

EFFET DE L'INOCULATION MIXTE AVEC DES SOUCHES DE RHIZOBIUM MELILOTI SUR LE RENDEMENT DE LA LUZERNE, CULTIVAR SARANAC

L. M. BORDELEAU¹ et H. ANTOUN²

¹Station de Recherches, Agriculture Canada, 2560 chemin Gomin, Sainte-Foy, Québec G1V 2J3, et ²Département de Phytologie, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Sainte-Foy, Qué. G1K 7P4. Contribution no 101, reçue le 23 mars, acceptée le 4 mai.

BORDELEAU, L. M. ET ANTOUN, H. 1977. Effet de l'inoculation mixte avec des souches de *Rhizobium meliloti* sur le rendement de la luzerne, cultivar Saranac. Can. J. Plant Sci. 57: 1071-1075.

L'effet du nombre de souches de *Rhizobium meliloti* dans l'inoculant de la luzerne, cv. Saranac, a été étudié en relation avec son rendement. Des combinaisons de une à six souches ont été utilisées comme inoculants. Aucune des souches n'a montré d'activité antagoniste vis-à-vis des autres en culture pure. Les souches utilisées en paires ont donné les rendements les plus élevés, indiquant un synergisme. L'utilisation de plus de deux souches dans l'inoculant a donné des rendements plus faibles que les souches une à une.

Effect of number of strains of *Rhizobium meliloti* in an inoculant for alfalfa, cv. Saranac, was studied in relationship to its yield. Combinations of one to six strains were used as inoculants. None of the strains have shown antagonistic activity toward each other in pure culture. Combinations of two strains resulted in the highest yields, indicating synergistic effects. The use of more than two strains in an inoculant resulted in lower yields as compared to a single strain.

L'inoculation des légumineuses avec des souches efficaces de *Rhizobium* est devenue une pratique agricole couramment utilisée. Plusieurs auteurs ont montré que les nodules de la plupart des légumineuses peuvent contenir plus d'une souche de *Rhizobium* (Johnston et Beringer 1976, 1975; Pinto et al. 1974; Skrdleta 1970). Martinez (1971) a aussi montré que sous certaines conditions expérimentales, la luzerne fixe relativement plus d'azote, lorsqu'elle est inoculée avec plus d'une souche de *Rhizobium meliloti*.

Dans le cadre d'un programme d'amélioration des inoculants de la luzerne, on a d'abord déterminé l'efficacité de diverses souches de *R. meliloti* (Bordeleau et al. 1977). Le présent travail porte sur l'effet du nombre de souches de *R. meliloti* présent dans l'inoculant de la luzerne en relation avec le rendement, en vue de déterminer les meilleures combinaisons à utiliser.

Can. J. Plant Sci. 57: 1071-1075 (Oct. 1977)

MATERIEL ET METHODES

Les six souches (A2, 3Doa8, A3, A4, S14 et V3) utilisées dans ce travail ont subi un test d'antagonisme tel que décrit par Schwinghamer (1971). Le milieu de culture utilisé contenait par litre: K₂HPO₄, 0.3 mM; KH₂PO₄, 0.3 mM; mannitol, 10 g; MgSO₄·7H₂O, 0.2 g; NaCl, 0.1 g; CaCl₂·2H₂O, 0.05 g; extrait de levure, 0.4 g; agar, 17 g. Le pH de ce milieu était tamponné à 6.85 ± 0.05. Chaque souche a servi alternativement, comme souche indicatrice et comme donatrice.

La méthode de culture de la luzerne a été celle décrite précédemment (Bordeleau et al. 1977), mais modifiée comme suit. Les graines du cv. Saranac, stérilisées en surface, ont été mises à germer dans des plats de Pétri contenant de l'agar à 1.5%. Trente graines germées ont été semées par pot Riviera contenant 9 litres de mélange synthétique stérile, dont le niveau du liquide a été ajusté par l'addition de 2.5 litres de solution nutritive. Juste avant son application, un inoculant contenant un nombre de cellules supérieur à 10⁸ par ml, était préparé d'après le protocole décrit par Martinez (1971). Une

semaine après le semis, une première inoculation était faite sur la surface de chaque pot, en distribuant de façon homogène 3 ml des souches à tester individuellement ou en mélange en parts égales, suspendu dans 100 ml de solution nutritive sans azote. Chaque pot a reçu le même nombre total de cellules. Lorsque les plantes formaient leur troisième feuille, le niveau de la solution nutritive dans les pots était abaissé à la normale (3 litres) et les plantes étaient sélectionnées pour conserver dans chaque pot 15 plantes d'apparence uniforme. Une deuxième inoculation était faite 2 semaines après le semis. Les conditions de croissance, la cueillette des données ainsi que le traitement statistique des résultats ont été tel que décrit ailleurs (Bordeleau et al. 1977).

RESULTATS ET DISCUSSION

Aucune des souches utilisées n'a montré d'activité antagoniste vis-à-vis des autres, même après exposition à l'ultraviolet pour favoriser l'induction. Ceci élimine, pour cet essai, l'interaction par production de bactériocine, comme rapporté chez certains *Rhizobium* (Schwinghamer 1971, 1975; Schwinghamer et Belkengren 1968; Roslycky 1967).

L'efficacité des traitements individuels tend à diminuer des valeurs rapportées précédemment (Bordeleau et al. 1977); ceci

Tableau 1. Moyenne des rendements en poids sec et analyse de variance des rendements obtenus avec les différents mélanges des souches de *R. meliloti*

	Coupe	
	1	2
Rendements (g/pot)	9.17	12.07
Ecart type de la moyenne	3.75	1.61
Valeurs de F	9.13**	1.75**

**Valeur significative à $P = 0.01$.

peut être attribué à la hausse de la valeur de la moyenne générale, résultant de l'utilisation des souches d'un seul groupe (tableaux 1 et 2).

Le classement des divers traitements a été basé sur la moyenne des rendements par coupe. Un traitement a été classé inefficace (NE) lorsque le rendement obtenu était plus petit que celui de la moyenne de la coupe moins la valeur de l'écart type de la moyenne; un traitement était classé efficace (E) lorsque le rendement obtenu était compris entre celui de la moyenne de la coupe plus ou moins la valeur d'un écart type de la moyenne; les traitements donnant des rendements supérieurs à celui de la moyenne plus la valeur d'un écart type de la

Tableau 2. Rendement moyen et total en grammes obtenu avec la luzerne pour les différents mélanges des six souches de *R. meliloti*

Traitements	1ère coupe		2ème coupe		Somme totale des rendements obtenus avec deux coupes	
1†	9.31	(E)‡	12.95	(E)	66.78	(E)§
2	11.32	(E)	11.64	(E)	68.88	(E)
3	7.56	(E)	12.83	(E)	61.17	(E)
4	10.25	(E)	13.11	(E)	70.08	(E)
5	14.75	(TE)	15.10	(TE)	89.55	(TE)
6	12.66	(E)	12.99	(E)	76.95	(E)
1+2	12.39	(E)	13.31	(E)	77.10	(E)
1+3	10.48	(E)	9.79	(NE)	60.81	(E)
1+4	20.07	(TE)	13.92	(TE)	101.97	(TE)
1+5	6.03	(E)	12.49	(E)	55.56	(E)
1+6	14.83	(TE)	13.62	(E)	85.35	(TE)
2+3	16.74	(TE)	13.59	(E)	90.99	(TE)
2+4	16.38	(TE)	13.52	(E)	89.70	(TE)
2+5	13.82	(TE)	13.08	(E)	80.70	(TE)
2+6	9.60	(E)	12.34	(E)	65.82	(E)
3+4	12.79	(E)	9.91	(NE)	68.10	(E)

Tableau 2. (suite)

Traitements	1ère coupe		2ème coupe		Somme totale des rendements obtenus avec deux coupes	
3+5	19.12	(TE)	16.06	(TE)	105.54	(TE)
3+6	13.65	(TE)	15.38	(TE)	87.09	(TE)
4+5	8.99	(E)	9.21	(NE)	54.60	(E)
4+6	15.07	(TE)	14.39	(TE)	88.38	(TE)
5+6	13.37	(TE)	13.84	(TE)	81.63	(TE)
1+2+3	11.96	(E)	14.79	(TE)	80.25	(TE)
1+2+4	6.14	(E)	10.14	(NE)	48.84	(NE)
1+2+5	9.92	(E)	11.01	(E)	62.79	(E)
1+2+6	7.18	(E)	8.79	(NE)	47.91	(NE)
1+3+4	11.67	(E)	12.14	(E)	71.43	(E)
1+3+5	9.14	(E)	10.34	(NE)	58.44	(E)
1+3+6	12.17	(E)	12.90	(E)	75.21	(E)
1+4+5	9.91	(E)	10.64	(E)	61.65	(E)
1+4+6	7.29	(E)	11.09	(E)	55.14	(E)
1+5+6	6.28	(E)	11.42	(E)	53.10	(E)
2+3+4	5.31	(NE)	11.18	(E)	49.47	(E)
2+3+5	6.39	(E)	9.85	(NE)	48.72	(NE)
2+3+6	5.44	(E)	10.83	(E)	48.81	(NE)
2+4+5	7.97	(E)	10.68	(E)	55.95	(E)
2+4+6	11.75	(E)	12.72	(E)	73.41	(E)
2+5+6	7.92	(E)	12.90	(E)	62.46	(E)
3+4+5	7.30	(E)	12.99	(E)	60.87	(E)
3+4+6	10.49	(E)	11.93	(E)	67.26	(E)
3+5+6	9.86	(E)	11.94	(E)	65.40	(E)
4+5+6	6.06	(E)	11.09	(E)	51.45	(E)
1+2+3+4	8.64	(E)	12.21	(E)	62.55	(E)
1+2+3+5	9.84	(E)	11.66	(E)	64.50	(E)
1+2+3+6	5.78	(E)	11.37	(E)	51.45	(E)
1+2+4+5	5.43	(E)	12.15	(E)	52.74	(E)
1+2+4+6	4.24	(NE)	12.65	(E)	50.67	(E)
1+2+5+6	8.03	(E)	13.48	(E)	64.53	(E)
1+3+4+5	6.34	(E)	10.14	(NE)	49.44	(E)
1+3+4+6	7.33	(E)	12.22	(E)	58.65	(E)
1+3+5+6	5.78	(E)	11.54	(E)	51.96	(E)
1+4+5+6	5.89	(E)	12.21	(E)	54.30	(E)
2+3+4+5	5.34	(NE)	10.65	(E)	47.97	(NE)
2+3+4+6	8.92	(E)	13.90	(TE)	68.46	(E)
2+3+5+6	7.07	(E)	13.62	(E)	62.07	(E)
2+4+5+6	5.25	(NE)	11.06	(E)	48.93	(NE)
3+4+5+6	6.63	(E)	11.02	(E)	52.95	(E)
1+2+3+4+5	6.49	(E)	12.47	(E)	56.88	(E)
1+2+3+4+6	6.15	(E)	11.86	(E)	54.03	(E)
1+2+3+5+6	4.33	(NE)	9.66	(NE)	41.97	(NE)
1+2+4+5+6	4.05	(NE)	9.84	(NE)	41.67	(NE)
1+3+4+5+6	6.79	(E)	13.18	(E)	59.91	(E)
2+3+4+5+6	5.58	(E)	12.50	(E)	54.24	(E)
1+2+3+4+5+6	4.31	(NE)	8.64	(NE)	38.85	(NE)
Témoin azoté	31.46		18.63		150.27	

†1 = A2; 2 = 3Doa8; 3 = A3; 4 = A4; 5 = S14; 6 = V3.

‡Les désignations entre parenthèses indiquent: NE: inefficace; E: efficace; TE: très efficace. Pour explication voir le texte.

§Moyenne = 63.71; écart type de la moyenne = 14.70.

moyenne ont été classés très efficaces (TE). A la première et à la deuxième coupes, les mélanges de souches ont un grand effet sur le rendement obtenu. L'efficacité d'un mélange peut augmenter (i.e. A2 + 3Doa8 + A4 + V3) ou diminuer (i.e. A3 + A4) d'une coupe à l'autre (tableau 2). De manière générale on remarque que les rendements ont tendance à diminuer avec l'augmentation du nombre de souches utilisées dans l'inoculant (tableau 3). Ceci indique que lorsque le nombre de cellules par souche diminue, la compétition entre les souches pour l'occupation des sites d'infection augmente. Le seul traitement impliquant les six souches a été NE et a donné des rendements 46% inférieurs à ceux des traitements individuels, indiquant ainsi que pour l'infection et l'efficacité, l'effet des souches n'est pas additif. Martinez (1971) a montré que les souches de *R. meliloti* étaient moins infectives dans un inoculant

mixte. Cette perte d'efficacité peut aussi provenir d'une grande compétition nutritive dans la rhizosphère, ou de la perturbation du processus de la fixation symbiotique d'azote dans le nodule dû à la présence de plus d'une souche de *Rhizobium*.

Les souches utilisées en paires ont donné des rendements 10% plus élevés que ceux des traitements individuels, indiquant un synergisme marqué. Alors que 16.7% des traitements individuels sont TE, 33 et 60% le sont avec les traitements en paires à la deuxième coupe et pour la somme de deux coupes (tableau 3). Ce synergisme peut provenir d'une stimulation nutritive dans la rhizosphère qui accélérerait l'infection et la formation des nodules ou d'un phénomène physiologique inconnu impliquant deux souches et prenant naissance dans les nodules.

Tout comme pour l'évaluation des souches de *R. meliloti* (Bordeleau et al.

Tableau 3. Effet du nombre de souches de *R. meliloti* dans l'inoculant de la luzerne sur l'efficacité

Nombre de souches dans l'inoculant	Rendement moyen total	Nombre de traitements	Distribution de l'efficacité des traitements			
			Efficacité	1ère coupe	2ème coupe	Somme totale des 2 coupes
1	72.24	6	NE	0	0	0
			E	5	5	5
			TE	1	1	1
2	79.56	15	NE	0	3	0
			E	6	7	6
			TE	9	5	9
3	59.93	20	NE	1	4	4
			E	19	15	15
			TE	0	1	1
4	56.08	15	NE	3	1	2
			E	12	13	13
			TE	0	1	0
5	51.45	6	NE	2	2	2
			E	4	4	4
			TE	0	0	0
6	38.85	1	NE	1	1	1
			E	-	-	-
			TE	-	-	-
Total	63.71	63	NE	7	11	9
			E	46	44	43
			TE	10	8	11

Tableau 4. Coefficients de corrélation (r) et de détermination des rendements moyens obtenus avec les différents traitements pour chaque coupe et la somme des coupes

	1	2	3	1+2	2+3	1+2+3
1		0.61 (37.52)†	0.22NS (0.05)	0.97 (93.28)	0.43 (18.50)	0.87 (75.99)
2			0.75 (56.05)	0.80 (63.43)	0.93 (85.95)	0.89 (79.95)
3				0.41 (16.80)	0.94 (88.85)	0.65 (42.11)

†Les valeurs entre parenthèses représentent le coefficient de détermination ($r^2 \times 100$).
NS: Non significatif.

1977), une deuxième coupe est nécessaire pour évaluer l'efficacité d'un mélange avec plus de précision. Cependant, il semble que l'effet d'un mélange apparaît surtout durant les premiers stades de croissance de la plante car 93% des rendements obtenus avec les deux premières coupes sont en relation avec ceux de la première coupe, et 63% seulement le sont avec ceux de la deuxième coupe (tableau 4).

A la deuxième coupe huit traitements impliquant les six souches sont classés TE. L'efficacité de ces traitements n'est pas associée à la présence d'une souche particulière parmi les six.

Avant d'utiliser de tels mélanges dans un inoculant commercial, il est souhaitable d'étudier leur comportement au champ ainsi que leur effet sur les différents cultivars de luzerne.

Les auteurs remercient les Drs A. Comeau et R. Michaud pour leurs discussions et critiques du manuscrit. Hani Antoun est boursier du Ministère de l'Éducation du Québec.

BORDELEAU, L. M., ANTOUN, H. et LACHANCE, R. A. 1977. Effets des souches de *Rhizobium meliloti* et des coupes successives de la luzerne (*Medicago sativa*) sur la fixation symbiotique d'azote. *Can. J. Plant Sci.* **57**: 433-439.

JOHNSTON, A. W. B. et BERINGER, J. E. 1975. Identification of the *Rhizobium* strains in pea root nodules using genetic markers. *J. Gen. Microbiol.* **87**: 343-350.

JOHNSTON, A. W. B. et BERINGER, J. E. 1976. Mixed inoculations with effective and ineffective strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Appl. Bacteriol.* **40**: 375-380.

MARTINEZ, C. I. 1971. Statistical evaluation of factors affecting symbiotic nitrogen fixation by alfalfa (*Medicago sativa*) and soybean (*Glycine max.* Merr.). Ph.D. Thesis, University of Wisconsin, Madison, Wis.

PINTO, C. M., YAO, P. Y. et VINCENT, J. M. 1974. Nodulating competitiveness amongst strains of *Rhizobium meliloti* and *R. Trifolii*. *Aust. J. Agric. Res.* **25**: 317-329.

ROSLYCKY, E. B. 1967. Bacteriocin production in Rhizobia bacteria. *Can. J. Microbiol.* **13**: 431-432.

SCHWINGHAMER, E. A. 1971. Antagonism between strains of *Rhizobium trifolii* in culture. *Soil Biol. Biochem.* **3**: 355-363.

SCHWINGHAMER, E. A. 1975. Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* **91**: 403-413.

SCHWINGHAMER, E. A. et R. P. BELKENGREN. 1968. Inhibition of Rhizobia by a strain of *Rhizobium trifolii*: some properties of the antibiotic and of the strain. *Arch. Mikrobiol.* **64**: 130-145.

SKRDLETA, V. 1970. Competition for nodule sites between two inoculum strains of *Rhizobium japonicum* as affected by delayed inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **2**: 167-171.