

# EFFETS DES SOUCHES DE RHIZOBIUM MELILOTI ET DES COUPES SUCCESSIVES DE LA LUZERNE (*MEDICAGO SATIVA*) SUR LA FIXATION SYMBIOTIQUE D'AZOTE

L. M. BORDELEAU<sup>1</sup>, H. ANTOUN<sup>2</sup> et R. A. LACHANCE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Station de Recherches, Agriculture Canada, 2560 chemin Gomin, Sainte-Foy, Québec, G1V 2J3, et <sup>2</sup>Département de phytologie, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, G1K 7P4. Contribution no 93, reçue le 19 juillet 1976, acceptée le 24 nov.

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.

La fixation symbiotique d'azote chez 49 souches de *Rhizobium meliloti* a été étudiée sous un environnement contrôlé avec la variété de luzerne Saranac. Il a été mis en évidence que le rendement en poids sec de la plante peut être utilisé comme mesure indirecte de la fixation d'azote, et comme critère de sélection des souches efficaces de *R. meliloti*. L'étude statistique des rendements de trois coupes a établi que la deuxième coupe donne le plus d'information pour évaluer correctement l'efficacité symbiotique des souches. Six souches très efficaces ont été sélectionnées.

Symbiotic nitrogen fixation with 49 isolates of *Rhizobium meliloti* was studied under controlled environment with alfalfa cv. Saranac. It was shown that plant yield in dry weight can be used as an indirect measurement of nitrogen fixation, and as a criterion for selecting efficient strains of *R. meliloti*. Statistical study on yields of three cuttings has established that the second cutting gives the most necessary information to correctly evaluate the symbiotic efficiency of the isolates. Six very efficient strains were selected.

La présence de souches efficaces de *Rhizobium* ayant une capacité élevée de fixer symbiotiquement l'azote avec les légumineuses est un des facteurs les plus importants qui influencent directement l'établissement de ces cultures (Burton 1972; Vincent 1974). En effet, certaines légumineuses deviennent alors rapidement indépendantes de l'azote du sol et produisent des récoltes d'une meilleure qualité.

L'amélioration des inoculants de légumineuses doit être basée sur la sélection intelligente de souches de *Rhizobium* ayant les caractéristiques majeures suivantes: (i) l'efficacité symbiotique dans toutes les conditions possibles d'habitat avec la plante hôte qui sera utilisée (Brockwell et al. 1968), (ii) l'habileté à former rapidement des nodules (Vincent 1974), (iii) l'habileté à concurrencer avec les autres *Rhizobium* du

sol (Ham et al. 1971), (iv) l'habileté à persister dans leur efficacité dans les sols concernés (Bergersen 1970; Bergersen et al. 1971). En plus, l'habileté des souches à bien se développer dans des cultures commerciales et à survivre sous les conditions d'entreposage et au cours de l'inoculation des semences est un facteur d'importance pour la production et l'usage comme culture commerciale (Date 1976). Les souches indigènes constituent la source primaire de tous les inoculants, et elles offrent de meilleures chances de succès lorsqu'elles sont réintroduites en grand nombre à leur milieu d'origine (Date 1976).

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de quelques souches indigènes de *R. meliloti*, ainsi que l'effet des coupes successives sur le rendement de la luzerne, dans le cadre d'un programme d'amélioration des inoculants pour cette légumineuse.

## MATERIEL ET METHODES

Les 49 souches de *R. meliloti* testées proviennent de notre collection; la plupart ont été isolées à partir de la rhizosphère de la luzerne. Des échantillons de sol de la rhizosphère ont été recueillis dans différentes régions du Québec puis ils ont été congelés à  $-20\text{ C}$  durant au moins 1 semaine avant d'être dégelés à la température de la chambre pour être utilisés comme source d'inoculant sur différentes variétés de luzerne. Le traitement au gel avait pour but de sélectionner des souches résistantes aux extrêmes de température. L'isolation des souches a été effectuée à partir des nodules formés sur les plantes inoculées d'après les techniques décrites par Vincent (1970). Le milieu de culture pour le maintien des souches a été le mannitol gélosé enrichi d'extrait de levure (Vincent 1970).

Pour la culture de la luzerne, les contenants utilisés étaient des pots "Riviera" de fabrication française (Manufacture provençale de matières plastiques de Marseille) conçus pour faciliter l'oxygénation des racines et munis d'un réservoir interne pour la solution nutritive qui est amenée à la plante via une mèche et une grille. Ces pots permettent un bon contrôle de la stérilité du milieu (Gasser et al. 1972). Chaque pot a reçu  $2.33\text{ dm}^3$  (litres) d'un mélange synthétique volumétriquement composé de 25% de silice no 10 (2 mm), 25% de silice no 16 (1.2 mm) et 50% de vermiculite. Les pots ont été stérilisés par un lavage avec une solution désinfectante contenant 0.5% (v/v) de Oakite Sanitizer No. 1 (Oakite Products of Canada Limited, Bramalea, Ontario) dans l'eau distillée. Le mélange synthétique a été autoclavé 60 min à 100 kPa de pression avant l'usage. La solution nutritive utilisée était celle de Hoagland et Arnon (1938), modifiée en tamponnant son pH à  $6.75 \pm 0.05$  avec  $174.18\text{ mg/litre}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et  $136.09\text{ mg/litre}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , et en utilisant  $110.99\text{ mg/litre}$  de  $\text{CaCl}_2$  comme source de calcium. Pour les témoins azotés la même solution était modifiée par l'addition de  $400.2\text{ mg/litre}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

La croissance des plantes s'est effectuée en aire de propagation sous 16 h de lumière à une température de  $18\text{--}20\text{ C}$  et une intensité lumineuse de  $1.6\text{--}2.2\text{ klx}$  et 8 h d'obscurité à une température de  $11\text{--}12\text{ C}$ ; l'humidité relative était maintenue constante à 65%.

Des graines de grosseur uniforme de la variété Saranac ont été stérilisées en surface et mises à

germer sur plats de Pétri contenant les souches à tester d'après le protocole décrit par Vincent (1970). La germination a duré 36 h à l'obscurité et à la température de la chambre. Douze graines germées ont été plantées dans chaque pot, dont le niveau du liquide fut élevé par l'addition d'un litre supplémentaire de solution nutritive. Chaque pot fut ensuite recouvert d'un polyéthylène transparent retenu par une bande élastique pour maintenir un haut niveau d'humidité et éviter les contaminations croisées durant la première phase de croissance; en effet, toutes les plantes des pots témoins ne contenant pas de l'azote minéral et non-inoculés ont péri avant la première coupe. Le troisième jour après le semis, une deuxième inoculation était faite sur la surface de chaque pot, en distribuant de façon homogène  $120\text{ ml}$  de solution nutritive sans azote contenant les souches à tester en nombre de cellules supérieur à  $10^6$  par ml. Lorsque les plantes formaient leur troisième feuille, les pots étaient découverts, le niveau de solution nutritive était abaissé à sa normale ( $700\text{ ml}$ ) et les plantes étaient sélectionnées pour en conserver huit d'apparence uniforme par pot. La solution nutritive était remplacée toutes les 2 semaines et, lorsqu'il s'avérait nécessaire, le niveau de la solution dans chaque pot était rétabli avec de l'eau distillée. Le dispositif expérimental dans l'aire de propagation a été celui de blocs répartis au hasard avec trois répétitions pour chaque traitement. Les coupes ont été faites au début de l'anthèse et la hauteur de coupe a été de  $4\text{ cm}$  au-dessus du niveau du milieu synthétique. La première coupe a été faite 6 semaines après le semis, la deuxième coupe 9 semaines, et la troisième coupe 12 semaines. Les plantes récoltées ont été séchées à  $80\text{ C}$  durant 24 h et leur poids a été noté. L'azote a été déterminé, après une digestion micro-Kjeldahl (Ward et Johnston 1962), colorimétriquement sur un appareil automatique selon la méthode décrite par Varley (1968). Toutes les données recueillies ont été soumises à l'analyse statistique (Steel et Torrie 1960).

## RESULTATS ET DISCUSSION

La relation qui existe entre le rendement en matière sèche et la teneur en azote total de la partie aérienne de la luzerne est résumée au Tableau 1. Les valeurs de  $r$  étant très significatives, le poids sec peut donc être utilisé comme mesure indirecte de la

Tableau 1. Moyennes des poids secs et des teneurs en azote total de la variété de luzerne Saranac, cultivée en pots rivièra, et les constantes statistiques reliant les deux caractères

	Poids sec* (g/pot)	Azote total (mg)	<i>r</i>	<i>b<sub>yx</sub></i>	<i>ES<sub>byx</sub></i>	<i>ES<sub>yx</sub></i>
1ère coupe	1.99	69.96	0.942***	24.75	1.26	14.77
2ème coupe	5.66	209.21	0.989***	37.28	0.78	12.45
3ème coupe	6.77	273.38	0.964***	38.04	1.51	20.01
Moyenne des trois coupes	4.81	184.19	0.979***	36.65	1.08	12.62

\*Moyenne des rendements des 49 souches et de deux témoins azotés.

\*\*\*Très significativement différent de zéro ( $P = 0.001$ ).

*r*, coefficient de corrélation; *b<sub>yx</sub>*, coefficient de régression; *ES<sub>byx</sub>*, écart type du coefficient de régression; *ES<sub>yx</sub>*, écart type de l'estimation.

fixation d'azote et comme critère de sélection des souches de *R. meliloti* sous les conditions expérimentales décrites. Ces résultats se comparent à ceux obtenus par Erdman et Means (1952) et Martinez (1971).

Il existe des écarts considérables et des différences très significatives entre l'efficacité des souches aux trois coupes (Tableaux 2 et 3). Haydock et Norris (1967) ont montré que l'assimilation de l'azote dans les plantes vivant en symbiose avec les *Rhizobium* ne se fait pas de la même façon que dans les plantes utilisant l'azote minéral; conséquemment les traitements ayant reçu de l'azote minéral n'ont pas été utilisés dans les comparaisons subséquentes entre les souches, mais ils reflètent les

conditions du milieu de culture pour la croissance de la luzerne. Le classement des souches selon leur efficacité a été basé sur la moyenne des rendements par coupe. Une souche a été classée inefficace (NE) lorsque le rendement obtenu était plus petit que celui de la moyenne de la coupe moins la valeur d'un écart type de la moyenne; une souche était classée 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 souches donnant des rendements supérieurs à celui de la moyenne plus la valeur d'un écart type de la moyenne ont été classées très efficaces (TE) (Tableau 4).

Les rendements moyens ont augmenté d'une coupe à l'autre mais les souches ont montré des différences très significatives dans leur efficacité (Tableau 2) alors que les répétitions étaient homogènes. Il est intéressant de noter qu'environ la même distribution de la population dans les trois classes d'efficacité se retrouve d'une coupe à l'autre (Tableau 4), mais les souches n'ont pas manifesté le même degré d'efficacité. Ainsi la souche *S*<sub>1</sub> s'est classée TE à la première coupe et E pour les deux autres coupes successives, alors que la souche *A*<sub>2</sub> s'est classée E à la première coupe et TE pour les deux autres coupes (Tableau 3). Ces résultats illustrent que l'efficacité des souches varie d'une coupe à l'autre, phénomène qui a déjà été mis en évidence

Tableau 2. Moyenne des rendements en poids sec par coupe et analyse de variance des rendements obtenus avec les 49 souches de *R. meliloti*

	Coupes		
	1	2	3
Rendements (g/pot)	1.70	5.53	6.74
Ecart type de la moyenne	±0.74	±2.18	±1.91
Valeurs de <i>F</i>			
Répétitions	1.10 NS*	0.41 NS	1.88 NS
Souches	22.60 TS**	8.68 TS	4.42 TS

\*NS, valeur non significative.

\*\*TS, valeur très significative ( $P = 0.0001$ ).

Tableau 3. Rendement moyen et total obtenu avec la luzerne pour les 49 souches de *R. meliloti*

Souches	Coupe (g/pot)			Somme total des rendements obtenus avec trois coupes (g)
	1	2	3	
S1	2.47 (TE)*	7.13 (E)	6.34 (E)	47.82 (E)**
S2	2.16 (E)	5.87 (E)	6.25 (E)	42.84 (E)
S3	2.18 (E)	6.79 (E)	6.83 (E)	47.40 (E)
S4	2.02 (E)	7.71 (E)	7.44 (E)	51.51 (E)
S5	2.31 (E)	7.63 (E)	7.19 (E)	51.39 (E)
S6	1.86 (E)	6.03 (E)	6.18 (E)	42.21 (E)
S7	2.35 (E)	6.72 (E)	6.15 (E)	45.66 (E)
S8	2.44 (E)	6.25 (E)	7.02 (E)	47.13 (E)
S9	1.72 (E)	4.52 (E)	6.40 (E)	37.92 (E)
S10	1.67 (E)	3.79 (E)	5.29 (E)	32.25 (E)
S11	3.04 (TE)	6.50 (E)	7.31 (E)	50.55 (E)
S12	1.72 (E)	5.13 (E)	6.01 (E)	38.58 (E)
S13	2.36 (E)	4.14 (E)	4.97 (E)	34.41 (E)
S14	2.76 (TE)	8.99 (TE)	7.54 (E)	57.87 (TE)
S15	2.67 (TE)	6.68 (E)	8.38 (E)	53.19 (E)
S16	1.62 (E)	5.45 (E)	6.49 (E)	40.68 (E)
S19	2.60 (TE)	7.35 (E)	7.45 (E)	52.20 (E)
S20	2.03 (E)	6.02 (E)	5.83 (E)	41.64 (E)
S21	2.16 (E)	6.75 (E)	7.34 (E)	48.75 (E)
S22	1.39 (E)	4.07 (E)	5.59 (E)	33.15 (E)
V1	2.00 (E)	5.53 (E)	6.90 (E)	43.29 (E)
V2	2.16 (E)	5.53 (E)	6.71 (E)	43.20 (E)
V3	3.19 (TE)	8.90 (TE)	6.87 (E)	56.88 (TE)
V4	1.34 (E)	4.61 (E)	6.75 (E)	38.10 (E)
V5	1.30 (E)	3.68 (E)	6.51 (E)	34.47 (E)
V6	1.21 (E)	3.20 (NE)	3.78 (NE)	24.57 (NE)
V7	1.67 (E)	4.92 (E)	5.21 (E)	35.40 (E)
D1	0.15 (NE)	0.45 (NE)	2.35 (NE)	8.85 (NE)
D2	1.79 (E)	7.18 (E)	8.41 (E)	52.14 (E)
D3	1.84 (E)	6.42 (E)	7.48 (E)	47.22 (E)
A1	0.26 (NE)	1.29 (NE)	4.80 (NE)	19.05 (NE)
A2	2.04 (E)	9.35 (TE)	10.62 (TE)	66.03 (TE)
A3	2.02 (E)	8.14 (TE)	9.95 (TE)	60.33 (TE)
A4	2.14 (E)	7.75 (TE)	10.15 (TE)	60.12 (TE)
A5	1.50 (E)	5.26 (E)	6.82 (E)	40.74 (E)
I1	0.07 (NE)	0.46 (NE)	1.55 (NE)	6.24 (NE)
I2	1.03 (E)	3.18 (NE)	4.30 (NE)	25.53 (NE)
I3	1.33 (E)	5.24 (E)	8.19 (E)	44.28 (E)
I4	0.89 (NE)	3.28 (NE)	5.69 (E)	29.58 (E)
R1	1.03 (E)	4.40 (E)	7.23 (E)	37.98 (E)
E1	0.54 (NE)	2.47 (NE)	4.40 (NE)	22.23 (NE)
E2	2.15 (E)	7.56 (E)	9.06 (TE)	56.31 (TE)
23A	1.45 (E)	7.43 (E)	9.71 (TE)	55.77 (TE)
3DOa2oa	1.49 (E)	6.55 (E)	10.20 (TE)	54.72 (E)
3DOa8	2.20 (E)	9.16 (TE)	8.79 (TE)	60.45 (TE)
C1	0.31 (NE)	2.14 (NE)	4.15 (NE)	19.80 (NE)
54032	1.05 (E)	3.85 (E)	6.63 (E)	34.59 (E)
54033	1.15 (E)	6.41 (E)	9.34 (TE)	50.70 (E)
Alfalfa D	0.42 (NE)	3.05 (NE)	5.79 (E)	27.78 (NE)
Témoins azotés	9.18	8.89	7.39	76.38

\*Les désignations entre parenthèse indiquent: NE, non-efficace; E, efficace; TE, très efficace; pour explication voir le texte.

\*\*Moyenne = 41.89; écart type de la moyenne = 13.26.

Tableau 4. Classement de 49 souches de *R. meliloti* d'après la moyenne du rendement obtenu à chaque coupe et le rendement total obtenu avec trois coupes

Classe d'efficacité	1ère coupe		2ème coupe		3ème coupe		Somme totale des trois coupes	
	Rendement (g/pot)	Nombre de souches	Rendement (g/pot)	Nombre de souches	Rendement (g/pot)	Nombre de souches	Rendement (g)	Nombre de souches
NE	<0.96	7	<3.35	9	<4.83	7	<28.63	8
E	0.96-2.44	36	3.35-7.71	34	4.83-8.65	34	28.63-55.15	33
TE	>2.44	6	>7.71	6	>8.65	8	>55.15	8

(Erdman et Means 1953; Martinez 1971; Gasser et al. 1972). Cette variation de l'efficacité peut être due au faible taux de réinfection des racines après la coupe de la partie aérienne, car la nodulation apparaît en vagues successives selon l'activité physiologique de la plante (Martinez 1971). Ainsi, certaines souches n'auraient pas autant d'habileté à croître dans la rhizosphère de la luzerne et à former rapidement de nouveaux nodules après une coupe (souche A<sub>1</sub> par exemple), alors que d'autres auraient l'habileté à former rapidement des nodules (souche A<sub>2</sub>). Les *Rhizobium*, aux stades prématurés de la symbiose, se comportent en parasites; les bactéries sont alors en compétition avec la plante pour l'azote et les autres substances métaboliques de la plante. La rapidité à laquelle une souche forme des nodules et élabore la nitrogénase pour la fixation de l'azote sera reflétée par une reprise rapide de la croissance de la luzerne. On n'a pas essayé de mettre en évidence les corrélations entre la grosseur et les nombres de nodules avec l'efficacité des souches après les coupes, car il aurait fallu sacrifier les plantes à chaque fois, ce qui n'aurait pas permis la continuité de l'expérience. Martinez (1971) a déjà mentionné le manque de corrélation entre l'état des nodules chez la luzerne et l'efficacité des souches de *R. meliloti*, l'appréciation de l'état des nodules étant trop subjective pour être quantifiable. Nous avons cependant observé, après la troisième coupe, que les souches classées TE avaient en général formé des gros nodules montrant une bonne

vitalité, ceci fut particulièrement vrai pour les souches A<sub>2</sub> et A<sub>4</sub>.

Les rendements d'une coupe à l'autre ne sont pas complètement indépendants l'un de l'autre. En effet, les constantes statistiques entre le rendement moyen obtenu avec les souches pour chaque coupe et la moyenne des coupes (Tableau 5) indiquent que seulement 68, 26 et 62% des rendements à la première coupe sont en relation avec ceux de la deuxième, de la troisième et de la moyenne des trois coupes respectivement. Statistiquement, la première coupe a peu de valeur pour prédire le rendement moyen et l'efficacité des souches. A l'exception de trois souches (I4, E2 et 23A), le classement des souches selon leur efficacité à la deuxième coupe est indentique à celui obtenu avec la somme totale des rendements des trois coupes (Tableau 3). Pour évaluer correctement l'efficacité d'une souche de *R. meliloti*, la deuxième coupe est la plus importante, car elle donne le maximum d'information. En effet les plus hauts coefficients de détermination sont obtenus avec cette coupe (Tableau 5).

A la deuxième coupe, en ordre décroissant de rendement, les souches A<sub>2</sub>, 3Doa8, S<sub>14</sub>, V<sub>3</sub>, A<sub>3</sub> et A<sub>4</sub> sont classées TE; ces souches donnent les plus hauts rendements pour la somme des trois coupes. La persistance au champ de ces souches est présentement à l'étude. Le comportement d'un mélange logique de souches très efficaces au départ avec des souches très efficaces à la deuxième et à la troisième coupe est actuellement à l'étude. Nous

Tableau 5. Coefficient de corrélation ( $r$ ) des rendements moyens obtenus avec les souches pour chaque coupe et la moyenne des coupes

	1	2	3	1+2	2+3	1+2+3
1	-	0.83 (68.73)*	0.51 (26.36)	0.90 (81.40)	0.71 (51.07)	0.79 (62.61)
2		-	0.82 (67.03)	0.99 (97.84)	0.96 (92.09)	0.98 (95.45)
3			-	0.77 (58.73)	0.95 (89.71)	0.91 (83.44)

\*Les valeurs entre parenthèses représentent le coefficient de détermination ( $r^2 \times 100$ ).

croyons qu'un tel mélange est souhaitable dans l'établissement d'une luzernière car il rendrait la plante rapidement indépendante de l'azote du sol.

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les Drs. M. Cescas, L. J. O'Grady et H. Gasser pour leurs conseils judicieux dans la préparation de ce manuscrit.

- BERGERSEN, F. J. 1970. Some Australian studies relating to the long-term effects of the inoculation of legume seeds. *Plant Soil* **32**: 727-736.
- BERGERSEN, F. J. BROCKWELL, J., GIBSON, A. H. et SCHWINGHAMER, E. A. 1971. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. *Plant Soil Spec.* Vol. pp. 3-16.
- BROCKWELL, J., DUDMAN, W. F., GIBSON, A. M., HELY, F. W. et ROBINSON, H. C. 1968. An integrated program for the improvement of legume inoculant strains. Pages 103-114 dans J. W. Holmes, ed. Transactions of the 9th International Congress Soil Science, Vol. 2. ISSS/Angers and Robertsen, Sydney.
- BURTON, J. C. 1972. Nodulation and symbiotic nitrogen fixation. Pages 229-246 dans C. H. Hanson, ed. Alfalfa, science and technology. Amer. Soc. Agron. Vol. 15.
- DATE, R. A. 1976. Principles of *Rhizobium* strain selection. Dans P. S. Nutman, ed. Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press, London.
- ERDMAN, L. W. et MEANS, U. M. 1952. Use of total yield for predicting nitrogen content of inoculated legumes grown in sand cultures. *Soil Sci.* **73**: 231-235.
- ERDMAN, L. W. et MEANS, U. M. 1953. Strain variation of *Rhizobium meliloti* on three varieties of *Medicago sativa*. *Agron. J.* **45**: 625-629.
- GASSER, H., GUY, P., OBATON, M. et SIKORO, I. 1972. Efficiency of *Rhizobium meliloti* strains and their effects on alfalfa cultivars. *Can. J. Plant Sci.* **52**: 441-448.
- HAM, G. E., CARDWELL, V. B. et JOHNSON, H. W. 1971. Evaluation of *Rhizobium japonicum* inoculants in soils containing naturalized populations of Rhizobia. *Agron. J.* **63**: 301-303.
- HAYDOCK, K. P. et NORRIS, D. O. 1967. Opposed curves for nitrogen per cent on dry weight given by *Rhizobium* dependent legumes. *Aust. J. Sci.* **29**: 426-427.
- HOAGLAND, D. R. et ARNON, D. I. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. of California, Agric. Exp. Sta., Berkley, Calif. Circ. 347, 39 pp.
- 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, Wisc.
- STEEL, R. G. D. et TORRIE, J. H. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Co., Inc., Toronto, Ont. 481 pp.
- VARLEY, J. A. 1968. Automatic methods for the determination of nitrogen and phosphorus and potassium in plant material. *Analyst* **91**: 119-126.
- VINCENT, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. I.B.P. Handb. No. 15. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh. 164 pp.
- VINCENT, J. M. 1974. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. Dans A. Quispel, ed. The biology of nitrogen fixation. North-Holland Research Monographs Frontiers of Biology, Vol. 33, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- WARD, C. M. et JOHNSTON, F. B. 1962. Chemical methods of plant analysis. Res. Br. Agric. Can. Publ. 1064.