

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش – الجزائر-

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE – EL HARRACH –
ALGER.

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Département : production végétales.

Spécialité : Ressources génétiques et amélioration des productions végétales

THEME

**Diversité fonctionnelle des rhizobia symbiotiques du niébé
(*Vigna unguiculata*) vis-à-vis de la minéralisation du phytate.**

Présenté par : M^{elle} CHAIR Kamilia

soutenu le : 10 / 10 / 2017.

Devant le jury :

Présidente	: Mme. MOUSSAOUI S	MAA (ENSA El-Harrach)
Promoteur	: Mr. OUNANE SM.	Professeur (ENSA El-Harrach)
Examineurs	: Mme. TELLAH S	MCA (ENSA El-Harrach)
	Mr. KIRDI B.	MAA (Blida 1)
Invité	: Mme. BENLAHRECH S	Doctorante (ENSA)

Promotion : 2012-2017

Sommaire

Dédicaces		
Remerciements		
Liste des abréviations		
Liste des tableaux		
Liste des figures		
Introduction	1	
Première partie : synthèse bibliographique		
I. Le Macrosymbiote <i>Vigna Unguiculata</i> L. (Walp.)		3
Origine et répartition géographique	3	
Description, classification et taxonomie	4	
Intérêts de la plante	6	
Intérêt agronomique	6	
Intérêt nutritif	6	
Intérêt économique.....	8	
Exigences de la plante	10	
Le climat	10	
Le sol.....	10	
L'eau	11	
Cycle Végétatif De La Plante	11	
Maladies Et Ravageurs De Niébé	11	
II. Le Microsymbiote		14
Définition	14	
Historique de la taxonomie des rhizobiums	14	
Classification actuelle des rhizobia	14	

Etapes de la nodulation.....	19
La fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par les légumineuses	21
III. Role physiologique du phosphore dans le sol	24
Le phosphore dans le sol.....	24
Importance du phosphore dans l'alimentation minérale des légumineuses.....	26
La biodisponibilité du phosphore	26
Effet de la deficiencia en phosphore	26
Effet de la déficiencia en p sur la croissance racinaire.....	26
Effet de la déficiencia en p sur les nodosités.....	26
Transformation microbienne du phosphore.....	27
IV. Phytases bacteriennes	29
Nomenclature et classification des phytases	29
Histidine acide phosphatase (HAP).....	29
B-Propeller Phytase (BPP)	30
Deuxième partie : materiel et methodes.....	31
Présentation de la zone d'étude	31
Caractéristiques Climatiques	32
Température.....	32
Pluviométrie.....	32
Protocole expérimental.....	33
Site expérimental.....	36
Dispositif expérimental.....	36
Analyse des echantillons	48
Sur le végétal	48
Partie microbiologique	48
Prélèvement et stérilisation des nodules	48
Milieu de culture.....	48

Technique d'isolement.....	49
Partie biologie moléculaire.....	51
Extraction d'ADN.....	51
Le gène Nifh	52
Le gène BPP	52
Le gène HAP.....	52
Traitement Statistiques Des Données	52
Troisième partie : Resultats Et Discussion	53
Caractéristiques Physico-Chimiques Des Sols Prélevés	53
Résultats D'analyse Des Echantillons	58
Sur Le Végétal.....	58
Microbiologie	58
Caractérisation Des Souches.....	58
Résultats Des Tests Microbiologiques.....	60
Biologie Moléculaire.....	64
Profile d'extraction d'ADN	65
Le Gène Nifh	66
Le Gène HAP.....	67
Le Gène BPP.....	68
Conclusion	70
Références bibliographique.....	71
Annexes	I
Résumés	

Résumé

Le phosphore (P) est souvent l'un des éléments les plus limitant pour la croissance des plantes du fait qu'il est peu mobile et le plus inaccessible dans les sols, spécialement dans les sols calcaires méditerranéens où sa rétention est élevée. Cette déficience en P affecte plus particulièrement les légumineuses à cause de la fixation symbiotique de l'azote qui consomme plus d'énergie que l'assimilation minérale. Ainsi des carences en P apparaissent au sein des cultures et elles peuvent être levées avec des apports de fertilisants dérivés du phosphate. Mais ce n'est pas une ressource renouvelable. Dans ce contexte, nos objectifs ont été le piégeage, l'isolement et la caractérisation des bactéries nodulant le niébé (*Vigna unguiculata* L.) et qui permet la minéralisation du phytate, forme majoritaire du P organique, en P minéral, forme assimilée par les plantes. Pour cela deux populations de niébé ont été utilisées et semées dans des sols provenant de dix différents sites pour pouvoir étudier la diversité fonctionnelle des bactéries du genre *rhizobium* nodulant le niébé et solubilisant le P. On a étudié l'activité phytase des bactéries isolées à partir des nodules de niébé. Cette activité phytase a confirmé la capacité de ces isolats à minéraliser le phytate. Des tests moléculaires (gènes NifH, HAP, BPP) ont été réalisés et ont montré que les souches isolées sont à calcium dépendance. Nos résultats suggèrent de nouvelles perspectives pour améliorer l'utilisation du P organique dans la nutrition phosphatée des légumineuses.

Mots clefs: activité phytase, phytate, diversité fonctionnelle des bactéries de genre *rhizobium*, nodules, *Vigna unguiculata* L. Walp.

Abstract

Phosphorus (P) is often one of the most limiting elements for plant growth because it is not very mobile and most inaccessible in soils, especially in Mediterranean calcareous soils where its retention is high. This P deficiency affects legumes in particular because of the symbiotic fixation of nitrogen that consumes more energy than mineral assimilation. Thus P deficiencies appear within cultures, they can be lifted with inputs of fertilizers derived from phosphate. But it is not a renewable resource. In this context, our objectives were trapping, isolation and characterization of community that nodulate cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and allowing the mineralization of phytate, the major form of organic P, in mineral P, assimilated by plants. For this purpose, two populations of cowpea have been used and seeded in ten different soil sites in order to study the functional diversity of rhizobium-like bacteria nodulating cowpea and solubilizing P. The phytase activity of isolated bacteria was studied from nodules of cowpea. This phytase activity confirmed the ability of these isolates to mineralize the phytate. Molecular tests (genes NifH, HAP, BPP) were carried out and showed that the isolated strains are calcium dependent. Our results suggest new perspectives for improving the use of organic P for phosphate nutrition of legumes.

Keywords: phytase activity, phytate, functional diversity of rhizobium bacteria, nodules, *Vigna unguiculata* L. Walp.

ملخص

يعتبر الفوسفور احد العناصر المقيدة لنمو النبات الا انه قليل الحركة في التربة خاصة في التربة الجيرية، قلة هذا العنصر في التربة يؤثر سلبا على المحاصيل الزراعية خاصة فيما يخص البقوليات بسبب تثبيتها لنتروجين الهواء، لكن يمكن رفع كمية الفوسفور في التربة باضافة الاسمدة الكيميائية، وفي هذا السياق تتمثل اهدافنا في عزل و وصف البكتيريا العفيدة للوبيا و المسؤولة على تمعدن الفيتات الشكل الغالب للفوسفور في التربة الى فوسفور معدني. من اجل هذا قمنا بزراع عائلتين من اللوبيا في عشرة اترية مختلفة من اجل دراسة التعدد الوظيفي للبكتيريا من نوع (ريزوبيوم).

كلمات مفتاحية : نشاط فيتاز، التعدد الوظيفي للبكتيريا من نوع ريزوبيوم، فيتات، عقدة.