

PUBLICATIONS DE L'INSTITUT NATIONAL  
POUR L'ÉTUDE AGRONOMIQUE DU CONGO BELGE  
(I. N. É. A. C.)

Symbiose  
*Rhizobium* - Légumineuses  
en région équatoriale

PAR

**Charles BONNIER**

Chef de Travaux à l'Institut agronomique de l'État à Gembloux  
Associé du Fonds National de la Recherche Scientifique  
Chargé de mission de l'I. N. É. A. C.

---

SÉRIE SCIENTIFIQUE N° 72  
1957

---

---

PRIX : 60 F

---

**Institut National pour l'Étude Agronomique du Congo Belge**  
**I. N. É. A. C.**

(A. R. du 22-12-33 et du 21-12-39).

L'INÉAC, créé pour promouvoir le développement scientifique de l'agriculture au Congo belge, exerce les attributions suivantes :

1. Administration de Stations de recherches dont la gestion lui est confiée par le Ministère des Colonies.
2. Organisation de missions d'études agronomiques et formation d'experts et de spécialistes.
3. Études, recherches, expérimentation et, en général, tous travaux quelconques se rapportant à son objet.

**Administration :**

**A. COMMISSION**

*Président :*

**S.A.R. le Prince ALBERT de Belgique.**

*Vice-Président :*

**M. JURION, F.,** Directeur général de l'I.N.É.A.C.

*Secrétaire :*

**M. LEBRUN, J.,** Secrétaire général de l'I.N.É.A.C.

*Membres :*

**MM. BOUILLENNE, R.,** Membre de l'Académie royale des Sciences, des Lettres et des Beaux-Arts de Belgique;

**BRIEN, P.,** Membre de l'Académie royale des Sciences coloniales;

**DEBAUCHE, H.,** Professeur à l'Université Catholique de Louvain;

**DE WILDE, L.,** Professeur à l'Institut Agronomique de l'État, à Gand;

**DUBOIS, A.,** Directeur de l'Institut de Médecine Tropicale « Prince Léopold », à Anvers;

**DUMON, A.,** Professeur à l'Institut Agronomique de l'Université Catholique de Louvain;

**GEURDEN, L.,** Professeur à l'École de Médecine Vétérinaire de l'État, à Gand;

**GILLIEAUX, P.,** Membre du Comité Cotonnier Congolais;

**GUILLAUME, A.,** Président du Comité Spécial du Katanga;

**HARROY, J.-P.,** Vice-Gouverneur général, Gouverneur du Ruanda-Urundi;

**HELBIG DE BALZAC, L.,** Président du Comité National du Kivu;

**HENRARD, J.,** Directeur de l'Agriculture, Forêts, Élevage et Colonisation, au Ministère des Colonies;

**HOMÈS, M.,** Professeur à l'Université Libre de Bruxelles;

**LAUDE, N.,** Directeur de l'Institut Universitaire des Territoires d'Outre-Mer, à Anvers;

**MAYNÉ, R.,** Professeur à l'Institut Agronomique de l'État, à Gembloux;

**OPSOMER, J.,** Professeur à l'Institut Agronomique de Louvain;

**PEETERS, G.,** Professeur à l'Université de Gand;

**PONCELET, L.,** Météorologiste à l'Institut Royal Météorologique, à Uccle;

**ROBYNS, W.,** Membre de l'Académie Royale Flamande des Sciences, des Lettres et des Beaux-Arts de Belgique;

**SCHOENAERS, F.,** Professeur à l'École de Médecine Vétérinaire de l'État, à Cureghem;



**SYMBIOSE**  
***RHIZOBIUM*-LÉGUMINEUSES**  
**EN RÉGION ÉQUATORIALE**



PUBLICATIONS DE L'INSTITUT NATIONAL  
POUR L'ÉTUDE AGRONOMIQUE DU CONGO BELGE  
( I. N. É. A. C.)

Symbiose  
*Rhizobium* - Légumineuses  
en région équatoriale

PAR

**Charles BONNIER**

Chef de Travaux à l'Institut agronomique de l'État à Gembloux  
Associé du Fonds National de la Recherche Scientifique  
Chargé de mission de l'I. N. É. A. C.

SÉRIE SCIENTIFIQUE N° 72

1957



## TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION . . . . .	9
CHAPITRE PREMIER — <i>Influence du climat équatorial sur la fixation symbiotique de l'azote</i> . . . . .	11
1. Essais réalisés . . . . .	11
2. Observations et conclusions . . . . .	12
CHAPITRE II — <i>Les facteurs en cause</i> . . . . .	13
1. La plante . . . . .	13
2. Les bactéries . . . . .	14
3. Le milieu . . . . .	15
a) Le sol . . . . .	15
b) Le climat . . . . .	17
c) Les pratiques culturales . . . . .	17
CHAPITRE III — <i>Observations et essais effectués</i> . . . . .	18
1. Observations « in situ » . . . . .	18
a) Symbiose sur les plantes cultivées . . . . .	18
b) Symbiose en forêt . . . . .	29
c) Nodules foliaires des Rubiaceae . . . . .	33
2. Isolement de souches bactériennes . . . . .	33
a) Techniques utilisées . . . . .	33
b) Milieu de culture utilisé . . . . .	36
c) Caractères des souches isolées . . . . .	36
3. Cultures aseptiques de Légumineuses . . . . .	37
a) <i>Stylosanthes gracilis</i> . . . . .	37
b) <i>Arachis hypogaea</i> et <i>Soja hispida</i> . . . . .	38
4. Mise au point d'une technique d'inoculation des graines . . . . .	39
a) Utilisation de tourbe . . . . .	40
b) Utilisation de sciure de bois décomposée . . . . .	40
c) Utilisation de balles de riz . . . . .	41

5. Essais en vases de végétation . . . . .	42
a) <i>Soja hispida</i> . . . . .	42
b) <i>Arachis hypogaea</i> . . . . .	43
6. Essais en champs, dans les conditions de la pratique agricole. . . . .	44
a) <i>Soja hispida</i> . . . . .	44
b) <i>Medicago sativa</i> . . . . .	48
7. Essai d'inoculation de semences désinfectées . . . . .	48
8. Essai de conservation de souches dans le sol . . . . .	49
CHAPITRE IV — <i>Applications pratiques actuelles</i> . . . . .	51
1. Nécessité de l'inoculation des cultures . . . . .	51
2. Inoculation de toute nouvelle Légumineuse introduite . . . . .	52
3. Technique d'inoculation . . . . .	52
CHAPITRE V — <i>Problèmes à résoudre</i> . . . . .	53
1. Problèmes à résoudre dans l'immédiat . . . . .	53
a) Choix des Légumineuses . . . . .	53
b) Observations « in situ » . . . . .	55
c) Établissement de parcelles d'observation . . . . .	56
d) Isolement de souches . . . . .	56
e) Cultures aseptiques de Légumineuses. . . . .	57
f) Cultures en vases de végétation . . . . .	57
g) Essais en plein champ . . . . .	58
h) Mise au point de techniques d'inoculation . . . . .	59
2. Problèmes à résoudre dans un avenir plus éloigné . . . . .	60
a) Vérification périodique des souches utilisées . . . . .	60
b) Conservation et migration du <i>Rhizobium</i> dans le sol . . . . .	61
c) Propriétés immunologiques des souches de <i>Rhizobium</i> . . . . .	61
d) Influence de la longueur du jour sur la symbiose . . . . .	62
e) Influence des oligo-éléments du sol sur la symbiose . . . . .	63
f) Les fausses nodulations. . . . .	63
CONCLUSIONS GÉNÉRALES . . . . .	64
BIBLIOGRAPHIE. . . . .	65

## INTRODUCTION

Si l'on tente de dresser le bilan de l'azote, on est immédiatement frappé par la place qu'occupe la fixation symbiotique par les Légumineuses. Il n'est donc pas étonnant que, parmi tous les travaux consacrés à la Microbiologie du sol, l'étude de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses constitue un chapitre essentiel, particulièrement fécond en applications pratiques.

La plupart de nos connaissances à ce sujet ont été acquises en régions tempérées. A l'I.N.É.A.C. revient le mérite d'avoir saisi toute l'importance du phénomène pour les régions intertropicales, où le problème de la fertilité se pose avec une particulière acuité.

C'est dans cet esprit que nous fut confiée une mission en Afrique belge, de mai à septembre 1956. Le premier aspect de cette étude sur place, dans le cadre des cycles de l'alimentation minérale des plantes cultivées, devait comporter la recherche de races locales de *Rhizobium*, adaptées aux Légumineuses les plus intéressantes actuellement.

Nous tenons à remercier M. le Professeur P. MANIL qui a proposé à l'I.N.É.A.C. la collaboration de son Service et qui a compris tout l'intérêt de cette mission en Afrique équatoriale pour la poursuite de nos travaux en nous donnant aimablement toutes facilités pour l'accepter.

Il nous est agréable de témoigner ici de notre reconnaissance à MM. les Membres du Comité de Direction de l'I.N.É.A.C., qui ont jugé que les recherches en cause valaient la peine d'être entreprises et qui nous ont honoré de leur confiance.

Notre profonde gratitude va également à M. F. JURION, Directeur général, pour toute l'aide qu'il a bien voulu nous apporter dans la réalisation de notre mission, et à M. le Professeur J. LEBRUN, Secrétaire général, qui non seulement a suivi nos travaux avec beaucoup d'attention mais nous a spécialement encouragé par l'intérêt compréhensif qu'il a accordé à nos essais et par les avis particulièrement autorisés qu'il nous a dispensés.

## SYMBIOSE *RHIZOBIUM*-LÉGUMINEUSES

Auprès de M. M. LECOMTE, Directeur général en Afrique, et de M. J. HENRY, Directeur du Centre de Recherches à Yangambi, nous avons trouvé toutes les facilités désirables et toute l'aide requise pour la réussite de l'œuvre entreprise.

Le travail n'aurait pu être mené à bien sans l'assistance quotidienne des différentes Divisions intéressées au problème : Agrologie, Botanique, Plantes vivrières, Physiologie végétale, Phytopathologie.

Merci à tous les aimables collègues chez qui nous avons trouvé la plus efficiente collaboration.

## CHAPITRE PREMIER

### INFLUENCE DU CLIMAT ÉQUATORIAL SUR LA FIXATION SYMBIOTIQUE DE L'AZOTE

Depuis plus d'un demi-siècle, le problème de la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses, tant sous ses aspects scientifiques qu'économiques, a fait l'objet de nombreuses études. Les applications agronomiques qui en résultent, telle l'inoculation des semences, sont à ce point heureuses qu'il n'est plus besoin d'insister sur leur intérêt.

Toutefois, il convient de noter que la plupart des recherches ont été poursuivies dans des régions à climat tempéré. Rares sont les réalisations connues en zones intertropicales.

Il était donc logique, au début de ce travail, d'étudier les modalités de la fixation symbiotique d'azote, en régions équatoriales, milieu écologique essentiellement différent. Cela s'imposait d'autant plus que l'importance du phénomène dans cette partie du globe a été souvent contestée.

#### 1. Essais réalisés.

Pour observer l'intensité du phénomène dans les conditions équatoriales, le choix des espèces végétales à utiliser avait son importance. Comme nous connaissons le comportement de certaines Légumineuses, expérimentées en régions tempérées, nous avons, à dessein, choisi, pour ce premier essai, deux plantes cultivées en Belgique : *Medicago sativa* et *Trifolium pratense*. Leur comportement à Yangambi permettait de mieux mettre en évidence l'action climatique de ce nouveau milieu.

Les cultures furent réalisées aseptiquement en tubes de verre, selon notre technique habituelle<sup>1</sup>. Les plantules stériles étaient transférées

---

1. Les semences ont été désinfectées extérieurement par passages successifs dans l'alcool à 96° pendant une minute, dans HgCl<sub>2</sub> à 2,5 ‰ pendant cinq minutes et dans dix bains de rinçage à l'eau stérile. Les graines ainsi traitées ont été mises à germer sur le milieu de WRIGHT [1925]. Les plantules issues de graines imparfaitement désinfectées pouvaient donc être facilement éliminées.

en tubes à essai, contenant un milieu gélosé [NICOL et THORNTON, 1941] complètement dépourvu d'azote.

Pour *Medicago sativa*, 40 tubes ont été garnis chacun d'une plantule stérile, dont : 10 non inoculés servant de témoins;

10 inoculés au moyen de 1 cm<sup>3</sup> d'une suspension aqueuse de la souche S.22;

10 inoculés au moyen de 1 cm<sup>3</sup> d'une suspension aqueuse de la souche S.2251;

10 inoculés au moyen de la même quantité d'une suspension de la souche S.2252.

Ces trois souches, apportées de Belgique, sont spécifiques de *Medicago* et particulièrement actives au point de vue de la fixation.

Pour *Trifolium pratense*, 40 tubes ont été garnis d'une plantule stérile, dont : 20 non inoculés comme témoins;

20 inoculés au moyen de 1 cm<sup>3</sup> d'une suspension aqueuse de la souche S.50, isolée en Belgique.

A part le climat, les conditions expérimentales étaient identiques à celles réalisées habituellement en Belgique.

## 2. Observations et conclusions.

Dans les tubes traités, les premiers nodules sont apparus, pour la luzerne, neuf jours après l'inoculation et, pour le trèfle, après sept jours déjà. Par rapport à ce qu'on observe en Belgique, la nodulation est plus rapide à Yangambi; on note une différence de trois jours pour *Medicago* et de cinq jours pour *Trifolium*.

D'autre part, on peut affirmer qu'il y a eu fixation « effective » d'azote. En effet, alors que les plantules non traitées restent petites, jaunâtres et offrent les symptômes caractéristiques de la carence en azote, celles des tubes inoculés présentent un très beau développement, des feuilles bien vertes et de la leghémoglobine dans les nodules<sup>1</sup>, autant de critères de l'action positive du *Rhizobium*.

Celle-ci a d'ailleurs été confirmée, au cours de multiples observations ultérieures, sur cultures en milieu aseptique (*Arachis*, *Stylosanthes*), en vases de végétation (*Arachis*, *Soja*) et en plein champ (*Soja*).

Il est intéressant de noter que, sur *Medicago* non inoculé, on remarque, aux points d'insertion des racines secondaires, de petites

---

1. La leghémoglobine est indispensable au phénomène biochimique qu'est la fixation et sa présence constitue, par elle seule, une preuve de l'efficacité de la symbiose. Les nodules « ineffectifs » ne contiennent jamais ce pigment. De plus, pour une même espèce, il y a corrélation entre la quantité d'azote fixée et la teneur des nodosités en leghémoglobine [VIRTANEN, 1955].

## FACTEURS EN CAUSE

intumescences anormales. Cette multiplication cellulaire, qui ne se rencontre que sur les sujets non traités, résulte, croyons-nous, d'une action particulière du climat.

On peut se demander si, quantitativement, l'apport d'azote est aussi intense qu'en conditions tempérées. A première vue, on pourrait en douter étant donné l'incidence de certains facteurs climatiques, par exemple la longueur du jour relativement faible, comparée à celle que l'on observe ailleurs, en période de pleine végétation. Le facteur lumière revêt, en effet, une grande importance [BONNIER et SIRONVAL, 1956; SIRONVAL, BONNIER et VERLINDEN, 1957]. Nous verrons par la suite qu'il est possible de répondre affirmativement à la question posée; des essais réalisés à Yangambi et rapportés plus loin sont significatifs à cet égard,

En définitive, en zone équatoriale où l'activité du *Rhizobium* peut s'exercer toute l'année, la quantité d'azote fixée, ou tout au moins fixable, apparaît comme devant être nettement supérieure à celle observée en régions tempérées.

## CHAPITRE II

### LES FACTEURS EN CAUSE

Pour comprendre le problème de la fixation symbiotique en régions équatoriales, il convient de s'arrêter d'abord à l'examen des facteurs déterminants de ce phénomène : la plante, le *Rhizobium* et le milieu.

#### 1. La plante.

Parmi les 10.000 à 12.000 espèces que compte la famille des Légumineuses, beaucoup ont leur habitat dans les régions intertropicales. Aussi, au début d'un travail d'ensemble concernant la fixation symbiotique, y a-t-il tout intérêt à multiplier les observations sur le plus grand nombre possible d'espèces afin de se rendre compte du degré de généralisation et de l'intensité du phénomène dans la nature.

Pour qui envisage l'application phytotechnique, il y a lieu d'effectuer un choix économique parmi le grand nombre de Légumineuses cultivées au Congo : en fait, chacune d'elles a des exigences propres en ce qui concerne les souches bactériennes.

De plus, il faut souligner que la sélection de races de *Rhizobium* très actives doit être également envisagée pour les plantes à introduire.

En effet, toute nouvelle espèce n'a de chances sérieuses de s'adapter que si elle est placée dans des conditions qui permettent l'établissement d'une symbiose active.

## 2. Les bactéries.

La présence ou l'absence de nodosités radiculaires fournit un critère simple de l'existence dans le sol considéré de souches spécifiques de *Rhizobium*.

D'autre part, l'observation de l'état physiologique de la plante permet déjà de porter un jugement sur la valeur des souches présentes, tout au moins quant à leur capacité fixatrice. A cet égard, le critère le plus caractéristique est la couleur interne des nodosités. Lorsqu'elle est blanche, les nodules ne présentent aucun intérêt pour la plante et peuvent même être nuisibles.

Par contre, la présence de leghémoglobine est un signe évident de la fixation. Toutes conditions étant égales, la teinte rouge due à ce composé essentiel peut varier du rose pâle, pour les nodules peu fixateurs, au rouge brun foncé pour ceux de haute « efficacité » [VIRTANEN, 1955].

Aussi, toute sélection de souches doit-elle se faire à partir de nodules contenant un pourcentage élevé de leghémoglobine. La capacité fixatrice et la spécificité doivent naturellement être vérifiées expérimentalement, selon des techniques et des critères bien établis [MANIL et BONNIER, 1950].

Avant de passer à l'inoculation, une troisième qualité, le « pouvoir compétitif », défini par NICOL et THORNTON [1941], est requise et se détermine par des essais en vases de végétation et en pleine terre. En effet, si on veut inoculer des graines, il ne suffit pas de disposer d'une race spécifique très active; il faut, de plus, que sa « valeur compétitive » soit élevée. Sans cette qualité, la souche pourrait perdre son « efficacité » par suite d'une colonisation éventuelle des racines par une souche autochtone de moindre valeur. Seuls des essais dans les conditions de la pratique agricole pourront nous renseigner à cet égard.

De plus, quand on dispose de races exceptionnelles au point de vue de la fixation, il est parfois utile d'inoculer les graines, même là où le sol contient naturellement des souches spécifiques et actives, pour autant que le matériel dont on dispose soit doué d'un pouvoir « compétitif » très élevé. Les propriétés antigéniques des bactéries fournissent des méthodes précises qui permettent l'identification de races diverses de *Rhizobium* et, partant, la détermination de cette valeur « compétitive » [MANIL et BONNIER, 1950; POCHON *et al.*, 1950 *a* et *b*].

### 3. Le milieu.

Ce troisième facteur, qui intervient dans l'établissement d'une symbiose active, conditionne en définitive la colonisation des racines, l'intensité de la fixation, la survivance des souches, etc.

Il revêt une importance toute particulière, en régions équatoriales notamment.

#### a. LE SOL :

##### *L'acidité.*

Dans la Cuvette congolaise, le sol, du fait de son pH généralement très bas, est défavorable au phénomène qui nous intéresse. MANIL [1945] rapporte les essais de FRED et DAVENPORT, de BRYAN, qui ont établi des valeurs de pH d'arrêt inférieur, pour des souches isolées de différentes Légumineuses.

A part certaines souches, isolées par exemple de *Soja hispida* ou de *Lupinus* qui résistent à des pH aussi bas que 3,3-3,15, les valeurs signalées sont, pour d'autres races, au-dessus ou à la limite de celles couramment observées en sols équatoriaux. Personnellement, nous avons d'ailleurs observé que la plupart des souches dont nous disposons ont un développement freiné en milieu liquide, au fur et à mesure que le pH de celui-ci diminue. Si certaines souches résistent à des pH assez bas, on observe généralement un ralentissement sensible du développement [BONNIER, s.d.].

Il est probable, cependant, qu'une certaine adaptation des diverses races peut se produire dans les conditions naturelles. Cela ne peut que souligner l'importance économique des procédés d'inoculation au moyen de souches bien étudiées.

Le pH du sol, nous le verrons plus loin, conditionne aussi la technique à utiliser pour l'inoculation. En effet, durant la période critique qui s'étend entre le semis et l'établissement de la symbiose, il s'agit de protéger la bactérie inoculée, vis-à-vis de l'action éventuellement défavorable du sol, reflétée par le pH. Une fois la symbiose installée, le complexe plante-bactérie forme un tout homogène et le *Rhizobium*, vivant de la plante et pour elle, est plus ou moins à l'abri des mauvaises conditions du milieu.

Il a d'ailleurs été démontré pour les *Trifolium* que les plantes, inoculées par trempage, ne portent aucun nodule si le pH du sol descend en dessous de 5 [ANDERSON, 1956]. Ce fait à lui seul peut expliquer bien des échecs signalés lors d'essais d'inoculation, en sols équatoriaux, par la méthode classique du trempage des graines dans une culture bactérienne liquide.

*Les réserves en calcium.*

Tous les auteurs sont d'accord pour attribuer au calcium une grande importance dans la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses. Cette action utile n'est pas seulement due au relèvement du pH, comme on pourrait s'y attendre, mais encore à l'action bien spécifique de l'ion calcium. Les études de MAC CALLA [1937], entre autres, montrent clairement que non seulement une grande quantité de cet élément est essentielle pour favoriser une multiplication abondante du *Rhizobium* mais aussi que, si cet organisme est privé de calcium, il se transforme en une forme anormale, chromogène, incapable d'envahir la plantule. La forme normale de *Rhizobium*, elle-même, envahit très difficilement les plantes-hôtes privées de calcium. ALBRECHT [1937] a même émis l'hypothèse selon laquelle la teneur en cet élément aurait un rôle déterminant dans la formation des nodules.

A ce point de vue, encore, les sols équatoriaux sont peu favorables à la symbiose, par suite de leurs faibles réserves en calcium.

*Les réserves en éléments assimilables : P, K, Mg, S, etc.*

Il est évident que l'inoculation ne peut entraîner une fixation importante d'azote que si les réserves du sol en éléments biogènes sont suffisantes et « équilibrées ».

Dans les sols généralement pauvres de l'Afrique centrale, il est indispensable d'associer le problème de l'inoculation pratique des semences de Légumineuses au problème général de la fertilité si on ne veut pas aller au devant d'échecs certains.

*Les réserves en oligo-éléments.*

Il a été démontré que certains oligo-éléments jouent un rôle important dans le phénomène biochimique qu'est la fixation symbiotique.

Le molybdène tout particulièrement s'est révélé d'une nécessité absolue. A ce point de vue, les observations de : VIRTANEN [1955], HEWITT [1956], ANDERSON [1956], EVANS [1956], DAVIES [1956], PURVIS et PETERSON [1956] et REISENAUER [1956] sont particulièrement caractéristiques.

Un autre oligo-élément, le bore [MULDER, 1953] a aussi son importance.

Il est donc tout indiqué d'étudier le phénomène de la symbiose en relation avec le problème des carences en éléments mineurs, principalement en molybdène.

*La température du sol.*

Certaines observations faites à Yangambi montrent que la température de la couche superficielle du sol, exposé sans protec-

## FACTEURS EN CAUSE

tion au soleil, peut atteindre 50 °C, température létale pour le *Rhizobium*.

Une inoculation exécutée selon les procédés classiques (trempage des semences dans une culture liquide) risque donc de rester sans effet, étant donné que les bactéries utilisées peuvent être exposées, sans défense, à des températures trop élevées.

### *Dessiccation et délavement.*

Le *Rhizobium*, introduit artificiellement dans le sol, est exposé également à d'autres facteurs défavorables. En effet, le terrain, même en saison des pluies, se dessèche très rapidement au point de constituer un milieu nuisible aux bactéries retenues, sans protection, à la surface des graines.

Le délavement, facteur à ne pas négliger, spécialement dans les sols peu argileux, est capable d'entraîner les bactéries qui entourent les semences.

## b. LE CLIMAT.

L'essai de culture en tubes stériles, de plantules de *Medicago* et de *Trifolium* inoculées, relaté au chapitre I, indique d'une façon nette que la température et l'humidité sont particulièrement favorables à l'établissement de la symbiose.

Un troisième facteur, la luminosité, présente une grande importance.

Il découle des travaux de différents auteurs, ainsi que des observations que nous avons faites sur *Soja*, en collaboration avec SIRONVAL [1956 et 1957] que, pour une souche « effective » donnée, la quantité d'azote fixée est directement proportionnelle à la longueur du jour. En d'autres termes, la formation de la leghémoglobine dans les nodules est directement liée à l'activité chlorophyllienne.

En régions tempérées, la période de végétation intense se situe au moment où les jours sont les plus longs (plus ou moins seize heures). En régions équatoriales, la longueur du jour est limitée à 12 heures environ, ce qui, à priori, semble moins favorable au phénomène en cause.

## c. LES PRATIQUES CULTURALES.

Certaines pratiques culturales, par suite de leur influence sur l'efficacité de l'inoculation, exigent un examen sérieux. C'est ainsi que la désinfection de certaines graines (*Arachis* notamment), au moyen de produits déterminés (les organo-mercuriques par exemple), rend l'inoculation inopérante si elle est effectuée par trempage.

On verra plus loin qu'il est possible de concilier les deux opérations.

## CHAPITRE III

### OBSERVATIONS ET ESSAIS EFFECTUÉS

#### 1. Observations « in situ ».

La première partie du travail consistait logiquement à multiplier les observations sur le phénomène de symbiose dans les conditions naturelles.

Le résultat de ces examens doit en effet constituer la base de tout travail : isolement de souches; étude détaillée des *Rhizobium* isolés, aux différents points de vue de la spécificité, de l'« effectivité » et de la valeur « compétitive »; utilité des pratiques d'inoculation et techniques à mettre au point; essais comparatifs, etc.

Les premières observations ont trait aux plantes cultivées, dans les conditions de la pratique agricole du lieu. Les secondes sont relatives aux espèces forestières, examinées dans leur habitat naturel.

##### a. SYMBIOSE SUR LES PLANTES CULTIVÉES.

De vastes possibilités de prospection s'offraient dans le cadre du Centre de Recherches de Yangambi. Le Jardin botanique, les collections agrostologiques, les parcelles des Divisions des Plantes vivrières et du Caféier, l'Essai de Phytotechnie générale, les parcelles cultivées par des agriculteurs, isolés ou groupés en paysannats, ont fourni un matériel très vaste dont l'observation a constitué une de nos activités principales.

En principe, toute Légumineuse rencontrée offrait de l'intérêt et méritait notre attention.

Sans vouloir, dès à présent, établir une classification parmi toutes ces espèces, nous rapporterons, pour les plus intéressantes d'entre elles, les observations effectuées.

##### *Arachis hypogaea* L.

Les nodules de *Arachis* sont de forme très régulièrement arrondie, lisses extérieurement, de même teinte que la racine; leur diamètre dépasse rarement 4 à 5 mm. Répartis régulièrement sur tout le système racinaire, ils peuvent être très abondants. A Lilanda, de nombreuses parcelles ont été observées de mai à septembre. Le nombre de nodosités et l'intensité de la fixation ont été très variables. Quelques plantes étaient garnies de nodules nombreux et actifs, à en juger par leur contenu en leghémoglobine, de teinte rouge sang caractéristique. D'autres touffes, situées dans le même champ, étaient par contre

complètement dépourvues de nodules, même « ineffectifs ». Enfin, certaines présentaient tous les stades : présence de quelques nodules « ineffectifs » ou, à la fois, de nodules les uns inactifs et les autres légèrement rosés à l'intérieur.

Ces fluctuations, indépendantes de la variété cultivée, se rencontrent dans le même milieu, le complexe cultural de la Lilanda, dont les caractéristiques pédologiques semblent cependant assez homogènes (sol sablonneux, léger et aéré). A noter que précédemment, les mêmes parcelles avaient déjà été ensemencées en arachides.

Au moment de la récolte, effectuée en août, les observations ont pu être largement multipliées. Les plantes sont alors déterrées et étalées en bottes sur le champ. Certaines d'entre elles se sont révélées totalement dépourvues de nodules. D'autres groupées en plages de quelques mètres carrés en portaient quelques-uns avec tous les degrés de fixation depuis l'« effectivité » très grande (couleur rouge sang de la nodosité) jusqu'à l'« ineffektivité » absolue en passant par tous les stades intermédiaires.

En dehors de Lilanda, tous les plants d'arachide examinés ont montré cette même irrégularité de nodulation, sans qu'on puisse jamais la lier à la variété ou à la situation.

#### *Les faux nodules.*

Dans le complexe cultural de la Lilanda, nous avons fait une observation d'un intérêt tout particulier : de nombreuses touffes d'arachide portaient de fausses nodulations qui, morphologiquement, diffèrent assez peu des vraies nodosités dues au *Rhizobium*. Ces formations extrêmement abondantes sur le système racinaire se confondent facilement, lors d'un examen superficiel, avec les nodules vrais.

Comment peut-on les distinguer ?

1. Alors que les nodosités vraies, nettement séparées des racines sur lesquelles elles prennent naissance, s'en détachent aisément, les faux nodules, par contre, font, le plus souvent, partie intégrante de la racine au point qu'il est impossible de les en isoler.

2. Ces derniers ont une forme plus irrégulière, moins nettement arrondie. Souvent, plusieurs d'entre eux s'intègrent jusqu'à former une masse plus ou moins informe, dont chaque constituant ne peut être séparé sans blessure.

3. Tous sont uniformément blancs à l'intérieur et ne contiennent jamais la moindre coloration rose, indicatrice de la présence de leghémoglobine.

4. Malgré les nombreux essais effectués, nous n'avons pu, dans aucun cas, isoler de bactéries à partir de ces néoformations qui, par ailleurs, ne sont pas dues aux anguillules.

A notre connaissance, seuls ALLEN et ALLEN [1940] décrivent des proliférations atypiques, formées à la base des racines secondaires ou à l'aisselle des racines latérales de *Arachis*. Comme nous, ces auteurs ont observé que, le plus souvent, ces proliférations bulbeuses entourent complètement la radicelle et forment un collier à la jonction radiculaire.

ALLEN et ALLEN affirment également qu'il n'y a aucune trace de colonisation par des microorganismes, à aucun stade du développement, fait que nous avons vérifié. Par contre, ces auteurs prétendent que les cellules de ces faux nodules sont bourrées de grains d'amidon; ces proliférations apparaîtraient donc comme des organes de réserve. Personnellement, nous n'avons pas observé la présence de quantités anormales d'amidon. Cependant, il convient de faire remarquer que nos examens n'ont pu être effectués sur des faux nodules en formation. Il est possible, qu'à l'état jeune, leur contenu en amidon soit temporairement assez élevé, puis, peut-être, diminue par la suite.

Ajoutons que ALLEN et ALLEN attribuent la formation de ces faux nodules à des substances auxiniques produites par des microorganismes présents dans la rhizosphère. Cette explication devrait être vérifiée, dans le cas qui nous occupe. Au point de vue histologique, ces excroissances apparaissent comme des proliférations du parenchyme cortical, sans différenciation.

Les auteurs cités ajoutent que ces faux nodules sont sans effet sur la croissance de la plante. Tel n'est pas notre avis, à la suite des observations faites à Yangambi. Les plants d'arachide qui en sont porteurs présentent généralement un aspect moins vigoureux; cela s'explique facilement si l'on considère que ces proliférations, extrêmement abondantes sur la racine, n'ont aucune capacité au point de vue de la fixation de l'azote de l'air et qu'elles se forment au détriment de la substance du végétal, sans aucun profit pour celui-ci.

Autre fait à signaler : jamais, nous n'avons observé la présence simultanée, sur des racines, de vrais et de faux nodules, malgré les très nombreuses observations réalisées. Y-a-t-il incompatibilité entre les uns et les autres? N'existe-t-il aucune relation entre les deux phénomènes? Quelle est la nature exacte de ces faux nodules? Leur abondance est-elle liée, à la suite d'un processus inconnu, au retour de l'arachide sur elle-même, dans le même champ? Autant de questions dont l'intérêt est réel et qui mériteraient une certaine attention, aux points de vue tant scientifique qu'économique.

#### *Soja hispida* M.

Les nodules de *Soja*, normalement assez volumineux, peuvent atteindre 1 cm de diamètre. D'aspect ridé, sillonnés de lignes blanches, ils sont répartis sur tout le système radiculaire.

Ici encore, ce sont surtout les champs de la Division des Plantes vivrières qui ont fait l'objet de nos observations. Pendant tout le cours de la végétation, de nombreuses plantes ont été prélevées au hasard, dans les diverses parcelles du Km 17. C'est seulement après la floraison que nous avons noté la présence de l'un ou l'autre nodule, peu « effectif », selon les apparences. Par contre, alors que les variétés hâtives étaient déjà récoltées, nous avons remarqué, notamment sur des types plus tardifs, la présence de nodules actifs, moyennement nombreux. Certains de ceux-ci étaient d'un aspect particulièrement intéressant : très grandes dimensions, pouvant atteindre plus de 1,5 cm de diamètre, et rouge très foncé à l'intérieur. Ils constituaient un matériel de choix pour l'isolement de souches à sélectionner.

Cette situation, caractérisée par l'absence de nodules pendant la plus grande partie de la croissance et par la présence de quelques nodosités très actives en fin de végétation, pourrait s'expliquer par le fait que le sol ne contient, à l'origine, qu'un très faible nombre de *Rhizobium* spécifiques. La fixation d'azote ne s'installe qu'en fin de développement, sur des types fourragers notamment. A ce stade, la fixation, si elle est utile au sol, n'offre plus grand intérêt pour la récolte. Elle semble même, au contraire, retarder la maturation des graines.

Cet état de choses fait ressortir la nécessité absolue de l'inoculation préalable des graines de *Soja*, au moyen de souches bactériennes appropriées, pour des milieux semblables à ceux du Km 17. C'est la seule manière de fournir à la plante, dès le début de la végétation, l'azote qui lui est indispensable.

A Lilanda, nous avons noté dans des parcelles de manioc succédant à du *Soja*, des plantules de cette dernière Légumineuse, absolument dépourvues de nodules.

Dans de nombreux autres endroits, les mêmes observations ont été faites : généralement, absence de nodules; dans l'un et l'autre cas, présence de nodosités « effectives ».

En résumé, on peut conclure que, pour *Soja hispida*, la situation apparaît nettement plus mauvaise encore que pour *Arachis*, où elle est déjà peu satisfaisante.

#### *Phaseolus* sp.

Sur *Phaseolus*, les nodules se présentent normalement sous une forme assez régulière. De dimensions relativement importantes, ils sont, comme chez *Soja* d'ailleurs, généralement moins nombreux que sur *Arachis*. A la suite des observations effectuées, nous croyons pouvoir établir une relation inverse entre la grosseur des nodules et leur nombre. Il semble bien que, toutes choses égales d'ailleurs, une fixation d'azote intense nécessite une certaine quantité de tissu nodulaire actif. Il faut

pour cela que les nodules soient de dimensions relativement grandes ou, s'ils sont peu volumineux, en nombre assez élevé.

Quoi qu'il en soit, signalons qu'ici encore la nodulation apparaît comme très irrégulière et, le plus souvent, insuffisante, sur *Phaseolus angularis* WIGHT notamment où il y a relativement peu de nodules actifs.

Notons aussi la présence assez générale sur des plantes de *Phaseolus* de galles dues aux anguillules. Il convient de ne pas confondre ces excroissances avec des nodosités. Les néoformations dues aux nématodes sont des proliférations de la racine qui se gonfle, se boursouffle pour donner des formes très irrégulières. Une coupe dans ces racines tuméfiées permet de retrouver facilement les agents parasitaires. Nous avons été surpris de constater sur *Phaseolus*, comme sur d'autres genres où nous signalerons le fait, la présence assez abondante de cette forme de parasitisme. Cette présence est trop fréquente pour être négligeable.

#### *Vigna sinensis* (L.) ENDL.

Les nodules sont assez gros, sillonnés extérieurement. Nous n'avons observé dans le domaine de Yangambi que très peu de plantes de *Vigna sinensis*, principalement au « couloir P.V. », dans les parcelles de l'Essai de Phytotechnie générale. Les sujets examinés étaient relativement bien « nodulés » et la fixation apparaissait comme certaine, tout au moins sur les quelques plantes prélevées parmi celles qui nous ont été signalées. A noter, ici aussi, la présence de galles dues aux nématodes.

#### *Stylosanthes* sp.

Sur *Stylosanthes*, les nodules se forment surtout sur la racine principale. Distincts les uns des autres, de petite taille, régulièrement arrondis et lisses, ils sont collés en amas, parfois abondants.

Il existe à Yangambi d'assez nombreuses parcelles de *Stylosanthes gracilis* H.B.K. Au point de vue qui nous intéresse, les plus beaux spécimens ont été observés dans les caféières de l'Essai de Phytotechnie générale. Il s'agissait de plantules relativement jeunes, issues de semis naturel, après enlèvement d'une couverture de la même espèce. Les plantes, d'aspect très sain, portaient d'assez nombreux nodules, dont la couleur rose interne transparaissait à l'extérieur. Ces plants se développaient donc sur une parcelle qui avait porté, précédemment déjà, du *Stylosanthes*. Rappelons que des observations antérieures [BONNIER, 1950 et 1951] et des essais de semis successifs ont précisément montré qu'une Légumineuse déterminée, introduite dans un sol apparemment dépourvu de *Rhizobium* spécifique, portait finalement des nodules actifs, après plusieurs semis successifs ou à la fin d'une assez longue période de végétation.

Par contre, là où il est d'introduction toute récente, le *Stylosanthes* ne porte que très peu de nodules « effectifs » au point qu'il a fallu chercher longtemps le matériel nécessaire à l'isolement de bonnes souches. Sur les jeunes plants issus de semis naturel, dans les caféières de l'Essai de Phytotechnie générale la nodulation est relativement bonne, et a pu fournir le matériel adéquat pour des isolements. Parmi tous les *Stylosanthes* examinés, ce sont les seuls qui soient apparus satisfaisants. Signalons cependant que, à la presque île Lokele, où la situation est généralement la même que partout ailleurs, une plage de quelques mètres carrés avec des nodules meilleurs nous fut signalée (J. CULOT) sans que nous puissions expliquer la raison de cette particularité. Dans une parcelle de la Division de Phytopathologie, nous avons observé des nodules verdâtres, eux aussi « ineffectifs ».

Aucune différence appréciable dans l'état de la nodulation n'est apparue parmi les différentes variétés de *Stylosanthes*. L'observation comparative était cependant aisée, dans les collections agrostologiques.

En bref, la situation n'est pas satisfaisante, particulièrement pour une plante de couverture, dont le rôle consiste, entre autres, à enrichir le sol en azote.

#### *Pueraria* sp.

Chez *Pueraria javanica* (BENTH.), les nodules peuvent atteindre la grosseur d'un pois et sont répartis sur tout le système racinaire.

Au Jardin agrostologique, nous avons observé, au sein d'une parcelle d'aspect chlorotique, une plage d'un vert très foncé dont les plants portaient de gros nodules, rouge foncé intérieurement. Il convient de noter que, à cet endroit, le sol était couvert de charbon de bois. Sans vouloir discuter ici de l'influence possible de ce dernier, — on y reviendra plus loin, — rapprochons de ces observations celles de ANDERSON et SPENCER [1948]. Ces auteurs ont fait les constatations suivantes sur des parcelles de trèfle, généralement dépourvues de nodules, établies en Australie (New South Wales) :

« A few small, isolated, patches of normal dark green clover, invariably well nodulated, occurred on the trials. These patches were erratically distributed and were not associated with any specific treatment. An obvious concentration of charcoal was often found on the ground at those patches. »

De telles observations semblent intéressantes à vérifier; leur utilité est évidente, aux points de vue tant scientifique qu'économique, ne fût-ce que dans le choix des méthodes pour un travail de sélection de souches actives.

Une seconde constatation à faire sur la nodulation naturelle de *Pueraria* mérite d'être mentionnée. Là où des plants de *P. javanica* se développent, sur un tronc ou une souche en décomposition, les

racines qui pénètrent à l'intérieur portent systématiquement de nombreux et beaux nodules (J. CULOT).

En dehors de ces situations particulières, les différentes parcelles de *Pueraria* examinées sont également d'une grande irrégularité au point de vue de la nodulation : absence totale de nodosités sur certaines plantes, présence sur d'autres de nodules plus ou moins « effectifs ».

Il faut noter également que les galles dues aux nématodes sont assez communes sur *Pueraria*.

*Mimosa invisa* MART.

Cette espèce est la seule qui, examinée dans des situations fort diverses, se soit montrée le plus souvent en excellente situation au point de vue qui nous occupe.

Sur la grande majorité des plantes rencontrées, de nombreux nodules ont été observés; ils sont assez longs et étroits, roses extérieurement, avec une surface ponctuée de points rouges caractéristiques. A en juger par l'aspect des plantes, par leur excellent état physiologique et par les nodules abondants et rouges, la fixation d'azote est intense.

En raison de ses qualités excellentes, cette espèce apparaît tout particulièrement intéressante à expérimenter, comme plante de couverture et de sidération. Elle est d'ailleurs envahissante dans certaines situations à Yangambi. Le type courant offre le grand désavantage d'être couvert d'épines, ce qui rend les travaux pénibles, voire impossibles. Il existe cependant une forme inerme (f. *inermis*) qui présente les mêmes qualités.

*Desmodium* sp.

Les nodules de différents *Desmodium*, *D. intortum* FAWC. et RENDLE et *D. adscendens* (SW.) DC., sont moyens à petits, sillonnés sur leur surface externe et répartis sur tout le système racinaire.

Chez *D. intortum*, la situation est sensiblement la même que chez *Pueraria* : nodules parfois assez nombreux, mais de faible activité en général. Par contre, sur *D. triflorum* (L.) DC., espèce relativement abondante dans les pelouses, on observe en certains endroits de nombreux petits nodules actifs; ces plages contrastent souvent avec des surfaces jaunes où l'activité fixatrice est faible ou nulle.

*Crotalaria* sp.

Sur aucun des *C. goreensis* GUILL. et PERR. observés à Yangambi (au Jardin agrostologique notamment), nous n'avons rencontré de nodules « effectifs ».

Par contre, *C. longithyrsa* var. *latifolia* WILCZEK, espèce d'apparence très rustique et très commune le long de la route de Stanleyville (rive

droite) porte de nombreuses nodosités rouge sang, sur tout son système racinaire.

*Canavalia ensiformis* DC.

Les nodules « effectifs » ou « ineffectifs » de *C. ensiformis*, tous de forme très irrégulière et branchue, sont très caractéristiques. Il s'agit des nodosités aux formes les plus tourmentées que nous ayons jamais observées. Elles sont le plus souvent composées et présentent des fasciations assez typiques. En raison de leurs formes très irrégulières, elles peuvent être assez facilement confondues avec les galles des nématodes, particulièrement fréquentes sur *Canavalia*.

Fait à noter, on trouve souvent sur le même nodule des appendices dont les tissus internes sont roses et d'autres incolores.

Dans les parcelles de la Division des Plantes vivrières, au Km 17 et à l'Essai de Phytotechnie générale, la nodulation était très peu satisfaisante en début de végétation. Par la suite, les nodules, d'« efficacité » variable, sont plus fréquents. Notre attention a été attirée par l'aspect de certains nodules, que nous qualifierons d'intermédiaires et auxquels nous attribuons un certain intérêt.

*Observations sur les formes « intermédiaires ».*

En rapport avec nos travaux antérieurs, relatifs à la spécificité de l'hôte dans le genre *Rhizobium*, nous avons eu l'occasion de procéder à Yangambi à des observations intéressantes. Elles permettent de se faire une idée plus précise de la situation naturelle des Légumineuses, au point de vue symbiotique.

Tout d'abord, il est nécessaire d'exposer brièvement le problème de la spécificité, tel que nous le concevons à la lumière d'essais antérieurs (BONNIER, 1953).

Certains auteurs ont voulu subdiviser le genre *Rhizobium*, en se basant sur l'aptitude que présentent les différentes souches à coloniser tel ou tel groupe de Légumineuses. Alors que les uns reconnaissent deux espèces, d'autres en distinguent jusqu'à trente-deux. Sans doute, par la méthode des inoculations croisées, c'est-à-dire l'inoculation de Légumineuses en culture aseptique au moyen de souches isolées d'autres espèces, on peut facilement observer qu'une race déterminée de *Rhizobium* est capable de produire une nodulation « effective » sur des hôtes différents. Mais ce comportement est tellement irrégulier et variable suivant les auteurs et le milieu considéré, qu'il nous semble hasardeux de vouloir établir une classification, basée sur des inoculations croisées. WILSON [1939] qui réalisa de très nombreux essais est arrivé d'ailleurs aux mêmes conclusions.

De plus, il n'existe aucun autre caractère microscopique, macroscopique, biochimique et même immunologique, capable de diffé-

rencier, d'une façon absolue, les *Rhizobium* spécifiques de telle ou telle espèce. Nous ne pouvons nous étendre ici sur tous les faits qui viennent appuyer cette affirmation; certes, il y a des différenciations possibles, mais elles ne sont pas liées à la spécificité de l'hôte. Nous croyons plutôt que les *Rhizobium* sont à considérer comme un vaste groupe de bactéries, possédant des caractères communs et capables, disons par adaptation, en utilisant ce terme dans son sens le plus large, de coloniser les espèces de la vaste famille des Légumineuses.

Tout en n'étant pas encore à même de détailler les mécanismes de cette « adaptation », nous pouvons rapporter tout au moins les faits suivants :

- On sait très bien qu'une Légumineuse déterminée peut ne pas former de nodules sur un sol qui contient néanmoins des *Rhizobium*, spécifiques d'autres espèces. Cependant, après trois ou quatre semis successifs, effectués sur le même substrat, on obtient des nodules en nombre de plus en plus élevé, pour finalement arriver à une fixation « effective » [BONNIER, 1950 et 1951].

- *Trifolium ambiguum* M. BIEB est une espèce fort intéressante au point de vue agronomique; originaire du Caucase, elle a été introduite aux États-Unis, où l'on s'est aperçu qu'elle était très difficilement colonisée par le *Rhizobium* dans les sols étudiés. Cette grande résistance à l'invasion constitue en somme une exception dans le genre *Trifolium*. Nous avons greffé sur *T. ambiguum*, *T. repens* et *T. pratense* [HELY, BONNIER et MANIL, 1953]. Par cette méthode, on a obtenu des nodules sur les sujets; de plus, la souche résoluée de ces nodosités était devenue capable, sans greffe cette fois, de provoquer la nodulation sur *T. ambiguum*. Nous avons multiplié les essais de greffes sur plusieurs genres de Légumineuses, avec des résultats généralement positifs [BONNIER, HELY et MANIL, 1952].

Les constituants biochimiques de la plante interviennent donc dans les mécanismes qui permettent à la bactérie de coloniser les racines. Ils sont même indispensables ainsi que l'ont prouvé des essais de cultures de racines. Jamais on n'est parvenu à faire noduler ces dernières, lorsqu'elles sont dépourvues de toute partie aérienne. Les travaux de NUTMAN [1953] montrent également que, parmi ces substances élaborées par la plante, les excréctions radiculaires jouent un rôle indispensable.

Comme le signale THORNTON [1954], les facteurs conférant à la plante la résistance à l'infection par le *Rhizobium* opèrent au niveau des poils radiculaires. D'autre part, NUTMAN [*op. cit.*] a montré, avons-nous vu, que les excréctions radiculaires jouaient un rôle certain dans l'établissement de la symbiose. Ces excréctions peuvent être favorisantes ou inhibitrices, sans qu'il soit exclu d'ailleurs que la même substance puisse avoir les deux effets selon la concentration.

Partant de ces faits, nous avons cherché à observer ce qui se passe lorsqu'on inhibe ces excréctions radiculaire, par l'utilisation d'un adsorbant. En cultures aseptiques, des plantules de *Trifolium* inoculées, en présence de charbon de bois stérile, d'une souche spécifique des *Medicago*, développent des excroissances radiculaire caractéristiques. De celles-ci, on peut réisoler la bactérie toujours capable d'infecter *Medicago*. Ces proliférations, de forme bien spéciale, ne présentent jamais, tout au moins au cours des premiers passages que nous avons pu faire jusqu'à présent, l'aspect extérieur de vraies nodosités. A l'origine, elles apparaissent toujours sous la forme d'un gonflement, d'un élargissement local de la racine. Dans certains cas d'inoculation de *Medicago sativa* à l'aide d'une souche spécifique des *Trifolium*, on a obtenu des nodules, en grappes difformes, qui n'avaient rien de commun avec les nodosités typiques de l'espèce considérée.

Jusqu'à présent, aucune trace de leghémoglobine n'a pu être décelée dans ces formations.

Histologiquement, le tissu des élargissements radiculaire, obtenus sur *Trifolium*, apparaît comme une prolifération du parenchyme cortical, sans aucune différenciation. Ces formes anormales peuvent être considérées, semble-t-il, comme des formes intermédiaires, vu que le *Rhizobium* inoculé peut en être réisolé. En régions tempérées, nous n'avons d'ailleurs jamais pu les observer dans la nature.

Au cours de multiples examens effectués à Yangambi, nous avons eu l'occasion de rencontrer, sur diverses espèces, des formes caractéristiques, semblables à celles observées dans les conditions artificielles (charbon de bois) rapportées ci-dessus. On en trouve en assez grand nombre sur les racines de *Desmodium adscendens*, *Mimosa invisa*, *Pueraria javanica*, *Phaseolus angularis* et, surtout, sur *Canavalia ensiformis*, bien souvent sur des racines portant également de vraies nodosités. Ces excroissances, comme celles observées *in vitro* en présence de charbon de bois, sont constituées par des « gonflements » de la racine, tout à fait typiques. Fait significatif, nous avons pu, dans nombre de cas, isoler de ces excroissances après un sévère traitement de désinfection externe, des souches bactériennes, macroscopiquement et microscopiquement indifférenciables des *Rhizobium*. Elles présentent notamment de nombreuses formes en Y, en X, en T, si caractéristiques des bactéries de la famille des *Rhizobiaceae*.

Ces néoformations ne peuvent être des nodosités en cours de développement. En effet, sur des espèces où les nodules sont nettement différenciés, les excroissances en cause ne consistent qu'en un simple accroissement local du diamètre de la racine. Elles diffèrent essentiellement des jeunes nodosités, dont il est aisé de suivre le développement ultérieur; ces dernières présentent d'ailleurs un aspect particulier à chaque espèce et identique à celui des nodosités adultes.

Il ne peut s'agir non plus, ni de faux nodules semblables à ceux signalés sur *Arachis* et dont aucun organisme ne peut être isolé, ni de galles dues aux nématodes, aisément identifiables.

A la suite de ces observations et des résultats obtenus lors de nos essais d'adaptation, en présence de charbon de bois, nous formulons l'hypothèse que ces nodosités anormales sont des formes intermédiaires, témoins d'un processus d'adaptation de souches quelconques de *Rhizobium* à une Légumineuse déterminée.

Leur étude mérite d'être poursuivie. Aussi, continuera-t-on les essais d'inoculations répétées des souches isolées de ces excroissances aux plantes qui leur servent de support. On pourra ainsi, à l'occasion de chaque opération, suivre l'évolution des races bactériennes. Des examens histologiques compléteront cette étude.

L'avenir vérifiera le bien-fondé de notre hypothèse. Elle mérite en tous cas d'être approfondie, étant donné l'intérêt certain que présente le problème de la spécificité de l'hôte, dans le genre *Rhizobium*.

#### *Conclusions générales des observations sur Légumineuses cultivées.*

Des observations effectuées, il ressort qu'en régions équatoriales, le problème posé par l'établissement d'une symbiose active chez les Légumineuses, est primordial.

Dans les conditions naturelles, les relations *Rhizobium*-Légumineuses sont loin d'un équilibre optimum; dans la plupart des cas observés, la symbiose profite peu à l'hôte et se réduit à un simple commensalisme.

Le problème posé pourrait brièvement se schématiser comme suit : la Légumineuse étant par nature adaptée à la fixation de l'azote de l'air, on constate que, en l'absence de *Rhizobium* actif, les réserves azotées du sol profitent de préférence aux représentants des autres groupes végétaux et au développement des plantes adventices. En d'autres termes, si une Légumineuse peut utiliser l'azote combiné du sol, jamais cependant son état physiologique n'est aussi parfait qu'en présence de *Rhizobium* actif. Ainsi VIRTANEN [1955] a démontré que, dans les conditions de la pratique agricole, le pois inoculé au moyen d'une souche très « effective » prélevait 90 % de son azote total à partir de l'air. Nous avons fait des observations analogues sur *Medicago*. En admettant même, ce qui ne semble pas être le cas, que les Légumineuses puissent, indifféremment, utiliser l'azote du sol ou de l'air, il saute aux yeux que dans cette hypothèse, les réserves du sol seraient, en l'absence de *Rhizobium* actif, soumises à un véritable gaspillage alors que les quantités illimitées contenues dans l'air resteraient inemployées.

Cela étant, on peut tirer les conclusions suivantes :

Lorsqu'on effectue un semis de Légumineuses, les jeunes plantules doivent trouver dans le sol des souches de *Rhizobium*, douées au moins

de deux qualités essentielles : la « spécificité » et l' « effectivité ». Dans la majorité des cas, la Légumineuse que l'on installe ne dispose que des souches généralement quelconques, nullement appropriées et dont la présence résulte d'activités symbiotiques diverses, antérieures au semis.

Bien souvent, un long processus d'adaptation devra se réaliser. Quelques types microbiens pourront s'installer, provoquant une nodulation « ineffective » ou faiblement « effective ». Évidemment, s'il s'agit de la culture d'une plante à très longue période végétative ou de cultures successives de la même espèce sur le même sol, ce qui constitue d'ailleurs le plus souvent un non-sens en agriculture, une symbiose active peut finir par s'installer. Des observations nombreuses et variées ont montré que les choses semblent bien se passer ainsi. A l'origine, il ne préexiste certainement pas, dans tous les sols, des souches de *Rhizobium* parfaitement adaptées à toutes les Légumineuses « nodulantes » susceptibles d'être cultivées. Dans chaque cas, une lente adaptation s'impose, ce qui implique une perte de temps préjudiciable, aux points de vue tant cultural qu'économique.

Par contre, il suffit que les graines disposent, dès la germination, d'une souche spécifique, de haute capacité fixatrice, pour que, toutes autres conditions étant assurées, la culture ait des chances de brillamment réussir. En régions équatoriales, nous l'avons vu, ces « strains » très actifs font souvent défaut.

Bref, on peut conclure que l'inoculation préalable des graines est, ici comme ailleurs, susceptible non seulement d'augmenter les rendements mais encore de faciliter éventuellement l'introduction d'espèces nouvelles. L'inoculation s'indique aussi impérieusement lorsque par suite des conditions climatiques les *Rhizobium* préexistants ou introduits risquent d'être partiellement ou totalement éliminés du sol.

#### b. SYMBIOSE EN FORÊT. <sup>1</sup>

Au cours des nombreuses observations effectuées sur les Légumineuses forestières, nous avons noté, en général, la présence de très peu de nodosités.

Tous les examens, dans la région de Yangambi, conduisent à la même conclusion : *peu de nodosités actives dans la forêt équatoriale*, où les Légumineuses sont cependant très largement représentées.

Selon ALLEN et BALDWIN [1954], sur les 10.000 à 12.000 espèces que compte cette famille, 1.200 seulement ont été examinées quant à la présence ou à l'absence de nodules. Alors que 90 % environ des

---

1. Les observations en forêt ont été possibles grâce à l'aide amicale de M. EVRARD, Assistant à la Division de Botanique, que nous remercions chaleureusement.

*Papilionaceae* et *Mimosaceae* observées étaient colonisées, 30 % seulement des *Caesalpiniaceae* portaient des nodules. Les autres espèces n'en portaient pas, apparemment. Il est très difficile en effet d'accepter telles quelles ces statistiques. C'est ainsi que dans la forêt à *Gilbertiodendron dewevrei* (DE WILD.) J. LÉONARD, nous n'avons décelé sur cette espèce aucune trace de symbiose bactérienne. Par contre, des nodosités actives ont été signalées sur *Gilbertiodendron* croissant sur des sols particulièrement aérés (communication verbale de M. EVRARD). Les conditions de milieu interviennent de façon tellement décisive, que toute affirmation relative à l'absence de nodosité sur une espèce déterminée ne doit être formulée qu'avec prudence.

Rapportons à ce sujet les faits suivants que nous tâcherons d'interpréter :

Ainsi qu'il vient d'être signalé, dans la forêt à *Gilbertiodendron*, nous n'avons personnellement observé aucun nodule, malgré de très nombreux examens, facilités par la présence, dans la couverture morte et les premiers centimètres de l'horizon humifère, d'innombrables racines et radicelles enchevêtrées. De plus, signalons que, sur les racines de la même essence, les mycorhizes sont très nombreuses. Selon MALAN [1954]<sup>1</sup>, de nombreuses observations montrent que les mycorhizes ne viennent jamais en contact des nodules fixateurs d'azote ou des parties de racines trop proches de ces nodules. Selon cet auteur, il y aurait donc une certaine incompatibilité entre la présence des mycorhizes et la symbiose à *Rhizobium*.

Tout comme les *Gilbertiodendron*, la plupart des autres espèces étaient également dépourvues de nodules. Nous avons noté une seule exception : *Dewevrea bilabiata* MICHELI. Il s'agit de nodules assez gros, de forme ovoïde, très régulière, et d'une longueur maximum de 6 mm. La surface des nodules en activité est jaunâtre et ridée très régulièrement en un réseau caractéristique. Jamais, on n'a observé plus de quatre nodules par plant. Le fait que ces nodosités, dont quelques-unes étaient rosées à l'intérieur, étaient si peu nombreuses, indique que la fixation d'azote doit être très faible.

Dans la forêt moins dense à *Afrormosia elata* HARMS, les jeunes *Afrormosia* portaient plus souvent des nodules, peu colorés intérieurement. D'autres essences de la même association portaient également des nodosités. Des Légumineuses qui ne nodulent pas dans la forêt à *Gilbertiodendron*, le font parfois dans la forêt à *Afrormosia*, ainsi qu'aux endroits situés, soit en lisière, soit en bordure de chemins, notamment là où le sol a été remué artificiellement (par des cantonniers par exemple).

1. Référence aimablement communiquée par M. FASSI, mycologiste à la Division de Phytopathologie et d'Entomologie agricole.

OBSERVATIONS ET ESSAIS

Il serait peut-être intéressant, en multipliant les prospections, de faire le rapprochement entre la présence de nodosités et la situation de la forêt au point de vue de la luminosité. On a déjà signalé le rôle important que joue la lumière, dans la formation des nodules et leur activité. Or, on a constaté précisément que la forêt dense à *Gilbertiodendron* est pratiquement dépourvue de nodosités (à part l'exception de *Dewevea bilabiata*), tandis que la forêt claire à *Afrormosia* compte beaucoup plus d'espèces nodulées.

Il apparaît en tout cas que la poursuite des observations dans le milieu naturel que constitue la forêt est susceptible de fournir des renseignements d'un intérêt certain.

Par ailleurs, le tableau ci-dessous donne le résultat de l'examen du système racinaire de quelques Légumineuses spontanées de la région de Yangambi. Le signe + indique que l'on a trouvé au moins un nodule.

*Caesalpiniaceae* :

<i>Gilbertiodendron dewevrei</i> (DE WILD.) J. LÉONARD	—
<i>Dialium zenkeri</i> HARMS	+
<i>Dialium pachyphyllum</i> HARMS	—
<i>Scorodophloeus zenkeri</i> HARMS	—
<i>Berlinia grandiflora</i> (VAHL.) HUTCH. et M. DALZ.	—
<i>Brachystegia laurentii</i> (DE WILD.) LOUIS	—
<i>Gossweilerodendron balsamiferum</i> (VERMOESEN) HARMS	+
<i>Cynometra hankei</i> HARMS	—
<i>Erythrophleum guineense</i> G. DON	+

*Papilionaceae* :

<i>Afrormosia elata</i> HARMS	+
<i>Dewevea bilabiata</i> MICHELI	+
<i>Pterocarpus soyauxii</i> TAUB.	+
<i>Millettia duschesmii</i> DE WILD.	+
<i>Millettia dubia</i> DE WILD.	+
<i>Millettia harmsiana</i> DE WILD.	+
<i>Dalhousiea africana</i> S. MOORE	—
<i>Dalhousiea</i> sp.	—
<i>Ostryoderris gabonica</i> (BAILL.) DUNN	+
<i>Baphia</i> sp.	+

*Mimosaceae* :

<i>Albizzia ealaensis</i> DE WILD.	+
<i>Acacia</i> (sect. <i>pinnata</i> )	—
<i>Acacia silvicola</i> GILBERT et BOUTIQUE	—
<i>Pentaclethra macrophylla</i> BENTH.	—

Ainsi donc, la forêt de Yangambi, qui contient de très nombreuses Légumineuses, apparaît comme fixant très peu d'azote par voie symbiotique.

Il convient, à ce propos, d'insister sur le fait que la forêt constitue un milieu équilibré, où les exportations sont nulles et où le cycle de l'azote semble bien fermé.

Les pertes, par érosion et délavement, doivent être très faibles. D'après les renseignements qui nous furent aimablement fournis à la Division de Climatologie (M. BERNARD), l'eau des rivières fournit normalement très peu de matières azotées à l'analyse. Les seules pertes que l'on puisse concevoir en forêt pourraient être dues à la libération d'azote gazeux, sous diverses formes (N et NH<sub>3</sub> principalement); encore faudrait-il vérifier expérimentalement que ces pertes sont possibles et que cet azote gazeux libéré n'est pas immédiatement capté. Si elles existent, elles sont compensées par les apports azotés dus aux pluies d'orages. Des travaux effectués en Indochine [VIOLARD-GOUDON et RICHARD, 1956] ont montré que les eaux de pluie, dans les conditions du lieu, pouvaient amener annuellement de 15 à 45 kg/ha d'azote.

Si l'on sait d'autre part, ainsi que l'ont montré de nombreux essais, que l'azote nitrique et ammoniacal du sol, à un taux suffisant, inhibe la nodulation chez les Légumineuses, la situation en forêt peut s'expliquer, jusqu'à un certain point tout au moins. Une symbiose très active y provoquerait d'ailleurs une accumulation continue d'azote, puisque les pertes en cet élément sont nulles.

Dans un travail tout récent, NORRIS [1956] émet l'hypothèse qu'en régions tropicales, la nodulation des Légumineuses serait un phénomène cyclique. L'auteur prétend que, dans les régions tropicales australiennes, les nodules apparaîtraient surtout en saison humide, « au moment, ajoute-t-il, où normalement personne ne fait d'examen de racines de Légumineuses ». Par contre, en saison sèche, « où les prospections sont possibles », les nodules seraient très peu nombreux. Cette hypothèse ne peut évidemment s'accorder avec les observations faites à Yangambi, en forêt équatoriale, où les pluies sont pratiquement ininterrompues.

Il y a en tous cas un grand intérêt à poursuivre les observations. Certains points restent en effet obscurs. C'est ainsi qu'il est connu, à la suite d'essais effectués par divers auteurs, VIRTANEN [1955] notamment, que les Légumineuses sont adaptées à la nutrition azotée symbiotique et que leur développement est, physiologiquement, moins bon si l'azote leur est fourni sous une autre forme.

Il faudrait voir si ce principe vaut pour les Légumineuses de la forêt qui ne semblent pas, dans le milieu envisagé, souffrir de l'absence de symbiose.

## c. NODULES FOLIAIRES DES RUBIACEAE.

Nous avons observé, très souvent, la présence de nodules foliaires sur des espèces de la famille des *Rubiaceae* (genres *Pavetta* et *Psychotria* notamment).

Ces « nodules » relativement peu étudiés jusqu'ici, se présentent sous la forme de taches, de petites boursofflures, à la face inférieure des feuilles. Le limbe peut être couvert de ces formations d'un millimètre environ, aisément discernables, grâce à leur teinte plus foncée.

Un examen microscopique permet d'observer la présence dans ces « nodules » d'un bâtonnet assez long, de forme anormale, branchue par exemple. Il y a incontestablement une relation entre la formation de ces « nodules » et la présence de ces bactéries.

Quant à l'utilité de ces excroissances foliaires, au point de vue de la fixation de l'azote notamment, les quelques auteurs qui ont étudié le problème [BREMERCAMP, 1933; ZIMMERMAN, 1902; VON FABER, 1912] ont des opinions divergentes. Des essais sont encore à réaliser à ce sujet; ils méritent, semble-t-il, notre attention, étant donné l'abondance relative de ces « nodules », en forêt équatoriale.

## 2. Isolement de souches bactériennes.

Cent treize souches bactériennes ont été isolées dont :

- 18 de *Arachis hypogaea*
- 18 de *Soja hispida*
- 4 de *Vigna sinensis*
- 9 de *Stylosanthes gracilis*
- 4 de *Desmodium intortum*
- 4 de *Desmodium adscendens*
- 6 de *Calopogonium mucunoides*
- 9 de *Mimosa invisa*
- 4 de *Afrormosia elata*
- 4 de *Dewevrea bilabiata*
- 7 de *Pterocarpus soyauxii*
- 12 de *Canavalia ensiformis*
- 7 de *Pueraria javanica*
- 5 de *Crotalaria longithyrsa*
- 3 de *Psychotria* sp. (*Rubiaceae*)

## a. TECHNIQUES UTILISÉES.

Les nodules choisis sont lavés dans l'eau courante, de façon à leur enlever toute trace de terre. Il convient de ne pas les laisser séjourner

plus de trois heures dans l'eau de lavage sinon ils deviennent beaucoup trop sensibles au produit désinfectant utilisé ultérieurement.

Après ce lavage, les nodules sont désinfectés extérieurement par trempage dans  $\text{HgCl}_2$  à 2,5 ‰, pendant cinq minutes environ. Huit à dix rinçages à l'eau stérile sont ensuite nécessaires pour enlever toute trace de  $\text{HgCl}_2$ .

A ce stade, deux techniques sont possibles pour isoler la bactérie :

1. Le nodule est écrasé dans une boîte stérile, au moyen d'un agitateur ; un fil de platine est « chargé » dans le broyat obtenu et utilisé pour faire un « épuisement » en stries sur boîtes de Petri, garnies d'un milieu convenable.

2. Le nodule est sectionné au moyen d'une lame stérile, du tissu interne est prélevé et broyé dans l'eau stérile ; la suspension obtenue est diluée et ensemencée, à la pipette, en boîtes de Petri.

La seconde méthode est de loin préférable parce que, seule, elle garantit, de façon absolue, l'origine des germes obtenus.

En effet, malgré toutes les précautions prises, la désinfection peut ne pas être parfaite, avec, pour résultat, une contamination des boîtes par des bactéries, productrices de « gommages » par exemple, qui peuvent être confondues avec le *Rhizobium*.

Malheureusement, cette dernière méthode n'est pas toujours applicable ; elle est réservée aux souches provenant de nodules assez volumineux. C'est ainsi que, pour le cas qui nous occupe, la technique est impraticable pour *Stylosanthes* et certains *Desmodium* ; elle est difficile pour *Crotalaria longithyrsa*. De plus, sur une même espèce (*Arachis* par exemple,) on peut trouver, à côté de nodules volumineux, de très petites nodosités dont l'intérêt peut être réel.

Partout où la technique par section est possible, elle doit être pratiquée. En effet, parmi toutes les souches isolées qui présentent les caractères du *Rhizobium*, certaines sont incapables de provoquer la formation de nodules, en cultures aseptiques, sur l'espèce à partir de laquelle elles ont été isolées (fait vérifié à maintes reprises, notamment sur *Arachis*, *Soja* et *Stylosanthes*).

En boîtes de Petri, elles ne se différencient pas sensiblement des *Rhizobium* vrais et, à première vue, ces races bactériennes peuvent être considérées comme des contaminations, dues à une désinfection imparfaite des nodosités. Il pourrait s'agir par exemple de souches de *Agrobacterium radiobacter* originaires de l'extérieur du nodule.

Étant donné leur fréquence, on a multiplié les isollements par la méthode du prélèvement interne de tissu nodulaire. Malgré ces précautions, nous avons encore obtenu une fraction importante de souches bactériennes que nous appellerons « inertes », incapables de former des nodules même « ineffectifs » sur l'espèce considérée. Il s'agit là d'une observation systématique.

Ainsi donc, il apparaît clairement que des nodules peuvent contenir, à côté de bactéries actives, des types macroscopiquement et microscopiquement identiques, mais « inertes ». S'agit-il de souches de *Agrobacterium radiobacter*, qui coexisteraient à l'intérieur du nodule avec les *Rhizobium*? S'agit-il de formes de *Rhizobium* anormales, ayant perdu leurs propriétés symbiotiques ou ne les ayant pas encore acquises? Quelles distinctions d'ailleurs peut-on établir entre ces deux formes, *A. radiobacter* et *Rhizobium* « inerte »? A côté de leur intérêt scientifique, ces questions offrent un aspect pratique immédiat. Elle constituent en effet une source de complications lors de travaux d'isolement de souches, effectués notamment dans un but d'études et d'applications à la pratique agricole.

On ne peut donc considérer comme *Rhizobium*, à la suite d'une technique quelconque d'isolement, que des souches dont on a vérifié les capacités de nodulation, par inoculation à la Légumineuse, cultivée aseptiquement.

C'est là le seul critère efficient.

Notons que certaines différenciations macroscopiques sont peut-être possibles; mais, de toutes façons elles ne peuvent servir que d'indications. C'est ainsi qu'il faut se méfier des souches dont le développement, en boîtes d'isolement, est très rapide et envahissant. Dans certains cas en effet, on obtient après 24 heures déjà des traînées abondantes, très gommeuses, plutôt translucides, constituées microscopiquement de formes semblables aux *Rhizobium*, qui se révèlent « inertes » par la suite. Après quatre à cinq jours, sur les mêmes boîtes, s'observent des traînées beaucoup moins abondantes, de croissance très lente et d'un blanc laiteux caractéristique. Ces dernières se révèlent le plus souvent être constituées de *Rhizobium* vrais. Avec une certaine habitude, l'œil peut apprécier ces différences. Répétons que de telles données ne peuvent fournir que des indications et qu'il est nécessaire de s'en tenir à la seule technique sûre : formation de nodosités par les souches isolées, inoculées à des Légumineuses cultivées aseptiquement. Comme de plus, les deux types de traînées distinctes en boîtes de Petri, dues aux *Rhizobium* vrais et aux *Rhizobium* « inertes », se superposent le plus souvent, on peut juger des difficultés inhérentes à l'isolement des souches de *Rhizobium*.

Il s'ensuit que la seule technique opératoire qui puisse offrir toute garantie se schématise comme suit :

- Désinfection du nodule.
- Chaque fois que la nodosité est de dimensions suffisantes, sectionner stérilement celle-ci, de façon à obtenir une tranche nette.
- Prélever aseptiquement un fragment de tissu interne.
- Broyer ce fragment et le suspendre en eau stérile.

## SYMBIOSE *RHIZOBIUM*-LÉGUMINEUSES

- Effectuer des dilutions et ensemercer les boîtes à la pipette, avant d'y couler le milieu, de manière à obtenir des colonies séparées, plutôt que de faire un isolement en stries, au moyen du fil de platine (les colonies confluent en une traînée dont on ne peut distinguer les éléments).
- Inoculer le produit des diverses colonies à des Légumineuses cultivées aseptiquement, de façon à identifier les *Rhizobium* vrais.

Telle est, semble-t-il, la seule technique qui puisse donner toute satisfaction.

### b. MILIEU DE CULTURE UTILISÉ.

Le milieu de WRIGHT [1925], à base de mannite, d'eau de levure (l'eau de levure entrant dans la composition) et de sels minéraux, s'est révélé supérieur à tous les autres milieux utilisés (celui au rouge congo notamment).

Insistons sur le fait que, à défaut de levure fraîche pour préparer le milieu, nous avons utilisé des levures sèches du commerce (genre Danisco) à raison de 25 g par litre d'eau.

### c. CARACTÈRES DES SOUCHES ISOLEÉS.

Les caractères macroscopiques et microscopiques des souches de *Rhizobium* présentent une grande variabilité sans que d'ailleurs ces caractères puissent être liés à l'origine végétale de la souche bactérienne. Ce fait a été contrôlé une fois de plus sur les nombreuses souches isolées. La dimension des bâtonnets est variable, mais assez uniforme pour une souche donnée : pour certaines races, elle est de 1 micron par exemple, tandis que pour d'autres, elle atteint de 4 à 5 microns.

De nombreuses formes irrégulières, caractéristiques des *Rhizobium*, en X, en Y ou en T peuvent être observées, spécialement chez certains types.

Même en recourant à la fuschine qui donne, pensons-nous, les meilleures préparations, les résultats varient d'une souche à l'autre. Les unes se colorent complètement, les autres en un ou plusieurs endroits seulement.

Soulignons également que les souches isolées des excroissances anormales, signalées plus haut, sont systématiquement constituées de formes bactéroïdes (X, Y ou T) beaucoup plus nombreuses que dans les races isolées de nodosités vraies. Il convient de signaler à nouveau qu'aucun caractère signalé n'apparaît lié à la spécificité d'hôte. Des souches, prélevées sur *Arachis* par exemple, peuvent être macroscopiquement et microscopiquement identiques à d'autres, isolées de *Stylosanthes*, tout en étant nettement distinctes d'autres races spéci-

fiques d'*Arachis*. Les observations faites à Yangambi, nombreuses et variées, confirment indiscutablement le fait.

### 3. Cultures aseptiques de Légumineuses.

La technique à utiliser varie suivant les espèces considérées. Elle n'offre généralement aucune difficulté pour les Légumineuses à petites graines.

Dans ce cas, les semences sont d'abord dégraissées, par agitation dans l'éther pendant deux ou trois minutes. Elles sont ensuite désinfectées par passages successifs dans l'alcool à 96° (1 minute), dans  $\text{HgCl}_2$  à 2,5 ‰ (5 minutes) et dans dix bains de rinçage à l'eau stérile. Ainsi qu'il a déjà été signalé précédemment, elles sont ensuite mises à germer sur le milieu gélosé de WRIGHT [1925]; les moindres « salissages » sont ainsi facilement décelés.

Après 36 à 48 heures, les plantules stériles sont placées, aseptiquement, en tubes à essai, sur un milieu minéral convenable, gélosé et complètement dépourvu d'azote. Les plantules sont inoculées au moyen d'une suspension aqueuse de la souche de *Rhizobium* à l'étude; les tubes sont placés en serre, à l'abri des contaminations, de façon que les racines soient protégées de la lumière.

#### a. STYLOSANTHES GRACILIS.

Neuf souches ont été comparées à un témoin, à raison de 6 tubes par objet.

Les souches indexées STECCA I et STECCA II se sont montrées les plus actives au point de vue de la fixation. Alors que les plantes témoins restaient petites, jaunes et offraient les symptômes de carence en azote, les plantules inoculées des deux races précitées présentaient un développement normal, des nodules rouges et des feuilles vert foncé.

Sur les neuf souches étudiées, trois n'ont provoqué la formation d'aucun nodule. Dans le cas de *Stylosanthes*, la technique de culture aseptique s'est montrée utilisable pour l'avenir.

Il faut cependant noter que :

- La germination des graines est généralement très mauvaise (10 % maximum). Un préchauffage de dix minutes à 50 °C (suggestion de M. MEYER) est favorable à la germination. Encore faut-il concilier ce préchauffage avec la technique de désinfection.

- Le développement des plantules est très lent. C'est ainsi qu'il a fallu 17 jours pour que les premiers nodules apparaissent. De plus, ce n'est que 12 jours après l'apparition de ceux-ci que des différences

ont commencé à se marquer dans le faciès des plantes, différences qui n'ont fait d'ailleurs que s'accroître par la suite.

- Parmi les neuf souches étudiées, deux se sont montrées intéressantes au point de vue de la fixation; ceci donne une idée du travail exigé par la mise au point d'une souche de qualité exceptionnelle.

#### b. ARACHIS HYPOGAEA ET SOJA HISPIDA.

Il s'agit ici de Légumineuses à grosses graines, dont la culture, en conditions aseptiques, offre plus de difficultés en raison du volume que peut occuper la plante, en plein développement.

Sur ces deux espèces, nous avons expérimenté la méthode décrite plus haut. La désinfection des semences est ici plus délicate et doit être menée avec grande attention. Il convient d'ailleurs de toujours adapter le traitement de désinfection à chaque espèce en cause.

Les plantules stériles ont été transférées dans des tubes de verre de grandes dimensions (800 × 80 mm), bouchés avec de l'ouate. Ces tubes contenaient le milieu minéral gélosé, dépourvu d'azote, dont il fut question.

Les résultats obtenus par cette technique, sur les Légumineuses à grosses graines, *Arachis* et *Soja*, n'ont pas été satisfaisants. C'est ainsi que pour les sept souches expérimentées sur *Arachis*, on n'a obtenu que quelques rares nodules, dans deux tubes seulement et encore, après plusieurs semaines de végétation. Le pouvoir de nodulation de certaines souches était cependant connu. Ce sont donc bien les conditions de culture des végétaux qui se sont révélées déficientes. Les mêmes constatations ont été faites sur *Soja*. Ces deux espèces, enfermées en tubes de verre, ne parviennent pas à noduler en présence de souches actives : leur développement est probablement freiné, malgré le volume des tubes utilisés.

Il ne semble pas que le milieu minéral soit à mettre en cause. En effet, l'essai a été complété par la culture aseptique de ces mêmes espèces en tubes contenant de la terre stérile, sans que les résultats obtenus soient meilleurs.

Il convient donc d'envisager, pour l'avenir, d'autres méthodes adaptées à ce genre de matériel. Des techniques de semi-aseptie notamment, qui permettent à la partie supérieure de se développer à l'air libre, ont donné d'excellents résultats qu'il est nécessaire de vérifier sur Légumineuses tropicales. Nous y reviendrons plus loin. Dans tous les cas, la culture en vases de végétation sur substrat stérilisé réussit toujours. Cette technique est valable pour toutes les Légumineuses : sa réalisation matérielle est plus simple mais donne des résultats moins sûrs, là où l'on ne dispose pas d'un personnel expérimenté.

#### 4. Mise au point d'une technique d'inoculation des graines.

En régions tempérées, les semences de Légumineuses sont inoculées, préalablement au semis, par trempage dans une culture liquide, de la souche de *Rhizobium* adéquate. On utilise généralement pour cette préparation, la culture liquide, éventuellement diluée, à raison de 10 % du poids des semences utilisées. Sur une surface bien propre, ou dans un récipient, les semences sont intimement mélangées avec la suspension inoculante, de façon à ce que toutes les graines soient mouillées. Les semences sont ensuite séchées une heure ou deux, jusqu'à ce que le semis soit matériellement possible. Toutes ces opérations doivent naturellement être réalisées à l'abri du soleil, pour empêcher toute destruction de bactéries et le semis effectué le jour même. En régions tempérées, cette technique donne d'excellents résultats dans la pratique agricole. Nous pensons qu'elle est inutilisable, en conditions équatoriales, pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, le système Légumineuse-bactérie constitue une symbiose vraie où les deux symbiotes vivent l'un de l'autre et forment un tout distinct. Entre le moment du semis et l'époque où la symbiose s'établit, s'écoule néanmoins un espace de temps, variable avec les espèces végétales (relativement long, par exemple, pour *Stylosanthes gracilis* et *Soja hispida*) et avec les conditions climatiques du moment. Pendant cette période, la bactérie est réduite à une vie saprophytique dans le sol, où elle est soumise aux conditions de milieu le plus souvent défavorables en régions équatoriales (cfr chapitre II).

L'inoculation des graines par trempage ne fournit au *Rhizobium* aucune protection.

Le trempage présente un autre inconvénient qui est loin d'être négligeable : il peut favoriser certaine forme de parasitisme. La culture liquide utilisée pour l'inoculation contient toujours une quantité assez importante de glucides, qui peuvent favoriser le développement de certaines maladies fongiques. Un essai, effectué en plein champ sur *Medicago sativa* à Yangambi, a attiré notre attention à cet égard. La plupart des plantes de la parcelle inoculée ont été envahies par la « fonte » des semis, qui a opéré une destruction beaucoup plus complète que dans les parcelles témoins non inoculées. La culture liquide relativement riche en mannite avait très certainement favorisé les agents responsables de la fonte.

La protection des bactéries constitue une impérieuse nécessité pour un autre motif encore : la pratique généralisée de la désinfection de certaines graines, d'*Arachis* par exemple. L'utilisation de divers produits, à base de mercure notamment, constitue une pratique culturale qui a fait ses preuves et que l'on ne peut songer à abandonner. Il faut la concilier avec le mode d'inoculation adopté.

C'est à ces différentes raisons que nous attribuons les nombreux échecs constatés lors d'essais d'inoculation pratique, dans les conditions équatoriales.

Bref, il s'agit de protéger la bactérie, ajoutée aux graines, jusqu'au moment où la symbiose peut s'installer. A partir de cet instant, le complexe plante-bactérie forme un tout et la bactérie, vivant de la plante et pour elle, est à l'abri des mauvaises conditions de milieu.

En vue d'assurer la protection du *Rhizobium*, nous avons eu recours au procédé suivant : plutôt que de tremper les semences dans une culture liquide, nous avons imaginé de placer dans le sol, à côté de la graine, au moment du semis, un substrat contenant la bactérie et assurant la protection de celle-ci vis-à-vis des agents défavorables : pH, température, dessiccation, délavement, produits désinfectants enrobant éventuellement la graine.

#### a. UTILISATION DE TOURBE.

Le *Rhizobium* se développe particulièrement bien sur un milieu solide constitué de tourbe, enrichie, à une dose convenable, du milieu de culture liquide habituel [WRIGHT, 1925]. L'expérience a montré qu'un tel milieu solide était particulièrement favorable au développement du *Rhizobium*. Après quinze jours d'incubation, il peut contenir jusqu'à 10 milliards de germes par gramme, alors qu'une culture liquide habituelle ne peut contenir plus de 500 millions de bactéries au cm<sup>3</sup>. Au moment du semis de la Légumineuse, il suffit donc de placer dans les « poquets », à côté des graines, une pincée de cette tourbe riche en *Rhizobium*.

En Afrique équatoriale belge, ce substrat ne peut malheureusement être utilisé dans la pratique, en raison de son prix de revient trop élevé; aussi a-t-on essayé d'autres substances, susceptibles de remplir le même rôle.

#### b. UTILISATION DE SCIURE DE BOIS DÉCOMPOSÉE.

Le produit à utiliser doit être doué de propriétés physiques comparables à celles de la tourbe : grande capacité d'absorption des liquides et structure capable de maintenir une bonne aération.

Nous disposions à Yangambi d'un dépôt de vieilles sciures de bois, exposées depuis de nombreuses années aux intempéries. Cette sciure avait subi une fermentation telle que son aspect était complètement changé.

Elle se présentait sous la forme d'une poudre brune, morphologiquement assez semblable à de la tourbe.

## OBSERVATIONS ET ESSAIS

Dans des vases d'Erlenmeyer, on a placé :

- 20 g de sciure séchée,
- 80 ml de milieu de WRIGHT [1925],
- 5 g de CaCO<sub>3</sub>, sous forme de craie lavée.

Ces récipients, bouchés avec de l'ouate, ont été stérilisés par deux passages à l'autoclave, à 24 heures d'intervalle, à 120 °C, pendant une heure. Les flacons ont ensuite été ensemencés au moyen de 2 ml d'une suspension aqueuse de diverses souches de *Rhizobium*.

Après 15 jours d'incubation, on a procédé à un premier comptage des germes; les résultats, certes déjà appréciables, étaient néanmoins encore insuffisants et d'ailleurs trop variables d'une souche à l'autre. De deux souches spécifiques de *Arachis*, l'une comptait 6.400.000 germes au gramme humide, l'autre 120.000.000. Des souches spécifiques d'autres Légumineuses n'ont pas donné de meilleurs résultats.

Il est cependant nécessaire de disposer d'un inoculum très riche, dont on puisse être sûr, en régions équatoriales surtout. Parmi d'autres auteurs, VINCENT [1954] a démontré que, en sols acides, les nodules obtenus étaient d'autant plus nombreux que l'inoculum était plus riche.

De nouveaux dénombrements, effectués après un mois et plus, n'ont pas donné de meilleurs résultats. Devant le comportement décevant de la sciure de bois décomposée, nous avons cherché à mettre en évidence les propriétés éventuellement inhibitrices de celle-ci, vis-à-vis du *Rhizobium*. Des boîtes de Petri, garnies de sciure fraîche et d'extraits aqueux de sciure, préparés selon différentes méthodes (à chaud et à froid) ont été ensemencées de diverses souches de *Rhizobium* et comparées à des boîtes témoins, sans sciure. En aucun cas, on n'a observé le moindre signe de toxicité, due à cette substance.

Constatons donc simplement, sans l'expliquer, que, malgré ses propriétés physiques, la sciure de bois décomposée ne convient pas pour la préparation d'un inoculum sous forme solide.

### c. UTILISATION DE BALLE DE RIZ.

Étant donné les grandes disponibilités, à Yangambi, de balles de riz, nous avons songé à utiliser ce produit.

Après divers essais, le milieu suivant a été retenu :

- 50 g de balles de riz, séchées, passées au moulin à marteaux (tamis 2 mm),
- 110 ml de milieu liquide de WRIGHT [1925],
- 3 g de CaCO<sub>3</sub>, sous forme de craie lavée.

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 120 °C, pendant une heure, deux fois, à intervalle de 24 heures. Les vases sont ensemencés au

moyen de 2 ml d'une suspension aqueuse de diverses souches de *Rhizobium*.

Après 15 jours d'incubation, des comptages ont donné respectivement pour une souche spécifique d'*Arachis*, 2,5 milliards de germes au gramme humide; pour une autre, isolée sur *Soja*, 4 milliards de germes et pour une troisième provenant de *Stylosanthes*, 4,5 milliards.

Tous les dénombrements effectués, avec des souches très diverses, ont fourni des résultats supérieurs à 2 milliards de germes. En raison de ses qualités, le milieu à base de balles de riz a été employé pour la préparation des produits destinés à l'inoculation. Que ce soit pour des essais en vases de végétation ou en pleine terre, il suffit de placer une pincée de balles ensemencées dans chaque poquet du semis. Les résultats sont très satisfaisants.

Le procédé est simple à utiliser pour autant qu'il s'agisse d'un semis manuel. Cependant, les essais devront être poursuivis dans le but notamment de mettre au point une méthode d'inoculation valable pour le semis mécanique. Après développement de la culture sur balles de riz, il conviendrait, pour ce faire, de laisser sécher à basse température le produit obtenu, qui serait incorporé intimement aux graines semées mécaniquement. L'expérience a prouvé que le substrat utilisé constitue dans le sol un milieu distinct de celui-ci, où les bactéries peuvent se maintenir, un certain temps, dans des conditions favorables.

Il serait toutefois intéressant de procéder, dans les conditions de la pratique culturale, à l'étude comparative des différents procédés d'inoculation, basés, en ordre essentiel, sur les conditions écologiques du lieu.

## 5. Essais en vases de végétation.

Par suite des mauvais résultats obtenus par la culture aseptique de Légumineuses à grosses graines, en tubes de verre, nous avons entrepris deux essais orientatifs, en vases de végétation, l'un avec *Soja hispida*, en milieu stérile, le second avec *Arachis hypogaea*, sur substrat non stérile.

Ces deux plantes ont été choisies en raison de leur vitesse de développement relativement élevée. Certes, il eût été utile d'étudier d'autres espèces mais le temps nous a fait défaut.

### a. SOJA HISPIDA.

Trois souches ont été comparées à un témoin non inoculé; l'une introduite de Gembloux (S.315) possède des qualités bien connues au point de vue de l'« effectivité » notamment. Les deux autres ont été isolées à Yangambi. Vingt vases de végétation (5 par objet) ont été

garnis de sol sablonneux, originaire de la Lilanda, et stérilisés à 120 °C, deux fois, pendant une heure, à 24 heures d'intervalle. Le semis a été effectué en poquets de trois graines désinfectées (4 par vase). De l'eau bouillie a été utilisée pour les arrosages.

Des différences très nettes se sont révélées à l'observation. Les plantes inoculées, particulièrement au moyen de la souche S.315 étaient de taille plus grande et de teinte verte, très foncée. Les plantes témoins dépourvues de nodules étaient plus petites et ont conservé pendant toute la durée de la végétation, une teinte jaunâtre.

Les résultats furent spectaculaires et montrent toute l'efficacité, dans les conditions équatoriales, de la technique d'étude des souches en vases de végétation stérilisés.

#### b. ARACHIS HYPOGAEA.

L'essai établi sur *Arachis* avait pour but de démontrer la possibilité d'étudier les valeurs « effective » et « compétitive » des souches, par la culture en vases sur un sol naturel, non stérilisé.

Les conditions sont ici plus proches de celles de la pratique et une souche de pouvoir fixateur élevé ne peut montrer ses effets que si sa valeur « compétitive » est suffisante : en effet, le substrat n'est pas stérilisé et les souches autochtones, éventuellement présentes, peuvent provoquer la nodulation au même titre que celle qui est introduite.

Cet essai a été entrepris sur sable de la Lilanda, recueilli dans des parcelles qui avaient déjà porté des cultures d'arachide, relativement bien réussies. Ce sol contenait donc des souches, de valeurs diverses.

Neuf races (chacune dans cinq vases) ont été comparées à un témoin.

Au cours de la période de végétation, il n'y eut en aucun cas de différences dans la taille des plantes.

Les cinq vases inoculés au moyen de deux souches, indexées Aa8 et S.625, portèrent des plantes toujours nettement plus vertes que celles des autres vases. Les sept autres souches n'ont jamais montré de différence, ni entre elles ni avec le témoin. Les racines de celui-ci portaient d'ailleurs des nodules « effectifs ». Notons qu'aucune précaution particulière ne fut prise, au cours de la végétation; les arrosages furent toujours effectués au moyen d'eau de pluie, non stérilisée.

Cet essai orientatif, entrepris avec les premières souches isolées dont les qualités étaient inconnues a montré que, par la culture en vases en conditions non aseptiques, il était possible d'étudier comparativement les pouvoirs fixateur et « compétitif » de différentes races. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il démontre la valeur d'une technique utilisable pour l'étude de souches spécifiques de Légumineuses à grosses graines.

## 6. Essais en champs, dans les conditions de la pratique agricole.

### a. SOJA *HISPIDA*.

Sur cette espèce, l'inoculation pouvait être réalisée immédiatement, à l'échelle de la pratique, puisque nous disposions déjà de souches bactériennes de très haute valeur, sélectionnées précédemment. Il est d'ailleurs remarquable que la race de *Rhizobium* expérimentée se soit montrée aussi active à Yangambi qu'en Belgique, où elle avait été testée auparavant. Quatre essais ont été entrepris au Centre de Yangambi.

Le premier essai a été établi dans le champ d'essai de la Division de Phytopathologie, sur un sol occupé précédemment par *Stylosanthes gracilis*, qui fut d'ailleurs éliminé avant d'entamer cet essai. D'une superficie de 36 m<sup>2</sup>, la parcelle fut partagée en deux groupes de dix lignes, après apport d'une quantité de chaux éteinte, correspondant à 1.500 kg/ha de Ca(OH)<sub>2</sub>.

On a procédé à l'épandage de 200 kg/ha de sulfate de potassium (48 % de K<sub>2</sub>O) et à 1.000 kg/ha de superphosphate simple (16,5 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

Des graines, de la variété Palmetto ont été semées le 29 juin suivant le dispositif habituellement utilisé : poquets de trois graines, écartements 20 × 40 cm.

Pour les raisons écologiques, détaillées précédemment, un inoculum solide a été utilisé, contenant plus de 3 milliards de germes vivants au gramme et dont une pincée fut placée dans chaque poquet, en même temps que les graines.

Pendant 25 jours, aucune différence n'était perceptible entre les lignes témoins et les lignes inoculées. Le soja réagit d'ailleurs assez tardivement à l'inoculation. Ce fait est facilement explicable si l'on sait qu'il s'agit d'une espèce à croissance très lente, au début de la végétation.

Des différences nettes ont commencé à se marquer dès le vingt-cinquième jour et se sont encore accentuées par la suite.

La figure 1 est significative à cet égard.

Les plantes témoins, toujours moins développées, ont une teinte jaune, caractéristique de la carence en azote, alors que les plants inoculés sont vert foncé; ces caractères sont particulièrement nets. A ce point de vue, on peut, d'après la « Munsell Color Chart for Plant Tissues », les caractériser comme suit :

Plantes inoculées : 7,5 GY 4/6 à 4/4

Plantes témoins : 2,5 GY 6/7 à 5/6



Fig. 1. — Inoculation du *Soja*.

A gauche, quatre lignes témoins; à droite, trois lignes inoculées par la souche S.315.



Fig. 2. — Inoculation du *Soja*.

A gauche, trois lignes témoins; à droite, quatre lignes inoculées par la souche S.315.

SYMBIOSE *RHIZOBIUM*-LÉGUMINEUSES

TABLEAU II

*Rendement en matière sèche et en azote.*

Partie du végétal	Rendement				Azote total de la partie inoculée en fonction du témoin (%)
	Partie inoculée		Témoin		
	Matière sèche (g)	Azote (%)	Matière sèche (g)	Azote (%)	
Graines . . . . .	33	7,25	9	5,47	485
Gousses . . . . .	17	0,76	7	0,67	264
Tiges et feuilles .	26	1,09	11	0,81	318
Racines . . . . .	6	1,42	3	0,78	364
Total. .	82	3,52	30	2,17	441

TABLEAU III

*Rendement en matière sèche et en azote.*

Partie du végétal	Rendement				Azote total de la partie inoculée en fonction du témoin (%)
	Partie inoculée		Témoin		
	Matière sèche (g)	Azote (%)	Matière sèche (g)	Azote (%)	
Graines . . . . .	18	6,78	10	6,25	195
Gousses . . . . .	16	1,85	8	1,24	298
Tiges et feuilles .	29	2,31	11	1,58	386
Racines . . . . .	6	1,95	3	1,32	295
Total. .	69	3,33	32	2,93	245

## OBSERVATIONS ET ESSAIS

TABLEAU IV

*Rendement en matière sèche et en azote.*

Partie du végétal	Rendement				Azote total de la partie inoculée en fonction du témoin (%)
	Partie inoculée		Témoin		
	Matière sèche (g)	Azote (%)	Matière sèche (g)	Azote (%)	
Graines . . . . .	27	6,09	14	5,60	210
Gousses . . . . .	19	1,13	10	0,87	247
Tiges et feuilles .	26	1,27	11	1,23	244
Racines . . . . .	6	1,53	4	1,07	214
Total . .	78	2,96	39	2,69	220

Enfin, le quatrième essai fut installé à Lilanda, sans aucune fumure. A en juger à l'aspect extérieur des plantes, les résultats sont aussi remarquables que dans les trois cas précédents.

## CONCLUSIONS.

Il convient de souligner que, dans les trois parcelles non fumées, des nodules « effectifs » ont été observés sur les plantes témoins, nodules formés par les souches existant naturellement dans le sol. Malgré la présence de ces nodules, les résultats obtenus par l'inoculation sont tels qu'ils démontrent la nécessité d'inoculer au moyen de souches sélectionnées, même là où le *Rhizobium* spécifique est présent dans le sol.

La fixation d'azote, dans les parcelles inoculées, est à l'origine de différences importantes dans les rendements. Il convient de faire remarquer l'augmentation de la récolte. Ainsi, dans la première parcelle, la matière sèche totale, qui est 2,72 fois plus importante dans la partie inoculée, contient 1,62 fois plus d'azote que le témoin. Si l'on considère uniquement cet élément, la partie inoculée fournit  $2,72 \times 1,62$  soit 4,4 fois plus d'azote, pour une même surface. Ces résultats sont particulièrement significatifs. Il faut ajouter qu'ils ne tiennent pas compte

de la quantité d'azote excrétée par la plante dans le sol, phénomène habituel dans les cultures réussies de Légumineuses. Ce fait augmente encore l'effet utile de l'inoculation et fait bien augurer de l'augmentation attendue de la fertilité des sols.

b. *MEDICAGO SATIVA*.

Nous avons profité d'un nouvel essai d'introduction de *Medicago sativa* établi par le D<sup>r</sup> GERMAIN, dans des parcelles du Jardin agrostologique, pour expérimenter l'influence de l'inoculation. Des deux parcelles installées, l'une fut semée au moyen de graines inoculées.

L'inoculation fut réalisée selon la méthode classique, utilisée en régions tempérées, c'est-à-dire par trempage dans une culture liquide de *Rhizobium*, très riche.

Dès la levée, toutes les plantules des deux parcelles ont eu à souffrir d'une sérieuse attaque de « fonte » des semis. La majorité des plantes dépérirent.

L'évolution de cet essai a attiré l'attention sur un inconvénient nouveau et très grave de la méthode d'inoculation par trempage. En arrosant copieusement les graines au moyen d'une culture liquide, riche en glucide et en eau de levure, on a favorisé d'une manière toute spéciale, les agents fongiques de la fonte, au point que la parcelle inoculée fut totalement détruite alors que quelques plants se sont maintenus dans la parcelle non traitée.

Ces observations ont conduit à la conclusion déjà énoncée : mise au point pour les régions équatoriales d'une méthode d'inoculation spécialement adaptée.

**7. Essai d'inoculation de semences désinfectées.**

En zones intertropicales plus encore qu'en pays tempérés, la désinfection des graines avant le semis constitue une pratique du plus haut intérêt. La désinfection des graines de Légumineuses qui comporte l'enrobage au moyen d'un produit fongicide, est, dans la plupart des cas, incompatible avec l'inoculation du *Rhizobium* par trempage. Certains composés, comme beaucoup d'organo-mercuriques, largement utilisés, provoquent la destruction des *Rhizobium* qui y sont exposés, tandis que d'autres paraissent sans influence.

Après d'autres, ces faits militent en faveur d'un procédé d'inoculation qui tienne compte de la désinfection. Nous avons donc voulu expérimenter sur des graines désinfectées, la nouvelle technique d'inoculation proposée.

## OBSERVATIONS ET ESSAIS

Des graines de *Soja hispida* de la variété Palmetto ont été enrobées au moyen du produit pulvérulent Ceresan, à base de mercure; la dose utilisée dans la pratique est de 2 ‰. Nous l'avons portée à 4 ‰, de façon à rendre l'essai plus significatif. Quarante vases ont été préparés au moyen de terre de la Lilanda et stérilisés à l'autoclave. Dans chacun d'eux, on a semé, quatre paquets de trois graines, de façon à réaliser les objets suivants, comptant chacun dix vases :

- A. Graines non désinfectées, inoculées par trempage;
- B. Graines désinfectées, inoculées par trempage;
- C. Graines désinfectées, inoculées par arrosage des vases;
- D. Graines désinfectées, inoculées par adjonction aux poquets d'un inoculum solide, à base de balles de riz.

Les observations furent concluantes :

- Les racines des vases A montraient quelques nodules;
- Celles de l'objet B en étaient pratiquement dépourvues;
- En C, on notait la présence de nodules, mais en nombre insuffisant;
- Les plants D étaient normalement nodulés.

Il semble donc que la technique d'inoculation proposée puisse donner toute satisfaction.

### 8. Essai de conservation de souches dans le sol.

Nous avons vu précédemment que les conditions de sol, en régions équatoriales, ne semblent pas très propices à la conservation du *Rhizobium*. C'est la raison essentielle pour laquelle il a été nécessaire de mettre au point une méthode nouvelle d'inoculation, qui place la bactérie inoculée à l'abri des circonstances défavorables.

La détermination précise de l'évolution du *Rhizobium* dans le sol conditionne la pratique même de l'inoculation. En effet, la solution de plusieurs problèmes, tels la durée de survie du *Rhizobium* après l'enlèvement de la Légumineuse symbionte, l'évolution du comportement des souches aux points de vue de la spécificité et de l'« effectivité », doit fournir des renseignements très utiles au point de vue cultural.

Aussi avons-nous jugé intéressant d'entreprendre l'étude de ces divers problèmes. A cette fin, quatre séries de 32 tubes à essai ont été préparés, à savoir :

- 32 garnis de 10 g de sol de Yangambi (30-40 % d'argile),
- 32 de 6,5 g de sol M 4, alluvionnaire récent de la presque île Lokele,
- 32 de 10 g de sol de Bambesa (50-60 % d'argile),
- 32 de 10 g de sol de Lilanda, sablonneux et très léger.

SYMBIOSE *RHIZOBIUM*-LÉGUMINEUSES

Les substrats furent humidifiés en proportion convenable et la moitié des tubes de chaque série stérilisés à l'autoclave. Trois souches de *Rhizobium*, sous forme de culture liquide, furent ajoutées à raison de 1 ml par tube :

S.22	spécifique de <i>Medicago</i>	(150.10 <sup>6</sup> germes/cm <sup>3</sup> )
S.3012	» de <i>Soja</i>	(370.10 <sup>6</sup> germes/cm <sup>3</sup> )
S.Aa4	» de <i>Arachis</i>	(272.10 <sup>6</sup> germes/cm <sup>3</sup> )

La répartition des tubes était la suivante :

	S.22	S.3012	S.Aa4	Témoin
Sol Y 1, stérile	4	4	4	4
Sol Y 1, non stérile	4	4	4	4
Sol M 4, stérile	4	4	4	4
Sol M 4, non stérile	4	4	4	4
Sol Bambesa, stérile	4	4	4	4
Sol Bambesa, non stérile	4	4	4	4
Sol Lilanda, stérile	4	4	4	4
Sol Lilanda, non stérile	4	4	4	4

Les paniers contenant les tubesensemencés furent ensuite placés à température ordinaire, dans une demi-obscurité et à l'abri des infections.

Après un mois de conservation, on a procédé au comptage sur boîtes de Petri, à partir d'un échantillon moyen de l'un des quatre tubes de chaque série stérilisée.

Le tableau ci-dessous indique, pour chaque sol et chaque souche, la fraction de germes vivants, par rapport au nombre initial.

	S.22	S.3012	S.Aa4
Sol Y 1	1/6.000	1/4.000	1/2.500
Sol M 4	1/2.000	1/1.000	1/1.500
Sol Bambesa	1/500	1/600	1/300
Sol Lilanda	1/450	1/300	1/100

Les tubes restants ont été conservés pour examens ultérieurs, après plusieurs mois de conservation.

A l'examen des chiffres précités, on constate, dans tous les cas, une diminution très prononcée du nombre initial de microgermes. Ce phénomène est habituel, puisqu'il a été observé à maintes reprises, lors d'essais analogues réalisés dans des sols de régions tempérées (BONNIER, 1955]. Notons toutefois que la chute semble ici beaucoup plus importante.

## APPLICATIONS PRATIQUES

Remarquons également la grande variation suivant la nature du sol et l'origine de la souche conservée.

Ces essais seront poursuivis sur une échelle aussi vaste que possible. Étant donné la disparition rapide dans le sol des souches de *Rhizobium* expérimentées, la nécessité de l'inoculation n'en ressort que plus nettement encore. Cette pratique s'avère d'autant plus nécessaire que les chiffres cités plus haut ont été relevés sur sols stérilisés, où les bactéries sont à l'abri des phénomènes d'antagonisme, toujours actifs en milieux naturels.

## CHAPITRE IV

### APPLICATIONS PRATIQUES ACTUELLES

#### 1. Nécessité de l'inoculation des cultures.

L'inoculation des graines de Légumineuses cultivées, au moyen de souches actives de *Rhizobium*, apparaît comme une nécessité. En effet, dans la très grande majorité des cas, la nodulation produite spontanément est de loin insuffisante en quantité et en qualité.

Encore faut-il disposer, dès à présent, de souches de *Rhizobium* douées de qualités appropriées.

Nous possédons actuellement plusieurs souches spécifiques de *Soja hispida*, dont une au moins a prouvé ses qualités fixatrices au cours de différents essais effectués en Belgique. Expérimentée à Yangambi, elle y a donné les résultats spectaculaires rapportés au chapitre précédent.

Dès maintenant, on peut donc conseiller l'inoculation des graines de *Soja hispida*, quel que soit le but poursuivi, économique ou expérimental. Cette mesure paraît d'autant plus justifiée que le prix de revient de l'opération est pratiquement nul, pour un laboratoire de microbiologie bien équipé, tel celui de Yangambi. Les résultats sont certains et ne laissent aucun doute, dans la plupart des situations.

Pour chacune des cultures de *Arachis* et de *Stylosanthes*, on dispose de deux souches susceptibles de donner de bons résultats. Sans doute, les essais ont-ils été insuffisants pour démontrer la haute valeur de ces souches. Quoi qu'il en soit, en attendant la conclusion des travaux de contrôle subséquents, il serait utile d'y recourir dès à présent, au moins dans les parcelles d'essais de l'I.N.É.A.C.

Quant aux autres Légumineuses cultivées, il est malheureusement nécessaire d'attendre, pour chacune d'elles, la sélection des souches indispensables.

## **2. Inoculation de toute nouvelle Légumineuse introduite.**

Lors de toute introduction de Légumineuses nouvelles au Congo, il est indispensable d'en inoculer les graines au moyen de souches spécifiques et « effectives ».

Dans la grande majorité des cas, les plantes importées ne peuvent trouver dans le sol les *Rhizobium* qui leur sont adaptés. Cette adaptation des souches bactériennes à une espèce nouvelle est lente et progressive. Sans inoculation, la plante sera presque toujours incapable d'extérioriser complètement ses caractéristiques. Certaines introductions apparaissent comme sans valeur par suite de l'absence des souches bactériennes indispensables.

Il semble donc justifié que tout envoi de graines d'une espèce dont l'introduction est envisagée soit accompagné de la souche bactérienne correspondante. Une telle pratique est d'ailleurs très largement répandue, aux États-Unis et en Australie notamment.

## **3. Technique d'inoculation.**

Tout porte à croire qu'il faille écarter la technique classique du trempage des graines dans une culture liquide, méthode responsable, croyons-nous, de l'échec de certains essais d'inoculation, effectués antérieurement.

Nous préconisons l'adjonction aux graines, au moment même du semis, d'un produit solide, pulvérulent (à base de balles de riz, par exemple) contenant plusieurs milliards de bactéries actives au gramme.

Cette méthode ne présente aucune difficulté appréciable, en ce qui concerne les semis effectués à la main, tels qu'ils sont le plus souvent pratiqués. Il suffit en effet que le semeur place dans les poquets qui reçoivent les graines, une pincée du produit utilisé.

Il convient néanmoins d'envisager l'éventualité du semis mécanique. Le produit solide devrait être, dans ce cas, suffisamment sec pour pouvoir, avant le semis, être mélangé intimement aux graines.

Des vérifications préliminaires effectuées à Yangambi semblent montrer que la dessiccation, à température relativement basse (35 °C maximum) ne diminue pas d'une façon trop brutale le nombre de germes contenus dans l'inoculum. Bien entendu, des précisions supplémentaires sont nécessaires, en ce qui concerne notamment la quantité de produit pulvérulent à employer.

## CHAPITRE V

### PROBLÈMES A RÉSOUDRE

Ces problèmes peuvent se subdiviser en deux catégories : les premiers ont trait aux travaux à entreprendre dans un avenir immédiat, travaux indispensables à la généralisation des pratiques d'inoculation au Congo belge. Les seconds concernent les recherches à organiser dès que des résultats tangibles auront été obtenus. Leur importance n'est pas moindre mais leur réalisation est relativement moins urgente. La priorité doit être accordée aux études d'intérêt pratique immédiat.

La réalisation du plan de travail exposé ci-après constitue une œuvre de longue haleine et devra nécessairement être échelonnée sur plusieurs années.

#### 1. Problèmes à résoudre dans l'immédiat.

##### a. CHOIX DES LÉGUMINEUSES.

Il est évident qu'il n'est pas possible d'entamer en même temps l'étude de la fixation symbiotique sur toutes les espèces cultivées ou susceptibles d'être cultivées au Congo belge.

Il apparaît donc indispensable de donner la priorité aux Légumineuses les plus intéressantes, au point de vue économique notamment.

Les espèces retenues ont été choisies, à titre indicatif, en collaboration avec les spécialistes du Centre de Recherches de Yangambi. La liste en est donnée ci-dessous, suivant l'ordre d'importance de chaque groupe.

##### *Les plantes de couverture et de sidération.*

Il semble nécessaire de consacrer les premiers efforts aux Légumineuses de cette catégorie qui revêtent une importance toute spéciale.

On sait avec certitude qu'une Légumineuse donnée, non seulement peut fixer de grandes quantités d'azote pour en constituer sa propre substance, mais encore, excrète dans le sol des quantités appréciables de cet élément, au profit des autres constituants de l'association. De nombreuses expériences effectuées dans différentes conditions sont significatives à cet égard. C'est ainsi que VIRTANEN [1955] estime qu'en régions tempérées, la quantité d'azote fixée annuellement peut atteindre

500 kg/ha pour une culture bien réussie de *Medicago* ou de *Trifolium*. Il y a tout lieu de penser que ces quantités peuvent être atteintes, voire dépassées, en zone équatoriale, où la fixation s'effectue toute l'année. Une analyse du sol des parcelles de *Soja* que nous avons établies à Yangambi (et dont il fut question au chapitre III) a révélé que le pourcentage d'azote au voisinage des racines était de 0,066 % pour les parcelles non inoculées et de 0,078 % pour les parcelles inoculées. Ces faits font ressortir tout l'intérêt de l'emploi des Légumineuses comme plantes de couverture ou de sidération.

Il est certain qu'une couverture de Légumineuses parfaitement nodulées constitue un apport d'azote appréciable.

Parmi les genres à prendre en considération dans cette catégorie, citons : *Stylosanthes*, *Mucuna*, *Pueraria*, *Crotalaria*, *Desmodium*, *Indigofera*, *Canavalia*, *Mimosa invisa* (f. *inermis* notamment), *Leucaena* et *Soja*.

Une telle liste n'est d'ailleurs pas limitative et parmi les milliers d'espèces que compte la famille des Légumineuses, il en est certainement de très nombreuses qui pourraient être expérimentées.

A cet égard, il est d'une absolue nécessité que les chercheurs qui s'occuperaient de fixation symbiotique, collaborent très étroitement avec les services spécialisés de la Division de Botanique et des diverses Divisions agronomiques.

#### *Les plantes cultivées pour la graine.*

Ici encore, la situation mérite une grande attention. Nous avons vu que, pratiquement, toutes les espèces cultivées présentaient de grandes irrégularités en ce qui concerne la nodulation. Il est important de pouvoir, le plus rapidement possible, disposer de souches bactériennes sélectionnées destinées à l'inoculation systématique des graines de : *Arachis*, *Soja*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Vigna*, etc.

L'inoculation doit amener une augmentation sensible des récoltes en quantité et en qualité.

#### *Les plantes fourragères.*

*Soja*, *Stylosanthes*, *Trifolium*, *Medicago* (*M. varia* et *M. lutea* notamment), *Pueraria* (*P. tumbergiana*, par exemple), *Leucaena* (*L. glauca*) et d'autres genres encore du cru, peu connues mais qu'il serait utile d'expérimenter, doivent être étudiés au point de vue de la fixation symbiotique. La haute teneur en protides d'un fourrage est un facteur d'une importance trop évidente pour que l'inoculation puisse être négligée.

#### *Les plantes d'ombrage.*

Il est possible de profiter de la nécessité d'une essence d'ombrage pour cumuler son action protectrice avec un enrichissement du sol

## PROBLÈMES A RÉSOUDRE

en azote, dont pourrait bénéficier la plantation considérée. Parmi les plantes susceptibles d'être utilisées à cette fin, rappelons certaines espèces des genres : *Leucaena*, *Erythrina*, *Albizzia*, *Pterocarpus*, *Erythrophleum*, etc.

Nous n'avons pas mentionné jusqu'ici d'espèces intéressant les forestiers. Il est évident néanmoins que l'inoculation de graines destinées aux pépinières peut fournir des jeunes plants mieux constitués dont la transplantation est de ce fait facilitée.

### b. OBSERVATIONS « IN SITU ».

Il est important de multiplier les observations *in situ*, non seulement pour pouvoir juger de l'état de la nodulation, mais surtout pour augmenter les chances de rencontrer des souches très actives, particulièrement adaptées aux différentes espèces.

Ces prospections ne seront pas uniquement limitées à l'examen de la nodulation elle-même, mais porteront également sur les facteurs du milieu (climat, sol, système cultural, etc.).

Il est intéressant de connaître non seulement l'état de nodulation d'une Légumineuse donnée, mais aussi le pourquoi de cet état de choses. Cet examen conditionne, pour une bonne part, la maîtrise du problème et, par conséquent, les chances de pouvoir agir efficacement.

Les observations doivent être multipliées dans l'espace surtout. L'expérience nous a en effet appris que la situation peut être fort différente d'une région naturelle à une autre; la meilleure souche susceptible d'être utilisée dans la pratique ne sera pas nécessairement trouvée là où les cultures de la Légumineuse en cause sont cependant étendues.

La forêt ombrophile équatoriale, climax de la région envisagée, doit être largement prospectée. Il est important de pouvoir préciser les observations rapportées sur la carence totale ou partielle en nodules des Légumineuses de la forêt. Si cette carence est réelle, pourquoi existe-t-elle?

Les essences non nodulées sont-elles réfractaires à la nodulation? Est-ce le milieu qui est défavorable? Dans l'affirmative, pourquoi l'est-il moins pour certaines espèces (*Dewevrea bilabiata*) par exemple? A ce propos, il serait particulièrement intéressant de prospecter les Légumineuses des friches et jachères préforestières, qui s'installent en fin de cycle cultural.

D'autres milieux naturels, comme les savanes, par exemple, doivent être prospectés. En dehors de l'intérêt de ces observations, comme telles, nous pouvons y découvrir des souches bactériennes adaptées aux conditions particulières du milieu.

## c. ÉTABLISSEMENT DE PARCELLES D'OBSERVATION.

L'établissement de petites parcelles d'observation (quelques mètres carrés suffisent) offre un grand intérêt. Celles-ci, installées en différents endroits, au moyen des espèces jugées les plus intéressantes, permettent tout d'abord de connaître la réaction naturelle d'une espèce donnée, réaction toujours variable avec la nature du sol.

Ainsi à Yangambi, pour l'arachide, on pourrait ensemercer 10, 15 ou 20 petites parcelles, selon les possibilités, choisies sur des terrains de natures diverses. C'est la seule façon de juger du comportement naturel de l'arachide dans une région déterminée. Des nodules se forment-ils dans tous les cas? Quelles sont les caractéristiques pédologiques, là où aucune nodulation n'est observée? En quel endroit observe-t-on les nodosités de meilleure qualité?

Toutes ces questions ont leur importance pour la réussite du travail à entreprendre.

Ces parcelles expérimentales présentent un second avantage. Nous avons signalé que, dans les conditions naturelles, la Légumineuse que l'on installe sur un sol, sans inoculation, doit se contenter des souches quelconques, nullement appropriées, qui ont survécu dans le sol aux mauvaises conditions de milieu. On sait que, dans la plupart des cas, la formation de nodules très actifs nécessite un long processus d'« adaptation ». Or, des observations nombreuses et variées ont montré que, par la technique des semis successifs, une symbiose très active finissait par s'installer. On peut juger par là de l'intérêt des parcelles d'observation, comme source de races bactériennes actives, à sélectionner pour l'inoculation pratique<sup>1</sup>.

## d. ISOLEMENT DE SOUCHES.

Les prospections de toutes natures doivent fournir le matériel destiné à l'isolement de souches diverses.

Il est évidemment nécessaire de choisir, à cette fin, des nodules qui offrent les meilleures garanties (présence de leghémoglobine par exemple).

Chez certaines espèces, *Stylosanthes* entre autres, la couleur rouge interne transparait à l'extérieur. Par contre, chez d'autres comme le *Soja*, les assises externes ne laissent pas transparaitre la couleur rouge. Dans ce cas, les nodules doivent être prélevés sur des plantes paraissant

---

1. Étant donné les propriétés particulières du charbon de bois, rapportées précédemment, il serait utile d'envisager la culture de Légumineuses sur sol enrichi de cette matière, dans le but de sélectionner des souches bactériennes particulièrement actives.

## PROBLÈMES A RÉSOUDRE

disposer de tout l'azote qui leur est nécessaire. Au cours des opérations d'isolement proprement dites, par broyage des nodules ou par ponction interne, il est toujours possible d'éliminer le matériel qui ne donne pas satisfaction.

Pour l'isolement, on doit autant que possible, après désinfection, opérer par prélèvement de tissu interne; celui-ci est broyé dans l'eau stérile et ensemencé, après dilution, en boîtes de Petri. Comme on l'a vu précédemment, c'est la seule technique susceptible d'offrir toutes garanties au point de vue spécificité.

Il n'est pas certain que, pour chaque Légumineuse, les souches autochtones soient, dans chaque cas, les meilleures dont nous puissions disposer. Il est utile de les mettre en comparaison avec celles sélectionnées dans d'autres pays.

### e. CULTURES ASEPTIQUES DE LÉGUMINEUSES.

La culture aseptique des Légumineuses à petites graines n'offre pratiquement pas de difficultés. Elle se réalise aisément en tubes à essai, garnis d'un milieu approprié. Il ne faut toutefois pas perdre de vue que ces substrats ont été conçus pour l'étude des Légumineuses de régions tempérées, et rien ne prouve qu'ils conviennent dans tous les cas, pour les espèces qui nous intéressent ici.

Les Légumineuses à grosses graines réagissent difficilement en tubes de verre, même de grand volume. Comme elles sont particulièrement nombreuses et importantes en Afrique, il paraît indispensable de mettre au point de nouvelles techniques. On dispose notamment de méthodes qui maintiennent le système racinaire en conditions aseptiques tout en permettant à la partie aérienne de se développer à l'air libre.

### f. CULTURES EN VASES DE VÉGÉTATION.

On rencontrera certainement des cas où la culture de la Légumineuse n'est pratiquement pas réalisable avec succès en conditions aseptiques. Dans cette hypothèse, il est indispensable d'étudier les souches en vases de végétation, sur substrat inerte, de sable par exemple, auquel on ajoute, sous forme liquide, les éléments minéraux requis.

Dans tous les cas, les cultures en vases ont d'ailleurs une autre utilité.

Parmi les souches dont la spécificité et l'« effectivité » ont été déterminées, selon les techniques mentionnées, les meilleures doivent encore être expérimentées dans les conditions les plus proches possible des conditions naturelles, dans le but, tout d'abord, de vérifier leurs

capacités « compétitives ». A cette fin, des plantes inoculées et non inoculées sont cultivées en vases de végétation, contenant cette fois, non plus un substrat stérile, mais des échantillons non stérilisés du ou des sols sur lesquels l'espèce végétale pourra être cultivée. Ces vases contiennent donc les souches de *Rhizobium* quelconques, présentes dans les sols étudiés. Si des différences nettes et significatives sont observables entre vases inoculés et non inoculés, il est clair que les souches bactériennes en cause, ayant servi à l'inoculation, sont capables de coloniser les plantes, en conditions naturelles, malgré la présence éventuelle de souches indigènes moins actives.

Il est possible de cette façon d'obtenir des indications, tout au moins relatives, sur la valeur « compétitive » des souches. Certes, il existe des méthodes plus précises pour la détermination de la valeur « compétitive » mais elles exigent trop de temps pour être appliquées au cours des premiers travaux.

Les essais en vases, sur substrats naturels, tels que nous venons de les définir, sont encore nécessaires pour le choix pratiquement définitif des meilleures souches à utiliser. Celles qui ont satisfait aux divers tests déjà mentionnés doivent alors être finalement expérimentées en plein champ. Ces derniers essais, les plus coûteux et les plus difficiles à entretenir et à surveiller seraient beaucoup trop vastes si de nombreuses souches devaient y être comparées. Un premier tri peut donc être effectué en vases de végétation, sur sols naturels. Les comparaisons et la surveillance sont rendues plus faciles, du fait du groupement des vases, et l'entretien plus aisé. De plus, des sols de différentes natures peuvent être testés en même temps, ce qui n'est jamais possible en parcelles.

#### g. ESSAIS EN PLEIN CHAMP.

Seules, les meilleures souches, dont la valeur est déjà bien connue par les précédents essais, peuvent parvenir à ce dernier stade.

Les parcelles doivent être établies avec répétitions et répondre évidemment aux conditions exigées de toute bonne expérimentation agricole : homogénéité du sol, surface régulière, sentiers de séparation, etc. L'expérience a montré que des parcelles de un are, en quatre ou cinq répétitions, sont suffisantes.

Nous croyons que, dans les conditions équatoriales, il y a un intérêt certain à installer ces essais de plein champ en des endroits dont la fertilité est améliorée par un certain apport d'éléments minéraux indispensables. Toute fumure azotée est évidemment à proscrire.

Il est à souhaiter d'ailleurs, étant donné la pauvreté des sols en cause, que des essais de fumure soient combinés avec les essais d'inoculation. Nous avons déjà dit que le problème de l'inoculation des graines

## PROBLÈMES A RÉSOUDRE

de Légumineuses doit être, plus encore en Afrique, lié au problème général de la fertilité. Il ne suffit pas en effet de disposer de souches, excellentes à tous points de vue, pour croire que le problème des Légumineuses soit résolu. Si les autres éléments, P, K, Ca, Mg, S, sans parler des oligo-éléments, sont au minimum, il est bien certain que la symbiose sera limitée dans son développement et que la souche bactérienne ne pourra extérioriser toutes ses qualités. Les conditions doivent être telles que seul l'azote soit au minimum, condition indispensable pour que les plantes puissent réagir à l'inoculation d'une manière très marquée. Il suffit pour s'en convaincre de se reporter aux analyses effectuées sur *Soja*. Le premier des quatre essais a fourni les différences les plus nettes entre parcelles inoculées et non inoculées; il s'agit précisément des seules parcelles qui avaient reçu une fumure en P, K et Ca. Dans les sols africains particulièrement pauvres, il faut de toute nécessité, lier les deux problèmes, inoculation et fertilité en général. Négliger cet aspect de la question risque d'amener des échecs quelles que soient les qualités des souches bactériennes sélectionnées. Celles-ci, faut-il le rappeler, n'interviennent, de façon décisive, que dans le cycle de l'azote.

### h. MISE AU POINT DE TECHNIQUES D'INOCULATION.

Étant donné les conditions de milieu défavorables, il est indispensable de disposer de méthodes d'inoculation capables de protéger la bactérie au sein du sol (vis-à-vis de l'acidité, des températures superficielles élevées, du délavement, des produits désinfectants, etc.).

La méthode proposée, d'inoculation sous forme solide, paraît donner toute satisfaction. Néanmoins, il est clair que des efforts doivent être poursuivis dans ce sens, ne fût-ce que pour donner toute garantie à ce sujet. Les questions suivantes, entre autres, doivent être résolues :

- Les cultures solides proposées conservent-elles longtemps un nombre de germes suffisamment élevé?
- Peut-on dessécher le produit sans l'altérer profondément?
- Les souches bactériennes gardent-elles, dans ce milieu, leurs propriétés intactes?
- Ne dispose-t-on pas en Afrique d'un substrat meilleur encore que les balles de riz? Que donneraient certains substrats artificiels, par exemple?

Il est nécessaire que le produit préparé pour l'inoculation puisse conserver pendant plusieurs mois toute son activité, car, cette pratique une fois généralisée, il sera nécessaire de préparer de grandes quantités de culture solide, de la stocker et de faire des envois dans des régions éloignées.

Toutes les modalités techniques du conditionnement du produit à utiliser doivent être mises au point et éprouvées. Elles relèvent de l'activité de chercheurs occupés au problème du *Rhizobium*.

Nous venons de passer en revue, dans leur suite chronologique, les travaux jugés indispensables pour l'organisation de recherches concernant la fixation symbiotique.

Nous avons voulu, dans cette première partie, signaler ce qui peut être considéré comme d'une absolue nécessité, pour qui veut entreprendre avec succès, l'inoculation dans la pratique agricole.

D'autres travaux qui ont aussi leur importance ne doivent pas être négligés.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous n'insisterons que sur les aspects des recherches directement utiles à l'application phyto-technique. Le problème du *Rhizobium* peut encore être abordé sous des angles dont l'intérêt est indéniable du point de vue de la biologie générale. Tels sont : la spécificité, la biochimie du phénomène, etc. On ne peut songer à aborder ici toutes les questions susceptibles d'intéresser un chercheur.

## 2. Problèmes à résoudre dans un avenir plus éloigné.

### a. VÉRIFICATION PÉRIODIQUE DES SOUCHES UTILISÉES.

Les souches sélectionnées doivent être périodiquement soumises à des tests de vérification.

Les repiquages continus en milieu artificiel, au laboratoire, peuvent être défavorables au maintien des qualités originales de différentes races. Des mutations notamment sont possibles; ce fait nécessite certaines précautions.

La vérification périodique des souches doit être effectuée par passages sur le végétal, en conditions aseptiques, et réisolement à partir des nodules obtenus. On sait que, grâce aux techniques de lyophilisation, il est possible de conserver, pendant des années, des souches microbiennes stabilisées. Ces méthodes peuvent offrir un grand intérêt dans un laboratoire où de nombreuses races de *Rhizobium* sont manipulées.

Si la lyophilisation maintient les souches dans leur état premier, avec leurs caractéristiques, elle facilite encore l'organisation d'une collection de souches. En conditions normales, le *Rhizobium* doit être repiqué, sur milieu frais, tous les trois ou quatre mois environ : ces repiquages n'offrent aucune garantie, quant à la bonne conservation des propriétés particulières des différents types bactériens. Par contre, la lyophilisation autorise de très longues conservations, pendant des années, tout en stabilisant les souches dans leur état original.

## PROBLÈMES A RÉSOUDRE

### b. CONSERVATION ET MIGRATION DU *Rhizobium* DANS LE SOL.

La conservation du *Rhizobium* dans le sol varie avec la nature pédologique du terrain [BONNIER, 1955]. La bactérie peut disparaître rapidement de certains sols ou s'y maintenir, avec toutes ses propriétés, de longs mois, voire des années. Les diverses souches se comportent différemment à cet égard.

La connaissance de ces phénomènes est indispensable à qui veut réaliser l'inoculation des graines.

Les essais de conservation peuvent se doubler d'études concernant la possibilité pour les différentes souches de « migrer » dans le sol, de s'éloigner des points inoculés. En général, à la suite d'observations faites en régions tempérées, il semble que cette migration soit très faible. Ces propriétés doivent être vérifiées dans les sols soumis au délavement, dans les sols lourds, légers, secs, humides, etc.

Enfin, en raison des caractères particuliers des sols équatoriaux, il convient d'entreprendre une étude du comportement des différentes souches dans les milieux à acidité relativement forte. On enregistre de grandes variations d'une souche à l'autre.

Sans doute pourrait-on également entreprendre des travaux de sélection ou d'adaptation de souches de *Rhizobium* particulièrement résistantes à des pH peu élevés. La mise au point de telles races faciliterait grandement la solution du problème de l'inoculation, dans les sols très acides rencontrés en Afrique.

Nous avons vu que le procédé d'inoculation intervenait ici pour protéger les bactéries. Il est toutefois certain que des souches particulièrement résistantes à l'acidité offriraient des garanties supplémentaires de réussite.

### c. PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES DES SOUCHES DE *Rhizobium*.

Nous avons vu que le pouvoir « compétitif » des souches de *Rhizobium*, c'est-à-dire leur capacité de former des nodules de préférence à d'autres souches présentes dans le sol, pouvait se déterminer par l'examen du végétal, en sols naturels.

Dans certains cas, la détermination plus précise de ce pouvoir « compétitif » est nécessaire. C'est ainsi par exemple que, si l'on dispose d'une race très active au point de vue de la fixation, on peut envisager l'inoculation des graines destinées à un terrain qui contient déjà de bonnes souches mais d'une activité inférieure à celle inoculée. Pour réussir cette opération, il est indispensable de disposer d'une souche douée d'un pouvoir « compétitif » très élevé, puisqu'elle doit l'emporter dans la formation des nodules, sur les souches indigènes.

Afin de choisir les souches les plus aptes, des essais sont établis, en vases ou en parcelles avec répétitions. La moitié de ceux-ci sont inoculés au moyen de la souche très active dont on veut déterminer la valeur « compétitive ». Au moment de la floraison, période d'activité maxima des nodules, on prélève un certain nombre de plantes dans chaque objet. Après isolement, on identifie les races de *Rhizobium* en présence, au moyen de tests sérologiques. Pour ce faire, il s'agit de disposer de sérum satisfaisant, donnant une agglutination spécifique avec la souche à l'étude.

La différence entre le nombre de souches agglutinées originaires des parcelles inoculées et le nombre de souches agglutinées originaires des parcelles non inoculées, donne une valeur que l'on considère comme le pouvoir « compétitif ». Dans les cas les plus favorables, il peut atteindre 80 %, ce qui signifie que 80 % des nodules des parcelles inoculées sont certainement dus à la souche utilisée. Ces essais exigent des centaines d'isollements et de tests sérologiques, d'autant plus que ce pouvoir « compétitif » peut encore varier avec le sol en cause. Néanmoins, c'est un travail souvent utile [POCHON *et al.*, 1950*b*].

#### d. INFLUENCE DE LA LONGUEUR DU JOUR SUR LA SYMBIOSE.

Parmi les facteurs du milieu qui conditionnent la symbiose, la longueur du jour exerce une action décisive. Des essais variés [BONNIER et SIRONVAL, 1956; SIRONVAL *et al.*, 1957] ont montré que, pour une souche donnée, des jours courts, de huit heures par exemple, peuvent inhiber totalement la formation des nodules, tandis que, en jours longs, de seize heures par exemple, l'activité fixatrice résultant de la symbiose était accrue.

Du fait qu'en Afrique centrale, les jours sont limités à douze heures environ, le problème revêt une importance toute spéciale.

- Les souches sélectionnées en Afrique montrent-elles une activité plus importante en jours de seize heures par exemple ?

- Les souches bactériennes isolées d'une même Légumineuse, réagissent-elles de la même façon à la longueur du jour ?

- Est-il possible de rencontrer, voire de sélectionner, des races dont l'activité serait maxima en jours de douze heures ?

Sans doute, cette activité fixatrice, variable avec la durée d'éclaircissement, est-elle fonction de l'activité chlorophyllienne, elle-même sous la dépendance du facteur lumière. Ces études relèvent donc autant de la physiologie végétale que de la microbiologie; il est toutefois nécessaire de les entreprendre, car elles conditionnent les applications à la phytotechnie.

## PROBLÈMES A RÉSOUDRE

La faible nodulation des Légumineuses forestières, phénomène que nous avons observé et rapporté précédemment, peut être une résultante de la luminosité, d'autant plus que des différences entre types de forêts semblent réelles.

Les observations méritent également d'être poursuivies à ce sujet.

### e. INFLUENCE DES OLIGO-ÉLÉMENTS DU SOL SUR LA SYMBIOSE.

L'attention a été attirée sur l'importance de certains oligo-éléments, le molybdène et le bore principalement, qui interviennent dans les mécanismes biochimiques de la fixation de l'azote. HEWITT [1956] notamment conclut comme suit son étude sur ce sujet : « La déficience du sol en molybdène provoque des symptômes de carence azotée, due à une fixation plus faible dans les nodules radiculaires ». Les nodules sont plus petits et plus nombreux, mais moins « effectifs », voire « ineffectifs ». ANDERSON [1956] a observé qu'une application de molybdène augmentait la fixation symbiotique de l'azote et, partant, favorisait le développement des Légumineuses. Systématiquement, en Australie, on ajoute aux engrais phosphatés destinés aux cultures de Légumineuses du molybdène, sous forme de  $\text{MoO}_3$ .

Des essais dans ce sens sont à entreprendre en Afrique centrale, dans le cadre de l'expérimentation concernant la fixation symbiotique.

### g. LES FAUSSES NODULATIONS.

L'étude des fausses nodulations, que nous avons couramment observées sur *Arachis*, mérite d'être poursuivie.

- Quelle est leur origine, leur nature ?
- Ont-elles un rapport quelconque avec le *Rhizobium* ?
- Sont-elles compatibles avec les vraies nodosités ?
- Jusqu'à quel point peuvent-elles nuire au végétal ?
- Est-il possible de les éviter ?

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les divers essais et observations que nous avons pu réaliser ont montré que les études concernant la fixation symbiotique de l'azote de l'air par les Légumineuses offraient de grandes possibilités en Afrique.

Les résultats positifs à obtenir sont certains et nous n'hésitons pas à ajouter qu'ils peuvent avoir une influence favorable très nette sur l'évolution de l'agriculture au Congo belge.

L'inoculation préalable des graines de Légumineuses au moyen de souches de *Rhizobium*, judicieusement choisies, peut incontestablement aider à résoudre le problème essentiel qui se pose : celui de la fertilité.

Rappelons que, par l'inoculation du *Soja*, nous avons pu obtenir 4,5 fois plus d'azote, sur la même surface cultivée, sans tenir compte d'ailleurs de l'azote excrété dans le sol.

De tels chiffres montrent d'une façon évidente, non seulement l'intérêt mais la nécessité absolue de réaliser, le plus rapidement possible, les études qui conditionnent l'inoculation. Les résultats souvent spectaculaires obtenus en Belgique, sur luzerne notamment [MANIL et BONNIER, 1949 et 1950; BONNIER, 1955] nous avaient à priori convaincu de l'intérêt de l'inoculation sous d'autres climats, pour certaines Légumineuses tout au moins.

Il faut souligner que la tâche à entreprendre ne relève pas exclusivement de la microbiologie ou de la biochimie microbienne, mais qu'elle est en fait agronomique, dans le plein sens du terme, c'est-à-dire qu'il faut tenir compte de tous les facteurs qui peuvent conditionner l'apparition de la symbiose plante-bactérie et l'évolution heureuse de celle-ci. C'est dire qu'aux problèmes essentiels d'ordre microbiologique, se joignent des problèmes qui relèvent de la botanique, de la pédologie, de la physiologie et génétique végétales, de la phytotechnie. Les chercheurs appelés à s'occuper de ces études doivent donc avoir une vue synthétique du problème.

## BIBLIOGRAPHIE

1937. ALBRECHT, W.A., Physiology of root nodule bacteria in relation to fertility levels of the soil, *Proc. Soil Sci. Soc.*, II, p. 315-27.
1940. ALLEN, O.N. et ALLEN, E.K., False nodulation on certain Leguminous species, *Proc. Hawaiian Acad. Sci.*, sp. publ., 35, p. 15-6.
1954. ALLEN, O.N. et BALDWIN, I.L., Rhizobia-Legume relationships, *Soil Sci.*, LXXVIII, 6, p. 415-27.
1956. ANDERSON, A.J., Molybdenum deficiencies in Legumes in Australia, *Soil Sci.*, LXXXI, 3, p. 173-82.
1948. ANDERSON, A.J. et SPENCER, D., Lime in relation to clover nodulation at site on the Southern Tablelands of New South Wales, *Jl. aust. Inst. agric. Sci.*, XIV, 1, p. 39-41.
1950. BONNIER, C., Formation de nodosités radiculaires sur *Soja hispida* M. dans une terre dépourvue du *Rhizobium* spécifique, *Bull. Inst. agr. Stat. Rech. Gembloux*, XVIII, 1-2, p. 218-9.
1951. BONNIER, C., Formation de nodosités radiculaires sur *Arachis hypogaea* L. dans une terre dépourvue du *Rhizobium* spécifique, *Bull. Inst. agr. Stat. Rech. Gembloux*, XIX, 1-2, p. 229-30.
1952. BONNIER, C., HELY, F.W. et MANIL, P., Essai d'adaptation à *Soja hispida* de souches de *Rhizobium* non spécifiques. Influence de greffes sur la spécificité d'hôte du genre *Rhizobium*, *Bull. Inst. agr. Stat. Rech. Gembloux*, XX, 1-3, p. 137-40.
1953. BONNIER, C., Classification et spécificité de l'hôte dans le genre *Rhizobium*, *Atti VI<sup>e</sup> Congr. Int. Microbiol.*, Rome, XVI, p. 325-7.
1955. BONNIER, C., La conservation du *Rhizobium* en sols stériles, *Bull. Inst. agr. Stat. Rech. Gembloux*, XXIII, 4, p. 359-67.
- s. d. BONNIER, C., Observations non publiées.
1956. BONNIER, C. et SIRONVAL, C., Influence of day-length on nodule formation in *Soja hispida* by a specific *Rhizobium* strain, *Nature*, Londres, CLXXVII, 4498, p. 93-4.
1933. BREMEKAMP, C. E. B., The bacteriophilous Species of *Psychotria*, *Jl Botany*, LXXI, 850, p. 271-80.
1956. DAVIES, E. B., Factors affecting molybdenum availability in soils, *Soil Sci.*, LXXXI, 3, p. 209-21.
1956. EVANS, H. J., Role of molybdenum in plant nutrition, *Soil Sci.*, LXXXI, 3, p. 199-208.
1953. HELY, F. W., BONNIER, C. et MANIL, P., Effect of grafting on nodulation of *Trifolium ambiguum*, *Nature*, Londres, CLXXI, 4359, p. 884-5.
1956. HEWITT, E. J., Symptoms of molybdenum deficiency in plants, *Soil Sci.*, LXXXI, 3, p. 159-70.

## BIBLIOGRAPHIE

1937. MAC CALLA, T.M., Behavior of legume bacteria (*Rhizobium*) in relation to exchangeable calcium and hydrogen on concentration of the colloidal fraction of the soil, *Missouri agric. expt Stat., Res. Bull.* 256, 44 pp.
1954. MALAN, C.F., Ricerche sui tubercoli radicoli e sulle micorize delle Leguminose alpine, *Ann.Bot.*, Rome, XXI, 3, p. 465-94.
1946. MANIL, P., Microbes et actions microbiennes, Desoer, Liège, 300 pp.
1948. - 1949. MANIL, P. et BONNIER, C., Fixation symbiotique d'azote chez la Luzerne (*Medicago sativa* L.). I. - Recherches effectuées en 1948, *Bull. Inst. agr. Stat. Rech. Gembloux*, XVII, p. 123-46.
1950. MANIL, P. et BONNIER, C. Fixation symbiotique d'azote chez la Luzerne (*Medicago sativa* L.). II. - Recherches effectuées en 1949, *Bull. Inst. agr. Stat. Rech. Gembloux*, XVIII, 1-2, p. 89-126.
1951. MANIL, P. et BONNIER, C., Fixation symbiotique d'azote chez la Luzerne (*Medicago sativa* L.). III. - Nouveaux essais pratiques d'inoculation, *Bull. Inst. agr. Sta. Rech. Gembloux*, XIX, 1-2, p. 15-32.
1953. MULDER, E.G., The essentiality of trace elements for microorganisms and the microbiological determination of these element, VI<sup>e</sup> Congr. Int. Microbiol., Rome, Riassunti delle comunicazioni, III, p. 1312.
1941. NICOL, H. et THORNTON, H.G., Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host, *Proc. roy. Soc., Londres, sér. B.*, CXXX, 858, p. 32-59.
1956. NORRIS, D.O., Legumes and the *Rhizobium* symbiosis, *Emp. Jl exp. Agric.*, XXIV, 96, p. 247-70.
1953. NUTMAN, P.S., Studies on the physiology of nodule formation. IV. Mutual inhibitory effects on nodule production of plants grown in association, *Ann. Bot.*, n<sup>11</sup><sup>e</sup> sér., XVII, 65, p. 95-126.
- 1950<sup>a</sup>. POCHON, J., MANIL, P., TCHAN, Y.T. et BONNIER, C., Compétition entre souches de *Rhizobium*. Analyse sérologique du phénomène, *C. R. Séan. Acad. Sci.*, Paris, CCXXX, p. 2134-5.
- 1950<sup>b</sup>. POCHON, J., MANIL, P., TCHAN, Y.T., BONNIER, C. et CHALVIGNAC, M.-A., Étude sérologique des *Rhizobium*. Application au phénomène de la compétition entre souches, *Ann. Inst. Pasteur*, LXXIX, p. 757-62.
1956. PURVIS, E.R. et PETERSON, N.K., Methods of soil and plant analyses for molybdenum, *Soil Sci.*, LXXXI, 3, p. 223-8.
1956. REISENAUER, H.M., Molybdenum content of alfalfa in relation to deficiency symptoms and response to molybdenum fertilization, *Soil Sci.*, LXXXI, 3, p. 237-58.
1957. SIRONVAL, C., BONNIER, C. et VERLINDEN, J.P., Action of day-length on nodule formation and chlorophyll content of *Soja hispida*, *Physiol. Plant.*, X, 4, p. 697-707.
1954. THORNTON, H. G., The nodule bacteria and their host Legumes : some problems that they still present, *Sci. Progr.*, XLII, 166, p. 185-204.
1954. VINCENT, J.M., The root-nodule bacteria of pasture Legumes, Seventh-ninth Ann. Gen. Met., 31st March 1954, Presidential Address, *Proc. Linn. Soc. N.S.W.*, LXXIX, 1-2, p. I-XXXI.
1956. VIOLARD-GOUDON, A. et RICHARD, C., Étude pluviométrique, physico-chimique et économique des eaux de pluie à Saïgon, *Agron. trop.* XI, 1, p. 74-92.
1955. VIRTANEN, A.I., Rapports du 3<sup>m</sup><sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, Bruxelles, p. 192-200.
1912. VON FABER, F.C., Das erbliche Zusammenleben von Bakterien und tropische Pflanzen, *Jahrb. f. wiss. Botanik*, LI p. 285-375.

## BIBLIOGRAPHIE

1939. WILSON, J.K., Leguminous plants and their associated organisms, Cornell Univ. agric. expt. Stat., Mem. 221, 48 pp.
1925. WRIGHT, W.H., The nodule bacteria of soybeans : 1. Bacteriology of strains, *Soil Sci.*, XX, p. 95-120.
1902. ZIMMERMANN, A., Ueber Bakterienknoten in den Blättern einiger Rubiaceen, *Jahrb. f. wiss. Botanik*, XXXVII, p. 1-11.



# Publications de l'INÉAC

Les publications de l'INÉAC peuvent être échangées contre des publications similaires et des périodiques émanant des Institutions belges ou étrangères. S'adresser : 1, rue Defacqz à Bruxelles. Elles peuvent être obtenues moyennant versement du prix de vente au n° 8737 du compte chèques postaux de l'Institut.

Les études sont publiées sous la responsabilité de leurs auteurs.

## SÉRIE SCIENTIFIQUE

1. LEBRUN, J., **Les essences forestières des régions montagneuses du Congo oriental**, 264 pp., 28 fig., 18 pl., 25 F, 1935 (épuisé).
2. STEYAERT, R.-L., **Un ennemi naturel du *Stephanoderes*. Le *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILLEMIN**, 46 pp., 16 fig., 5 F, 1935 (épuisé).
3. GHESQUIÈRE, J., **État sanitaire de quelques palmeraies de la province de Coquilhatville**, 40 pp., 15 F, 1935 (épuisé).
4. STANER, P., **Quelques plantes congolaises à fruits comestibles**, 56 pp., 9 fig., 9 F, 1935 (épuisé).
5. BEIRNAERT, A., **Introduction à la biologie florale du palmier à huile**, 42 pp., 28 fig., 12 F, 1935 (épuisé).
6. JURION, F., **La brûlure des caféiers**, 28 pp., 30 fig., 8 F, 1936 (épuisé).
7. STEYAERT, R.-L., **Étude des facteurs météorologiques régissant la pullulation du *Rhizoctonia Solani* KUHN sur le cotonnier**, 27 pp., 3 fig., 20 F, 1936 (épuisé).
8. LEROY, J.-V., **Observations relatives à quelques insectes attaquant le caféier**, 30 pp., 9 fig., 10 F, 1936 (épuisé).
9. STEYAERT, R.-L., **Le port et la pathologie du cotonnier. — Influence des facteurs météorologiques**, 32 pp., 11 fig., 17 tabl., 30 F, 1936 (épuisé).
10. LEROY, J.-V., **Observations relatives à quelques hémiptères du cotonnier**, 20 pp., 18 pl., 9 fig., 35 F, 1936 (épuisé).
11. STOFFELS, E., **La sélection du caféier *arabica* à la Station de Mulungu. (Premières communications)**, 41 pp., 22 fig., 12 F, 1936 (épuisé).
12. OPSOMER, J.-E., **Recherches sur la « Méthodique » de l'amélioration du riz à Yangambi. I. La technique des essais**, 25 pp., 2 fig., 15 tabl., 25 F, 1937.
13. STEYAERT, R.-L., **Présence du *Sclerospora Maydis* (RAC.) PALM (*S. javanica* PALM) au Congo belge**, 16 pp., 1 pl., 15 F, 1937.
14. OPSOMER, J.-E., **Notes techniques sur la conduite des essais avec plantes annuelles et l'analyse des résultats**, 79 pp., 16 fig., 20 fr., 1937 (épuisé).
15. OPSOMER, J.-E., **Recherches sur la « Méthodique » de l'amélioration du riz à Yangambi. II. Études de biologie florale. — Essais d'hybridation**, 39 pp., 7 fig., 25 F, 1938.
16. STEYAERT, R.-L., **La sélection du cotonnier pour la résistance aux stigmato-mycoses**, 29 pp., 10 tabl., 8 fig., 20 F, 1939.
17. GILBERT, G., **Observations préliminaires sur la morphologie des plantules forestières au Congo belge**, 28 pp., 7 fig., 20 F, 1939.
18. STEYAERT, R.-L., **Notes sur deux conditions pathologiques de l'*Elaeis guineensis***, 13 pp., 5 fig., 10 F, 1939.
19. HENDRICKX, F.-L., **Observations sur la maladie verruqueuse des fruits du caféier**, 11 pp., 1 fig., 10 F, 1939 (épuisé).
20. HENRARD, P., **Réaction de la microflore du sol aux feux de brousse. — Essai préliminaire exécuté dans la région de Kisantu**, 23 pp., 15 F, 1939.
21. SOYER, D., **La "rosette" de l'arachide. — Recherches sur les vecteurs possibles de la maladie**, 23 pp., 7 fig., 18 F, 1939.
22. FERRAND, M., **Observations sur les variations de la concentration du latex *in situ* par la microméthode de la goutte du latex**, 33 pp., 1 fig., 20 F, 1941.

23. WOUTERS, W., Contribution à la biologie florale du maïs. — Sa pollinisation libre et sa pollinisation contrôlée en Afrique centrale, 51 pp., 11 fig., 30 F, 1941.
24. OPSOMER, J.-E Contribution à l'étude de l'hétérosis chez le riz, 30 pp., 1 fig., 18 F, 1942.
- 24bis. VRIJDAGH, J. M., Études sur la biologie des *Dysdercus supersticiosus* F. (Hemiptera), 19 pp., 10 tabl., 15 F, 1941.
25. DE LEENHEER, L., Introduction à l'étude minéralogique des sols du Congo belge, 45 pp., 4 fig., 25 F, 1944.
- 25bis. STOFFELS, E., La sélection du caféier *arabica* à la Station de Mulungu. (Deuxièmes communications), 72 pp., 11 fig., 30 tabl., 50 F, 1942 (épuisé).
26. HENDRICKX, F.-L., LEFÈVRE, P.-C. et LEROY, J.-V., Les *Antestia* spp. au Kivu, 69 pp., 9 fig., 5 graph., 50 F, 1942 (épuisé).
27. BEIRNAERT, A. et VANDERWEYEN, R., Contribution à l'étude génétique et biométrique des variétés d'*Elaeis guineensis* JACQUIN. (Communication n° 4 sur le palmier à huile), 100 pp., 9 fig., 34 tabl., 60 F, 1941 (épuisé).
28. VRIJDAGH, J. M., Étude de l'acariose du cotonnier, causée par *Hemitarsonemus latus* (BANKS) au Congo belge, 25 pp., 6 fig., 20 F, 1942 (épuisé).
29. SOYER, D., Miride du cotonnier, *Creontiades pallidus* RAMB. *Capsidae* (Miridae), 15 pp., 8 fig., 25 F, 1942 (épuisé).
30. LEFÈVRE, P.-C., Introduction à l'étude de *Helopeltis orophila* GHESQ., 46 pp., 6 graph., 10 tabl., 14 photos, 45 F, 1942 (épuisé).
31. VRIJDAGH, J. M., Étude comparée sur la biologie de *Dysdercus nigrofasciatus* STÅL. et *Dysdercus melanoderes* KARSCH., 32 pp., 1 fig., 3 pl. en couleur, 40 F, 1942 (épuisé).
32. CASTAGNE, E., ADRIAENS, L. et ISTAS, R., Contribution à l'étude chimique de quelques bois congolais, 30 pp., 15 F, 1946.
33. SOYER, D., Une nouvelle maladie du cotonnier. La *Psyllose* provoquée par *Paurocephala gossypii* RUSSELL, 40 pp., 1 pl., 9 fig., 50 F, 1947.
34. WOUTERS, W., Contribution à l'étude taxonomique et caryologique du genre *Gossypium* et application à l'amélioration du cotonnier au Congo belge, 383 pp., 5 pl., 18 fig., 250 F, 1948.
35. HENDRICKX, F.-L., *Sylloge fungorum congensium*, 216 pp., 100 F, 1948.
36. FOUARGE, J., L'attaque du bois de Limba (*Terminalia superba* ENGL. et DIELS) par le *Lyctus brunneus* LE C., 17 pp., 9 fig., 15 F, 1947.
37. DONIS, C., Essai d'économie forestière au Mayumbe, 92 pp., 3 cartes, 63 fig., 70 F, 1948.
38. D'HOORE, J. et FRIPIAT, J., Recherches sur les variations de structure du sol à Yangambi (Congo belge), 60 pp., 8 fig., 30 F, 1948.
39. HOMÈS, M.-V., L'alimentation minérale du Palmier à huile *Elaeis guineensis* JACQ., 124 pp., 16 fig., 100 F, 1949.
40. ENGELBEEN, M., Contribution expérimentale à l'étude de la Biologie florale de *Cinchona Ledgeriana* MOENS, 140 pp., 18 fig., 28 photos, 120 F, 1949.
41. SCHMITZ, G., La Pyrale du Caféier Robusta, *Dichocrocis crocodora* MEYRICK, biologie et moyens de lutte, 132 pp., 36 fig., 100 F, 1949.
42. VANDERWEYEN, R. et ROELS, O., Les variétés d'*Elaeis guineensis* JACQUIN du type *albescens* et l'*Elaeis melanococca* GAERTNER (em. BAILEY). - Note préliminaire, 24 pp., 16 fig., 3 pl., 30 F, 1949.
43. GERMAIN, R., Reconnaissance géobotanique dans le Nord du Kwango, 22 pp., 13 fig., 25 F, 1949.
44. LAUDELOUT, H. et D'HOORE, J., Influence du milieu sur les matières humiques en relation avec la microflore du sol dans la région de Yangambi (Congo belge), 32 pp., 20 F, 1949.
45. LÉONARD, J., Étude botanique des copaliers du Congo belge, 158 pp., 23 photos, 16 fig., 3 pl., 130 F, 1950.
46. KELLOGG, C.E et DAVOL, F.D., An exploratory study of soil groups in the Belgian Congo, 73 pp., 35 photos, 100 F, 1949.
47. LAUDELOUT, H., Étude pédologique d'un essai de fumure minérale de l'*Elaeis* à Yangambi, 21 pp., 25 F, 1950.

48. LEFÈVRE, P.-C., *Bruchus obtectus* SAY ou Bruche des haricots (*Phaseolus vulgaris* L.), 68 pp., 35 F, 1950.
49. LECOMTE, M., DE COENE, R. et CORCELLB, F., Observations sur les réactions du cotonnier aux conditions de milieu, 55 pp., 7 fig., 70 F, 1951.
50. LAUDELOUT, H. et DU BOIS, H., Microbiologie des sols latéritiques de l'Uele, 36 pp., 30 F, 1951.
51. DONIS, C. et MAUDOUX, E., Sur l'uniformisation par le haut. Une méthode de conversion des forêts sauvages, 80 pp., 4 fig. hors texte, 100 F, 1951.
52. GERMAIN, R., Les associations végétales de la plaine de la Ruzizi (Congo belge) en relation avec le milieu, 322 pp., 28 fig., 83 photos, 180 F, 1952.
53. ISTAS, J.-R. et RAEKELBOOM, E.-L., Contribution à l'étude chimique des bois du Mayumbe, 122 pp., 17 pl., 3 tabl., 100 F, 1952.
54. FRIPIAT, J.-J. et GASTUCHE, M.-C., Étude physico-chimique des surfaces des argiles. Les combinaisons de la kaolinite avec les oxydes du fer trivalent, 60 pp., 50 F, 1952.
55. DE LEENHEER, L., D'HOORE, J. et SYS, K., Cartographie et caractérisation pédologique de la catena de Yangambi, 62 pp., 50 F, 1952.
56. RINGOET, A., Recherches sur la transpiration et le bilan d'eau de quelques plantes tropicales (Palmier à huile, Cafétier, Cacaoyer, etc.), 139 pp., 25 fig., 140 F, 1952.
57. BARTHOLOMEW, W.V., MEYER, J. et LAUDELOUT, H., Mineral nutrient immobilization under forest and grass fallow in the Yangambi (Belgian Congo) Region—With some preliminary results on the decomposition of plant material on the forest floor, 27 pp., 10 tabl., 30 F, 1953.
58. HOMÈS, M.-V., L'alimentation minérale du cacaoyer (*Theobroma Cacao* L.), 128 pp., 6 fig., 125 F, 1953.
59. RUHE, R.V., Erosion Surfaces of Central African Interior High Plateaus, 56 pp., 100 F, 1954.
60. WAEGEMANS, G., Les latérites de Gimbi (Bas-Congo), 28 pp., 4 fig., 4 photos, 25 F, 1954.
61. MULLENDERS, W., La végétation de Kaniama (Entre-Lubishi-Lubilash, Congo belge), 499 pp., 39 fig., 18 pl., 6 tabl. hors texte, 180 F, 1954.
62. D'HOORE, J., L'accumulation des sesquioxydes libres dans les sols tropicaux, 132 pp., 37 photos, 24 fig., 80 F, 1954.
- 62<sup>bis</sup>. D'HOORE, J., De accumulatie van vrije sesquioxyden in tropische gronden, 134 pp., 37 foto's, 24 fig., 80 F, 1954.
63. LEBRUN, J. et GILBERT, G., Une classification écologique des forêts du Congo, 90 pp., 1 fig., 1 carte hors texte, 16 photos, 60 F, 1954.
64. DE HEINZELIN, J., Observations sur la genèse des nappes de gravats dans les sols tropicaux, 37 pp., 14 fig., 30 F, 1955.
65. DEVRED, R., Les savanes herbeuses de la région de Mvuazi (Bas-Congo), 115 pp., 7 tabl., 100 F, 1956.
66. RUHE, V., Landscape evolution in the High Ituri, Belgian Congo, 92 pp., 8 fig., 7 photos, 6 tabl., 90 F, 1956.
67. GERMAIN, R. et EVRARD, C., Étude écologique et phytosociologique de la forêt à *Brachystegia laurentii*, 105 pp., 12 fig., 7 photos, 90 F, 1956.
68. BERNARD, E., Le déterminisme de l'évaporation dans la nature, 162 pp., 135 F, 1956.
69. MOLLE, A., L'alimentation minérale du caféier (*Coffea canephora* PIERRE), 164 pp., 6 fig., 160 F, 1957.
70. SCHMITZ, G. et CRISINEL, P., La lutte contre *Stephanoderes hampei* FERR., 156 pp., 1 fig., 7 photos, 130 F, 1957.
71. SCHMITZ, G. L'*Helopeltis* du cotonnier en Afrique centrale, (sous presse).

72. BONNIER, C., **Symbiose *Rhizobium*-Légumineuses en région équatoriale**, 68 pp., 2 fig., 4 tabl., 60 F, 1957.
73. CULOT, J.P. et VAN WAMBEKE, A., **Contribution à l'étude des déficiences minérales du caféier d'Arabie au Kivu** (sous presse).

#### SÉRIE TECHNIQUE

1. RINGOET, A., **Notes sur la préparation du café**, 52 pp., 13 fig., 5 F, 1935 (épuisé).
2. SOYER, L., **Les méthodes de mensuration de la longueur des fibres de coton**, 27 pp., 12 fig., 3 F, 1935 (épuisé).
3. SOYER, L., **Technique de l'autofécondation et de l'hybridation des fleurs du cotonnier**, 19 pp., 4 fig., 2 F, 1935 (épuisé).
4. BEIRNAERT, A., **Germination des graines d'Elacis. Essais entrepris à Yangambi**, 39 pp., 7 fig., 8 F, 1936 (épuisé).
5. WÆLKENS, M., **Travaux de sélection du coton**, 107 pp., 23 fig., 50 F, 1936 (épuisé).
6. FERRAND, M., **La multiplication de l'*Hevea brasiliensis* au Congo belge**, 34 pp., 11 fig., 12 F, 1936 (épuisé).
7. REYFENS, J.-L., **La production de la banane au Cameroun**, 22 pp., 20 fig., 8 F, 1936 (épuisé).
8. PITTEY, R., **Quelques données sur l'expérimentation cotonnière. — Influence de la date des semis sur le rendement. — Essais comparatifs**, 61 pp., 47 tabl., 23 fig., 40 F, 1936.
9. WÆLKENS, M., **La purification du Triumph Big Boll dans l'Uele**, 44 pp., 22 fig., 30 F, 1936.
10. WÆLKENS, M., **La campagne cotonnière 1935-1936**, 46 pp., 9 fig., 25 F, 1936.
11. WILBAUX, R., **Quelques données sur l'épuration de l'huile de palme**, 16 pp., 6 fig., 5 F, 1937 (épuisé).
12. STOFFELS, E., **La taille du caféier *arabica* au Kivu**, 34 pp., 22 fig., 8 photos, 9 planches, 15 F, 1937 (épuisé).
13. WILBAUX, R., **Recherches préliminaires sur la préparation du café par voie humide**, 50 pp., 3 fig., 12 F, 1937 (épuisé).
14. SOYER, L., **Une méthode d'appréciation du coton-graines**, 30 pp., 7 fig., 9 tabl., 8 F, 1937 (épuisé).
15. WILBAUX, R., **Recherches préliminaires sur la préparation du cacao**, 71 pp., 9 fig., 40 F, 1937 (épuisé).
16. SOYER, D., **Les caractéristiques du cotonnier au Lomami. — Étude comparative de cinq variétés de cotonniers expérimentées à la Station de Gandajika**, 60 pp., 14 fig., 3 pl., 24 tabl., 40 F, 1937.
17. RINGOET, A., **La culture du quinquina. — Possibilités au Congo belge**, 40 pp., 9 fig., 10 F, 1938 (épuisé).
18. GILLAIN, J., **Contribution à l'étude des races bovines indigènes au Congo belge**, 33 pp., 16 fig., 20 F, 1938.
19. OPSOMER, J.-E. et CARNEWAL, J., **Rapport sur les essais comparatifs du décor-ticage de riz exécutés à Yangambi en 1936 et 1937**, 39 pp., 6 fig., 12 tabl. hors texte, 25 F, 1938.
20. LECOMTE, M., **Recherches sur le cotonnier dans les régions de savane de l'Uele**, 38 pp., 4 fig., 8 photos, 20 F, 1938.
21. WILBAUX, R., **Recherches sur la préparation du café par voie humide**, 45 pp., 11 fig., 30 F, 1938 (épuisé).
22. BANNEUX, L., **Quelques données économiques sur le coton au Congo belge**, 46 pp., 25 F, 1938.
23. GILLAIN, J., **"East Coast Fever". — Traitement et immunisation des bovidés**, 32 pp., 14 graph., 20 F, 1939.

24. STOFFELS, E.-H.-J., *Le quinquina*, 51 pp., 21 fig., 3 pl., 12 tabl., 18 F, 1939 (épuisé).
- 25a. FERRAND, M., *Directives pour l'établissement d'une plantation d'Hevea greffés au Congo belge*, 48 pp., 4 pl., 13 fig., 30 F, 1941.
- 25b. FERRAND, M., *Aanwijzingen voor het aanleggen van een geënte Hevea aanplanting in Belgisch-Congo*, 51 pp., 4 pl., 13 fig., 30 F, 1941.
26. BEIRNAERT, A., *La technique culturale sous l'Équateur*, xi-86 pp., 1 portrait héliogr., 4 fig., 22 F, 1941 (épuisé).
27. LIVENS, J., *L'étude du sol et sa nécessité au Congo belge*, 53 pp., 1 fig., 16 F, 1943 (épuisé).
- 27bis. BEIRNAERT, A. et VANDERWEYEN, R., *Note préliminaire concernant l'influence du dispositif de plantation sur les rendements. (Communication n° 1 sur le palmier à huile)*, 26 pp., 8 tabl., 10 F, 1940 (épuisé).
28. RINGOET, A., *Note sur la culture du cacaoyer et son avenir au Congo belge*, 82 pp., 6 fig., 36 F, 1944.
- 28bis. BEIRNAERT, A. et VANDERWEYEN, R., *Les graines sélectionnées livrées par la Station de Yangambi. (Communication n° 2 sur le palmier à huile)*, 41 pp., 15 F, 1941 (épuisé).
29. WÆLKENS, M. et LECOMTE, M., *Le choix de la variété de coton dans les Districts de l'Uele et de l'Ubanguï*, 31 pp., 7 tabl., 25 F, 1941.
30. BEIRNAERT, A. et VANDERWEYEN, R., *Influence de l'origine variétale sur les rendements. (Communication n° 3 sur le palmier à huile)*, 26 pp., 8 tabl., 20 F, 1941 (épuisé).
31. POSKIN, J.-H., *La taille du Caféier Robusta*, 59 pp., 8 fig., 25 photos, 60 F, 1942 (épuisé).
32. BROUWERS, M.-J.-A., *La greffe de l'Hevea en pépinière et au champ*, 29 pp., 8 fig., 12 photos, 30 F, 1943 (épuisé).
33. DE POERCK, R., *Note contributive à l'amélioration des agrumes au Congo belge*, 78 pp., 60 F, 1945.
34. DE MEULEMEESTER, D. et RAES, G., *Caractéristiques de certaines variétés du coton spécialement congolaises, Première partie*, 110 pp., 40 F, 1947.
35. DE MEULEMEESTER, D. et RAES, G., *Caractéristiques de certaines variétés de coton spécialement congolaises, Deuxième partie*, 37 pp., 40 F, 1947.
36. LECOMTE, M., *Étude des qualités et des méthodes de multiplication des nouvelles variétés cotonnières au Congo belge*, 56 pp., 4 fig., 40 F, 1949.
37. VANDERWEYEN, R. et MICLOTTE, H., *Valeur des graines d'Elaeis guineensis JACQ. livrées par la Station de Yangambi*, 24 pp., 15 F, 1949.
38. FOUARGE, J., SACRÉ, E. et MOTTET, A., *Appropriation des bois congolais aux besoins de la Métropole*, 17 pp., 20 F, 1950.
39. PICHEL, R.-J., *Premiers résultats en matière de sélection précoce chez l'Hévéa*, 43 pp., 10 fig., 40 F, 1951.
40. BAPTIST, A.-G., *Matériaux pour l'étude de l'économie rurale des populations de la Cuvette forestière du Congo belge*, 63 pp., 50 F, 1951.
41. ISTAS, J.-R. et HONTOY, J., *Composition chimique et valeur papetière de quelques espèces de Bambous récoltées au Congo belge*, 23 pp., 7 tabl., 25 F, 1952.
42. CAPOT, J., DE MEULEMEESTER, D., BRYNAERT, J. et RAES, G., *Recherches sur une plante à fibres : L'Abroma augusta L. f.*, 113 pp., 59 fig., 100 F, 1953.
43. ISTAS, J.-R., HEREMANS, R. et RAERELBOOM, E. L., *Caractères généraux des bois feuillus du Congo belge en relation avec leur utilisation dans l'industrie des pâtes à papier. - Étude détaillée de quelques essences*, 123 pp., 46 photos, 80 F, 1954.
44. HELLINCKX, L., *Les propriétés des Copals du Congo belge en relation avec leur origine botanique*, 44 pp., 40 F, 1955.

45. HENNAUX, L. et COMPÈRE, R., **Le ravitaillement en calcium et en phosphore et le comportement du squelette du bétail au Congo belge**, 45 pp., 11 photos, 50 F, 1955.
46. ANTOINE, R.C. et LALOYAU, L.E., **Le débit des bois à la scie à ruban. I. Introduction à l'étude du sciage des principaux bois du Congo belge**, 31 pp. 8 fig., 25 F. 1955.
47. ANTOINE, R.C. et LALOYAU, L.E., **Le débit des bois à la scie à ruban. II. Étude du sciage de *Chlorophora excelsa* (Kambala, Mulundu)**, 77 pp., 33 fig., 2 abaques, 60 F, 1955.
48. HENNAUX, L., **L'alimentation minérale du bétail au Congo belge**, 118 pp., 11 photos hors texte, 160 F, 1956.
49. PICHEL, R., **Les pourridiés de l'Hévéa dans la Cuvette congolaise**, 480 pp., 149 fig. noir et couleur, 30 graph., 1 carte hors texte, 400 F, 1956.
50. LALOYAU, L., **Le travail de la scie circulaire. Application au sciage du Diambi (*Guarea cedrata*)**, 48 pp., 8 photos, 8+12 fig., 40 F, 1956.
51. ISTAS, J.R., RAEKELBOOM, E.L. et HEREMANS, R., **Étude biométrique, chimique et papetière de quelques bois**, 58 pp., 40 F, 1956.
52. ANTOINE, R.C., **Contribution à l'étude du sciage du bois. Essai théorique de détermination de la puissance utile au sciage en fonction des variations dimensionnelles du copeau**, 32 pp. 15 fig., 30 F, 1957.

## FLORE DU CONGO BELGE ET DU RUANDA-URUNDI

### SPERMATOPHYTES

Prix par volume : édition sur papier ordinaire : 300 F, édition sur papier bible : 500 F.  
 Volume I (1948). Volume II (1951). Volume III (1952). Volume IV (1953). Volume V (1954). Volume VI (1954).

## ATLAS ANATOMIQUE DES BOIS DU CONGO BELGE

### SPERMATOPHYTES

- Volume I. LEBACQ, L., *Podocarpaceae, Cupressaceae, Ulmaceae, Moraceae, Proteaceae, Olacaceae*, 26 + 32 pp., 1 tabl., XXXII pl., 52 fig., 250 F, 1955.
- Volume II. LEBACQ, L., *Annonaceae, Myristicaceae, Monimiaceae, Lauraceae, Cappariaceae*, 36 pp., 1 tabl., XXXVI pl., 250 F, 1955.
- Volume III. LEBACQ, L., *Rosaceae, Mimosaceae, Caesalpiniaceae* 116 pp., 1 tabl., CXVI pl., 500 F, 1957.
- Volume IV. LEBACQ, L., *Papilionaceae*, 19 pp. 1 tabl., XIX pl., 250 F, 1957.

## CARTE DES SOLS ET DE LA VÉGÉTATION DU CONGO BELGE ET DU RUANDA-URUNDI

- Livraison 1. **Kaniama** (Haut-Lomami), 53 pp., 8 photos, 3 cartes, 150 F, 1955.
- Livraison 2. **Mvuazi** (Bas-Congo), 40 pp., 2 cartes, 3 fig., 100 F, 1954.
- Livraison 3. **Vallée de la Ruzizi**, 48 pp., 2 cartes, 100 F, 1955.
- Livraison 4. **Nioka** (Ituri), 58 pp., 5 cartes, 3 fig., 7 pl., 450 F, 1954 (épuisé).
- Livraison 5. **Mosso** (Urundi), 40 pp., 5 cartes, 200 F, 1955.
- Livraison 6. **Yangambi**. Planchette 1 : Weko, 23 pp., 2 cartes, 100 F, 1954  
 Planchette 2 : Yangambi, 36 pp., 2 cartes, 100 F, 1956.
- Livraison 7. **Bugesera-Mayaga** (Ruanda), 58 pp., 1 fig., 3 cartes, 150 F, 1956.
- Livraison 8. **Vallée de la Lufira**, 71 pp., 2 cartes, 1 fig., 100 F, 1956.
- Livraison 9. **Région d'Élisabethville** (en préparation).

COLLECTION IN-4°

- LOUIS J. et FOUARGE, J., **Essences forestières et bois du Congo.**  
 Fascicule 1. Introduction, 72 pp., 1 tabl. + 15 pl. hors texte, 180 F, 1953.  
 Fascicule 2. *Afromosia elata*, 22 pp., 6 pl., 3 fig., 55 F, 1943.  
 Fascicule 3. *Guarea Thompsoni*, 38 pp., 4 pl., 8 fig., 85 F, 1944.  
 Fascicule 4. *Entandrophragma palustre*, 75 pp., 4 pl., 5 fig., 180 F, 1947.  
 Fascicule 5. *Guarea Laurentii*, XIV + 14 pp., 1 portrait héliogr., 3 pl., 60 F, 1948.  
 Fascicule 6. *Macrobium Dewevrei*, 44 pp., 5 pl., 4 fig., 90 F, 1949.
- BERNARD, E., **Le climat écologique de la Cuvette centrale congolaise**, 240 pp., 36 fig., 2 cartes, 70 tabl., 300 F, 1945.
- BULTOT, F., **Régimes normaux et cartes des précipitations dans l'Est du Congo belge (Long. : 26° à 31° Est, Lat. : 4° Nord à 5° Sud) pour la période 1930 à 1946** (Communication n° 1 du Bureau climatologique), 56 pp., 1 fig., 1 pl., 13 cartes, 300 F, 1950.
- BULTOT, F., **Carte des régions climatiques du Congo belge établie d'après les critères de Köppen** (Communication n° 2 du Bureau climatologique), 16 pp., 1 carte, 80 F, 1950.
- BULTOT, F., **Sur le caractère organisé de la pluie au Congo belge** (Communication n° 6 du Bureau climatologique), 16 pp., 8 cartes, 80 F, 1952.
- BULTOT, F., **Saisons et périodes sèches et pluvieuses au Congo belge et au Ruanda-Urundi** (Communication n° 9 du Bureau climatologique), 70 pp., 1 fig., 7 cartes, 16 tabl., 250 F, 1954.
- BULTOT, F., **Étude statistique des pluies intenses en un point et sur une aire au Congo belge et au Ruanda-Urundi** (Communication n° 11 du Bureau climatologique), 90 pp., 100 F, 1956.
- BULTOT, F., **Risques d'années sèches et pluvieuses au Congo belge et au Ruanda-Urundi** (Communication n° 13 du Bureau climatologique), 22 pp., 5 cartes, 80 F, 1957.
- BULTOT, F., **Distribution conjointe de la température et de l'humidité de l'air au Congo belge** (Communication n° 14 du Bureau climatologique) 32 pp., 60 F, 1957.
- \*\*\* **Chutes de pluie au Congo belge et au Ruanda-Urundi pendant la décade 1940-1949** (Communication n° 3 du Bureau climatologique), 248 pp., 160 F, 1951.
- \*\*\* **Bulletin climatologique annuel du Congo belge et du Ruanda-Urundi. Année 1950** (Communication n° 4 du Bureau climatologique), 103 pp., 100 F, 1952.
- \*\*\* **Bulletin climatologique annuel du Congo belge et du Ruanda-Urundi, Année 1951** (Communication n° 5 du Bureau climatologique), 99 pp., 100 F, 1952.
- \*\*\* **Bulletin climatologique annuel du Congo belge et du Ruanda-Urundi, Année 1952** (Communication n° 7 du Bureau climatologique), 145 pp., 120 F, 1953.
- \*\*\* **Bulletin climatologique annuel du Congo belge et du Ruanda-Urundi, Année 1953** (Communication n° 8 du Bureau climatologique), 153 pp., 120 F, 1954.
- \*\*\* **Bulletin climatologique annuel du Congo belge et du Ruanda-Urundi. Année 1954** (Communication n° 10 du Bureau climatologique), 161 pp., 120 F, 1955.
- \*\*\* **Bulletin climatologique annuel du Congo belge et du Ruanda-Urundi, Année 1955** (Communication n° 12 du Bureau climatologique), 202 pp., 1 carte hors texte, 80 F, 1956.
- \*\*\* **Bulletin climatologique annuel du Congo belge et du Ruanda-Urundi, Année 1956** (Communication n° 15 du Bureau climatologique), 182 pp., 125 F, 1957.

- DE HEINZELIN, J., **Sols, paléosols et désertifications anciennes dans le secteur nord-oriental du bassin du Congo**, 168 pp., 52 fig., 1 tabl. + 8 pl. hors texte, 250 F, 1952.
- FOURGE, J., GÉRARD, G. et SACRÉ, E., **Bois du Congo**, 424 pp., 1 tabl. + 41 pl. hors texte, 400 F, 1953 (épuisé).

#### HORS SÉRIE

- \*\*\* **Renseignements économiques sur les plantations du Secteur central de Yangambi**, 24 pp., 10 F, 1935.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1936**, 143 pp., 48 fig., 30 F, 1937.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1937**, 181 pp., 26 fig., 1 carte hors texte, 40 F, 1938.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1938 (1<sup>re</sup> partie)**, 272 pp., 35 fig., 1 carte hors texte, 60 F, 1939.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1938 (2<sup>e</sup> partie)**, 216 pp., 50 F, 1939.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1939**, 301 pp., 2 fig., 1 carte hors texte, 50 F, 1941.
- \*\*\* **Rapport pour les Exercices 1940 et 1941**, 152 pp., 50 F, 1943 (imprimé en Afrique).
- \*\*\* **Rapport pour les Exercices 1942 et 1943**, 154 pp., 50 F, 1944 (imprimé en Afrique).
- \*\*\* **Rapport pour les Exercices 1944 et 1945**, 191 pp., 80 F, 1947.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1946**, 184 pp., 70 F, 1948.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1947**, 217 pp., 80 F, 1948.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1948**, 290 pp., 150 F, 1949.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1949**, 306 pp., 150 F, 1950.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1950**, 392 pp., 160 F, 1951.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1951**, 436 pp., 160 F, 1952.
- \*\*\* **Jaarverslag voor het dienstjaar 1951**, 438 pp., 160 F, 1953.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1952**, 395 pp., 160 F, 1953.
- \*\*\* **Jaarverslag voor het dienstjaar 1952**, 398 pp., 160 F, 1953.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1953**, 507 pp., 160 F, 1954.
- \*\*\* **Jaarverslag voor het dienstjaar 1953**, 509 pp., 160 F, 1954.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1954**, 492 pp., 160 F, 1955.
- \*\*\* **Jaarverslag voor het dienstjaar 1954**, 492 pp., 160 F, 1955.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1955**, 570 pp., 160 F, 1956.
- \*\*\* **Jaarverslag voor het dienstjaar 1955**, 588 pp., 160 F, 1956.
- \*\*\* **Rapport annuel pour l'Exercice 1956**, (sous presse).
- \*\*\* **Jaarverslag voor het dienstjaar 1956**, (sous presse).
- GOEDERT, P., **Le régime pluvial au Congo belge**, 45 pp., 4 tabl., 15 pl. et 2 graph. hors texte, 40 F, 1938 (épuisé).
- BELOT, R.-M., **La sérériculture au Congo belge**, 148 pp., 65 fig., 15 F, 1938 (épuisé).
- BAEYENS, J., **Les sols de l'Afrique centrale et spécialement du Congo belge**, Tome I. Le Bas-Congo, 375 pp., 9 cartes, 31 fig., 40 ph., 50 tabl., 150 F, 1938 (épuisé).
- LEBRUN, J., **Recherches morphologiques et systématiques sur les caféiers du Congo**, 183 pp., 19 pl., 80 fr., 1941 (épuisé).

- TONDEUR, R., **Recherches chimiques sur les alcaloïdes de l' « Erythrophleum »,** 52 pp., 50 F, 1950.
- \*\*\* **Communications de l'I.N.É.A.C., Recueil n° 1,** 66 pp., 7 fig., 60 F, 1943 (imprimé en Afrique) (épuisé).
- \*\*\* **Communications de l'I.N.É.A.C., Recueil n° 2,** 144 pages, 60 F, 1945 (imprimé en Afrique).
- \*\*\* **Comptes rendus de la Semaine agricole de Yangambi (du 26 février au 5 mars 1947),** 2 vol. illustr., 952 pp., 500 F, 1947.
- \*\*\* **L'Institut National pour l'Étude Agronomique du Congo Belge (INÉAC). Son but. Son programme. Ses réalisations,** 4<sup>e</sup> éd., octobre 1957, 156 pp., 54 fig. et 10 cartes hors texte, 1957.

### FICHES BIBLIOGRAPHIQUES

Les fiches bibliographiques éditées par l'Institut peuvent être distribuées au public moyennant un abonnement annuel de 500 F (pour l'étranger, port en plus). Cette documentation bibliographique est éditée bimensuellement, en fascicules d'importance variable, et comprend environ 3000 fiches chaque année. Elle résulte du recensement régulier des acquisitions des bibliothèques de l'Institut qui reçoivent la plupart des publications périodiques et des ouvrages de fond intéressant la recherche agronomique en général et plus spécialement la mise en valeur agricole des pays tropicaux et subtropicaux.

Outre les indications bibliographiques habituelles, ces fiches comportent un indice de classification (établi d'après un système empirique calqué sur l'organisation de l'Institut) et un compte rendu sommaire.

Un fascicule-spécimen peut être obtenu sur demande.

### BULLETIN D'INFORMATION DE L'INÉAC

1. Publié sous la même couverture que le **Bulletin agricole du Congo belge** (s'adresser à la Rédaction de ce dernier Bulletin, au Ministère des Colonies, 7, place Royale, Bruxelles).

2. Publié séparément (s'adresser à l'INÉAC).

Vol. I, 1952 (trimestriel) : 75 F.

Vol. II, 1953 (bimestriel) : 100 F.

Vol. III, 1954 (bimestriel) : 100 F.

Vol. IV, 1955 (bimestriel) : 100 F.

Vol. V, 1956 (bimestriel) : 100 F.

Vol. VI, 1957 (bimestriel) : 100 F.







**MM. SIMONART, P.**, Professeur à l'Université Catholique de Louvain;  
**STANER, P.**, Inspecteur royal des Colonies;  
**STOFFELS, E.**, Professeur à l'Institut Agronomique de Gembloux;  
**TULIPPE, O.**, Professeur à l'Université de Liège;  
**VAN DE PUTTE, M.**, Membre du Conseil Colonial;  
**VAN STRAELEN, V.**, Président de l'Institut des Parcs Nationaux du Congo Belge;  
**WILLEMS, J.**, Administrateur-Directeur du Fonds National de la Recherche Scientifique.

#### B. COMITÉ DE DIRECTION

*Président :*

**M. JURION, F.**, Directeur général de l'I.N.É.A.C.

*Représentant du Ministre des Colonies :*

**M. STANER, P.**, Inspecteur royal des Colonies.

*Secrétaire :*

**M. LEBRUN, J.**, Secrétaire général de l'I.N.É.A.C.

*Membres :*

**MM. GILLIEAUX, P.**, Membre du Comité Cotonnier Congolais;  
**HENRARD, J.**, Directeur de l'Agriculture, Forêts, Élevage et Colonisation, au Ministère des Colonies;  
**HOMÈS, M.**, Professeur à l'Université Libre de Bruxelles;  
**OPSOMER, J.**, Professeur à l'Institut Agronomique de Louvain;  
**STOFFELS, E.**, Professeur à l'Institut Agronomique de Gembloux;  
**VAN STRAELEN, V.**, Président de l'Institut des Parcs Nationaux du Congo Belge.

#### C. DIRECTEUR GÉNÉRAL

**M. JURION, F.**



Des Presses des Éts VROMANT, S. A.,  
3, rue de la Chapelle, Bruxelles.