

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger

&

CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES EN SCIENCES AGRONOMIQUES
(Montpellier SupAgro)

ECOLE DOCTORALE

Systemes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences
& Environnement (SIBAGHE)

DOCTORAT

Spécialité: Ecosystemes & agronomie

Nora ALKAMA épouse Messous

**Adaptation de la symbiose rhizobienne chez le haricot à la
déficience en phosphore: détermination de la réponse de la
plante en terme d'échanges gazeux et de flux minéraux
échangés avec la rhizosphère**

Thèse en co-tutelle co-dirigée par
Sidi Mohamed OUNANE & Jean Jacques DREVON

Soutenue le 9 décembre 2010

Devant le jury composé de:

Abdellah AIDAOU	Professeur, ENSA Alger	Rapporteur & président
Etienne-Pascal JOURNET,	Chargé de recherche, INRA Toulouse,	Rapporteur
Sidi Mohamed OUNANE,	Professeur, ENSA Alger,	Co-directeur de thèse
Jean Jacques DREVON	Directeur de recherche, INRA Montpellier,	Co-directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	4
CHAPITRE 1	8
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	8
Biodisponibilité du phosphore à l'interface sol-légumineuse	8
1. La symbiose rhizobia-légumineuse	8
1.1. Processus de nodulation	9
1.2. Respiration et diffusion de l'oxygène	13
2. Le phosphore	13
2.1. Le phosphore dans la plante	15
2.2. Le phosphore dans le sol	16
2.3. Le prélèvement du phosphore par la plante.....	18
2.4. La déficience du sol en P et les stratégies du prélèvement par la plante	20
3. La déficience des sols en P et conséquences sur la symbiose légumineuse-rhizobia	22
3.1. Modifications morphologiques	23
3.2. Influence sur le système racinaire et aérien.....	24
3.3. Influence sur les nodosités	24
3.4. La fixation symbiotique de l'azote et la carence en phosphore.....	26
4. Le Haricot	27
4.1. Origine du haricot	27
4.2. Classification.....	29
4.3. Importance de la culture du haricot.....	30
4.4. Limitation de la production, sélection et croisement chez le haricot	35
4.5. Propriétés symbiotiques de l'espèce	35
5. Objectifs et stratégie de recherche	36
5.1. Problématique de la thèse.....	36
5.2. Objectifs.....	37
5.3. Hypothèse de base.....	39
5.4. Approche expérimentale	39
CHAPITRE 2	51
Is genotypic variation of H⁺ efflux under P deficiency linked with nodulated-root respiration of N₂ - fixing common-bean	55
1. Introduction	56
2. Materials and methods	57
2.1. Biological material, soil and culture conditions	57
2.2. Measurements of proton release and nodulated-root O ₂ uptake	58
2.3. Analysis at harvest and statistical data processing	59
3. Results	59
3.1. Growth and nodulation.....	59
3.2. Proton release by nodulated-roots	62
3.3. P concentration in shoot and nodules	62
3.4. Nodulated-root consumption of O ₂	65
4. Discussion	67

5. References.....	68
CHAPITRE 3	72
Proton efflux of nodulated-root varies among recombinant Inbred Lines of common-bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>) BAT477xDOR364 under P deficiency in rhizotron?	75
1. Introduction.....	76
2. Materials and methods	77
2.1 Biological material, soil and culture conditions	77
2.2 Measurement of proton efflux in rhizotron	78
2.3 Gas exchange measurement	79
2.4 Analysis at harvest and statistical data processing	79
3. Results.....	80
3.1 Growth and nodulation.....	80
3.2 Proton efflux by nodulated-roots.....	82
3.3 P concentration in shoot and nodules	83
3.4 Nodule and plant nitrogenase activity	84
4. Discussion	86
5. References.....	88
CHAPITRE 4	92
Nodulation et croissance des lignées recombinantes contrastantes du haricot commun (<i>Phaseolus vulgaris</i>) en multisites dans la région de Tizi Ouzou	92
I. Nodulation diagnosis of contrasted recombinant imbred lines of common bean observed in multi-local field trial in Mediterranean conditions.	94
1. Introduction.....	95
2. Materials and methods	97
2.1 Experimental sites	97
2.2 Plant material	97
2.3 Statistical analysis	98
3. Results.....	98
3.1 Typology of experimental sites	98
3.2 Nodule and plant biomass	100
3.3 Genotype differences	103
4. Discussion	106
4.1 Multi-local approach to explore a large variability of soil properties	106
4.2 Response of common bean to soil fertility	106
4.3 Variation among common bean RILs	107
4.4 Limitation of multi-local approach	108
5. Conclusion	109
6. References.....	110

II. Are the nodulated Recombinant Imbred Lines of common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) links with soil Olsen-P in multi-local field test in Mediterranean conditions? -----	113
1. Introduction	115
2. Material and methods	116
2.1 Experimental site.....	116
2.2 Plant material	117
2.3 Statistical analysis	117
3. Results	118
3.1 Plant nodulation	118
3.2 Nodule and shoot biomass as a function of Olsen-P	120
3.3. Hierarchical classification of the RILs	124
4. Discussion	124
5. Conclusion	127
6. References	128
Chapitre 5 -----	131
Nodulation, growth, P and N statut of contrasted Recombinant Imbred Lines of common bean observed at two soil phosphorus levels under biological nitrogen fixation. -----	131
1. Introduction	133
2. Material and methods	134
2.1. Experimental sites	134
2.2. Plant material	135
2.3. Statistical analysis	136
3. Results	136
3.1 Biomass production.....	136
3.2. Phosphorus status	138
3.3. Nitrogen status and nodule biomass.....	139
4. Discussion	140
5. Conclusion	141
6. References	141
CONCLUSIONS GENERALES -----	144
Vers une vision dynamique et intégrative des processus rhizosphériques impliqués dans le transfert sol-plante-minéraux -----	144
ANNEXES -----	147
I. Importance du haricot en Algérie et dans la région de Tizi Ouzou -----	147
II. Questionnaire d'enquête -----	151
III. Analyse de l'enquête -----	157
IV. Présentation de la région d'étude -----	163

INTRODUCTION GENERALE

Les légumineuses constituent une source importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale. Elles ont une particularité biologique qui leur permet de s'associer à des bactéries du sol (Rhizobiacées), pour former des organes symbiotiques «nodosités» ou «nodules» au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante (Mylona *et al.*, 1995). Certaines espèces ont la capacité de fixer jusqu'à 300 Kg Nha⁻¹ (Blondeau, 1980) et l'ensemble des légumineuses produit chaque année, sur notre planète, d'avantage d'ammoniac que l'industrie des engrais azotés (Denarié *et al.*, 1992). Ces nodosités sont le siège d'échanges trophiques complexes entre les deux partenaires. Sachant que la triple liaison de N₂ est chimiquement l'une des plus difficiles à briser. C'est donc grâce à l'enzyme « la nitrogénase » que la réduction de N₂ se fait en NH₃. Les bactéroïdes, nom donné à la forme symbiotique de la bactérie, reçoivent des substrats des cellules de la plante, essentiellement sous forme de malate qu'ils utilisent comme source du pouvoir réducteur pour la nitrogénase et les chaînes respiratoires. En échange, les bactéroïdes fournissent le NH₃ ou des intermédiaires de la synthèse des composés azotés comme les uréides. Grâce à leur capacité à fixer l'azote, les légumineuses contribuent au maintien de la fertilité du sol, tout en réduisant l'utilisation des engrais azotés et la pollution qu'ils entraînent. Dans ces conditions elles sont indiquées pour la protection de l'environnement et pour le développement d'une agriculture durable équilibrée.

La culture des légumineuses est confrontée à plusieurs contraintes notamment la faible disponibilité du phosphore dans le sol. Ce dernier constitue un facteur limitant majeur lorsque les légumineuses recourent à la fixation symbiotique de l'azote (Hernandez *et al.*, 2007). La teneur en P des nodosités, est d'ailleurs beaucoup plus élevée que celle d'autres organes de la plante (Vadez, 1996). La fixation symbiotique de l'azote s'accompagne généralement d'une acidification de la rhizosphère qui a pour conséquence une augmentation significative de la biodisponibilité de P (Behi, 2003). Cet effet s'explique par le rôle majeur que joue l'azote dans le bilan des cations et anions prélevés par la plante et, *in fine*, dans la modification du pH de la rhizosphère à la suite d'exorption de protons pour compenser l'excédent de cations dans ce bilan

(Hisinger *et al.*, 2003). En utilisant N₂ au lieu de NO₃⁻, les légumineuses peuvent acidifier davantage leur rhizosphère, qui se traduit par une augmentation de la biodisponibilité de P (Alkama *et al.*, 2009).

Parmi les légumineuses à graines les plus répandues et appréciées, le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). Il est produit sur plus de 18 millions d'hectares localisés principalement en Amérique latine, et à l'est et au sud de l'Afrique (Blair, 2009). Originaire d'Amérique du sud et central, il est aujourd'hui cultivé sur tous les continents. En 2006, la production mondiale de haricots, selon les statistiques publiées par la FAO, s'est élevée à 28.6 millions de tonnes, dont 19.6 tonnes de haricots secs (68 %), 6.4 tonnes de haricots frais (22 %) et 2.6 tonnes de haricots verts (9 %). Entre 1961 et 2006, la production totale de haricots a doublé passant de 14.4 à 28.6 millions de tonnes, progressant assez régulièrement au taux de 1.5 % par an (FAO.STAT, 2009). En effet, le haricot constitue un aliment de base pour près de 500 millions d'êtres humains de part sa richesse en protéines (25% environ) (Andrade *et al.*, 2003; Shimelis & Rakshit, 2005; Shimelis *et al.*, 2006; Pujola *et al.*, 2007) qui peut substituer aux protéines animales qui sont souvent inaccessible pour de nombreuses personnes. Malheureusement, le haricot est souvent cultivé dans des zones marginales, où plus de 50% des sols sont carencés en P. Comme toutes les légumineuses, le P constitue un facteur limitant pour la culture du haricot. En effet, les sols moins fertiles en particulier ceux déficients en P, constituent l'une des premières contraintes de la production du haricot (Lynch & Beebe, 1995). C'est le cas des régions tropicales et subtropicales, où la production de cette culture est sévèrement limitée par la déficience en P, en particulier dans les sols contenant de fortes concentrations en oxydes de fer ou d'aluminium qui complexent le P et le rendent moins disponible aux plantes (Shen *et al.*, 2005). C'est le cas aussi de certaines zones céréalières d'Algérie où le pH des sols dépasse souvent 8. Ainsi, sa faible biodisponibilité dans la majorité des sols cultivés en fait souvent un élément primordial pour la satisfaction des besoins nutritifs des végétaux..

De nombreux chercheurs ont travaillé sur la variabilité génétique vis-à-vis de l'efficacité d'utilisation de P (EUP) chez le haricot, efficacité qu'ils ont attribué à l'origine géographique des cultivars testés. Ils ont suggéré que les génotypes ayant un bon rendement en conditions de limitation phosphatée seraient les plus efficaces pour l'utilisation de P. Dans un projet de coopération, le CIAT (Centre International de Recherche Agronomique Tropicale) et l'INRA (Institut National de Recherche

Agronomique) de Montpellier, ont obtenu des lignées recombinantes (RILs) et contrastantes pour leur fixation symbiotique d'azote (FSN) et leur EUP issues du croisement entre BAT 477 et DOR 364. Ces RILs sont susceptibles de s'adapter aux conditions méditerranéennes (Trabelsi, 2001). C'est dans cette thématique que s'inscrit notre travail.

La première étape est d'étudier sous conditions contrôlées sous serre, des génotypes de haricot dont la fixation d'azote est tolérante à la déficience en P. Sur un nombre limité de génotypes, l'efflux de protons et la respiration nodulaire seront mesurés. La nodosité présente ce paradoxe d'être le siège d'une respiration intense pour fournir l'ATP nécessaire au fonctionnement de la nitrogénase, mais en revanche elle maintient une teneur en oxygène extrêmement faible dans l'environnement de la nitrogénase qui est facilement inactivée par O₂. La comparaison de génotypes contrastants pour la tolérance de la fixation d'azote à la carence en P dans un agro-écosystème constitue la deuxième phase de ce travail.

L'hypothèse de départ est qu'il existerait un lien étroit entre la nutrition phosphatée et la fixation d'azote dans le métabolisme énergétique intense des nodosités. Les lignées de haricot contrastantes, sous fixation d'azote, du fait de l'acidification de leur rhizosphère, contribuent-elles à mobiliser le P du sol? Existerait-il des différences d'efflux de H⁺ entre les lignées contrastantes pour l'EUP?

Références

- Alkama N., Bi Bolou E.B., Vailhe H., Roger L., Ounane S.M., Drevon J.J., 2009. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with variation of proton efflux in cowpea rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 41, 1814–1823.
- Andrade, C.A.B., Patroni, S.M.S., Clemente, E., Scapin, C.A., Silve´ rio, L., 2003. Effect of fertilization in protein and tryptophan contents in three bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 46, 93–94.
- Behi, O., 2003. Modélisation des systèmes complexes par composition en sous ensembles: Application à la disponibilité du phosphore provenant de phosphates naturels. *Thèse de doctorat. Montpellier II.* 192 p
- Beebe S., Lynch J., Galwey N., Tohme J., Ochoa I., 1997. A geographical approach to identify P-efficient genotypes among landraces and wild ancestors of common bean. *Euphytica* 95, 325–336.

- Blair M.W., Díaz L.M., Buendía C., H.F. Duque E., M.C., 2009. Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Gen.* 119, 955–972.
- Blondeau R., 1980. Fixation Biologique de l'azote atmosphérique. Libraire Vuibert, Paris. 103p.
- Denarie J., Debelle P., Rosenberg C., 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* 46, 497-531.
- FAO.STAT, 2009, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Hernaández G., Ramírez M, Valde´s-Lopez O., Tesfaye M., Graham M.A., Czechowski T., Schlereth A., Wandrey M., Erban A., Cheung F., et al., 2007. Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol.* 144, 752–767
- Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their environment constraint- a review. *Plant Soil* 248, 43-59.
- Lynch J.P., Beebe S.E., 1995. Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. *Hort Sci.* 30, 1165-1171.
- Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T., 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cel.* 7, 869–885.
- Pujola M., Farreras A., Casanas, F., 2007. Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 102, 1034–1041.
- Shen J, Li H, Neumann G, Zhang F., 2005. Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. *Plant Sci.* 168, 837–845.
- Shimelis E.A., Rakshit S.K., 2005. Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *LWT* 38, 331–338
- Shimelis E.A., Meaza M., Rakshit S.K., 2006. Physico-chemical properties, pasting behavior and functional characteristics of flours and starches from improved bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Agric. Eng. Int.* 8, 1–19.
- Trabelsi M., 2001. Réponse du haricot à certains facteurs contrôlant la production. 45-58. In: Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen. Ed. INRA, Paris 2003. *Les colloques*, N° 100.
- Vadez V., 1996. Variabilité génétique de la fixation d'azote sous carence en phosphore chez le haricot: relations avec l'efficacité d'utilisation du P et la perméabilité nodulaire à l'oxygène. *PhD thesis, Montpellier* 150 pp.
- Vadez V., Drevon J.J., 2001. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N₂ fixation in common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 21, 691-699.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Biodisponibilité du phosphore à l'interface sol-légumineuse

Dans le contexte de l'adaptation des légumineuses à la déficience en phosphore (P), ce travail de synthèse a pour but de résumer les connaissances actuelles concernant la biodisponibilité de P pour les légumineuses nodulées, en général et du haricot, en particulier. La présente synthèse restera focalisée sur l'exposition des plantes par l'intermédiaire de leur système racinaire et s'intéressera donc exclusivement aux interactions sol-racine.

1. La symbiose rhizobia-légumineuse

Les symbioses rhizobia-légumineuse sont des associations bénéfiques réciproques entre une plante et un micro-organisme. La symbiose rhizobienne consiste en l'association de bactéries du genre rhizobia et les racines des légumineuses après les mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes. Cette association forme des nodosités (Figure 1) sur les racines à l'intérieur desquels la bactérie se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique. Certaines bactéries du genre rhizobia ont la propriété de fixer l'azote atmosphérique (N_2) et couvre entre 40 et 80% de ses besoins (Walter, 2005). L'établissement et le fonctionnement de la symbiose sont sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires (Gage, 2004).



Figure 1. Les nodules sur les racines du haricot

La fixation biologique de l'azote est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement. C'est le processus de réduction enzymatique de N_2 (azote moléculaire) en NH_3 (azote ammoniacal, ou ammoniac). Cette forme de N combinée représente la fin de la réaction de fixation et le début de l'incorporation de l'azote fixé dans le squelette carboné. Ce processus est comparable à celui de la photosynthèse qui permet de produire des substances glucidiques à partir du gaz carbonique (CO_2) de l'atmosphère. Mais, alors que la photosynthèse est le fait de tous les végétaux (sauf les végétaux saprophytes), la fixation de l'azote ambiant n'est réalisée que par certaines espèces de bactéries et d'algues cyanophycées. Toutefois, de nombreuses plantes, principalement de la famille des Fabacées (légumineuses), la réalisent de façon indirecte, en symbiose avec des bactéries de leur rhizosphère. Cette activité peut produire jusqu'à 300 kg d'azote à l'hectare, qui se retrouvent en partie dans les récoltes exportées (protéines des graines et fourrages) et en partie dans le sol, utilisable par les cultures suivantes. Au niveau de la planète, on estime à 100 millions de tonnes par an le volume d'azote ainsi fixé, soit l'ordre de grandeur de la production industrielle des engrais azotés dans le monde

1.2. Processus de nodulation

La formation d'une nodosité se déroule en une séquence d'événements dont les étapes les plus importantes sont (Figure 2):

Pré-infection: Les rhizobia se multiplient dans la rhizosphère grâce aux exsudats racinaires. Des glycoprotéines de la plante, les lectines, permettent leur adhésion au poil absorbant de la racine. Ce dernier réagit à la présence de rhizobia par une courbure qui serait provoquée par l'acide indole acétique.

Infection: Le rhizobia pénètre à l'intérieur du poil absorbant. Il induit le développement d'un cordon d'infection, qui est constitué d'une membrane cytoplasmique contenant une gelée mucilagineuse dans laquelle les rhizobia se multiplient activement. Le cordon traverse la paroi pectocellulosique des cellules végétales ; il croît et se ramifie à l'intérieur du cortex racinaire.

Genèse du nodule: Des cellules corticales se différencient en méristème. Un hypothétique transfert d'ADN plasmidique de la bactérie à la cellule hôte interviendrait dans ce processus. La nodosité naît et croît par l'activité de ce méristème. Le cordon d'infection se ramifie tandis que les rhizobia se multiplient.

Maturation: Immédiatement après la libération des bactéries, hors du cordon infectieux, elles se divisent activement dans le cytoplasme de l'hôte. Les bactéries subissent ensuite des changements morphologiques avec une augmentation de la taille: ce sont les bactéroïde toujours entourés d'une membrane de séquestration. Chaque bactéroïde est maintenue séparément dans le cytoplasme des cellules de l'hôte (Oke & Long, 1999). Parallèlement à cette différenciation, les cellules racinaires de l'hôte augmentent considérablement de taille formant ainsi le tissu central du nodule qui est bien alimenté en sève et contiennent dans leur cytoplasme de la leghémoglobine (dérivant de légumineuse et hémoglobine) qui donne à la région centrale de la nodosité une coloration brunâtre à rougeâtre (Oke & Long, 1999).

Sénescence des nodosités: La sénescence des nodosités peut être rapidement induite par de nombreux stress et aussi une réponse à des signaux systématiques des feuilles ou à une régulation hormonale, résultant en une activité protéolytique accrue (Puppo *et al.*, 1991).

La structure, la forme et la taille des nodosités varient selon les partenaires de la symbiose. Les nodosités à croissance déterminée (exemple chez le haricot) diffèrent des nodosités à croissance indéterminée par des aspects morphologiques et physiologiques importants

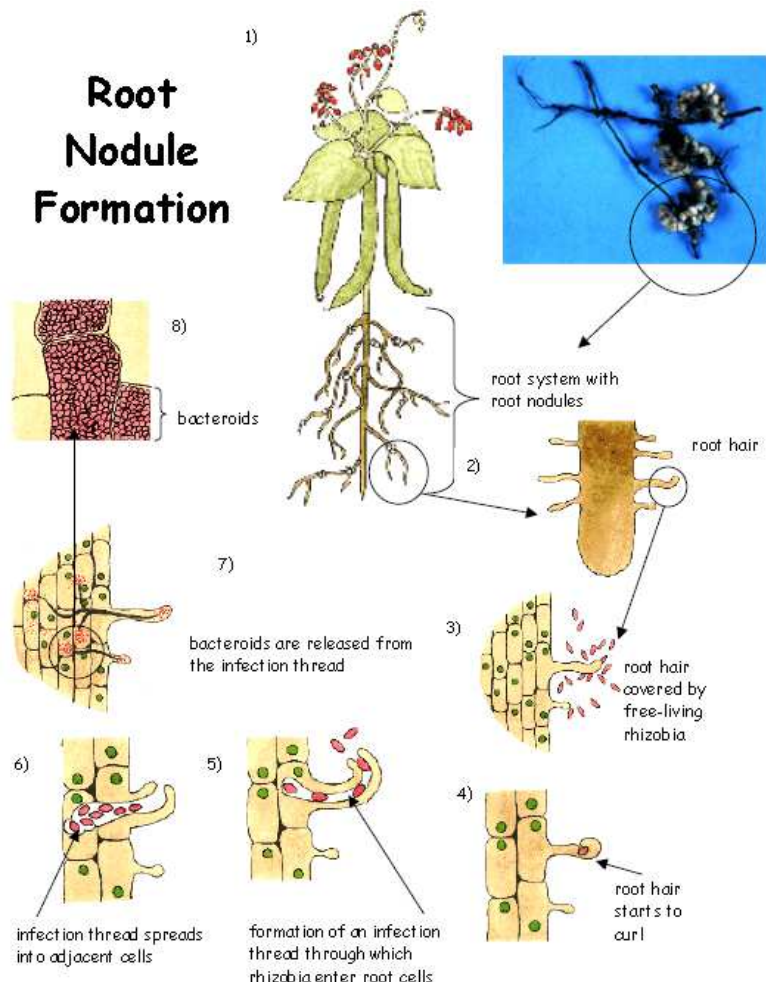


Figure 2. Processus de nodulation
 (Source : www.microbiologyonline.org.uk/forms/rhizobium)

La formation des nodosités chez une espèce donnée de légumineuse n'est possible qu'avec certaines souches de rhizobia. L'association des deux partenaires est spécifique. La spécificité des interactions entre la bactérie et la plante hôte intervient au cours des différentes étapes de la formation des nodosités, mais la reconnaissance spécifique semble intervenir à un stade précoce et des signaux moléculaires sont émis par les deux partenaires (Figure 3). Les premiers signaux sont des composés flavonoïdes exsudés par les racines de la plante afin d'activer les gènes bactériens responsables de la nodulation (Mulder *et al.*, 2005). Ces derniers codent pour des molécules dites facteurs "Nod" responsables de la déformation spécifique des poils racinaires et la formation des nodules (Cooper, 2007). Des études microscopiques ont montré qu'il existe aussi une spécificité dans l'attachement des rhizobia à la surface des poils absorbants des racines

(Denarié *et al.*, 1993). Plusieurs travaux suggèrent qu'une glycoprotéine d'hôte appelée "lectine" joue un rôle dans cette liaison spécifique (Bohlool & Schmidt, 1974).

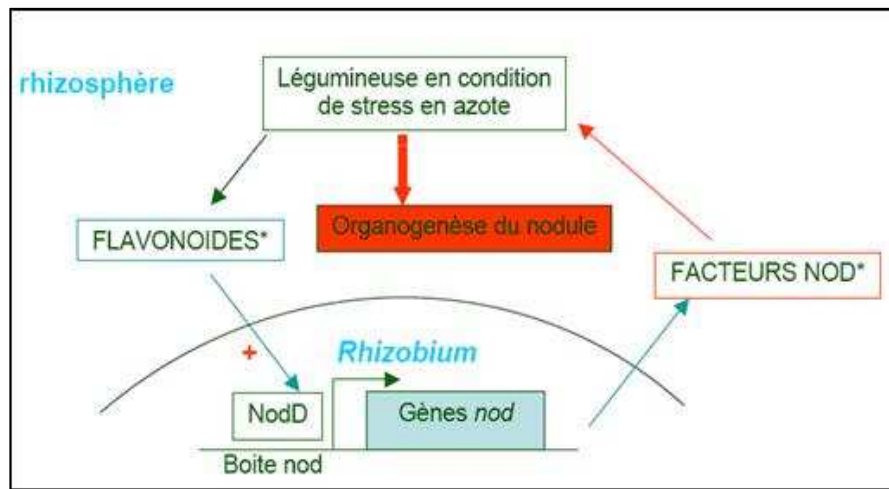
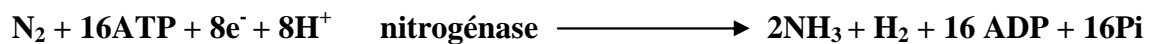


Figure 3. Communication moléculaire entre rhizobia et légumineuse (Gage, 2004).

La découverte de la fixation d'azote par la symbiose rhizobia-légumineuse remonte au 19^{ème} siècle. La localisation de cette activité dans les bactéroïdes n'a pu être établie que beaucoup plus récemment avec des microorganismes extraits de nodosités puis incubés en présence de N¹⁵ et de très faibles concentrations en oxygène (Bergersen, 1966). Le processus de la fixation symbiotique consiste en la réduction de l'azote atmosphérique sous forme ammoniacale selon la réaction suivante (Dommergues *et al.*, 1999).



La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique exige la présence de la nitrogénase, de l'énergie et un pouvoir réducteur. L'activité photosynthétique de la plante fournit l'énergie nécessaire aux processus enzymatiques pour la réduction de l'azote atmosphérique en ammonium. La nitrogénase est un complexe enzymatique constituant, d'une part, de la dinitrogénase (protéine I) appelée FeMoCo, qui est le site actif de la réduction de N₂ en NH₃. D'autre part, de la dinitrogénase réductase (protéine II), ferroprotéine qui assure le transfert des électrons nécessaires à la réduction de N₂ d'un donneur à la dinitrogénase.

1.2 Respiration et diffusion de l'oxygène

Il existe dans le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote chez les légumineuses un certain antagonisme entre les besoins importants en oxygène nécessaire aux chaînes respiratoires pour fournir l'ATP à la nitrogénase et la sensibilité de cette enzyme à l'oxygène qui inhibe son fonctionnement (Gérard, 1993). Dans l'étude de la réponse de l'activité réductrice d'acétylène (ARA), à la variation de la pression d'oxygène externe dans le compartiment racinaire (Drevon et al., 1987), il est apparu deux points importants :

* L'optimum de l'ARA est obtenu pour une pression d'oxygène de 35% donc supérieure à la pression atmosphérique (21%).

* A de très fortes pressions d'oxygène externe (45, 50 et 60% d'O₂), la nitrogénase n'est pas altérée, mais présente une activité se situant légèrement en dessous de l'optimum.

Ces deux résultats nous indiquent que la nitrogénase se trouve dans des conditions limitantes d'oxygène à la pression atmosphérique (Drevon et al., 1988) et qu'il doit exister un contrôle de la diffusion de l'oxygène à l'intérieur du nodule sans lequel l'enzyme de la fixation serait détruite aux fortes pressions d'oxygène.

On sait que la pression partielle de l'oxygène à l'intérieur des nodules est très faibles, de l'ordre de 1 Pa. Witty et al. (1986) en introduisant une microélectrode à oxygène à travers les tissus nodulaires, ont situé la zone de dépression de ce gaz dans le cortex interne, encore appelé parenchyme nodulaire. Ce tissu induit une résistance à la diffusion qui change d'intensité selon la pression d'oxygène externe. Le mécanisme du contrôle de cette résistance, pourrait être lié à la tutescence des cellules (Weisz et Sinclair, 1987)

2. Le phosphore

Les engrais phosphatés sont produits à partir de divers gisements de minéraux phosphatés dont notamment des dépôts d'origine sédimentaire marin (80%), des roches magmatiques (17%), ainsi que des dépôts sédimentaires résiduels et de guano (Zapata & Roy, 2004). L'utilisation mondiale des engrais phosphatés a augmenté de 900 millions de tonnes en 1913 jusqu'à 17000 millions de tonnes dans les années 1980 (Hart *et al.*,

2004). Ainsi, certains experts pensent que les ressources risquent de s'épuiser d'ici 60 à 80 années (Liu *et al.*, 2004). Ce problème est accentué par 2 phénomènes :

- d'une part, la faible efficacité des engrais qui n'excède souvent pas les 50%. En effet, quand un engrais phosphaté hydrosoluble est apporté au sol, il réagit rapidement avec les composants du sol. Les produits qui en résultent sont des composés phosphatés modérément solubles et du phosphore adsorbé sur les particules colloïdales du sol.
- d'autre part, l'augmentation de la population mondiale qui devrait atteindre 6 milliards d'habitants d'ici 2020 (Zapata & Roy, 2004), fait que la limite des terres agricoles est susceptible de se déplacer vers des terres marginales, avec des conditions environnementales difficiles, qui comprennent des sols fragiles ayant une capacité de production inférieure et un plus gros risque de dégradation (Zapata & Roy, 2004).

Pour ces deux raisons, il est indispensable de repenser l'agriculture en terme de durabilité.

Les engrais phosphatés peuvent être fabriqués selon deux procédés: on obtient soit du super-phosphate (18 à 25% de P_2O_5), soit du triple super phosphate (38 à 45% de P_2O_5). Ainsi, la fabrication d'une tonne de superphosphate nécessite 370 kg d'acide sulfurique à 100%, tandis que celle d'une tonne du triple super phosphate nécessite 350 kg d'acide phosphorique.

(http://.sfc.fr/Donnees/mine/eng/cadeng.htm#Engrais_phosphatés).

Les déchets de fabrication sont pour les deux procédés la production de gaz fluorés (HF), dont le pouvoir à effet de serre est beaucoup plus puissant que celui du CO_2 . En France, notamment pour les procédés d'incinération, leur rejet est limité à 1mg m^{-3} (Moyenne journalière). Le second processus produit également du phosphogypse, déchet qui n'est pas encore valorisé. D'autre part, les activités agricoles sont la plus importante source diffuse d'éléments nutritifs dans l'environnement. Ils sont apportés sous forme d'effluent d'élevage et d'engrais minéraux.

Dans ce contexte, la sélection de génotypes de plantes ayant un potentiel de rendement élevé, efficaces dans l'utilisation des éléments nutritifs et tolérantes aux stress abiotiques (sécheresse, acidité, salinité, gel, etc.) sera d'une importance stratégique. En effet, leur emploi permettrait de résoudre le problème lié aux réserves de

phosphore dans le monde qui vont en s'épuisant, de même qu'il limiterait les pollutions directes dues au processus de fabrication des engrais dans l'environnement. Ils occupent à l'heure actuelle, une place importante dans beaucoup de programmes internationaux de sélection.

2.1 Le phosphore dans la plante

Le phosphore (P) est un élément largement distribué dans la nature. Il est considéré, avec l'azote (N) et le potassium (K), comme un constituant fondamental de la vie des plantes et des animaux (Zapata & Roy, 2004). Les concentrations des tissus végétaux en phosphore varient entre 0.1 et 0.5%, soit près du dixième des teneurs en azote et en potassium (1 à 6%). A la différence du nitrate et du sulfate, le phosphate n'est pas réduit dans les plantes mais reste sous sa forme oxydée la plus élevée (Zapata & Roy, 2004).

Le P est un constituant essentiel des végétaux, dont la teneur moyenne en cet élément est de l'ordre de 0.5 à 1% de la matière sèche. Les grains, organes de réserve par excellence peuvent atteindre 5000 mg de P /kg de matière sèche (Fardeau & Morel., 2002). Le P s'accumule d'abord dans les jeunes tissus pour se concentrer ensuite dans les organes de reproduction et les graines. Dans ces dernières le P est stocké principalement sous forme de phytates et constitue environ 50% de P total dans les graines des légumineuses et 60% à 70% dans les grains des céréales. Il se trouve partiellement à l'état de phosphate minéral, mais surtout en combinaison organo-phosphatée complexée avec les lipides, les protides et glucides. Il entre dans la composition des phospholipides abondants dans les membranes cytoplasmiques et qui joue un rôle considérable dans le processus de pénétration des ions dans la cellule.

Pour la reproduction, le P est un constituant de l'ADN et de l'ARN et traduit les informations génétiques. En ce qui concerne le transfert de l'énergie, les ions phosphoriques, sont capables de recevoir l'énergie lumineuse captée par la chlorophylle et la transporter à travers la plante, pour la synthèse de l'ATP. Ainsi le couple ATP-ADP permet de stocker et de fournir l'énergie nécessaire à toutes les réactions chimiques. De ce fait, le P est un élément fondamental, qui intervient dans la majorité des grands cycles biochimiques (Fardeau & Morel, 2002). Le P participe également à de nombreuses réactions métaboliques de la plante, comme la respiration et la photosynthèse. Il intervient également dans toutes les autres réactions qui exigent de

l'énergie. Il entre également dans la composition des lipides structuraux de la membrane, des acides nucléiques qui composent en partie l'ADN, ainsi que dans les phosphoprotéines qui sont impliqués dans la photosynthèse (RUBP soit bi-phosphate Ribulose) ou encore la respiration (Glucose-6-Phosphate).

Le phosphore permet la formation correcte des graines (des quantités importantes de phosphore sont stockées dans les semences sous forme de phytine) et accélère leur maturation. En effet, le niveau de l'approvisionnement en phosphore pendant les étapes reproductrices règle la partition des photosynthétats (produits de la photosynthèse) entre les feuilles-sources et les organes reproducteurs (Zapata & Roy, 2004). De même il stimule la croissance des racines et améliore la fixation N_2 des légumineuses. Des plantes déficientes en phosphore montrent un retard de croissance. Cela se manifeste souvent par une couleur vert foncé (concentration plus élevée en chlorophylle) et une coloration rougeâtre (augmentation de la production d'anthocyanes) (Zapata & Roy, 2004). Il accroît également la résistance de la plante au froid et aux maladies.

2.2 Le phosphore dans le sol

Les minéraux phosphatés terrestres connus sont des ortho phosphates. Prés de 200 espèces minérales ont été recensées. Cependant la famille des apatites est la mieux représentée. Il s'agit de minéraux de formule type $3Ca_3(PO_4)_2CaX_2$. Les plus courants sont l'hydroxyle apatite ($X=OH$), la fluoroapatite ($X=F$) et la chloroapatite ($X=Cl$). Les principales réserves mondiales de phosphates, environ 5.7×10^9 tonnes de phosphore sont constituées de phosphorite. La roche phosphatée est essentiellement composée de fluoroapatite. Dans un environnement calcaire, l'apatite est un minéral très stable et se présente souvent dans la taille des sables, ce qui la rend aisément reconnaissable (Frossard *et al.*, 2004). C'est un minéral facile à synthétiser à basse température, en milieu alcalin. Dans les sols non carbonatés, à faible teneur en calcaire, de nombreux auteurs mettent en évidence une forte corrélation entre les teneurs en Fe ou en Al et les teneurs en P. Cette relation peut traduire l'adsorption du P sur des phases minérales plus ou moins bien cristallisées du Fe et de Al.

Le P dans le sol existe sous deux formes principales, organique et inorganique ou minérale, qui se répartissent selon deux phases: phase liquide (P en solution) et phase solide ou particulaire (P lié à la phase solide). Entre les ions de la solution du sol et les

ions maintenus à la surface des adsorbants, existent des échanges constants qui aboutissent à un état d'équilibre. Lorsqu'une cause extérieure vient rompre cet équilibre (apport d'engrais, prélèvement par les racines), les modifications de concentration dans l'une ou l'autre phase du système provoquent un transfert vers l'autre phase.

Le phosphore inorganique (Pi) est très peu soluble dans le sol du fait de l'existence de liaisons de forte énergie (Jaillard & Hinsinger, 1993). Sa concentration dans la solution du sol est souvent inférieure à $2-10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Hammond *et al.*, 2004). De plus, sa vitesse de diffusion est très lente (de l'ordre de $10^{-12}-10^{-15} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$) en comparaison à d'autres nutriments tels que le potassium (de l'ordre de $10^{-11}-10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$) ou le nitrate (de l'ordre de $10^{-10}-10^{-11} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$) (Ström *et al.*, 2001 ; Hinsinger, 2004). En conséquence, le phosphore est l'un des 6 macronutriments (N, P, K, Ca, Mg et S) les plus inaccessibles du sol. Plus de 90% du phosphore total est sous forme insoluble (Mengel & Kirkby, 2001).

Ceci est vrai aussi bien dans les sols calcaires où le phosphore est complexé par le carbonate de calcium Ca-P (Hinsinger, 1998 ; Ström *et al.*, 2005; Ligaba *et al.*, 2004) et de magnésium Mg-P (Ström *et al.*, 2005), que dans les sols acides où le phosphore est alors complexé par les hydroxydes de fer et d'aluminium (Hinsinger, 1998; Ligaba *et al.*, 2004). Ainsi, la zone d'épuisement du phosphore autour des racines se limite généralement à moins de 1 mm autour des racines. (Hinsinger, 1998, 2004). L'acide phosphorique étant un acide faible, le pH joue généralement un rôle prépondérant dans la dissolution des combinaisons phosphatées. Toutefois, dans les sols cultivés des régions tempérées, le pH est voisin de la neutralité ce qui fait que les phénomènes de dissolution sont relativement restreints (Jaillard & Hinsinger, 1993).

Quant au phosphore organique, il représente environ 50% du phosphore total sachant que cela peut varier de 15 à 80%. Généralement, cette fraction augmente avec l'incorporation de matière organique dans le sol.

La minéralisation et l'immobilisation des composés organiques phosphatés sont des processus qui font partie du cycle du phosphore dans les sols qui contiennent des quantités significatives de matière organique. Près de la moitié du phosphore organique dans le sol est sous forme d'acide phytique (phytine), un phosphate de sucre libéré par la décomposition des résidus de plantes par les microorganismes. Des acides de la matière organique mais ils sont rapidement dégradés.

Comme c'est le cas pour l'azote, la minéralisation et l'immobilisation du phosphore se produisent simultanément. La prépondérance d'un phénomène par rapport

à l'autre dépend de la proportion C/P du sol (ou plutôt du ratio C/N/P) selon les rapports suivants:

- Rapport C/P < 200 : minéralisation nette, d'où libération de phosphore organique,
- Rapport C/P = 200 à 300 : absence de gain et perte de phosphore inorganique disponible pour la plante,
- Rapport C/P > 300 : immobilisation nette

(http://www.iav.ac.ma/agro/dss/fertilite_4/3phosphore.htm).

2.3 Le prélèvement du phosphore par la plante

Le phosphore est absorbé principalement pendant la croissance végétative et, par la suite, la majeure partie de celui-ci est transférée dans les fruits et les graines pendant les étapes de reproduction (Zapata & Roy, 2004). Son absorption dans la solution du sol s'effectue sous la forme de l'anion orthophosphate monovalent (H_2PO_4^-) et divalent (HPO_4^{2-}). Pour un pH neutre, les deux formes sont équimolaires dans la solution du sol ($\text{pK}_a = 7.21$ à 25°C) (Hinsinger 2001).

Le P phytodisponible désigne la fraction du P du sol susceptible d'être prélevée par les végétaux. Ce transfert sol-plante est une des étapes clés qui conditionne la circulation du P au sein de l'écosystème cultivé. La nutrition des plantes en P suppose un mécanisme de prélèvement actif par la racine. Il y'a, par conséquent, un gradient de concentration en P dans la solution du sol, à proximité des racines. Ce gradient est le moteur d'une diffusion depuis les zones non rhizosphériques vers les racines qui constitue un flux diffusif de P pouvant assurer l'essentiel des besoins de la plante.

Le prélèvement des plantes doit être compensé par la libération de P dans la solution. Il y'a ainsi transfert depuis la phase solide vers la solution (Fardeau & Morel, 2002). Les mécanismes impliqués (dissolution, désorption) conditionnent la nutrition des végétaux. La rhizosphère est donc un lieu d'échanges importants entre le sol, la solution de sol, la racine et la microflore qui détermine une modification des équilibres ioniques et gazeux et une augmentation de la concentration en composés organiques (Lemanceau & Heulin, 1998).

Le transfert du P de la phase solide vers la solution dépend des mécanismes physiques, chimiques, et biologiques, développé par la racine (Guivarch, 2001 et Morel, 2002). Ainsi plusieurs mécanismes permettent l'absorption du P par les plantes:

L'interception racinaire désigne l'absorption des éléments nutritifs par la racine (et les mycorhizes) lors de sa croissance, sans qu'aucun déplacement d'ions ne soit mis en jeu. Dans le cas du P, cet apport n'excède pas 1 % des besoins de la plante (Barber, 1984) .

Le flux de masse ou « advection » c'est le flux lié à l'absorption d'eau par la plante qui compense ainsi l'évapotranspiration. Le flux d'advection du P ne représente également qu'une faible fraction du P assimilé par la plante (Fardeau & Morel, 2002).

La diffusion désigne le mouvement des ions dans la solution, engendré par un gradient de concentrations. Dans le cas du P, le prélèvement actif par les racines et, le cas échéant, les mycorhizes entretiennent ce gradient. Ainsi, la diffusion associée à la libération conjointe du P lié à la fraction solide du sol, assure l'essentiel des besoins de la plante.

Le phosphate entre dans la racine par la voie apoplastique (Rausch & Bucher, 2002, Smith, 2002) (Figure 4).

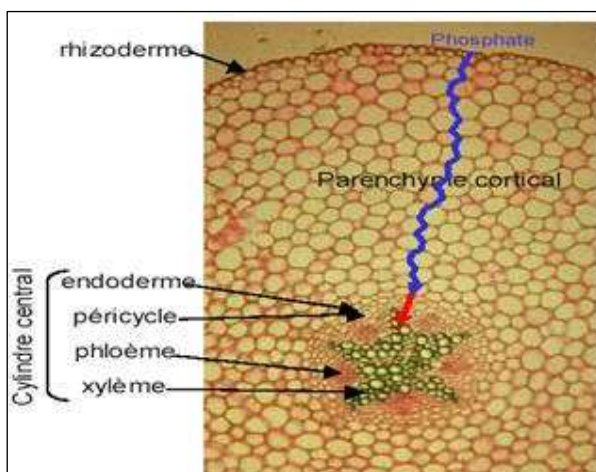


Figure 4. Visualisation du trajet du phosphate dans la coupe transversale d'une racine d'hellébore. Le trajet apoplastique est représenté en bleu et la voie symplastique en rouge (Hubert, 2001).

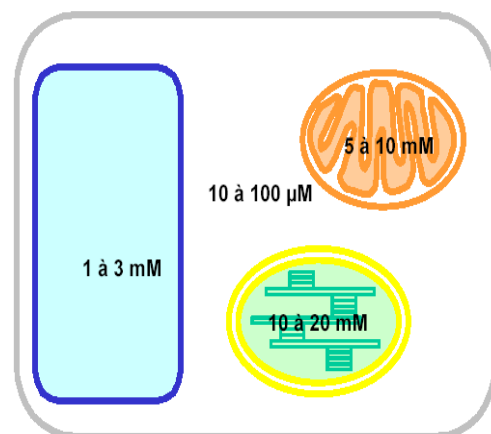


Figure 5. Concentration en phosphate des principaux compartiments de la cellule végétale d'après (Hubert, 2001).

La teneur en phosphate dans les organites cellulaires (Figure 5) varie et est régulée

en fonction du milieu extracellulaire et des besoins physiologiques de la cellule. En effet le cytosol est le compartiment dont la concentration en phosphate est la mieux régulée: elle est de l'ordre de $10 \mu\text{M}$ (Jouhet *et al.*, 2003). La concentration cytosolique est essentiellement contrôlée par les échanges avec le milieu extracellulaire et avec la

vacuole: l'efflux de phosphate est régulé en fonction de la quantité présente dans le milieu externe (Ragothama, 1999). La vacuole est le principal réservoir de phosphate de la cellule (85 à 95% du phosphate libre) (Raush & Bucher, 2002). La vacuole est d'ailleurs le premier compartiment à se vider en phosphate lors de la carence en phosphate.

2.4. La déficience du sol en P et les stratégies du prélèvement par la plante

Le phosphore étant très peu disponible dans le sol, les plantes ont développé plusieurs stratégies pour le rendre biodisponible:

1. elles peuvent stocker le phosphore dans les racines lors des périodes d'abondance pour ensuite le redistribuer dans les parties aériennes lors des périodes de déficience,
2. elles augmentent leur taux d'endomycorhization,
3. elles développent leur biomasse racinaire, certaines même produisent des racines spéciales appelées protéoïdes,
4. elles peuvent excréter d'avantage d'acides organiques et d'enzymes,
5. elles acidifient le milieu par excrétion de protons H^+ (Li *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004 Ström *et al.*, 2005).

Le phénomène d'acidification a notamment été identifié dans le cas du maïs (*Zea mays* L.) (Hinsinger *et al.*, 2003) du lupin blanc (*Lupinus albus*) (Shen *et al.*, 2004). Il est particulièrement important chez les légumineuses (Alkama *et al.*, 2009; Kouas *et al.*, 2009). Ainsi, le pH dans la rhizosphère peut s'avérer être différent du sol non rhizosphérique, pouvant atteindre une différence de une ou deux unités de pH (Hinsinger *et al.*, 2003). Cette stratégie s'avère très intéressante dans les sols calcaires. Dans le cas des sols acides, elle peut être nuisible dans la mesure où une acidification trop importante conduit à intensifier la solubilité des ions phyto-toxiques tels que l'aluminium (Hinsinger, 1998). Dans ce cas, le phosphore est rendu biodisponible par échange d'ions OH^- et de HCO_3^- sur les oxy-hydroxydes de fer et d'alumine (Marschner, 1995; Hinsinger, 1998). D'autre part, le phénomène d'acidification peut être également dû à la libération des acides organiques dans le sol. Dans les deux parties à venir, nous traiterons plus particulièrement de ces deux phénomènes.

Une variation du pH des sols provoque la libération du phosphore par la solubilisation des minéraux qui complexent le phosphore (Mengel & Kirkby, 2001). L'acidification ou l'alcalinisation du sol par les plantes est directement liée aux taux de

prélèvement de cations-anions. Le principe est simple : quand d'avantage de cations sont prélevés, des H^+ sont exsudés par les racines afin de compenser l'excès de charges positives prélevées. Il y'a donc alcalinisation de la cellule. Ce processus entraîne par voie de conséquence une acidification de la rhizosphère. A l'inverse, quand ce sont les anions qui sont majoritairement prélevés, on observe une alcalinisation de la rhizosphère via la libération de OH^- ou de HCO_3^- (Hinsinger, 2001; Hinsinger *et al.*, 2003).

L'azote joue un rôle clef dans cet équilibre puisqu'il s'agit du nutriment le plus prélevé (près de 70% sur la totalité des cations-anions prélevés) par la plupart des espèces végétales (Marschner, 1995). Ainsi, un apport d'azote sous forme de nitrate (NO_3^-) entraînera à une alcalinisation de la rhizosphère. A l'inverse, un apport sous la forme d'ammonium (NH_4^+), entraîne une acidification. Cette acidification sera d'autant plus forte que les principaux éléments minéraux absorbés par la plante autre que l'azote se trouvent sous forme cationique (K^+ , Ca^{2+}) (Jaillard & Hinsinger, 1993).

En réponse à une déficience en phosphore, une acidification peut être la conséquence d'une baisse dans les prélèvement de l'ion nitrate en faveur d'une augmentation du prélèvement des cations (Tang *et al.*, 2004). C'est le cas notamment pour le lupin blanc (*Lupinus albus* L.) (Kania *et al.*, 2002). Ces auteurs expliquent que cette diminution peut être associée à une baisse de l'activité de l'enzyme nitrate réductase et par conséquent une accumulation des nitrates dans les tissus racinaires. Ce phénomène induit en retour une inhibition du prélèvement en ion NO_3^- . D'ailleurs, d'après Shen *et al.* (2005), le prélèvement des anions demande d'avantage d'énergie à la plante que le prélèvement des cations. Or, sachant qu'une déficience en phosphore perturbe le métabolisme énergétique, cela pourrait induire indirectement une diminution dans le prélèvement des anions. Ce phénomène a déjà été observé dans le cas d'une toxicité en aluminium (Hinsinger *et al.*, 2003). Plusieurs expériences tendent à confirmer ces phénomènes. Ainsi, Tang *et al.* (2004), rapportent que chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), on observe sous nutrition azotée NO_3^- et sous déficience en phosphore, une alcalinisation moindre que celle observée sur les témoins avec phosphore suffisant. De même, Hinsinger (1998) observe que sous nutrition azotée ammoniacale (NH_4^+), les plantes sont plus efficaces dans la mobilisation du phosphore, que sous nutrition azotée nitrique (NO_3^-).

L'autre phénomène d'acidification est le flux d'anions organiques. En cas de déficience en phosphore ou en fer, l'exsorption des acides organiques augmente (Bhattacharyya, 2003; Hinsinger *et al.*, 2003; Ström *et al.*, 2005). Shen *et al.* (2005) ont démontré chez le lupin blanc (*Lupinus albus*), qu'en cas de déficience en phosphore, la plante développe des racines protéoïdes à partir desquelles elle exsude des acides organiques et en particulier des citrates. Le même phénomène est observé chez le *Lupinus pilosus*, l'alfafa, le colza (Ligaba *et al.*, 2004). Les acides organiques agissent dans le sol en tant que ligands qui entrent en compétition avec l'anion phosphate. Ils provoquent ainsi la libération du phosphore par désorption du phosphore des minéraux (Parent & Khiari, 2005). Ainsi, certains acides organiques sont tous aussi aptes à libérer le phosphore des oxydes d'alumine ou de fer que des complexes calciques (Kania *et al.*, 2002). Jones (1998) rapporte que le malate et le citrate sont principalement exsudés en cas de déficience en phosphore. Il est d'ailleurs intéressant de noter que ces deux acides organiques ne précipitent pas l'ion Ca^{2+} (Jones, 1998). Pour des raisons de neutralité électrique, les anions organiques sont exsudés avec un ou plusieurs cations. Après avoir suggéré dans le premier temps que ce cation soit H^+ (Marschner, 1995), il est avéré que les mécanismes de libération des acides organiques et des H^+ étaient séparés biochimiquement (Libaga *et al.*, 2004 ; Ström *et al.*, 2005). Les H^+ sont en effet libérés par la pompe H^+ -ATPase. Pour de nombreuses espèces, l'ion accompagnement n'a pas encore été identifié. Toutefois, dans le cas du citrate, Kania *et al.* (2002) ont démontré que sa libération s'accompagne d'une hausse de l'activité de la pompe ATPase. Il n'est pas forcément évident que les acides organiques soit à l'origine d'une modification du pH de la rhizosphère (Ström *et al.*, 2005).

3. La déficience des sols en P et conséquences sur la symbiose légumineuse-rhizobia

La déficience en P peut avoir deux causes, la première est la faible teneur en P total de certains sols pauvres, en matière organique ou très lessivés, la deuxième peut être la complexation du P avec les cations Ca, Al ou Fe, sous forme d'oxydes ou hydroxydes insolubles indisponibles pour les plantes, comme dans des sols acides riches en Al et en Fe libres (Raghothama & Karthikeyan, 2005) et qui se retrouvent en quantités importantes dans les sols, 0.2 à 0.7 % soit plusieurs tonnes par hectares (Giroux & Enright, 2002). Ou des sols alcalins riches en calcaires en s'immobilisant avec le Ca. Ce qui

peut contribuer en cas de carence à élargir la pauvreté des sols cultivés. La déficience en P induirait des modifications morphologique, métabolique et physiologique (Figure 6).

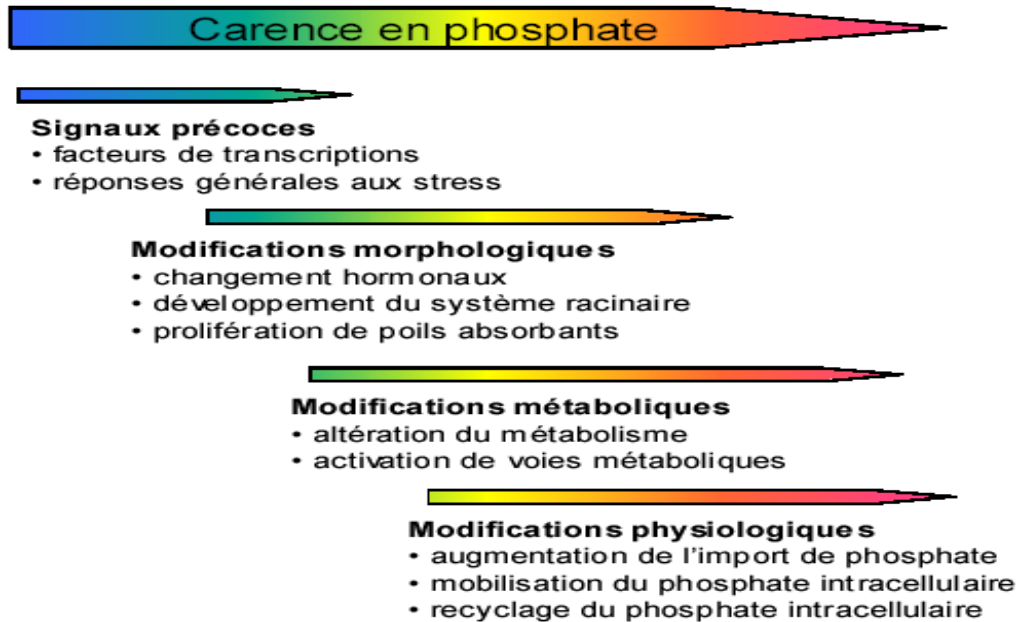


Figure 6. Chronologie hypothétique des gènes impliqués dans la carence de phosphate. Ce déroulement a été ordonné selon une échelle arbitraire de carence de phosphate allant d'une carence courte à longue (Hammond *et al.*, 2004).

3.1. Modifications morphologiques

Le phosphate est considéré comme un facteur limitant de la division cellulaire. En général et en conditions de carence en phosphate, l'architecture racinaire est modifiée pour augmenter la surface d'échange et explorer le sol au-delà de la zone d'épuisement présente autour des racines (développement de racines secondaires latérales et augmentation du nombre et de la taille des poils absorbants) (Hammond *et al.*, 2004). La plante s'adapte aussi à une distribution hétérogène du phosphate dans un sol. Les racines latérales se développent fortement dans les zones les plus riches en phosphate alors que leur croissance est inhibée dans les zones les plus pauvres. En parallèle au développement du système racinaire, la croissance générale de la plante est ralentie.

3.2. Influence sur le système racinaire et aérien

Des travaux montrent que la déficience en Pi affecte les paramètres de croissance chez les plantes de *Phaseolus vulgaris*. En effet, en cas de carence en P la croissance racinaire est beaucoup moins inhibée entraînant ainsi, en terme de matière sèche, une diminution du rapport parties aériennes /racinaire (Bernal *et al.*, 2005). Ainsi, chez *Phaseolus vulgaris*, ce rapport s'abaisse de 5.0 pour des plantes suffisantes en P à 1.9 en cas de déficience. Ce dernier auteur a montré après trois semaines de privation des plantes du haricot en P, que cet élément est réduit de 42% et 67% respectivement dans la partie aérienne et la partie racinaire de *Phaseolus vulgaris*. Ainsi, la privation prolongée en P des racines de *Phaseolus vulgaris* induit la formation de radicaux libres (Malusà *et al.*, 2002) et la modification de la composition de la membrane cytoplasmique en phospholipides. Ces résultats sont en accord avec ceux de Tang *et al.* (2001) qui ont trouvé que chez des plantes âgées de 42 jours, la croissance aérienne et racinaire des plantes recevant 5 μM de P (cas de déficience) étaient respectivement de 55 et 62 % alors qu'en présence 25 μM en P (cas de suffisance) elle est respectivement de l'ordre de 82 et 88 %.

3.3. Influence sur les nodosités

Une des spécificités des légumineuses fixatrices d'azote est l'importance particulière que revêt la nutrition phosphatée, surtout que le P est le deuxième élément limitant la croissance végétale (Vance *et al.*, 2000). Ainsi les nodosités constituent des puits importants pour le P (Tang *et al.*, 2001) en lien avec le coût énergétique élevé de la fixation symbiotique de l'azote. En effet, il est bien établi que la biomasse nodulaire est fortement corrélée à la disponibilité en P de la plante. La carence en P diminue le nombre de nodosités par plante et/ou la masse individuelle des nodosités (Kouas *et al.*, 2005 ; Alkama *et al.*, 2008), ainsi que la masse des bactéroïdes chez le soja (Sa & Israël, 1991).

Dans le cas des légumineuses, les plantes symbiotiques exigent plus de P que les non symbiotiques, car environ 20% du P total de la plante est assigné aux nodules (Gunawardena *et al.*, 1992). Par rapport aux autres organes végétaux, la concentration en P dans les nodules reste supérieure et moins affectée par la déficience en P (Tableau 1).

Cependant, la biomasse nodulaire est fortement corrélée à la disponibilité en P pour les

plantes (Hellsten & Huss-Danell, 2001), elle est fortement réduite sous sa déficience (Gunawardena *et al.*, 1992), notamment au niveau de la taille des nodules (Ribet & Drevon, 1995 ; Tang *et al.*, 2001). Schulze & Drevon (2005), ont rapporté que l'adaptation des plantes de luzerne vis-à-vis d'une carence en P se traduit par des nodules de volume réduit alors que leur nombre reste constant. Dans un autre sens, Valverde *et al.* (2002) suggèrent que les réserves de la graine en P constituent un mécanisme adaptatif qui garantit l'infection rhizobienne et la formation nodulaire mais une moindre survie des rhizobia en sols carencés en P pourrait diminuer la probabilité de l'infection.

Israël (1987) & Vadez *et al.* (1995) suggèrent qu'il est possible que la forte teneur en P des nodosités soit liée à une forte proportion de P structural. En effet, la quantité des membranes est 20 fois plus forte dans les cellules infectées que dans des cellules non infectées en raison de la prolifération exceptionnelle de membranes bactériennes, péricellulaires, ainsi que mitochondriales (Bergersen, 1995). La carence en P pourrait affecter la synthèse de la phosphatidyl-choline qui est chez *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* (Miller *et al.*, 1990), l'un des principaux phospholipides membranaires des membranes péricellulaires.

Tableau 1. Influence de la concentration en P sur quelques paramètres nodulaires et la fixation de l'azote chez *Phaseolus vulgaris* (Graham & Vance, 2003).

Paramètres mesurés (ppm)	P additionné dans la solution nutritive		
	1	4	16
Poids sec nodulaire (mg/plant)	70	212	354
P nodulaire (%)	0.21	0.20	0.29
P de plant trouvé dans les nodules (%)	9.0	10.9	9.7
N totale du plant (mg)	45	108	126
Réduction d'acétylène ($\mu\text{M}/\text{plant h}^{-1}$)	4.3	12.4	34.0
Activité spécifique nodulaire ($\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ nodule h}^{-1}$)	0.061	0.058	0.069
Fixation par unité de P ($\mu\text{M C}_2\text{H}_4 \text{ mg P nodule h}^{-1}$)	28.5	26.9	33.7

3.4. La fixation symbiotique de l'azote et la carence en phosphore.

La disponibilité du P dans le sol et surtout sa mobilisation par la plante ont un effet direct sur leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (Hirsch *et al.*, 2001). Ainsi, sous déficit en P, *Phaseolus vulgaris* a une faible capacité de nodulation et donc une faible fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (Graham, 1981). Unkovich et Pate (2000) suggéraient que les taux de fixation de l'azote atmosphérique N₂ par la symbiose haricot-rhizobia peuvent atteindre 150 kg N₂ ha⁻¹, avec une accumulation moyenne de 55 kg N₂ ha⁻¹ dans la partie aérienne. Chez le haricot le rapport de cette fixation (pousses aériennes / racines) est de 2.8, soit l'équivalent à une fixation totale moyenne N₂ de 85 kg ha⁻¹.

Robson (1983) a suggéré que la carence en P limiterait la fixation de N₂ indirectement, via la croissance de la plante hôte, car chez la plupart des légumineuses nodulées, la teneur en P total de la partie aérienne est fortement corrélée à la disponibilité en P. Chez le pois carencé, Jakobsen (1985) a observé une augmentation de la teneur en P total de la partie aérienne dès le 1er jour d'un apport supplémentaire de P alors qu'il faut attendre le 3^{ème} jour pour que la biomasse, la teneur en P et l'activité de réductrice d'acétylène des nodosités soient augmentées. Mais chez le soja carencé, un apport supplémentaire de P se traduit par un rétablissement synchrone, en deux jours, de la teneur optimale en P dans les feuilles et les nodosités, tandis que l'augmentation de la vitesse de croissance n'est mesurable que deux semaines plus tard (Sas & Israël, 1991; Israël, 1993). Ces auteurs ont conclu que l'augmentation de la production des photosynthétats précède ou coïncide avec la stimulation de la fixation de N₂. En plus de la déficience en P, la perméabilité nodulaire vis-à-vis de l'oxygène peut être impliquée dans la régulation de la fixation de l'azote atmosphérique (Hunt & Layzell, 1993)

Pereira et Bliss (1989) suggèrent qu'il est possible d'améliorer en même temps la fixation de N₂ et l'efficacité d'utilisation du P, ainsi des lignés du haricot, se sont révélées actives pour la fixation de N₂ même sous des faibles concentrations en P. En effet, plusieurs travaux indiquent que l'application de P augmente le contenu de l'azote dans les graines de légumineuses, comme la luzerne et le soja (Drevon & Hartwing, 1996). Dans le même sens Olivera *et al.* (2004) ont trouvé que 1.5 mM en P est la concentration optimale pour le développement et la croissance de la symbiose *P. vulgaris* - *R. tropici*. Ainsi, l'activité spécifique nitrégénase varie selon les traitements en P,

elle augmente de 10 à 20 fois dans les nodules des plantes cultivées respectivement avec 1.5 mM et 2 mM de P en comparaison avec celle des plantes cultivées sans P.

4. Le Haricot

4.1 Origine du haricot

Il est généralement admis que le progéniteur de l'espèce *vulgaris* (haricot commun) serait une forme de *Phaseolus aboriginus*, liane tropicale autogame, à gousse déhiscente et petite graine non dormante. Le mot haricot désigne, à la fois, le fruit, la graine et la plante qui les produit. Il dérive de ayacolt, nom de ce légume en Nahuatal, langue parlée par les aztèques (Anonyme, 1999). Selon Gepts (1991) la domestication aurait pu s'effectuer à partir d'une seule population sauvage, à l'intérieur d'un même centre d'origine. Le haricot a été domestiqué au Pérou et au Mexique il y'a déjà 8 à 10000 ans (Yves & Claude, 1999) (Tableau 2). Aujourd'hui, la culture du haricot est largement répandue sur l'ensemble du globe, et occupe une place importante dans l'activité agricole et dans l'alimentation humaine. Actuellement, il existe 200 espèces de forme, de couleur, de saveur et de composition biochimique différente à travers le monde, mais les plus utilisées sont : le *Phaseolus coccineus* (haricot d'Espagne), le *Phaseolus lutanus* (haricot de lima), le *Phaseolus acutifolius* (Tepary bean) et enfin le *Phaseolus vulgaris* qui est l'haricot commun (Blair, 2009).

Plusieurs études ont porté sur la caractérisation des haricots afin de les assembler en groupes et distinguer les zones de leur culture et de leur développement dans le but de faciliter leurs études: Sur le plan morphologique Laumonier, (1979), a pu répartir les haricots en fonction de leur taille en nain et à rame, puis selon la présence ou pas de tissus parcheminés tapissant l'intérieur des gousses. Le tableau 1 donne les groupes de haricot en fonction de leur taille et des exemples de quelques espèces cultivées dans le monde.

Tableau 2. Répartition des groupes d'haricots selon leur taille en plusieurs espèces. Laumonier, (1979)

<i>Groupes</i>	<i>Variétés</i>
A rame sans parchemin (mange tout)	A cosse violette, Blanc de juillet, Beure or du Rhin, Esméralda, Saint-Fiacre, Œil de pérderie.
A rame avec parchemin (à écosser)	Soisson blanc, Soisson vert, Crochu de Montmagny, Michelet à longue cosse à rame.
Nain sans parchemin (mange tout)	Contender, Espada, Coco de Prade, Roi des Beurres, Coco rose d'Eyrague.
Nain à parchemin (filet).	Triomphe de Farcy, Obélisque, Morgane, Saint-Esprit rouge, Fin de bagnols.
Nain à parchemin (à écosser).	Rognon de coq, Flageolet chevrier, Coco blanc précoce, Lingot, Ariel, Michelet à langue cosse.

Les études morphologiques et biochimiques des phaséolines, qui constituent l'essentiel des protéines de réserve de la graine, confirment l'existence de trois (3) pools génétiques principaux (Figure 7 & tableau 3):

- Un pool andain, caractérisé par les phaséolines T et de grosses graines, s'étendant depuis l'Argentine jusqu'à l'Equateur.
- Un pool méso-américain, caractérisé par les phaséolines S et de petites graines couvrant l'ensemble de l'Amérique centrale depuis le Panama jusqu'au nord du Mexique.
- Un pool intermédiaire, entre les deux autres, situé en Colombie et jusqu'à récemment assimilé au pool andain.

Ces mêmes études permettent ainsi d'étudier l'origine des haricots, que l'on trouve maintenant, disséminés dans les zones sud américaines plus basses comme le Brésil ou en dehors du continent américain comme l'Europe et l'Afrique. Dans le premier cas, le haricot serait originaire du pool méso-américain et aurait pu cheminer par le Venezuela. Les haricots cultivés en Afrique seraient d'origine andine, ayant cheminé directement ou indirectement via l'Europe au cours de la période coloniale (Vadez, 1996).

La variabilité génétique chez le haricot a donné naissance à plus de 100 espèces de haricots de forme, de couleur, de saveur et de valeur nutritive diverses (Laumonier, 1979; Anonyme, 1999).

Tableau 3. Répartition des groupes de haricots selon leur composition biochimique. Vadez, (1996)

<i>Groupes</i>	<i>Type de phaseoline</i>	<i>Répartition des groupes dans le continent américain</i>
Pool andain	Phaseoline de type : T	De l'Argentine jusqu'à l'équateur.
Pool méso-américain	Phaseoline de type : S	Du Panama jusqu'au nord du Mexique.
Pool intermédiaire	Phaseolines de type: T et S	Situé en Colombie.

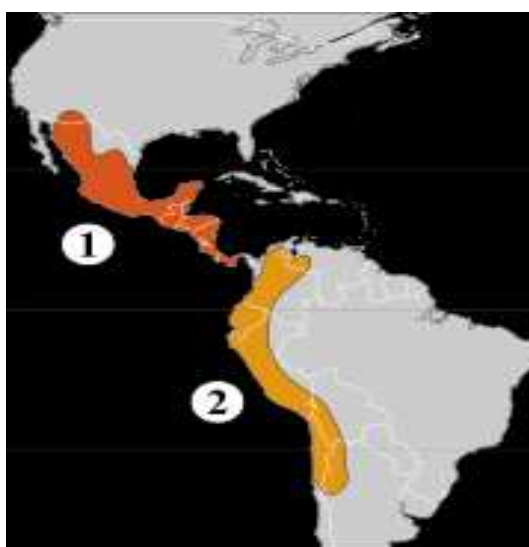


Figure 7. Aire de domestication du haricot commun (<http://fr.wikipedia.org/wiki/Haricot>)
1 - centre mésoaméricain 2 - centre andin

4.2. Classification

Selon l'APG (2003) on attribue à l'haricot la classification suivante:

Classification classique

Règne : *Plantae.*

Sous règne : *Tracheobionta.*

Division : *Magnoliophyta.*

Classe : *Magnoliopsida.*

Sous classe : *Rosidae.*

Ordre : *Fabale.*

Famille : *Fabaceae.*

Genre : *Phaseolus.*

Espèce : *Phaseolus vulgaris.*

Classification phylognétique

Clade : *Angiospermes.*

Clade : *Dicotylédones vraies.*

Clade : *Rosdées.*

Clade : *Fabidées.*

Ordre : *Fabale.*

Famille : *Fabaceae.*

Genre : *Phaseolus.*

Espèce : *Phaseolus vulgaris.*

Le nombre chromosomique du haricot commun (*Phaseolea vulgaris*. L) est de $2n = 22$ (à une exception près). Le genre *Phaseolus* renferme 55 espèces (Debouck, 1991)

On sépare les variétés de haricot en 4 groupes selon leur habitus de croissance, qui dépend de la caractéristique du bourgeon terminal : (i) le type I, ou habitus I, est un type déterminé, sa croissance est buissonnante avec une ramification importante; (ii) les types II et III sont eux aussi à port buissonnant mais sa croissance est déterminée. On trouve chez le type buissonnant une majorité de génotypes à maturation précoce avec de grosses graines, (iii) le type IV est à croissance indéterminée mais son port est grimpant ne présentant aucune ramification. C'est la forme de croissance la plus proche du phénotype sauvage.

4.3 Importance de la culture du haricot

La culture du haricot présente un double intérêt pour ses fruits dans la consommation humaine: (i) Les gousses ou grains sont consommés à l'état frais; (ii) Les graines à l'état sec, alors que les résidus de cultures (tiges, gousses) sont destinés à l'alimentation des animaux (Anonyme, 1993). Compte tenu de leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, les légumineuses produisent des protéines en abondance (leurs grains contiennent 3 fois plus de protéines que ceux des céréales), sans fertilisation azotée (Domergue, 2006). Cependant les graines du haricot sont dites incomplètes, car elles sont déficientes en certains acides aminés (Anonyme, 1999) et elles constituent un complément pour ceux des graines de céréales (Quinn, 1999). De part leur composition, les protéines des graines du haricot sont très proches de celles de la viande de mouton (Kentour, 1999). Ainsi, dans de nombreuses régions pauvres de la planète, ces espèces adaptées constituent une importante source de nourriture humaine (pois chiche, haricot, pois, lentilles, arachide...). Elles représentent un substitut pour les populations qui accusent d'importants déficits en protéines animales (Domergue, 2006). En effet selon Benatmane (2000) l'algérien n'en consomme que 12 à 15 g/j, alors que les normes établies par la FAO sont de 33 g/habitant/j. En plus de leurs hautes qualités gustatives, les gousses et les graines du haricot sont une excellente source d'acides aminés, de vitamines et une bonne source d'éléments minéraux. Le haricot présente des teneurs qui varient suivant le type et l'état de sa consommation comme on peut le constater dans le tableau 4.

Tableau 4. La composition des grains et des gousses du haricot selon son type et sa consommation (Anonyme, 1999).

	<i>L'élément</i>	<i>Haricot dolique</i>	<i>Haricot sec</i>	<i>Haricot frais</i>	
				<i>Crus</i>	<i>Cuit</i>
Acides aminés	Acide folique	+	+	+	+
	Thiamine	+	+	+	-
Vitamines	Niacine	+	+	+	-
	Pantothénique	+	-	-	-
	B6	+	+	-	-
	A	-	-	+	+
Eléments minéraux	C	-	-	+	+
	K	+	+	-	+
	Mg	+	+	+	+
	Fe	+	+	+	+
	P	+	+	+	-
	Zn	+	+	-	-
	Cu	+	+	+	+
	Ca	-	-	+	-

- Le signe +: signifie que l'élément considéré est présent dans la composition.
- Le signe -: signifie absence de l'élément dans la composition.

Les graines du haricot, apportent en outre, de l'énergie (341 à 342 calories), des glucides et des acides gras insaturés qui favorisent le bon fonctionnement du système cardiovasculaire. On dit que le haricot frais est diurétique, dépuratif et anti-infectieux (Anonyme, 1999).

Tableau 5. Valeur nutritive du haricot vert et du niébé en (g/100g) de graine entière (Stantan, 1970)

<i>Nom botanique</i>	<i>Calorie (kcal)</i>	<i>Hydrates de carbone</i>	<i>Eau (g)</i>	<i>Protéines</i>	<i>Matières grasses</i>	<i>Fibres</i>	<i>Glucides</i>
<i>Vigna unguiculata</i>	342	60.3	11	23.4	1.8	4.3	60-65
(L).wap							
<i>Phaseolus vulgaris</i> L	341	61.4	11	22.1	1.7	4.2	60-65

Sur le plan agronomique et en tant que légumineuse, le haricot peut s'intégrer dans des systèmes de production biologique qui utilisent la bio-fertilisation. Dans ces systèmes, le haricot, parmi d'autres légumineuses, est utilisé dans des rotations culturales ou associé à d'autres cultures dans le but de limiter les effets défavorables pour l'environnement (Canado et al., 2003). Le haricot en tant que légumineuse:

➤ Possède le système de fixation azotée le plus performant, du fait qu'il associe cette fixation à la photosynthèse (Pochon, 1981). La symbiose entre le rhizobia et la légumineuse est responsable de près de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (120 millions de tonnes d'azote qui est le double de l'apport des bactéries libres) (Davet, 1996).

➤ Favorise le développement des mycorhizes qui améliorent la nutrition phosphatée des plantes lors d'une carence en P, et augmente le degré d'infection des autres plantes par ces microorganismes (Smith & Read, 2008). Au delà d'une amélioration de la nutrition phosphatée des cultures, les mycorhizes semblent jouer d'autres rôles dans les agro systèmes: blocage des métaux au niveau des hyphes dans les sols pollués, amélioration de la nutrition en micro éléments et en N des cultures, de la résistance de la plante au stress hydrique et aux maladies, et de la stabilité structurale des sols (Smith & Read, 2008).

➤ Constitue un bon précédent cultural dans la rotation, comme elle peut bien s'installer après les solanacées, les cucurbitacées et les brassicacées et elle donne un meilleur rendement si elle est cultivée après l'orge, le blé ou le maïs (Wortmann *et al.*, 1994 ; Fageria, 2004).

➤ Apporte des masses importantes de résidus fermentescibles pouvant activer la vie microbienne du sol (Abdenour, 1982). Des associations symbiotiques fixatrices d'azote établies entre des bactéries du sol (rhizobia) et des légumineuses ont été utilisées pour la restauration d'écosystèmes dégradés dans le sud de l'Espagne (Requena *et al.*, 2001) et au Portugal (Werner *et al.*, 2000).

➤ Offre une rupture efficace dans le cycle des maladies et des ravageurs des céréales à pailles. Le haricot joue également le rôle de plante piège en diminuant le taux d'infestation sur la céréale, comme dans le cas de *Strigula hermonthica* qui est une plante parasite qui attaque le sorgho et non le haricot (Hall, 2001).

Sur le plan économique, la production mondiale de haricots, selon les statistiques publiées par la FAO en 2007, s'est élevée à 28.6 millions de tonnes, dont 19.6 de haricots secs (68 %), 6.4 de haricots frais (22 %) et 2.6 de haricots verts (9 %) (**Figure 8**). En 2002, ces chiffres étaient respectivement de 25.7, 18.3, 5,7 et 1.7 millions de tonnes. Entre 1961 et 2006, la production totale de haricots a doublé passant de 14.4 à 28.6 millions de tonnes, progressant assez régulièrement au taux de 1.5 % par an.

Pour les haricots secs, la production mondiale est estimée à 19.6 millions de tonnes en 2006 (FAOSTAT, 2007) (Figure 9). La surface totale consacrée à cette production représentait un peu plus de 26 millions d'hectares pour un rendement moyen de 7.4 quintaux par hectare. Les quinze premiers pays représentent plus de 80 % du total mondial (FAOSTAT, 2007). Les trois premiers, Brésil, Inde, et Chine représentent 44 % du total et les six premiers (les précédents plus Maynmar, Mexique et Etats –Unis) près des deux-tiers (Tableau 6).

En France (2006), la culture du haricot occupe environ 41 000 hectares pour une production de 413 000 tonnes, soit en moyenne 10 t/ha, due principalement aux haricots verts qui représentent les 3/4 des surfaces et 86 % de la production (FAOSTAT, 2007).

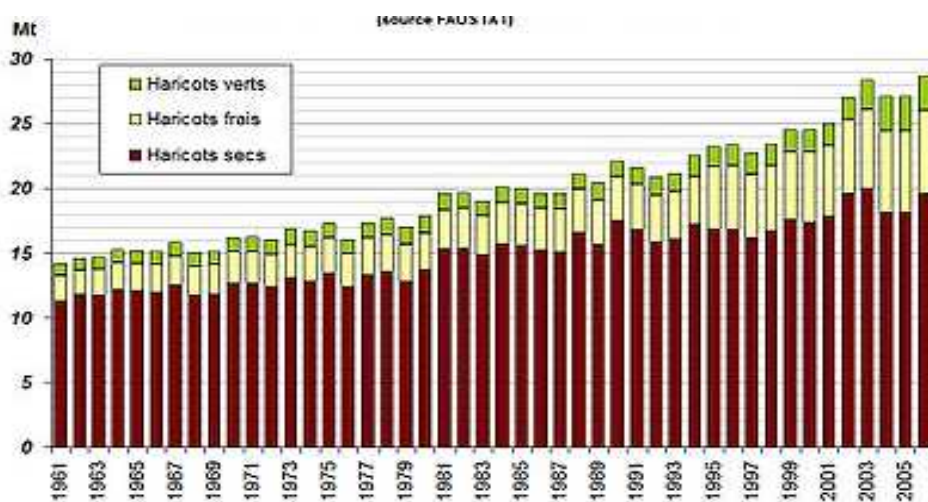


Figure 8. Production mondiale du haricots 1961-2006 (FAOSTAT)

Le haricot est cultivé largement en Amérique latine et centrale. Le Mexique et le Brésil étant les principaux producteurs et/ou la consommation moyenne par habitant est de 13.3 Kg/an. En Afrique, la production est moindre, sauf en Afrique de l'est comme l'Ouganda, le Kenya, le Rwanda, le Burundi ou la Tanzanie ou la consommation

moyenne par habitant est de 30 Kg/an. En Afrique de l'ouest, c'est surtout le niébé (*Vigna unguiculata* walp L.) qui est consommé par les populations (Vadez, 1996).

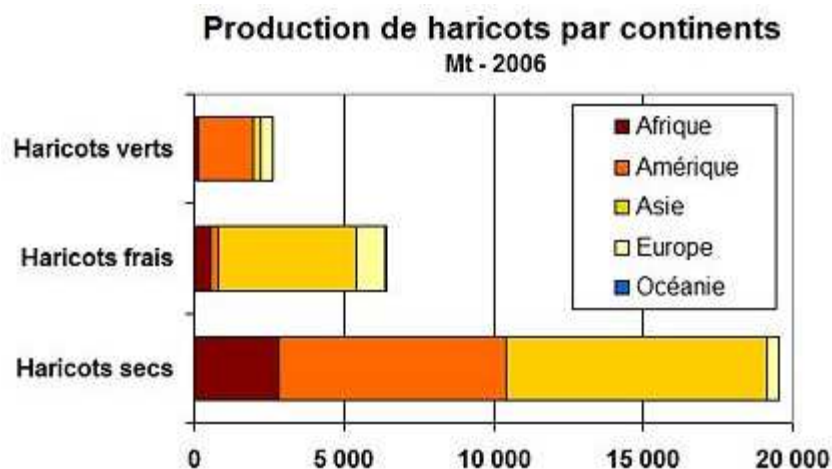


Figure 9. Production de haricots par continents Mt-2006 (FAOSTAT)

Haricots 2006	secs	Surface cultivée (milliers d'hectares)	Rendement (q/ha)	Production (milliers de tonnes)
Brésil		4016,8	8,6	3 436,5
Inde		8600,0	3,7	3 174,0
Chine		1204,0	16,7	2 006,5
Myanmar		1720,0	9,9	1 700,0
Mexique		1708,3	8,1	1 374,5
États-Unis		614,7	17,2	1 056,9
Kenya		995,4	5,3	531,8
Ouganda		849,0	4,9	424,0
Canada		180,0	20,7	372,7
Indonésie		313,2	10,5	327,4
Argentine		235,1	13,7	322,8
Tanzanie		380,0	7,6	290,0
Rwanda		356,4	7,9	283,4
Corée du Sud		360,0	7,8	280,0
Burundi		240	9,2	220,0
Iran		111,3	19,4	216,1
Cameroun		230,0	8,7	200,0
Nicaragua		243,0	8,1	197,1

Tableau 6. Principaux pays producteurs de haricot secs en 2006 (FAO.STAT)

4.4 Limitation de la production, sélection et croisement chez le haricot

Le haricot présente un potentiel de rendement faible comparé à d'autres légumineuses comme le soja. En effet, il est produit sous contraintes environnementales diverses: stress biotiques et/ou abiotiques notamment déficit hydrique, présence de pathogènes comme l'antracnose ou le virus de la mosaïque. Le haricot est plus sensible aux conditions extrêmes d'environnement que des céréales (blé, riz). Une étude menée par le CIAT a montré que 60% des sols où est cultivé le haricot sont carencés en P. L'importance de cette culture a poussé les améliorateurs à sélectionner des variétés capables de s'adapter aux sols peu fertiles pour satisfaire la demande croissante des populations.

Des croisements entre génotypes Andins et Méso-Américains ont été entrepris pour obtenir des lignées à bon rendements en conditions non limitantes en P ou pour améliorer la capacité des génotypes en sols peu fertiles voir infertiles. Il semblait nécessaire de sélectionner d'une part pour certains caractères promoteurs du rendement en conditions non limitées et d'autre part pour les gènes conférant une aptitude ou tolérance particulière à une limitation donnée.

Les rendements obtenus par les types I ou les génotypes à grosses graines sont souvent inférieures aux autres types ou aux génotypes à petites graines. Ceci est dû à la croissance déterminée et au nombre limité de bourgeons floraux (Vadez, 1996), mais aussi à une durée pour parvenir à maturation plus longue chez les habitus indéterminés, notamment les habitus IV alors que les habitus I sont généralement précoces.

4.5 Propriétés symbiotiques de l'espèce

Malgré plusieurs travaux d'amélioration, le haricot est souvent considérée comme un fixateur d'azote médiocre, notamment par rapport au Soja (Yoshida, 1991) malgré les travaux d'amélioration de ce potentiel (Hardarson, 1993). Ce caractère pourrait s'expliquer par: (i) la sensibilité particulière de la nodulation aux reliquats azotés. Le haricot produit en système intensif est fertilisé en azote ce qui génère en début de la culture un reliquat important en azote ce qui empêcherait le haricot d'exprimer au mieux son potentiel de fixation symbiotique. (ii) D'autre part, la carence de certains sols, notamment tropicaux, couplée à la minéralisation rapide de la MO pousse le haricot à utiliser l'azote minéral plutôt que sa propre capacité symbiotique.

Plus particulièrement dans le cas de la carence en P dont les besoins sont plus importants pour la fixation symbiotique que pour l'assimilation minérale (Israel, 1987).

Cependant, Il existe une variabilité interspécifique pour la fixation symbiotique de l'azote chez le haricot (Bliss, 1993; Vadez, 1999). Sur le plan génotypique on peut trouver dans le réservoir génétique du haricot des variétés ayant une bonne tolérance à la carence en P ainsi qu'une bonne fixation symbiotique d'azote, et qui permettrait d'améliorer les rendements par le biais de ce caractère. Peu d'études ont porté sur l'interaction de la fixation d'azote avec la carence en P chez le haricot.

5. Objectifs et stratégie de recherche

5.1 Problématique de la thèse

Durant ces 15 dernières années, l'intérêt des légumineuses à graines pour l'alimentation humaine a considérablement augmenté dans le bassin méditerranéen pour l'autosuffisance alimentaire en protéines et la diversification des systèmes de production céréalière. Toutefois, aucune des légumineuses à graines traditionnellement cultivées, telles que pois-chiche, fève, lentille ou haricot, ne s'est réellement développée. Cette difficulté résulte en particulier d'une forte instabilité de leurs rendements.

De nombreuses espèces de légumineuses ont la capacité de croître dans des sols très peu fertiles. Elles sont utilisées en toutes zones climatiques dans la restauration de sols appauvris par l'exploitation intensive et l'érosion. Cette capacité des légumineuses à réhabiliter des sols dégradés ou à coloniser des sols nouveaux, est largement due à leur fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (FSN) par les rhizobia qu'elles hébergent dans leurs nodosités. Cette symbiose fournit chaque année à la biosphère une quantité d'azote équivalente à celle synthétisée par voie chimique dans l'industrie des engrais. Ses bénéfices écologiques et économiques sont considérables.

La déficience en phosphore est l'un des facteurs limitant la production des légumineuses, en particulier dans les sols des zones méditerranéennes et tropicales, et d'autant plus que leur rendement dépend de la FSN. Or l'apport critique de P pour la croissance de la plupart des légumineuses est plus élevé en nutrition azotée symbiotique que nitrique ou ammoniacale (Darrah, 1993). Cette exigence est généralement attribuée au coût énergétique élevé de la FSN qui augmente lorsque la légumineuse nodulée est exposée à une déficience de P (Ribet et Drevon, 1995).

Or le haricot apparaît plus exigeant en phosphore que les autres légumineuses comme le soja ou les acacias (Israel, 1987 ; Vadez, 1996 ; Ribet et Drevon, 1996). Cependant il existe parmi la diversité du haricot en Amérique Latine, des lignées à fort potentiel de fixation d'azote (Bliss, 1993), ainsi qu'à forte efficacité d'utilisation de P (EUP) (Vadez *et al.*, 1999). Dans ce contexte, des géniteurs ont été sélectionnés par le CIAT et l'INRA, puis croisés avec des variétés d'importance agronomique. Parmi ceux-ci, le croisement de BAT 477 et DOR 364 a généré des lignées contrastantes pour leur FSN et leur EUP susceptibles d'être adaptées aux conditions méditerranéennes (Trabelsi, 2001). Tang *et al.* (2001) ont montré que les génotypes parentaux répondent à la déficience en P par des flux différents de protons libérés par les racines. Or une telle réponse a pour conséquence d'augmenter la capacité de la plante à mobiliser différents éléments minéraux du sol, en particulier P, ce qui constituerait une adaptation à la déficience en phosphore.

En effet, les légumineuses acidifient les sols lorsque leurs besoins en azote sont couverts par la FSN avec la molécule N₂ neutre (Bolan *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 1998). Les racines nodulées absorberaient alors plus de cations que d'anions, compensant cette différence par un efflux de protons permettant de maintenir l'équilibre ionique de la plante (Hinsinger *et al.*, 2003). Tang *et al.*, (2001) et Alkama (2004) ont montré que cette acidification dans la rhizosphère des légumineuses, varie largement selon l'espèce végétale considérée, *Medicago truncatula* et *Phaseolus vulgaris*, son stade physiologique et son statut symbiotique. Dans des sols à pH élevé cette excrétion de protons peut contribuer à la mobilisation du P dans la rhizosphère (Tang *et al.*, 2004). Elle permet la solubilisation du phosphate lié à des cations calciques et ferriques en particulier, et le rend ainsi assimilable par la plante absorbant la solution du sol. C'est le cas des sols calcaires rencontrés en Algérie, où les teneurs en phosphore extractible sont souvent très basses. Les légumineuses pourraient donc jouer un rôle important dans la biodisponibilité du phosphore dans ces sols.

5.2 Objectifs

La diversité génétique du haricot en Amérique latine a permis d'identifier avec le CIAT, des lignées recombinantes du croisement de DOR364 et BAT477 à fort pouvoir fixateur d'azote (FSN) et à forte efficacité d'utilisation de phosphore (EUP). Des

expériences précédentes ont été réalisées pour tester l'effet de *Rhizobium tropici* CIAT 899 sur 50 lignées de ce croisement qui avaient été sélectionnées dans le cadre du projet PPR de coopération INRA (France) – IS (Cuba) et parmi lesquelles ont été choisies les lignées contrastantes qui sont utilisées dans ce projet de thèse.

L'objectif de cette thèse est de:

(i) quantifier et localiser les fonctions rhizosphériques associées aux efflux de protons et au niveau des racines nodulées de lignées recombinantes, contrastantes pour leur EUP par leur FSN. Les flux de protons libérés par les racines nodulées: Tang *et al.*, (2001) ont montré que les deux variétés parentales de haricot, BAT 477 et DOR 364, se distinguent par des efflux différents de H⁺, et probablement d'anions organiques. Or, les protons et les anions organiques sont susceptibles de contribuer à mobiliser le phosphore dans la rhizosphère, en particulier en sols calcaires, et donc d'améliorer l'efficacité d'acquisition de P,

(ii) d'étudier leur relation avec la consommation d'oxygène liée à l'activité nitrogénase, la consommation d'O₂ par les nodosités qui est proportionnelle à leur activité de fixation symbiotique. Drevon *et al.*, (1988) ont montré que la FSN rhizobienne est régulée par la faible perméabilité nodulaire à O₂ qui détermine la microaérobie intra-nodulaire et les quantités d'ATP qui sont nécessaires au fonctionnement de la nitrogénase, enzyme bactérienne qui catalyse la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac,

(iii) d'évaluer la contribution de ces flux à la biodisponibilité du phosphore dans la rhizosphère et *in fine* au rendement de la légumineuse en sols peu fertiles.

Les recherches seront menées en milieu contrôlé sous serre en France et au champ de faible fertilité en P en Algérie

Les résultats attendus sont de deux ordres:

Dans une perspective de recherche sur le fonctionnement de la rhizosphère, ce travail nous permettra d'engager la réflexion autour de la manière de prendre en compte dans des modèles de nutrition minérale des plantes, l'effet des modifications physico-chimiques induites par la légumineuse sur le milieu. Cette recherche devrait conduire à terme à une meilleure intégration des processus de nutrition minérale, en particulier symbiotique, dans les modèles écophysiologiques de fonctionnement de la plante entière.

Dans une perspective de développement agricole régional et de gestion de l'environnement, ce travail nous permettra de vérifier la pertinence des critères d'adaptation de la fixation symbiotique de l'azote à la disponibilité de P que nous avons déterminé. Il servira d'appui à la sélection de variétés de haricot de la zone de référence.

5.3 Hypothèse de base

L'hypothèse centrale de mes travaux est donc la suivante :

Les processus rhizosphériques, i.e. le flux de prélèvement, le réapprovisionnement de P en solution et les modifications chimiques dans la rhizosphère, sont des déterminants majeurs de la biodisponibilité de P pour les plantes.

Les lignées de haricot contrastantes, sous fixation d'azote, du fait de l'acidification de leur rhizosphère, contribuent-elles à mobiliser le P du sol ? Existerait-il des différences d'efflux de H^+ entre les lignées contrastantes pour l' EUP.

Sur cette base nous pouvons partir sur l'hypothèse où les variétés efficaces fixent plus d'azote que les variétés non efficaces. Celles-ci acidifieraient plus leur rhizosphère et par conséquent mobiliseraient d'avantage le P du sol que dans le cas des variétés non efficaces

5.4 Approche expérimentale

Le programme de recherche comprend une caractérisation en milieu contrôlé de lignées de haricot contrastantes pour l'Efficacité d'Utilisation du Phosphore (EUP) et la Fixation Symbiotique de l'azote (FSN), et une évaluation au champ de leur potentiel de rendement sous faible intrants de N et P. Les études en milieu contrôlé auront lieu à Montpellier sous la direction de J.J. Drevon (DR à l'INRA). Les observations au champ sont menées en Algérie sous la direction de M Ounane (Pr à l'INA).

5.4.1 Milieu contrôlé sous serre

La possibilité de déceler avec précision des différences entre lignées dans ce dispositif constituera la base des mesures de biomasses aérienne, racinaire et nodulaire. Ces déterminations se font en 6^{ème} semaine de culture, après les mesures de flux décrites ci-dessus. Elles seront suivies de dosages en teneurs minérales N et P.

Détermination des flux et des échanges gazeux : Une comparaison variétale de lignées recombinantes (RIL), déjà sélectionnées pour leur EUP et FSN contrastantes parmi les 120 lignées du croisement BAT477 x DOR364, avec des variétés de haricot cultivées en Algérie, est menée sous serre en bacs en conditions hydro-aéroponiques avec *Rhizobium tropici* CIAT899 comme rhizobia de référence. Ces conditions mises au point initialement sur le soja (Kalia & Drevon, 1985) sont appliquées sur le haricot (Hernandez & Drevon, 1991). Des observations en serre permettent d'établir la relation entre leur efflux de H^+ lié à la fixation de N_2 et leur adaptation à la faible disponibilité en P d'un sol de référence de Cazevieille et des sols d'Algérie choisis selon l'approche au champ.

La présélection en hydro-aéroponie s'effectue dans des conditions de croissance nodulaire optimales, éloignées des conditions réelles et en absence de sol en particulier. Pour cette étude et se rapprocher du milieu réel, un premier test avec sol sera effectué en milieu contrôlé avec le dispositif de couche mince de sol (1mm) adapté à la symbiose rhizobienne dans le cadre du DEA de N. Alkama (2004). Ce dispositif est équipé d'une toile à bluter dont le diamètre des mailles (30 μm) permet les échanges de solutés entre les racines nodulées et la couche mince de sol, mais empêche le passage des racines (Casarin et al., 2004). Afin d'effectuer une première comparaison interspécifique d'efflux de protons, les plantes seront transférées en début de 3^{ème} semaine de croissance, des bacs dans ce dispositif avec un sol Fersiallitique décarbonaté (Chromic Cambisols) de Cazevieille en Languedoc France, qui est un sol de référence pour l'UMR Eco&Sols. Le flux de H^+ sera calculé à partir de l'évolution du pH et du pouvoir tampon du sol (Behi, 2003). Les résultats sur couche mince de sol seront comparés à ceux mesurés pendant la même période en culture hydro-aéroponique par la quantité de KOH nécessaire pour contrôler le pH de la solution nutritive.

Par ailleurs, afin d'évaluer l'efflux de protons uniquement lié à la FSN, la consommation d' O_2 liée à l'activité nitrogénase des racines nodulées sera mesurée durant la 5^{ème} semaine sur 5 plantes après transfert en bouteille sérum, comme décrit dans la figure 10. Le principe des mesures est de suivre l'évolution de la concentration d' O_2 en faisant varier la pression partielle d'oxygène dans le flacon après étanchéification du compartiment des racines nodulées avec un joint rhodorsil non toxique autour du collet (Jebara & Drevon, 2001).

Les biomasses aérienne, racinaire et nodulaire seront déterminées en 6^{ème} semaine de culture, pour les deux dispositifs, hydroaéroponie et rhizotron, après les mesures décrites ci-dessus. (Figure 10).

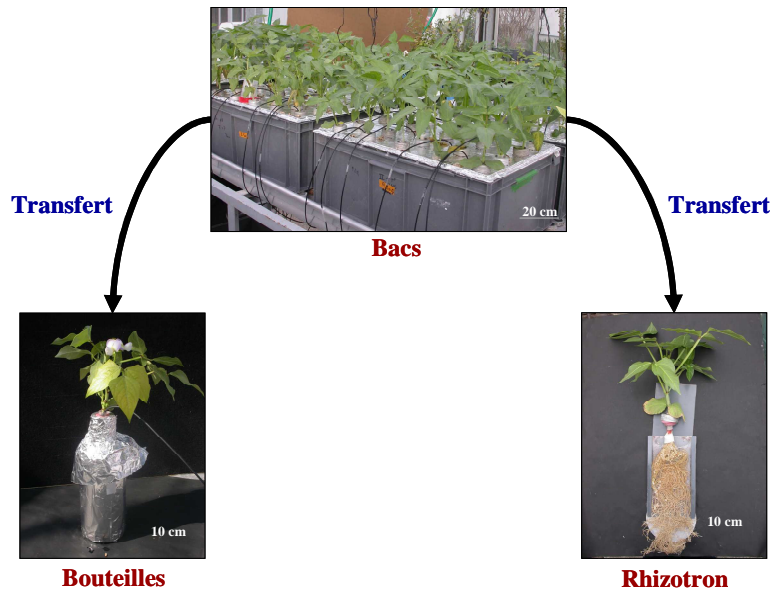


Figure 10. Dispositifs utilisés en conditions semi-contrôlées sous serre en hydroaéroponie (Bacs et bouteilles) et en sol rhizosphérique (Rhizotron)

5.4.2 Au champ

Des observations au champ sont réalisées en Algérie dans la région de Tizi Ouzou avec les lignées de haricot sélectionnées ci-dessus. Les valeurs de nodulation, biomasses aérienne et nodulaire à la floraison, seront comparées aux valeurs "potentielles" établies en conditions optimales de fixation symbiotique d'azote en conditions contrôlées. La description quantitative de la nodulation, nombre et biomasse est particulièrement importante car ce sont des paramètres particulièrement sensibles à la déficience en P (Vadez *et al.*, 2001). Les analyses physico-chimiques des sols et des plantes seront mesurées.

Test multilocal. Un test multilocal des lignées de haricot les plus contrastantes en serre (INRA), a été proposé à des producteurs de la région de Tizi Ouzou. L'objectif est d'évaluer l'effet de la variabilité spatiale des paramètres mesurés initialement dans l'essai en station, et d'intégrer les pratiques paysannes dans l'évaluation au champ. Des échantillons de sol sont prélevés pour la mesure des paramètres physico-chimiques. La

localisation des producteurs sur ces communes s'est accompagnée d'une enquête auprès des agriculteurs selon un questionnaire préparé pour le choix des parcelles d'étude. Des données sur la production du haricot ont ainsi été collectées au niveau des communes dans la Wilaya (Province) de Tizi-Ouzou.

Test agronomique. Les lignées précédemment citées ont fait l'objet d'un essai agronomique. Afin d'évaluer l'expression du potentiel des légumineuses dans des conditions de sol en place, les lignées sélectionnées et étudiées en milieu contrôlé sous serre, sont comparées au champ à la variété locale el Djadida. Chaque demi-parcelle reçoit une fertilisation phosphatée qui assure les besoins du haricot, et l'autre demi-parcelle sert de témoin. La biomasse aérienne, le nombre et la biomasse des nodules seront mesurés à la floraison. Ce stade physiologique correspond en effet généralement au développement maximal nodulaire et végétatif du haricot. L'acidification du sol et les paramètres physico-chimiques qui y sont liés, seront mesurés sur des échantillons composés de sols de rhizosphère prélevés avec les plantes à la floraison

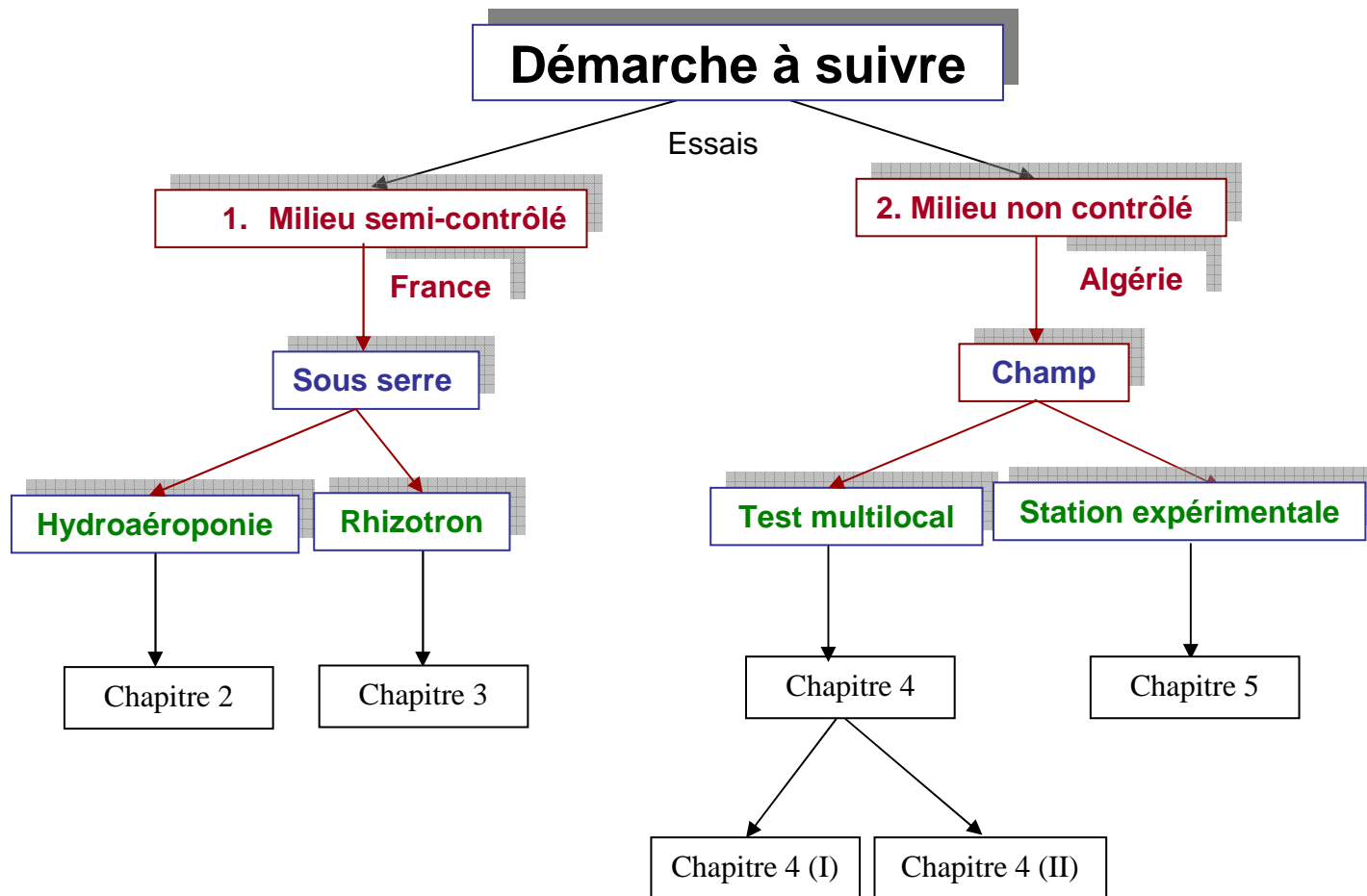


Figure 11: Plan de la thèse. Les résultats obtenus feront l'objet des chapitres de cette thèse. Le chapitre 1 étant consacré à la synthèse bibliographique.

Références

- Abdenour H., 1982. Etude de la fixation de l'azote chez quelques légumineuses. *Thèse d'ing. Ins. D'Agronomie (INA) de El Harrach* 72p.
- Alkama N., 2004. Efflux de protons dans la rhizosphère du haricot sous fixation symbiotique d'azote en fonction de la nutrition phosphatée. *Mémoire de DEA. INA PG.*
- Alkama N., Bi Bolou E.B., Vailhe H., Roger L., Ounane S.M., Drevon J.J., 2009. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with variation of proton efflux in cowpea rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1814–1823
- Anonyme, 1999. L'encyclopédie de la cuisine. Les éditions Québec Amérique inc. 5p.
- Hirsch A.M., Lum M.R., Downie J.A., 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.* 127,1484-1492.
- Behi O., 2003. Modélisation des systèmes complexes par composition en sous ensembles: Application à la disponibilité du phosphore provenant de phosphates naturels. *Thèse de doctorat. Montpellier II.* 192 p
- Benatmane F., 2000. Contribution à l'évaluation des besoins d'entretien en azote des ovins de race "Ouled-Djellal" âgés de 06 à 12 mois. Actes des 3^{èmes} journées de recherches sur les productions animales "Conduite et performances d'élevage" Tizi-Ouzou les 13, 14, 15 novembre 2000, 129-135.
- Bergersen F.J., 1966. Some properties of nitrogen-fixing breis prepared from soybean root nodules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 130,(28) 304-312
- Bergersen F.J., 1994. Distribution of O₂ within infected cells of soybean root nodules: a new simulation. *Protoplasma* 183, 49–61.
- Bernal L., Coello P., Martínez-Barajas E., 2005. Possible role of R1 protein on starch accumulation in bean seedling (*Phaseolus vulgaris* L.) under phosphate deficiency. *J Plant Physiol.* 162, 970–976
- Blair M.W., Díaz L.M., Buendía C., H.F. Duque E., M.C., 2009. Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Gen.* 119, 955–972.
- Bliss F.A.,1993. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. *Plant Soil* 152, 71-79.
- Bohlool, B.B. Schmidt, E.L., 1974. Lectins: a possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. *Sci.* 185, 269–271.
- Bolan N.S., Hedley M.J., White R.E., 1991. Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume pastures. *Plant Soil*, 1324, 53-63.

- Canado I.C., Doussinague C., Villena E., 2003. Technicien en agriculture. Ed. Cultural S. A., Madrid. 519p.
- Casarin V., Plassard C., Hinsinger P. Arvieu J.J., 2004. Quantification of ectomycorrhizal fungal effects on the bioavailability and mobilization of soil P in the rhizosphere of *Pinus pinaster*. *New phytol.*, 163, 177-185.
- Cooper J.E., 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Applied Microbiol.* 103, 1355–1365
- Darrah P., 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant Soil* 155-156: 1-20.
- Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. INRA. Paris. 383p.
- De'narie', J., Debelle', F., Truchet, G. and Prome', J.-C., 1993. Rhizobium and legume nodulation: a molecular dialogue. In *New Horizons in Nitrogen Fixation* ed. Palacios, R., Mora, J. and Newton, W.E. pp. 19–30. *Dordrecht: Kluwer*.
- Drevon J.J., Hartwig U.A., 1997. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. *Planta*. 201, 463-469.
- Drevon J.J., Kalia V.C., Heckman M.O., Pedelahore P., 1988. In situ open-flow assay of acetylene reduction activity by soybean root-nodules: influence of acetylene and oxygene. *Plant Physiol. Biochem.*, 26, 73-78.
- Fageria N. K., 2004. Dry Matter Yield and Shoot Nutrient Concentrations of Upland Rice, Common Bean, Corn, and Soybean Grown in Rotation on an Oxisol *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1532-2416, 35, 961– 974
- FAO.STAT, 207. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fardeau J.C., Morel R., 2002. Le phosphore (Agricole et environnemental), ses relations avec le vivant. *Agronomie*. INRA. 13p.
- Frossard E., Julien P., Neyroud J.A., Sinaj S., 2004. Le phosphore dans les sols. Etat de la situation en Suisse. Cahier de l'environnement n° 368. Office fédéral de l'environnement, des forêts et du paysage, Berne. 180p.
- Gage, D. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogenfixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 68, 280-300.
- Gepts P., Debouck D., 1991. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). p7-53 In *Common bean: research for crop improvement*. A Van Shoonhoven & O Voysest Eds. C.A.B. International, Wallingford, UK and CIAT, Cali Colombia
- Gérard R., 1993. Respiration et diffusion de l'oxygène dans la symbiose fixatrice d'azote : Soja-Bradyrhizobium japonicum. *Thèse de doctorat*, ENSA Montpellier. 98p.
- Giroux M., Enright P., 2002. Concentrations et charges d'azote et de phosphore perdues dans les drains souterrains selon les cultures et les modes de fertilisation. Site de Saint-

- Lambert-de-Lauzon. Cahiers de l'observatoire de la qualité des sols de Québec, Institut de recherche de développement en agro-environnement Inc.
- Graham P.H., Vance C., 2003. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiol* 131, 872-877
- Graham P.H., 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Field Crop Res.* 4, 93-112.
- Gros A., 1979. Engrais. Guide pratique de la fertilisation. Ed. la maison rustique. Paris 382p.
- Guivarch A., 2001. Valeur fertilisante à court terme du phosphore des boues de station d'épuration urbaine. *Thèse de Doctorat*, INPL, EDRPRE. 309p
- Gunawardena S.F.B.N., Danso S.K.A., Zapata F., 1992. Phosphorus requirement and nitrogen accumulation three mungbean (*Vigna radiata* (L) Welzek) cultivars. *Plant Soil* 147, 267-274.
- Hall A. E., 2001. La culture traditionnelle du niébé au Sénégal, étude de cas N diaga cisse ISLA/CNRA. BP 53 Bomby, Sénégal. 60p.
- Hammond J.P., Broadly M.R., White P.J., 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Ann. Bot. (Lond)* 94, 323–332
- Hardarson G., 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil* 152, 117
- Hart M.R., Quin B.F., Nguyen M.L., 2004. Phosphorus runoff from agricultural land direct fertilizer effects: review, *J. Env. Quality* 33, 1954-1972.
- Hellsten, A., Huss-Danell, K., 2001. Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica. Section B, Soil Plant Sci.* 50, 135-142.
- Hernandez P., Drevon J.J., 1991. In situ assay of acetylene reduction by *Phaseolus vulgaris* root nodules: influence of oxygen. *J. Plant Physiol.* 138, 587-591.
- Hinsinger P. 2004. Rhizosphère : Nutrient mouvement and avilability. *Encyclopedia of plant and crop science.* Marcel Dekker, INC. 1094-1097pp.
- Hinsinger P., 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 64, 225-265.
- Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B., 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environnemental constraints – a review. *Plant Soil* 248, 43-59.
- http://sfc.fr/Donnees/mine/eng/cadeng.htm#Engrais_phosphatés
- Hubert, 2001.
- Hunt S., Layzell D.B., 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 483-511.
- Israel D.W., 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol* 84, 835-840.

- Israël D.W., 1993. Symbiotic dinitrogen fixation and host plant growth during development of and recovery from phosphorus deficiency. *Physiol. Plant* 88, 294-300.
- Jaillard B., Hinsinger P., 1993. Alimentation minérale des végétaux dans le sol. *Techniques agricoles* 1210, 6.
- Jakobsen I., 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*). *Physiol Plant* 64, 190-196.
- Jebara M., Drevon J.J., 2001. Genotypic variation in nodule conductance to oxygen diffusion in common bean. *Agronomie*, 21, 667-674.
- Jones D., 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 205, 25-44.
- Jouhet J., Maréchal E., Bligny R., Joyard J., Block. M.A., 2003. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett.* 544,63–68
- Kalia V.C., Drevon J.J., 1985. Variation in nitrogenase activity (C₂H₂ reduction) during the in situ incubation of root nodules of *Glycine max* (L.) Merr. CR. Académie Sciences. Paris. Ser., III 301, 591-596.
- Kania A., Langlade N., martinoia E., Neumann G., 2002. A physiological and molecule approach to study organic exudation and developpement of cluster roots in *Lupinus albus* L. Thèse de doctorat, Université de Neuchâstel, n°1614 Ch. IV (Phosphorus deficiency-induced modifications in citrate catabolism and in cytosolic pH as related to citrate exudation in cluster roots of white lupin).
- Kentour S., 1999. Contribution à l'étude des propriétés des graines du haricot dollique (*Vigna unguiculata* L. walp) au cours d'un essai à l'ITMA de Boukhalfa wilaya de Tizi-Ouzou. DES de biologie. 44p.
- Kouas, S., Alkama, N., Abdelly, C., Drevon, J.J., 2008. Proton efflux by nodulated roots varies among common-bean genotypes (*Phaseolus vulgaris*) under phosphorus deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sc.*, 171, 242-248.
- Laumonier R., 1979. Cultures légumières et maraîchères. Tome I. Ed. Baillière. Paris. 276p.
- Lemanceau P., Heulin T., 1998. La rhizosphère, 93-104. In sol : interface fragile. COORD.P. Stengel S. Gelin INRA Editions. Collections «Mieux comprendre».
- Li C.J., Pang X., Zhang F.S., 2003. Comparison on responses of different phosphorus efficient wheat varieties to phosphorus deficiency stress. *Acta Botanica Sinica* 45, 936-943.
- Ligaba A., Yamaguchi M., Shen H., Sasaki T., Yamamoto Y., Matsumoto H., 2004. Phosphorus deficiency enhances plasma membrane H⁺-ATPase activity and citrate exudation in greater purple lupin (*Lupinus pilosus*). *Functional Plant Biology* 31, 1075-1083.
- Liu Y., Mi G., Chen F., Zhang J., Zhang F., 2004. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes contrasting P efficiency at low availability. *Plant Sci.* 167, 217-223.

- Malusà E., Laurenti E., Juszczuk I., Ferrari R.P., Rychter A.M., 2002. Free radical production in roots of *Phaseolus vulgaris* subjected to phosphate deficiency stress
Plant Physiol. Biochem. 40, 963-967.
- Marschner A., 1995. Minéral nutrition of high plants. Academic press London. 889p.
- Mengel K., Kirkby E., 2001. Principal of plant nutrition. 5^{ème} édition. Klumer Academic Publishers. Morel C., 2002. Caractérisation de la phytodisponibilité du phosphore du sol par la modélisation du transfert des ions phosphatés entre le sol et la solution. *Thèse d'habilitation INRA Bordeaux*, 80p.
- Mulder L., Hogg B., Bersoult A., Cullimore, J.V., 2005. Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiol Plant* 123, 207–218.
- Oke V., Long S.R., 1999. Bacteroid formation in the Rhizobium–legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology* 2, 641-646
- Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocana, A., Lluch C., 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum*, 121: 498-505
- Parent L.E., Khiari S., 2005. Marchand Response to Phosphorus of Cranberry on High Phosphorus Testing Acid Sandy Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 70, 1914-1921.
- Pereira P.A.A., Bliss F.A., 1989. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N₂ fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. *Plant Soil* 115, 75-82.
- Pochon N., 1981. La prairie permanente à base de trèfle blanc. Ed. de l'institut technique de l'élevage bovin. Paris. 104p.
- Puppo A., Herrada G., Rigaud J., 1991. lipid peroxydation in peribacteroid membranes from french bean nodules. *Plant Physiol.* 96, 826-830.
- Quinn J., 1999. Cowpea, a versatile legume for hot dry conditions. Ed. Indiana, Missouri.
- Ragothama K.G., Karthikeyan A.S., 1999. Phosphate acquisition. *Plant and Soil* 274, 37-49.
- Ragothama K.G., Karthikeyan A.S., 2005. Phosphate Acquisition. *Plant Soil* 274, 37-49.
- Rausch C., Bucher Æ M., 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216, 23–37
- Requena N., Perezsolis E., Azconaguilar C., Jeffries P., Barea J.M., 2001. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied Env. Microbiol.*, 67, 495-498.
- Ribet J., Drevon J.J., 1995a. Increase in permeability to oxygen diffusion and in oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. *Physiol. Plant*, 94, 298-304.
- Ribet J. Drevon J.J., 1995b. Phosphorus deficiency increases the acetylene induced decline in nitrogenase activity in soy bean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Exp. Bot.* 46, 1479-1486.

- Ribet J. Drevon J.J., 1996. The phosphorous requirement of N₂-fixing and urea-fed *Acacia mangium*. *New Phytol.*, 132, 383-390.
- Sas T., Israël D.W., 1991. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. *Plant physiology* 97, 928-935.
- Schulze J., Drevon J.J., 2005. P-deficiency increases the O₂ uptake per N₂ reduced in alfalfa. *J Ex Bot.* 56, 1779–1784.
- Shen J., Li H., Neumann G., Zhang F., 2005. Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. *Plant Science* 168, 837-845.
- Smith S.E., Read D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis, 3rd Eds. Academic Press, London, UK.
- Smith, 2002. Phosphate transport in plants Frank W. Smith¹, Stephen R. Mudge, Anne L. Rae & Donna Glassop. *Plant Soil* 248, 71–83, 2003.
- Stantan W. R., 1970. Les légumineuses à graines en Afrique. Ed. Lavoisier. 365p.
- Ström L., Andrew G. Owen, Douglas L. Godbold, David L. Jones, 2001. Organic acid mediated P mobilization in the rhizosphere and uptake by the maize roots. *Soil Biol Biochem.* 34, 703-710.
- Ström L., Andrew G. Owen, Douglas L. Godbold, David L. Jones, 2005. Organic acid behaviour in calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biol. Biochem.* 1-9.
- Tang C., Fang R.Y., Raphael C., 1998b. Factors affecting soil acidification under legumes. III. Effect of phosphorus supply. *Australian Journal of Agricultural Research* 49, 657-664.
- Tang C., Hinsinger P., Jaillard B., Rengel Z., Drevon J.J., 2001. Effect of phosphorus deficiency on the growth, symbiotic N₂ fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie* 21, 683-689.
- Tang, C. ; Hinsinger, P. Drevon, J J.; Jaillard, B. 2001a. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* L. *Annals Botany* 88 (1), 131-138.
- Tang C., Drevon J.J., Jaillard B., Souche G., Hinsinger P., 2004. Proton release of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency. *Plant Soil* 260, 59-68.
- Trabelsi, M., 2001. Caractérisation biologique et agronomique d'une collection de génotypes de haricot. In: Drevon, J.J. and Sifi, B (Eds), Fixation Symbiotique de l'Azote et Développement Durable dans le Bassin Méditerranéen. INRA *Les Colloques*, Paris.
- Troelstra S. R., Van Dijk K., Blacquiere T., 1985. Effects of N source on proton excretion, ionic balance and growth of *Alnus Glutinosa* (L.) Gaertner: comparisons of N₂ fixation with single and mixed sources of NO₃⁻ and NH₄⁺. *Plant Soil* 84, 361-385.

- Vadez V. 1996. Variabilité génétique de la fixation d'azote sous carence en phosphore chez le haricot: relations avec l'efficacité d'utilisation du P et la perméabilité nodulaire à l'oxygène. *PhD thesis, Montpellier* 150 pp.
- Vadez V., Rodier F, Payre H., Drevon J.J. 1996. Nodule permeability to O₂ and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N₂ fixation to P deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 34, 871-878
- Vadez V., Lasso J.H., Beck D.P. Drevon J.J., 1999. Variability of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to P use efficiency. *Euphytica* 106, 231-242.
- Vadez V. Drevon J.J., 2001. Genotypic variability in phosphorus use deficiency symbiotic N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie.* 21, 691-6
- Valverde C., Ferrari A., Wall L.G., 2002. Phosphorus and the regulation of nodulation in the actinorhizal symbiosis between *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* symbiosis. *Canadian J Bot.* 77, 1302-1310.
- Vance C.P., Graham P.H., Allan D.L., 200. Biological Nitrogen Fixation: phosphorus – a critical future need? In: Pedrosa FO, ed. Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. Netherlands: *Kluwer Academic Publishers* 509-514.
- Walter, D., 2005. The environmental impact of genetically modified crop plants on the microbiology of the rhizosphere. *Ph.D. thesis.* Flinders University, South Australia.
- Weisz P.R., Siclaire T.R., 1987. Regulation of soybean nitrogen fixation in response to rhizosphere oxygen. II. Quantification of ndule gaz permeability. *Plant physio.* 84, 906-910.
- Werner C., Clemente A. S., Correia P. M., Lino P., Maguas C., Correia A.I., Correia O. 2000. Restoration of disturbed areas in the Mediterranean – a case study in a limestone quarry pp. 367 376.
- Witty J.F., Minchin F.R., Skot Scheely J.E., 1986. Nitrogen fixation and oxygen in legume root nodules. *Oxford of surveys of plant molecular and celle biol.* 3, 276-314.
- Wortmann C.S., Lunze L., Ochwoh V.A., Lynch J., 1994. Bean improvement for low fertility soils in Africa- African Crop Sc., 4, 469-477.
- Yves T. Claude M., 1999. Technologie des légumes. Ed. Tec & Doc Lavoisier. pp 131-141.
- Zapata E., Roy R.N., 2004. Utilisation des phosphates naturels pour une agriculture durable. Bulletin FAO: engrais et nutrition végétale 13, 25-29.

CHAPITRE 2

Is genotypic variation of H⁺ efflux under P deficiency linked with nodule-root respiration of N₂ - fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris*)?

Il est reconnu que la faible disponibilité du phosphore (P) dans les sols constitue un problème majeur pour la production de biomasse chez les plantes. Cependant, les organismes du sol telles que les bactéries, champignons et les plantes, ont développé de nombreuses stratégies pour augmenter la disponibilité en P. L'efflux de protons (H⁺), et par conséquent, l'acidification de la rhizosphère, est une de ces stratégies. Ce phénomène est particulièrement important notamment pour les légumineuses (Tang *et al.*, 2004).

Plusieurs travaux se sont intéressés à l'interaction entre perméabilité nodulaire à l'oxygène et la déficience en P. Des résultats montrent que l'amplitude du déclin d'ARA dû à l'acétylène est variable selon le génotype et que la perméabilité nodulaire à l'oxygène est accrue sous déficience en P. Ceci suggère que la déficience en P induit une limitation en oxygène du métabolisme nodulaire. Or, l'oxygène est présent en faible concentration dans la nodosité, et cette limitation est accrue sous déficience, ce qu'une augmentation de perméabilité nodulaire pourrait partiellement compenser.

Cependant, il n'y'aurait que l'étude de Saber *et al.* (2008) et Alkama *et al.* (2009) qui se serait intéressée au lien qui existerait entre l'efflux de protons et la respiration des racines nodulées du haricot.

Les objectifs de ce deuxième chapitre sont donc les suivants:

- 1) Comparer des lignées contrastantes en terme de croissance et d'efflux de protons
- 2) Rechercher si la perméabilité nodulaire révèle des variations intra-spécifiques. Cette variation est-elle liée à l'efflux de H⁺ ?

Pour répondre à nos objectifs, 7 RILs contrastantes pour leur Efficacité d'Utilisation du Phosphore (EUP) ont été cultivées sous serre: 147, 124, 115, 104, 83, 75 et 34. Les graines sont stérilisées puis inoculées avant la mise en culture en hydroaéroponie, un milieu nutritif liquide (Annexe 1). L'aération du milieu de culture est assurée en permanence par bullage d'air comprimé. Les plantules sont transférées en bouteilles sérum de 1l contenant la même solution nutritive. Ce dispositif est adéquat pour l'observation de la nodulation et les mesures d'échanges gazeux *in situ* des racines nodulées.

La mesure *in situ* de l'efflux de protons est faite au cours de la culture des plantes dans les flacons sérum. La quantité de H^+ libérés par les racines est déterminée par le suivi quotidien du pH. Celui-ci est ajusté à 6.8 par addition de KOH 10^{-1} M. Le volume de KOH ajouté pour l'ajustement du pH de la solution nutritive est déterminé selon la procédure décrite dans le paragraphe de la pré-culture. La quantité de H^+ est donnée par la relation suivante: $Q = CV / 1000$ avec Q, quantité de matière (mol) de H^+ ; C, concentration de la solution de KOH (M); V, volume de solution de KOH (ml) utilisée pour l'ajustement du pH.

La consommation d' O_2 par les racines nodulées (Conr) est mesurée avec un oxymètre à deux voies (Abiss, La Verpillère, France) sur les plantes transférées en flacons et âgées de 39 à 44 Jours Après Semi (JAS). Un jour avant la mesure de la Conr, le niveau de la solution nutritive dans le flacon est réduite au tiers du volume du flacon de façon à mettre en contact la majorité des nodules et la phase gazeuse.

Le principe des mesures d'échange gazeux consiste à suivre avec l'oxymètre relié à un enregistreur, l'évolution de la consommation d' O_2 dans le volume connu du flacon sérum contenant le matériel biologique à tester et celui des diverses tubulures. Une pompe péristaltique permet d'assurer une circulation et une homogénéisation permanente de la phase gazeuse entre l'incubateur (racines nodulées) et l'oxymètre, à un débit de 400 ml min^{-1} . Des confinements successifs sont réalisés avec une pO_2 initiale de 21, 25, 30 et 40 KPa O_2 . Après 15 min de confinement, la Conr peut être calculée suivant la formule donnée par: $Conr = \Delta pO_2(V/24.2)(60/t)$, avec $\Delta pO_2 = pO_2$ initiale - pO_2 finale en % de pression atmosphérique; V (en litre) = volume de la phase gazeuse dans les conditions expérimentales; t (en min) = temps entre la mesure initiale et finale d' O_2 ; 24.2 (en litre) = volume de 1 mol de gaz pur dans les conditions expérimentales. La Conr est exprimée en $\mu\text{mol } O_2 \text{ consommé plante}^{-1} \text{ h}^{-1}$. (Figure ci-dessous).

L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un premier article intitulé: «Is genotypic variation of H^+ efflux under P deficiency linked with nodulated-root respiration of N_2 - fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris*)? » qui a été soumis en 2010 à la revue PPB.

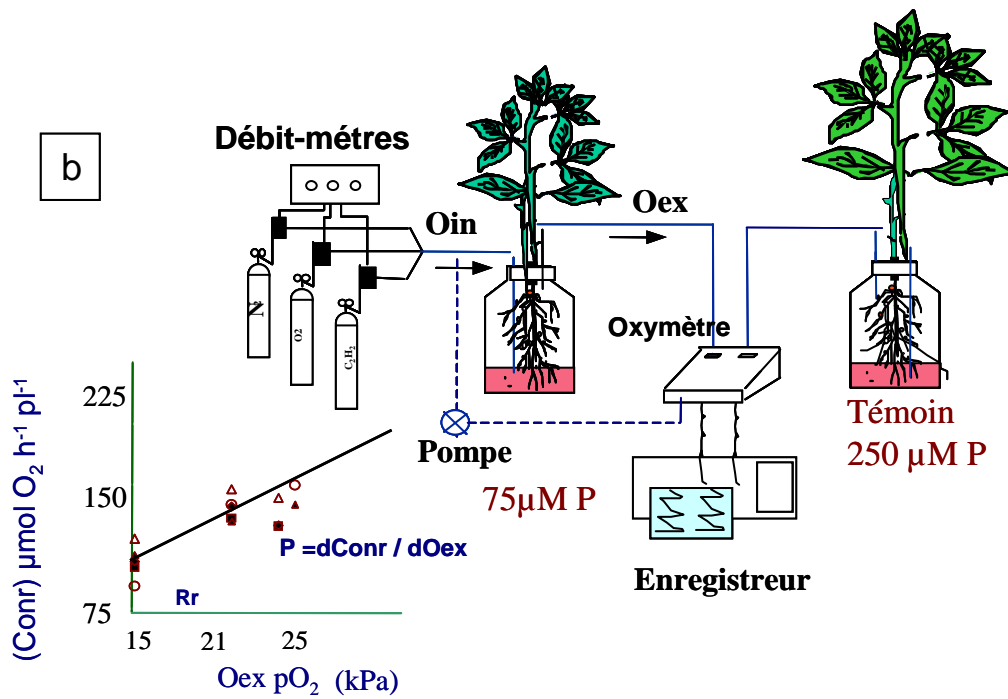


Figure . Dispositif de mesure in situ de l'oxygène consommé par les racines nodulées du haricot. (a) photo du dispositif (bouteilles à gauche et pompe à droite); (b), représentation schématique Oex = oxygène expiré; Oin = oxygène inspiré; Conr = oxygène consommé par les racines nodulées (Jebara & Drevon, 2001).

Références

- Alkama N., Bolou Bi Bolou E., Vailhe H., Roger L., Ounane S.M., Drevon J.J., 2009. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with variation of proton efflux in cowpea rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1814–1823.
- Saber S., Alkama N., Abdelly C., Drevon J.J., 2008. Proton efflux by nodulated roots varies among common-bean genotypes (*Phaseolus vulgaris*) under phosphorus deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 171 242-248.
- Tang C., Drevon J.J., Jaillard B., Souche G., Hinsinger P., 2004 Proton efflux of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency. *Plant Soil* 260 59-68.

Is genotypic variation of H⁺ efflux under P deficiency linked with nodulated-root respiration of N₂ - fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris*)?

Authors: Nora Alkama^{a,b,c,*}, Benoît Jaillard^a, Sidi Mohamed Ounane^c, Jean Jacques Drevon^{a,*}

Affiliation: ^a INRA-IRD-SUPAGRO, UMR Eco&Sol, Bat 12, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

^b Université Mouloud Mammeri, faculté des sciences biologiques et agronomiques, département d'agronomie, Tizi Ouzou. Algeria.

^c Institut National Agronomique, Département de phytotechnie, Hassan Badi, El Harrach, Algiers, Algeria.

Abstract

In order to examine genotypic variation of common bean in growth, phosphorus uptake, nodulated-root proton release, and nodule gas permeability, seven common-bean recombinant inbred lines (RIL) from the cross of BAT477 x DOR364 were inoculated by *Rhizobium tropici* CIAT 899, and grown in hydroaerobic culture under glasshouse. A positive correlation was observed between shoot and nodule biomass for most of the studied RILs. Overall, the P concentration was 1.5 to 2 fold higher in nodules than in shoot. Under P deficiency, the tolerant common-bean RILs acidified more their rhizosphere than the sensitive ones. The proton release of the RILs 147, 124, 104, 75 and 34 was positively correlated with nodule O₂-permeability. It is concluded that nodulated common-bean release a substantial amount of H⁺ into the rhizosphere that is linked to the symbiotic N₂ fixation, and depends upon the nodule permeability to O₂ diffusion.

Keys words: H⁺ efflux; Nitrogen fixation; Nodule respiration; *Phaseolus vulgaris*; Phosphorus deficiency; Symbiosis.

1. Introduction

Common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most widely grown food-legume for direct human consumption in the world [2]. However its economic development is limited by the large variability of its yield. This is often due to low content of phosphorus of the soils where it is grown in particular under Mediterranean and tropical climates, whenever water deficiency is not the major limiting factor. Indeed, there are many examples of increases in growth and yield of common-bean by P fertilization. Like other legume plants depending on symbiotic nitrogen fixation (SNF), common-bean requires more P than plants depending on mineral N [11,28,3]. In addition, SNF potential for selected cultivars is generally lower than for other grain legumes [10].

Phosphorus is present in small quantity in the lithosphere (0.1%) and in most soils it does not exceed 0.3%, although it varies with the type of soil and farming system, in particular with the contributions of manure and waste [27]. Thus, low phosphorus fertility of the soils may be due to low total P content, particularly in soils with low organic matter content. However, the low availability of P is often due to its insoluble association with such cations as Ca, Al or Fe and its adsorption on surfaces of mineral phases.

In response to P deficiency, plants show two strategies, depending on their ability to adjust their external and internal P requirement [5]. The internal strategy consists in optimising the metabolic phosphorus use efficiency (PUE) by producing overall more biomass per unit of P consumed, which in fixing more N₂ per unit of P for a SNF-dependent legum [29]. The external strategy consists in developing a more effective system of acquisition of P by either increasing the absorbing surface through root architecture, root hair and mycorrhizal hyphae which enhance the volume of soil explored, or by secreting protons, organic acids and phosphatases whose role is to dissolve insoluble P of the soil [24,19]. Thus in common-bean, soybean, lupin and alfalfa, P deficiency has been shown (i) to reduce the number and biomass of nodules as well as their nitrogenase activity [17,28,16], (ii) to increase the absorption surface and density of the roots resulting in more exploration of the soil volume [30], and (iii) to acidify the rhizosphere by root exudates [15] and H⁺ release [23-24]. In addition, the root-induced solubilisation of soil P is increased by rhizosphere microorganisms.

For legumes an additional H⁺ release is associated with the SNF [22,8]. However, the relation between the genotypic variation in P use efficiency (PUE) for the

nodule respiration and the H^+ release is not well documented, except the recent works of [13] and [1] with a diversity of cowpea and common bean genotypes though they were not RILs. The present study addresses whether the nodulated-root H^+ release is related with nodulated-root respiration and N_2 -fixation adaptability to low P supply among RILs of common bean contrasting in tolerance of P deficiency.

2. Materials and methods

2.1. Biological material, soil and culture conditions

The seven RILs of *Phaseolus vulgaris* were selected among the progenies of the crossing of two parental RILs, namely BAT477 and DOR364, from the International Centre of Tropical Agriculture (CIAT, Cali, Colombia). Seeds were sterilized with 3% calcium hypochlorite for 5 min and rinsed by 5 washings with sterile distilled water. They were then transferred for germination on soft agar, consisting of 100 ml Bergersen solution containing 5 g mannitol and 7 g agar in 1 l of distilled water with sterilization at 120 °C for 20 min [31].

The inoculation was performed by soaking 4 d-old seedlings for 30 min in a suspension of an inoculum of *Rhizobium tropici* CIAT899 containing 10^9 bacteria ml^{-1} . This rhizobial strain, kindly provided by the CIAT, is a reference for the studies on common-bean because of its high capacity to fix nitrogen and its ubiquity with the diversity among *P. vulgaris* (Vadez *et al.*, 1996). The inoculum was prepared from rhizobia culture preserved in tubes at 4 °C, then transferred into 100 ml of following sterilized liquid YEM (Yeast Extract Mannitol) medium with stirring at 28 °C during 24 h: 900 ml distilled water; 100 ml of Bergersen concentrated solution containing 1 g KCl; 0.1 g $FeCl_3$; 0.4 g $CaCl_2$, 4.5 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ and 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, firstly in 100 ml of distilled water then adjusted to 1 l, and subsequently added with 1 g Yeast extract, 10 g mannitol [31].

For each P treatment, 20 inoculated plants were transferred into containers of 0.2 m large, 0.4 m long and 0.4 m high for hydroaeronic pre-culture during 28 d. Based on work of [28], P was supplied weekly in the form of KH_2PO_4 (75 or 250 $\mu mol plant^{-1} week^{-1}$ for deficient or sufficient P supply) to the following nutrient solution that was changed every week: $CaCl_2$ (1650 mM); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1000 mM); K_2SO_4 (700 mM);

Fe EDDHA (8.5 mM Fe as sequestrene); H₃BO₃ (4 mM); MnSO₄·H₂O (6mM); ZnSO₄·7H₂O (1 mM); CuSO₄·7H₂O (1 mM); Na₂MoO₄·7H₂O (0.1 mM).

The oxygenation of the culture solution was ensured by a permanent flow of 400 ml⁻¹ min⁻¹ of compressed air. The pH was adjusted daily to a value of 6.8 with KOH (0.1 M). A supply of urea was provided with 2 mmol plant⁻¹ in the initial solution and 1 mmol plant⁻¹ at the first change of solution after two weeks, in order to optimize nodulation[6]. The plants were then grown in N-free nutrient solution. The whole experiment was carried out in a glasshouse under temperature conditions of 28/20 °C during 16/8 h day/night cycle with an additional illumination of 400 μmol photons m⁻² s⁻¹ and 70% relative humidity during the day.

2.2. Measurements of proton release and nodulated-root O₂ uptake

At 28 days after sowing (DAS), plants representing the mean growth in containers for each P treatment were transferred individually in 11 serum bottles receiving the previously described nutrient solution according to [4].

To compensate for acidification of the nutrient solution, the pH was measured daily, like in containers, and corrected to 6.8, if necessary, by adding a quantity Q (mol) of the KOH solution determined as $Q = CV \cdot 10^3$ where C is concentration of the solution in M and V is the volume of solution used in ml.

At 39–44 DAS, the consumption of O₂ by the nodulated-roots (Conr) was measured with two-way oxymeter (Abiss, Verpillère, France), connected to a recorder, and the evolution of O₂ consumption was followed by monitoring O₂ in the known volume of the serum bottle plus tubing like described in more details by [12].

One day before the measurement of Conr, the level of the nutrient solution in the bottle was reduced to one-third of the volume so that the whole nodule population was in direct contact with the gas phase. A peristaltic pump ensured the circulation and continuous homogenisation of the gas phase between the nodulated roots and the oxymeter, with a flow of 400 ml min⁻¹. Successive measurements were performed after 15 min with an initial pO₂ of 21, 25, 30, 40, kPa O₂. The consumption of O₂ was calculated as $Conr = \Delta pO_2 (V/24.2)(60/t)$, with $\Delta pO_2 = pO_2 \text{ initial} - pO_2 \text{ final}$ in % of atmospheric pressure; V in l, volume of the gas phase under the experimental conditions; t in min, time between the initial and final measurement of O₂; 24.2 in l, volume of 1 pure gas mol under the experimental conditions [21]. Conr is expressed in

$\mu\text{mol O}_2$ consumed $\text{plant}^{-1} \text{ h}^{-1}$. The nodule O_2 -permeability is calculated as the ratio of the slope of the regression between Conr and external pO_2 .

2.3. Analysis at harvest and statistical data processing

The plants were harvested at the flowering stage with the first pod measuring 2 cm long. The shoot was separated from the root at the cotyledonary node, then weighed after 48 h at 70 °C. Nodules were separated from the roots, counted and weighed separately. Soil samples were dried at 105 °C for 24 h. Their pH was measured in an aqueous suspension shaken at 1200 rotations min^{-1} for 30 min with a soil/solution ration of 1/5.

The available P of the soil was measured by the Olsen method according to standard NF ISO 11263 after extraction by soil agitation with a solution of 0.5 N sodium bicarbonate with pH 8.5.

In order to determine the contribution of P supply to plant growth, the response curves were established from biomass values with the software Excel Microsoft Office XP.

For regressions shown in various figures, covariance analysis was performed for the calculation of the F value, with decision of significance for $p < 0.05$.

Differences between means of all parameters for sufficient versus deficient P treatments were determined by two-way analysis of variance (ANOVA) and significance was tested with the Fisher's LSD test, with $p < 0.05$, $P < 0.01$ as significant and highly significant, respectively.

3. Results

3.1. Growth and nodulation

The P supply and RILs affected significantly the shoot and root biomass. P deficiency decreased significantly the shoot biomass by more than 36% for 147, 124 and 83 (Fig. 1a). By contrast the decrease was not significant for other RILs, with less than 25% for 115, 75, and 34 and 104 being intermediate. P deficiency decreased significantly the root biomass, though without interaction between P supply and RILs (Fig. 1b).

The P supply, RILs and the interaction P supply and RILs affected significantly the nodule biomass and number, and the individual nodule mass. P deficiency decreased significantly the nodule biomass by more than 50% for all RILs, with the largest

decrease being 71% for 147 (Fig. 1c). It decreased the nodule number by more than 40% for all RILs with the highest values for 75 and 34 against the lowest for 147 and 83 (Fig. 1d). P deficiency decreased significantly the individual nodule mass by 40% for 124, 147 and 83, but by less than 16% and not significantly for 115, 34 and 104 (Fig. 1e). Under P sufficiency, the individual nodule mass was the highest for 115 and 34 against the lowest for 124, 147 and 83 (Fig. 1e).

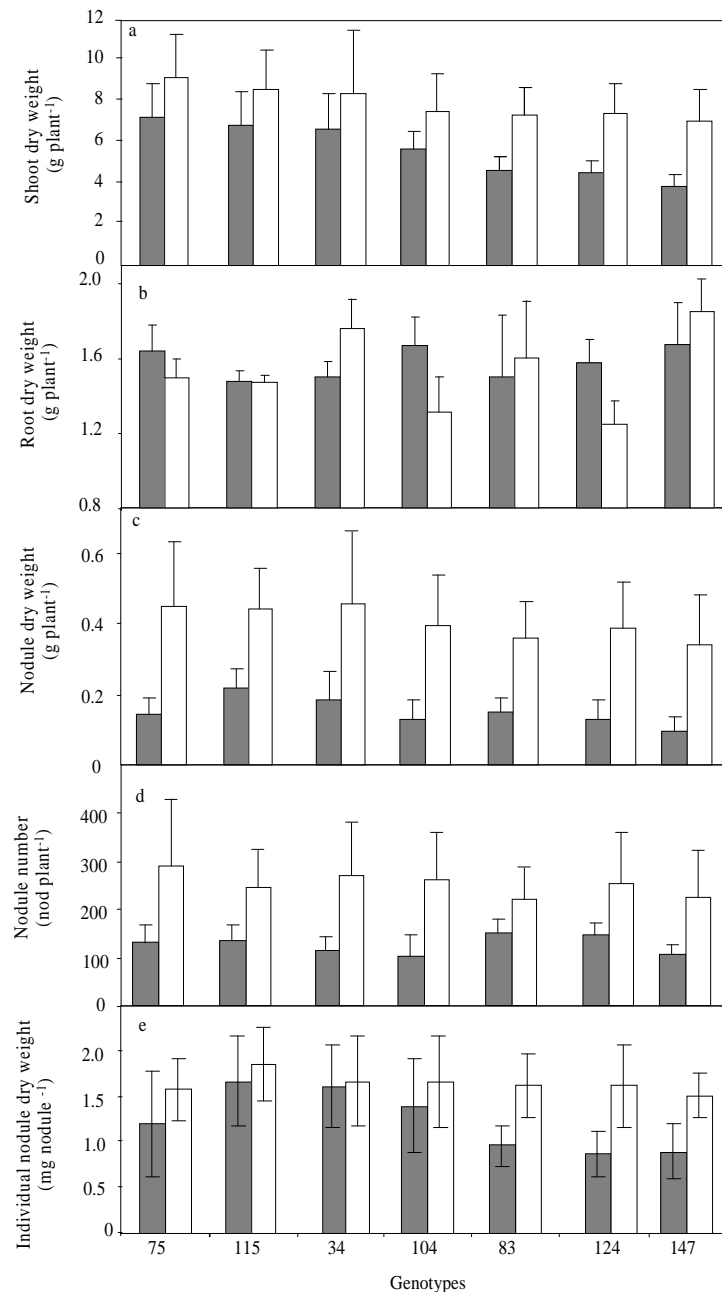


Figure 1. Effect of P nutrition on a) shoot b) root biomass c) nodule biomass d) nodule number and e) individual nodule biomass in 7 bean genotype in hydroaerponics. Data are means and SD of 12 harvested plants at 45 day after sowing. P deficiency versus P sufficiency

In order to assess the efficiency in use of the rhizobial symbiosis (EURS), the values of the shoot biomass were plotted as a function of those of nodule biomass in Figure 3 with the slope of the regressions being an estimate of the EURS. Under P deficiency, a positive correlation was observed between these two parameters for 115, 124, 34 and 104. Under P sufficiency a positive correlation was observed for all RILs except 104. The EURS of 34 under P sufficiency was 30% lower than under P deficiency (Fig. 2)

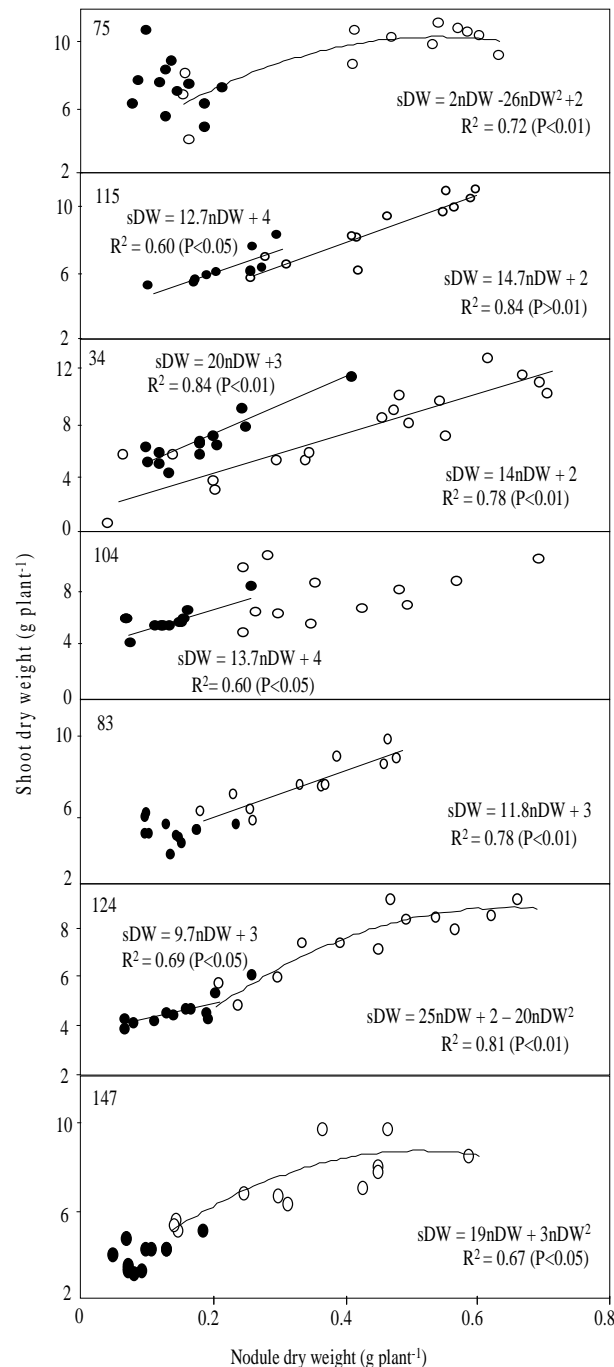


Figure 2. Effect of P nutrition on use efficiency of rhizobia symbiosis (the regression parameter of shoot as nodule) in 7 bean genotypes in hydroaerponics. Data are means SD of 12 replicates at 45 days after sowing. P deficiency ● versus ○ P sufficiency

3.2. Proton release by nodulated-roots

RILs and the interaction between P supply and RILs affected significantly the H^+ release cumulated during 12 days after transfer. For both P deficiency and sufficiency, the highest H^+ release was observed for 115 against the lowest one for 83 with a difference of about 60% between both RILs (Fig.3). The H^+ release of 115 was significantly higher than that of 75, 104, 124, 34 and 147 with values of 18%, 27%, 37%, 39% and 44%, respectively.

The data in figure 4a made it possible to calculate H^+ release $plant^{-1} d^{-1}$ and H^+ release $rDW^{-1} d^{-1}$. RILs and the interaction between P supply and RILs affected significantly these two parameters. The highest H^+ release $plant^{-1} d^{-1}$ under both P deficiency and sufficiency, was observed for 115 against the lowest one for 83 (Fig.4a). For 124, P deficiency decreased significantly this parameter by 26%, but it increased it by 27% and 10% for 75 and 34 respectively. The highest H^+ release $rDW^{-1} d^{-1}$ was observed for 115 against the lowest one for 83 (Fig.4b).

3.3. P concentration in shoot and nodules

The P supply, RILs and the interaction between P supply and RILs affected highly significantly the P concentration in shoot and nodule at flowering stages. Under P sufficiency, shoot P concentration was 1.5 to 2 fold higher for 34, 115 and 75 than for 147, 124 and 83. P deficiency decreased significantly the shoot P concentration for 147, 124 (Fig. 5a). Overall, the P concentration in nodules was 1.5 to 2 fold higher than in shoot. Under P sufficiency 34 had the significantly highest nodule P concentration. There was no difference between 124, 75, 115 and 104 whereas the significantly lowest value was observed for 147 and 83. Under P deficiency, the P nodule concentration decreased significantly for 147, 124 and 115, and was significantly higher for 34 than for 75, 104, 115, 83, 124 and 147 by 6, 21, 25, 38, 45 and 56% (Fig. 5b).

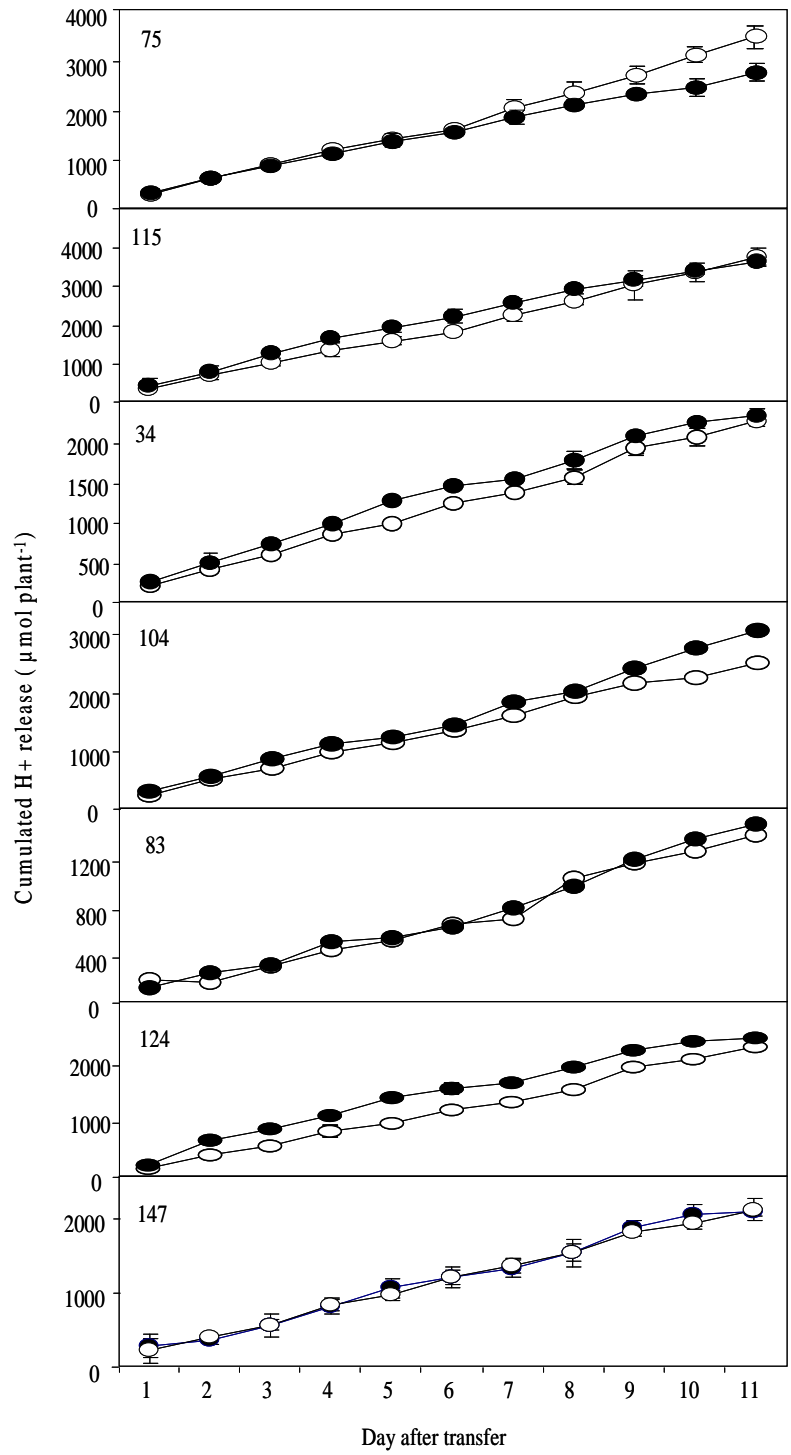


Figure 3. Effect of P nutrition on rhizosphere daily cumulated H⁺ release of 7 bean genotypes in hydroaerponics. Data are means SD of 12 replicates at 45 days after sowing. P deficiency ● versus P sufficiency ○

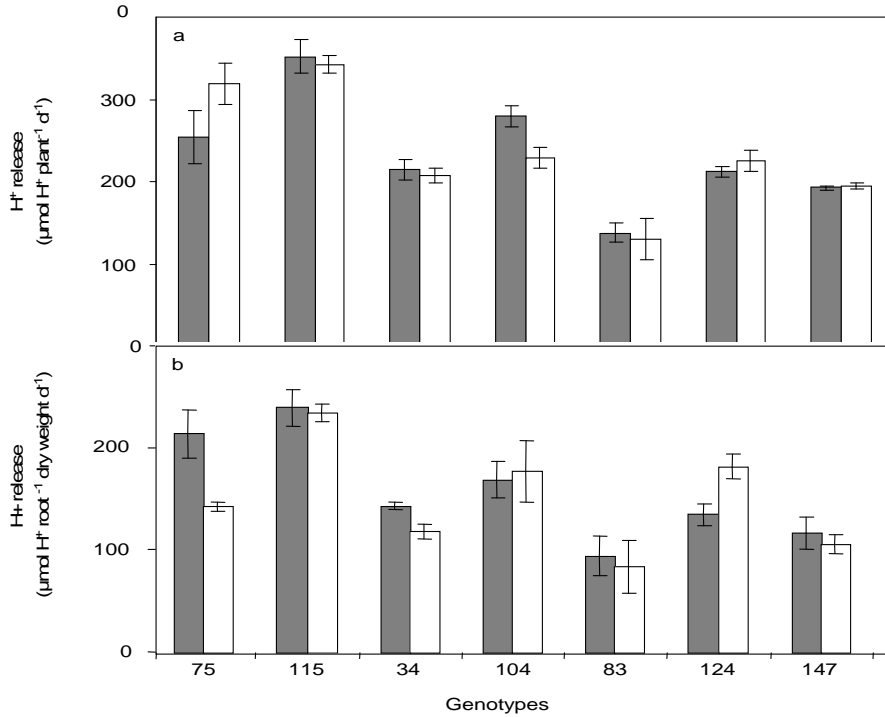


Figure 4. Effect of P nutrition on a) mean of daily H⁺ release per plant b) H⁺ release per root dry weight of 7 bean genotypes in hydroaeroponics. Data are means SD of 5 replicates harvested at 45 days after sowing. P deficiency versus P sufficiency

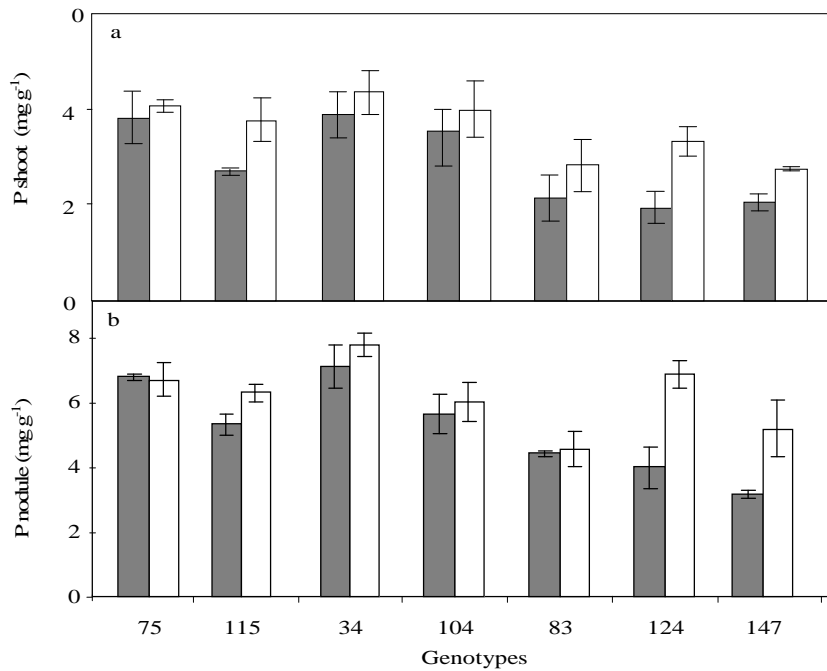


Figure 5. Effect of P nutrition on a) P shoot and b) P nodule of 7 bean genotypes in hydroaeroponics. Data are means SD of 5 replicates harvested at 45 days after sowing. P deficiency versus P sufficiency

2.4. Nodulated-root consumption of O₂

The response curves of the consumption of O₂ by the nodulated root (Conr) as a function of the external concentration of O₂ in figure 6 show that raising pO₂ induced an increase in Conr to a maximum value corresponding to the critical oxygen pressure (COP).

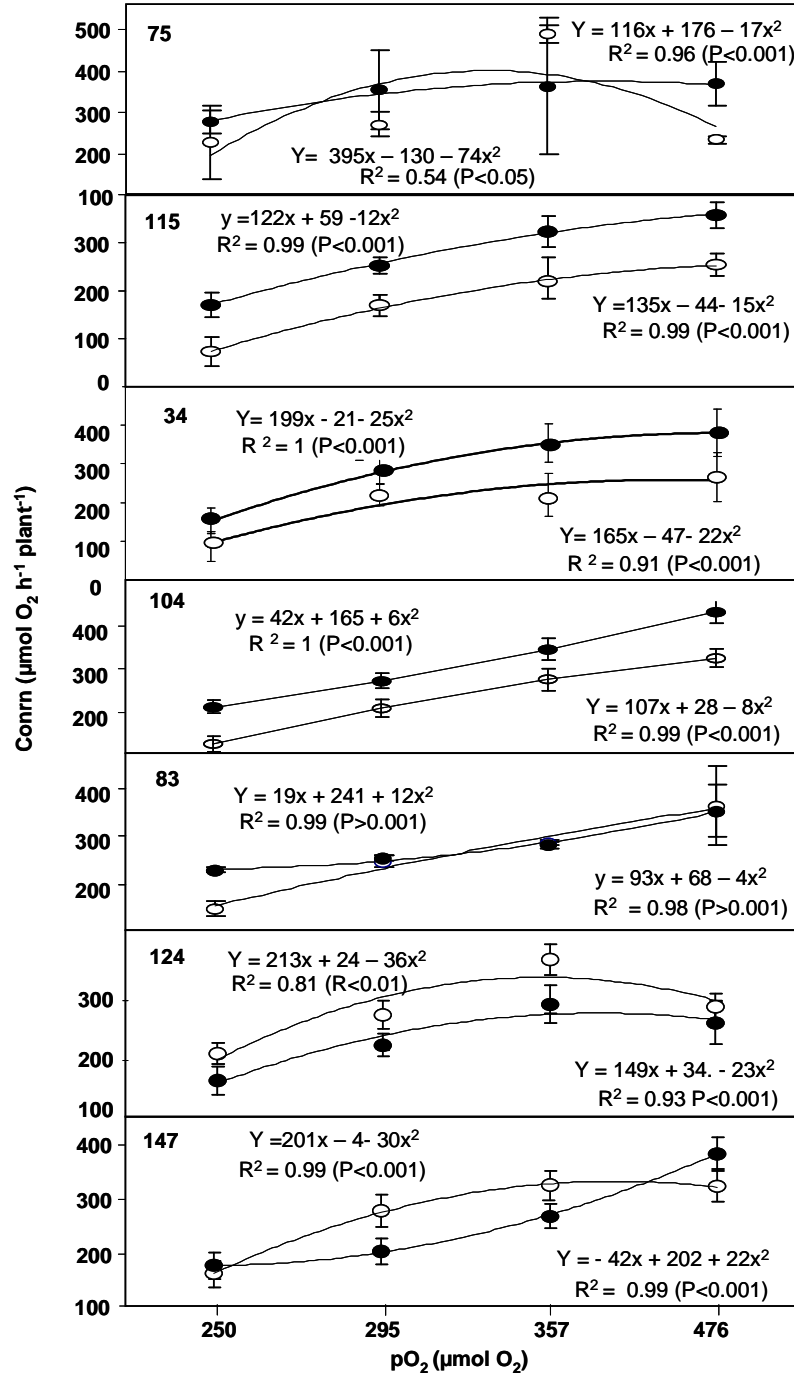


Figure 6. Nodulated root O₂ consumption as a function of rhizospheric O₂ pressure on for 7 bean genotypes under P sufficiency ○ versus P deficiency ●. Data are means SD of 6 replicates between 40 and 44th DAS in serum bottles.

Under P deficiency, the COP was the highest for 34 and 104, whereas it was the lowest for 124. Under P sufficiency the Conr was the highest for 83 and 75 with more than 400 $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$ whereas it was the lowest for 147 and 124 with about 300 $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$. Under ambiental pO_2 , 75 had the highest Conr value for both P deficiency and P sufficiency .

The nodule permeability was calculated as the slope of the response of Conr as a function of pO_2 as explained in detail in [12]. P deficiency decreased significantly the nodule permeability for 124 and 147 by 20 and 77%, respectively, and by contrast it increased this parameter significantly for 75 and 83 by 91 and 76%, respectively (Fig.6).

In order to assess whether the H^+ release was related to the O_2 respiration linked with SNF, the H^+ release was plotted as a function of the nodule permeability in Figure 7. Interestingly, we found a significant correlation between nodule permeability and H^+ release for RILs 147, 124, 104, 34 and 75.

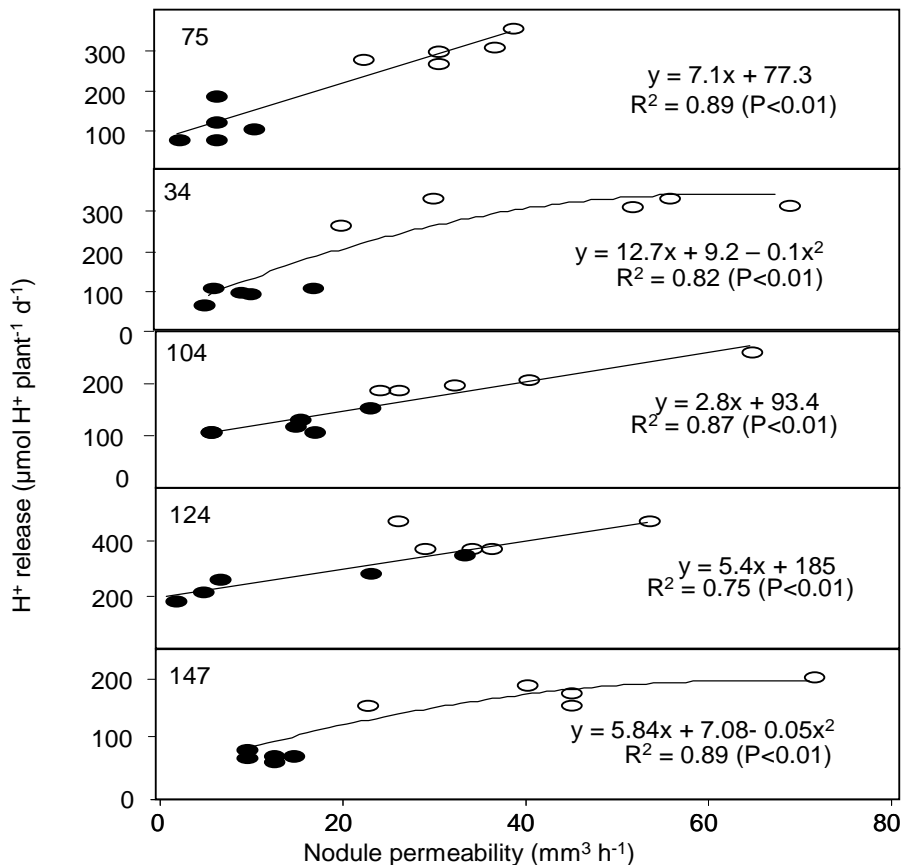


Figure 7. Relation between proton release with nodule permeability of 7 bean genotypes in hydroaerponics. Only the significant correlations were presented. Data are means SD of 4 replicates harvested at 45 day after sowing. P deficiency ● versus P sufficiency ○

4. Discussion

The major finding in this work is that H^+ release positively correlates with nodule gaz-permeability for 147, 124, 104, 75 and 34 (Fig.7). Although, the curvilinear regression of H^+ release as a function of nodule permeability for 147 and 34 suggest that positive correlation between these 2 parameters is valid only for nodule permeability below $40 \text{ mm}^3 \text{ h}^{-1}$. In these conditions, the correlation between H^+ release and nodule permeability suggests that part of the H^+ release may be related to symbiotic N_2 fixation since nodule permeability controls nodule respiration that supplies ATP for N_2 reduction catalysed by the bacteroidal nitrogenase within the nodule infected-zone [9,13]. Thus, the differences among RILs in amount H^+ release per unit permeability could be explained directly by differences in H^+ production per O_2 consumed by nodules. In this work, these genotypic differences did not relate significantly with the variations in nodule P concentration among RILs in response to P supply (Fig. 5) although. P concentration was up to 2 fold higher in nodules than in shoot under both P deficiency and sufficiency in agreement with previous observations of [29] for common bean. By contrast, above the nodule permeability of $40 \text{ mm}^3 \text{ h}^{-1}$, the steady H^+ release although the permeability raised (Fig. 7) can be compared with the steady shoot dry weight (sDW) although nodule dry weight (nDW) raised above 0.4 g per plant (Fig. 2). The later suggests that a decrease in activity of the additional nodules would compensate an excessive increase in number of nodules.

The differences among RILs in amount H^+ release can be explained indirectly by differences in cation-anion balance[23,26]. Thus nitrogen nutrition affects rhizosphere acidification by influencing the balance of anion and cation uptake by plants[14,7,8]. Legumes relying on N_2 fixation generally take up more cations than anions and thus extrude proportionally more H^+ than OH^- at the root–soil interface for compensation of electrical positive charges and regulation of cytosolic pH in their plant cells[22,25]. Also nodulated-roots might exudate organic anions that were not accounted for in cation-anion balance (Tang *et al.*, 2003). In contrast, plants supplied with nitrate (NO_3^-) acquire more anions than cations, and exudate hydroxyl ions to balance the electrical negative charges [25]. When exuded at large fluxes, organic anions can contribute some significant proportion of cation-anion balance as shown for citrate in white lupins [18] where H^+ release was not strictly related to citrate release under P deficiency [18]. In contrast, malate release shows a strong dependence on H^+ release[33]. The higher

rhizosphere acidification by the tolerant 75 and 115 than by the sensitive 147 and 83 (Fig 5) suggests an involvement of root-acidification capacity in the adaptation of common-bean to P deficiency. Thus, an essential enzyme for the plant adaptation to P deficiency would be H⁺-ATPase playing an essential role for the enhanced H⁺ release by roots in addition to a passive release of organic anions mediated by channel-like transporters [32]. It is generally accepted that plasma membrane H⁺-ATPase, as primary transporter, pumps protons (H⁺) out of the cell, thereby creating pH and electric-potential differences across the plasma membrane. Results of [20] also suggest an involvement of root plasma-membrane H⁺-ATPase in the adaptation of soybean to P starvation.

In conclusion, our study based on RILs shows that nodulated common-bean by CIAT 899 exudates a substantial amount of H⁺ into the rhizosphere that is linked to the nodule permeability to O₂ diffusion which supports the symbiotic N₂ fixation. It shows also that the tolerant nodulated common-bean to P deficiency acidifies more their rhizosphere than the sensitive ones. Further studies need to check if the same results will be observed with other rhizobial strain, and to address with molecular tools whether differences between RILs are associated with differences in phosphatase genes expression. Also the RILs are available for field-trials to test whether their potential differences in PUE and proton release are associated with differences in adaptation to low-P soils.

Acknowledgments

This work was supported by the Aquarhiz project of the EU INCOMED program and Tassili PHC of the French Ministry of Foreign Affairs. For her journey in Montpellier, Nora Alkama received a 18 months fellowship of the EU AVERROES program. The authors are grateful to H el ene Vailhe for excellent technical assistance, and Saber Kouas for fruitful exchanges.

5. References

- [1] N. Alkama, E. Bolou Bi Bolou, H. Vailhe, L. Roger, S.M. Ounane, J.J. Drevon, Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with variation of proton efflux in cowpea rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 41(2009) 1814–1823.

- [2] W.J. Broughton, G. Hernandez, B. Blair, S. Beebe, P. Gepts, J. Vanderleyden, Beans (*Phaseolus spp.*) –model food legumes. *Plant Soil* 252 (2003) 55–128.
- [3] I. Christiansen, P.H. Graham, Variation in dinitrogen fixation among Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown at low and high levels of phosphorus supply. *Fields Crops Research* 73 (2002) 133–142.
- [4] J.J. Drevon, V.C. Kalia, M.O. Heckmann, P. Pédalhore, *In situ* open-flow assay of soybean root nodular acetylene reduction activity: influence of acetylene and oxygen. *Plant Physiol Biochem.* 26 (1988) 73-78.
- [5] D. Föhse, N. Claassen, K.A. Jung, Phosphorus efficiency of plants. I. External and internal requirement and P uptake efficiency of different plant species. *Plant Soil* 110 (1988) 101-109.
- [6] P. Hernandez, J.J. Drevon, *In situ* assay of acetylene reduction by *Phaseolus vulgaris* root nodules: influence of oxygen. *Journal of Plant Physiol.* 138 (1991) 587-591.
- [7] P. Hinsinger, Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes – a review. *Plant Soil* 13 (2001) 173–195.
- [8] P. Hinsinger, C. Plassard, C. Tang, B. Jaillard, Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their environment constraint- a review. *Plant Soil* 248 (2003) 43-59.
- [9] S. Hunt, D.B. Layzell, Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annual Review Plant Physiol..Plant Molecular Biol.* 44 (1993) 483-511.
- [10] T. Isoi, S. Yoshida, Low nitrogen fixation of common-bean (*Phaseolus vulgaris*). *Soil Sci. Plant Nutrition* 37 (1991) 559-563.
- [11] D.W. Israel, Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol.* 84 (1987) 835-840.
- [12] M. Jebara, J.J. Drevon, Genotypic variation in nodule conductance to the oxygen diffusion in common-bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomie* 21 (2001) 667-674.
- [13] S. Kouas, N. Alkama, C. Abdelly, J.J. Drevon, Proton efflux by nodulated roots varies among common-bean genotypes (*Phaseolus vulgaris*) under phosphorus deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171 (2008) 242-248.
- [14] H. Marshner, Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. London: Academic Press, (1995).
- [15] G. Neuman, V. Römheld, Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 211 (1999) 121-130.
- [16] Y.F. Qiao, C. Tang, X.Z. Han, S. Miao, Phosphorus deficiency delays the onset of nodule function in soybean. *Journal of Plant Nutrition* 30 (2007) 1341–1353.
- [17] J. Ribet, J.J. Drevon, Increase in permeability to oxygen and in oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. *Physiology Plantarum* 94 (1995) 298-304.

- [18] L. Sas, Z. Rengel, C. Tang, .Excess cation uptake, and extrusion of proton and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency. *Plant Science* 160 (2001), 1191-1198.
- [19] L. Ström, A.G. Owen, D.L. Godbold, D.L. Jones, Organic acid behaviour in a calcareous soil: sorption reactions and biodegradation rates. *Soil Biol. Biochem.* 33 (2005) 2125-2133.
- [20] Shen, H., Chen, J., Wang, Z., Yang, C., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Matsumoto, H., Yan, X., 2006. Root plasma membrane H⁺-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany* 57, 1353-1362.
- [21] J. Schulze, J.J. Drevon, P-deficiency increases the O₂ uptake per N₂ reduced in alfalfa. *Journal of Experimental Botany* 56 (2005) 1779–1784.
- [22] C. Tang, C.D.A. McLay, L. Barton, A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37 (1997) 563-570.
- [23] C. Tang, P. Hinsinger, J.J. Drevon, B. Jaillard, B., Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* L. *Annals of Botany* 88 (2001) 131-138.
- [24] C. Tang, J.J. Drevon, B. Jaillard, G. Souche, P. Hinsinger, Proton efflux of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency. *Plant Soil* 260 (2004) 59-68.
- [25] C. Tang, Z. Rengel, Role of plant cation/anion uptake ratio in soil acidification. In *Handbook of Soil Acidity*, Ed. Z Rengel, Marcel Dekker, New York, (2003) 57-81.
- [26] C. Tang, X.Z. Han, Y.F. Qiao, S.J. Zheng, Phosphorus deficiency does not enhance proton efflux by roots of soybean [*Glycine max* (L.) Murr.]. *Environmental and Experimental Botany* 67 (2009) 228–234.
- [27] L.M. Thompson, F.R. Troeh, *Soils and Soil Fertility*. Mc Graw-Hill, Montreal, (1973) 495p.
- [28] V. Vadez, F. Rodier, H. Payré, J.J. Drevon, Nodule permeability to O₂ and nitrogenase-respiration in bean genotype varying in the tolerance of N₂ fixation to P deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 346, (1996) 871-878.
- [29] V. Vadez, J.J. Drevon, Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N₂ fixation in common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 21 (2001) 691-699.
- [30] C.P. Vance, Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in world of declining renewable resources*. *Plant Physiol.* 27 (2001) 390-397.
- [31] J.M. Vincent, *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. IBP handbook 15. Blackwell Science Publisher, Oxford, 1970 164 pp.

- [32] F. Yan, Y. Zhu, C. Müller, C. Zörb, S. Schubert, Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 129 (2002) 50-63.
- [33] Y. Zhu, F. Yan, C. Zörb, S. Schubert, A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions? *Plant Cell. Physiol.* 46 (2005) 892-901.

CHAPITRE 3

Genotypic variation of H⁺ efflux under P deficiency with nodulated-root respiration of N₂ - fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris*) in rhizotron

Dans le chapitre précédent l'étude est menée sous serre en hydroaéroponie. Elle est portée sur des lignées recombinantes (RILs) du haricot qui diffèrent dans leur tolérance à la déficience en P. Les résultats obtenus sont innovateurs. D'une part, nous avons démontré qu'en milieu hydroaéroponique, les racines nodulées du haricot excrètent dans leur rhizosphère une quantité d'H⁺ qui est corrélée à la perméabilité nodulaire. Ce qui laisse penser qu'une part d'H⁺ excrétée par les racines nodulées est liée à la fixation symbiotique d'azote atmosphérique. En effet, la perméabilité nodulaire contrôle la respiration qui fournit l'ATP pour la réduction de N₂ catalysé par la nitrogénase des bactéroïdes à l'intérieur de la zone infectée du nodule.

D'autre part, nous avons démontré que sous déficience en P les RILs tolérantes acidifient plus leur rhizosphère que les sensibles. Cependant le comportement de ces RILs en contact du sol rhizosphérique, en terme d'efflux de H⁺, n'est pas encore connu. Nous nous sommes intéressés, dans ce chapitre, à cet aspect.

Les objectifs de ce chapitre sont donc les suivants:

- 1) Etudier l'efflux de protons des racines nodulées des RILs contrastantes en contact du sol rhizosphérique
- 2) Comparer l'efflux de protons des lignées sensibles à celles des tolérantes.

Le dispositif utilisé pour la culture en rhizotron est celui utilisé lors des travaux de Alkama (2004) sur haricot (Figure ci-dessous). Ce dispositif permet d'étudier les phénomènes physico-chimiques qui se déroulent dans la rhizosphère en créant un sol rhizosphérique. Le sol rhizosphérique est le volume de sol influencé par les activités des racines. L'appréciation du volume du sol rhizosphérique est conditionnée par la méthode d'échantillonnage. Dans la plupart des études, le sol rhizosphérique est estimé comme étant le sol fixé sur les racines après avoir agité vigoureusement celles-ci. Cette méthode d'échantillonnage du sol rhizosphérique dépend de l'expérimentateur, alors que ce n'est pas le cas avec le dispositif utilisé. Les plantes sont récoltées 3 semaines

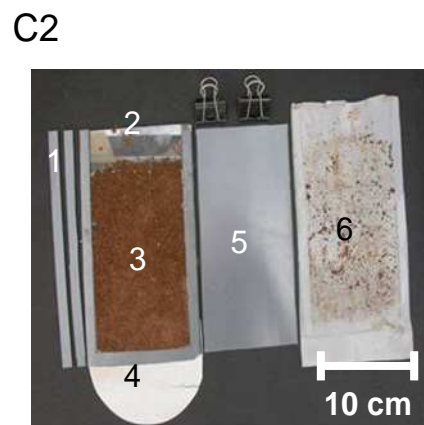
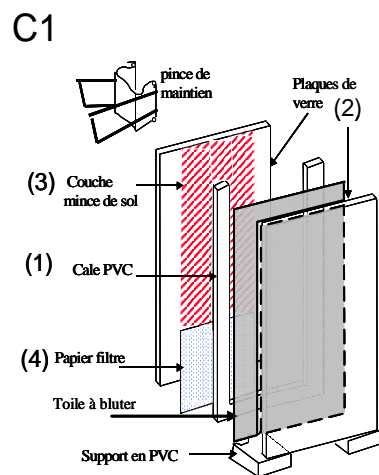
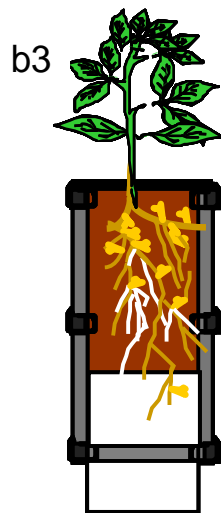


Figure. Dispositif de culture sur couche mince de sol transférées du bac après la cinquième semaine. (a) les plaques de sol dans des seaux à raison de 5 répétions par traitement. Couche de sol vue de, (b1) dos coté sol, (b2) face coté racines. (b3) schéma du dispositif. (C1) et (C2) les différentes pièces constituant le dispositif, (1), cales ; (2) plaque de verre; (3) couche de sol; (4) papier filtre; (5) support pour la plante; (6) toile à bluter.

après le transfert, et le sol est prélevé pour l'estimation de l'efflux de protons et du P assimilable. L'efflux de protons est déduit par calcul des variations du pH du sol induites par la culture des plantes. La quantité H^+ excrétée dans un sol cultivé est une fonction d'une part du pouvoir tampon (β) du sol, de la variation du pH (ΔpH) avant et après la culture et de la masse (M) du sol, et d'autre part du temps (Δt) de culture. Elle est donnée par la relation: $QH^+ = (\beta * \Delta pH * M) / \Delta t$ exprimé en $\mu mol\ plante^{-1}\ j^{-1}$, où β est exprimé en $\mu mol\ OH^- (g\ sol)^{-1}(unité\ pH)^{-1}$; ΔpH (en unité de pH), M (en g); Δt (en jours) (Helyar & Porter, 1989).

Références

Helyar, K.R., Porter, W.M., 1989. Soil acidification, its measurement and the processes involved. In: Soil Acidity and Plant Growth, A.D. Robson (ed.). *Academic Press, Sydney, Australia*, 65-82.

Proton efflux of nodulated-root varies among recombinant Inbred Lines of common-bean (*Phaseolus vulgaris*) BAT477xDOR364 under P deficiency in rhizotron?

Authors: Nora Alkama^{a,b,c,*}, Benoît Jaillard^a, Sidi Mohamed Ounane^c, Jean Jacques Drevon^{a,*}

Affiliation: ^a INRA-IRD-SUPAGRO, UMR Eco&Sol, Bat 12, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

^b Université Mouloud Mammeri, faculté des sciences biologiques et agronomiques, département d'agronomie, Tizi Ouzou. Algeria.

^c Institut National Agronomique, Département de phytotechnie, Hassan Badi, El Harrach, Algiers, Algeria.

Abstract

In order to examine genotypic variation of common bean in growth, phosphorus uptake, nodulated-root proton release as a function of P concentration in rhizospheric soil, seven common-bean recombinant inbred lines (RIL) from the cross of BAT477 x DOR364 were inoculated with *Rhizobium tropici* CIAT 899, and grown in rhizotron under glasshouse. Under P deficiency, the tolerant common-bean RILs acidified more their rhizosphere than the sensitive ones. Overall, the P concentration was 1.5 to 2 fold higher in nodules than in shoot. During assays, nitrogenase activity declined a few minutes after exposure of the nodulated roots to acetylene. For the tolerant RIL 115, the decline was larger in low-P than in control plants and the bump appears in P deficient.. In contrast in P sufficiency, for the sensitive RIL 147 the same results were observed like in P deficiency of the RIL 115. It is concluded that the genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with a variation in nodulated-root proton efflux and respiration in common bean rhizosphere, and that these parameters should be measured for more contrasting genotypes in order to test whether they correlate with the adaptation of N₂-dependent legumes to low-P soils.

Keys words: Bioavailability, Genotypes, ARA; Nitrogen fixation, Phosphorus, Rhizosphere, Symbiosis.

1. Introduction

Nitrogen (N₂)-fixing plants have an inherently higher phosphorus (P) demand than NO₃⁻ fed plants, which attributed to the high energetic cost of symbiotic N₂ fixation (SNF) (Ribet & Drevon, 1995). This is particularly true for common bean which is generally considered to be more sensitive than other legumes crops to most biotic and abiotic constraints, including P deficiency (Vadez *et al.*, 1996). Nodulation requires large allocation of plant P resources, nodule P concentration being up to 3-fold higher than that of the other organs (Jakobsen, 1985; Vadez *et al.*, 1999). A positive correlation between nodule number and P availability has been often documented, P deficiency leading to nodulation delay and impairment (Araujo & Teixeira, 2000; Kouas *et al.*, 2005). Nodule growth is more sensitive to P deficiency than plant growth (Drevon & Hartwig, 1997).

Some plant species have developed enhanced rhizosphere acidification among various morphological and physiological strategies to acquire sparingly soluble P from soil (Tang *et al.*, 2001; Hinsinger *et al.*, 2003). It is generally accepted that plasma membrane H⁺-ATPase, as primary transporter, pumps protons (H⁺) out of cells, thereby creating pH and electric potential differences across the plasma membrane. Schubert and Yan (1997) have demonstrated that the plasmalemma H⁺-ATPase of root cells plays an essential role during ammonium nutrition. An increase of the kinetic parameter V_{max} after ammonium nutrition suggests that the capacity of H⁺ release may be adjusted to the particular requirements of ammonium nutrition. In the same way, legumes relying on N₂ fixation generally take up more cations than anions and thus extrude into the rhizosphere proportionally more H⁺ than OH⁻ (Tang *et al.*, 1997). This acidification capacity is P-dependent. According to Sas *et al.* (2003), H⁺ efflux by P-deficient plants (grown at 1 and 5 μM P) was, on average, 2- to 3-fold than organic-acid exudation.

In previous work with common bean lines, Kouas *et al.* (2005) showed that nodule number and biomass were significantly diminished by low-P treatments. The present study addresses the question whether H⁺ efflux is related to a different adaptability of common bean lines to low P supply. Thus, the effect of P deficiency on H⁺ release was investigated in 7 contrasting common bean lines for tolerance to P deficiency.

2. Materials and methods

2.1 Biological material, soil and culture conditions

The seven RILs of *Phaseolus vulgaris* were selected among the progenies of the crossing of two parental RILs, namely BAT477 and DOR364, from the International Centre of Tropical Agriculture (CIAT, Cali, Colombia). Seeds were sterilized with 3% calcium hypochlorite for 5 min and rinsed by 5 washings with sterile distilled water. They were then transferred for germination on soft agar, consisting of 100 ml Bergersen solution containing 5 g mannitol and 7 g agar in 1 l of distilled water with sterilization at 120 °C for 20 min (Vincent, 1970).

The inoculation was performed by soaking 4 d-old seedlings for 30 min in a suspension of an inoculum of *Rhizobium tropici* CIAT899 containing 10^9 bacteria ml⁻¹. This rhizobia, kindly provided by the CIAT, is a reference for the studies on common-bean because of its high capacity to fix nitrogen and its ubiquity with the diversity among *P. vulgaris* (Vadez *et al.*, 1996). The inoculum was prepared from rhizobia culture preserved in tubes at 4 °C, on the following 120 °C sterilized agar YEM (Yeast Extract Mannitol) medium: 900 ml distilled water; 100 ml of Bergersen concentrated solution containing 1 g KCl; 0.1 g FeCl₃; 0.4 g CaCl₂, 4.5 g Na₂HPO₄·12H₂O and 1 g MgSO₄·7H₂O, firstly in 100 ml of distilled water then adjusted to 1 l, and subsequently added with 1 g Yeast extract, 10 g mannitol and 15 g agar (Vincent, 1970). Rhizobial colonies were transferred from preservation tubes into 100 ml of liquid YEM with stirring at 28 °C during 24 h.

For each P treatment, 20 inoculated plants were transferred into 45 l vat, 0.2 m large, 0.4 m long and 0.4 m high for hydroaerobic pre-culture during 28 d. Based on work of Vadez *et al.* (1996), P was supplied weekly in the form of KH₂PO₄ (75 or 250 μmol plant⁻¹ week⁻¹ for deficient or sufficient P supply) to the following nutrient solution that was changed every week: CaCl₂ (1650 mM); MgSO₄·7H₂O (1000 mM); K₂SO₄ (700 mM); Fe EDDHA (8.5 mM Fe as sequestrene); H₃BO₃ (4 mM); MnSO₄·H₂O (6mM); ZnSO₄·7H₂O (1 mM); CuSO₄·7H₂O (1 mM); Na₂MoO₄·7H₂O (0.1 mM). The oxygenation of the culture solution was ensured by a permanent flow of 400 ml⁻¹ min⁻¹ of compressed air. The pH was adjusted daily to a value of 6.8 with KOH (0.1 M). A supply of urea was provided with 2 mmol plant⁻¹ in the initial solution and 1 mmol plant⁻¹ at the first change of solution after two weeks, in order to optimize nodulation (Hernandez & Drevon, 1991). The plants were then grown in N-free nutrient solution.

The whole experiment was carried out in a glasshouse under temperature conditions of 28/20 °C during 16/8 h day/night cycle with an additional illumination of 400 mmol photons m⁻² s⁻¹ and 70% relative humidity during the day.

2.2 Measurement of proton efflux in rhizotron

In order to evaluate the influence of the nodulated root on the pH of the soil, 5 plants representing the mean growth in containers of each P treatment were transferred individually at 28 DAS into the rhizotron described previously by Alkama *et al.* (2009) for cowpea. The soil was characterized by high cation exchange capacity (CEC), neutral pH and low content of available P, in spite of its rather large total P content (Alkama *et al.*, 2009). It was sampled at a depth of 5–20 cm in Cazevieille (South of France), and was sieved (<2 mm) after removing stones and plant residues. It is classified as a fersiallitic soil, i.e. chromic cambisols according to FAO–UNESCO (1989). A polyamide mesh of 30 mm (Nytrel 0.2SPN, Fyltis-U.G.B., Lyon, France) separated the soil from roots without limiting the exchange of water and chemical with the nodulated roots (Hinsinger & Gilkes, 1997). Each 24 g of soil used in each rhizotron was incubated for 4 d at 20 °C. The rhizotrons were fixed vertically into buckets, with a filter paper as wick bathing in the previously described nutrient solution.

The initial pH of the soil was measured in an aqueous suspension with a soil/water ratio of 1/5 (v/v), after having calculated the water content of each sample. At harvest, a fraction of soil of each replicate was weighed then dried at 105 °C for 24 h to estimate the water content of each soil sample. The H⁺ efflux, expressed in mmol plant⁻¹ d⁻¹, was calculated as: $QH^+ (\beta_s * \Delta H * Ma)t^{-1}$ where, β_s is buffer capacity of the soil in mmol OH⁻ g⁻¹ soil unit pH, ΔH is difference between the final pH at harvest and the initial pH before the culture, Ma is mass of soil used in g, t is the duration of culture in d (Helyar & Porter, 1989). The soil buffering capacity was assessed by decreasing or increasing soil pH by 1 unit after addition of a solution of H₂SO₄ or KOH. According to the proton balance, the soil pH depends upon the amount of H⁺ added or depleted from soil solution and the intensity of the soil buffer that depends on the contents of clay and organic matter (Conyers *et al.*, 1995).

2.3 Gas exchange measurement

In order to assess whether the above differences in EUSR link with nodule nitrogenase activity the later was addressed with the acetylene reduction assay for only 115 and 147, the two contrasted RILs for P deficiency. This measurement was done only on the two RILs because of its complexity on the rhizobox.

Measurement of ARA were performed with injecting C_2H_2 in rhizobox a flow –through system. C_2H_4 content in the out. It is performed with injecting C_2H_2 in rhizobox a flow –through system. C_2H_4 content in the out-flow was analysed with catarometer. Gas samples were taken at different times every two minutes. For genotype investigation, ARA was measured during 90 min at 48 day after sowing.

2.4 Analysis at harvest and statistical data processing

The plants were harvested at the flowering stage with the first pod measuring 2 cm long. The shoot was separated from the root at the cotyledonary node, then weighed after 48 h at 70 °C. Nodules were separated from the roots, counted and weighed separately. Soil samples were dried at 105 °C for 24 h. Their pH was measured in an aqueous suspension shaken at 1200 rotations min^{-1} for 30 min with a soil/solution ration of 1/5.

The available P of the soil was measured by the Olsen method according to standard NF ISO 11263 after extraction by soil agitation with a solution of 0.5 N sodium bicarbonate with pH 8.5.

In order to determine the contribution of P supply to plant growth, the response curves were established from biomass values with the software Excel Microsoft Office XP.

For regressions shown in various figures, covariance analysis was performed for the calculation of the F value, with decision of significance for $p < 0.05$. Differences between means of all parameters for sufficient versus deficient P treatments were determined by two-way analysis of variance (ANOVA) and significance was tested with the Fisher's LSD test, with $p < 0.05$, $P < 0.01$ as significant and highly significant, respectively.

3. Results

3.1 Growth and nodulation

The P supply and RILs affected significantly the shoot, root and nodule biomass. P deficiency decreased significantly the shoot biomass by circa 40% for 83, 75 and 124 and by 24% for 147, whereas the decrease was less than 25%, and not significant, for 115, 34 and 104 (Fig. 1a).

Under P sufficiency, the nodule biomass was significantly higher for 124 and 115 than for the other RILs (Fig. 1b). The nodule biomass of 83 under P sufficiency was 6-fold larger than under P deficiency whereas it was 4.7, 2.8, 1.7, 1.5 fold for 104, 124, 34 and 115. By contrast root biomass was not significantly affected by P deficiency, no by its interaction with RILs (Fig. 1c). The P supply and RILs affected significantly the nodule number, with decrease of more than 60% for 34 and only 3% for 147 (Fig. 1d) under P deficiency. P decreased significantly the individual nodule mass by more than 80% for 104 and 83, and 50% for 124 (Fig. 1e). By contrast, there was no difference in individual nodule biomass between P sufficiency and P deficiency for 75, 115, 34 and 147.

In order to assess the efficiency in use of the rhizobial symbiosis (EURS), the values of the shoot biomass were plotted as a function of those of nodule biomass in figure 2 with the slope of the regressions being an estimate of the EURS. Significant regressions were found for the RIL 124 with a significantly lower EURS under P sufficiency than under P deficiency (Fig. 2). Although no significant regressions were observed for other RILs whatever the P supply.

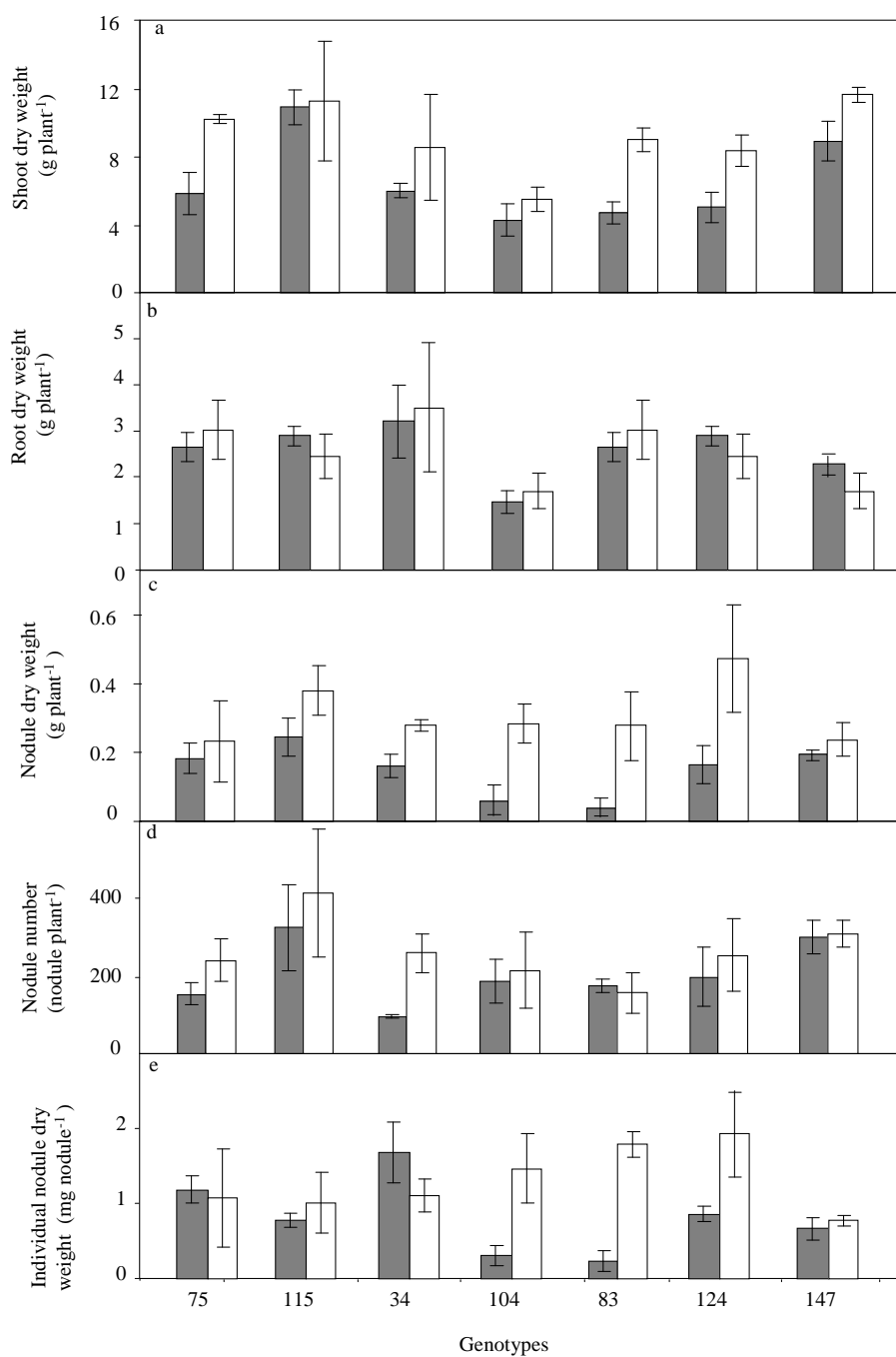


Figure 1. Effect of P nutrition on a) shoot b) root biomass c) nodule biomass d) nodule number and e) individual nodule biomass in 7 bean genotypes inrhizotron. Data are means and SD of 6 harvested plants at 45 day after sowing. P deficiency versus P sufficiency

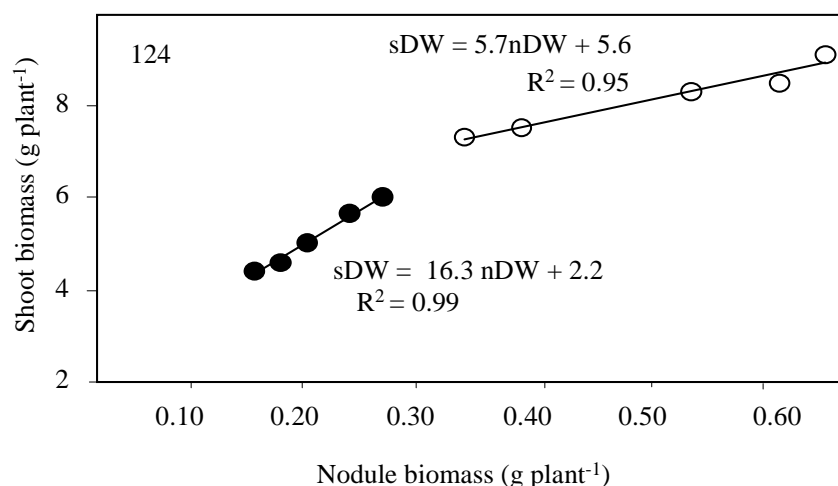


Figure 2. Effect Of P nutrition on use efficiency of symbiotic nitrogen fixation (EUSR) (the regression parameter of shoot as a function of nodule) of the genotypes in rhizotron. Significant regression were found only for the RIL 124 with significantly lower EUSR under P sufficiency than under P deficiency. Data are means SD of 5 replicates harvested at 45 days after sowing.

3.2 Proton efflux by nodulated-roots

RILs and the interaction between P supply and RILs affected significantly the pH of the rhizosphere whereas P supply had no effect. Under P sufficiency, 34, 104, 75 and 115 induced the lowest pH, whereas under P deficiency, 75 and 104 induced the lowest pH in contrast with 147 with a significant difference of about 10% between RILs (Fig 3a).

The data in figure 3a made it possible to calculate H^+ efflux $plant^{-1} d^{-1}$ and H^+ efflux $rDW^{-1} d^{-1}$ from soil buffering capacity as described in materials and methods. Under P sufficiency there was more H^+ efflux $plant^{-1} d^{-1}$ for 34, 104, 75 and 115 than for 124, 83 and 147 (Fig. 3b), and the H^+ efflux $rDW^{-1} d^{-1}$ for 75, 104 and 34 was significantly higher than for 115, 83, 124 and 147 by more than 30%. Under P sufficiency 83 was significantly lower than 104, 147 and 115 by more than 40% (Fig 3c).

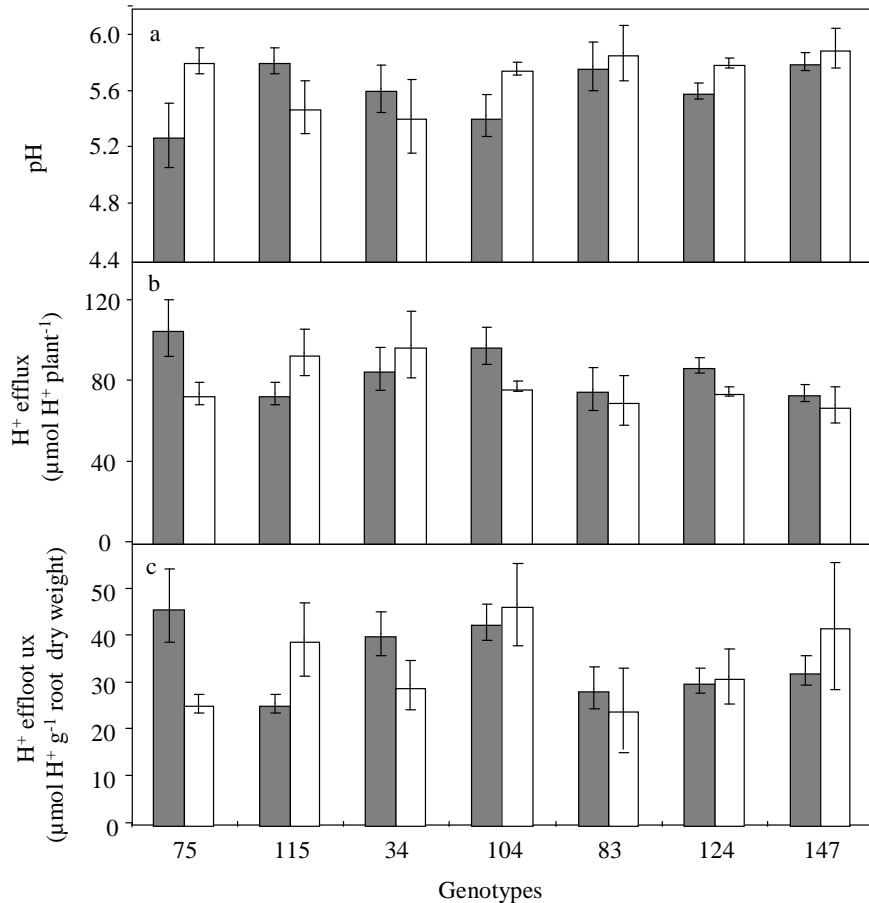


Figure 3. Effect of P nutrition on a) pH, b) mean of daily H⁺ efflux per plant, c) H⁺ efflux per root dry weight of 7 common bean genotypes in rhizotron. Data are means SD of 6 replicates harvested at 45 days after sowing. P sufficiency □ versus P deficiency ■

3.3 P concentration in shoot and nodules

P supply, RILs and the interaction between P supply and RILs affected significantly the P concentration in shoot and nodules at flowering stage. P deficiency decreased significantly the shoot P concentration for 147, 124 and 83, 104 and 115 (Fig. 4a). The values for 75 and 34 were significantly higher than for 124, 83 and 147 by 37, 45 and 47%, respectively. With the other RILs the difference was less than 18%, and no significant. P deficiency decreased significantly the nodule P concentration for 147, 124, 83, 104 34 and 115 (Fig. 4b). The highest value was for 34 and 75 that was significantly higher than for 124, 147 and 83 by nearly 40%, and than 104 by 20%. There was no significant difference with 115. Like in hydroaerponics (Alkama *et al.*,

submitted), 34, 75 and 115 show a high capacity to concentrate P in their shoot and nodules.

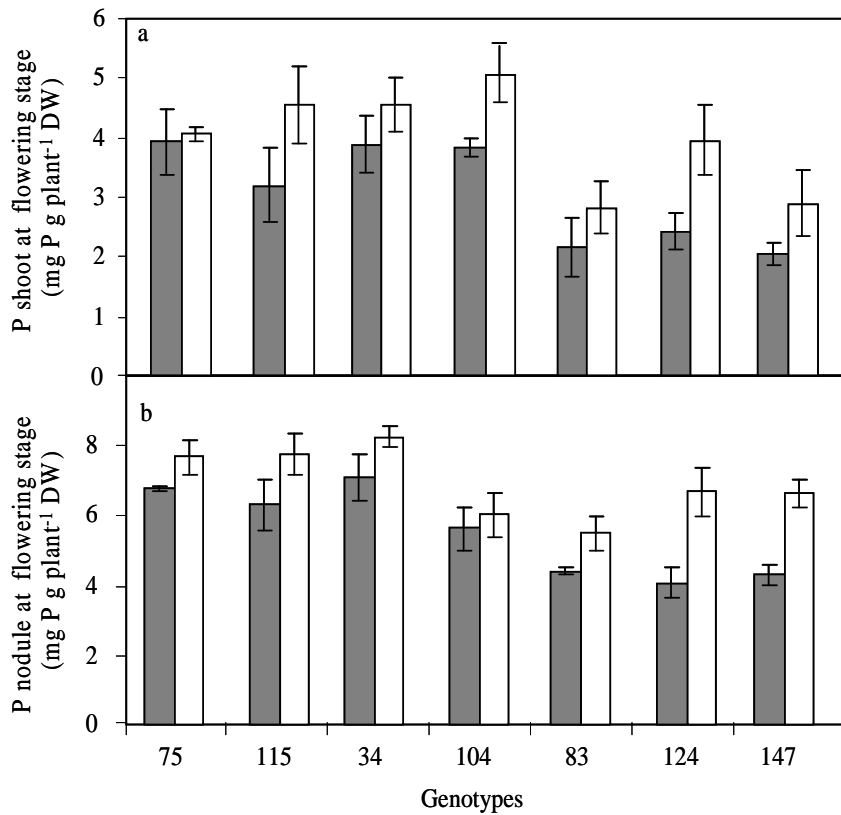


Figure 4. Effect of P nutrition on a) shoot and b) nodules at flowering stage of 7 bean genotypes in rhizotron. Data are means SD of 6 replicates harvested at 45 days after sowing. P sufficiency □ versus P deficiency ■

3.4 Nodule and plant nitrogenase activity

ARA was assayed for the contrasting RILs 115 and 147 at flowering stage. For the RIL 115, under P sufficiency the ARA for the first replicate was relatively steady during all the time of the exposure to C₂H₂ (Fig 5a). But, for the two other replicates we observed a maximal activity of nitrogenase after 20 min exposure to C₂H₂ (Fig. 5b,c). However in the onset of the evolution of ARA of the replicates 2 and 3 we observed at the first 4 min of evolution a more intense activity than after. By contrast, under P deficiency the ARA of the first replicate was more intensive than from 5 to 10 min (Fig.5d). It is!! followed from 9 to 12 min a new period of intense activity than by a weak activity until 30min where we observed a new intense ARA. The low values between 17 and 25 min corresponded probably to a gas leak into the sampling syringe. It might be the same for the replicates 2 and 3 where leaks were observed (Fig. 5e, f).

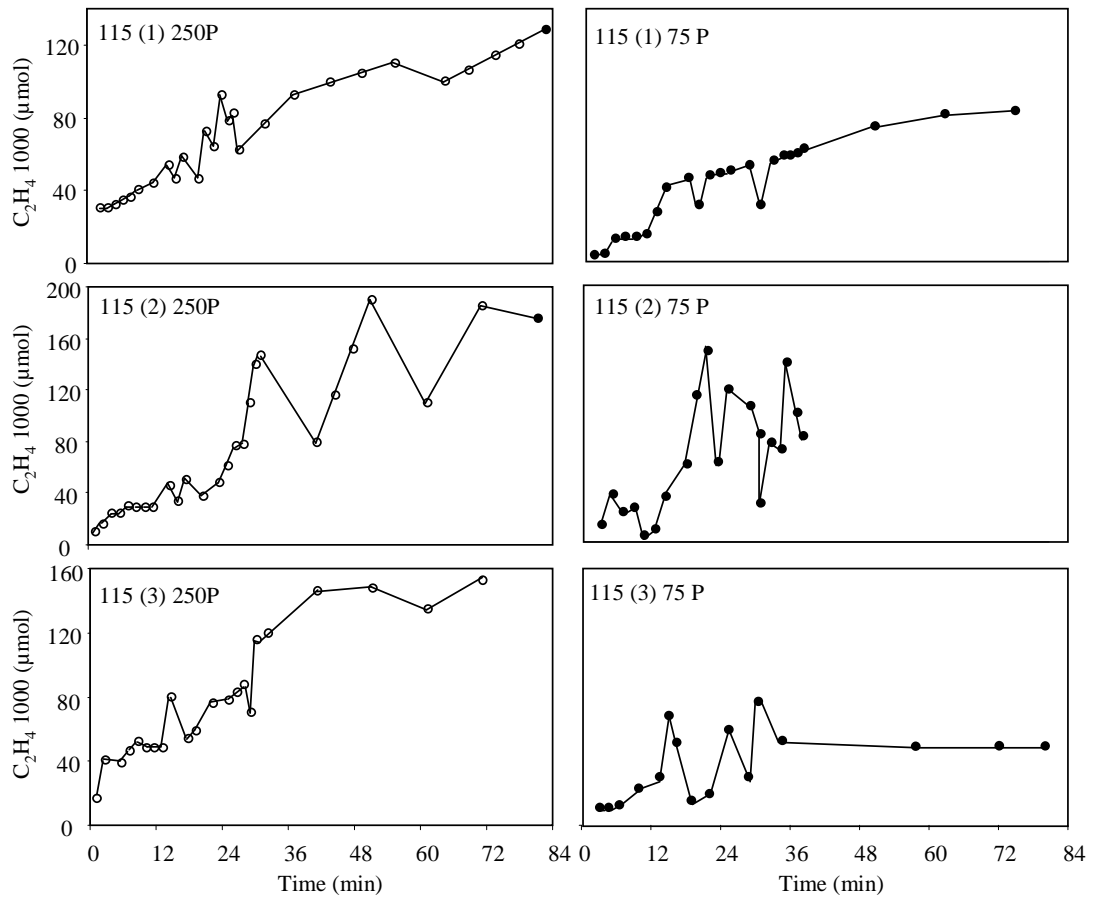


Figure 5. C_2H_4 evolution on time in minutes of the genotype 115 under P sufficiency ○ versus P deficiency ●. The numbers 1, 2 & 3 indicates the replicates

For the RIL 147 under P sufficiency, ARA kinetics were close to those observed for the RIL 115 under P deficiency. The ARA of the first replicate was more intensive than from 6 to 12min (Fig. 6a). It is followed from 12 to 19 min by a new period of intense activity then by a weak activity until 28min when was observed a new intense activity of reduction of acetylene (Fig. 6a). Again the less value observed at 15 and 18 min corresponded probably to a gas leak . For the second replicate we observed the same evolution of ARA but the measurement was stopped at 30min because of gas leak (Fig. 6b). In the third replicate a lot of leaks were observed. We can suppose that the evolution of ARA will be as the two first replicates because the evolution started as them.

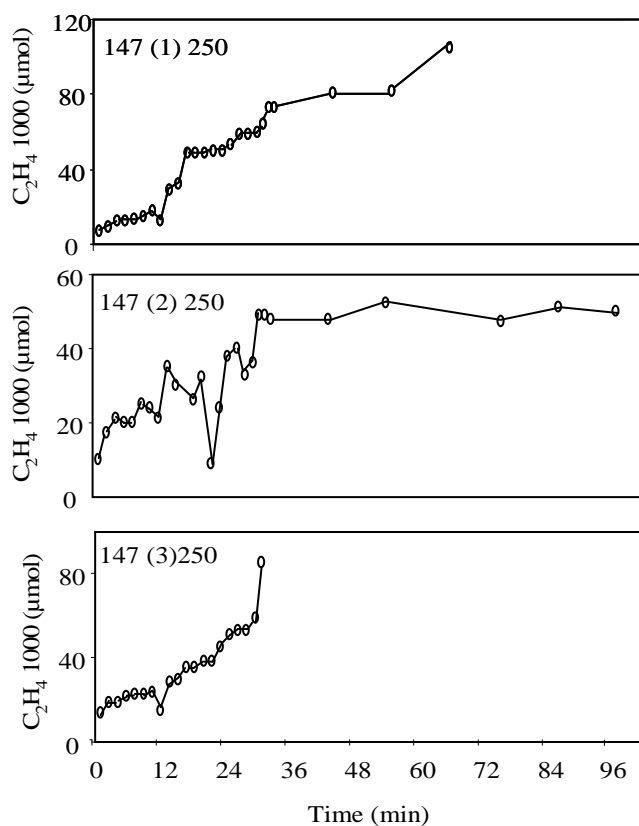
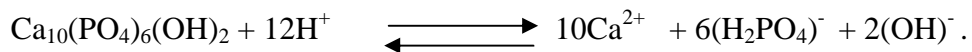


Figure 6. C_2H_4 evolution on time in minutes of the genotype 147 under P sufficiency. The numbers 1, 2 & 3 indicates the replicates

4. Discussion

The aim of this research was to investigate the relation between P nutrition and proton efflux by nodulated-roots of seven genotypes of common bean in rhizotron in order to address whether a P-efficient genotype may have more proton efflux than a P-inefficient one. Differences in P-requirements between the RILs (Fig. 1, 2, 3) agrees with previous descriptions of genotypic variations for bean P-requirement in pots or in field by Kolawole *et al.* (2000), Krasilnikoff *et al.* (2003), Sanginga *et al.* (2000) and Alkama *et al.* (2009). The greater tolerance of 115, 75 and 34 compared to others is related to a greater phosphorus use efficiency (PUE) that is illustrated by greater growth of nodules, shoot and roots with the same amount of available P (Fig. 3,4). The greater P requirement for nodules than shoot agrees with the previous observation that the P content is three-fold larger in nodules than in shoots for *A. mangium* (Ribet & Drevon, 1996) and *G. max* (Ribet & Drevon, 1995). The high requirement of P for nodules might be related to high energy requirement of the FSN process (Israel, 1987), i.e. the equivalent of 30 ATP per N_2 reduced (Salsac *et al.*, 1984).

The greater H⁺ efflux for the P-efficient than for the P-inefficient agrees with previous conclusion of Tang *et al.* (2001a) with *P. vulgaris*. The greater H⁺ efflux under P sufficiency than deficiency is consistent with the finding in genotypes of *G. max* (Tang *et al.*, 2007) but contrasts with previous observations of a stimulation of the H⁺ efflux by P deficiency under the same conditions with *M. sativa* (Tang *et al.*, 2001b) and *P. vulgaris* (Alkama, 2004, unpublished). The acidification of the common bean rhizosphere could be related to an excess of cation absorption (Tang, 2001a; Hinsinger *et al.*, 2003). The rhizospheric acidification could contribute to the adaptation of legume genotypes and species to P deficiency through the effects on P bioavailability. In the soil of our study, the P that is fixed in the calcic-phosphatic complexes can be solubilized according to the following equation for hydroxyapatite which shows the solubilizing effect of H⁺ (Hinsinger & Gilkes, 1997):



During ARA assays, nitrogenase activity declined a few minutes after exposure of the nodulated roots to acetylene. For the tolerant RIL 115, the decline was larger in low-P than in control plants and the transient ARA increase appears in P deficient. In contrast in P sufficiency, the same results were observed like in P deficiency of the RIL 115 confirmed the results obtained by Drevon & Hartwig with soybean and alfalfa (1997). They hypothesized that exposure to Ar/C₂H₂ stimulates nitrogenase activity because of a faster electron transfer to H⁺ only (Thorneley & Eady 1977) and an excess of energy due to the absence of N₂ fixation. These stimulations of nitrogenase activity would rapidly exhaust the pool of readily available reductant causing a decrease in respiration followed by an increase in nodule O₂ concentration and a subsequent decrease in nodule permeability.

The transient arrest of the decline in nitrogenase activity in the control might be due to a transient mobilization of an additional source of reductant. The latter would be less available under P deficiency since the arrest was not observed in low-P plants. The partial recovery of ARA evolution has previously been described only in *Myrica gale* exposed to C₂H₂ (Tjepkema & Schwintzer, 1992). The increases in nitrogenase activity may correspond to increases in nodule permeability, although they are faster than the increases in nodule permeability caused by the transfer of intact nodule from ambiental to limiting pO₂ (Weisz & Sinclair 1987; Drevon *et al.*, 1995). Alternatively, these partial recoveries might be due to the establishment of a new balance between metabolic

processes involved in NAD(P)H and ATP generation following their disturbance by exposure of nodulated-roots to Ar or C₂H₂ (Bergersen & Turner 1992; Streeter, 1995). It may be relevant that these adjustments are slower under P deficiency.

Taken altogether, our observations support the conclusion that for the RILs the the H⁺ efflux is greater in the rhizosphere of the most P-efficient genotype, though it is not stimulated by the later.. Another conclusion supported by our study is that a relatively large C₂H₂-ID occurs whenever an environmental factor, like P deficiency, limits nodule development and growth more than the growth of other plant organs, therefore causing a saturation of the capacity of the symbiosis to satisfy. Further work is needed to adapt the rhizotron device to the large tap-root, in order to explore the relationships between H⁺ efflux, nodule respiration and P solubilization in common bean rhizosphere with a larger collection of contrasting genotypes.

Acknowledgments

This work was supported by Aquarhiz project of the EU INCOMED program and Tassili PHC of the French ministry of foreign affairs. For her journey in Montpellier, Nora Alkama received a 18 months fellowship of the EU AVERROES program. The autors are garteful to Hélène Vailhe for excellent technical assistance.

5. References

- Alkama N., Bolou Bi Bolou E., Vailhe H., Roger L., Ounane S.M., Drevon J.J., 2009. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with variation of proton efflux in cowpea rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1814–1823.
- Araujo A.P., Teixeira M.G., 2000. Ontogenetic variations on absorption and utilization of phosphorus in common bean cultivars under biological nitrogen fixation. *Plant Soil* 225, 1-10.
- Bergersen F.J., Turner G.L., 1992. Supply of O₂ regulates O₂ demand during utilization of reserves of poly- -hydroxybutyrate in N₂-fixing soybean bacteroids. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 249, 143-48
- Conyers, M.K., Uren, N.C., Helyar, K.R., 1995. Causes of changes in pH in acid mineral soils. *Soil Biol. Biochem.* 27, 1383-1392.
- Drevon J.J., Hartwig U.A., 1997. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. *Planta* 201, 463-469.

- Drevon J.J., Deransart C., Irekti H., Payre H., Roy G., Serraj R.; 1995. La salinité abaisse la conductance des nodosités a la diffusion de l'oxygène. In: Drevon J.J. (ed) Facteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote dans le bassin méditerranéen. INRA (Les Colloques n°77), Paris, pp 73-4
- Durand J.L., Sheehy J.E., Minchin F.R., 1987. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation. *J. Exp. Bot.* 38, 311-321.
- Evans H.J., Hanus F.J., Russell S.A., Harker A.R., Lambert G.R., Dalton D.A., 1985. Biochemical characterization, evaluation and genetics of H₂ recycling in *Rhizobium*. In: Ludden P.W., Burris J.E. (eds) Nitrogen fixation and CO₂ metabolism. Elsevier, New York, pp 3-11
- Hartwig U.A., Boller B.C., NoÈsberger J., 1987. Oxygen supply limits nitrogenase activity in clover nodules after defoliation. *Ann. Bot.* 59, 285-291.
- Hartwig U.A., Heim I., LuÈscher A., NoÈsberger J., 1994. The nitrogensink is involved in the regulation of nitrogenase in white clover after deolation. *Physiol. Plant* 92, 375-382.
- Heckmann M.O., Drevon J.J., Saglio P., Salsac L., 1989. Effect of oxygen and malate on NO₃⁻ inhibition of nitrogenase inhibition of nitrogenase in soybean nodules. *Plant Physiol.* 90, 224-229.
- Heim I., Hartwig U.A., NoÈsberger J., 1993. Current nitrogen fixation is involved in the regulation of nitrogenase activity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Physiol.* 103, 1009-1014
- Helyar, K.R., Porter, W.M., 1989. Soil acidification, its measurement and the processes involved. In: Soil Acidity and Plant Growth, A.D. Robson (ed.). *Academic Press, Sydney, Australia*, 65-82.
- Israel D.W. 1987. Investigation on the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol.* 69, 835-840.
- Jakobsen I., 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*) *Physiologia Plantarum* 64, 190–196
- Kolawole G., Tian Guang L., Singh B.B., 2000. Differential response of cowpea lines to aluminium and phosphorus application. *J. Plant Nutr.* 23,731–740.
- Kouas S., Labidi N., Debez A., Abdelly C., 2005. Effect of P on nodule formation and N fixation in bean. *Agron. Sustain.* 25, 389–393
- Kouas, S., Alkama, N., Abdelly, C., Drevon, J.J., 2008. Proton efflux by nodulated roots varies among common-bean genotypes (*Phaseolus vulgaris*) under phosphorus deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 171, 242-248.

- Krasilnikoff G., Gahoonia T., Nielsen N., 2003. Variation in phosphorus uptake efficiency by genotypes of cowpea (*Vigna unguiculata*) due to differences in root hair length and induced rhizosphere processes. *Plant Soil* 251, 83–91.
- Minchin F.R., Minguez M.I., Sheehy J.E., Witty J.F., Skot L. 1986. Relations between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation in white clover. *J. Exp. Bot.* 3, 1103-1113
- Minchin F.R., Witty J.F., Sheehy J.E., Muller M., 1983. A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *J. Exp. Bot.* 34, 641-649.
- Pankhurst C.E., Sprent J.I., 1975. Effects of water stress on the respiratory and nitrogen-fixing activity of soybean root nodules. *J. Exp. Bot.* 91, 287-304.
- Ribet J., Drevon J.J., 1996. The phosphorus requirement of N₂-fixation and urea-fed *Acacia mangium*. *New Phytol.* 132, 383–390.
- Ribet J., Drevon, J.J., 1995. Increase in permeability to oxygen and in oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. *Physiology Plantarum* 94, 298-304.
- Ribet J., Drevon J.J., 1995b. Phosphorus deficiency increases the acetylene-induced decline of nitrogenase activity in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J. Exp. Bot.* 46, 1479-1486.
- Salsac L., Drevon J.J., Zengbe M., Cleyet-Marel J.C., Obaton, M., 1984. Energy requirement of symbiotic nitrogen fixation. *Physiologie Vegetale* 22, 509–521.
- Sanginga N., Lyasso O., Singh B.B., 2000. Phosphorus use efficiency and nitrogen balance of cowpea breeding lines in low phosphorus soil of the derived savanna zone in West Africa. *Plant Soil* 220, 119–128.
- Sas L., Marschner H., Römheld V., 2003. Effect of nitrogen forms on growth and chemical changes in the rhizosphere of strawberry plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 25, 241-247.
- Sas, L., Rengel, Z., Tang, C., 2001. Excess cation uptake, and extrusion of proton and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency. *Plant Sci.* 160, 1191-1198.
- Schubert S, Yan F., 1997. Nitrate and ammonium nutrition of plants: effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma H⁺ ATPase. *Z Pflanzen Bodenk* 160, 275-281.
- Serraj R., Roy G., Drevon J.J., 1994. Salt-stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion. *Physiol. Plant* 91, 161-168.
- Sprent J.I., 1972. The effects of water stress on nitrogen fixing root nodules. III. Effects of osmotically applied stress. *New Phytol.* 71, 451-460.
- Streeter J.G., 1995. A new model for rapid effects of non-invasive treatments on nitrogenase and respiratory activity in legume nodules. *J. Theor. Biol.* 174, 441-452.

- Ström, L., Owen, A.G., Godbold, D.L., Jones, D.L., 2005. Organic acid behaviour in a calcareous soil: sorption reactions and biodegradation rates. *Soil Biol Biochem.* 33, 2125-2133.
- Tang C., Hinsinger P., Jaillard B., Rengel Z., Drevon J.J., 2001a. Effect of phosphorus sub-deficiency on growth, symbiotic N₂ fixation and proton efflux by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie* 21, 683–689.
- Tang C., Hinsinger P., Drevon J.J., Jaillard B., 2001b. Phosphorus sub-deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton efflux in roots of *Medicago truncatula* L. *Annals Botany* 88, 131–138.
- Tang C., Qiao Y.F., Han X.Z., Zheng S.J., 2007. Genotypic variation in phosphorus utilization of soybean (*Glycine max* (L.) Murr.) grown in various sparingly soluble P sources. *Australian J. Agr Res.* 58, 443–451.
- Tang, C., McLay C.D.A., Barton, L., 1997. A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Australian J. Exp. Agri.* 37, 563-570.
- Thorneley R.N.F., Eady R.R., 1977. Distinction between proton-reducing and acetylene-reducing forms of the enzyme: effect of temperature and component protein ratio on substrate-reduction kinetics. *Biochem. J.* 167, 457-461.
- Tjepkema J.D., Schwintzer C.R., 1992. Factors affecting the acetylene-induced decline during nitrogenase assays in root nodules of *Myrica gale* L. *Plant Physiol.* 98, 1451-1459.
- Vadez V., Lasso J., Beck D., Drevon J.J., 1999. Variability of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P sub-deficiency is related to P use efficiency. *Euphytica* 106, 231–242.
- Vadez, V., Rodier, F., Payré, H., Drevon, J.J., 1996. Nodule permeability to O₂ and nitrogenase-respiration in bean genotype varying in the tolerance of N₂ fixation to P deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 34 (6) 871-878.
- Vincent, J.M., 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP handbook 15. Blackwell Science Publisher, Oxford. 164 pp.
- Walsh K.B., Vessey J.K., Layzell D.B., 1992. Carbohydrate supply and N₂ fixation in soybean: the effect of varied day length and stem girdling. *Plant Physiol.* 85,137-144.
- Weisz P.R., Sinclair T.R., 1987. Regulation of soybean nitrogen fixation in response to rhizosphere oxygen. II Quantification of nodule gas permeability. *Plant Physiol.* 84, 906-910.

CHAPITRE 4

Nodulation et croissance des lignées recombinantes contrastantes du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) en multisites dans la région de Tizi Ouzou

Dans le chapitre précédent, nous avons intégré une première approche en conditions contrôlées sous serre. Le comportement des lignées contrastantes a été étudié en contact avec le sol rhizosphérique. Les résultats obtenus rejoignent ceux obtenus en hydroaéroponie où il a été démontré que les lignées sensibles secrétaient moins d'efflux de protons que les tolérantes.

Dans ce chapitre l'étude des RILs est élargie sur d'autres sols en place. Cette approche est basée sur des essais multi-locaux, en plein champ, pour explorer une diversité des situations culturales du haricot commun dans la région de Tizi Ouzou une des villes du nord d'Algérie. Une telle approche a impliqué une participation volontaire des agriculteurs locaux. Les biomasses aériennes et nodulaires des RILs ont été mesurées au stade floraison et ont été comparées au génotype traditionnellement utilisée par les agriculteurs de cette zone de référence.

Les objectifs de ce chapitre sont les suivants:

- 1) Etablir le diagnostic nodulaire des lignées contrastantes sur différents sites de la région de Tizi Ouzou. Cet objectif constituera le sous chapitre 4 (I)
- 2) Rechercher si la variabilité spatiale peut traduire des variations intra-spécifiques. Cette variation est-elle liée à l'azote et/ou au P du sol ? Cet objectif constituera le sous chapitre 4 (II).

Pour répondre à nos objectifs, les RILs étudiées sous serre ont été cultivées dans 15 différents sites de la région de Tizi Ouzou. Un questionnaire d'enquête a été établi au préalable (Annexes). A travers cette enquête, nous voulions comprendre quelles étaient les pratiques culturales des agriculteurs recensés dans notre zone d'étude (Annexes). Notre enquête a été réalisée sur plusieurs exploitations, situées dans la wilaya de Tizi-Ouzou. Le choix de ces communes a été motivé par l'importance des superficies réservées à la culture de haricot ainsi que leurs taux de productions par rapport aux autres régions, selon les données de la DSA de Tizi-Ouzou (2006).

I. Nodulation diagnosis of contrasted Recombinant Imbred Lines of common bean observed in multi-local field trial in Mediterranean conditions

Ce sous-chapitre répond au premier objectif du chapitre 4. Il traitera des essais établis sur des lignées de haricot dans la région de Tizi Ouzou. Le haricot est intégré dans les différents assolements pratiqués par les agriculteurs de cette région. Celle-ci figure parmi les premières wilayas les plus productrices de cette légumineuse en Algérie. En raison de sa richesse en eau le haricot est conduit en irrigué. En effet, elle possède des ressources en eau suffisantes pour sa mise en culture, en été, grâce à ses nombreuses retenues collinaires.

L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un article intitulé: «Nodulation diagnosis of contrasted Recombinant Imbred Lines of common bean observed in multi-local field trial in Mediterranean conditions , Tizi-Ouzou, Algeria» qui a été soumis en 2010 à la revue crop field.



Photo d'une parcelle de haricot chez l'un des agriculteurs de Tizi Ouzou.

I. Nodulation diagnosis of contrasted recombinant inbred lines of common bean observed in multi-local field trial in Mediterranean conditions.

Authors: Nora Alkama^{a,b,c,*}, Benoît Jaillard^a, Sidi Mohamed Ounane^c, Jean Jacques Drevon^{a,*}

Affiliation: ^a INRA-IRD-SUPAGRO, UMR Eco&Sol, Bat 12, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

^b Université Mouloud Mammeri, faculté des sciences biologiques et agronomiques, département d'agronomie, Tizi Ouzou. Algeria.

^c Institut National Agronomique, Département de phytotechnie, Hassan Badi, El Harrach, Algiers, Algeria.

Abstract

In order to integrate farmers practices, a multi-local test was proposed to producers in 15 sites of Tizi-Ouzou area of Algeria, without modification of their cultivation methods. The genotype “El Djadida” (symbolised by Dj) traditionally used by farmers , and seven potentially interesting recombinant inbred lines selected among the crossing of BAT 477 and DOR 364 carried out within the framework of a co-operation CIAT-INRA, namely RIL “124, 115, 104, 147, 83, 75 and 7”, were compared. Sampling for nodule and plant biomass was performed at the stage of flowering, by excavating 20 cm in depth and around the root-system of 10 plants per block. Shoot, nodule and roots were separated and oven dried for weight. Four clusters were determined with total-N and total-P as the most determinant factors of the soil clustering. The shoot biomass with contribution of nitrogen fixation was nearly the same as with N nutrition exclusively. Two main groups of RILs could be identified as tolerant versus sensitive to low fertility. Dj seems to be different of those groups and it was the most nodulated genotype under low fertility conditions. Further works are needed to explore interaction of more parameters of soil on nodulation and the growth of common bean, including in each site individually.

Key words: Nitrogen fixation, phosphorus deficiency, rhizobial symbiosis, soil fertility, genotypes, clustering, dendrogram.

1. Introduction

Common bean was first domesticated more than 6000 years ago in South and Central America and it is cultivated on all continents. Being a legume, common bean is an important source of protein for the human diet in numerous developing countries. However, yields are particularly low ($0.5-0.7 \text{ t ha}^{-1}$) when compared with those achieved in developed countries ($2.5-3.5 \text{ t ha}^{-1}$) (FAO.STAT, 2010). Indeed bean is often cultivated in marginal zones, where more than 50% of the soils are deficient in phosphorus. Like for most other legumes, phosphorus is an important limiting factor for bean, and P-deficiency in soil constitutes the first constraint for its production in the tropical and subtropical areas (Lynch and Beebe, 1995), but also in Mediterranean regions where phosphorus is linked to lime in soil (Trabelsi, 2001).

Algeria is one of the southern countries where people appreciates dry seeds, especially bean. So the country spend 50 000 thousands of dollars to import 62 000 tons of bean (FAO.STAT, 2010) to cover the market demand because area allowed to this culture is limited (1300 ha), compared to India the first country with 10 millions ha in 2008, and the yield is low with 0.6 t ha^{-1} (FAO.STAT, 2010). Fresh bean is more cultivated than dry bean, primarily on the coastal and sub-coastal areas where climatic conditions are the best for its culture. Bean is generally integrated in various rotations though its area assigned is generally lower than 5%, against 50% for solanaceous and 30% for fodder (DSA, 2007).

Thanks to its symbiosis with rhizobia, common bean can grow on poor soils without addition of costly and potentially pollutant nitrogen fertilizers. Indeed these soil bacteria induce the formation of nodules on roots – and sometimes on stems – of legumes, in which they transform atmospheric nitrogen (N_2) into ammonium (NH_4^+) that is used by plant to synthesize proteins. Nutrient limitation might be a major constraint on legume N_2 -fixation and yield. In contrary, high rate of N-fertilizer used in intensive agriculture can inhibit the formation of nodules and the N_2 -fixing process (Streeter, 1988). This fact is attributed to intrinsic characteristics of the host plant, as well as the great sensitivity to other nodulation-limiting factors, such as the nutrient deficiency, high temperatures and soil dryness (Gentili *et al.*, 2006). Moreover, the P requirement of legumes is increased when the legume is dependent on N_2 fixation (Leidi, 2000; Gentili & Huss-Danell, 2003). It.Thus symbiotic nitrogen fixation is an

energetically expensive process which requires more inorganic P than mineral nitrogen assimilation (Vadez & Devon, 2001)

Vadez *et al.* (1999) demonstrated the existence of a genetic variation for the phosphorus use efficiency (PUE) for bean. The authors suggested that the genotypes having a high yield in limited P conditions would be most efficient for PUE. Within the co-operation of CIAT (International Centre of Tropical Agronomic) and INRA (Agronomic National Research Institute) of Montpellier, these authors obtained Recombinant Inbred Lines (RILs) from the crossing between BAT 477 and DOR 364, which were contrasting for their symbiotic nitrogen fixation (FSN) and their PUE. The parents of the RILs were found to be adapted to the Mediterranean conditions (Trabelsi, 2001).

In a previous work in glass house, Alkama *et al.* (submitted) have tested seven RILs in hydroaeroponics both under P sufficiency and P deficiency. Seeds were sterilized with 3% calcium hypochlorite for 5 min and rinsed with sterile distilled water. After germination, they were inoculated by *Rhizobium tropici* CIAT899 containing 10^9 bacteria ml^{-1} . This strain is a reference for the studies on common-bean because of its high capacity to fix nitrogen and its ubiquity with the diversity among *P. vulgaris* (Vadez *et al.*, 1996). For each P treatment, the inoculated plants were transferred into serum bottles for hydroaerobic culture. Phosphorus was supplied weekly in the form of KH_2PO_4 (75 or 250 $\mu\text{mol plant}^{-1} \text{ week}^{-1}$ for deficient or sufficient P supply) to the nutrient solution that was changed every week. A supply of urea was provided with 2 mmol plant^{-1} in the initial solution and 1 mmol plant^{-1} at the first change of solution after two weeks, in order to optimize nodulation. The plants were then grown in N-free nutrient solution. The whole experiment was carried out in a glasshouse. The plants were harvested at the flowering stage with the first pod measuring 2 cm long. The shoot was separated from the root at the cotyledonary node, then weighed after 48 h at 70 °C. Nodules were separated from the roots, counted and weighed separately. According to P status, and based on shoot biomass, two main group of P contrasting lines were obtained: the group of the sensitive RILs with 83, 147 and 124, with significant decreasing of biomass under P deficiency by more than 36%; and the group of the tolerant RILs with not significant decreasing of biomass under P deficiency with less than 25% for 115, 75, and 34.

This work aims to test these contrasting genotypes in fields. Our approach was consequently based on a multi-local field trial to explore a large diversity of soils and

culture conditions of common bean. Such approach implied a close association with organized local farmers, and the ability to take into account the large variability of agricultural situations. The nodulation rate and shoot biomass of RILs were measured at the flowering stage and compared with the cultivar traditionally used by the farmers as a reference.

2. Materials and methods

2.1 Experimental sites

The experimental sites were located in Tizi-Ouzou district, Algeria, at 100 km east of Algiers. This area was selected for its importance in bean production. The rainfall is nearly 1000 mm per year. The area, of about 3000 km², counts about twenty water reservoirs used for irrigation with full capacity reaching six millions m³ per year. The Mediterranean climate of Tizi-Ouzou is characterized by a cold winter with important rainfalls, and a very hot, long and dry summer which extends from mid-May until mid-September. Climate of this region favours the bean development with irrigation.

Fifteen sites were selected, representing the major agro-ecological conditions where beans are produced. A recognition survey was first conducted with key informants among the farmers who were invited by the Participatory Rural Appraisal (PRA) to cultivate common bean on more than 1 ha of land which was sprinkly irrigated. They were mainly elderly farmers with wide experience in bean growing, village elders as well as the frontline extension staff. A checklist was used as a guide throughout the interview process. The interview covered perceptions on adoption of bean varieties, bean yield losses due to insect pests, local knowledge of pests and cultural practices as a management option.

Soil of the 15 experimental sites were characterized by a standard sampling using a drill with a 30 cm depth, before the sowing of the bean culture. It correspond to the soil depth that is likely to be exploited by the roots of common bean.

2.2 Plant material

Seven Recombinant Inbred Lines (RILs), respectively noted 124, 115, 104, 147, 83, 75 and 7, were tested. The seven RILs resulted from crossing between BAT 477 and

DOR 364, carried out by Ribet (1996) within the framework of a co-operation CIAT-INRA. DOR 364 is a variety having a good adaptation in Latin America and to the Caribbean: that results mainly from its tolerance to virus BGMV. BAT 477 was selected in Mexico for its tolerance to the drought, and has a high symbiotic nitrogen fixation (SNF) and a high PUE and FSN in hydro-aeroponic culture like in agronomic tests in tropical zone in Cuba (Hernandez et al., 1993). Preceding experiments were carried out to test the effect of *Rhizobium tropici* CIAT 899 among 50 lines of this crossing selected within the framework of the project of co-operation INRA (France) - IS (Cuba) which made it possible to choose the contrasting lines that were used in this experiment. As a reference for the farmer, RILs were compared with “El Djadida” (noted Dj), which is a cultivar traditionally used by the farmers in this area.

The culture tests were carried out in a random way, the plots were divided into lines, each line carrying a genotype. The follow-up of the cultures was throughout the vegetative cycle. At the stage of full flowering, i.e. 45-46 days after emergence, 10 plants for each genotype were harvested by excavating within 20 cm deep around the roots. Shoots, nodules and roots of the harvested plants were separated, oven dried and weight.

2.3 Statistical analysis

The statistical analysis were done using the software package STATISTICA 8 for Windows (StatSoft Inc. Statistica, 2007). The principal component analysis (PCA) and cluster analysis were used to explore the structure of data set (Jolliffe, 2002; Mencia and Mas-Pla, 2008). The normality of data distribution was checked, and the data were transformed by a square-root procedure if necessary. The variance analysis were carried with a p-level of 0.05. The comparisons of means were made according to the test of NEWMAN and KEULS with a p-level of 0.05.

3. Results

3.1 Typology of experimental sites

Figure 1 shows the result of principal components analysis (PCA) on soil properties of the 15 experimental sites. The two main components of PCA explained

53% of the total variance, with 33% for component 1 and 20% for component 2. Content in total phosphorus (total-P) had high effect on component 1, whereas content in organic matter (OM) and total nitrogen (total-N) had high effect on component 2. Moreover, this analysis showed that granulometrical soil properties (clay, silt and sand contents) were independent from chemical soil properties.

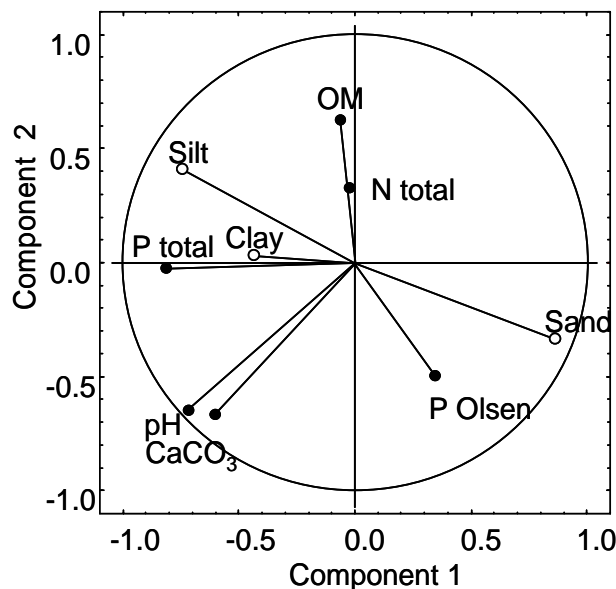


Figure 1. Projection of the correlation matrix of granulometrical○ and chemical soil properties● of experimental sites according both the most significant component of the principal components analysis. A principal component analysis of the soil properties showed that chemical properties structured the data set. The two main components explained 53% of the total variance, with 33% for component 1 and 20% for component 2. Content in total phosphorus (total-P) had high effect on component 1, since organic matter content (OM) and total nitrogen (total-N) had high effect on component 2.

Cluster analysis in Figure 2 confirmed this analysis by the dendrogram of soil properties of experimental sites. Similar dendrograms were obtained by including or not the granulometrical soil properties. Cluster analysis allowed to discriminate four soil clusters, gathering between 2 to 5 sites per cluster. Table 1 shows the mean values for granulometrical and chemical soil properties for each soil clusters. Granulometrical soil properties were not significantly different between clusters. Chemical properties significantly differed between soil clusters for CaCO_3 content (but not soil pH), total-P (but not Olsen-P) and total-N contents in soil (but not organic matter contents). CaCO_3 content varied between 62 and 184 g kg^{-1} however, it must be noted that all soils were

calcareous and that their pH was not significantly different. Total-N content varied between 1.1 and 2.3 g kg⁻¹: however, only the soil cluster A (with 2.3 g kg⁻¹) was significantly different from cluster C and D (with 1.2 and 1.1 g kg⁻¹ respective). In contrast, total-P content varied from 99 to 506 mg kg⁻¹: all the soil clusters were significantly different, the highest being the soils of cluster C with 506 mg kg⁻¹. However, the mean bio-available Olsen-P did not vary between soil clusters.

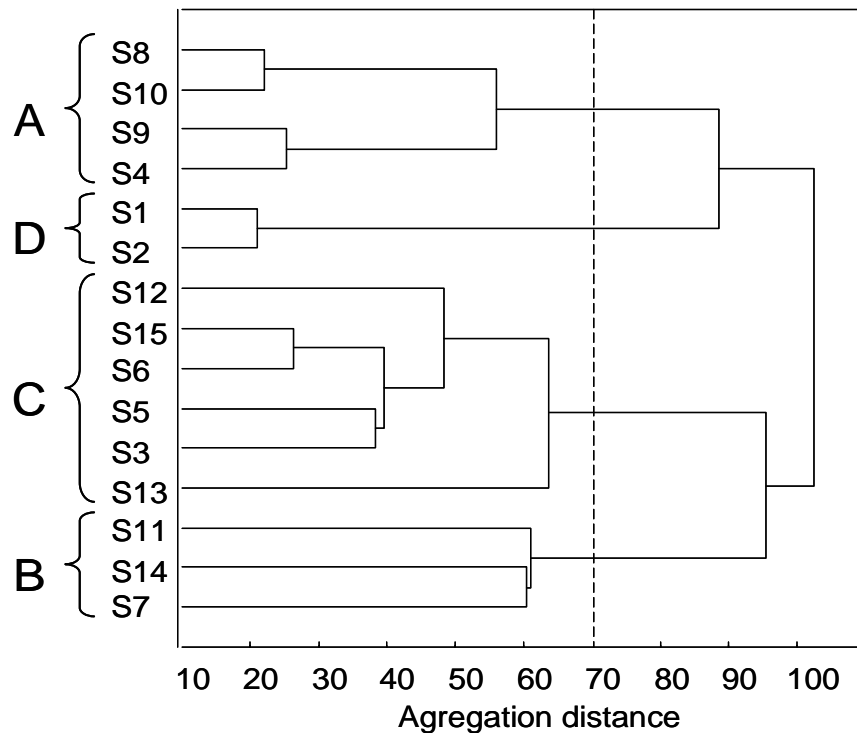


Figure 2. Dendrogram of chemical properties of soils of experimental sites. Cluster analysis allowed to discriminate two (at aggregation distance of 95) or four (at the aggregation distance of 70) soil clusters. The same dendrogram was obtained by including or not the granulometrical soil properties

3.2 Nodule and plant biomass

Table 1 shows also the nodulation and biomass of common bean. Nodule number and biomass were significantly different between each soil cluster: nodule number varied between 1 to 48 per plant, and nodule biomass between 1 to 54 mg per

plant. The specific nodule biomass, which was around 1 mg per nodule, was not significantly different between clusters. Shoot biomass was also significantly different between soil clusters, the highest being in A cluster where soil total-N was the highest, and the lowest being in C cluster where soil total-P was the highest.

Table 1. Granulometrical and chemical soil properties, and plant biomass production on the four soil clusters. Different letters indicated significant differences at $p < 0.05$.

	A	B	C	D
Clay, g kg ⁻¹	370 ± 40	250 ± 140	350 ± 130	240 ± 60
Silt, g kg ⁻¹	270 ± 120	440 ± 140	420 ± 130	260 ± 40
Sand, g kg ⁻¹	330 ± 160	280 ± 170	220 ± 150	480 ± 90
pH	7.5 ± 0.3	7.4 ± 0.3	7.7 ± 0.3	7.2 ± 0.2
CaCO ₃ content, g kg ⁻¹	179 ± 56 a	149 ± 34 ab	184 ± 66a	62 ± 11b
Organic matter, g kg ⁻¹	11 ± 3	10 ± 1	12 ± 2	12 ± 2
Total-N, g kg ⁻¹	2.3 ± 0.9 a	1.5 ± 0.7ab	1.2 ± 0.4 b	1.1 ± 0.2 b
Total-P, mg kg ⁻¹	213 ± 20c	334 ± 17 b	506 ± 40 a	99 ± 8 d
Olsen-P, mg kg ⁻¹	34 ± 21	45 ± 37	30 ± 16	32 ± 5
Nodule number	1.2 ± 0.4d	12 ± 4 c	33 ± 6 b	48 ± 23 a
Nodule biomass, g plant ⁻¹	1.2 ± 0.5 d	10 ± 2 c	30 ± 4 b	54 ± 31 a
Root biomass, g plant ⁻¹	2.7 ± 0.6	2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.3 ± 0.4
Shoot biomass, g plant ⁻¹	26 ± 3 a	20 ± 4 bc	18 ± 2 c	23 ± 4 b
Nodule/Shoot biomass, g g ⁻¹	0.07 ± 0.02 d	0.47 ± 0.08c	0.66 ± 0.09b	1.11 ± 0.19a

Figure 3 specifies the relationships between significant soil properties and bean biomass. Figure 3a and 3c shows that total-P content was quite different between each soil clusters, but this soil parameter was not related to neither nodule biomass nor shoot biomass of common bean. Contrastingly, Figure 3b suggests that total-N content in soil determined the nodule biomass of common bean in each soil clusters, the highest total-N being associated with the lowest nodule biomass. Nodule biomass was null when total-N content reached 2.3 g kg⁻¹ of soil. Figure 3d shows that, shoot biomass was the highest when total-N in soil was the highest without any nodule or the lowest when nodule biomass was the highest. Figure 4 illustrates this relation between nodule and shoot biomass of common bean in the four soil clusters, suggesting that root nodulation can compensate N-deficiency in soil if root nodulation were more than about 30 mg of nodule per plant, i.e. about more than 30 nodules per plant.

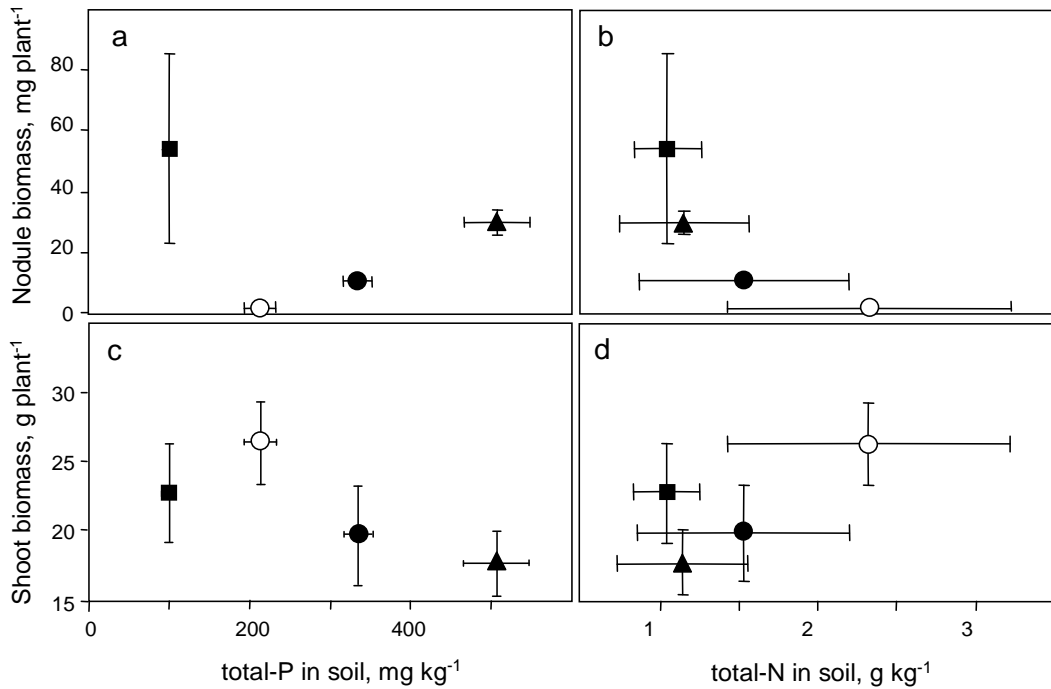


Figure 3. Relation between shoot and nodule biomasses and total-N and total-P contents in soil clusters. Total-P content of soil clusters appeared as the main explicative factor, while total-N content of soil clusters was the second explicative factor of plant nodule and shoot biomasses. (○: soil cluster A; ●: soil cluster B; ▲: soil cluster C; ■: soil cluster D)

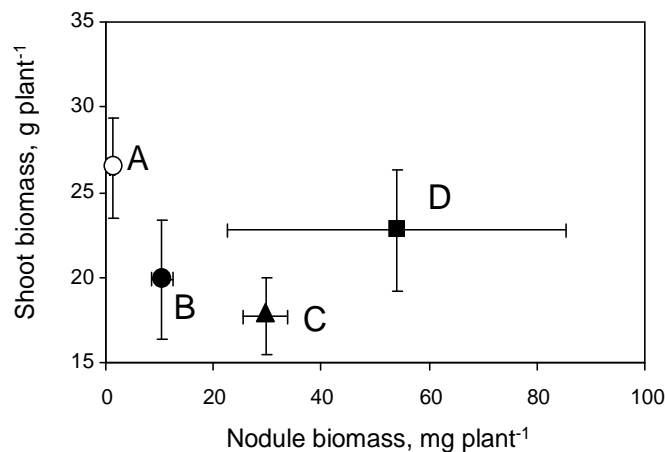


Figure 4 . Relation between shoot and nodule biomasses for the four soil clusters. When nodule biomass increased, the shoot biomass first decreased, second increased when the nodule biomass was high enough. (○: soil cluster A; ●: soil cluster B; ▲: soil cluster C; ■: soil cluster D)

3.3 Genotype differences

Figure 5 shows the nodule number and biomass, root and shoot biomass and nodule/shoot biomass ratio of the studied genotypes. The most variable biological parameters were root and shoot biomass of common bean, except in soil cluster D where nodule number and biomass varied considerably among genotypes. Soil cluster D corresponded to the lowest total-N content in soil, thus allowing the highest nodulation of bean roots. So, the difference in nodulation between genotypes expressed mostly under the most constraining conditions, i.e. when content of total-N and total-P contents in soils were the lowest.

Figure 6 shows the dendrogram of the different genotypes. It evidences that local variety El Djadida (Dj) was quite different from the RILs genotypes. Among the RILs, two main groups could be distinguished, the 7-147-83 group, and the 124-104-115 group, whereas 75 and Dj formed two single groups, separately.

Figure 7 shows the relation between shoot and nodule biomass for the different genotypes. The 7-147-83 group was characterized by a weak nodulation in all the soil clusters, which consequently did not compensate the N-deficiency in soil. The 124-104-115 group was characterized by a higher nodulation in soil cluster D where total-N content in soils was low, allowing the genotypes to compensate partially the low total-N content in soil by the nitrogen fixation. The RIL genotype 75 appeared intermediary between the two groups. Finally, the local variety El Djadida (Dj) presented the ability to produce the greatest nodulation in soil cluster D, up to 100mg of nodules per plant. This high level of nodulation made it possible to completely compensate the N-deficiency in soil by producing a similar shoot biomass as in N-sufficient soil.

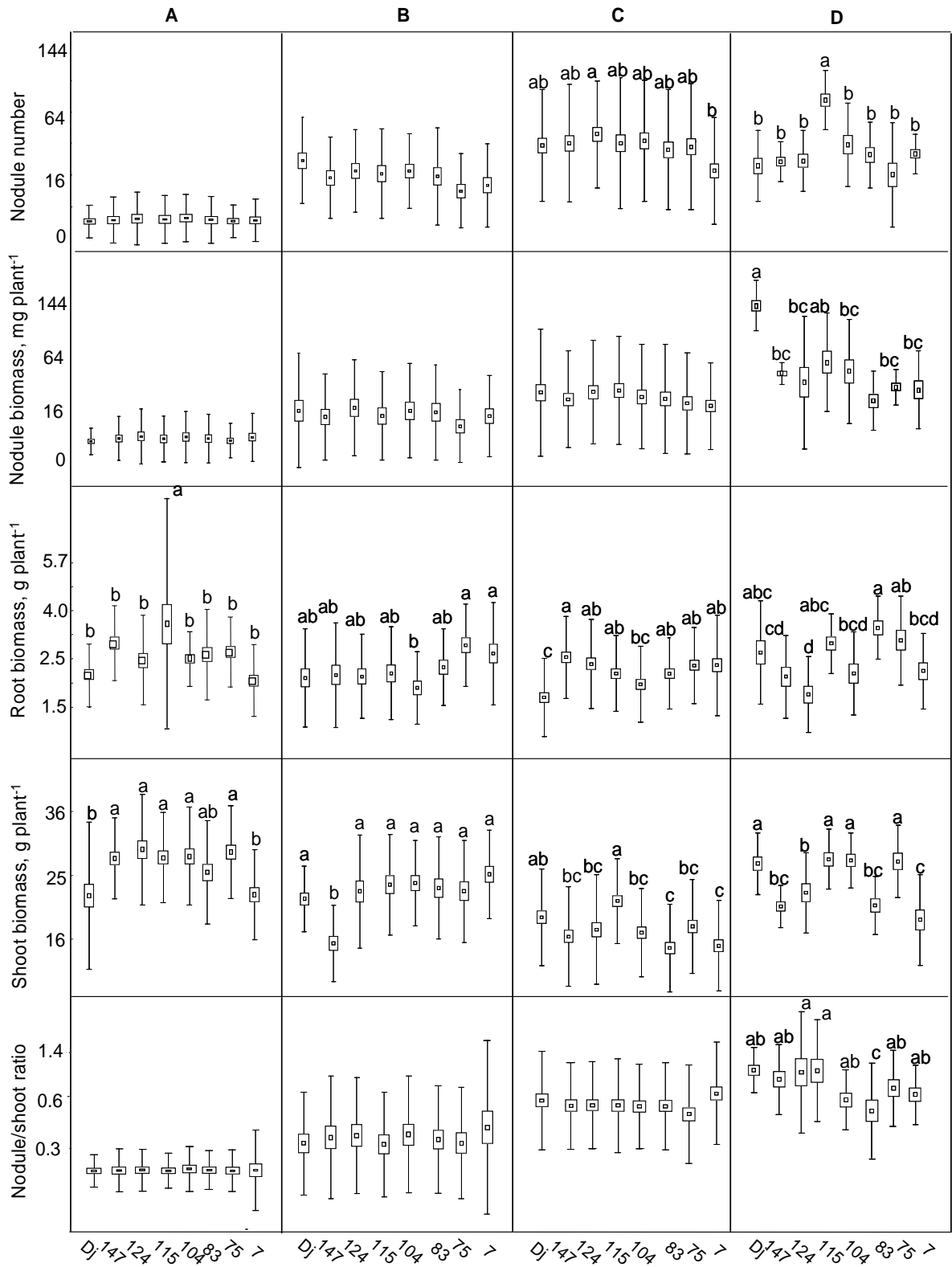


Figure 5. Comparison of shoot, root and nodule biomass of the different genotypes inside the four soil clusters.

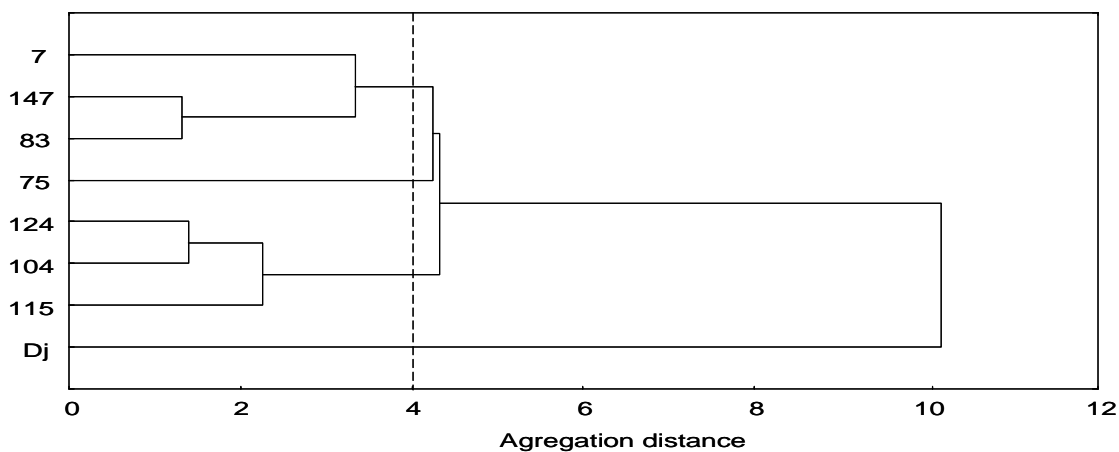


Figure 6. Dendrogram of the different genotypes : Cluster analysis allowed to discriminate two (at the aggregation distance of 8) or four (at the aggregation distance of 4) genotypes clusters. The same dendrogram was obtained by including or not the root biomass.

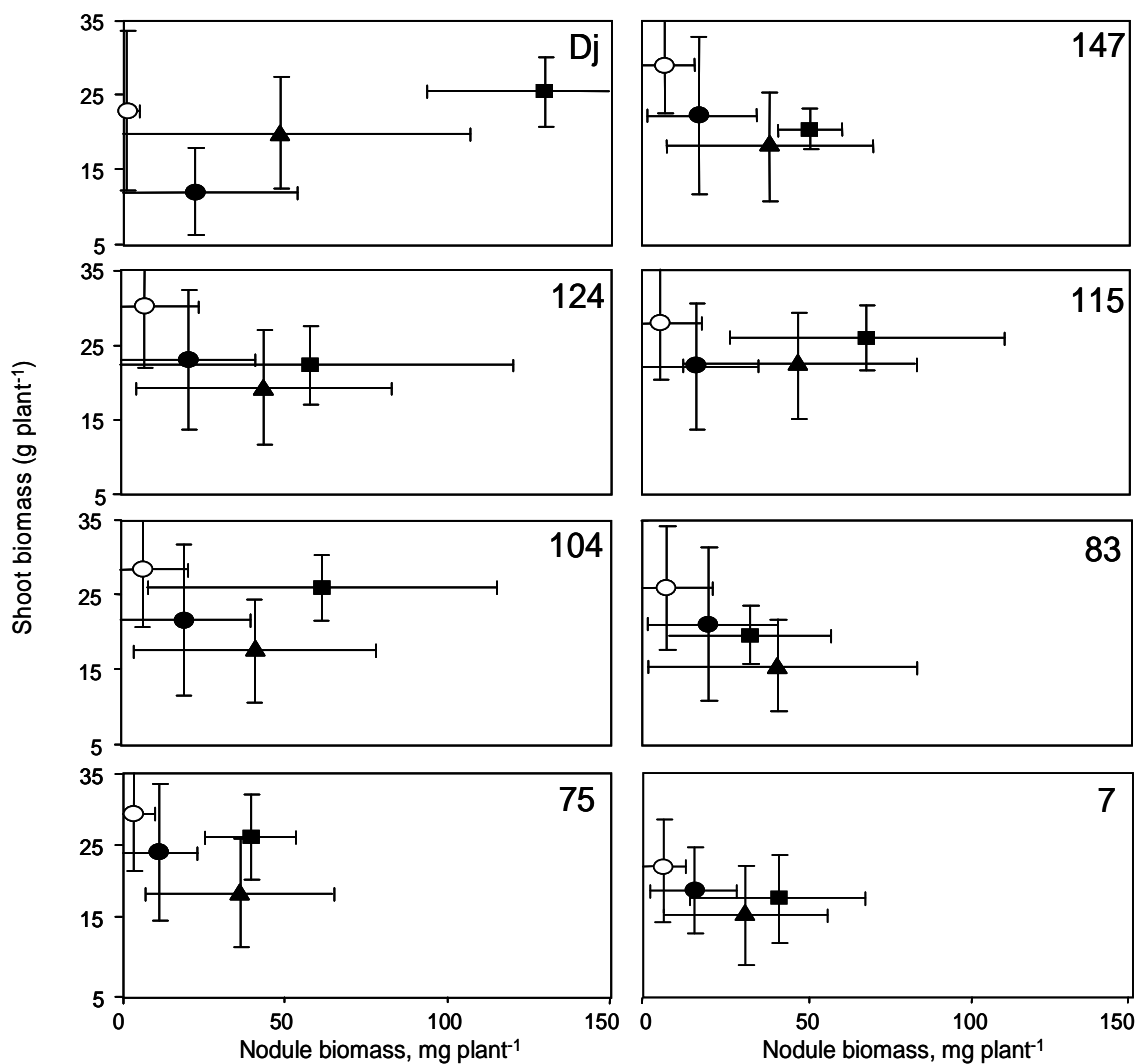


Figure 7. Relation between shoot and nodule biomasses in the four soil clusters for the different genotypes. (O: soil cluster A; ●: soil cluster B; ▲: soil cluster C; ■: soil cluster D)

4. Discussion

4.1 Multi-local approach to explore a large variability of soil properties

Multi-local approach has the advantage to make it possible to explore a large variability of soil and culture conditions. However, the north of Algeria is widely calcareous (Djilli *et al.*, 1999) and our trial was reduced to the Tizi-Ouzou district. In spite a certain diversity of soils in this area (Mesrouk, 1984; Yakoub, 1996), our result show that the studied soils of our multi-local approach on 15 different sites did not present a large variability of their properties. The texture of soils were silty, silty-clay, clay-silty or clayey. All the soils were calcareous, the CaCO₃ contents being comprised between 60 and 180 g kg⁻¹, as the values reported by Djilli *et al.* (1999), and the soil pH was 7.5 in average. Finally, granulometrical and physico-chemical properties were few different and not discriminant between the soils of sites cultivated with common bean.

Statistical analysis showed that the differences between soils resulted mainly from fertility status of soil, i.e. their N and P contents. Hierarchical analysis allowed to distinguish 4 groups of soils, of which the chemical properties were significantly different. Soil cluster A had a high total-N content and quite a low total-P content, corresponding likely to well fertilized fields with high N residues. In contrast, soil cluster D had a low total-N content and a low P-content corresponded likely to farming with low fertilizer inputs. Soil cluster B and D had intermediate position with rather high P-contents and low-N-contents. Thus, the soil classification proposed by clustering analysis may illustrate mainly the farmer practices. Finally, the multi-local approach on a reduced area as the Tizi-Ouzou district has highlighted the fertilizer status of soils rather than their physico-chemical properties.

4.2 Response of common bean to soil fertility

Our results showed that nodulation rate and shoot biomass of common bean were significantly different between each soil cluster. Nodulation rate was the lowest in soil cluster A where total-N was the highest, and the highest in soil cluster D where the total-N was the lowest (see Figure 3b). It is well known that, both in actinorhizal plants and legumes, nitrogen decreases nodulation (Hellsten and Huss-Danell, 2001; Gentili & Huss-Danell, 2002, 2003; Gentili *et al.*, 2006). In common bean, poor response to rhizobia inoculants was associated with high level of residual nitrate in soils

(Rodriguez-Navarro, 1996). Moreover, high concentration of N in soil inhibits the formation of nodules and the N₂-fixing process (Streeter, 1988). So, bean is usually considered to fix N₂ poorly, being more sensitive than other legumes to the presence of nitrate (Temprano-Vera *et al.*, 1997).

Our results showed also that nodulation rate of roots can be high enough to compensate N-deficiency in soil, and makes it possible to produce quite as much plant biomass as with high N concentration in soil (see Figure 3d). This would need a nodulation rate of more than about 30 mg of nodule per plant, i.e. more than about 30 nodules per plant. So, the shoot biomass production would present a minimum versus nodulation rate: the biomass production would be thus controlled in the same time by soil mineral-N taken up by roots, and by N₂-fixation by nodules (see Figure 4). The first process would be limited by the availability of mineral-N in soil, and thus by residual-N concentration in soil; the second by nodule biomass, itself limited by mineral-N in soil. Mineral-N concentration in soil would have two antagonistic effects on common bean growth. Voisin *et al.* (2002) have investigated in the field the effect of soil mineral N availability on nitrogen nutrition and biomass on pea, using 5 levels of mineral N application at sowing ranging from 0 to 400 kg N ha⁻¹.

These authors found that even when soil mineral-N availability strongly inhibited symbiotic nitrogen fixation, nitrogen stress was never observed in the field. Despite the fact that Ney *et al.* (1997) stressed that any diagnosis using the critical nitrogen concentration was only valuable until the beginning of seed filling. These data support the hypothesis of Lemaire *et al.* (1997), based on observations of lucerne (Lemaire *et al.*, 1992), which stated that relationships between nitrogen and growth would be unchanged by the nitrogen nutrition regime. Indeed, regulatory mechanism would be under the control of C and N fluxes in phloem, through signalling molecules, for both symbiotic N₂ fixation (Neo & Layzell, 1997; Soussana & Hartwig, 1996) and root absorption (Muller & Touraine, 1992).

4.3 Variation among common bean RILs

Our results make it possible to distinguish two main groups between the RILs according to soil clusters: the group of 7-83-147, and the group of 104-115-124. Among them, four RILs (104, 115, 124 or 147) were considered as references and multiplied and tested in different areas in Lauragais, France, between 2003 and 2006 (Drevon *et*

al., personal data). In this trial, the RILs 115 and 147 were very contrasting in a brown soil, whereas no difference was observed in a gray soil in the same reference area. Our results obtained in field conditions in multi-local approach are also similar to those obtained previously in controlled conditions, in hydro-aeroponic and in rhizotron in glasshouse, under P-deficiency (Alkama *et al.*, 2010 submitted): RILs 83 and 147 appeared very sensitive to P-deficiency, although RILs 104 and 115 appeared tolerant to P-deficiency and had a high PUE. Moreover, both RILs 104 and 115 showed very similar behaviour as the local genotype El Djadida, which is surnamed “4x4 bean” by farmers of Algeria for its ability to grow in any soil conditions, with the noticeable ability to have a high nodulation rate in very constraining conditions, and then to compensate the N-deficiency in soil by producing similar shoot biomass as in N-sufficient soil. The two contrasting lines 115 and 147, which have been extensively studied recently in our group, can be indicators of the status of P of the soils.

4.4 Limitation of multi-local approach

Do our results make it possible to conclude about the effects of P, N and their interaction on shoot and nodule biomass ? Leidi and Rodriguez-Navarro. (2000) showed that the interaction of N and P had an effect on nodulation of common bean. These authors suggested that nodulation was improved by P supply at a low concentration of N in solution, whereas the effect of P at high N concentration was neglectible. This effect suggests that nodule formation and growth were limited by P, whereas shoot and root growth were little affected. As at low nitrate concentration, increasing amounts of P promoted both nodule formation and N₂ fixation. However, at high nitrate concentration, nodulation did not improve with decreased P supply. To some extent stimulation of nodulation by P can counteract the inhibition by N (Wall *et al.*, 2000; Gentili & Huss-Danell, 2002). In N₂-fixing legumes and actinorhizal plants, phosphorus is often the most limiting nutrient for growth (Vance, 2001; Gentili *et al.*, 2006). Nutrient limitation may be a major constraint on legume N₂ fixation and yield (O’Hara *et al.*, 1988).

5. Conclusion

In conclusion, the classification of our experimental sites is mainly based on total-P concentration in soil, which was significantly different for each cluster, rather than total-N concentration in soil, which was significantly different only for soil cluster A. That suggests that, in our data set, total-N and total-P concentrations in soil are linked, likely by farmer practices such as fertilisation or position of bean in the rotation. In this study, there was no obvious relation between phosphorus and biomass or nodulation rate of bean. Moreover, Olsen-P concentration in soil was not significantly different between soil clusters. Among the four soil clusters, common bean grown in soil of cluster A was totally dependent on mineral-N, in contrast common bean grown in soil of cluster B depended on nitrogen fixation by nodules. But, common bean grown in soil of clusters C and D depended both on nodulation and N-mineral which inhibits partially nodulation and which is compensated by P. In a next analysis, it will be interesting to reconsider the raw data of these two soil clusters C and D for looking for a possible effect of Olsen-P concentration on nodulation and growth of the different lines. On genotypical point of view, this multi-local field trial confirmed the result previously obtained in controlled conditions, that is RILs 83 and 147 are sensitive, although RILs 104 and 115 are tolerant, to P-deficiency.

Acknowledgments

This work was supported by the Tassili PHC of the French Ministry of Foreign Affairs. For her journey in Montpellier, Nora Alkama received a 18 months fellowship of the EU AVERROES program. The authors are grateful to Madouche Youguerthen and Ait Ouarab Djamel for their excellent assistance.

6. References

- Alkama, N., Jaillard, B., Ounane, S.M., Drevon, J.J., 2010. Is genotypic variation of H⁺ efflux under P deficiency linked with nodulated-root respiration of N₂ - fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.)? Submitted to Plant Physiol Biochem.
- Cassman, K.G., Munns, D.N., Beck, D.P., 1981. Phosphorus nutrition of *Rhizobium japonicum*: strain differences in phosphate storage and utilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 517-520.
- Djilli, K., Daoud, Y., Ayache, N., 1999. Analyse de la distribution verticale et spatiale du calcaire dans les sols de l'Algérie septentrionale. INA, Département des Sciences du Sol, El Harrach, Alger, 201-213.
- DSA, 2007. Statistiques agricoles de la wilaya de Tizi-Ouzou. Algérie: Direction des Services Agricoles de la Wilaya. 48p.
- FAO.STAT, 2010. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Gentili, F., Huss-Danell, K., 2003. Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. *J. Exp. Bot.* 54, 2757-2767.
- Gentili, F., Wall, L.G., Huss-Danell, K., 2006. Effect of phosphorus and nitrogen on nodulation are seen already at the stage of early cortical cell divisions in *Alnus incana*. *Annals Botany* 98, 309-315.
- Gentili, F., Huss-Danell, K., 2002. Phosphorus modifies the effects of nitrogen on nodulation in split-root systems of *Hippophaë rhamnoides*. *New Phytol.* 153, 53-61.
- Hellsten, A., Huss-Danell, K., 2001. Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica. Section B, Soil Plant Sci.* 50, 135-142.
- Hernandez, G., Vasquez, H., Toscano, V., Sanchez, T., Franchi-Alfaro, A., Mendez, N., Drevon, J.J., 1993. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars in hydroponic culture and in the field. *Trop. Agric. (Trinidad)*, 70, 230-234.
- Jolliffe, I.T., 2002. Principal component analysis. NY: Springer. 487p
- Leidi, E.O., Rodriguez-Navarro, D.N., 2000. Nitrogen and phosphorus availability limit N₂ fixation in bean. *New Phytol.* 147, 337-346.
- Lemaire, G., Gastal, F., Plenet, D., Le Bot, J., 1997. Le prélèvement de l'azote par les peuplements végétaux et la production des cultures. In Maîtrise de l'azote dans les agrosystèmes, Eds. G Lemaire and B Nicolardot. pp 121–139 *série les colloques de l'INRA*, INRA-Editions, Paris.
- Lynch, J.P., Beebe, S.E., 1995. Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. *Hort Sci.* 30,1165-1171.
- Mencio, A., Mas-Pla, J., 2008. Assessment by multivariate analysis of groundwater–surface water interactions in urbanized Mediterranean streams. *J. Hydrol.* 352, 355–366.

- Mesrouk, A., 1984. Caractérisation et genèse des sols de la région de Tizi-Ouzou, grande Kabylie, Algérie. *Phd Thesis*. 173p.
- Muller, B., Touraine, B., 1992. Inhibition of NO₃ uptake by various phloem translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* 43, 617–623.
- Neo, H.H., Layzell, D.B., 1997. Phloem glutamine and the regulation of O₂ diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* 113, 259–267.
- Ney, B., Doré, T., Sagan, M., 1997. The nitrogen requirement of major agricultural crops: rain Legumes. In *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops*. Ed. G. Lemaire. pp 107–118. Springer-Verlag, Heigelberg.
- O'Hara, G.W., Boonkerd, N., Dilworth, M.J., 1988. Mineral constraints to nitrogen fixation. *Plant Soil.* 108, 93-110.
- Rodriguez-Navarro, D.N., 1996. Efectos del nitrato sobre la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*. In: Chordi-Corbo A, Martinez-Molina E, Mateos-González P.F., Velázquez-Pérez ME., eds. *Avances en la investigación sobre fijación biológica de nitrógeno*. Salamanca, Spain: Excma, Diputación Provincial Salamanca. 317-321.
- Streeter, J.G., 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *CRC Critical Rev. Plant Sc.* 7, 1-23.
- Soussana, J.F., Hartwig, U.A., 1996. The effect of elevated CO₂ on symbiotic N₂ fixation: a link between the carbon and nitrogen cycles in grass land ecosystems. *Plant Soil.* 187, 321–332.
- Temprano-Vera, F.J., Santamaria-Linaza, C., Daza-Ortega, A., Leidi, E.O., Rodriguez-Navarro, D.N., 1997. Tolerancia simbiótica a nitrato de distintas leguminosas. In: Sarmiento R, Leidi E.O., Troncoso A, eds. *Nutrición mineral de las plantas en la agricultura sostenible*. Sevilla, Spain: Consjeria de Agricultura Y Pesca, Junta de Andalucía, 41-47.
- Trabelsi, M., 2001. Réponse du haricot à certains facteurs contrôlant la production. 45-58. In : *Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen*. Ed INRA, Paris 2003. *Les colloques*, N° 100.
- Vadez, V., Drevon, J.J., 2001. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 21, 691-699.
- Vadez, V., Lasso, J.H., Beck D.P., Drevon, J.J., 1999. Variability of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to P use efficiency. *Euphytica* 106, 231-242.
- Vance, C.P., 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.* 127, 390-397.
- Voisin, A.S., Salon, C., Munier-Jolain, N.G., Ney, B., 2002. Effect of mineral nitrogen on nitrogen nutrition and biomass partitioning between the shoot and roots of pea (*Pisum Sativum* L.). *Plant Soil* 242, 251-262.

- Wall, L.G., Hellsten, A., Huss-Danell, K., 2000. Nitrogen, phosphorus and the ratio between them affect nodulation in *Alnus incana* and *Trifolium pratense*. *Symbiosis* 29, 91-105.
- Yakoub, B., 1996. Le problème de l'eau de la grande Kabylie. U. P. U. de Tizi-Ouzou. 320p.

CHAPITRE 4

II. Are the nodulated Recombinant Imbred Lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) links with soil Olsen-P in multi-local field test in Mediterranean conditions?

Dans la partie précédente, nous avons établi un diagnostique nodulaire sous différentes situations culturales de haricot commun à Tizi Ouzou, une des villes du nord d'Algérie. Les résultats obtenus sont multiples: i) quatre clusters ont été déterminés selon N-total et P-total. Ces derniers sont les facteurs les plus déterminants de cette hiérarchisation ii) la biomasse aérienne sous fixation d'azote atmosphérique était proche de celle obtenue sous nutrition exclusive de l'azote minéral iii) deux groupes de RILs se distinguent, les tolérantes *versus* les sensibles à la faible fertilité des sols en P iiiii) Dj (génotype local) se distingue des groupes précédents. C'est celle qui présente la meilleure nodulation quand les sols sont peu fertiles. Ce qui justifierait le surnom donné par les agriculteurs à la lignée locale «4x4» d. Elle est capable de croître dans différents sols, notamment les contraignants avec une grande capacité à noduler, par conséquent, à compenser la déficience en N en produisant une biomasse aérienne proche de celle des sols à N suffisant.

Dans cette étude l'analyse est portée sur les clusters dont P-Olsen n'était pas significativement différent. Nous nous sommes intéressés aux clusters nodulants où les différents sites de ces clusters ont été examinés et de voir s'il y'aurait un effet significatif de P-Olsen sur la nodulation. Ceci est donc l'objet de notre travail. Il représente une analyse plus détaillée de données brutes la partie précédente.

L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un second article de ce chapitre 4. Il est intitulé: «Are the nodulated Recombinant Imbred Lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) links with soil Olsen-P in multi-local field test in Mediterranean conditions?» qui a été soumis en 2010 à la revue « Plant & Soil »

II. Are the nodulated Recombinant Inbred Lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) links with soil Olsen-P in multi-local field test in Mediterranean conditions?

Authors: Nora Alkama^{a,b,c,*}, Benoît Jaillard^a, Sidi Mohamed Ounane^c, Jean Jacques Drevon^{a,*}

Affiliation: ^a INRA-IRD-SUPAGRO, UMR Eco&Sols, Bat 12, 1 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

^b Université Mouloud Mammeri, Faculté des Sciences biologiques et agronomiques, Département d'Agronomie, Tizi Ouzou, Algeria.

^c Institut National Agronomique, Département de Phytotechnie, Hassan Badi, El Harrach, Algiers, Algeria.

Abstract

In order to assess the relation between symbiotic nitrogen fixation and soil phosphorus, a multi-local test was proposed to producers of Tizi Ouzou area in Algeria, without modification of their cultivation practises. The nodulation and growth of the cultivar “El Djadida” (symbolised by Dj) traditionally used by farmers, was compared with seven potentially interesting recombinant inbred lines selected among the crossing of BAT 477 and DOR 364, namely RIL 124, 115, 104, 147, 83, 75 and 7. The sampling was performed at the flowering stage, by excavating 20 cm in depth and around the root-system of 10 plants per genotype and per site. Shoot and nodule were separated and oven dried for weight. The major finding in this work is that nodule biomass were positively correlated with Olsen-P. Although, the curvilinear regressions of nodule biomass and shoot biomass as a function of Olsen-P suggest the existence of 2 ranges of Olsen-P among studied sites that are separated by critical P values. Dj was the most nodulated genotype. The P use efficiency for nodulation was higher for Dj than for the RILs, and the critical P for nodulation and growth of Dj was reached before that of the RILs. It is concluded that the low nodulation of the RILs was partly compensated by increasing the efficiency in use of the rhizobial symbiosis. Further work is needed to study the interactions between soil P on the RILs biomass parameters in local agronomic trials.

Key words: Genotype, N₂ fixation, clustering, agronomic trials, Olsen-P, soil fertility, rhizobial symbiosis.

1. Introduction

Among legumes, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most cultivated and appreciated in the world. Indeed, the bean constitutes a staple food for 500 million humans for its high content in proteins which can substitute the animal proteins which are often inaccessible for many people (Andrade *et al.*, 2003; Shimelis & Rakshit, 2005; Shimelis *et al.*, 2006; Pujola *et al.*, 2007). Originating from Central and Southern America, common bean is cultivated in all continents. In 2006, the worldwide production of beans, according to the statistics published by FAO, represented 28.6 million tons, distributing into 68% of dry beans, 22% of fresh beans, and 9% of french beans. Between 1961 and 2006, the total production of beans doubled, progressing rather regularly at the rate of 1.5% per year (FAO.STAT, 2009).

Unfortunately, common bean is often cultivated in marginal lands, where more than 50% of the soils are deficient in phosphorus. Thus, P-deficiency in soil constitutes the first constraint for the production of bean (Lynch & Beebe, 1995) in particular for the tropical and subtropical areas. Like for all legumes, phosphorus is a major limiting factor for common bean, although Pereira & Bliss (1989) show a large diversity in its adaptation to low P availability. In addition, Vadez & Drevon (2001) demonstrated the existence of a genetic variation for the phosphorus use efficiency (PUE) for N₂-dependent growth of common bean. These authors selected recombinant inbred lines (RILs) from the crossing between BAT 477 and DOR 364, that were contrasting in their PUE for their symbiotic nitrogen fixation and were adapted to the Mediterranean conditions (Trabelsi, 2001).

In a previous paper (Alkama *et al.*, submitted), we have tested in the field seven RILs (noted 7, 34, 75, 83, 115, 124, 147) issued from the crossing between BAT 477 and DOR 364. Our approach was based on a multi-local field trial to explore a large diversity of soils and culture conditions of common bean. Soil properties were measured previously, and the nodulation rate and shoot biomass of RILs were measured at the flowering stage. The RILs were compared with a cultivar traditionally used by the farmers as a reference, named El Djadida. A hierarchical analysis of the soil properties showed that four soil clusters could be distinguished according to their total-N and total-P soil concentrations, suggesting a link with farmer practices such as fertilisation or position of bean in the rotation. The analysis of shoot biomass or nodulation rate of common bean showed that, when total-N concentration in soil was high, root nodulation

was inhibited and common bean grown was totally dependent on mineral-N, although when the total-N concentration was low, nodulation rate was high and common bean grown depended mainly on nitrogen fixation by nodules. Moreover, a hierarchical analysis of shoot and nodule biomasses of different lines tested showed that the lines were ordered according to their tolerance to P-deficiency evaluated in hydroponics. This last result was surprising because available phosphorus concentration in soil, measured by Olsen-P, was not significantly different between the different soil clusters given by hierarchical analysis. So it will be interesting to reconsider the raw data of this multi-local trial for looking at a possible effect of Olsen-P concentration on nodulation and growth of the different lines.

The objective of this work was consequently to focus on the relationship between Olsen-P and RILs cultivated in farm conditions in a Mediterranean agro-ecosystem. Our approach was based on a new analysis of data collected in the multi-local trial, investigated again in light of previous results presented by Alkama *et al* (submitted).

2. Material and methods

2.1 Experimental site

The experimental sites were located in Tizi-Ouzou district, Algeria, at 100 km east of Algiers. This area was selected for its importance in bean production. The rainfall is nearly 1000 mm per year. The area, of about 3000 km², counts about twenty water reservoirs used for irrigation with full capacity reaching six millions m³ per year. The Mediterranean climate of Tizi-Ouzou is characterized by a cold winter with important rainfalls, and a very hot and dry summer from mid-May until mid-September. The climate of this region favours the bean development with irrigation.

Fifteen sites were initially selected, representing the diversity of agro-ecological conditions where beans are produced. A recognition survey was first conducted with key informants among the farmers who were invited by the Participatory Rural Appraisal to cultivate more than 1 ha of land with common bean. They were mainly village elders as well as the frontline extension staff, with wide experience in bean growing. A check list was used as a guide throughout the interview process. The interview covered perceptions on adoption of bean varieties, bean yield losses due to insect pests, local knowledge of pests and cultural practices as a management option.

Soil of the 15 sites were characterized by a standard sampling using a drill at a 30 cm depth, before sowing the bean culture. This correspond to the soil depth that is likely to be exploited by the roots of common bean.

2.2 Plant material

Seven Recombinant Inbred Lines (RILs), respectively noted 124, 115, 104, 147, 83, 75 and 7, were tested. They result from crossing between BAT 477 and DOR 364 carried out by Ribet (1996) within the framework of a co-operation CIAT-INRA. DOR 364 is well adopted in Latin America and Caribbean for its tolerance to the BGMV virus. BAT 477 was selected in Mexico for its tolerance to drought. It show high symbiotic nitrogen fixation and phosphorus use efficiency in hydro-aeroponic culture and agronomic trials in tropical zone in Cuba (Hernandez *et al.*, 1993). Preceding experiments were carried out to test the effect of *Rhizobium tropici* CIAT 899 among 50 lines of this crossing selected within the framework of the project of co-operation INRA (France) - IS (Cuba) which made it possible to choose the contrasting lines that were used in this experiment. “El Djadida” (abbreviated Dj) was used as a local reference for comparison with the RILs since this cultivar is traditionally used by the farmers in this area.

The culture tests were carried out randomly in each sites divided into lines, each line carrying a genotype among the Dj canopy. At the stage of full flowering, i.e. 45-46 days after emergence, 10 plants for each genotype were excavated within 20 cm deep and around the root. Shoots, nodules and roots of the harvested plants were separated, oven dried and weighted.

2.3 Statistical analysis

As reported above, we have previously showed (Alkama *et al*, submitted) that a hierarchical analysis of the soil properties made it possible to distinguished four soil clusters according to their total-N and total-P soil concentration. In this study, we have left out the soils where total-N concentration in soil was high enough to inhibit the nodulation of roots. So we have focused our study on soil clusters (clusters C and D in Alkama *et al*, submitted) with the lowest total-N concentrations, and with the highest nodulation rate of common bean. These soil clusters corresponded to 8 experimental sites. The soil properties and plant biomass production of 8 experimental sites kept, and

of 7 sites left out in this study, are presented in Table 1: soil properties were not different between the two set of sites, except total-N concentration which was lower in 8 sites kept, inducing a response in terms of nodulation much higher in the 8 sites kept for this study. The statistical analysis were done using the software package STATISTICA 8 for Windows (StatSoft Inc. Statistica 2007). The variance analysis were carried with a p-level of 0.05. The means were compared according to the test of NEWMAN and KEULS with a p-level of 0.05.

Table 1. Données physiques et chimiques des clusters A&B et C&D

Soil clusters	A & B	C & D
Clay, g kg ⁻¹	320 ± 110	320 ± 120
Silt, g kg ⁻¹	340 ± 170	380 ± 90
Sand, g kg ⁻¹	310 ± 150	280 ± 170
pH	7.46 ± 0.26	7.51 ± 0.32
CaCO ₃ content, g kg ⁻¹	166 ± 47	153 ± 79
Organic matter, g kg ⁻¹	11 ± 2	12 ± 2
total-N, g kg ⁻¹	2.0 ± 0.9 a	1.1 ± 0.4 b
Total-P, mg kg ⁻¹	265 ± 67	404 ± 191
Olsen-P, mg kg ⁻¹	39 ± 27	31 ± 14
Nodule number	10 ± 15 a	45 ± 35 b
Nodule biomass, g plant ⁻¹	11 ± 17 a	46 ± 40 b
Root biomass, g plant ⁻¹	2.7 ± 2.2 a	2.5 ± 0.9 b
Shoot biomass, g plant ⁻¹	24 ± 9 a	20 ± 7 b
Nodule/Shoot biomass, g g ⁻¹	0.4 ± 1.1 a	0.9 ± 0.6 b

3. Results

3.1 Plant nodulation

Figure 1 shows, on the 8 experimental sites, mean shoot biomass produced by all the 8 lines of common bean as a function of nodule biomass. We observed a highly significant relation between shoot and nodule biomasses, with a R value of 0.86 (p-level < 0.01) and a slope of 200 mg of shoot biomass produced by mg of nodule biomass.

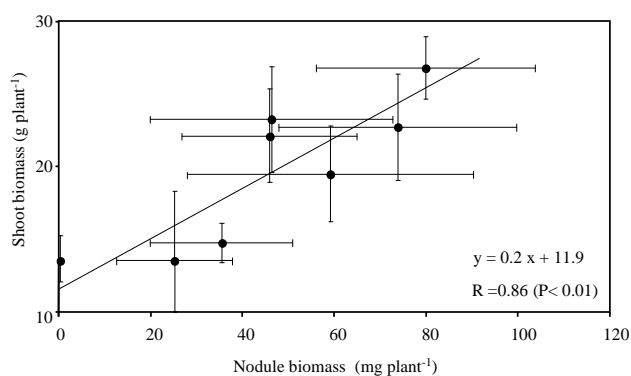


Figure 1. Mean shoot biomass *versus* nodule biomass of the 8 genotypes named El Djadida (Dj), 147, 124, 115, 104, 83, 75 and 7, grown on the 8 experimental sites retained. Data are means and SD of 10 replicates collected at flowering stage.

The significant relation makes it possible to draw an overall efficiency in use of the rhizobial symbiosis of each RILs on the 8 sites. Figure 2 shows that a significant relation was found for each RILs, except for 115. The local variety El Djadida (Dj) presented the ability to produce the greatest nodulation, up to 100mg of nodules per plant.

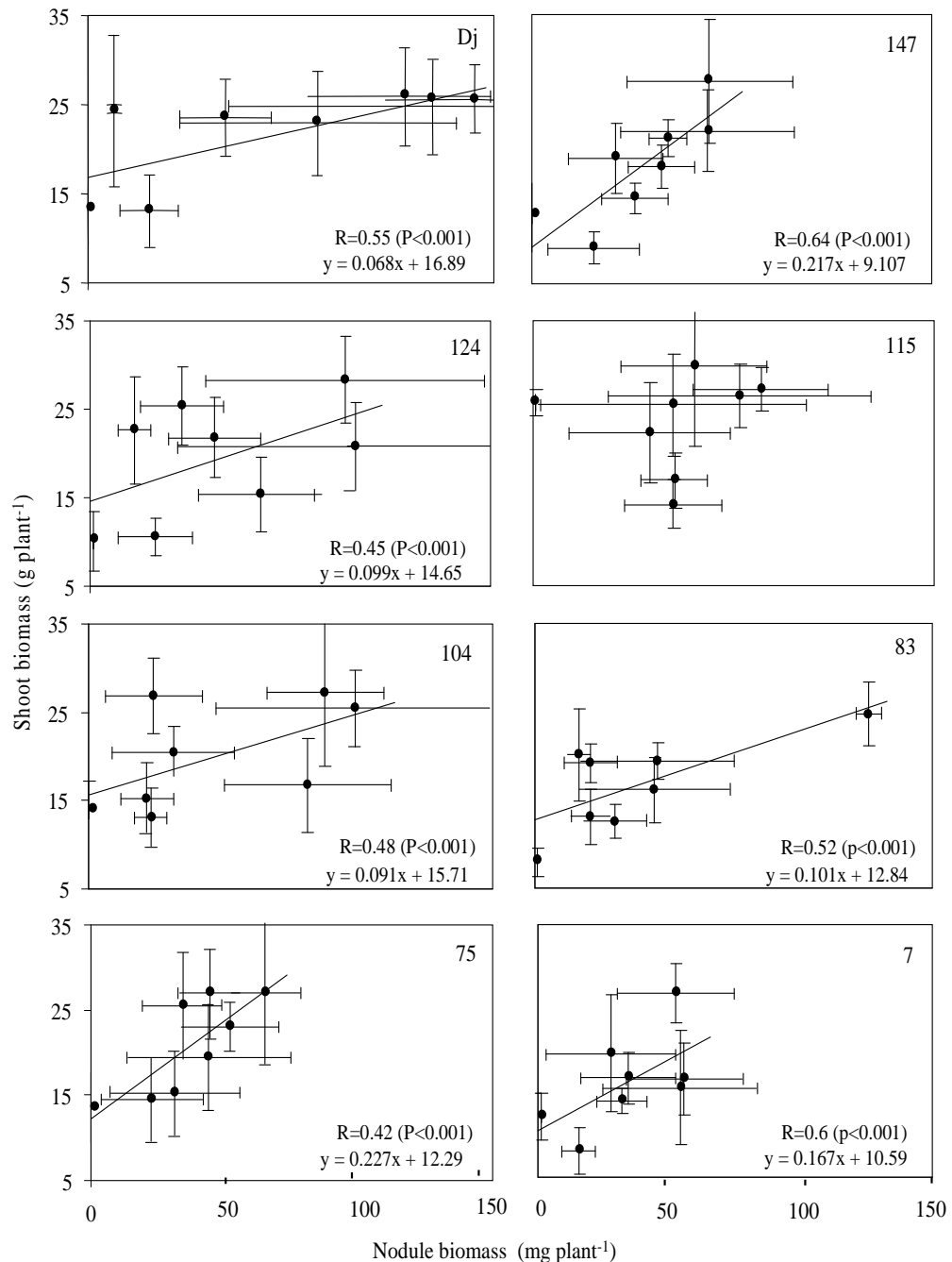


Figure 2. Shoot biomass *versus* nodule biomass for each 8 genotypes named El Djadida (Dj), 147, 124, 115, 104, 83, 75 and 7, grown on the 8 experimental sites retained. Data are means and SD of 10 replicates collected at flowering stage.

3.2 Nodule and shoot biomass as a function of Olsen-P

The question was to determine if the availability of P had an effect on the nodulation of roots, and thus on shoot biomass production by common bean. Figure 3 shows mean nodule (Fig. 3a) and shoot (Fig 3b) biomasses of the 8 lines of common bean as a function of Olsen-P concentration in soil of the 8 experimental sites. We observed a highly significant relation between biomasses and Olsen-P concentration in soil. The best fits were obtained with a curvilinear equation. For nodule and shoot biomasses, the optima were observed for a Olsen-P concentration of about 40 and 35 mg kg^{-1} of Olsen-P in soil, respectively : behind this value, nodule and shoot biomasses increased with Olsen-P concentration, since above this value nodule and shoot biomasses decreased with Olsen-P concentration in soil.

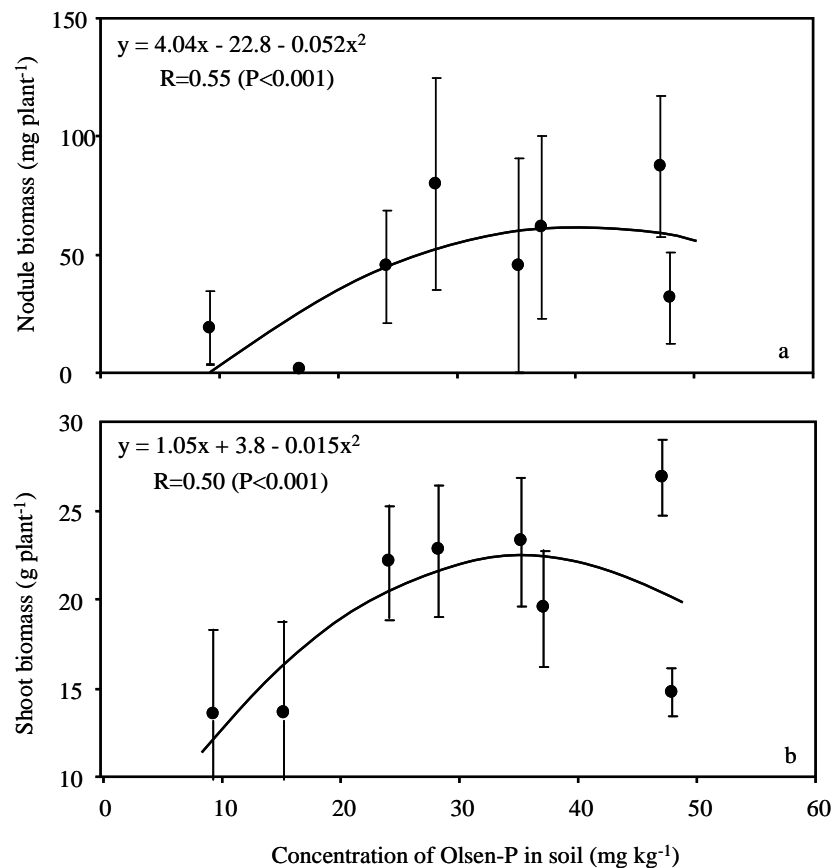


Figure 3. Nodule a) and shoot b) biomasses, versus concentration of Olsen-P in soil, of the 8 genotypes named El Djadida (Dj), 147, 124, 115, 104, 83, 75 and 7, grown on the experimental sites retained. Data are means and SD of 10 replicates collected at flowering stage.

Figure 4 shows nodule biomass of the different lines as a function of Olsen-P concentration in soil of experimental sites. Except for the RILs 83 and 115, the nodulation was related to Olsen-P concentration in soil. It appears that the best fits were again obtained with a curvilinear equation, indicating optima around 40 mg kg⁻¹ of Olsen-P in soil.

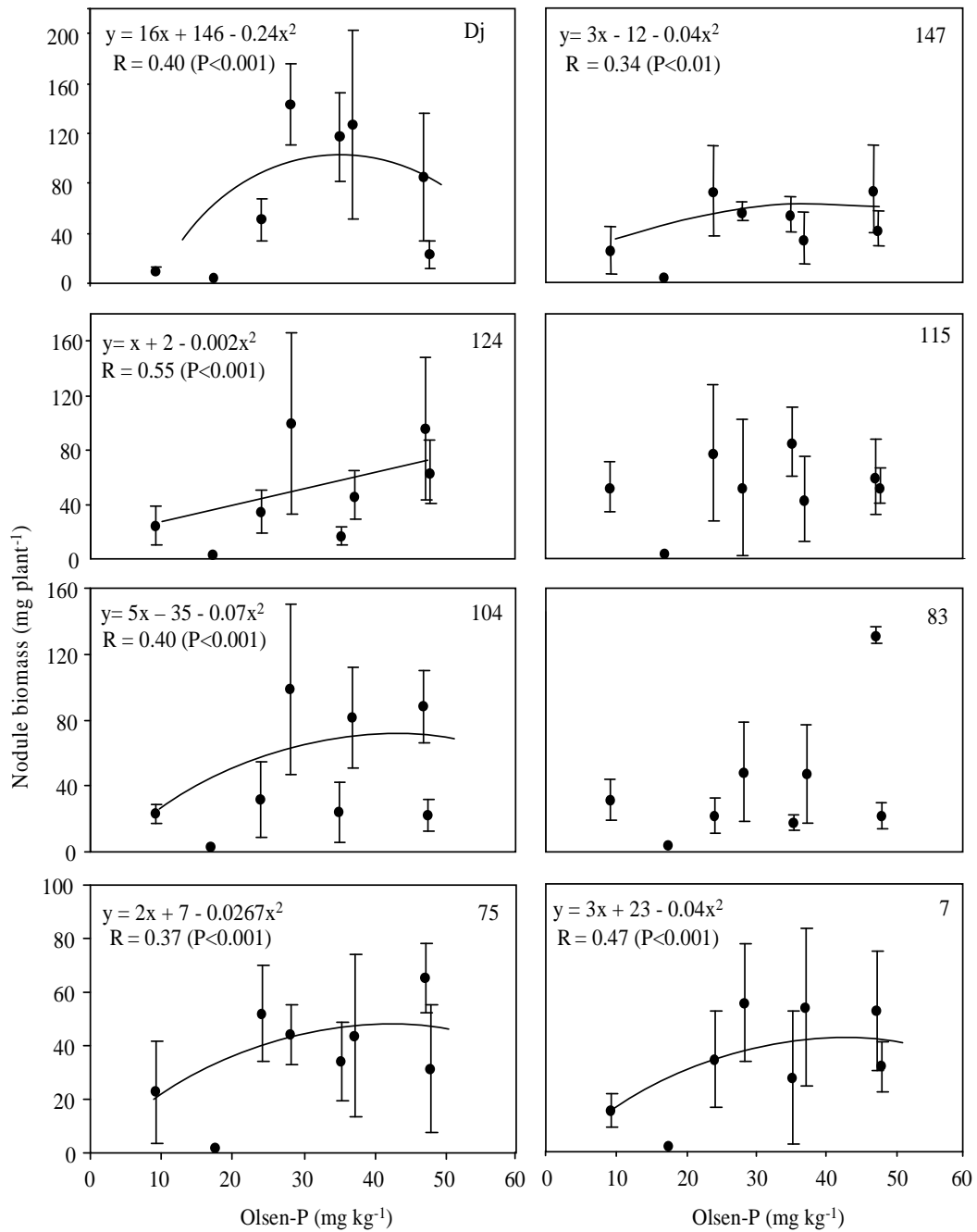


Figure 4. Nodule biomass *versus* concentration of Olsen-P in soil, of the 8 genotypes named El Djadida (Dj), 147, 124, 115, 104, 83, 75 and 7, grown on the experimental sites retained. Data are means and SD of 10 replicates collected at flowering stage.

For El Djadida (Dj) for example, the nodulation increased with Olsen-P until a maximal value close to 120 mg of nodules by plant, corresponding to the critical P value of 35 mg of Olsen-P by kg of soil. For each increase of 1 mg P kg⁻¹ of soil, the nodulation of Dj increased of 16 mg of nodule biomass by plant. For the RILs 147, 104, 75 and 7 the relation was curvilinear with nodulation increasing until maximal value corresponding to the critical P ranging between 40-50 mg kg⁻¹. The maximal value of nodulation given by the model was close to 70, 50 and 40 mg plant⁻¹ for the RIL 104, 147, 75 and 7, respectively. By contrast, the relation was linear for RIL 124. For each increase of 1 mg P kg⁻¹ of soil the nodulation of the RILs increased of 5, 3 and 2 mg nodule biomass plant⁻¹ for the RILs 104, 147, 7 and 75, respectively.

Figure 5 shows shoot biomass of the different lines as a function of Olsen-P of the experimental sites. For Dj the shoot biomass increased significantly with Olsen-P until maximal value corresponding to the critical value of 28 mg Olsen-P kg⁻¹ of soil. The maximal shoot biomass given by the model was nearly of 22 g plant⁻¹. For each increase of 1 mg P kg⁻¹ of soil the shoot biomass of Dj increased of 0.9 g shoot biomass plant⁻¹. For the RILs the shoot biomass was related with Olsen-P according to a curvilinear model. For RILs 147, 124, 104, and 83 the maximal value corresponding to the critical P was 35 mg Olsen-P kg⁻¹ of soil, whereas for RILs 115 and 75 it was 32 mg P kg⁻¹ of soil, and for RIL 7 the critical P was above 50 mg P kg⁻¹ of soil.

The maximal value of nodulation given by the model was nearly as above of 25, 20 and 15 g plant⁻¹ for RILs 104, 115 and 75, RIL 124, and RILs 147 and 83 respectively. For RILs 124, 75, 104, 147 and 115 each increase of 1 mg P kg⁻¹ of soil was associated with a shoot biomass increase of 1.1 to 1.4 g plant⁻¹. However, for RILs 83 and 7 each increase of 1 mg P kg⁻¹ of soil the shoot biomass of the RILs increased of less than 0.8 g plant⁻¹.

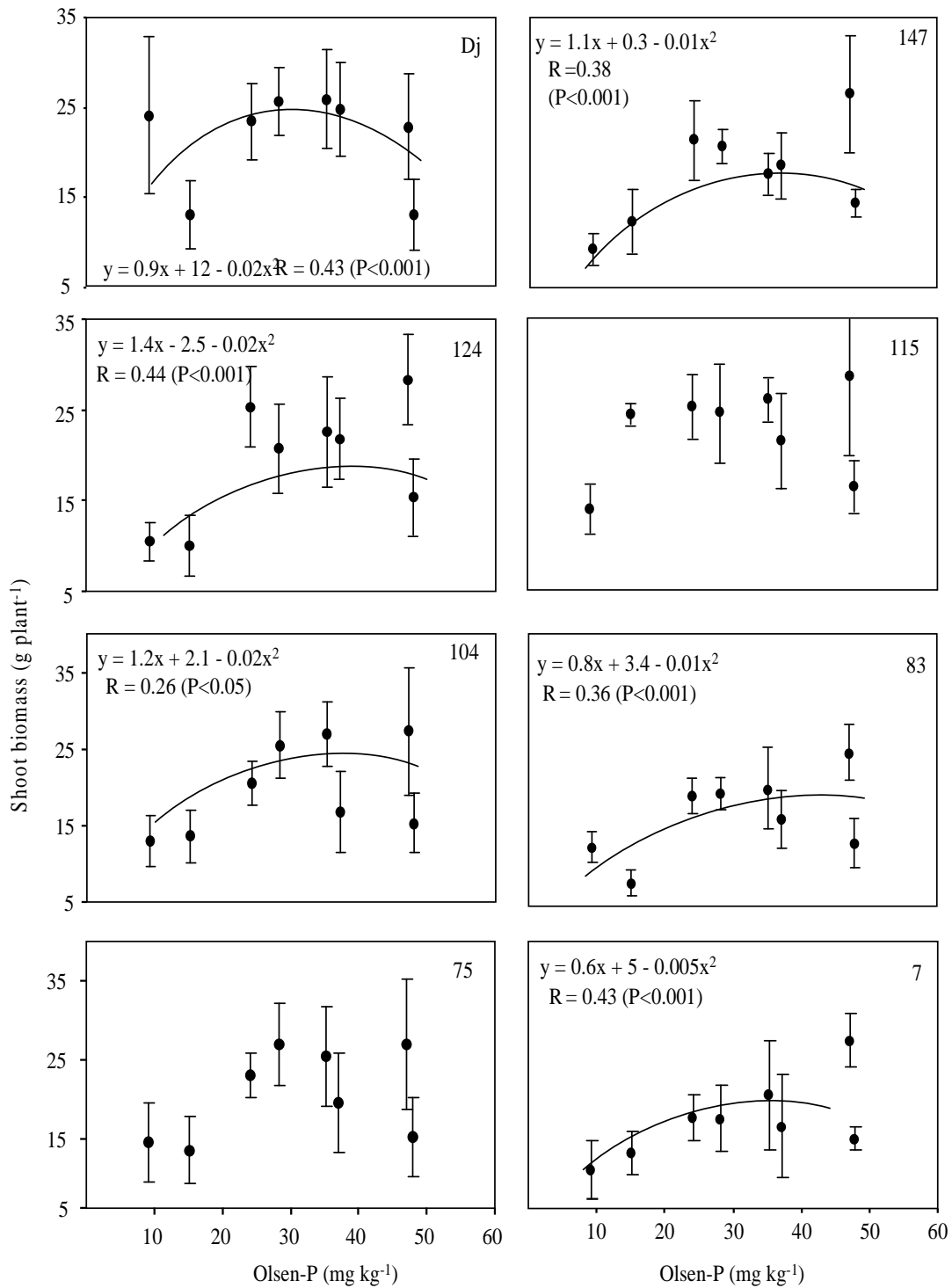


Figure 5. shoot biomass *versus* concentration of Olsen-P in soil, of the 8 genotypes named El Djadida (Dj), 147, 124, 115, 104, 83, 75 and 7, grown on the experimental sites retained. Data are means and SD of 10 replicates collected at flowering stage.

3.3. Hierarchical classification of the RILs

Figure 6 shows the dendrogram of the nodule and shoot biomass of different genotypes on the 8 experimental sites. It appears that the hierarchical analysis separated first El Djadida from the group of 7 RILs issued from the crossing between BAT 477 and DOR 364. At lower aggregation distance, the most tolerant to P-deficiency RIL 115 was separated, then the group of less sensitive RILs 104 and 124; and finally the most sensitive to P-deficiency RILs 7, 147, 83 and 75. So the different lines of common bean were ordered from the most tolerant to the most sensitive to P-deficiency.

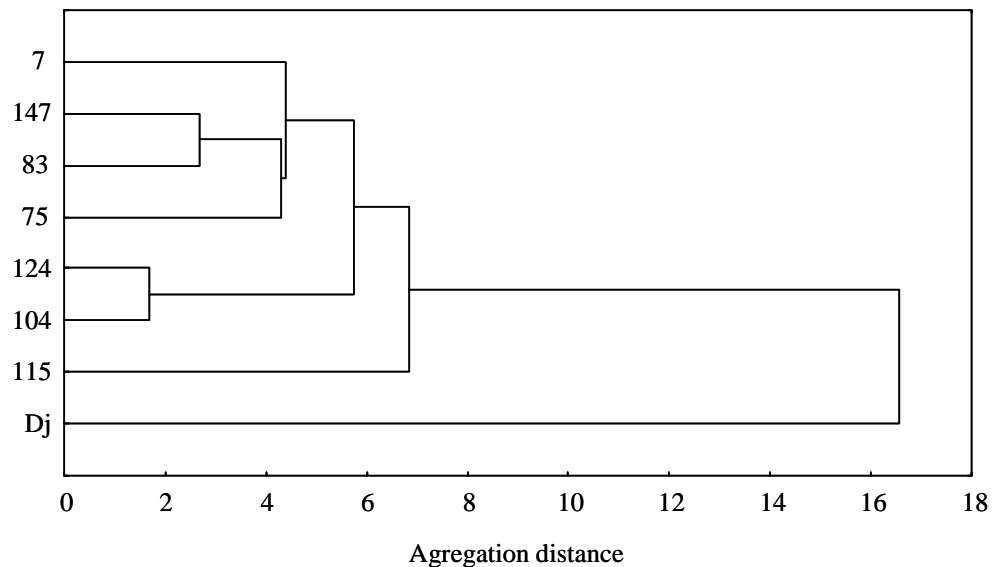


Figure 6. Dendrogram of the shoot and nodule biomass of the 8 genotypes named El Djadida (Dj), 147, 124, 115, 104, 83, 75 and 7, grown on the experimental sites retained.

4. Discussion

The major finding in this work is that, on the set of data kept for this study, nodule biomass and shoot biomass of the 8 lines of common bean tested were significantly linked to Olsen-P concentration in soil.

In this study we could highlight the existence of the linear correlation between nodulation and shoot biomass indicating that nodules were sufficiently efficient. We have previously showed (Alkama *et al*, submitted) that this level of nodulation made it possible to completely compensate the N-deficiency in soil by producing a similar shoot biomass as in N-sufficient soil. Nitrogen nutrition of legumes, which relies on atmospheric N₂ and soil mineral N, remains a major limiting factor of growth (Voisin *et*

al., 2007). A decade ago, breeders tried to increase N uptake through hypernodulation (Sagan & Duc, 1996; Voisin *et al.*, 2007). The reduction of the atmospheric nitrogen by the nitrogenase requires a large energy expenditure with half to be provided by ATP. This molecule is indeed necessary for the transfer between components of the nitrogenase complex, of electrons that will be eventually allocated to a nitrogen atom for the ammonium synthesis. In the rhizobial legume symbiosis, the synthesis of this ATP depends on phosphorus (Ribet & Drevon, 1995). Legumes depending on symbiotic N₂ fixation have a higher internal P requirement for optimum nitrogen accumulation than plants dependent on combined N (Ribet & Drevon, 1995). Several authors have showed that P deficiency can impair nodulation and N₂ fixation (Tang *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2002). In plants relying on N₂ fixation, P stimulated nodulation and N₂ fixation more than it stimulated plant growth (Israel, 1987; Leidi & Rodriguez-Navarro, 2000; Hellsten & Huss-Danell, 2001; Gentili & Huss-Danell, 2002, 2003; Valverde *et al.*, 2002).

Alternatively, stimulation of nodulation by P might be ascribed to a general growth effect in legumes (Robson *et al.*, 1981; Jakobsen, 1985) and in an actinorhizal symbiosis (Reddell *et al.*, 1997). Thus, although Dj was the most nodulated genotype in this study, its overall lower efficiency in use of the rhizobial symbiosis suggesting that a lack of nodulation of the RILs could be compensated by an increase in the nodule efficiency to support plant growth. In most studies the positive response of plant growth and symbiotic N₂-fixation to increased P supply in legumes is thought to be because symbiotic N₂-fixation is an energy demanding process with a high ATP requirement of 16 ATP for reduction of one molecule of N₂ into 2NH₃ (Israel, 1987; Sanginga *et al.*, 1989; Burris, 2000). The C cost of N₂-fixation to the plant has been estimated at 6-12 mg C per mg fixed-N (Vance & Heichel, 1991) which is far greater than the C cost for the acquisition of combined-N (Lambers *et al.*, 1998) supporting the conclusion that nitrogen fixation would have a higher P requirement than combined-N nutrition. The high P requirement of N₂-fixation and the subsequent legume growth is consistent with the observations that in fertile soil, legume growth responded more than grasses to elevated CO₂ levels because of N₂-fixation, whereas in P-deficient soil, the legumes no longer increased biomass or N₂-fixation in response to elevated CO₂ (Almeida *et al.*, 2000). The influence of P availability on N₂-fixation was emphasized by the fact that during P stress in white lupin, 80% of new nodule growth preferentially located near cluster roots (Vance *et al.*, 2003) where P uptake is higher than non-cluster root parts of

the root (Adams *et al.*, 2002). Also P deficient legumes may modulate N₂-fixation through low sink demand for N (Hartwig, 1998; Almeida *et al.*, 2000) as a response to decreased shoot growth through lowered leaf expansion and lowered specific leaf area (Jensen *et al.*, 2003).

Moreover, the relation which linked nodule biomass and shoot biomass of the 8 lines of common bean to Olsen-P concentration in soils presented systematically a best fit with a curvilinear regression, by increasing from 0 to about 40 mg of P kg⁻¹ soil, and by being quite constant or decreasing beyond this value of P. P would limit nodulation whereas above 40 mg of P kg⁻¹ soil, the P availability would be higher than the nodule requirement for most RILs, and eventually toxic for Dj. Thus P toxicity is apparent in low-P adapted plants when grown experimentally at relatively higher P supply, although the extra P could be stored in the vacuole (Schactman *et al.*, 1998; Shane *et al.*, 2004). However, this study shows that legumes would scarcely encounter such high concentrations of Olsen-P toxicity in Mediterranean fields. The contrasting absence of correlation for RIL 115 suggests that this RIL would be less demanding for P than the other genotypes of the study, since its relatively high nodulation was not affected by Olsen-P variation between 10 and 50 mg of P kg⁻¹ soil among sites. RILs 83 and 124 would be the most P demanding since their nodulation was still responding to an increase of P above 50 mg of P kg⁻¹ soil. Other P demanding genotypes in the conditions of this study were RILs 7, 75 and 147 since their critical Olsen-P for nodulation was above 40 mg of P kg⁻¹ soil, by contrast with that close to 30 mg of P kg⁻¹ soil for RIL 104. This conclusion is confirmed by the significantly higher maximal nodulation of about 80 mg nodule biomass plant⁻¹ for RILs for 115 and 104, than below 60 mg nodule biomassplant⁻¹ for the other RILs. This agrees with the conclusion of Vance (2003) that for N₂-fixing legumes and actinorhizal plants, phosphorus is often the most limiting nutrient for growth (Vance, 2003).

Eventually the above variations in response of nodulation and growth to Olsen-P may be explained by infraspecific interactions with native rhizobia among the various sites. Indeed previous studies have shown how nodule occupancy by different serogroups of rhizobia can be dramatically changed as a result of changes in P concentration, showing differences among rhizobial strain abilities to produce and excrete Nod factors under low P level (Mullen *et al.*, 1988). In contrast, Zaroug and Munns (1979) found that phosphate addition had no effect on the nodulation of *Lablab purpureus* by strains of *Bradyrhizobium* CB756 and CB1024. Thus further work is

needed to establish whether the rhizobial microsymbiont may interact with nodulation and efficiency in use of rhizobial symbiosis of the RILs under limiting soil P supply.

5. Conclusion

In conclusion, a multi-local approach allows to explore the behaviour of different genotypes in field conditions close to real farm conditions. However, farm conditions presents a wide variability due to the large difference in agricultural practices. In a first paper, we (Alkama *et al.*, submitted) have showed that experimental sites should be first classified according to their soil properties, mainly total-P and total N-content in soil: in fact, high N content in soil inhibited the root nodulation of common bean. In this study, we have consequently focused our attention only on sites where soil had low N-content. In this condition, we have showed that shoot biomass produced by common bean was related to the nodulation rate of roots, demonstrating a high use efficiency of rhizobial symbiosis in these field conditions. Moreover, specific analysis showed that nodulation rate of roots, and thus shoot biomass, depended to the available phosphorus concentration in soil: it increased with available P concentration until a value close to 40 mg per kg of soil, and decreased above this critical value. We confirm thus in field conditions a process well-known in controlled conditions. At the level of genotypes, we have finally showed that hierarchical analysis of these data made it possible to classify the different lines tested according to their tolerance to P-deficiency. Our results confirmed the results yet obtained in controlled conditions (Alkama *et al.*, submitted). In addition, they underlined the outstanding ability of local genotype, El Djadida surnamed “4x4 bean” by farmers, to tolerate low available phosphorus concentration in soil.

Acknowledgments

This work was supported by Aquarhiz project of the EU INCOMED program and Tassili PHC of the French ministry of foreign affairs. The authors are grateful to the local farmers and the students of Mouloud Mammeri University for their excellent contribution.

6. References

- Alkama, N., Jaillard, B., Ounane, S.M., Drevon, J.J., 2010. Is genotypic variation of H⁺ efflux under P deficiency linked with nodule-root respiration of N₂ - fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.)? Submitted to *Plant Physiol. Biochem.*
- Adams M.A., Bell T.L., Pate J.S., 2002. Phosphorus source and availability modify growth and distribution of root clusters and nodules of native Australian legumes. *Plant Cell & Env.* 25, 837-850.
- Almeida J.P.F., Hartwig U.E., Freher M., Nosberger J., Luscher A., 2000. Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Exp. Bot.* 51, 1289-1297.
- Andrade, C.A.B., Patroni, S.M.S., Clemente, E., Scapin, C.A., Silve´rio, L., 2003. Effect of fertilization in protein and tryptophan contents in three bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Rep. Bean Improv. Coop.* 46, 93-94.
- Burris R.H., 2000. Introduction to nitrogenases. Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process. Wymondhan, UK, *Horizon Scientific Press*, 33-41.
- Gentili, F., Huss-Danell, K., 2002. Phosphorus modifies the effects of nitrogen on nodulation in split-root systems of *Hippophaë rhamnoides*. *New Phytol.* 153, 53-61
- Gentili, F., Huss-Danell, K., 2003. Local and systemic effects of phosphorus and nitrogen on nodulation and nodule function in *Alnus incana*. *J. Exp. Bot.* 54, 2757-2767.
- Hartwig U.A., 1998. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in plant Ecology, Evolution & Systematics.* 1, 92-120.
- Hellsten A., Huss-Danell K., 2000. Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavia* 50, 135-142.
- Hernandez G., Vasquez H., Toscano V., Sanchez T., Franchi-Alfaro A., Mendez N., Drevon J.J., 1993. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars in hydroponic culture and in the field. *Trop. Agric. (Trinidad).* 70, 230-234.
- Israel D.W., 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol.* 84, 835-840.
- Jakobsen I., 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum.* 64, 190-196.
- Jensen, E.S., Hauggaard-Nielsen, H., 2003. How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant Soil* 252, 177-186.
- Leidi, E.O., Rodriguez-Navarro, D.N., 2000. Nitrogen and phosphorus availability limit N₂ fixation in bean. *New Phytol.* 147, 337-346.

- Mullen M.D., Israël, D.W. Wollum II A.G., 1988. Effects of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) phosphorus nutrition on nodulation and dinitrogen fixation. *Applied Env. Microbiol.* 54, 2387-2392.
- Pereira P.A.A., Bliss F.A., 1987. Nitrogen fixation and plant growth of common bean *Phaseolus vulgaris* (L) at different levels of phosphorus availability. *Plant Soil* 104, 79-84.
- Pujola, M., Farreras, A., Casanas, F., 2007. Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 102, 1034–1041.
- Reddell P, Yun Y, Shipton WA, 1997. Do *Casuarina cunninghamiana* seedlings dependant on N₂ fixation have higher phosphorus requirements than those supplied with adequate fertilizer nitrogen? *Plant Soil.* 189, 213-219.
- Ribet J., Drevon J.J., 1996. The phosphorus requirement of N₂-fixing and urea-fed *Acacia mangium*. *New Phytol.* 132, 383-390.
- Robson A.D., O'Hara G.W., Abott L.K, 1981. Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Australian Journal of Plant Physiology.* 8, 427-436.
- Sagan M., Duc G., 1996. *Sym28* and *Sym29*, two new genes involved in regulation of nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). *Symbiosis* 20, 229-245.
- Sanginga N., Danso S.K.A., Bowen G.D., 1989. Nodulation and growth response of *Allocauarina* and *Casuarina* species to phosphorus fertilization. *Plant Soil.* 118, 125-132.
- Schachtman D.P., Reid RJ, Ayling SM. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant physiol.* 116, 447-453.
- Shane M.W., McCully M.E., Lambers H., 2004. Tissue and cellular phosphorus storage during development of phosphorus toxicity in *Hakea prostrata* (Proteaceae). *J. Exp. Bot.*
- Shimelis, E.A., Rakshit, S.K., 2005. Proximate composition and physico-chemical properties of improved dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *LWT* 38, 331–338.
- Shimelis, E.A., Meaza, M., Rakshit, S.K., 2006. Physico-chemical properties, pasting behavior and functional characteristics of flours and starches from improved bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Agric. Eng. Int.* 8, 1–19.
- Tang, C., Hinsinger P., Drevon J.J., Jaillard B., 2001a. Phosphorus deficiency impairs early nodule function in *Medicago truncatula* L. *Ann. Bot.* 88, 131–138.
- Trabelsi, M., 2001. Réponse du haricot à certains facteurs contrôlant la production. 45-58. In : Fixation symbiotique de l'azote et développement durable dans le Bassin méditerranéen. Ed INRA, Paris 2003. Les colloques, N° 100.
- Valverde C., Ferrari A., Wall L.G., 2002. Phosphorus and the regulation of nodulation in the actinorhizal symbiosis between *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* symbiosis. *Canadian J Bot.* 77, 1302-1310.

- Vance C.P., Heichel, G. H., 1991. Carbon in nitrogen fixation: Limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42, 373-392.
- Vance C.P., Udhe-Stone C., Allan DL, 2003. Phosphorus acquisition and use critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource. *New Phytol.*, 157, 423-447.
- Vadez V., Drevon J.J., 2001. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 21, 691-699.
- Voisin A.S., Bourion V., Duc G., Salon C., 2007. Using an ecophysiological analysis dissect genetic variability and to propose an ideotype for nitrogen nutrition in pea. *Ann. of Bot.* 1-12.
- Zaroug M.G., Munns D.N., 1979. Nodulation and growth of *Dolichos Lablab* in relation to *Rhizobium* strain, liming and phosphorus. *Plant Soil* 53, 329-339.

Chapitre 5

Nodulation, growth, P and N statut of contrasted Recombinant Imbred Lines of common bean observed at two soil phosphorus levels under biological nitrogen fixation.

Dans le chapitre précédent nous avons pu mettre en évidence l'effet significatif de P Olsen sur la nodulation et la croissance en multilocal dans la région de Tizi Ouzou, en Algérie. Nous avons obtenu une corrélation positive et significative de P Olsen avec la nodulation des RILs dans différents sites.

Dans ce chapitre nous voulions vérifier le rôle que jouerait le P disponible sur les RILs étudiées précédemment. Elles sont cultivées sous deux niveaux de phosphore : P déficient et P suffisant. L'essai est mené dans une parcelle expérimentale en bloc comme indiqué dans les photos ci-dessous.



Photos de l'essai agronomique

Nodulation, growth, P and N statut of contrasted Recombinant Imbred Lines of common bean observed at two soil phosphorus levels under biological nitrogen fixation.

Authors: Nora Alkama^{a,b,c,*}, Benoît Jaillard^a, Sidi Mohamed Ounane^c, Jean Jacques Drevon^{a,*}

Affiliation: ^a INRA-IRD-SUPAGRO, UMR Eco&Sol, Bat 12, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

^bUniversité Mouloud Mammeri, Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, département d'Agronomie, Tizi Ouzou. Algeria.

^cInstitut National Agronomique, Département de Phytotechnie, Hassan Badi, El Harrach, Algiers, Algeria.

Abstract

The genotypic differences on growth and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in response to P supply were evaluated in a field experiment under biological N₂ fixation. Eight cultivars were grown at P sufficiency and P deficiency, in randomized block design in factorial arrangement. Vegetative biomass was sampled at three ontogenetic stages. The analysis of variance identified a significant effect of genotype, phosphorus and time of sampling for almost all traits for accumulation of biomass and nutrients. Considering the average of the three samples, the higher P supply stimulated the vegetative growth of the genotype, increasing shoot and nodule biomass of plant. Patterns of biomass accumulation differed among genotypes. The nodule senescence observed after flowering might have reduced N₂ fixation during pod filing.

Key words: Recombined Imbred Lines, nodulation, *Phaseolus vulgaris*, Phosphorus, Nitrogen

1. Introduction

Comprises approximately 700 genera with more than 18000 species (Doyle & Luckow, 2003), was the evolution of mutualistic symbioses with nitrogen (N)-fixing bacteria of the family Rhizobiaceae to directly capture atmospheric dinitrogen (N₂) to support plant growth. Symbiotic nitrogen fixation (SNF) takes place in specialized rhizobia-induced legume root nodules and involves a tight association between the two symbionts. SNF and legume crop production might be affected by disease and insect pressures but also by edaphic constraints that include climatic conditions, nutrient deficiency.

Phosphorus (P) is an essential macronutrient for plant growth and development, with P concentration ranging from 0.05% to 0.5% plant dry weight (Hernandez *et al.*, 2009). P is taken by the plants as phosphate (Pi), but Pi is unevenly distributed and relatively immobile in soils. As a result, crop yield in 30% to 40% of arable land is limited by P availability (Vance *et al.*, 2003). Widespread P deficiency is a major restriction for SNF and legume crop productivity (Andrew, 1978).

Common bean is the world's most important grain legume for direct human consumption (Hernandez *et al.*, 2009). P deficiency is widespread in the bean-producing regions of the Third World and is perhaps the factor that most limits N₂ fixation on small farms. Bean genotypes differ in N₂ fixation ability and P use efficiency under P deficiency. Considering the greater P need of nodulated legumes, P-tolerant cultivars that in addition partition a significant percentage of their P uptake to nodules will be a prerequisite for improved bean N₂ fixation (Graham, 1981; Broughton *et al.*, 2003; Graham & Vance, 2003; Tang *et al.*, 2004).

Common bean exhibits a generalized response to P fertilization (Oliveira *et al.*, 2004). Combined analysis of seven experiments showed that the maximal economic fertilizer level for bean production was equal to 47 kg ha⁻¹ of P (Barbosa Filho & Silva, 1994). Some works have noticed the genotypic variability for responses to P fertilization of bean yield (Pereira & Bliss, 1989; Youngdahl, 1990; Yan *et al.*, 1995a). Owing to such genotypic differences, fertilizer recommendation must consider the crop technological level, in order to obtain the maximal potential of specific cultivar (Araújo *et al.*, 2000).

Grain yield would not sufficient as unique criterion for evaluating efficiency in use of bean genotypes, as yield integrates many edaphic and climatic variables, it would likely to conceal the efficient germplasm (Informe..., 1985). The identification of

morphological traits and specific period crop development, regarded critical for establishment of cultivars under low P, could enhance the ability of manipulating the germplasm (Informe..., 1985). The lack of significance on the interaction between growth under low P and three soil types might mean that bean adaptation to low P is stable across different environments, making the selection and breeding relatively easier (Yan *et al.*, 1995b; Araùjo *et al.*, 2000).

The failure to establish effective nodulation is often considered as the main reason for poor N₂ fixation by common bean in the field, but species may generally be predisposed to poor fixation because of ineffective symbiosis and the short vegetative fixation period (Piha & Munns, 1987). Most studies on adaptation of beans to low P availability were carried out under conditions combined N, and studies to ensure that tolerance to low P is compatible with N₂ fixation are needed, since attempts to select bean genotypes tolerant to low P are likely to be affected by symbiosis established with rhizobia. Genotypic variability in N₂ fixation at low soil P level indicates that breeding to enhance these traits simultaneously would be possible (Araùjo *et al.*, 2000).

In a previous paper (Alkama *et al.*, submitted), we have tested in a multi-local field seven Recombinant Inbred Lines (RILs) issued from the crossing between BAT 477 and DOR 364. The RILs were compared with a cultivar traditionally used by the farmers as a reference, named El Djadida. We could demonstrate that, on the set of data kept for this study, nodule biomass and shoot biomass of the RILs of common bean tested were significantly linked to Olsen-P concentration in soil.

The objective of this work was consequently to focus on the evaluation of the differences of common bean RILs in the response to P supply of the vegetative growth, N and P concentration in a field experiment under conditions of biological N₂ fixation.

2. Material and methods

2.1. Experimental sites

The experiment was carried out at the Tizi Ouzou location in a complete randomized block design in factorial arrangement with four replicates. Eight common bean cultivars were cropped at two levels of P, P deficiency with the existing P in soil and P sufficiency with 50 kg ha⁻¹ of P as triple superphosphate. The soil namely Site 19 was classified between cluster C and D according to classification given by Alkama *et al.* (submitted). Clusters C and D depended both on nodulation and N-mineral which

inhibits partially nodulation and which is compensated by P. The soil properties of the experimental sites kept, in this study, are presented in Table 1 and its classification is also given by an hierachical classification in **figure 1**.

Table 1. Soil properties of the studied sites 19

<i>Sites</i>	<i>pH</i>	<i>CaCO3</i>	<i>OM</i>	<i>Total-P</i>	<i>Olsen-P</i>	<i>Total-N</i>	<i>Clay</i>	<i>Silt</i>	<i>Sand</i>
Site 19	8.2	25	1.08	230	12	0.28	36	37	27

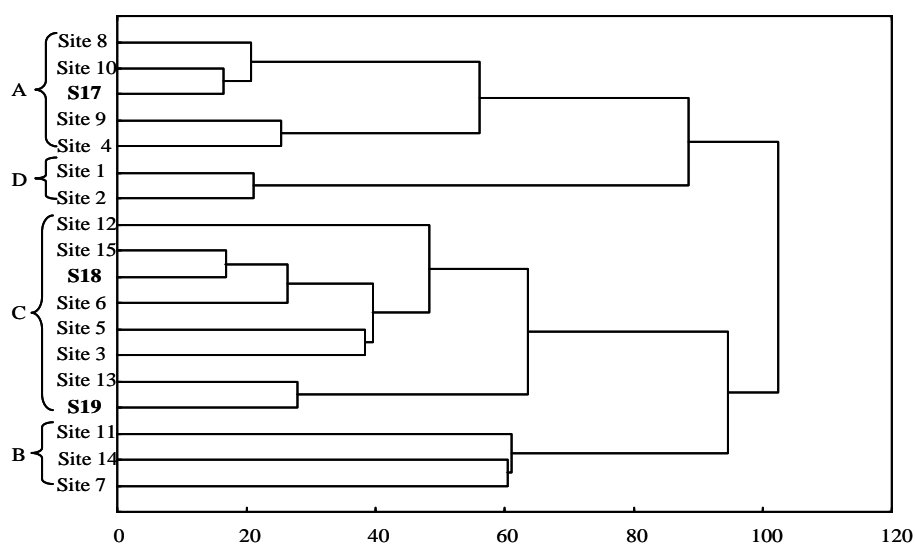


Figure 1. Dendrogram of location of the studied sites 19 into the fourth clusters obtained previously.

2.2. Plant material

Seven Recombinant Inbred Lines (RILs), respectively noted 124, 115, 104, 147, 83, 75 and 7, were tested. The seven RILs resulted from crossing between BAT 477 and DOR 364. carried out by Ribet (1996) within the framework of a co-operation CIAT-INRA. DOR 364 is a variety having a good adaptation in Latin America and to the Caribbean: that results mainly from its tolerance to virus BGMV. BAT 477 was selected in Mexico for its tolerance to the drought, and has a high symbiotic nitrogen fixation (SNF) and a high PUE and FSN in hydro-aeroponic culture like in agronomic tests in tropical zone in Cuba (Hernandez *et al.*, 1993) . Preceding experiments were carried out to test the effect of *Rhizobium tropici* CIAT 899 among 50 lines of this crossing selected within the framework of the project of co-operation INRA (France) - IS (Cuba) which made it possible to choose the contrasting lines that were used in this experiment.

As a reference for the farmer, RILs were compared with “El Djadida” (noted Dj), which is a cultivar traditionally used by the farmers in this area.

Vegetative biomass was sampled at the stages V1, V6 and R7 of plant development (Fernandez *et al.*, 1985; Araùjo *et al.*, 2000). The sample unit consisted of 12 plants harvested from the two middle rows of each plot. Roots were washed and nodules were detached. Shoots, roots and nodules were separately dried and weighed. Roots plus nodules and shoots were ground and N concentration was measured by Kjeldahl procedure and P concentration by green malachite method.

2.3. Statistical analysis

The statistical analysis were done using the software package STATISTICA 8 for Windows (StatSoft Inc. Statistica 2007). The cluster analysis were used to explore the structure of data set (Jolliffe 2002; Mencia and Mas-Pla 2008). The variance analysis were carried with a p-level of 0.05. The comparisons of means were made according to the test of NEWMAN and KEULS with a p-level of 0.05.

3. Results

3.1 Biomass production

Figure 2 shows variation on nodule biomass in site 19 of studied RILs in comparison with Dj the local farmer genotype. All RILs presented a reduction in nDW after flowering. Such effect being less intense in RIL 28 which showed poor nodulation. At flowering stage Dj was less nodulated with only 20 mg plant⁻¹ against 40 mg plant⁻¹.

Figure 3 shows variation on shoot biomass in site 19 of studied RILs in comparison with Dj the local farmer genotype. The analysis of variance of the sDW identified significant effects of genotypes, phosphorus and time of sampling. Considering the average of the three samples, the higher P supply stimulated the vegetative growth of bean lines, increasing shoot dry weight. Patterns of biomass accumulation differed among cultivars. In the P deficient soil, shoot was markedly reduced with the sensitive RILs 147, 124 and 28 showing the weakest values for these parameters when P was limited in the soil. In contrast the difference between P sufficiency and P deficiency was not significant for Dj and 115. This is confirmed by the figure 4 which shows the dendrogram of the different genotypes at P deficiency. It

as evident that local variety El Djadida (Dj) was quite different from the RILs genotypes.

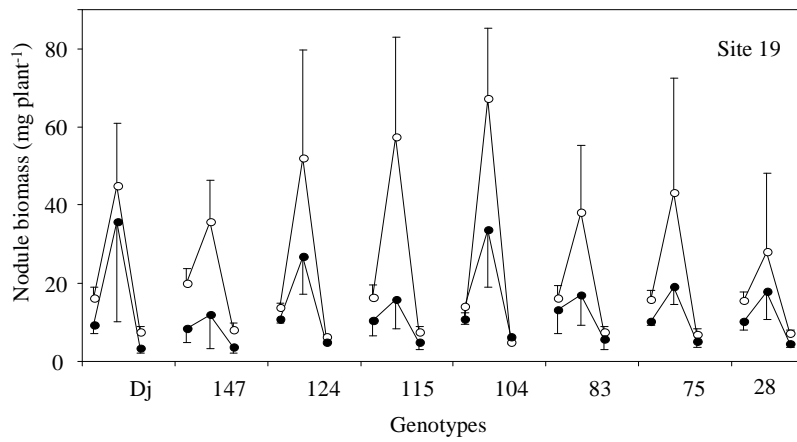


Figure 2. Effect of two P level (P sufficiency ○ *versus* P deficiency ●) on nodule biomass of 8 genotypes in the site 19.at three times of sampling: V1, V6 and R6. data are means of 12 harvested plants.

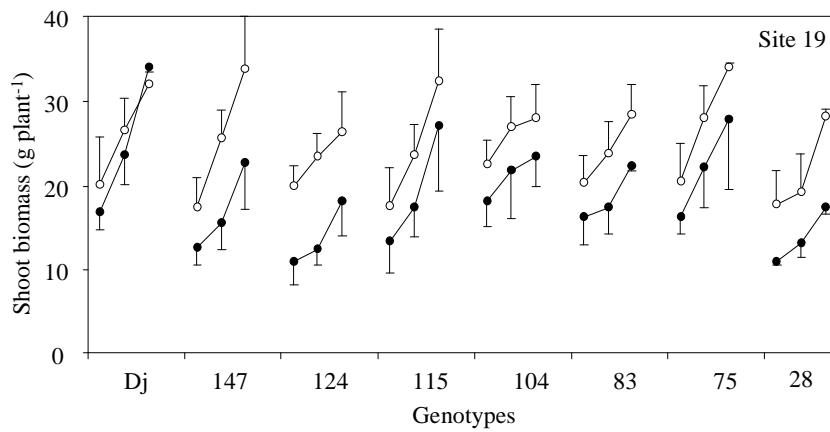


Figure 3. Effect of two P level (P sufficiency ○ *versus* P deficiency ●) on shoot biomass of 8 genotypes in the site 19.at three times of sampling: V1, V6 and R6. Data are means of 12 harvested plants.

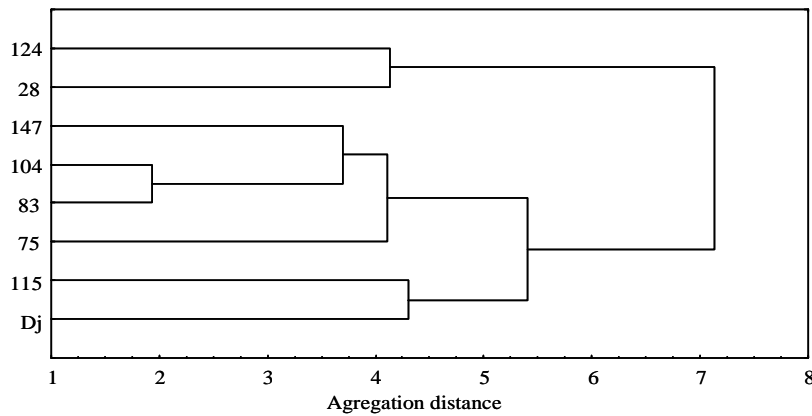


Figure 4. Dendrogram of the 8 genotypes named El Djadida (Dj), 147, 124, 115, 104, 83, 75 and 7, grown on the experimental site 19

Figure 5 shows, on the experimental site, all the data (Fig. 5a) and the mean (Fig.5b) shoot biomass produced by all the 8 lines of common bean as a function of nodule biomass under P sufficiency and P deficiency at flowering stage. We observed a significant relation between shoot and nodule biomasses and a high values of nodul and shoot biomass under P sufficiency than under P deficiency.

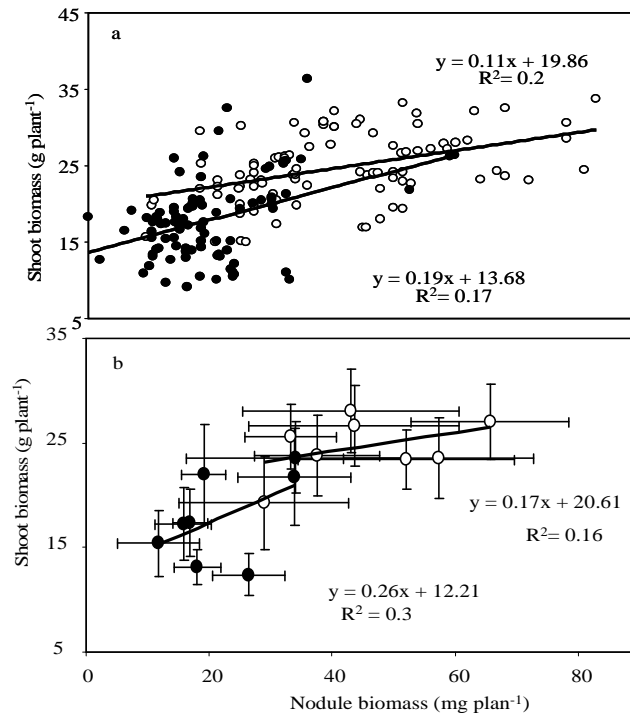


Figure 5. Shoot biomass as a fonction of nodule biomass of the 8 genotypes named El Djadida (Dj), 147, 124, 115, 104, 83, 75 and 7, grown on the experimental site 19 under two level of P: sufficiency \circ versus deficiency. \bullet . In a) all replicates of the 8 genotypes were represented. In b) the mean of the data of the different replicates were represented.

3.2. Phosphorus status

The analysis of variance of the P-shoot showed significant effects of genotypes, phosphorus and time of sampling. Ontogeny reduced continuously shoot P concentration in every RIL in each traitement. For the RIL 124 at P deficiency we observed a decrease at flowering stage and an increase at pod filling. The RIL 75 presented the highest value at P sufficiency (Data not shown). The analysis of variance of the P-root showed significant effects of genotypes, phosphorus and time of sampling. Ontogeny reduced continuously root P concentration in every RIL in each traitement. (data not shown)

Figure 6a shows variation on P-content of studied RILs and Dj the local farmer genotype. The analysis of variance showed significant effects of genotypes, phosphorus and time of sampling. Ontogeny increased continuously P content in every RIL in each traitement. The RILs 75 and 104 and the genotype Dj presented the highest value in both P sufficiency and P deficiency. In contrast the RILs 147 and 28 was the lowest.

Figure 6b shows variation on PUE, i.e. the ratio biomass:plant P concentration of studied RILs and Dj the local farmer genotype. The analysis of variance showed significant effects of genotypes, phosphorus and time of sampling. Ontogeny increased continuously PUE in every RIL in each traitement. Dj had the highest value comparing with the different RILs. Between the RILs 147 was the lowest.

3.3. Nitrogen status and nodule biomass

Figure 7 shows variation on N-shoot of studied RILs in comparison with Dj the local farmer genotype. The analysis of variance of the N-shoot identified significant effects of phosphorus and time of sampling. Shoot N concentration decreased with time at both P levels. In addition, genotypes grown in P deficient soil showed a positive and significant correlation ($r^2 = 0.90$) between plant N content and nodule biomass (Fig.7).

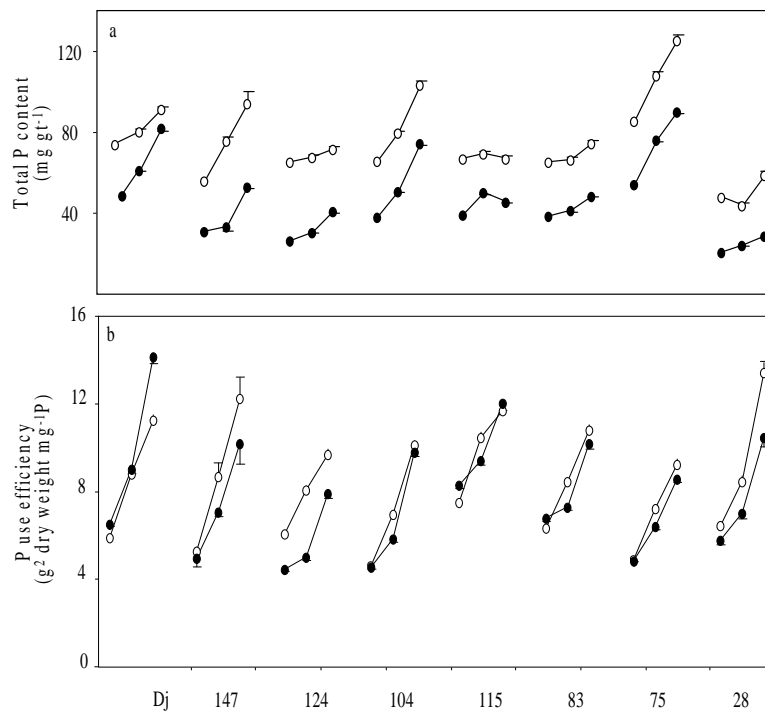


Figure 6. Effect of two level of P: P sufficiency ○ versus P deficiency ● on a) P content and b) P use efficiency: ratio biomass: plant P concentration in the site 19 for the 8 genotypes at three times of sampling. Data are means of 12 harvested plants. level

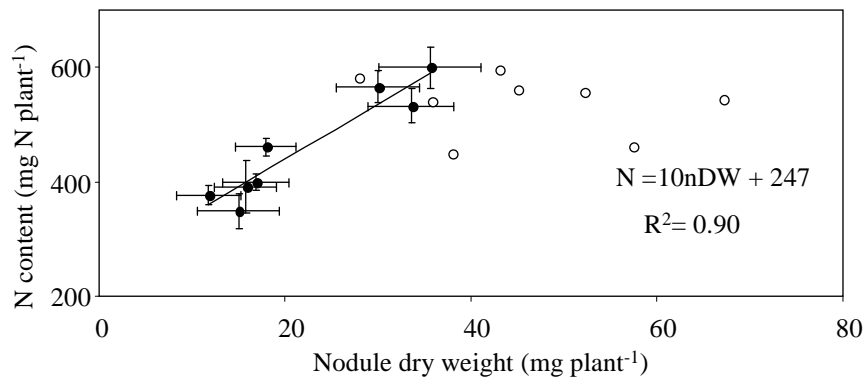


Figure 7. Efficiency in use of rhizobial symbiosis of 8 genotypes at flowering stage P sufficiency ○ versus P deficiency ●. Data are means of 12 harvested plants for each genotype.

4. Discussion

Our work shows genotypic variation in P requirement for N₂ fixation in common bean. The RILs and Dj presented different patterns of biomass production and N and P accumulation on root and shoot system. The relation we have found between genotypic differences in P requirement for N₂ fixation and PUE agrees with previous similar conclusions in common bean (Vadez & Drevon, 2001) and in soybean (Gunawardena et al., 1992) and *Acacia mangium* (Vadez et al., 1997). The PUE concept, initially defined by Siddiqui & Glass (1981) and discussed by Gourley et al., (1993), has gained scientific interest (Israel & Rufty, 1988). It may also have economic significance for the management of chemical fertilizers in highly productive environment or in marginal land where the cost of fertilizer limits its use. Vadez et al. (1999) found that genotypic differences for N₂ fixation under P deficiency were most likely due to differences in PUE. This is substantiated by three fold higher SNF for tolerant versus sensitive lines with the same amount of P supplied. This complements the previous reports of genotypic differences in SNF tolerance to P deficiency which were attributed to differences in P uptake ability (Pereira & Bliss, 1989).

Genotypes grown in P deficient soil showed a positive and significant correlation between plant N content and nodule biomass (Fig. 7), denoting that a compensatory mechanism between nodulation and shoot growth for N₂ fixation occurs. The results indicated that in the P deficient soil, shoot and root biomasses and nodulation were markedly reduced with the sensitive RILs 147 and 28 showing the

weakest values for these parameters when P was limited in the soil. This constraint induced a significant decrease in plant P uptake, N accumulation and P use efficiency (PUE) in all the tested genotypes with some relative variations.

5. Conclusion

We conclude that differences of the tolerance to P deficiency in soil existed among the studied bean genotypes. Our study identifies promising lines to be used in selection for enhanced PUE for SNF in common bean.

Acknowledgments

This work was supported by Aquarhiz project of the EU INCOMED program and Tassili PHC of the French ministry of foreign affairs. The authors are grateful to the local farmers and the students of Mouloud Mammeri University for their excellent contribution.

6. References

- Andrew C.S., 1978. Nutritional restraints on legume symbiosis. In J Dobereiner R.H., Burris, A Hollaender, eds, Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. *Plenum Press, New York*, 135–160.
- Barbosa Filho M.P., Silva O.F., 1994. Aspectos agro-economicos de calagem e da adubação pas culturas de arroz e teijao irrigados por aspersao. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 29, 163-166.
- Broughton W.J., Hernandez G, Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J., 2003. Beans (*Phaseolus spp.*): model food legume. *Plant Soil* 252, 55–128
- Doyle J.J., Luckow M.A., 2003. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131, 900–910
- Fernandez F., Gepts P., Lopez M., 1993. Etapas de desarrollo en la planta de frijol, In Lopez M., Fernandez F., Schoonhoven A., van. Eds. Frijolinvestigation y produccion Cali: CIAT, 61-78.
- Gourley CJP, Allan, DL Russelle MP., 1993. Defining phosphorus efficiency in plants *Plant soil* 155-156, 289-292.
- Graham P.H., 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. *Field Crops Res.* 4, 93–112

- Graham P.H., Rosas J.C., Estevez de Jensen C., Peralta E., Tlustý B., Acosta-Gallegos J., Arraes Pereira P.A., 2003. Addressing edaphic constraints to bean production: the bean/cowpea CRSP project in perspective. *Field Crops Res.* 82, 179–192;
- Gunawardena S., Danso SKA, Zapata F -1992. Phosphorus requirements and nitrogen accumulation by three mungbean (*Vigna radiata* (L) Welzek) cultivars *Plant Soil*, 147, 267-274.
- Hernández G., Valdés-López O., Ramírez M., Goffard N., Weiller G., Aparicio-Fabre R., Fuentes S.I., Erban A., Kopka J., Udvardi M.K., Vance C.P., 2009. Global Changes in the Transcript and Metabolic Profiles during Symbiotic Nitrogen Fixation in Phosphorus-Stressed Common Bean Plants. *Plant Physiology* 151,1221-1238.
- Informe, 1985. Anual del programa de Frijol. Cali: CIAT, 372p.
- Israel D.W., Rufty T.W., 1988. Influence of phosphorus nutrition on phosphorus and nitrogen utilization efficiencies and associated physiological responses in soybean. *Crop Sc.*, 28, 954-960.
- Olivera M., Tejera N., Iribarne C., Ocaña A., Lluch C., 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiol Plant* 121, 498–505
- Pereira P.A.A., Bliss F.A., 1989. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N₂ fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. *Plant Soil* 115, 75-82.
- Piha M.L., Munns D.N., 1987. Nitrogen fixation potential of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with other grain legumes under controlled conditions. *Plant and Soil* 98, 169-182.
- Tang C., Drevon J.J., Jaillard B., Souche G., Hinsinger P., 2004. Proton release of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency. *Plant Soil* 260, 59–68.
- Vadez V., Beck D.P., Drevon J.J., 1997. Utilization of the acetylene reduction assay to screen for tolerance of symbiotic N₂ fixation to limiting P nutrition in common bean. *Physiol. Plant* 99, 227–232.
- Vadez V., Drevon J.J., 2001. Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 21, 691-699.
- Vadez, V., Lasso, J.H., Beck D.P., Drevon, J.J., 1999. Variability of N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to P use efficiency. *Euphytica*. 106, 231-242.
- Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157, 423–447.

- Yan X., Lynch J.P., Beebe S.E., 1995a. Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types. I. Yield response. *Crop Science* 35, 1094-1099.
- Yan X., Beebe S.E., Lynch J.P., 1995b. Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types. II. Vegetative response. *Crop Science* 35, 1086-1093.
- Youngdahl L.J., 1990. Differences in phosphorus efficiency in bean genotypes. *J. Plant Nutr.* 13, 1381-1392.

CONCLUSIONS GENERALES

Vers une vision dynamique et intégrative des processus rhizosphériques impliqués dans le transfert sol-plante-minéraux

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont permis de répondre à notre objectif principal de thèse qui consistait à vérifier la pertinence des critères d'adaptation de la fixation symbiotique de l'azote à la disponibilité de P dans des sols de culture maraichère en Algérie. A travers l'exemple de la culture de lignées de haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) contrastantes pour le phosphore, l'enjeu principal de mes travaux était d'évaluer la participation respective de divers processus rhizosphériques impliqués dans le déterminisme de la biodisponibilité du phosphore (P). Je me suis notamment intéressée à l'efflux de protons et à la respiration des racines nodulées de cette culture.

Les résultats obtenus, *ex-situ*, en milieu contrôlé dans le chapitre 2 et 3, ont suggéré que le prélèvement racinaire de P ne serait pas systématiquement limitant, dans le cas des lignées efficaces, en particulier dans les milieux déficients en P. Nous avons pu mettre en évidence de larges modifications de pH qui augmentent la biodisponibilité de P. Nous avons démontré, d'une part, qu'en hydroaéroponie, les racines nodulées du haricot excrètent dans leur rhizosphère une quantité de H^+ qui est corrélée à la perméabilité nodulaire. Ce qui laisse penser qu'une part d' H^+ excrétée par les racines nodulées est liée à la fixation symbiotique d'azote atmosphérique. La perméabilité nodulaire contrôle la respiration qui fournit l'ATP pour la réduction de N_2 catalysé par la nitrogénase des bactéroïdes à l'intérieur de la zone infectée du nodule. D'autre part, nous avons démontré que sous déficience en P, les RILs tolérantes, comparées aux sensibles acidifient plus leur rhizosphère et avec pour conséquence des concentrations en P sont plus élevées dans le sol proche de leurs racines nodulées.

Parallèlement à cette étude en hydroaéroponie, l'expérimentation en rhizotron dans le chapitre 3 a permis de mettre en évidence une acidification de près de 1 unité pH dans le sol provoquant une augmentation de la disponibilité de P. Les résultats obtenus rejoignent ceux obtenus en hydroaéroponie, les lignées sensibles secrétant moins d'efflux de protons que les tolérantes.

L'acidification de la rhizosphère apparaît donc comme un phénomène majeur régulant la biodisponibilité de P pour le haricot dans les sols.

Les expérimentations menées *in-situ*, en essai multilocal dans le chapitre 4 ont permis d'évaluer au champ, les conclusions de notre étude sur les lignées contrastantes menées *ex situ* sous serre. Nous avons d'abord pu classer les sites en 4 groupes qui dépendaient principalement de N-total et P-total (Chapitre 4, partie I). Les valeurs élevées de l'azote dans certains sites ont inhibé la nodulation. Nous avons aussi démontré que la biomasse aérienne sous fixation d'azote atmosphérique était proche de celle obtenue sous nutrition exclusive de l'azote minéral. Deux groupes de RILs tolérantes *versus* sensibles à la faible fertilité des sols en P se distinguent. Ce qui confirme les résultats obtenus *ex situ*.

Dans une analyse spécifique des sols à forte nodulation, (Chapitre 4, partie II) nous avons pu démontrer, que la biomasse aérienne est positivement corrélée à la nodulation. Ce qui laisse supposer que la nutrition azotée dépend principalement de la fixation symbiotique de N₂. Nous avons également pu démontrer que les biomasses nodulaire et aérienne sont corrélées au P Olsen du sol. Ces biomasses augmentent avec l'augmentation de la concentration de P jusqu'à une valeur critique d'environ 40 mg kg⁻¹ de sol. Nous avons ainsi démontré au champ un processus bien documenté en conditions contrôlées.

Il faut noter que Dj «El Djadida»,génotype local, se distingue des groupes précédents en présentant une bonne nodulation quand les sols sont peu fertiles. Ce qui justifierait le surnom de «4x4» donné par les agriculteurs à cette lignée locale. Elle est capable de croître dans différents sols, notamment contraignants, avec une grande capacité à noduler, permettant de compenser la déficience en N en produisant une biomasse aérienne proche de celle des sols à N suffisant.

Une des limites majeures de mes travaux concerne les résultats des essais au champ. En effet, Ils sont obtenus en une seule année. Pour le soucis de répétabilité des résultats, il serait intéressant de reprendre la même démarche multilocale sur plusieurs sites et ce durant 2 à 3 années, voir plus. Cependant, les résultats obtenus semblent pouvoir déboucher sur un certain nombre de perspectives scientifiques en rapport avec les différents processus rhizosphériques impliqués dans le transfert sol-plante.

En collaboration avec des microbiologistes, les nodules issus d'interactions remarquables entre les souches autochtones de rhizobia et les RILs ou Dj des parcelles choisies, peuvent faire l'objet d'un isolement raisonné de rhizobia,. Ceci permettra d'envisager un essai d'inoculation croisé en serre, avec un échantillon de 6 des isolats choisis si possible avec des éléments de caractérisation obtenus par les microbiologistes. L'objectif sera de vérifier si les potentiels sélectionnés avec la souche de référence CIAT899, peuvent être significativement modifiés par l'interaction avec les microsymbiotes rhizobiens locaux. Ceci permettra aussi de choisir le rhizobia natif pour un test d'inoculation rhizobienne qui sera réalisé dans des parcelles où la population rhizobienne locale aurait été identifiée comme limitante.

Le test multilocal proposé aux maraîchers de la région de Tizi Ouzou peut intéresser les céréaliers pour le haricot, mais aussi les autres légumineuses à graines, voire les fourragère (la rotation blé jachère)

Concernant la physiologie de la fixation d'azote et de l'équilibre ionique de la plante sous nutrition azoté s'expliqueraient-ils uniquement par le flux de protons associé à la fixation de N_2 ? Sachant que l'acidification de la rhizosphère concerne à la fois la baisse de pH et les exsudats racinaires. Il serait, donc, nécessaire d'étudier ce processus.

Rappelons que les plantes ont développé de nombreuses stratégies leur permettant d'assimiler le Pi avec une plus grande efficacité dans des sols appauvris en cet élément. Ces stratégies consistent en (i) une augmentation de la croissance racinaire, (ii) la mise en place d'organes spécialisés (iii) l'expression de transporteurs de Pi à haute affinité, (iv) la sécrétion d'exsudats racinaires et d'enzymes spécialisées et (v) l'association symbiotique avec des champignons du sol. Il serait donc, intéressant d'étudier
chaqu'une de ces stratégies.

ANNEXES

I. Importance du haricot en Algérie et dans la région de Tizi Ouzou

1. Importance et situation de la culture du haricot en Algérie

Les variétés les plus cultivées en Algérie et pour lesquels l'autosuffisance est atteinte, bien que le prix soit relativement élevés en particulier pour le haricot à écosser sont:

- Haricot nain mange tout: Contender, El Djadida, Molière.
- Haricot nain à écosser: Coco de Prague, Pactole.
- Haricot à rame mange tout: Sidi Feredj, Blanc de juillet.
- Haricot à rame à écosser: Coco blanc, Coco de Prague.

Bien qu'il soit apprécié, le haricot sec est pour sa part peu cultivé. L'Algérie recourt aux importations pour couvrir la demande du marché. La production nationale du haricot est représentée dans le tableau 1.

Tableau 1. La production nationale en haricot (MADR/DSASI, 2006).

Année	<i>Haricot vert</i>			<i>Haricot sec</i>		
	Superficie (ha)	Production (qx)	Rendement (qx/ha)	Superficie (ha)	Production (qx)	Rendement (qx/ha)
1997	4880	236480	48,45	1400	6460	4,61
1998	5440	222830	40,96	1850	10790	5,83
1999	7110	263060	36,99	1740	9390	5,39
2000	5990	255230	42,60	1280	4190	3,27
2001	6000	295270	49,21	1180	7340	6,22
2002	6400	29700	46,48	1190	8640	7,26
2003	6730	406810	60,44	1560	10960	7,02
2004	7534	411000	54,55	1992	15810	7,93
2005	6928	332650	48,10	9240	6660	5,52
2006	7766	355076	45,72	1496	9145	6,11

Le tableau 1 montre que les rendements du haricot vert par hectare sont en régression durant ces dernières années: ils fluctuent d'une manière imprévisible de 36.99 qx/ha en 1999 à 60.44 qx/ha en 2004. La production, varie sans aucune corrélation avec les superficies cultivées, d'un peu plus de 222 mille quintaux à 411 mille quintaux. Cette production reste caractérisée par l'instabilité des niveaux de récolte. La même observation est faite pour la production du haricot sec avec une production annuelle variant de 4190 qx à 15810 qx.

En Algérie, les superficies consacrées aux cultures maraîchères sont très faibles comparativement aux autres cultures. Elles occupent environ 372096 ha pour l'année 2006 soit 4.65% de la SAU. Les surfaces agricoles réservées au haricot vert sont encore plus faibles représentant seulement 2.08% de la superficie totale des cultures maraîchères. Le haricot sec est peu cultivé en Algérie, avec seulement 1496 ha durant l'année 2006 soit 2.23% des superficies réservées à la production des légumes secs.

Les zones de production du haricot en Algérie sont situées essentiellement sur le littoral et le sublittoral. Les principales wilayas productrices sont montrées dans le **tableau 2**.

Tableau 2. Les principales wilayas productrices du haricot en Algérie pour la période 2003-2006 (MADR, 2006).

<i>Wilayas</i>	<i>2003/2004</i>			<i>2004/2005</i>			<i>2005/2006</i>		
	Superf (ha)	Prod (qx)	Rdt (qx/ha)	Superf (ha)	Prod (qx)	Rdt (qx/ha)	Superf (ha)	Prod (qx)	Rdt (qx/ha)
Ain	767	33200	43,3	900	27000	30,0	860	20800	24,2
Timouchent									
Mostaganem	478	23800	50	150	10950	73	840	39980	48
Tipaza	952	37400	39	551	29210	53	658	31864	48
Boumer dès	920	60400	66	910	63400	69	630	42000	67
Alger	566	35400	63	481	21990	62	613	40596	66
Skikda	647	32000	49	650	26800	41	550	19710	36
Tlemcen	394	26700	68	492	19410	39	502	15200	30
Djijel	358	22800	64	340	20110	59	348	18650	54
Tizi-Ouzou	377	26300	70	321	22490	70	342	22819	67
Taref	175	7500	43	106	3250	37	300	11600	39
Biskra	284	15000	56	252	9390	37	272	1590	50
Setif	256	16500	64,5	246	13000	52,8	248	18405	74,2
Bejaia	240	12000	50,0	233	7080	30,4	243	9750	40,1

2. Importance de la culture du haricot dans la wilaya de Tizi-Ouzou

Dans la wilaya de Tizi-Ouzou, le haricot est intégré dans les différents assolements pratiqués par les agriculteurs de cette région. Que ce soit, les assolements (rotations) maraîchères purs: (i) les assolements triennaux (Solanacées/ Liliacées/ Légumineuses): Pomme de terre/ Ail- Oignon/ Haricot; (i) Dans les assolements quadriennaux (Solanacées/ Liliacées/ Solanacées/ Légumineuses): Pomme de terre/ Ail- Oignon/ Tomate/ Haricot. Ou les assolements (rotations) maraîchage/ fourrage : Solanacées/ Légumineuses/ Solanacées/ Fourrages.

Lors de ces assolements, 50% des terres sont affectées aux solanacées, 27% aux fourrages, alors que le haricot n'occupe en moyenne que 5% dans les assolements irrigués (Tableau 3).

Tableau 3. Les proportions approximatives des différentes espèces dans les assolements irrigués de la wilaya de Tizi-Ouzou (D.S.A, 2006)

<i>Espèces</i>	<i>Pourcentage dans l'assolement</i>
Pomme de terre	25%
Tomate	15%
Piment/ Poivron	10%
Ail/ Oignon	10%
Fève	5%
Haricot	5%
Concombre/ Courgette	5%
Melon/ Pastèque	10%
Betterave/ Fenouillet	5%
Laitue/ Carotte	5%
Navet/ Choux	5%

La wilaya de Tizi-Ouzou figure parmi les premières wilayas les plus productrices du haricot en Algérie comme on peut le constater dans le tableau 8. Ceci serait dû, essentiellement à sa large consommation par les habitants, surtout lors des fêtes en été, en plus des avantages climatiques qui caractérisent cette wilaya (eau, température, l'ensoleillement...). L'évolution des superficies réservées à la culture du haricot dans cette wilaya est montrée dans le tableau 4

Tableau 4. Evolution des superficies et de la production du haricot dans la wilaya de Tizi-Ouzou de l'année 2002 à 2006 (D.S.A, 2006)

<i>Année</i>	<i>Superficies (ha)</i>	<i>Production (qx)</i>	<i>Rendements (qx/ha)</i>
2002	313	21390	68
2003	334	22140	66
2004	377	26300	69
2005	321	22480	71
2006	342	22819	67

Le tableau 5 classe les communes de la wilaya de Tizi-Ouzou selon l'importance des superficies consacrées à cette culture.

Tableau 5. Les principales communes productrices du haricot dans la wilaya de Tizi-Ouzou. (Les superficies en ha, la production en qx et les rendements en qx/ha) (D.S.A, 2005)

<i>Les Communes</i>	<i>2003-2004</i>			<i>2004-2005</i>		
	<i>Superficie</i>	<i>Production</i>	<i>Rendement</i>	<i>Superficie</i>	<i>Production</i>	<i>Rendement</i>
Ouagenounne	60	7200	120	50	7500	150
Ain zaouia	15	900	60	30	1800	60
Tizi-Ouzou	53	2700	51	30	1800	60
Timizart	50	3252	65	20	1200	60
Fréha	30	1920	64	16	1180	72
Azeffoune	13	630	48	13	750	60
Mekla	12	600	50	11	440	40
Makouda	10	559	56	10	700	70
Ait Khelili	10	500	50	10	380	38
Tizi-ghenif	10	400	40	10	500	50
Draa-el-mizane	8	480	60	10	600	60
Azazga	6	600	100	6	600	100
Tigzirt	4	223	56	4	240	60
Mechtras	2	90	45	3	180	60

Selon les données de ce tableau, on constate une très grande variabilité pour tous les paramètres considérés (Superficie, production, rendement) d'une année à une autre et d'une région à une autre.

II. Questionnaire d'enquête

Dans ce qui suit nous vous présentons la fiche type de questionnaire d'enquête établi pour l'essai multilocal dans la région de Tizi Ouzou.

Questionnaire d'enquête

Nom :	Date de passage :
N° Fixe :	Wilaya :
N° Portable :	Commune :
E-mail :	N° de l'exploitation dans la commune :

1. Adresse de l'exploitation :.....
.....
.....

I. Identification de l'exploitant

2. Si l'exploitant ne vit pas dans cette exploitation, indiquez son adresse

.....
.....

3. Nom et prénom de l'exploitant.....

4. Age.....

5. Situation matrimoniale :

6. dernière classe suivie.....

7. Niveau de formation agricole :.....

8. Etes vous :

Exploitant unique

Exploitant principal

II. Identification de l'exploitation

10. Statut de l'exploitation :

EAC

EAI

Familiale

Autre (préciser)

11. Superficie (ha):.....

11. Date de création ou de prise en charge de l'exploitation par vous même

.....
.....

III Choix de l'exploitation

Nous avons choisi votre exploitation car:
A/ elle semble porter sur une ou plusieurs de vos parcelles la culture de haricot vert et/ou haricot dolique

12. Année de début de la culture de
 Haricot vert.....
 Haricot dolique.....

1.1. Priorité des spéculations pour cette saison?

Type de culture	Surface totale (ha)	Nbre parcelles	Surface (ha)
Haricot vert	
Haricot dolique	
Autres spéculations			

1.2. Quelle est la (les) raison(s) du choix de la culture

Choix de la culture	Motifs
Haricot vert	
Haricot dolique	

1.3 Utilisation

	Haricot vert	Haricot dolique
Si Irrigation (Mode) (fréquence)		
1ère culture (ha) 2ème culture (ha) Culture intercalaire		
Ressources en eau AEP PUIT Autre préciser		

B/ Suppose être localisée sur des sols calcaires

	Haricot vert			Haricot dolique		
	2004 –2005	2003 – 2004	2003 - 2002	2004 –2005	2003 – 2004	2003 - 2002
Nom ou numéro de la parcelle						
Surface						
Origine de la semence Locale (produite) Achetée						
Semis : Période Distance entre les lignes Distance entre les plants Nbre de graines /trou						
Récolte Période Mode Rendement/ha						
Précédant cultural						
Type d'entretien de la parcelle Enherbement, Labour, Désherbage, Labour, Autre...						
Signes particuliers Eventuelles carence en P Carences en N						
Présence de nodules Nombre Type Position sur la racine Couleur						
Labour Période Type Profondeur						
Un chaulage a-t-il été effectué à la parcelle Si oui : Période Dose						
Engrais Période Type Dose						

Fumures organiques Période Type Dose						
penne Faible Moyenne Forte						
Commercialisation Autoconsommation Commercialisation						

Connaissez vous des hétérogénéités sur cette parcelle ? Lesquelles

Etes vous en mesure de fournir les calendriers de fertilisations des années précédentes

Jusqu'à quelle année peut-on remonter ?

.....

Essayez de faire ressortir la dose de P, N et calcaire annuelle à la parcelle :

Quelle a été la dose moyenne de P, N annuelle apportée à la parcelle (en gros)...

De 2004 à 2005.....

De 2003 à 2004.....

De 2002 à 2003.....

De 2001 à 2002.....

De 2000 à 2001.....

Avez vous déjà effectué des analyses sur cette parcelle ? Lesquelles

Autres remarques

FICHE ECHANTILLONNAGE

Nom : Adresse : N° Fixe : N° Portable : E-mail :	Date de prélèvement:
	Wilaya :
	Commune :
	N° de l'exploitation dans la commune :
	N° de la parcelle :
	Nbre de prélèvements

ITINERAIRE TECHNIQUE :

Labour

Fertilisation

Précédant cultural

Si Haricot vert et : ou dolique

DESCRIPTION DE LA PARCELLE :

TYPE D'ECHANTILLONNAGE

CARACTERISTIQUES DU SOL:

Couleur
Texture
Structure
HCl
MO

Joindre croquis de la parcelle et autres pièces nécessaires

III. Analyse de l'enquête

3.1 Volet sociologique

L'enquête est menée sur des agriculteurs appartenant à différentes catégories d'âge, de profession, de niveau d'instruction et de niveau de formation agricole. La totalité, des individus questionnés, appartient à une tranche d'âge allant de 20 à 40 ans. Chez environ 55 % de ces individus, l'agriculture ne constitue pas leur principale source de revenus. Par contre, pour les 45 % restant, l'agriculture constitue leur seule source de revenus.

Pour le niveau d'instruction, (**Figure1**). 45 % de ces individus ont un niveau secondaire (C.E.M), 27% ont le niveau terminal (3^{ème}AS) et 27% restants ont un niveau universitaire. Cependant, parmi ces agriculteurs aucun n'a suivi une formation agricole.

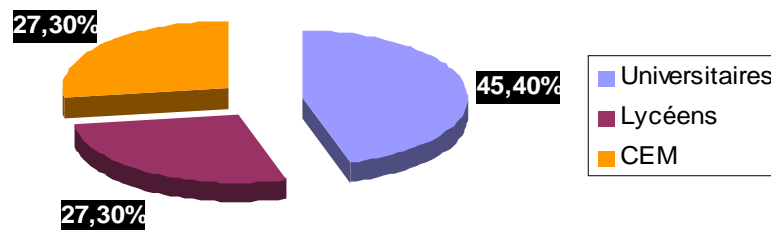


Figure 1. Répartition des agriculteurs selon le niveau d'instruction.

3.2 Volet phytotechnique

Le prix du marché du haricot en Algérie est élevé. De ce fait 81 % des agriculteurs s'intéressent à cette culture pour des raisons économiques. L'objectif le plus recherché par eux est de tirer profit de la marge bénéficiaire. Par contre, 18% seulement des individus ont répondu avoir choisi cette culture pour son intérêt agronomique. La discussion menée avec les agriculteurs nous laisse croire que la majorité d'entre eux ignorent l'intérêt agronomique des légumineuses en général et celui du haricot en particulier. D'ailleurs, la majorité de ces agriculteurs apportent des engrais de la même façon pour les légumineuses que pour les autres cultures. Ils ignorent que les légumineuses sont moins exigeantes en azote. Nous avons aussi constaté qu'ils ne font pas de contrôles de nodulation de leur culture. Ce qui peut être

attribué au manque d'informations et de vulgarisation à ce sujet et probablement à leur niveau d'instruction.

Tous les agriculteurs achètent leur semence sur le marché et ne jugent pas utile d'assurer la multiplication de graines. De ce fait, la variété utilisée est la même chez la plus part des agriculteurs. El Djadida est la plus utilisées dans la région, du fait de sa disponibilité sur le marché, sa bonne productivité, ainsi que sa résistance aux maladies et son adaptation aux conditions du milieu.

Notre enquête a révélé que les périodes de laboure, semis et récolte s'échelonnent sur des périodes différentes selon les régions et le climat.

- **Le laboure:** La période de laboure s'étale du mois de Mai jusqu'au mois de Septembre. 64% des agriculteurs labourent leurs parcelles au mois de Mai, 18% le font en mois de Septembre par contre 18% de ces agriculteurs labourent au mois de Janvier-Février.

Des différences de la profondeur de laboure ont été constatées. Elle est en moyenne de 40 à 50 cm.

- **Le semis:** En fonction des régions, la période de semis s'effectue entre fin Avril jusqu'au début Juin. L'ensemble de ces agriculteurs effectuent un semis en ligne, avec des distances entre les lignes et les plants qui diffèrent suivant la superficie exploitée d'un agriculteur à un autre. Ces distances sont respectivement en moyenne de 60 cm, et 35 cm. Ces agriculteurs mettent généralement 3 grains/trou.

- **La récolte:** La récolte se trouve liée à la période de floraison, qui est fonction du climat local. Dans les zones du piémont, la récolte du haricot vert s'effectue à partir du mois d'Août jusqu'au mois d'Octobre. Pour la région du sublittoral, la récolte s'effectue du mois de Juillet jusqu'au mois d'Octobre. Pour le littoral, elle est plus longue, et s'étale du mois de Juillet jusqu'au mois de Novembre.

Le fait que le haricot vert soit récolté manuellement, il y'a lieu de signaler que le manque de main d'œuvre constitue une contrainte majeure surtout durant ce stade de production.

- **Le rendement:** Il nous a été difficile d'obtenir des informations bien précises sur ce point, car la majorité des agriculteurs, environs 72%, nous ont répondu par des

estimations qu'ils ont jugées eux même d'imprécises, alors qu'environ 27% d'entre eux n'ont pas répondu à cette question, (Figure 2).

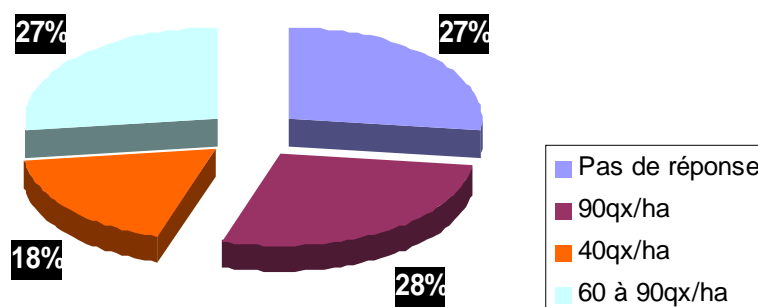


Figure 2. Répartition des exploitations selon les rendements obtenus.

La destination de la récolte diffère d'un agriculteur à un autre suivant l'importance de l'exploitation. La majorité d'entre eux commercialisent la totalité de leur récolte alors que quelques uns laissent une part pour une consommation familiale.

3.3 Le processus de commercialisation

Le processus de commercialisation des récoltes diffère d'un agriculteur à un autre. Environ 45% d'entre eux écoulent leur récolte sur le marché de gros surtout lors d'une grande production, 18% d'entre eux vendent une partie de leur production sur le marché de gros et l'autre sur le marché de détail en fonction la différence du prix de vente. Par contre 27% assurent une vente directe de la totalité de leur récolte sur le lieu même de production à des commerçants de détail ou pour des particuliers.

Mécanisation: Le matériel agricole utilisé peut être personnel ou loué. De ce fait notre enquête nous a démontré que 64% de ces agriculteurs possèdent le matériel agricole nécessaire pour la réalisation de leurs travaux (Figure 3). 36% des agriculteurs ne peuvent entamer les travaux culturaux qu'après avoir loué les machines. Dans le même sens, nous avons pu constater un intérêt des agriculteurs pour la mécanisation. En effet 45% des agriculteurs questionnés sont hautement mécanisés, 36% ont un degré moyen de mécanisation et les 9% de ces agriculteurs demeurent toujours dans les pratiques artisanales.

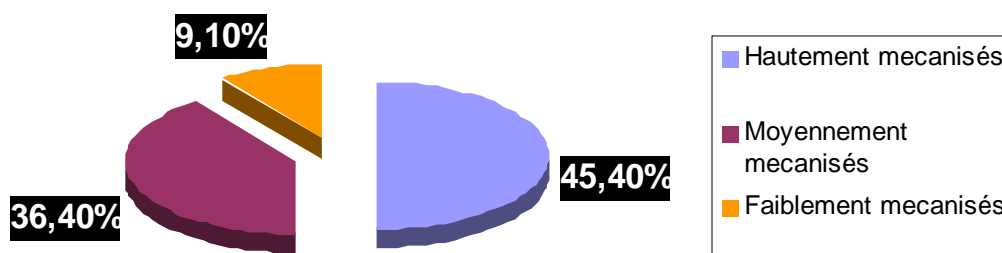


Figure 3. Répartition des exploitations selon le degré de mécanisation.

Main d'œuvre: Notre enquête a révélé deux types de main d'œuvres, permanente et/ou saisonnière. Plus de la moitié est saisonnière, et représente 73% de la main d'œuvre totale. La main d'œuvre permanente est constituée principalement des exploitants (propriétaires). Les exploitants agricoles ne font appel à des saisonniers que pendant la période de récolte qui nécessite un grand nombre d'ouvriers pas forcément qualifiés ce qui se répercute sur la qualité des travaux surtout à la récolte. C'est à ce stade bien précis qu'un minimum de savoir faire est nécessaire pour favoriser la reprise.

Irrigation : Le haricot est une culture d'été et se conduit, donc, en irrigué. La disponibilité en eau est différente d'une région à une autre. Le mode et la fréquence d'irrigation sont forcément différents d'un agriculteur à un autre. De ce fait, 82% des agriculteurs optent pour une irrigation par aspersion dans les régions où l'eau est disponible (retenues collinaires, puits), 9% d'entre eux utilisent le système de goutte à goutte qui leur permet d'économiser l'eau, et d'appliquer la fertigation. 9% restants, occupant des petites exploitations, utilisent un système traditionnel par rigoles (**Figure 4**). Néanmoins, la majorité des agriculteurs utilisent leur propre matériel d'irrigation .

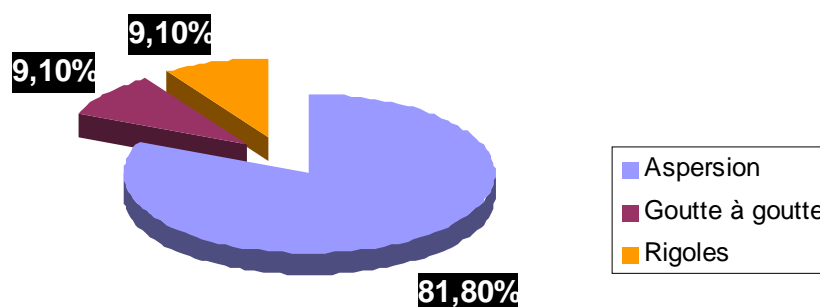


Figure 4. Répartition des exploitations selon le mode d'irrigation.

Vu la diversité topographique de ces régions, les ressources en eau dont dispose ces agriculteurs sont aussi diverses. L'irrigation s'effectue grâce aux retenues collinaires chez 54% des agriculteurs questionnés, aux puits chez 27% et enfin 18% irriguent à partir des ressources naturelles se trouvant à l'intérieur de leurs parcelles (Figure 5).

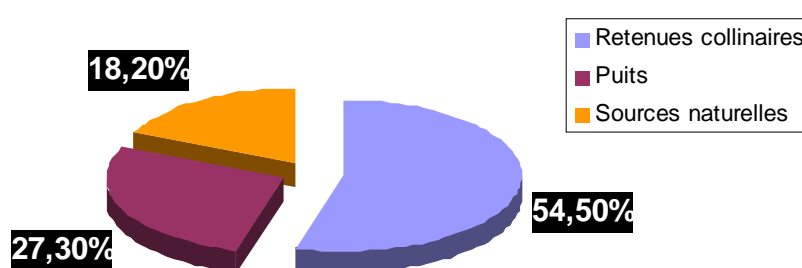


Figure 5. Répartition des exploitations selon la source de l'eau d'irrigation.

Le remplissage de ces ressources est conditionné par la pluviométrie saisonnière. Les superficies cultivées et le choix des spéculations sont fonction de la disponibilité de l'eau. Les agriculteurs optent généralement pour des cultures moins exigeantes en eau lors des saisons sèches.

3.4 Aspects agronomiques

Les exploitations sont dans leur totalité privées strictes, dont 27% sont familiales (Melk), 45% sont privées individuelles et 27% sont louées, avec des superficies allant de 1 à 15ha réservées à différentes spéculations (Pomme de terre, culture fourragère, culture maraîchère).

La superficie consacrée à l'haricot dépasse la moitié de l'exploitation chez 45% des exploitants, par contre, elle est inférieure à 50% de l'exploitation totale chez le reste des exploitants où elle représente seulement 20 à 40%.

2.5 Divers

➤ La contrainte majeure soulevée par la majorité des agriculteurs questionnés est le manque d'eau. C'est un facteur limitant la production. Le choix de la spéculations ou de la superficie à cultiver dépend largement de ce facteur.

➤ Il est à remarquer que 100 % des exploitants ont soulevé le problème du coût élevé des intrants. Un véritable obstacle pour la garantie d'une bonne production et d'une bonne qualité des récoltes.

➤ Le prix élevé des produits phytosanitaires sur le marché, leur disponibilité ainsi que leur qualité est aussi un des problèmes cruciaux. Ce qui conduit les exploitants à diminuer le nombre de traitement pour les cultures infectées. S'ajoute à cela les attaques d'animaux sauvages qui causent d'importants dégâts sur les cultures.

➤ Les exploitants souffrent de manque de main d'œuvre pour assurer les tâches nécessaires pour leur culture. Cela s'explique par la fuite de la population active vers d'autres activités plus rémunérées, en plus du manque de formation et du savoir faire des ouvriers d'une manière générale.

➤ La commercialisation et le transport constituent un problème important qui persiste toujours. La production est difficilement écoulee, à cause des prix bas proposés sur le marché, la non maîtrise du fonctionnement de ce dernier par les agriculteurs et l'absence du contrôle des prix. C'est donc les revendeurs qui en tirent plus de profit au détriment des agriculteurs.

➤ L'absence de l'Etat en matière de subvention et de vulgarisation constitue un handicap pour les agriculteurs et limite les possibilités d'améliorer leurs potentialité de production. L'absence d'un statut bien défini empêche les agriculteurs de se structurer et de se stabiliser dans leur domaine.

Quelques agriculteurs ont répondu favorablement à notre proposition, par contre les autres ont accepté de porter ces essais sur leurs parcelles mais sous conditions:

- Les superficies qu'ils peuvent réserver doivent être petites.
- La quantité des semences à tester sera réduite.
- Faire intégrer l'agriculteur dans la recherche scientifique.

IV. Présentation de la région d'étude

1. Caractéristiques de la région

La wilaya de Tizi-Ouzou comprend soixante sept communes et vingt et une daïras (Figure 1). Elle se localise au nord de la zone centrale de l'Algérie délimitée:

- Au nord par la mer méditerranéenne.
- A l'est par le massif d'Akfadou et la wilaya de Bejaia.
- A l'ouest par les plaines du sahel d'Alger et la wilaya de Boumerdes.
- Au sud par la chaîne cristalline de Djurdjura et la wilaya de Bouira.

Elle se situe à une centaine de kilomètres à l'est d'Alger. Elle s'étend sur environ 2957 km², soit 10% du territoire national, dont 59 % forment trois bandes parallèles: la chaîne côtière, le massif central et le massif du Djurdjura. Le reste représente 35 % de collines et 6 % de vallées et plaines côtières.

Le relief de la wilaya de Tizi-Ouzou est donc typiquement montagneux et forme la grande partie de son territoire.

1.1. Géologie et géomorphologie

L'existence de zones de chevauchement et de charriage, notamment dans la partie sud, rend l'étude de la structure difficile à appréhender (Abdessalem, 1995). D'importantes failles se présentent particulièrement dans la partie sud de Djurdjura. Cette tectonique cassante a affecté les différentes formations importantes dues aux mouvements orogéniques alpins de la fin de l'ère tertiaire et le début du quaternaire (Asla, 2002). Cette région est constituée de quatre ensembles géologiques orientés sur un axe est-ouest:

- La chaîne côtière : C'est un vaste synclinal parallèle à la mer méditerranéenne.
- La chaîne de Djurdjura :Elle représente un relief important dominant toute la Kabylie, de nature calcaire reposant sur des terrains d'âge primaire, elle recoupe la chaîne côtière du massif de Tamgout.
-
-



Figure 1. Situation de la zone d'étude dans la wilaya de Tizi-Ouzou.

- Le socle métamorphique : Les terrains sont cristallophylliens de nature magmatique (granite, pegmatite) et métamorphique (micaschiste, quartzite) d'âge paléozoïque.
- Dépôts alluvionnaires : Ce sont des formations alluvionnaires du quaternaire. Ils sont caractérisés par six niveaux de terrasses sous forme emboîtée ou étagée (Yakoub, 1996).

La Kabylie est constituée en principe de trois formes morphologiques qui sont :

- Les massifs montagneux de grande Kabylie qui s'étendent de la cote jusqu'au pied du Djurdjura.
- Collines Elles s'étendent jusqu'au pied du massif de Kabylie. Elles masquent la transition entre les terres démolies des bas fonds et les premières pentes des montagnes. Elles sont de relief arrondi avec des pentes très douces et de nature marneuse.
- Plaines Ce sont des plaines alluviales, souvent associées aux collines qui les entourent.

1.2. Reliefs et sols

Du point de vue relief, la wilaya de Tizi-Ouzou est constituée de sept grands ensembles morphologiques orientés sur un axe est-ouest qui sont :

- La chaîne côtière.
- La vallée du Sébaou.
- Le massif montagneux de grande Kabylie.
- La zone collinaire de Tizi-Ouzou.
- La zone collinaire de Tizi-Gheniff.
- La dépression de Draa el Mizan.
- La chaîne de Djurdjura de type calcaire.

Les sols de la wilaya de Tizi-Ouzou sont de plusieurs natures, selon Mesrouk (1984), on trouve:

- Les sols peu évolués : Ce sont des sols jeunes formés sur des alluvions récents, ils forment ainsi à majeure partie des terrasses récentes.
- Les sols brunifiés: Ce sont des sols avec un ou plusieurs horizons diagnostiques qui peuvent se former assez rapidement et ne présentent pas d'alluvions.

- Les sols calcimagnésiques: Ils sont surtout formés sur grès calcaire, le profil est calcaire.
- Les sols sesquioxides: Ils sont localisés dans les poches de dissolution karstiques de roches dures. Ils couvrent la majeure partie du massif de Larbaa Nath Irathen et la partie amont de Fréha où ces roches sont exploitées comme matériaux de construction.
- Les vertisols: Ils Sont largement répartis dans la plaine du Sébaou.

Tizi-Ouzou est une zone essentiellement montagneuse, qui bénéficie d'une forte pluviosité avec 1000 mm/an, réparties dans l'année selon le régime climatique méditerranéen. La source d'eau la plus importante de cette wilaya, est l'oued Sébaou avec ses affluents. La région compte quatre vingt (80) retenues collinaires destinées à l'irrigation dont la capacité totale atteint six million de m³/an.

Les terres irrigables sont situées dans la zone de la vallée du Sébaou (Yakoub, 1996). Les ressources en eau souterraines sont tributaires de la capacité d'emménagement de la nappe alluviale du Sébaou.

La potentialité hydrique importante de la région n'est pas exploitée. Les volumes d'eau qui se jettent dans la mer, à partir du Sébaou, représentent l'équivalent de dix fois la demande globale annuelle de la wilaya (Yakoub, 1996).

1.3. Etude climatique de la wilaya de Tizi-Ouzou

Le climat de la wilaya de Tizi-Ouzou ressort du régime méditerranéen caractérisé par un hiver froid à pluviosité importante et un été très chaud et sec, qui s'étend de la mi-Mai jusqu'à la mi-Septembre.

En vue de l'étude climatique, nous avons utilisé des données s'étalant sur une période de dix ans (1996-2006).

Température

D'après le tableau 1, les températures moyennes enregistrées durant les mois les plus froids (Du mois de Novembre au mois de Mars) varient entre 9°C et 17°C. Alors que pendant la période chaude, elles varient entre 24.8°C et 28.8°C. Les températures maximales sont enregistrées durant les mois de Juin, Juillet et Août avec respectivement 32.3°C; 37.1°C et 34.2°C.

Tableau 1. Variation des températures moyennes, minimales et maximales de l'année 2006 O.N.M de Boukhalfa, 2007

<i>Année</i>	<i>J</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>M</i>	<i>J</i>	<i>Ju</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>O</i>	<i>N</i>	<i>D</i>	<i>Tot</i>
2006													
T°C m	9.2	10	14.2	18.3	21.9	24.8	28.8	26.7	23.9	22.3	17.3	12.1	229.5
T°C mm	5.7	6.3	9.2	12.9	16.9	18.5	21.8	20.9	18.5	17.3	12.4	8.5	168.9
T°C mM	13.8	15	20.7	25.2	29	32.3	37.1	34.2	31.7	30.1	23.8	16,7	309,9

T°C m : températures moyennes mensuelles du mois en °C.
 t°C mm : températures moyennes minimales du mois en °C.
 T°C mM : températures moyennes maximales du mois en °C.

D'après le tableau 2, la période des dix dernières années (1996-2006) suit les mêmes variations thermiques avec les mois les plus froid allant de janvier à mars et de novembre à décembre avec respectivement 10.12°C; 10.5°C; 13.7°C et 14.5°C et 10°C. A partir du mois d'Avril, les moyennes des températures commencent à augmenter progressivement jusqu'à une valeur maximale de 27,10°C enregistrée au mois de Juillet.

Tableau 2. Variation des températures moyennes mensuelles de la décennie (1996-2006). (O.N.M de Boukhalfa, 2007)

<i>Mois</i>	<i>J</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>M</i>	<i>J</i>	<i>Ju</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>O</i>	<i>N</i>	<i>D</i>	<i>Tot</i>
T°C	10.1	10.5	14.0	15.9	19.7	24.9	27.6	23.7	24.5	21.0	14.5	10.0	216.4

La pluviométrie

Les précipitations sont irrégulières et varient d'une année à une autre. La pluviométrie moyenne annuelle enregistrée au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou durant la décennie (1996-2006) est de 735.7mm. Le maximum de pluie est enregistré au mois de Décembre avec 143.7mm et le minimum en Juillet avec 1.6 mm (Tableau 3).

Tableau 3. Variation des précipitations moyennes mensuelles de la décennie (1996-2006) (O.N.M de Boukhalfa, 2007)

<i>Mois</i>	<i>J</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>M</i>	<i>J</i>	<i>Ju</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>O</i>	<i>N</i>	<i>D</i>	<i>Tot</i>
P (mm)	130	70.5	35.2	71.9	69.4	4.3	1.6	20.5	30.3	52.1	106	144	735.7

Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen

Ces deux auteurs considèrent qu'un mois est sec quand le total des précipitations P en mm est inférieur au double de la température T , c'est-à-dire quand le rapport P/T est inférieur ou égal à 2 (Bagnouls et Gaussen, 1953). Le système du diagramme ombrothermique permet la détermination de la période sèche (Figure 1). Sur ce diagramme sont reportés :

- En abscisses, les mois de l'année.
- En ordonnées, d'un côté les précipitations moyennes mensuelles de l'autre côté les températures moyennes mensuelles à une échelle double de celles des précipitations.

Lorsque la courbe des précipitations passe au dessous de celle des températures, la période qui s'étale entre les abscisses des points d'interaction des deux courbes correspond à la durée de la période sèche.

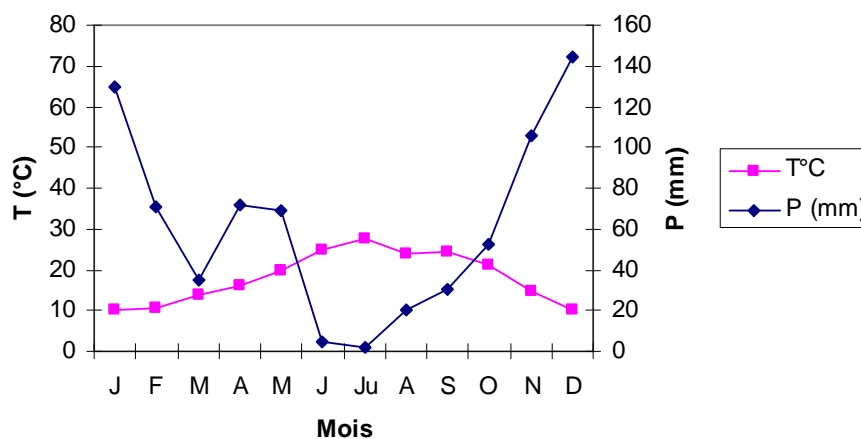


Figure 2. Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gaussen de la wilaya de Tizi-Ouzou (1996-2006).

Le diagramme ombrothermique de la wilaya de Tizi-Ouzou, pour la période (1996-2006), révèle la présence d'une période sèche qui s'étale de la mi-Mai à la fin du mois de Septembre. La wilaya de Tizi-Ouzou se trouve dans des conditions de climat favorable au développement de la culture du haricot, à savoir, un climat méditerranéen qui présente des températures moyennes concordantes et répondant aux exigences de la culture, qui coïncident avec les stades phénologiques du haricot. Ce climat est caractérisé par une pluviométrie assez suffisante, notamment pendant l'automne et l'hiver. On enregistre en moyenne plus de 700mm de pluie annuellement. Il est aussi

caractérisé par une période estivale sèche qui nécessite la conduite de cette culture en irrigué.

2. L'agriculture dans la wilaya de Tizi-Ouzou

La superficie agricole utile (S.A.U) de la wilaya, estimée à 97131 ha, demeure très réduite. Elle représente 32.84 % de la superficie totale de la wilaya et 67.81 % de l'ensemble de la SAT. Cette S.A.U se caractérise par un morcellement extrême des exploitations au nombre de 66853 unités (au dernier R.G.A de 2001) et par le statut juridique privé à 96 % des propriétés qui entravent toute intensification et modernisation de l'agriculture dans la région (problème de l'indivision).

La répartition de la S.A.U par commune fait ressortir une grande partie qui est située en zone montagneuse dont les terres présentent généralement une pente supérieure à 12 %. (Tableau 4).

En plus de son exiguïté, la S.A.U actuelle est faiblement irriguée. On ne relève que 5800 ha de la S.A.U irriguée sur un potentiel irrigable de 12000 ha dont le maraîchage occupe 2950 ha soit 50.86 %.

En raison de son caractère montagneux, la S.A.U est dominée par les cultures fourragères qui représentent un peu plus de 36 % de cette surface. Les autres spéculations sont représentées par l'arboriculture (olivier et figuier principalement) avec 12 % et la viticulture avec 0.81 %.

Tableau 4. Répartition générale des terres de la wilaya de Tizi-Ouzou (DSA, 2006)

				Superficies (ha)	(%)⁽¹⁾	(%)⁽²⁾	
S A T	S	Terres labourables	Cultures herbacées	19 630	13.70	6.64	
			Maraîchages	7 200	5.03	2.43	
			Terres au repos	22 407	15.64	7.58	
	A	U	Cultures permanentes	Plantations fruitières	12 760	8.91	4.31
				Olivier	32 448	22.65	10.97
				Vignobles	1 429	1	0.48
				Prairies naturelles	1 257	0.88	0.42
	Total S.A.U				97 131	67.81	32.84
	Pacages et parcours				27 081	18.90	9.16
	Terres improductives				19 040	13.29	6.44
Total des terres affectées à l'agriculture				143 252	100	48.44	
Superficie forestière et maquis				115 000	/	38.87	
Terres Non agricoles				37 540	/	12.69	
Superficie totale de la wilaya				295 792	/	100	

(%)⁽¹⁾ : pourcentage calculé par rapport à la superficie totale des terres affectées à l'agriculture ;

(%)⁽²⁾ : pourcentage calculé par rapport à la superficie totale de la wilaya.

3. Les zones de prospection

Les communes d'étude sont essentiellement localisées dans le littoral, le sublittoral, la vallée du Sébaou et la région de montagne (Figure 6). Elles sont d'une diversité agro-écologique très marquée. Pour notre prospection, nous avons délimité la région d'étude en trois zones qui sont:

➤ **La zone I** : Comprenant les deux communes suivantes:

- **La commune d'Azeffoune** Elle est limitée à l'Est par la commune de Ait Chafaà, à l'ouest par la commune de Timizart et Iflissen, au nord par la mer méditerranéenne et au sud par la commune de Zekri, Yakourene et Fréha. Cette commune comporte trois zones de reliefs, avec prédominance de montagnes qui occupent 70% de la superficie totale. Les collines représentent 25% de la superficie alors que les plaines ne représentent que 5%.

Les sols sont calcaires de texture argileuse. On y trouve aussi des sols à texture fine rougeâtre de profondeur moyenne. La pluviométrie moyenne annuelle est de 700 à 800 mm, la température moyenne maximale est de 27°C en période Juillet-Aout, la minimale est de 10°C en période Janvier-Fevrier.

- **La commune de Tizirt** : Elle est limitée à l'Est par la commune d'Iflissen, à l'ouest par la commune de Mizrana, au nord par la mer méditerranéenne et au sud par les communes de Boudjima et celle de Makouda. Le relief de la commune est de prédominance montagneuse avec certaines collines. Cette commune se caractérise par une forte pluviométrie.

➤ **La zone II** : avec les communes suivantes:

- **La commune de Fréha**

Elle se situe dans la vallée du haut Sébaou à 35 km de la wilaya de Tizi-ouzou. Elle est limitée au nord par la commune d'Aghrib, à l'Est par la commune d'Azazga, à l'ouest par les communes de Timizart, Ouaguenoune et Tizi-Ouzou, au sud, la limite principale est constituée par l'oued Sébaou qui la sépare des communes de Mekla et de Tizi-Rached. Le relief de cette commune est caractérisé par trois zones étagées suivant l'altitude:

- Une zone de montagne occupant 51% de la surface communale totale, caractérisée par une agriculture de type traditionnelle.

- Une zone de collines qui représente 36% de la superficie et qui est de vocation céréalière et fourragère.

- La zone de vallée qui occupe la partie inférieure de la commune, représente 13% de la superficie totale de la commune, formées de terrains plats pouvant être irrigués.

Les sols de la commune de Fréha se posent sur des terrasses alluviales récentes, qui à leur tour, reposent sur des formations miocène post-nappe.

- **La Commune d’Azazga:** Elle est limitée au nord par la commune d’Aghrib et le massif montagneux de Tamgout, à l’Est par la forêts de yakourene, à l’ouest par la commune de Fréha, et au sud par la limite naturelle de oued Sébaou, et enfin au sud-est par la commune d’Ifigha, La commune d’Azazga s’étend sur une superficie totale de 7705 ha. Cette commune est composée de trois zones de relief. La majeure partie de son territoire est prédominée par la zone montagneuse qui occupe 75% de la superficie, la zone collinaire avec 20% de la superficie totale et enfin les plaines avec seulement 5% de la surface communale totale. Les sols de la région sont en général de type argileux reposant sur marne. Les températures varient généralement entre 6°C et 15°C en hiver et 25°C et 35°C en été.

- **La commune de Timizart:** Elle se situe au nord-est du chef lieu de la wilaya de Tizi-Ouzou, à une distance de 41km. Elle est limitée au nord par la commune d’Iflissen et d’Aghrib, au sud par Fréha et Oueguenoune, à l’Est par celle de Fréha, et à l’ouest par la commune de Boudjima. Cette commune s’étend sur une superficie de 6514 ha, dont 30,4% est constituées de plaines, 23.2% représente les piémonts. tant disque 46.4% est occupé par la montagne. La surface agricole utile représente une part importante dans la surface totale de la commune soit 42.5% de la superficie agricole totale.

Plusieurs spéculations sont rencontrées dans cette commune. Les cultures céréalières représentent 60.18% de la S.A.U. Les cultures maraîchères occupent 13.72% de la S.A.U, alors que l’arboriculture représente 26.10% de la S.A.U. La commune de Timizart se situe dans l’étage bioclimatique subhumide. La moyenne des précipitations est de 800 mm/an, ce qui est favorable à l’agriculture et permet l’alimentation des sources d’eau souterraines et de surface.

- **La commune de Makouda**

La commune de Makouda est située au nord-ouest de la wilaya de Tizi-Ouzou, distante de 25km du chef lieu. Elle est administrativement limitée au nord par la

commune de Mizrana, à l'ouest par celle de Sidi Naamane, à l'Est et au sud respectivement par les communes de Boudjima et Ait Aissa Mimoun, et au sud par la commune de Tizi-Ouzou.

Cette commune s'étend sur une superficie totale de 5743 ha dont 1841 ha soit 32% sont des surfaces agricoles utiles (S.A.U) et 3902 ha, soit 65.94% sont des bois, parcours et terres incultes. La surface agricole (S.A.U) se divise en deux parties:

- Les terres nues avec différentes spéculations: céréales, fourrages, cultures maraîchères et légumineuses, avec une superficie de 1072.25 ha soit 58% de la (S.A.U).
- Les plantations des arbres fruitiers avec une diversité d'espèces, occupent une superficie de 637.25 ha, soit 34.61% de la S.A.U.

➤ La zone 3

- **La commune de Mechtras** Elle se situe au sud sud-est du chef lieu de la wilaya de Tizi-Ouzou, à une distance de 36km, avec une superficie de 17.36 km² (C.C.D.I) pour une population de 13000 habitants soit 74.9 habitant/km². Elle est limitée au nord par la commune de Souk El Tenine, à l'Est par la commune de Tizi N'tlata, à l'ouest par la commune de Boghni, et au sud par Assi Youssef. La commune de Mechtras se compose d'une importante masse de collines séparées de la chaîne de Djurdjura par une grande vallée, selon Abdesslam (1995). Ces zones sont formées par l'accumulation des dépôts de l'oligo-miocène recouvert par l'oligocène (Flyschs chaotiques). Elle est cependant renommée par ses potentialités hydriques importantes. L'existence de plusieurs oueds, puits et d'importantes sources plaçant cette commune parmi les régions les plus ressourcées en eau. La profondeur des puits montre que les nappes phréatiques sont poches de la surface. La pluviométrie de la région est généralement supérieure à 700mm d'eau/an, mais elle varie d'une année à une autre. Les précipitations s'échelonnent sur environ six mois de l'année. Les températures moyennes maximales sont de 29°C à 35°C en période estivale, et les minimales sont de 10°C en période hivernale.

- **La commune de Ain Zaouia** La commune de Ain Zaouia se situe au sud de la wilaya de Tizi-Ouzou. Elle est limitée au nord par la commune de Ait Yahia Moussa, au sud par Bounouh et la commune de Frikat, à l'Est par la commune de Boghni et celle de Maatkas, et à l'ouest par la commune de Draa El Mizan.

La surface agricole utile est de 2216.45 ha soit 38.96% de la S.A.T. (5688 ha) avec une dominance des cultures céréalières représentées par 630 ha, soit 16.69% de la S.A.U. Les sols de la commune sont généralement de texture Argilo-limoneuse à structure grumeleuse.

Abréviations

ARA : Activité réductrice d'acétylène

C₂H₂-ID : «Acetylene-induced decline» : déclin d'ARA de la nitrogénase induit par acétylène

CO_{nr} : Consommation d'oxygène des racines nodulées

DAS : Days after sowing

EUP : Efficacité d'utilisation du phosphore

FSN : Fixation symbiotique d'azote

MS : Matière sèche

O_e : Concentration d'oxygène externe

O_i : Concentration d'oxygène interne

PCO : Pression rhizosphérique d'O₂, permettant l'activité enzymatique maximale

Pi : Orthophosphate

PO₂ : Pression partielle d'oxygène

RILs : Recombinant imbred lines

Adaptation de la symbiose rhizobienne chez le haricot à la déficience en phosphore: détermination de la réponse de la plante en terme d'échanges gazeux et de flux minéraux échangés avec la rhizosphère

Résumé: La déficience en phosphore est l'un des facteurs limitant la production de légumineuses à graines, dont le haricot (*Phaseolus vulgaris*). La diversité génétique de cette espèce en Amérique latine a permis d'identifier avec le CIAT, des lignées recombinantes du croisement de DOR364 et BAT477 à fort pouvoir fixateur d'azote (FSN) et à forte efficacité d'utilisation de phosphore (EUP). Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont permis de répondre à notre objectif principal de thèse qui consistait à vérifier la pertinence des critères d'adaptation de la fixation symbiotique de l'azote chez le haricot à la disponibilité de P que nous avons déterminé. Nous avons démontré, d'une part, en milieu hydroaéroponique, que les racines nodulées du haricot, excrètent dans leur rhizosphère une quantité de H^+ qui est corrélée à la perméabilité nodulaire. Ce qui laisse penser qu'une part d' H^+ excrétée par les racines nodulées est liée à la fixation symbiotique de N_2 . D'autre part, nous avons démontré que sous déficience en P les lignées tolérantes acidifient plus leur rhizosphère que les sensibles. En multisites les facteurs les plus déterminants de la hiérarchisation des sites sont N-total et P-total. Deux groupes de lignées se distinguent, les tolérantes *versus* les sensibles à la faible fertilité des sols en P. La lignée locale se distingue des groupes précédents. Elle est capable de croître dans différents sols, notamment les contraignants avec une grande capacité à noduler, par conséquent, à compenser la déficience en N. Nous avons également pu démontrer que les biomasses nodulaire et aérienne sont corrélées au P Olsen du sol.

Mots clefs: Lignées recombinantes, perméabilité nodulaire, efflux de protons, *Phaseolus vulgaris*, nodulation.

Adaptation of nodulated bean to P deficiency: determination of nodule respiration and proton efflux in rhizosphere

Abstract: Phosphorus deficiency is one of the limiting factor for grain legume production like bean (*Phaseolus vulgaris*). The results obtained during this work enabled us to confirm our main aim of this work which is checking the relevance of the criteria of adaptation of the symbiotic nitrogen fixation of bean to P availability. We showed, in controlled conditions that the nodulated roots of bean, release in their rhizosphere a quantity of H^+ which is correlated with the nodul permeability. What lets think that a share of H^+ released is related to the symbiotic N_2 fixing. In addition, we showed that under P deficiency the tolerant lines acidify more their rhizosphere that the sensitive ones. Into multisite trial the most determining factors of the hierarchisation of the sites are total-N and total-P. Two groups of lines are distinguished: tolerant versus sensitive to P deficiency. The local farmer line is distinguished from the studied lines. It is able to grow in various soil fertility, in particular the constraining soils. ones with a great capacity with noduler, consequently, to compensate for deficiency in NR. We also could show that shoot and nodule biomass are correlated with the Olsen-P Olsen of the soil.

Key words: Recombinant Imbred Lines, nodule perméability, proton efflux, *Phaseolus vulgaris*, nodulation.

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé en partie au sein de l'UMR Ecologie Fonctionnelle & Biogéochimie des Sols (Eco&Sols) à Montpellier et en partie à l'Ecole Nationale Agronomique d'Alger (ENSAA) et à Tizi Ouzou, en Algérie.

Mes premiers remerciements s'adressent à Benoît JAILLARD, Directeur de Recherches à l'INRA-Montpellier (UMR Eco&sols), ex-Directeur de l'ex UMR Rhizosphère & Symbiose (R & S), pour ses aides multiples depuis pour mon DEA jusqu'à la fin de ma thèse. J'ai pu apprécier non seulement sa gentillesse mais également sa participation à une grande partie de mon travail dont les analyses statistiques. Je lui exprime ma gratitude pour l'attention qu'il m'a accordée tout au long de cette thèse. Merci infiniment Benoît

Je remercie vivement Sidi Mohamed OUNANE Professeur et chef du département à l'Ecole Nationale Agronomique d'Alger (ENSAA) d'avoir co-dirigé mon travail et de m'avoir soutenue tout au long de ma thèse. Il m'a toujours encouragée à aller jusqu'au bout. Grâce à lui j'ai pu surmonter beaucoup de problèmes administratifs qui auraient pu retarder, voir même freiner ma soutenance. Je remercie, par l'occasion, Mme Ghania Ounane pour son amitié et ses aides précieuses. Merci infiniment à tous les deux.

Je remercie vivement et sincèrement Mr Abdellah AIDAOUÏ, Professeur à l'Ecole Nationale Agronomique d'Alger (ENSAA) pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de participer au jury de cette thèse dont il était rapporteur. Merci aussi, d'avoir accepté d'être le président de mon jury.

Je remercie Mr Etienne-Pascal JOURNET, Chargé de Recherches HDR CNRS à l'INRA-Toulouse, pour avoir accepté de juger mon travail et d'être rapporteur, malgré ses nombreuses occupations. Merci à lui d'avoir accepté de se déplacer en Algérie à la veille des fêtes de Noël.

Je remercie Jean-Jacques DREVON, Directeur de Recherches à l'INRA-Montpellier (UMR Eco&sols), pour avoir co-dirigé mon travail.

Je n'aurai garde d'oublier Philippe HINSINGER, Directeur de Recherches à l'INRA-Montpellier (UMR Eco&sols), pour l'intérêt qu'il a manifesté dans ce travail. Je lui exprime ma gratitude pour la bienveillante attention qu'il m'a accordée tout au long de ma thèse. J'ai pu ainsi largement bénéficier de sa gentillesse, de ses conseils et de sa grande compétence.

Je tiens également à remercier particulièrement M^{me} Martine BARRAUD, de l'Ecole Doctorale SIBAGHE de Montpellier et de SupAgro pour son professionnalisme et pour son dévouement à toujours vouloir alléger les doctorants de leurs tâches administratives. Dieu seul sait combien son aide était précieuse pour moi. J'ai pu profiter de sa large gentillesse et de son admirable sympathie. C'est grâce à ses interventions multiples, quant aux problèmes administratifs en France ou en Algérie, que j'ai pu arriver à terme de ma thèse. Merci infiniment Martine pour tout ce que tu as fait pour moi.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à Mr Jacques MAILLET Directeur adjoint à Sup-Agro Montpellier de m'avoir soutenue durant toute ma thèse. Merci d'avoir soutenu ma candidature pour la bourse AVERROES. C'est cette bourse de 18 mois qui m'a aidée à mener à terme ma thèse dans les délais fixés par l'école doctorale SIBAGHE et dans de bonnes conditions financières. Je remercie par l'occasion Jan Luc BOSIO et Corinne Pickett qui font partie de ce programme boursier qui m'ont largement aidée.

Il existe des personnes que je ne saurai jamais assez bien remercier, ce sont les assistants-ingénieurs, techniciens et ACP de l'ex UMR R&S, et de l'actuelle UMR Eco&sols, qui m'ont aidée: Lucien ROGER qui est malheureusement parti en retraite avant même de finir ma thèse mais avec qui je garde de très très bons contacts, Hélène PAYRE, , Gérard SOUCHE Didier ARNAL et Catherine PERNOT. Avec leur bonne humeur et leur humour, ils ont toujours su me guider et me soutenir. J'ai trouvé ici, l'occasion de leur exprimer ma gratitude et de leur dire Merci. C'est une chance pour moi de les avoir tous connus.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Corinne ALLEGRE et Farid MEDDACI pour leurs aides administratives et leur gentillesse et surtout pour leur amitié. Pour moi, vous êtes les meilleurs et les plus gentils secrétaires que j'ai connu.

Un grand merci pour le doyen de notre faculté, le Professeur Arezki DERRIDJ d'avoir soutenu ma candidature au poste de maître assistante à l'université de Tizi Ouzou.

Ce travail n'aurait pu être mené à terme sans l'aide précieuse de Mr Hamid MADIOU chef du département des sciences agronomiques à la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques qui était parmi les rares personnes du département à me soutenir dans mes démarches pour finaliser ma thèse. Je citerai aussi Fatima MEDJKANE secrétaire au département des sciences agronomiques à la faculté des sciences biologiques pour toutes ses aides précieuses.

Un grand merci à tous mes étudiants de l'université de Tizi Ouzou qui ont largement contribué aux essais menés au champs. Je citerai Yougherthen MADOUCHE, Djamel AIT OUARAB, Jugurta LAYAZID, Karim REZGUI et Rabiee HESSAS.

Une pensée particulière pour l'aide particulière au québécois Benoît-Cloutier HURTEAU. Merci Benoît!

Et enfin je dédicace ce mémoire à mes héros de l'univers Idir, mon mari et mon bébé Rayane qui constituent ma richesse de cette terre. Merci Idir pour ton soutien affectueux, ta patience et ton indulgence. Tu étais toujours là à chaque fois que j'ai besoin d'un soutien moral et elles étaient nombreuses. Sans toi, je n'aurais jamais eu le courage d'aller jusqu'au bout. Toi et Rayane êtes le meilleur cadeau que dieu puisse m'offrir et el hamdoulah.

ملخص

نقص الفسفور ما بين العوامل التي تعيق إنتاج البقول الجافة و من بينها الفاصولياء (Phaseolus Vulgaris).

التعدد الجيني للفاصولياء في أمريكا اللاتينية مكنت، بفضل CIAT ، من تحديد جينات جديدة التي نتجت من تناسل DOR364 و BAT477 التي لها قدرات عالية في تثبيت الازوت الجوي (FSN) و كذا في إمكانية استعمال الفسفور (EUP) في الأرض.

النتائج المحصلة عليها في إطار هذا البحث مكنت الإجابة على التساؤلات المطروحة و هي :

Vérifier la pertinence des critères على التثبيت الريزوبي للأزوت على توفر الفسفور عند الفاصولياء. أثبتنا في المحلول الغذائي أن جذور nodules للفاصولياء تطرح في الريزوسفير كمية H^+ تتناسب مع التدفق Nodulaire. ذلك يدفع للتفكير بان كمية ما من H^+ الذي يطرح من الجذور est liée إلى تثبيت الريزوبي للأزوت.

أثبتنا كذلك أن تحت نقص الفسفور حموضية الريزوسفير تكون أكبر عند الجينات المقاومة بالمقارنة مع الجينات الغير المقاومة لنقص الفسفور, فيما يخص النتائج المتحصل عليها في الحقل (تعدد المواضيع) العوامل التي مكنت من ترتيب تلك المواضيع P Total N total .

مجموعتي من الجينات يمكن تفريقها : المقاومة و الغير المقاومة في الأرض. الجين المحلي يختلف تماما عن المجموعتين السالفتين الذكر لها خصوصية النمو حتى في الأراضي الوعرة و لها قدرات في تشكيل Nodules كثيرة و التي يمكن لها تعويض نقص الازوت في الأرض.

العنوان:

تأقلم التعايش الريزوبي عند الفاصولياء في نقص الفسفور, تحديد تجاوب النبتة على المبادلات الغازية و إنفدفاق المعادن المبادلة مع اليزوسفير.

الكلمات الأساسية:

الجينات المشكلة Perméabilité Nodulaire, التدفق البروتوني (Phaseolus Vulgaris) التعايش الروزوبي .