

## EFFET DU SOUFRE ET DE L'AZOTE SUR LA FIXATION SYMBIOTIQUE D'AZOTE CHEZ LES PLANTULES DE LUZERNE (*Medicago Sativa* L.)

L. M. BORDELEAU<sup>1</sup>, M. GIROUX<sup>2</sup>, R. OUELLET<sup>2</sup>, et H. ANTOUN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Station de Recherches, Agriculture Canada, 2560 boulevard Hochelaga, Sainte-Foy, Québec G1V 2J3; <sup>2</sup>Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation du Québec, Service de recherche en sols, 2700, Einstein, Sainte-Foy, Qué. G1P 3W8; et <sup>3</sup>Département des Sols, Faculté des sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, Sainte-Foy, Qué. G1K 7P4. Contribution n° 180 de la station de recherches et contribution n° 290 de la direction générale de la recherche et de l'enseignement agricole, reçue le 21 juillet, acceptée le 30 mars.

BORDELEAU, L. M., GIROUX, M., OUELLET, R. ET ANTOUN, H. 1981. Effet du soufre et de l'azote sur la fixation symbiotique d'azote chez les plantules de luzerne (*Medicago Sativa* L.) Can. J. Plant Sci. **61**: 639-645.

L'effet de l'addition de soufre et d'azote sur la masse aérienne, la masse radiculaire, la nodulation et l'activité de la nitrogénase a été étudié chez des plantules de luzerne de la variété Saranac, inoculées avec une souche très efficace de *Rhizobium meliloti*. La masse aérienne ainsi que la masse radiculaire et l'indice nodulaire augmentent avec l'augmentation du niveau d'azote et de soufre. Avec le soufre, le taux d'augmentation de la masse aérienne et de l'indice nodulaire n'est pas constant sur l'étendue des concentrations étudiées. Le soufre et l'azote semblent avoir un effet multiplicatif important sur la masse aérienne et la masse radiculaire. En l'absence de soufre, l'azote ne semble pas influencer l'activité de la nitrogénase. La masse aérienne et l'indice nodulaire sont fortement reliés à la masse radiculaire et à l'activité de la nitrogénase. Cependant, aucune corrélation significative n'a été observée entre l'activité de la nitrogénase et la masse radiculaire.

The effect of the addition of sulphur and nitrogen on the aerial mass, root mass, nodulation and nitrogenase activity was studied on alfalfa cv. Saranac seedlings inoculated with a very efficient strain of *Rhizobium meliloti*. The aerial mass, root mass and a nodulation index increase with the addition of increasing concentrations of nitrogen and sulphur. The rate of increase of aerial mass and the nodulation index with sulphur are not constant over the range of the concentrations studied. Sulphur and nitrogen appeared to have a very important multiplicative effect on aerial mass and root mass. In the absence of sulphur, nitrogen did not affect nitrogenase activity. The aerial mass and the nodulation index are strongly correlated to the root mass and nitrogenase activity. However, nitrogenase activity and the root mass were not significantly correlated.

A cause de l'importance économique de la fixation symbiotique de l'azote chez la luzerne, les recherches se sont orientées vers l'amélioration de la fixation chez les cultivars de cette plante (Seetin et Barnes 1977; Duhigg et al. 1978) ainsi que la sélection de souches efficaces de *Rhizobium meliloti* Dangeard (Burton 1972; Bordeleau et al. 1977). Cependant, pour bénéficier au maximum de

cette association symbiotique, il est aussi important d'améliorer les conditions de la symbiose, en optimisant la nutrition minérale de la plante.

Richardson et al. (1957) montrent qu'un apport minime d'azote minérale améliore le développement nodulaire de la luzerne, alors qu'un apport massif a l'effet contraire. Cependant, Heichel et Vance (1979) soulignent l'importance de l'étude de l'efficacité des souches de *R. meliloti* en présence de nitrate.

D'autre part, Martel et Zizka (1977) rapportent que la luzerne réagit mieux, en serres, à une addition de soufre qu'à l'addition de phosphore et de potassium. Duke et al. (1980) montrent aussi l'importance du rôle que peut jouer le soufre sur la fixation symbiotique de l'azote chez la luzerne.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de l'addition de soufre et d'azote sur la nodulation et la fixation symbiotique d'azote des plantules de luzerne, inoculées avec une souche très efficace de *R. meliloti*.

### MATERIEL ET METHODS

Des graines (12-15) de grosseur uniforme de la variété Saranac de luzerne ont été stérilisées en surface (Vincent 1970) et semées dans des sachets en plastique tel que décrit par Weaver et Frederick (1972). Chaque sachet reçoit 30 mL d'une solution nutritive complète et stérile (Hoagland et Arnon 1938) tamponnée à pH 6.75  $\pm$  0.05 (Bordeleau et al. 1977) et modifiée comme suit: l'azote sous forme de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  aux concentrations de 0, 28, 56 et 112  $\mu\text{g}$  de N par mL est utilisé avec le soufre sous forme de  $\text{Mg SO}_4$  aux concentrations de 0, 20, 40, 60 et 80  $\mu\text{g}$  de S par mL dans une combinaison factorielle. A la concentration 0  $\mu\text{g}$  de S par mL, les plantes ont encore à leur disposition la quantité de soufre normalement contenue dans la solution nutritive de Hoagland et Arnon (1938). Mais à 0  $\mu\text{g}$  de N par mL, la seule source d'azote est la fixation symbiotique. Les plantes sont cultivées dans des cabinets de croissance sous des conditions décrites précédemment (Bordeleau et al. 1977). Une semaine après le semis, les plantes étaient sélectionnées pour en conserver 10 d'apparence uniforme par sachet et chaque sachet était inoculé avec  $10^9$  cellules de la souche très efficace  $A_2$  de *Rhizobium meliloti* (Bordeleau et al. 1977). Quatre semaines après l'inoculation, les racines des plantes ont été séparées et incubées durant 2 h à 25°C en présence de 0.125 atmosphère d'acétylène, afin de mesurer l'activité de la nitrogénase (Hardy et al. 1973). La quantité d'éthylène produite a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse sur un appareil Tracor 220, muni d'une colonne (3 mm  $\times$  183 cm) remplie de porapak N, et d'un détecteur d'ionisation à flamme.

Un indice nodulaire, tenant compte du nombre ainsi que de la grosseur des nodules, a été calculé comme suit. Le nombre relatif de nodules par plant est déterminé selon une échelle variant de 1 (au-

cune nodulation) à 5 (nodulation maximum). De plus, la distribution relative de chacune de 3 classes de grosseur des nodules est déterminée selon une échelle variant de 1 (peu de nodules) à 3 (nodules nombreux). Chaque classe est pondérée en multipliant la distribution relative par 3 pour les gros nodules, par 2 pour les nodules moyens et par 1 pour les petits nodules. La somme de ces pondérations divisée par 18 et multipliée par le nombre relatif de nodules par plant représente l'indice nodulaire.

Le poids de la matière sèche des parties aériennes et des racines des plantes a été déterminé après une période de séchage de 24 h à 80°C. Tous les essais comprenaient neuf répétitions.

### RESULTATS ET DISCUSSION

Le tableau 1 résume l'analyse de la variance de la masse aérienne, de la masse racinaire, de l'indice nodulaire et de l'activité de la nitrogénase de plantules de la variété Saranac de luzerne, inoculée avec la souche très efficace  $A_2$  de *Rhizobium meliloti*. Les effets principaux et l'interaction du soufre et de l'azote sur les quatre variables étudiées semblent tous différents de zéro ( $P \leq 0.01$  partout sauf pour l'effet de l'interaction N  $\times$  S sur l'activité de la nitrogénase où  $P \leq 0.05$ ). Les quatre équations suivantes établies à partir du tableau 1 indiquent de quels termes en azote (N) et en soufre (S) dépendent la masse aérienne (MA), la masse racinaire (MR), l'indice nodulaire (IN) et l'activité de la nitrogénase (AN):

$$MA = f(+N^1, +S^1, -S^2, +S^3, +N^1S^1, +N^2S^1, +N^2S^2) \quad (1)$$

$$MR = f(+N^1, +S^1, +N^1S^1, +N^2S^1, +N^2S^2, +N^2S^4) \quad (2)$$

$$IN = f(+N^1, +S^1, -S^2, +S^3, +N^1S^1, +N^2S^1) \quad (3)$$

$$AN = f(+S^1, -S^2, -N^3S^4) \quad (4)$$

Dans ces équations, seuls les termes significatifs à 1% ont été utilisés et  $f$  signifie "fonction linéaire de"; le signe qui précède chaque terme est celui de son coefficient dans l'équation de régression.

La masse aérienne ainsi que la masse racinaire et l'indice nodulaire augmentent, en moyenne, avec l'augmentation du niveau d'azote (tableau 2 et figs. 1-3). Ils augmentent aussi avec l'addition de concentrations

croissantes de soufre, mais le taux d'augmentation n'est pas constant sur l'étendue des concentrations de soufre étudié, dans le cas de la masse aérienne et de l'indice nodulaire. En effet, la présence d'un terme négatif en  $S^2$  dans les éqs. 1 et 3 signifie que le taux d'augmentation de la masse aérienne moyenne ou de l'indice nodulaire moyen est assez élevé pour les niveaux de soufre les plus bas, puis diminue aux niveaux de soufre les plus hauts (figs. 1 et 3).

Les signes positifs de tous les termes de l'interaction  $N \times S$  des éqs. 1, 2 et 3 indiquent que l'effet combiné de l'azote et du soufre sur la masse aérienne, la masse racinaire et l'indice nodulaire n'est pas simplement additif. Ainsi la masse aérienne et la masse racinaire augmentent proportionnellement au produit du carré du taux d'azote par le carré du taux de soufre (éqs. 1 et 2).

Ceci suggère un effet multiplicatif très important de ces deux éléments sur la masse aérienne et la masse racinaire.

On remarque dans l'éq. 4 et la fig. 4 qu'en l'absence de soufre, l'azote ne semble pas influencer l'activité de la nitrogénase. L'addition d'azote et de soufre favorise donc le développement des parties aérienne et racinaire ainsi que celui des nodules des plantules de la variété Saranac de luzerne en présence de la souche très efficace  $A_2$  de *Rhizobium meliloti*.

La masse aérienne et l'indice nodulaire sont fortement reliés à la masse racinaire et l'activité de la nitrogénase (tableau 3). Les coefficients de corrélation sont tous positifs, ce qui indique que la masse aérienne tend à augmenter avec la masse racinaire, l'indice nodulaire et l'activité de la nitrogénase. Dans cette expérience, aucune corrélation

Tableau 1. Analyse de variance des effets du soufre (S) et de l'azote (N) sur la fixation symbiotique de l'azote des plantules de la variété Saranac de luzerne inoculées avec une souche très efficace de *Rhizobium meliloti*

Source de variation	Degrés de liberté	Carrés moyens			
		Masse aérienne	Masse racinaire	Indice nodulaire	Activité de la nitrogénase
Répétitions	8	161.50	15.48	0.80	4.43
N	3	203.34 **	111.95 **	2.06 **	8.92 **
N linéaire ( $N^1$ )	1	398.16 **	318.96 **	4.21 **	6.01 NS
N quadratique ( $N^2$ )	1	90.77 NS	13.07 *	0.96 NS	11.04 *
N cubique ( $N^3$ )	1	121.10 *	3.84 NS	1.02 NS	9.70 *
S	4	933.08 **	21.78 **	15.29 **	48.60 **
S linéaire ( $S^1$ )	1	2068.66 **	63.28 **	44.61 **	104.32 **
S quadratique ( $S^2$ )	1	1263.41 **	4.99 NS	8.54 **	78.96 **
S cubique ( $S^3$ )	1	237.35 **	9.91 NS	5.85 **	10.39 *
S quartique ( $S^4$ )	1	162.91 *	8.93 NS	2.14 *	0.71 NS
$N \times S$	12	128.34 **	22.42 **	2.91 **	3.57 *
$N^1 \times S^1$	1	365.55 **	103.93 **	8.81 **	0.001 NS
$N^1 \times S^2$	1	48.33 NS	2.78 NS	0.95 NS	1.64 NS
$N^1 \times S^3$	1	25.94 NS	0.56 NS	2.97 *	3.65 NS
$N^1 \times S^4$	1	25.54 NS	9.19 NS	0.71 NS	0.27 NS
$N^2 \times S^1$	1	221.26 **	74.83 **	15.51 **	1.81 NS
$N^2 \times S^2$	1	499.15 **	40.55 **	0.81 NS	7.14 *
$N^2 \times S^3$	1	39.81 NS	4.66 NS	0.82 NS	0.94 NS
$N^2 \times S^4$	1	31.68 NS	25.46 **	0.01 NS	1.83 NS
$N^3 \times S^1$	1	2.10 NS	0.01 NS	0.14 NS	0.59 NS
$N^3 \times S^2$	1	126.72 *	0.49 NS	0.19 NS	2.14 NS
$N^3 \times S^3$	1	37.77 NS	6.40 NS	1.56 NS	0.18 NS
$N^3 \times S^4$	1	122.19 *	0.20 NS	2.42 *	22.68 **
Erreur	152	25.96	3.32	0.48	1.81

\*\*Valeur significative à  $P \leq 0.01$ ; \*valeur significative à  $P \leq 0.05$ ; NS = Valeur non significative.

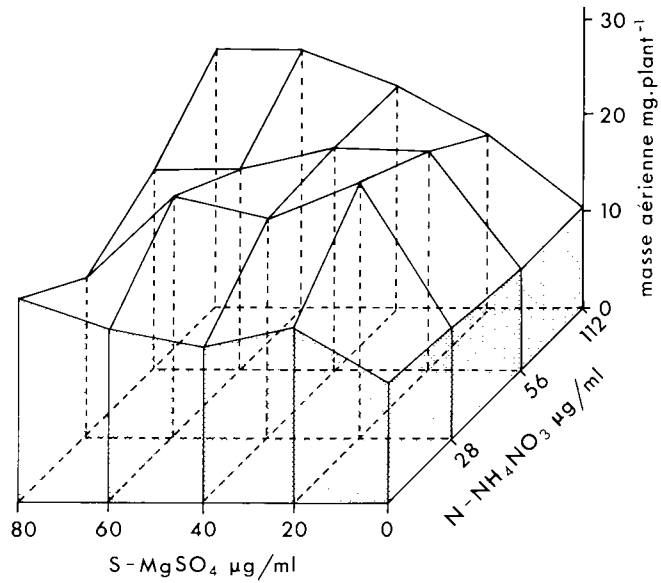


Fig. 1. Effets du soufre et de l'azote sur le rendement moyen de la masse aérienne de la variété Saranac de luzerne inoculée avec une souche très efficace de *R. meliloti*.

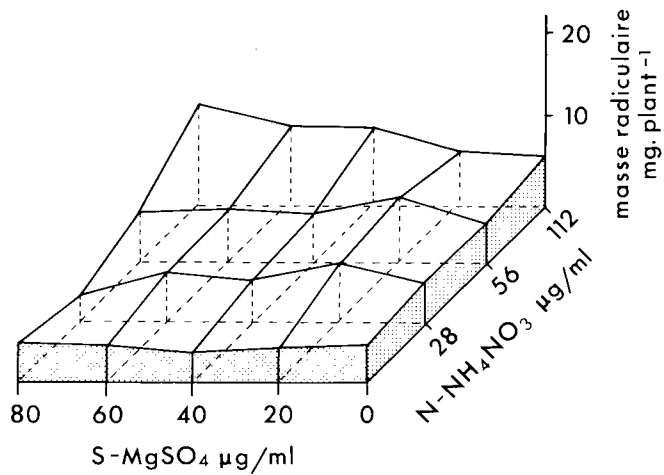


Fig. 2. Effets du soufre et de l'azote sur le rendement moyen de la masse racinaire de la variété Saranac de luzerne inoculée avec une souche très efficace de *R. meliloti*.

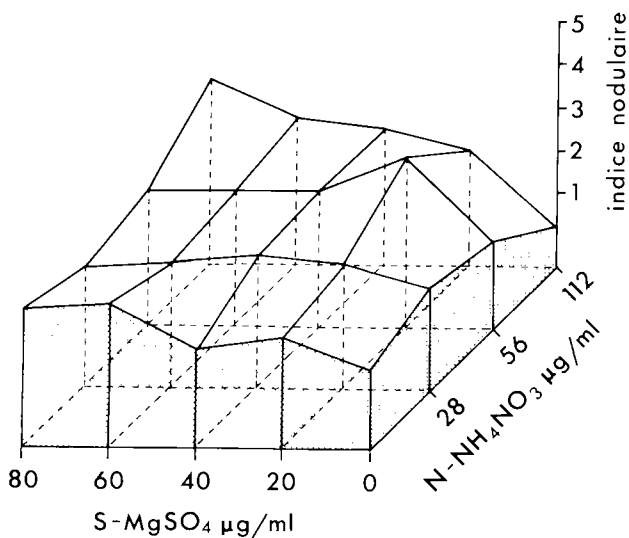


Fig. 3. Effets du soufre et de l'azote sur l'indice nodulaire de la variété Saranac de luzerne inoculée avec une souche très efficace de *R. meliloti*.

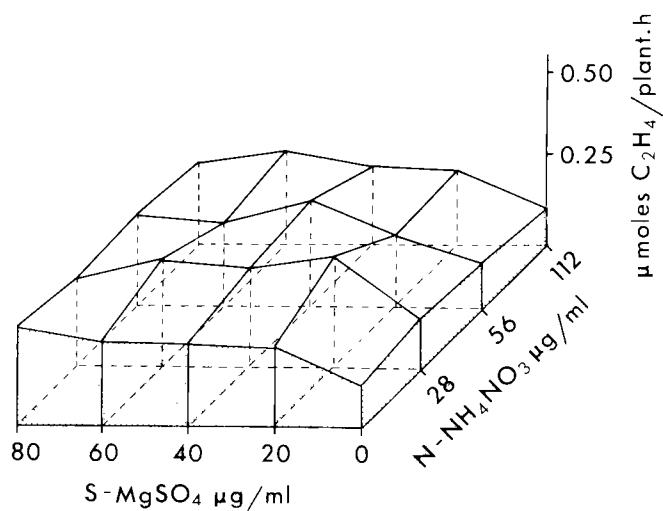


Fig. 4. Effets du soufre et de l'azote sur l'activité de la nitrogénase des nodules de la variété Saranac de luzerne inoculée avec une souche très efficace de *R. meliloti*.

Tableau 2. Valeurs moyennes de la masse aérienne, la masse racinaire, l'indice nodulaire et l'activité de la nitrogénase de la luzerne inoculée avec une souche très efficace de *Rhizobium meliloti* à différents niveaux de soufre et d'azote

Traitements µg/mL		Masse aérienne mg × plant <sup>-1</sup>	Masse racinaire mg × plant <sup>-1</sup>	Indice nodulaire	Activité de la nitrogénase µmoles × 20 C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / plant × h
S	N				
0	0	12.87	4.43	1.84	2.77
0	28	12.00	4.66	2.31	2.98
0	56	11.11	4.19	1.97	2.63
0	112	10.86	4.98	0.99	2.32
20	0	18.43	4.05	2.60	4.72
20	28	28.42	6.80	2.89	6.61
20	56	23.91	7.56	4.02	4.24
20	112	19.49	5.90	2.68	4.41
40	0	16.49	3.44	2.33	4.88
40	28	23.87	4.75	3.09	5.79
40	56	24.94	5.98	3.20	6.34
40	112	24.21	8.52	3.31	4.67
60	0	18.22	4.13	3.33	4.99
60	28	27.22	5.90	2.91	6.26
60	56	22.41	6.08	3.18	4.70
60	112	28.59	8.91	3.55	5.62
80	0	22.30	5.18	3.17	5.76
80	28	17.90	3.69	2.81	5.22
80	56	22.69	5.99	3.33	5.01
80	112	28.80	11.44	4.45	4.68
Ecart type des moyennes		1.70	0.61	0.23	0.45

significative n'a été observée entre l'activité de la nitrogénase et la masse racinaire. L'activité de la nitrogénase dépendrait donc de la masse aérienne et de l'indice nodulaire.

L'addition de soufre et d'azote aux plantules de luzerne inoculées avec une souche très efficace de *R. meliloti* s'avère importante. Nos résultats corroborent ceux de

Martel et Zizka (1977) qui avaient souligné l'effet bénéfique de l'addition de ces deux éléments à la luzerne. L'amélioration de la nutrition minérale de la plante doit être prise en considération pour profiter au maximum du système symbiotique de la luzerne, en particulier lors de la sélection de nouvelles souches très efficaces de *R. meliloti*. Des études au champ sont nécessaires pour pouvoir déterminer avec exactitude l'effet de l'addition du soufre et de l'azote sur la fixation symbiotique de l'azote chez la luzerne.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Dr A. F. MacKenzie pour la définition de l'indice nodulaire, Mme M. Bernier-Cardou pour son aide précieuse dans l'analyse statistique et l'interprétation des résultats, le Dr A. Comeau pour ses conseils judicieux et Mlle E. Imbeault pour son excellente aide technique.

Tableau 3. Coefficients de corrélation (*r*) reliant la masse aérienne (MA), la masse racinaire (MR), l'indice nodulaire (IN) et l'activité de la nitrogénase (AN) de la variété Saranac de luzerne inoculée avec une souche très efficace de *R. meliloti* en présence de soufre et d'azote

	MR	IN	AN
MA	0.71 **	0.81 **	0.82 **
MR		0.68 **	0.22 NS
IN			0.59 **

\*\*Valeurs significatives à  $P \leq 0.01$ ; NS = non significatif.

- 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.
- 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. ASA, Madison, Wis.
- DUHIGG, P., MELTON, B. et BALTENSPERGER, A. 1978. Selection for acetylene reduction rates in "Mesilla" alfalfa. *Crop Sci.* **18**: 813-816.
- DUKE, S. H., COLLINS, M. et SOBERALSKE, R. M. 1980. Effects of potassium fertilization on nitrogen fixation and nodule enzymes of nitrogen metabolism in alfalfa. *Crop Sci.* **20**: 213-219.
- HARDY, R. W. F., BURNS, R. C. et HOLS-TEN, R. D. 1973. Application of the acetylene reduction assays for nitrogenase. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 47-81.
- HEICHEL, G. H. et VANCE, C. P. 1979. Nitrate-N and *Rhizobium* strain roles in alfalfa seedling nodulation and growth. *Crop Sci.* **19**: 512-518.
- HOAGLAND, D. R. et ARNON, D. I. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. of California, Agric. Exp. Sta., Berkeley, Calif. Circ. 347. 39 pp.
- MARTEL, Y. A. et ZIZKA, J. 1977. Yield and quality of alfalfa as influenced by additions of S to P and K fertilizations under greenhouse conditions. *Agron. J.* **69**: 531-535.
- RICHARDSON, D. A., JORDAN, D. C. et GARRARD, F. H. 1957. The influence of combined nitrogen on nodulation and nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Plant Sci.* **37**: 205-214.
- SEETIN, M. W. et BARNES, D. K. 1977. Variation among alfalfa genotypes for rate of acetylene reduction. *Crop Sci.* **17**: 783-787.
- VINCENT, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme, Handb. No. 15. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh. 164 pp.
- WEAVER, R. W. et FREDERICK, L. R. 1972. A new technique for most probable number counts of Rhizobia. *Plant Soil* **36**: 219-222.