

***Adaptation de la symbiose légumineuse
haricot-rhizobium à la déficience en
phosphore***

**incidence sur la biodisponibilité du phosphore dans
la rhizosphère**

Présenté par :

M.LATATI Mourad

Directeur : M. OUNANE S.M. Professeur (ENSA)

Soutenu le : 05/01/2012

Jury: Président : M. KHELIFI L.Professeur (ENSA) Examineurs : M. BOUZNAD Z. Professeur (ENSA) Mme ALKAMA N.Maître de Conférences (Univ. Tizi Ouzou)

Table des matières

Remerciement . .	5
Dédicace . .	6
Liste des abréviations . .	7
Résumé . .	8
ص غ ل م ل ا . .	9
Abstract . .	10
INTRODUCTION GENERALE . .	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE . .	13
1. Légumineuses : présentation générale et importance dans les systèmes de cultures . .	13
2. Le haricot . .	13
2.1. Origine, Air de répartition et classification . .	13
2.2. Caractéristiques agronomiques . .	14
2.3. Importance . .	14
2.4. Production . .	15
2.5. Situation du haricot en Algérie . .	16
2.6. Contraintes et limites de production . .	18
3. Symbiose fixatrice d'azote . .	18
3.1. Importance de l'azote dans la nutrition des plantes et intérêt de la fixation d'azote . .	18
3.2. Mécanismes de la fixation symbiotique de l'azote . .	19
3.3. Les rhizobia . .	19
3.4. Etablissement de la symbiose légumineuses-rhizobia . .	19
3.5. La symbiose <i>Phaseolus</i> -Rhizobia . .	21
4. Le phosphore . .	22
4.1. Le phosphore dans la plante : forme et fonction . .	23
4.2. L'état du phosphore du sol . .	24
4.3. La biodisponibilité de phosphore et son prélèvement par la plante . .	25
4.4. Acidification de la rhizosphère sous déficience en P . .	26
4.5. Conséquence de la déficience en phosphore sur la plante . .	27
4.6. Fixation symbiotique sous déficience en phosphore . .	29
4.7. Solubilisation du phosphore par les micro-organismes . .	30
MATERIELS ET METHODES . .	32
1. Matériel biologique . .	32
1.1. Matériel végétal . .	32
1.2. Le sol . .	33
1.3. Souches bactériennes . .	33
2. Etude microbiologique . .	34
2.1. Piégeage . .	34
2.2. Isolement des souches de rhizobium . .	35
2.3. Authentification des isolats . .	36

2.4. Screening (Solubilisation du phosphore) . .	37
3. Etude agronomique . .	38
3.1. Site expérimental . .	38
3.2. Traitement phosphaté . .	38
3.3. Inoculation . .	38
3.4. Dispositif expérimental . .	39
3.5. Semis . .	39
3.6. Irrigation . .	39
3.7. Caractères étudiés . .	40
3.8. Analyses statistiques . .	41
RESULTATS ET DISCUSSIONS . .	42
1. Isolement et caractérisation des souches rhizobiennes solubilisatrices du phosphore . .	42
1.1. Evaluation de pouvoir nodulant des sols . .	42
1.2. Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats . .	43
1.3. Effet de l'isolat de KA sur la solubilisation du phosphate tricalcique (PTC) sur le milieu solide . .	46
2. Effet de la déficience en phosphore sur l'interaction symbiotique haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i>)-rhizobium . .	48
2.1. Effet de la déficience en phosphore sur les paramètres de croissance . .	48
2.2. Effet de la déficience en phosphore sur la concentration en phosphore dans la plante . .	53
2.3. Effet de la déficience en phosphore sur la solubilisation du phosphore dans la rhizosphère . .	60
2.4. Effet de la déficience en phosphore sur la fixation symbiotique de l'azote . .	63
3. Discussion générale et synthèse . .	67
3.1 Réponse des différents couples symbiotiques à la déficience en P . .	67
3.2. Screening de l'efficacité d'utilisation du P (PE) chez les différents couples symbiotiques . .	70
CONCLUSION GENERALE . .	76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES . .	78
ANNEXES . .	90
Annexe 1 : Teste de signification obtenu par l'analyse de la variance (ANOVA) et regroupement des couples symbiotiques selon le teste de Newman et Keuls ($\alpha < 0.05\%$) . .	90
Annexe 2 : Matrice de corrélation . .	102
Annexe 3 : Composantes (CPs) principales et poids relatif (PR) des différents couples symbiotiques . .	103

Remerciement

Je remercie, tout d'abord, ALLAH, le tout puissant, de m'avoir aidé à achever ce modeste travail.

A l'issue de ce travail, je tiens tout particulièrement à remercier M. M.S OUNANE (Professeur à l'ENSA) pour avoir accepté de diriger avec beaucoup d'attention et de soin cette thèse. Je lui suis très reconnaissant pour sa disponibilité, son soutien permanent, sa gentillesse et surtout ses qualités humaines.

Je tiens à remercier vivement M. L. KHELIFI L (Professeur à l'ENSA) pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mes remerciements vont également à M^{me} N. ALKAMA (Maitre de conférences à l'université de Mouloud Mammeri à Tizi Ouzou) et M. Z. BOUZNAD (Professeur à l'ENSA) qui me font l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie particulièrement, M^{lle} ABED N.H (Doctorante à l'université d'Oran Essenia) qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et gratitude pour m'avoir initié à la microbiologie.

Je remercie : M. Kadi F. (Chargé de cours à L'ENS, Kouba) pour son aide à la caractérisation moléculaire des souches bactériennes, M^{me} Hylène (Ingénieur de laboratoire à l'INRA Sup-Agro, Montpellier) pour la fourniture des isolats rhizobiens de la souche CIAT 899 et M. ABD-EL HAFID (responsable de la pépinière d'EL NOUR à STAOUELI) pour la fourniture du sol.

J'adresse un très grand merci à toute l'équipe du département de phytotechnie et de botanique, particulièrement M^{me} DJEBARI, M^{me} Djamila, M^{me} Samia, M. Noureddine sans oublier Safir et El ARBI.

Mourad LATATI

Dédicace

Avec l'aide d'Allah le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie A mes très chers parents et mes sœurs et frères: Pour leur soutien et affection inconditionnels, toutes les privations et sacrifices et leurs encouragements infaillibles. Je ne les remercierai jamais assez, pour tout ce qu'ils m'ont fait, A tous mes enseignants en témoignage du respect et de ma profonde et éternelle gratitude que je leurs porte, A Nour pour ses qualités humaines, son éducation et son aide morale et physique, A tous les amis de COLLO, plus particulièrement BAZIZ Manich, BOUASLA Khale, GHEMIRED Amine, DJWAMAA Anis et KHANICH Mohcène, A tous mes amis (Asma, Sihem, Ouarda, Katia, Malak, Samia, Amina, Lamia, Bakaka, Adel, Omar, Nounou, Chouka, Fares, Sabki, Yamin, Didi, Sif, salah et salim) pour leur gentillesse, dévouement, leur inconditionnelle affection et surtout pour leur soutien infaillible, A toutes les personnes qui ont participé, de loin ou de près, à la réalisation du présent travail. Mourad LATATI

Liste des abréviations

- **ABA** : Abscisic Acid
- **ACC** : 1-amino-Cyclopropane-1-Carboxylic Acid
- **ACP** : Analyse des Composantes Principales
- **ADN** : Acide Désoxy-ribo-Nucléique
- **AHC** : Analyse de Classification hiérarchique
- **ANOVA** : Analysais Of Variance
- **ARA** : Activité Réductrice d'Acétylène
- **ARN** : Acide Ribo-Nucléique
- **BTB** : Bleu de Bromo-Thymole
- **C** : CIAT 899
- **CIAT** : Centre International de Recherche Agronomique Tropicale
- **CNCC** : Centre National de Contrôle et de Certification
- **DJBM** : Djelfa, Précédent culturale Blé, nodule Moyen
- **DJBG** : Djelfa, Précédent culturale Blé, nodule Grand
- **DO** : Densité Optique
- **ENSA** : Ecole Nationale Supérieure Agronomique
- **EUP** : l'Efficacité d'Utilisation du Phosphore
- **F** : Composante des paramètres
- **FAO** : Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
- **FSN** : Fixation Symbiotique de l'Azote
- **IAA** : Indole-Acetic Acid
- **INRA** : Institut National de Recherche Agronomique
- **IS** : Indice de Solubilisation
- **MADR** : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
- **NBRIP** : National Botanical Research Institute's Phosphate
- **PC** : Composante Principale
- **PE** : l'Efficiencie de Phosphore
- **PEP** : Phospho-Enole-Pyivate
- **pH** : Potentiel d'Hydrogène
- **PR** : Poids Relatif
- **PSB** : Bactéries Solubilisatrice de Phosphore
- **PTC** : Phosphate Tri-Calciqie
- **RIL** : Lignées Recombinantes
- **RPAE** : The Phosphorus Absorption Efficiency by Root
- **TPS** : Super Triple Phosphate
- **YMA** : Yeast- Mannitol-Agar
- **Y.M.B** : Yeast- Mannitol- Broth

Résumé

Le but de ce travail est de mettre en évidence, les réponses adaptatives à la déficience en phosphore de cinq lignées de haricot et une variété locale El Djadida, inoculées par deux isolats rhizobiens, en vue d'identifier les interactions symbiotiques les plus efficaces vis-à-vis de l'utilisation du phosphore.

Les résultats obtenus montrent que les effets de la déficience en phosphore se manifestent par une diminution de la biomasse sèche de la partie aérienne, de la hauteur de la tige, de la surface foliaire, de la concentration en phosphore dans la partie aérienne, du phosphore total prélevé par la plante et de l'efficacité de prélèvement du phosphore par les racines. En revanche l'efficacité d'utilisation du phosphore a connu une augmentation sous la déficience en phosphore. Les différentes lignées inoculées par la souche rhizobienne KA, présentent une meilleure biomasse nodulaire qui favorise une forte fixation symbiotique d'azote, et qui s'accompagne aussi par une amélioration de la biodisponibilité de phosphore par acidification de la rhizosphère. Les interactions symbiotiques se comportent différemment sous déficience en phosphore. Cependant, les couples symbiotiques K-115, K-75 et le K-83 se sont avérés les plus efficaces à la déficience en phosphore comparés aux couples symbiotiques C-Dj, K-Dj, C-7, K-7 et le K-104.

Dans cette étude, la variabilité génétique du matériel végétal et de l'inoculation, plus particulièrement par la souche de rhizobium KA, ont permis d'améliorer la tolérance du haricot à la déficience en phosphore du sol.

Mots clés :

Déficience, phosphore, haricot, rhizobium, inoculation, interaction symbiotique, efficient, fixation symbiotique

ص خ ل م ا

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير مختلف أنماط التعاقب فاصوليا بيكتوريا عقدة لخمسة عشائر من الفاصوليا مع سلالة أخرى نغرس محليا تدعى "الجديدة" ملقدين بنوعين مختلفين من البيكتوريا العقدة و هذا بغرض تحديد و اختيار التعاقبات الأكثر فعالية في استغلال الفسفور .

النتائج التي تم الحصول عليها تظهر أن نقص الفسفور ساهم في انخفاض الوزن الجاف , طول الساق , مساحة الورقة تركيز الفسفور و الفسفور الكلي الممتص أما فعالية استعمال الفسفور فقد عرفت ارتفاع نسبة تأثير نقص الفسفور في التربة . مختلف التعاقبات الملقحة بنوع البيكتوريا KA أظهرت عقد ذات وزن جاف مرتفع مما ساهم في ارتفاع نسبة تثبيت الأزوت الجوي , هذا الأخير كان مصحوبا بتحسين في التوافر البيولوجي للفسفور في الريزوسفير عن طريق زيادة حموضته. التعاقبات K-115, K-83, K-75 كانت الأكثر فعالية في استغلال الفسفور على غرار C-7, C-Dj, K-104, K-Dj التي تميزت بفعالية ضعيفة في استغلال الفسفور.

في هذه الدراسة النوع الجيني النباتي و التلقيح عن الأخص بواسطة البيكتوريا ساعد على تحسين مقاومة الفاصوليا لنقص الفسفور في التربة.
الكلمات المفتاحية

نقص الفسفور, الفاصوليا, البيكتوريا العقدة, تلقيح, التعاقب, فعالية, تثبيت الأزوت

Abstract

The purpose of this work is to highlight the responses to phosphorus deficiency of five lines and a variety of beans grown locally named El Djadid inoculated with two strains of rhizobia, to identify the most P-efficient symbiotic interactions.

The results obtained show that the effects of phosphorus deficiency are manifested by a decrease in shoot dry weight, the length of the stem, the surface area, the concentration of phosphorus in shoot, the total phosphorus uptake and P absorption efficiency by root. However, the phosphorus use efficiency has increased under phosphorus deficiency. The various lines inoculated with the strain of rhizobia KA has better nodular biomass which will contribute to a strong symbiotic fixation, the latter is accompanied by an improvement in the bioavailability of phosphorus in the rhizosphere by acidifying it moreover. These symbiotic interactions behave differently in soils deficient in phosphorus. However, the symbiotic couples K-115, K-75 and K-83 proved the most efficient in phosphorus deficiency. The symbiotic interactions against C-Dj, K-Dj-, C-7, K-7 and K-104 are the least efficient to the limitation of phosphorus in the soil.

In this study, the genetic variability of plant material and inoculation particularly by strain of rhizobia KA has improved tolerance of bean to phosphorus deficiency in the soil.

Key Words

INTRODUCTION GENERALE

Les légumineuses à graine occupent une place privilégiée dans l'alimentation de part leur richesse en protéines et leur valeur nutritive. Elles jouent également un rôle essentiel dans la rotation des cultures grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (Mylona *et al.*, 1995).

Le système de production le plus fréquent en Algérie reste sans conteste le système Jachère-blé. La résorption de la jachère (40% de la surface agricole utile) est devenue une nécessité stratégique afin de garantir la sécurité alimentaire en réponse à l'instabilité de l'offre et la persistance de la hausse des prix des produits alimentaires, sur le marché mondial. Dans ce cas, les légumineuses peuvent jouer un rôle important bien que marginalisées en raison de la faiblesse et de la grande instabilité de leur rendement. Ce manque d'intérêt s'explique par deux facteurs limitants, le déficit hydrique et la déficience en phosphore, qui caractérisent la plupart des zones méditerranéennes. Par ailleurs il est reconnu que les légumineuses sont exigeantes en phosphore inorganique à cause du coût énergétique élevé de la fixation symbiotique de l'azote (FSN) qui est particulièrement important chez le haricot (Drevon et Ounane, 2009).

Parmi les légumineuses à graines, le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) est le plus répandu et apprécié ; il est produit sur plus de 18 millions d'hectares localisés principalement en Amérique latine. 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). Cependant, on retrouve cette culture dans des zones marginales, où plus de 50% des sols sont carencés en P. C'est le cas aussi de certaines zones céréalières d'Algérie où le pH alcalin des sols se traduit par une faible biodisponibilité de P (Djili, 2000).

Dans le but d'améliorer l'efficacité d'utilisation du phosphore (EUP) chez le haricot, un projet de coopération entre le CIAT (Centre International de Recherche Agronomique Tropicale) et l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) de Montpellier, a permis l'obtention des lignées recombinantes (RILs) et contrastantes pour leur FSN et leur EUP, issues du croisement entre deux variétés, BAT 477 et DOR 364. Ces RILs sont susceptibles de s'adapter à la déficience en phosphore dans les conditions méditerranéennes (Trabelsi, 2001).

Par ailleurs, les rhizobia qui colonisent la rhizosphère jouent un rôle important dans la croissance et le développement des plantes. Ainsi Les bactéries solubilisatrices de phosphore (PSB) de la famille Rhizobiacées interviennent dans le cycle biogéochimique de P en transformant le phosphore insoluble sous formes solubles par l'acidification de la rhizosphère (Khan *et al.*, 2010).

De plus, la fixation symbiotique de l'azote est associée à un efflux de protons (Tang *et al.*, 1997) car les racines des légumineuses absorbent plus de cations que d'anions, ce qui se traduit par une acidification marquée de la rhizosphère (Mengel et Kirkby, 2001 ; Tang *et al.*, 1998). Cette acidification contribue à la solubilisation du phosphore dans les sols calcaires qui caractérisent la plupart des zones céréalières en Algérie et améliore de ce fait la biodisponibilité de cet élément pour les plantes (Drevon et Ounane, 2009).

Le but du présent mémoire est de rechercher les couples symbiotiques haricot-rhizobium les plus performants, ayant la capacité de s'adapter au mieux à la déficience en phosphore dans le sol. Pour cela, l'adaptation de la symbiose haricot (*Phaseolus vulgaris*)-rhizobium sous déficience en phosphore dans la rhizosphère, est étudiée sur cinq lignées de haricot (RILs) contrastantes pour leurs FSN et EUP afin de les comparer avec une variété locale nommée El-Djadida. La réponse de ces lignées à l'inoculation est aussi évaluée avec deux isolats de rhizobium : la CIAT 899 qui est une souche de référence et une souche locale issue d'un piégeage à partir d'un sol prélevé à El Kala nommée KA,

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Légumineuses : présentation générale et importance dans les systèmes de cultures

La famille des légumineuses est très diverse avec 3 sous familles: Mimosoideae, Caesalpinioideae, et Papilionoideae (Doyle et Luckow, 2003).

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) ou l'alimentation animale (luzerne,...) grâce à leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec des microorganismes du sol. Cette spécificité leur permet de s'associer à des bactéries du sol appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, pour former des organes symbiotiques «nodosités» ou «nodules» au sein desquels ces bactéries convertissent 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 N ha⁻¹ (Blondeau, 1980).

Les légumineuses occupent la deuxième place, après les céréales. En 2004, plus de 300 millions de tonnes de graines ont été produites sur une superficie de 190 millions d'hectares, soit 13% des terres cultivées (FAO, 1996). De ce fait, Elles constituent une part importante dans l'alimentation mondiale, particulièrement dans les pays en développement où elles sont la principale source de protéines pour l'homme. Citons le haricot (*Phaseolus vulgaris*) en Amérique Latine, le Pois Chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*) et la Fève (*Vicia faba*) dans le bassin méditerranéen, le Soja (*Glycine max*) en Asie sans oublier l'Arachide (*Arachis hypogea*) et le Pois (*Pisum sativum*) dans le monde entier (Broughton *et al.*, 2003).

2. Le haricot

2.1. Origine, Aire de répartition et classification

- Origine et aire de répartition

Le Nouveau Monde constitue l'aire d'origine et de domestication du genre *Phaseolus* (Kaplan, 1981). Selon Debouck (1991), cette région se caractérise par trois centres de diversité primaire : le centre méso-américain (du sud des États-Unis), le centre nord-andin (de l'ouest du Venezuela au nord du Pérou), et le centre sud-andin (du centre du Pérou au nord de l'Argentine).

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 (Vadez, 1996) (Tableau 1).

<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.

Tableau 1. Répartition des groupes de haricots selon leur composition biochimique.

Source : Vadez, (1996)

- classification

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

Classification classique Classification phylognétique

Règne : Plantae. **Clade :** Angiospermes.

Sous règne : Tracheobionta. **Clade :** Dicotylédones vraies.

Division : Magnoliophyta. **Clade :** Rosdées.

Classe : Magnoliopsida. **Clade :** Fabidées.

Sous classe : Rosidae. **Ordre :** Fabale.

Ordre : Fabale. **Famille :** Fabaceae.

Famille : Fabaceae. **Genre :** Phaseolus.

Genre : Phaseolus. **Espèce :** Phaseolus vulgaris.

Espèce : Phaseolus vulgaris.

2.2. Caractéristiques agronomiques

Les fleurs de couleur blanche ou pourpre donnent des fruits en gousses longues droites ou légèrement courbées pouvant contenir plus de 12 graines de forme, de taille et de couleur très variées à maturité. Le poids moyen de 100 graines varie entre 12 et 100 g selon les variétés. Les feuilles du haricot sont trifoliées et alternes sur une tige rarement ligneuse à la base (Diouf, 1997).

Chez le haricot, la durée de stades de développement varie considérablement. Les graines semées directement dans un sol bien drainé germent au bout de 5 à 7 jours et les plantes fleurissent entre 24 et 42 jours après le semis selon les conditions de l'environnement. La durée de floraison (5 à 30 jours) et de remplissage des graines (23 à 50 jours) de même que la date de maturation des graines (60 à 130 jours) varie considérablement selon les variétés cultivées. La nodulation apparaît 15 à 30 jours après le semis (Adams *et al.*, 1985).

2.3. Importance

La culture du haricot présente deux intérêt : (i) Les gousses 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.

Les graines du haricot constituent un complément nutritionnel aux graines de céréales. De part leur composition, les protéines des graines du haricot sont très proches de celles de la viande de mouton (Quinn, 1999). En plus de leurs hautes qualités gustatives, les gousses et les graines du haricot sont considérées comme une excellente source d'acides aminés, de vitamines et une bonne source d'éléments minéraux (Kentour, 1999).

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

Tableau 2. Valeur nutritive du haricot vert et du niébé en (g/100g) de graine entière

Source : (Stantan, 1970)

Sur le plan agronomique et en tant que légumineuse, le haricot peut s'intégrer dans les 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 la pollution (Canado *et al.*, 2003).

Le haricot commun présente plusieurs avantages :

- Constitue un bon précédent cultural dans les systèmes de cultures, grâce à sa capacité à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec des bactéries du sol appelées Rhizobia (Pochon, 1981). Cette aptitude est responsable de près de la moitié de l'azote fixé annuellement par voie biologique (120 millions de tonnes d'azote) (Davet, 1996). Il favorise également 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 (Mozafar *et al.*, 2000; Jansa *et al.*, 2002).
- Apporte des masses importantes de résidus fermentescibles pouvant activer la vie microbienne du sol (Abdenour, 1982).
- Offre une rupture efficace dans le cycle des maladies et des ravageurs des céréales à pailles.

2.4. Production

Le haricot est cultivé largement en Amérique Latine et Centrale. Le Mexique et le Brésil étant les principaux producteurs où 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 et la Tanzanie où 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).

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

Tableau 3. Principaux pays producteurs de haricot secs en 2006 (FAO.STAT, 2007)

2.5. Situation du haricot en Algérie

Les variétés les plus cultivées en Algérie, pour lesquelles 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 4.

Wilayas	2003/2004			2004/2005			2005/2006		
	Superf (ha)	Prod (qx)	Rdt (qx/ha)	Superf (ha)	Prod (qx)	Rdt (qx/ha)	Superf (ha)	Prod (qx)	Rdt (qx/ha)
Ain Timouchent	767	33200	43,3	900	27000	30,0	860	20800	24,2
Mostaganem	478	23800	50	150	10950	73	840	39980	48
Tipaza	952	37400	39	551	29210	53	658	31864	48
Boumerdès	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

Tableau 4 : Les principales wilayas productrices de haricot en Algérie pour la période 2003-2006 (MADR/DSASI, 2006 in Alkama, 2010).

Le tableau 5 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. Cependant la 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.

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

Tableau 5. La production nationale en haricot (MADR/DSASI, 2006 in Alkama, 2010).

2.6. Contraintes et limites de production

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 le déficit hydrique, la présence de pathogènes comme l'antracnose ou le virus de la mosaïque. Le haricot est plus sensible aux conditions extrêmes du milieu que les céréales (blé, riz) (Vadez, 1996). 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 amené à la sélection des variétés capables de s'adapter aux sols peu fertiles pour satisfaire la demande croissante des populations (Alkama, 2010).

3. Symbiose fixatrice d'azote

3.1. Importance de l'azote dans la nutrition des plantes et intérêt de la fixation d'azote

L'azote est l'un des éléments majeurs de la vie. Il représente un facteur limitant pour la croissance des plantes ; il est le quatrième plus important élément entrant dans la composition des protéines, acides nucléiques et chlorophylle. Il est le constituant principal de l'atmosphère terrestre; néanmoins les plantes n'ont pas la capacité de l'assimiler directement. Les plantes absorbent l'azote dans le sol sous forme de nitrates (NO_3^-)

et d'ammonium (NH_4^+), l'importance relative de chacune de ces formes dépendant de l'espèce végétale et des conditions du milieu (Lazrek Ben-Friha, 2008).

Cependant les légumineuses peuvent acquérir l'azote grâce à la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique. Dans ce cas, elles ne nécessitent pas l'apport d'engrais azotés, à la différence des céréales ou des oléo-protéagineux comme le colza et le tournesol (Lazrek Ben-Friha, 2008).

On estime que la réduction biologique de l'azote atmosphérique N_2 en ammonium fournit environ 65% de l'azote disponible dans la biosphère (Lodwig *et al.*, 2003). La majorité de cet azote est apporté par la symbiose Rhizobium-légumineuses (Zahran, 1999), avec un apport annuel d'azote dans les terres estimé à 200–300 kg N ha⁻¹ (Peoples *et al.*, 1995).

L'azote de la fixation symbiotique a une contribution plus importante pour la croissance des plantes par rapport aux engrais azotés appliqués dans l'agriculture. L'azote fixé de l'atmosphère contribue pour 50 à 60 % du N des légumineuses à graines, 55 à 60 % du N des arbres fixateurs d'azote, 70 à 80 % du N des légumineuses fourragères. Cette réserve d'azote, étant stockée dans les feuilles, les nodules ou bien les autres organes, reste plus longtemps disponible dans les sols comparativement à l'azote minéral fortement **lixévié** par les eaux (Danso, 1995).

3.2. Mécanismes de la fixation symbiotique de l'azote

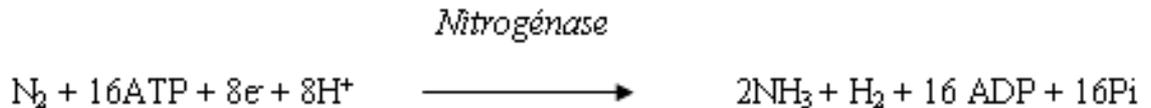
La fixation biologique d'azote atmosphérique est un processus qui permet de produire des substances protéiques à partir de l'azote gazeux présent dans l'atmosphère et l'environnement. C'est le processus de réduction enzymatique de N_2 (azote moléculaire) en NH_3 (azote ammoniacal, ou ammoniac). Cette forme d'azote 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 (Bergersen, 1966).

3.3. Les rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries telluriques à Gram négatif, non sporulées, hétérotrophes, strictement aérobies (Pelmont, 1993), appartenant à la famille des *Rhizobiaceae*, se développant bien dans le sol et sont généralement présentes dans la terre cultivée (Obaton, 1983). Elles sont rencontrées dans le sol sous forme libre ou en bactéroïdes à l'intérieur des nodosités (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Vincent, 1974). La morphologie de la bactérie est très voisine quel que soit l'espèce (Vincent, 1977). Etant mésophiles, leur température optimale de croissance se situe entre 25 et 30°C (Elkan, 1992). La plupart des *Rhizobia* préfèrent la neutralité (Jordan, 1984). D'autres, au contraire, tolèrent des pH acides (Vincent., 1977 ; Bergey's *et al.*, 1984), comme le c'est le cas de *Bradyrhizobium japonicum* qui supporte des pH de l'ordre de 3.5 à 4 (Dommergues et Mangenot, 1970), ou alcalin jusqu'à pH 12 (Kulkarni *et al.*, 2000).

3.4. Etablissement de la symbiose légumineuses-rhizobia

Les bactéries de la famille des rhizobiacées peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation de structures appelées nodosités ou nodules. Par ces nodules, la plante hôte offre un micro habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse. Le processus de la fixation, lui-même, consiste en la réduction de l'azote atmosphérique N_2 sous forme ammoniacale. Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique appelé Nitrogénase d'origine bactérienne (Downie, 2005). Cette association à bénéfice réciproque entre la légumineuse et les bactéries est appelée symbiose fixatrice de l'azote atmosphérique.



3.4.1. Etape de nodulation

La formation d'une nodosité se déroule en une séquence d'événements dont les étapes les plus importantes sont schématisées dans la Figure 1.

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.

A cette étape, un dialogue moléculaire entre le rhizobia et la plante hôte est instauré. 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. 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 (Kondorosi *et al.*, 1991).

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 pecto-cellulosique des cellules végétales ; il croît et se ramifie à l'intérieur du cortex racinaire (Bergersen, 1974).

Genèse du nodule

Les cellules corticales se différencient en méristème. Le 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. (Khan, 2010)

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 (Bergersen, 1966). 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 (O'Brain, 1989).

3.4.2. 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).

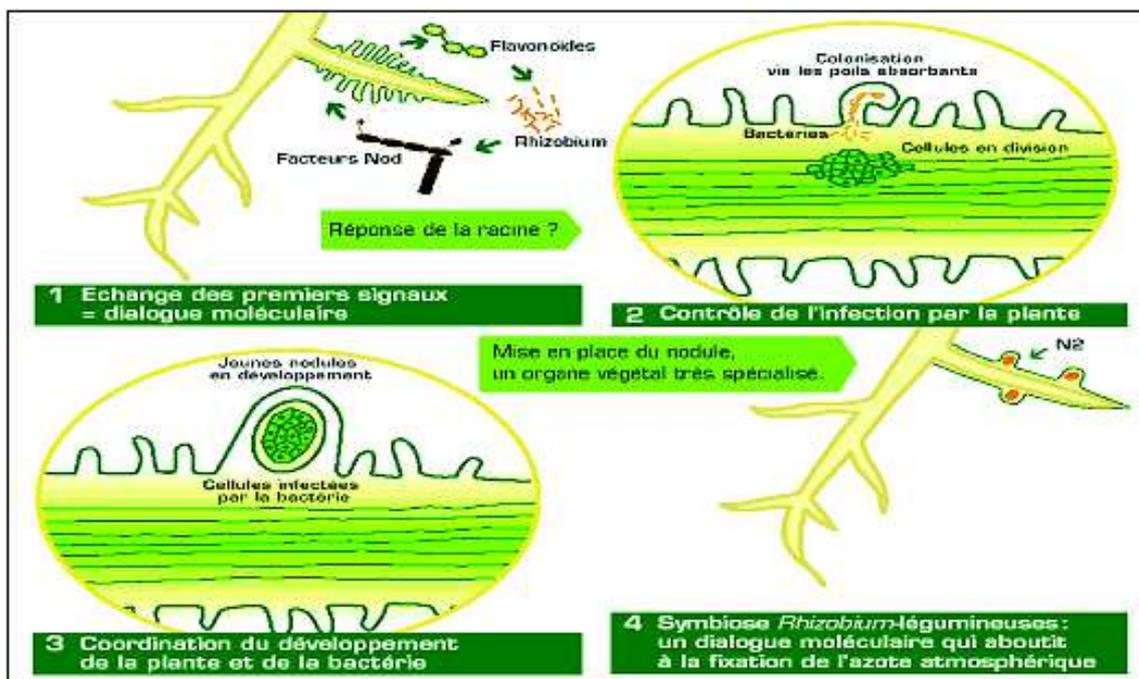


Fig 1. Dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie lors de la mise en place d'une association symbiotique fixatrice d'azote.

Source: <http://www.crdp-toulouse.fr/>

3.5. La symbiose *Phaseolus*-Rhizobia

3.5.1. Propriétés symbiotiques du haricot

Le haricot est souvent considéré comme un fixateur d'azote médiocre, notamment par rapport au Soja (Isoi et Yoshida, 1991 ;Hardarson *et al.*,1993). Mais en revanche, en conditions contrôlées en serre, le haricot fixe l'azote aussi bien que les autres espèces de légumineuses cultivées (Eaglesham, 1989).

La mauvaise qualité de fixation de l'azote 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 l'empêche d'exprimer au mieux son potentiel de fixation symbiotique. Cette inhibition est d'avantage marquée chez le haricot que chez d'autres légumineuses cultivées comme le soja. (ii) D'autre part, la pauvreté de certains sols couplée à la minéralisation rapide de la matière organique pousse le haricot à utiliser l'azote minéral plutôt que sa propre capacité symbiotique (George *et al.*, 1987 ; Abaïdoo *et al.*, 1989).

Cependant, la fixation symbiotique de l'azote nécessite plus de phosphore inorganique que la nutrition azotée minérale (Darrah, 1993). Cette exigence est attribuée au coût énergétique élevé de la FSN. Elle apparaît particulièrement forte chez le haricot, qui est en effet plus affecté par la déficience en phosphore que d'autres légumineuses (Vadez *et al.*, 1996).

Le classement des variétés en fonction du pouvoir fixateur d'azote est remarquablement constant. Toutefois, les quantités d'azote fixé sont très différentes selon les expériences. Au Brésil, Ruschel *et al.* (1982) et Duque *et al.* (1985) ont rapporté que le haricot fixe respectivement entre 25 - 65 kg N/ha et 3 - 32 kg N/ha. Cette quantité varie entre 74 - 91 kg N/ha au Kenya (Ssali et Keya, 1986), 40 - 121 kg N/ha au Canada (Rennie et Kemp, 1983) et 125 kg N/ha en Australie (Hardarson *et al.*, 1993).

3.5.2. Réponse du haricot à l'inoculation avec des souches de *Rhizobium*

La faible nodulation au champ souvent observée chez le haricot vert n'est pas due à une incapacité intrinsèque de la plante à former des nodules car elle peut être améliorée en conditions contrôlées (Graham, 1981). Plusieurs auteurs ont rapporté la réponse positive du haricot à l'inoculation avec des souches de rhizohium efficaces et compétitives (Rennie et Kemp, 1983). Au Cameroun, Salez et Saint Macary (1987) ont observé une amélioration de la nodulation du haricot après inoculation avec des souches appropriées. Cependant il y a eu augmentation du rendement qu'une année sur trois. La quantité et le pourcentage d'azote fixé par la plante varient largement au sein d'une espèce selon le génotype de la plante et les conditions de l'environnement (Graham et Temple, 1984 ; Abaïdoo *et al.*, 1989).

La réponse à l'inoculation dépend surtout du nombre, de l'infectivité et de la compétitivité des populations de rhizobium natifs des sols inoculés (Thies *et al.*, 1991). Dans les zones où l'inoculation a été effectuée avec succès, il est souvent noté l'absence ou la faible présence dans ces sols de rhizobiums infectifs. Dans un sol contenant de nombreuses populations indigènes de rhizohium infectifs sur le haricot, une sélection judicieuse de souches de rhizohium effectives du haricot peut augmenter le rendement au champ (Diouf, 1997).

Les rhizobia indigènes d'un sol donné présentant une grande compétitivité inhibent l'installation de la symbiose avec des souches introduites (Thies *et al.*, 1991). L'inoculation avec des souches de *Rhizobium* non compétitives par rapport aux souches natives n'a pu produire d'effet positif sur la nodulation ; une souche de rhizobium adaptée à des conditions de champ déterminées peut devenir compétitive (Lucrecia *et al.*, 1987).

4. Le phosphore

Le phosphore est l'un des facteurs limitant de la croissance des végétaux ; sa disponibilité dépend des caractéristiques du sol et de sa fraction labile contenue dans le sol.

L'application de phosphore est essentielle pour réduire au minimum la perte de rendement. 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). Cette dernière augmentation est due, d'une part, à l'augmentation de la population mondiale qui devrait atteindre 6 milliards d'habitants d'ici 2020 (Zapat et Roy, 2004). D'autre part, la majeure partie du P appliqué au sol peut être convertie sous formes indisponibles qui ne peuvent pas être facilement utilisées par la plante (Rengel 1999; Hash *et al.* 2002).

A cet effet, la sélection de génotypes ayant un potentiel de rendement élevé, efficaces dans l'utilisation des éléments nutritifs et tolérants 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. Ils occupent à l'heure actuelle, une place importante dans beaucoup de programmes internationaux de sélection (Alkama, 2010).

4.1. Le phosphore dans la plante : forme et fonction

La matière sèche de la plante renferme environ 1% de phosphore. Au niveau de la plante, le P se répartit entre un pool métabolique, situé dans le cytoplasme et les chloroplastes et un pool non métabolique dit de réserve, sous forme inorganique au sein des vacuoles (Etchebest, 2000 ; Assuero *et al.*, 2004).

Ses rôles métaboliques sont :

- Structural, entrant dans la constitution de phospholipides et acides nucléiques (pont stable entre deux chaînes carbonées, estérifié sur un groupe hydroxyle d'une chaîne carbonée) ;
- Energétique par le haut potentiel que le phosphoryle confère à certaines molécules (ATP) ;
- Régulateur des voies métaboliques par sa répartition entre chloroplaste et cytoplasme.

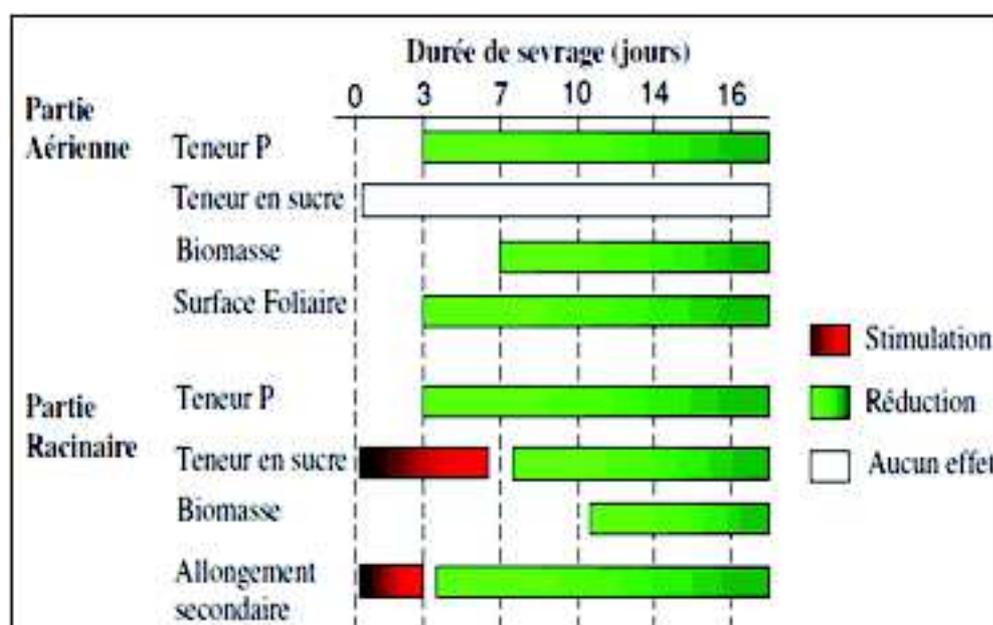


Fig2: Synthèse bibliographique sur les effets d'un sevrage en P sur la physiologie d'un peuplement de maïs durant 16 jours.

(**Source :** Maire, 2005).

Ainsi, 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 feuilles-sources et les organes reproducteurs (Zapata *et al.*, 2004). De même il stimule la croissance des racines et améliore la fixation N₂ 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 et Roy, 2004).

4.2. L'état du phosphore du sol

Le P dans le sol existe sous deux formes principales (minérale et organique) qui se répartissent selon deux phases : phase liquide (le P en solution) ; phase particulaire (le P lié à la phase solide) (Mengel et Kirkby, 2001).

La phase liquide, où les ions sont dissous, correspond à une absence de liaison avec les constituants du sol (Jaillard *et al.*, 1993). Sous la dénomination d'ions phosphates, on désigne deux formes d'ions : H₂PO⁽⁻⁴⁾ et HPO₄⁽²⁻⁾ qui sont en équilibre ; ce dernier est fonction du pH. La concentration du P minéral dissous dans la solution est comprise entre 0.08 et 2.31 mgP/l, soit quelques dizaines à quelques centaines de grammes de phosphore par hectare (Morel *et al.*, 2000).

Le phosphore inorganique est très peu soluble dans le sol du fait de l'existence de liaisons de forte énergie (Jaillard *et al.*, 1993). Sa concentration dans la solution du sol est souvent inférieure à 2-10 μmol.L⁻¹ (Hammaondet *et al.*, 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 et Kirkby, 2001).

Dans les sols calcaires le phosphore est complexé par le carbonate de calcium et de magnésium Mg-P (Ström *et al.*, 2005). Dans les sols acides où le phosphore est alors complexé par les hydroxydes de fer et d'aluminium (Hinsinger, 1998; Ligaba *et al.*, 2004).

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 (Morel *et al.*, 2006).

La prépondérance de la minéralisation de P par rapport à sa mobilisation 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

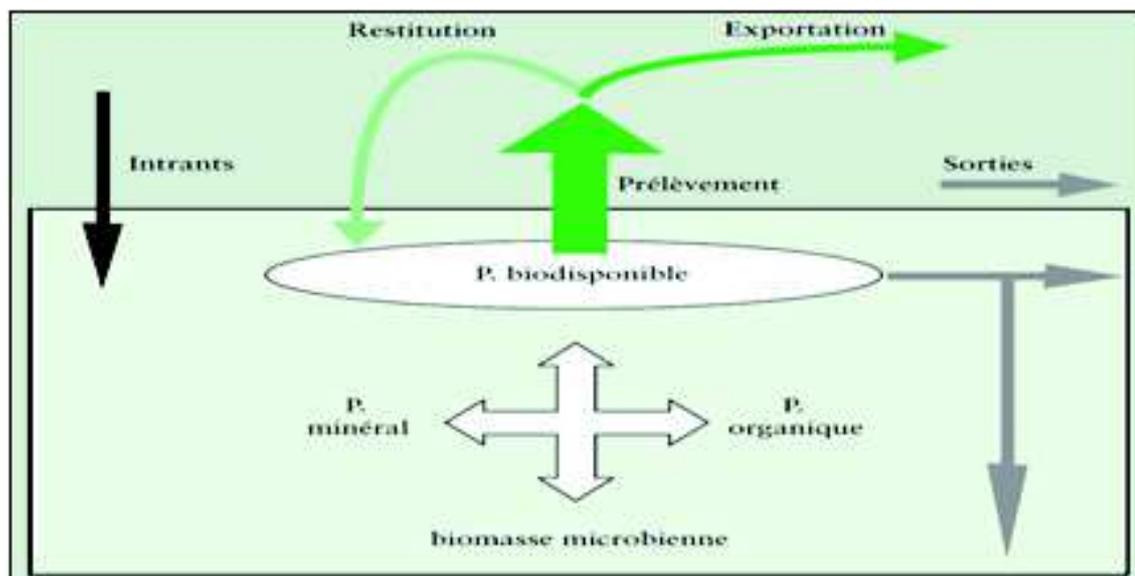


Fig 3. Schéma du cycle simplifié de phosphore dans un écosystème cultivé présentant les flux possibles entre les différents réservoirs de phosphore (Morel *et al.*, 2006).

4.3. La biodisponibilité de phosphore et son prélèvement par la plante

Le phosphore est prélevé sur toute la surface des racines sous forme d'ions phosphates dissous dans la solution du sol, $\text{H}_2\text{PO}_4^{(4-)}$ ou $\text{HPO}_4^{(2-)}$. La concentration en PO_4 à l'intérieur des racines étant supérieure à celle de la solution du sol, l'absorption se réalise contre le gradient électrochimique nécessitant un transport actif (Morel, 2002).

On entend par biodisponibilité du P, la fraction du P susceptible d'être prélevé par la plante. L'évaluation quantitative et mécaniste de cette fraction devient délicate lorsqu'on s'intéresse à la diversité des formes de P ajoutée à la multiplicité, la diversité et l'interactivité des mécanismes impliqués dans la régulation du transfert des ions P dans le système sol-solution- racine (Mollier et Pellerin, 1999). Parmi ces mécanismes, on peut distinguer par ordre d'importance:

- L'abaissement de la concentration des ions P à la surface de la racine suite à son absorption conduisant à la création d'un gradient entre cette surface, la solution du sol et sa phase solide,
- Le déplacement des ions P par diffusion dans la solution du sol suite à l'existence de ce gradient de concentration (Jungk *et al.*, 1993),
- Le flux de convection de l'eau du sol (mass flow) associé à la transpiration des cultures. Ce transport est considéré négligeable compte tenu de la faible concentration du P dans la solution (Jungk et Claasen, 1997),
- Les dissolutions de P précipité par modification du pH et/ou des propriétés rédox et autres réactions de complexation par exsudation de composés organiques,
- La production d'enzymes (phosphatases et phytase) par les racines et les micro-organismes capables de dégrader des composés organiques et libérer ainsi des ions P dans la solution (Mollier et Pellerin, 1999).

De par l'ensemble de ces phénomènes, il est illusoire de pouvoir séparer un pool de P biodisponible d'un pool non disponible par de simples extractions chimiques. Néanmoins la quantité de P biodisponible est caractérisée, à la fois, par la concentration induite en solution et le sens et l'intensité de la variation de cette concentration en fonction des facteurs pédo-climatiques et des variations de ces facteurs imposées par les organismes vivant et notamment la plante. (Schneider *et al.*, 2000)

4.4. Acidification de la rhizosphère sous déficience en P

Le phénomène d'acidification a été identifié dans le cas du maïs du lupin blanc (Hinsinger *et al.*, 2003). Il est particulièrement important chez les légumineuses (Alkama *et al.*, 2009; Kouas *et al.*, 2009 et Alkama, 2010). 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 (Jaillard *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.

4.4.1. Les flux de protons

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).

La fixation symbiotique de l'azote est associée à un efflux de protons (Tang *et al.*, 1998) car les racines des légumineuses absorbent plus de cations que d'anions et ont donc un effet acidifiant marqué sur les sols (Tang *et al.*, 1998). Tang *et al.* (2001) et Alkama (2010) ont étudié en détail cette acidification dans la rhizosphère des légumineuses,

Medicago truncatula et *Phaseolus vulgaris* respectivement, avec la fixation symbiotique d'azote comme seule source d'azote. Ils ont observé que le flux de protons varie largement selon l'espèce végétale considérée, son stade physiologique et son statut symbiotique.

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 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 *et al.*, 1993).

Plusieurs expériences tendent à confirmer ces phénomènes. Ainsi, Tang *et al.* (2004) rapportent que chez le haricot, on observe sous nutrition azotée NO_3^- et sous déficience en phosphore, une alcalinisation moindre que celle observée sur les témoins avec phosphore suffisant.

4.4.2. Flux des anions organique

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 (Khiari et Parent, 2003). Ainsi, certains acides organiques sont tout aussi aptes à libérer le phosphore des oxydes d'alumine ou de fer que des complexes calciques (Kania *et al.*, 2002). 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).

4.5. Conséquence de la déficience en phosphore sur la plante

La déficience en P dans le sol est provoquée par deux causes majeurs : le sol est pauvre avec une faible teneur de P totale, ou le sol est déficient en P car ce dernier se trouve en complexe avec autres 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 (Amijee *et al.*, 1991).

En réponse aux niveaux constamment bas de P disponible dans la rhizosphère, la plante développe des mécanismes morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires fortement spécialisés. Pour acquérir et utiliser le P de l'environnement. Les conséquences finales de ces modifications augmentent la disponibilité de P dans la rhizosphère, ainsi que son prélèvement par la plante (Raghothama, 1999).

4.5.1. Modification morphologique

En général et en conditions de carence en phosphate, plusieurs modifications morphologiques vont permettre à la plante se s'adapter à ces conditions (Raghothama, 1999), parmi ces dernières :

- Augmentation du rapport Partie souterraine-Partie aérienne,
- Changements de la morphologie et de l'architecture de racine ; augmentation de nombre des poils racinaires,

- Prolifération ; élongation de poils de racine,
- Accumulation des colorants d'anthocyanine,
- Formation des protéides racinaires.

4.5.2. Modification physiologique

1. Influence sur la croissance du système racinaire et aérien

Des travaux montrent que la déficience en P affecte les paramètres de croissance chez le haricot. Bien que, la croissance racinaire est beaucoup moins affectée entraînant, en terme de matière sèche, une diminution du rapport parties aérienne /racinaire (Bernal *et al.*, 2005 ; Alkama, 2010). Ainsi, chez le haricot, ce rapport s'abaisse de 5 pour des plantes suffisantes en P à 1,9 en cas de déficience. De même la carence prolongée en P des racines induit la formation de radicaux libres et la modification de la composition de la membrane cytoplasmique en phospholipides (Tang *et al.*, 2001).

2. Influence sur les nodosités

Les nodosités constituent des puits importants pour le P 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 (Alkama, 2010). La carence en P diminue le nombre de nodosités par plante (Mullen *et al.*, 1988) et/ou la masse individuelle des nodosités (Israël, 1987; Gunawardena *et al.*, 1992), ainsi que la masse des bactéroïdes chez le soja (Sa et 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 (Graham et Vance, 2003).

Cependant, la biomasse nodulaire est fortement corrélée à la disponibilité en P pour les plantes (Hellsten et Huss-Danell, 2001) ; elle est fortement réduite sous sa déficience (Gunawardena *et al.*, 1992), notamment au niveau de la taille des nodules (Ribet et Drevon, 1995 ; Tang *et al.*, 2001). Schulze et 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.

4.5.3. Modification biochimique

Les changements dans les processus biochimiques qui se produisant dans les cellules végétales dans les périodes de déficience en phosphore ont été étudié (Plaxton, 1996).

Il a été constaté que des changements des processus biochimiques se produisent au niveau cellulaire à cause de la déficience en phosphore. (Plaxton et Carswell, 1999). L'induction des phosphatases acides sous la déficience en phosphore est une réponse universelle pour les plantes supérieures (Duff *et al.*, 1994) ; d'ailleurs, la production des phosphatases extracellulaires et intracellulaires est considérée comme une partie intégrale de la réponse de la plante à l'insuffisance de P (Goldstein, 1992).

Haut du formulaire Les phosphatases sont présumés pour libérer le phosphore à partir de matériaux organiques (Ueki, 1978 ; Lefebvre *et al.*, 1990 ; Goldstein, 1992 ; Duff *et al.*, 1994). Les niveaux d'ATP et de l'ensemble des nucléotides sont considérablement réduits au cours de stress phosphaté.

Cependant, la limitation de P a également comme conséquence l'activation d'une voie respiratoire alternative (Rychter *et al.*, 1990) provoquant ainsi une diminution du taux de la photosynthèse et de la conductivité stomatique. (Biddinger *et al.*, 1998).

4.5.4. Modification Moléculaire

L'accumulation différentielle des protéines sous la déficience en P est indicative des changements étendus de l'expression de gènes et/ou la synthèse des protéines (Carswell *et al.*, 1997). Ainsi, la synthèse de plusieurs types de protéines, y compris RNases, phosphatases, transporteurs de Pi et PEPCase, augmente sous la déficience en P, en raison de la synthèse de novo des protéines (Hawkesford et Belcher, 1991).

L'identification des gènes exprimés en réponse à l'insuffisance de Pi a augmenté rapidement. Les végétaux et les microorganismes ont développé des mécanismes à plusieurs facettes de réponse pour acquérir le P dans leur environnement (Raghothama *et al.*, 1998). Ces mécanismes de réponse sont beaucoup plus complexes chez la plante que dans le cas des micro-organismes unicellulaires tels que les bactéries et la levure (Raghothama, 1999).

Plus de 100 gènes sont impliqués dans l'adaptation des plantes à la déficience en P. Plusieurs de ces gènes peuvent avoir des rôles spécifiques en permettant aux plantes d'acquérir et d'utiliser le P efficacement, tandis que d'autres peuvent être impliqués en réglant l'expression des gènes induits par la déficience en P (Green, 1994 ; Bariola *et al.*, 1994).



Fig 4. Chronologie hypothétique des gènes impliqués dans la carence de phosphate. (Hammond et al., 2004).

4.6. Fixation symbiotique sous déficience en phosphore

La disponibilité du P dans le sol et sa mobilisation par la plante ont un effet direct sur leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (Barea *et al.*, 1983).

Pereira et Bliss (1993) suggèrent qu'il est possible d'améliorer en même temps la fixation de N₂ et l'efficacité d'utilisation du P. En effet, plusieurs travaux indiquent que l'application de P augmente le contenu en azote dans les graines de légumineuses (Kolawole *et al.*, 2000), comme la luzerne et le soja (Drevon et Hartwing, 1997). 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 nitrogénase 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. La teneur en P des nodosités est d'ailleurs beaucoup plus élevée que celle d'autres organes de la plante (Vadez, 1996).

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).

4.7. Solubilisation du phosphore par les micro-organismes

L'évidence de la solubilisation naturelle de phosphore par certains micro-organismes dits solubilisateurs de P (PSM) remonte à 1903 (Khan *et al.*, 2007).

Les communautés microbiennes colonisent le sol ou la rhizosphère jouent un rôle important dans la croissance et le développement des plantes. De ces communautés, les bactéries solubilisatrices de phosphore (PSB) jouent un rôle fondamental dans le cycle biogéochimique de P en transformant le phosphore insoluble en formes solubles par l'acidification, la chélation, les réactions d'échange et la formation de polymères de substances (Khan *et al.*, 2010) .

Parmi les bactéries qui solubilisent le phosphore dans le sol, les rhizobia qui sont connues exclusivement pour leur capacité à former une symbiose avec les légumineuses, elles peuvent également faciliter la croissance des plantes en synthétisant des régulateurs de croissance et en solubilisant le phosphore insoluble (Zaidi *et al.*, 2003). En outre, l'inoculation du sol avec les bactéries de rhizobium devrait être considérée non seulement pour le potentiel de fixation du N₂, mais aussi pour sa capacité à solubiliser le P (Zaidi *et al.*, 2009).

Gull *et al.* (2004) ont rapporté que la croissance de pois chiche, les concentrations de P et N, le poids sec des nodules et l'activité nitrogénase ont été significativement augmenté à cause l'inoculation par des bactéries solubilisatrices de phosphore.

L'utilisation des bactéries solubilisatrices de phosphore dans les pratiques agronomiques aide non seulement à excentrer le coût élevé d'engrais phosphatés mais à mobiliser également le phosphore insoluble dans les engrais et les sols (Chen *et al.*, 2008 ; Poonguzhali *et al.*, 2008).

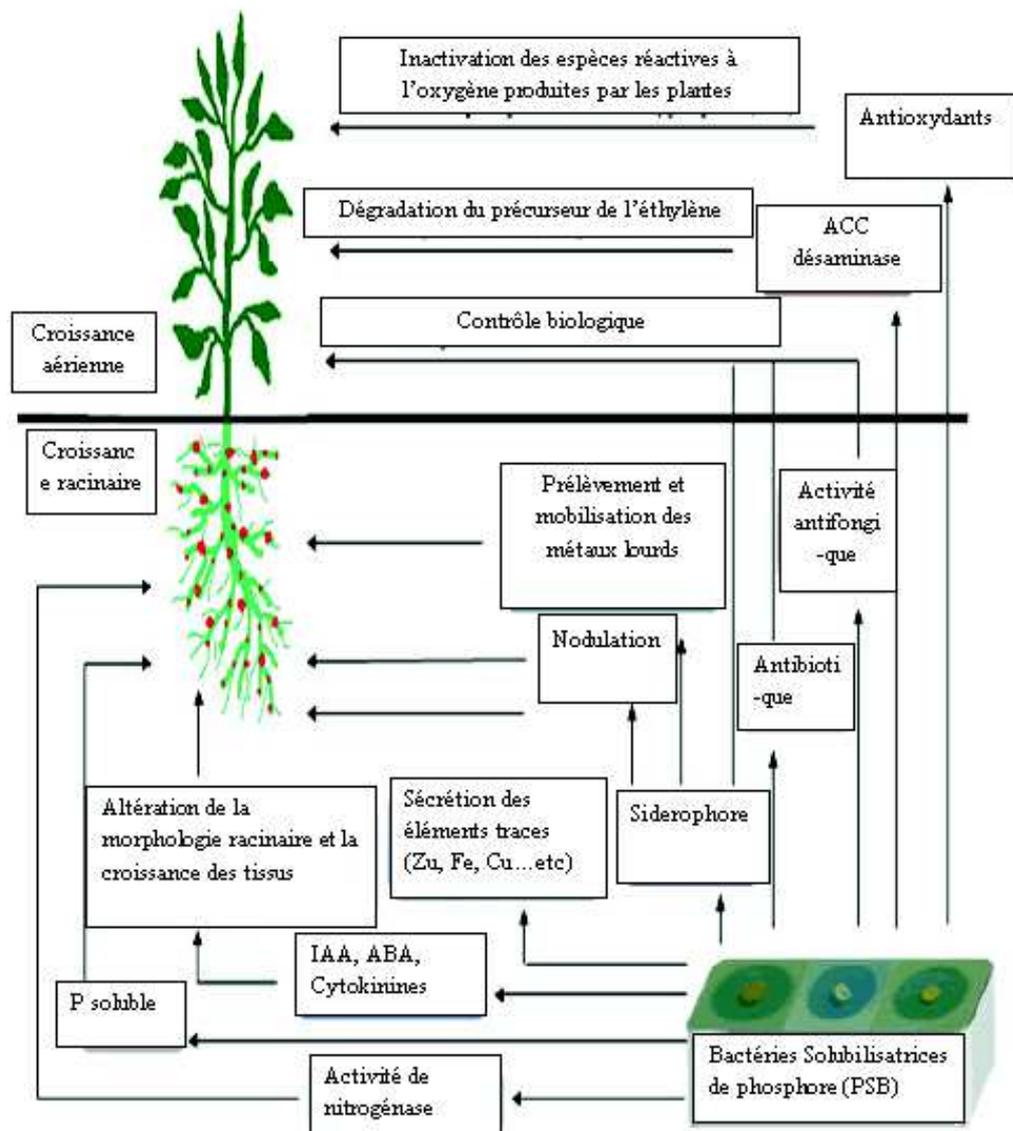


Fig 5. Le mécanisme développé par les bactéries solubilisatrices de phosphore pour contrôler la croissance des plantes légumineuses.

Source : Khan et al., 2010

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

1.1. Matériel végétal

Une variété locale de haricot nommée El Djadida, issue de la collection de graines du centre national de contrôle et de certification (CNCC), ainsi que cinq lignées recombinantes (RILs) (115, 83, 75, 104 et 07) de haricot (*Phaseolus vulgaris*) ont été étudiées. Les lignées recombinantes sont contrastantes pour la FSN (Fixation symbiotique de l'azote) et l'EUP (Efficacité d'utilisation de phosphore).

Couleur de la graine	Noire	Noire	Crème	Crème	Crème	Crème
Forme de la graine	réniforme	réniforme	réniforme	réniforme	réniforme	réniforme
Texture tégumentaires	lisse	lisse	rugueuse	Lisse-rugueuse	lisse	rugueuse
Longueur de la graine (cm)	1,5	1	1,1	0,8	1	1,1
Largeur de la graine (cm)	0,9	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5
Poids de 1000 graine (g)	324	305	296	275	256	242

Tableau 6. Principales caractéristiques morphologiques des lignées de haricot utilisées

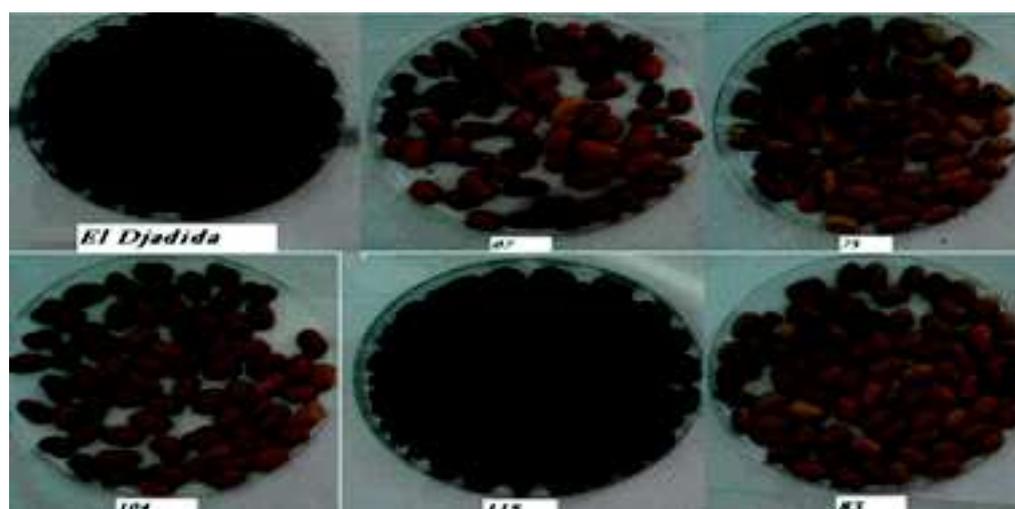


Fig 6. Lignées contrastantes (RILs) du haricot

1.2. Le sol

Le sol utilisé pour cette étude provient d'une pépinière implantée dans la région de Staoueli. Il a été choisi pour sa déficience en phosphore.

Les analyses physico-chimiques et granulométriques ont été effectuées au département de Phytotechnie ; elles sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Analyse	Eléments	Résultats	Méthodes
Granulométries	Sable	75,25%	Pipette de Robinson
	Limon	19,75%	
	Argile	5%	
Chimiques	pH eau	7,6	pH mètre
	pH KCl	7,2	
	Calcaire totale	1,3	Calcimètre de Bernard
	C% Totale	1,6%	Walkey Black
	N% Total	1,8 %	Kjeldhal
	P assimilable	18 mg.kg	Joret Hebert
	Conductivité électrique	3 mmohs/cm	Conductimètre

Tableau 7. Analyses granulométriques et chimiques du sol.

1.3. Souches bactériennes

Deux souches rhizobiennes sont choisies. Une souche de référence CIAT 899 correspondant à *Rhizobium tropici*, issue de la collection de INRA-Sup-Agro de Montpellier ainsi qu'une souche locale isolée à partir d'un piégeage sur un sol prélevé à El Kala, dénommée KA.

Milieux de culture

Pour l'isolement et la culture des souches, le milieu Y.M.A est utilisé :

Agar (Y.M.A) (Vincent, 1970).

Mannitol : 10g Extrait de levure : 0.4g

K₂HPO₄: 0.5g NaCl: 0.1g

MgSO₄: 0.2g Agar agar: 15g

Le milieu est ajusté à pH 6.9 puis autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Pour la réalisation de nos pré-cultures, le milieu Yeast- Mannitol- Broth (Y.M.B) a été utilisé et dont la composition est semblable au Y.M.A précédemment décrit mais sans *Agar Agar*.

2. Etude microbiologique

2.1. Piégeage

2.1.1. Echantillonnage et collecte du sol

Dans le but d'avoir une collection comportant un maximum de diversité de souches nodulant le haricot, cinq échantillons de sol ont été collectés au niveau de cinq wilayas de l'est algérien. Chaque sol est caractérisé par un précédent cultural. Les différentes stations d'échantillonnage et les précédents culturaux correspondants à chaque type de sol sont représentés dans le tableau 8.

El Kala	Sabaa 1	Arachide
	Sabaa 2	Arachide
Skikda	Sidi Mezghich 1	Fève
	Sidi Mezghich 2	Pois
Sétif	Baida Bordj	Haricot
	Ain Oulmen	Haricot
	Ain Lahdjar	Haricot
Djelfa	Taaédmit	Luzerne
Alger	Staoueli	/

Tableau 8. Différentes zones d'échantillonnages des sols de piégeage

2.1.2. Evaluation du potentiel nodulant des sols

Des pots, de 25 cm de hauteur et de 15 cm de diamètre, sont remplis des sols suscités et dans lesquels des graines de haricot (variété El Djadida) ont été semées avec trois répétitions par sol. Les plants sont déterrés deux mois après le semi. Les nodules racinaires sont récoltés, rincés abondamment à l'eau claire puis placés dans du glycérol à 20%.



Fig 7 : Vue d'ensemble de l'essai de piégeage.

2.2. Isolement des souches de rhizobium

2.2.1. Prélèvement et désinfection des nodules

Les nodosités racinaires récoltées sont immergées dans de l'hypochlorite de sodium pendant 10 min puis dans de l'éthanol (96°) durant 5 min suivis de dix rinçages successifs à l'eau distillée autoclavée.



Fig 8. Nodules obtenus à partir du sol d'El Kala (précédent cultural : Arachide)

2.2.2. Isolement des souches

Les nodules ainsi traités sont disséqués sur des boites de Petri contenant du Y.M.A. Une partie de la zone centrale rouge indiquant la présence de leghémoglobine est prélevée et déposée dans une boîte de Petri contenant un milieu Y.M.A gélosé. A partir du dépôt, des stries d'épuisement sont effectuées sur le milieu gélosé. Toutes les boîtes sont mises en incubation pendant 3 jours à 30°C (Vincent, 1970).

La nomenclature des isolats tient compte du site de prélèvement de l'échantillon de sol, du précédent cultural.

K : El Kala.

A : précédent cultural Arachide.

2.2.3. Vérification de la pureté des souches

2.2.3.1. Vérification de la pureté des souches par repiquage et microscopie

Des repiquages successifs sur milieu YMA-BTB ont été pratiqués. Pour cela des colonies isolées sont ensemencées et incubées à 28°C pendant 48 à 72 h ; l'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de cultures pures.

2.2.3.2. Coloration de Gram

Un contrôle supplémentaire par la coloration de Gram permet de différencier sur la base de la composition de la paroi cellulaire entre les bactéries qui sont à Gram négatif (comme les rhizobia) et les autres bactéries à Gram positif.

Les étapes du protocole sont les suivantes : les cellules sont fixées à la flamme. Ensuite le violet de Gentiane est ajouté (1-2 Mn). Les bactéries se colorent alors en violet. Le colorant par la suite est fixé à l'aide du lugol (iodure de potassium) (2* 30 sec). La préparation est

abondamment rincée à l'eau distillée afin d'évacuer l'excès de colorant. La préparation est décolorée par l'alcool absolu et rincée à nouveau abondamment à l'eau distillée. Puis, une deuxième coloration avec la fuschine ou safranine est réalisée. De nouveau la préparation est rincée à l'eau et séchée à température ambiante. L'observation microscopique au grossissement X1000 avec huile à immersion permet de voir si les cellules sont colorées en violet (Gram-positif) ou bien en rose (Gram négatif).

2.2.3.3 Test au KOH Lanta (Shushan *et al.*, 1981)

Le test au KOH est une technique simple, rapide et viable pour confirmer le gram de la souche étudiée. Il suffit de mettre en contact (sur une lame pour microscope) une colonie isolée avec une goutte d'une solution de KOH 3 %. Quelques secondes après, à l'aide d'une pipette pasteur, le mélange est tiré vers le haut ; si un filament se forme entre la pipette et la lame, alors la colonie isolée est constituée de bactéries à gram négatif, si rien n'est entraîné par la pipette, la colonie est constituée de bactéries à gram positif.

2.2.3.4. Caractérisation moléculaire de la souches bactérienne KA

- Séquençage de l'ADNr16S (Gène 16S rARN, 800bp)

La technique utilisée à identifier de souches isolées dont l'identification par des moyens classiques ne satisfait pas (croissance lente, activités biochimiques faibles ou douteuses, agglutination incertaine etc...).

Pour cela, il est intéressant de compléter les résultats obtenus par la biologie moléculaire. Le séquençage des souches (KA) a été faite dans le laboratoire de Mme MILLINGTON par M.KADI Farid.

- Principe de la méthode utilisée:
 - Extraction de l'ADN,
 - Amplification du gène 16S rARN,
 - Séquençage d'une partie du produit d'amplification (800bp),
 - Comparaison de la séquence identifiée à toutes les séquences bactériennes connues, enregistrées dans la banque de données (EMBL, GenBank),
 - Coordination de la propre séquence à un genre/une espèce enregistrée.
- Traitement de données

Pour l'exploitation des données de la séquence d'ADN de la souche KA, cette dernière est tout d'abord corrigée grâce certains logiciels (ClustralX et Chromas-Pro) et comparée avec d'autres séquences stockées dans la base de données GèneBank. Cette recherche est dite par « BLAST ». Cependant, le résultat est donné sous forme d'une liste des séquences les plus proches de celle que l'on a soumis (KA).

Enfin, nous avons utilisé le logiciel PAUP et MLEGA pour construire l'arbre phylogénétique (Dendrogramme) afin d'identifier le genre et l'espèce de la souche étudiée (KA).

2.3. Authentification des isolats

Le test d'authentification consiste à vérifier l'aptitude des souches à noduler lorsqu'ils sont inoculés à la plante hôte (Vincent, 1970). Dans notre cas, nous avons utilisé des plantules de haricot (*Phaseolus vulgaris*) variété El Djadida.

Les graines de haricot sont préalablement désinfectées dans de l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 30 secondes suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée stérile. Les graines ainsi traitées sont mises à germer sur une eau gélosée à 8%.

Les plantules âgées de 48^h sont transférées aseptiquement dans des tubes Gibson contenant du milieu Jensen incliné additionné de milieu Jensen liquide dilué au quart. L'inoculation des plantules est réalisée avec 1ml de cultures bactériennes âgées de 72 h préalablement ensemencées dans du Y.M.B et mises à incuber à 28°C. Les tubes ainsi préparés sont placés dans une chambre de culture à 28°C.

Un test de nodulation sur support sol est également réalisé. Les graines désinfectées sont enrobées de tourbe préalablement inoculée avec une culture bactérienne âgée de 72h dans de l'Y.M.B ; elles sont ensuite semées dans des pots remplis de sol stérilisé.

2.4. Screening (Solubilisation du phosphore)

2.4.1. La capacité des isolats à solubiliser le P inorganique (milieu PVK et NBRIP)

Dans le but d'évaluer la capacité des souches isolées à solubiliser *in-vitro* le phosphate tricalcique, deux milieux solides (PVK :Pikovskaya et NBRIP : National Botanical Research Institute's phosphate growth medium) sont utilisés et contenant le phosphate tricalcique comme seul source de phosphore. La composition de chacun des deux milieux est mentionnée dans le tableau 9.

Le pH est ajusté à pH 7 avant la stérilisation à l'autoclave durant 30 min à 120°C (Alikhani *et al.*, 2006). Chaque boîte de Petri est ensemencée en touche avec trois répétitions par souche et par milieu avant d'être mises à incuber à 28°C (Shekhar-Nautiyal, 1999).

Agar agar	15	15
Glucose	10	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5	5
MgSO ₄	0,1	0,25
Kcl	0,2	0,2
Extrait de levure	0,5	
MnSO ₄	0,002	
FeSO ₄	0,002	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	0,1
NaCl	0,2	
MgCl ₂	1	5

Tableau 9. Composition chimique de milieux PVK et NBRIP

Source : Shekhar-Nautiyal, 1999

2.4.2. Indice de solubilisation du phosphore

Le diamètre de la zone claire (halo) entourant la croissance bactérienne aussi bien que le diamètre de la colonie ont été mesurés après 3, 6, 9, 12 et 15 jours et l'indice de solubilisation a été calculé par le rapport du diamètre du halo/diamètre de la colonie (Xie, 2009).

3. Etude agronomique

3.1. Site expérimental

L'expérimentation a été réalisée au niveau de la station expérimentale de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), dans une serre en verre orientée vers le Nord-Sud dont les coordonnées géographiques sont : latitude 36°43'Nord, longitude 30° 8' et une altitude de 50 m, elle est caractérisée par un étage bioclimatique subhumide avec un hiver doux. L'essai est mené dans des pots contenant 10 Kg de sol préalablement tamisé et thyndallisé à 100°C durant 4 jours.

3.2. Traitement phosphaté

La dose de phosphate apportée a été calculée suivant la référence d'Alkama (2010). La norme utilisée étant de 50 kg/ha de Super Triple Phosphate (TPS) à 46%, ajustée aux conditions de notre expérimentation. Le fertilisant utilisé est le phosphate tricalcique (PTC) six fois hydraté ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à la place du TPS. La dose de phosphate tricalcique est apportée avant le semis par mélange avec l'ensemble du sol contenu dans chaque pot.

3.3. Inoculation

3.3.1. Préparation d'inoculum

Une préculture de chacune des deux souches (CIAT 899 et KA) âgée de 72h est utilisée pour ensemer des erlens de 500 ml contenant 90 ml d'YMB. Les erlens sont ensuite mis à incuber durant 72h à 28°C sous agitation rotative de 200 tours/mn. Le nombre de cellules bactériennes par un ml de l'inoculum est déterminé par la méthode du nombre le plus probable. Une série de dilution décimale est réalisée, de chaque dilution un volume de 0,1ml est prélevé pour ensemer des boîtes de Petri contenant du YMA. Ainsi la concentration de l'inoculum est de $61 \cdot 10^8$ cellules bactériennes/ml correspondant à une DO de 620 nm.



Fig 9. Détermination du nombre de cellules bactériennes viables présentes dans l'inoculum par la méthode du Nombre le Plus Probable.

3.3.2-Apport de l'inoculum

Les essais d'inoculation sont basés sur la méthode de NIFTAL proposé par FAO/GRET (Beau, 1983). Le jour du semis, les semences à inoculer sont préalablement trempées dans une solution de miel. Puis, elles sont enrobées uniformément dans de la tourbe inoculée. Elles sont ensuite mises à sécher à l'air libre à l'abri de la lumière solaire directe avant d'être semées.

3.4. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental adopté est une randomisation totale avec trois répétitions seulement ; la quantité du sol disponible et la superficie de la serre ne permettaient pas d'envisager plus de répétitions. Pour répondre aux objectifs signalés à l'introduction, notre dispositif expérimental comporte trois facteurs :

Facteur 1 : Représente l'effet de la sélection variétale, avec six modalités qui sont les variétés de haricot étudiées (115, 104, 83, 75, 07 et EL Djadida),

Facteur 2 : Représente l'effet de l'inoculation, avec deux modalités représentées par les deux souches de rhizobium (KA et la CIAT 899),

Facteur 3 : Représente l'effet du sol avec deux modalités de sol, un sol déficient (non fertilisé) et un autre efficient (fertilisé).

3.5. Semis

Les graines de haricot inoculées sont semées à raison de trois graines par pot à une profondeur de 3 cm. Après la levée (plant de 10 à 15 cm de hauteur), nous avons effectué un éclaircissage en gardant le plant le plus rigoureux.

3.6. Irrigation

L'irrigation a été effectuée manuellement à l'aide d'un arrosoir. Les plantes reçoivent quotidiennement une quantité moyenne d'eau de 100 ml avant la levée, nous avons augmenté cette dernière à 250 ml après le stade de levée.



Fig 10. Vue générale de l'essai

3.7. Caractères étudiés

3.7.1. Préparation des échantillons

Au stade plein floraison, les plantes sont récoltées, le sol rhizosphérique (1 à 4mm près de racine, est séparé du bulk : sol non rhizosphérique) (PAN *et al.*, 2008). La partie aérienne, les racines et les nodules sont séparés après rinçage à l'eau. Les échantillons prélevés sont séchés à l'étuve pendant 48 heures à 65°C.

3.7.2. Analyse des échantillons

Les analyses effectuées sur le végétal et le sol rhizosphérique sont les suivantes :

3.7.2.1. Sur le végétal

- Poids sec des nodules,
- Poids sec de la partie aérienne,
- Poids sec des racines,
- Surface foliaire (SF) (Alem *et al.*, 2002)
- Hauteur des tiges : du collet au bourgeon terminal
- La concentration en phosphore dans la plante : la concentration en phosphore total dans la partie aérienne et les racines est déterminé par dosage colorimétrique par la méthode du vert de malachit (Mo-Met-uvv, 2007), après une attaque par l'acide nitrique (Pansu et Gautheyrou, 1998),
- Activité Réductrice d'Acétylène (ARA) : ce paramètre est utilisé pour l'estimation de la fixation symbiotique directement dans le pot par la méthode « in situ » mise au point par Balandreau et Dommergues (1970),
- L'EUP (Phosphorus Utilization Efficiency): représente l'efficacité d'utilisation de phosphore par la plante, c'est le rapport entre le poids sec de toute la plante et la concentration en phosphore dans la plante (Gerloff et Gabelman, 1983),
- Le RPAE (The Phosphorus Absorption Efficiency by Root): représente l'efficacité des racines à prélever le phosphore de sol, c'est le rapport entre la concentration en phosphore dans la plante et le poids sec des racines (Gerloff et Gabelman, 1983).

3.7.2.2. Sur le sol rhizosphérique

- Le pH : le pH eau est déterminé avec un rapport sol/eau distillé ; 1:5
- Le phosphore assimilable : le dosage de phosphore assimilable dans le sol est réalisé par la méthode Joret Hebert
- Le calcaire total : le taux de calcaire total est mesuré par le calcimètre de Bernard.

3.8. Analyses statistiques

Toutes les données ont été statistiquement analysées par le logiciel de SPSS (ANOVA) et STATISTICA (ACP et AHC), la différence entre les couples symbiotiques et le traitement phosphaté est déterminée par ANOVA à deux facteurs.

La composante des paramètres (valeur F) est obtenue par une analyse des composantes principales des différentes valeurs standardisées des paramètres à P- (déficiência en P) et leurs valeurs relatives à P+ (suffisance en P), la valeur F est représenté par la formules :

$$F = \sum_{k=1}^{n=12} PC_k * PR_k$$

Avec : PC_k représente la composante principale de chaque couple symbiotique ; PR_k représente le poids relatif de chaque couple symbiotique.

Enfin la classification des différents couples symbiotiques en fonction des paramètres étudiés et en fonction de la valeur F est faite par une analyse de classification hiérarchique selon la méthode de Ward.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Isolement et caractérisation des souches rhizobiennes solubilisatrices du phosphore

1.1. Evaluation de pouvoir nodulant des sols

Toutes les plantes sont déterrées au stade floraison

A l'exception des sols de Skikda et de Sétif (Ain Oulmen et Ain Lahdjar), tous les sols sont capables de noduler le haricot. (Figure 11)

Les résultats obtenus indiquent une plasticité de nodulation chez le haricot. Il peut être nodulé par les souches autochtones des différents sols de piégeage étudiés. (Figure 11)

La localisation des nodosités sur le système racinaire de la plante a montré également une grande variabilité. Les nodules sont du type déterminé et de petite taille (inférieur à 0,5cm), de taille moyenne (1cm-2cm) ou de grande taille (>2cm) (Lee et Larue, 1992).



Fig 11. Les différents nodules obtenus sur des racines de haricot (*Phaseolus vulgaris*) dans les différents sols avec différents précédents culturaux (PC)

1.2. Caractéristiques morphologiques et microscopiques des isolats

1.2.1. Caractéristiques morphologiques

16 souches ont été isolées des nodules de haricot, Les colonies obtenues après purification des différents isolats sur milieu YEM-BTB présentent les mêmes caractéristiques macroscopiques ; elles apparaissent homogènes le long des stries. Elles sont circulaires de 2 à 3 mm de diamètre 72H après ensemencement, de couleur blanchâtre, acidifiantes, compactes pour la plupart, opaques, de surface lisse et visqueuse à contour régulier et marquées par une très forte viscosité qui augmente avec le temps d'incubation surtout chez les isolats KH, KA, STC, DJBM, DJBG, SHG et la SHM (Figure 12). Cette viscosité est due à une production massive d'exo-poly-saccharide (Zahran, 1994). Ces caractéristiques morphologiques observées sont semblables à ceux des rhizobiums décrits par de Lajudie *et al.* (1994).



Fig 12. Aspect morphologique des isolats après 72h d'incubation à 28°C.

1.2.2. Caractérisation microscopique

La coloration de Gram a mis en évidence des bactéries de forme bacilles à cocco bacilles de couleur rose indiquant un gram négatif (Figure 13). Le test KOH Lanta (Shushan *et al.*, 1981) a confirmé l'observation au microscope (Figure 14).



Fig 13 Caractérisation des isolats de la souche KA après coloration de Gram (grossissement *1000)

Les caractères morphologiques observés sont en rapport avec ceux décrits pour le genre rhizobia (Vincent, 1970 ; Dommergues et Mangenot, 1970 ; Jordan, 1984 et Rome *et al.*, 1996).

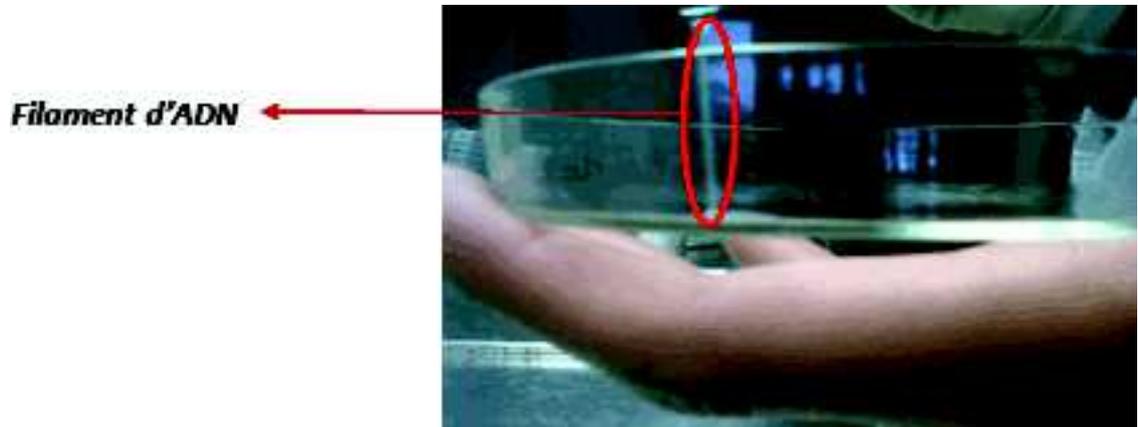


Fig 14 Caractérisation des isolats KA d'après le test de KOH

1.2.3. Caractérisation moléculaire

· Séquençage partiel de l'ADNr16S

Cette analyse nous a permis de rapprocher nos isolats du genre *Rhizobium* et *Agrobacterium* sur la base de la comparaison des séquences par Blast

La séquence corrigée de la souche KA, ainsi que la liste d'alignement de cette dernière avec les différentes souches de référence sont représentées dans la planche A.

Sequencing: 612 letters

>KA

```

CCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGAGGTGAGTAACGCGTGGGAACATACCCCTTCTGCGGAATAGTCCGGGA
AACTGGAATTAATACCCATACGCCCTACGGGGAAAGATTATCGGGGAAGGATTGCCCGGTTGGATTAG
CTAGTTGGTGGGTAAGGCCTACCAAGCGCAGATCCATAGCTGCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC
AGCCATGCCGCGTGAAGGCTTACGGGTTGTAAGCTCTTCCCGATGAAGATAATGACGGTAGTC
GGAAAAAGAAAGCCCGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTCGGAATT
ACTGGGCGTAAAGCGCAGTAGGGGATATTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGCGGAACTGCC
TTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATT
CGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTTACTGTCCATTACTGACGCTGAGG
    
```

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
U93329.1	Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone GASP-MA2W3_E11 16S ribosomal RNA	1109	1104	100%	0.0	100%
AF212982.1	<i>Rhizobium</i> sp. Ph-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1104	100%	0.0	100%
U68522.1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. X11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1099	100%	0.0	99%
U51456.1	<i>Rhizobium tibeticum</i> partial 16S rRNA gene, strain SLD2	1105	1095	100%	0.0	99%
U51454.1	<i>Rhizobium tibeticum</i> partial 16S rRNA gene, strain 246-1	1105	1095	100%	0.0	99%
U629120.1	<i>Rhizobium</i> sp. SEMSA 6438 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
U630113.1	<i>Rhizobium</i> sp. SEMSA 6435 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
U630118.1	<i>Rhizobium</i> sp. SEMSA 6437 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
U529873.1	<i>Rhizobium</i> sp. OR191 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
U529872.1	<i>Rhizobium</i> sp. T1155 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
U529868.1	<i>Rhizobium</i> sp. T1470 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
U529867.1	<i>Rhizobium</i> sp. T1473 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
U529866.1	<i>Rhizobium</i> sp. T136 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
AF092117.1	<i>Rhizobium</i> sp. Sulf-430 partial 16S rRNA gene, isolate Sulf-430	1105	1095	100%	0.0	99%
U512650.1	<i>Rhizobium</i> eoti strain CCB4U 85027 16S ribosomal RNA gene, partial se	1105	1095	100%	0.0	99%
AF212983.1	<i>Rhizobium</i> sp. UMR2372 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
AF212987.1	<i>Rhizobium</i> sp. UMR2370 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
U628648.1	<i>Rhizobium</i> sp. H86C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1105	1095	100%	0.0	99%
U93211.1	<i>R. leguminosarum</i> 16S ribosomal RNA gene	1105	1095	100%	0.0	99%
U9528272.1	<i>Rhizobium</i> sp. XXV 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1102	1092	99%	0.0	99%
U9423840.1	<i>Rhizobium tibeticum</i> strain R3041 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1100	1090	100%	0.0	99%
AB458522.1	<i>Rhizobium</i> sp. Cg-A3 gene for 16S rRNA, partial sequence	1100	1090	100%	0.0	99%
U5289300.1	Uncultured soil bacterium clone 2_D5 16S ribosomal RNA gene, partial	1100	1090	100%	0.0	99%
U5256404.1	<i>Rhizobium tibeticum</i> strain CCB4U 85039 16S ribosomal RNA gene, pa	1100	1090	100%	0.0	99%
AF212982.1	<i>Rhizobium</i> sp. partial 16S rRNA gene, strain r020	1100	1090	100%	0.0	99%
F117501.1	Uncultured bacterium clone xbrh_46 16S ribosomal RNA gene, partial i	1098	1086	100%	0.0	99%
AF212981.1	<i>Rhizobium</i> sp. SH2742 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1088	1085	100%	0.0	99%
U6286726.1	<i>Rhizobium</i> sp. AC100 gene for 16S ribosomal RNA	1088	1083	100%	0.0	99%
U6292398.1	<i>Rhizobium</i> sp. B09(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1081	1081	98%	0.0	99%
Z112173.1	Uncultured bacterium clone ncd1282e2c1 16S ribosomal RNA gene, p	1077	1077	100%	0.0	99%
Z112178.1	Uncultured bacterium clone ncd1281h01c1 16S ribosomal RNA gene, p	1077	1077	100%	0.0	99%
U517985.1	<i>Rhizobium pisi</i> partial 16S rRNA gene, strain GR18	1077	1077	100%	0.0	99%
U517952.1	Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone GASP-K8251_E08 16S ribosomal RNA	1077	1077	98%	0.0	99%
U517950.1	Bacterium PK7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1077	1077	100%	0.0	99%
U6292146.1	<i>Rhizobium leguminosarum</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1077	1077	100%	0.0	99%
U5082176.1	<i>Rhizobium</i> sp. 3-177 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1074	1074	99%	0.0	99%
U6292526.1	Uncultured bacterium clone nbw785f07c1 16S ribosomal RNA gene, pa	1072	1072	100%	0.0	99%
AF272623.1	<i>Rhizobium</i> sp. AC86a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1072	1072	100%	0.0	99%
U6292636.1	<i>Rhizobium</i> sp. T141 genes for 16S rRNA and 16S-23S ribosomal RNA II	1068	1068	100%	0.0	99%
U60812128.1	<i>Rhizobium</i> sp. ZBU4 949 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1058	1058	100%	0.0	99%
AF117826.1	<i>Rhizobium eoti</i> strain PRF54 16S ribosomal RNA gene, complete sequ	1058	1058	100%	0.0	99%
AF117823.1	<i>Rhizobium eoti</i> strain PRF76 16S ribosomal RNA gene, complete sequ	1058	1058	100%	0.0	99%
AF117820.1	<i>Rhizobium eoti</i> strain PRF230 16S ribosomal RNA gene, complete sequ	1058	1058	100%	0.0	99%
AF117828.1	<i>Rhizobium eoti</i> strain PRF51 16S ribosomal RNA gene, complete sequ	1058	1058	100%	0.0	99%

Planche A : Résultats de séquençage moléculaire de la souche KA et son alignement avec les souches de référence les plus proches.

La comparaison de la séquence de la souche KA à celles présentes sur les banques de donnée et son alignement à ces différentes séquences par le programme BLAST, a révélé la présence de 44 séquences (Planche A) significativement similaires à la notre. La presque totalité de ces séquences appartient aux génomes d'espèces du genre *Rhizobium*. Cinq séquences sont celles d'espèces bactériennes non identifiées.

L'analyse plus fine du tableau des résultats de l'alignement montre (Planche A) que le query coverage, est dans tous les cas égale à 100. Cette valeur indique la proportion de notre séquence qui est alignée à celle de la base de données. Comparée aux différentes séquences, celle étudiée présente entre 98 et 100% de similitude avec les séquences appartenant aux génomes d'espèces de *Rhizobium*.

Par ailleurs la totalité des valeurs du E-value sont égale à 0 ; ceci indique qu'il n'existe aucune chance que l'alignement obtenu ne soit du au fait du hasard. En effet l'E-value indique le nombre d'alignements attendus par hasard ayant un score supérieur au score

obtenu dans la banque considérée. Dans le cas analysé cette valeur est nulle ; ainsi la similitude observée entre la séquence analysée et celles des espèces appartenant au genre *Rhizobium* n'est certainement pas due au hasard. Les valeurs du score élevées indique une relation biologique des séquences, effectivement il s'agit dans tous les cas d'ADN codant les ARN ribosomale.

1.3. Effet de l'isolat de KA sur la solubilisation du phosphate tricalcique (PTC) sur le milieu solide

L'aptitude des isolats à solubiliser le phosphate tricalcique a été testée sur deux milieux solides : PVK et NBRIP

Parmi les 16 souches isolées, seule la souche KA présente un pouvoir de solubilisation de phosphate tricalcique sur les deux milieux de screening PVK et NBRIP.

La souche KA a formé des zones claires (halo de solubilisation) autour des colonies sur les deux milieux d'agar PVK et NBRIP après 3 jours d'incubation et qui ont graduellement augmenté jusqu'au quinzième jour. L'apparition de cette zone claire indique la dissolution du phosphate tricalcique en phosphate mono-calciq (PMC) du à la sécrétion d'acide organique (Shekhar-Nautiyal, 1999 ; Chen *et al.*, 2006 ; Khan, 2010) par les isolats de KA (figure 15).



Fig 15. Solubilisation du phosphate tricalcique par la souche KA sur le milieu PVK (A gauche : 6 jours après incubation, à droite 30 jours après incubation)

Le diamètre des colonies, le diamètre des halos de solubilisation et l'indice de solubilisation (SI) ont été mesurés pendant les 15 jours d'incubation (tableau 10).

PVK	3	1,5	3	0.5
	6	3	4	0.75
	9	3.5	4.5	0.77
	12	4	5	0.8
	15	5	6	0.83
NBRI	3	1	3	0.33
	6	2	5	0.4
	9	2.5	6	0.42
	12	3	6	0.5
	15	3.5	6	0.58

Tableau 10. Solubilisation du phosphate tricalcique par les isolats de KA

L'indice de solubilisation de P de l'isolat KA diffère dans les deux milieux (figure 16)

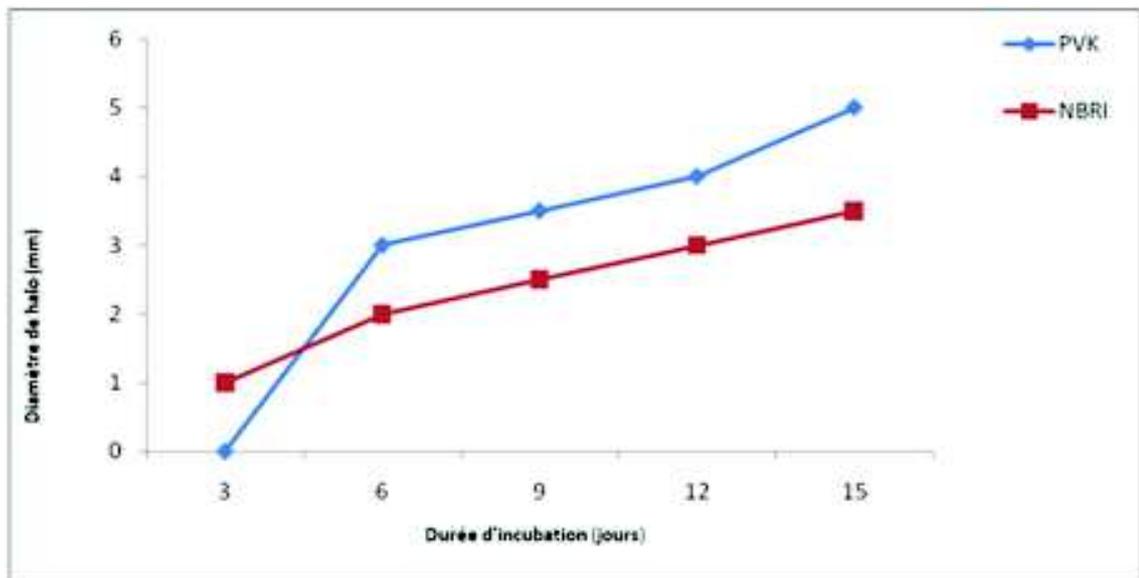


Fig 16. Variation de diamètre de halo de solubilisation pendant les quinze jours d'incubation dans les deux milieux (PVK et NBRIP).

Le halo de solubilisation du PTC ainsi que l'indice de solubilisation sur milieu de PVK est supérieur à celui du milieu NBRIP et ce durant toute la période d'incubation (tableau 10). De ce fait, l'isolat KA présente une meilleure solubilisation de PTC sur le milieu PVK (IS=0.83) que sur le milieu NBRIP (IS=0.58).

Les bactéries sont impliquées dans les processus affectant la transformation du phosphore dans le sol. Elles sont capables de libérer le phosphore des pools inorganiques insolubles à travers le processus de solubilisation. Il a été constaté que le processus de solubilisation des différents phosphates est associé à la diminution du pH du milieu et à la synthèse des acides

organiques (Fankem *et al.*, 2006).

La solubilisation du phosphate de calcium est fortement influencée par l'acidification du milieu. Par ailleurs, l'acidification du milieu contribue efficacement à la solubilisation du phosphate de calcium par les différents acides organiques, avec au premier plan le citrate, le tartrate, le malate et le trans-aconitate (Fankem, 2007).

Comparativement à l'indice de solubilisation des isolats de KA sur milieu PVK (0,83), Alikhan *et al.* (2006) rapportent, dans les mêmes conditions (sur milieu PVK avec 14 jour d'incubation) une légère augmentation (IS=0,96) de cet indice chez les rhizobia de *Phaseoli*, une augmentation plus ou moins importante (IS=1,40) chez *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium ciceri* et *M. mediterraneum* et une augmentation importante (IS=2,48) chez les rhizobia de légumineuses biovare *Viciae*.

Cependant nos résultats sont contradictoires avec ceux rapportés par Shekhar-Nautiyal, (1999) chez huit espèces de *Pseudomonas*. En effet, cet auteur rapporte chez ce genre une meilleure solubilisation du PTC sur milieu NBRIP que sur milieu PVK.

2. Effet de la déficience en phosphore sur l'interaction symbiotique haricot (*Phaseolus vulgaris*)-rhizobium

2.1. Effet de la déficience en phosphore sur les paramètres de croissance

2.1.1. Effet de la déficience en phosphore sur la biomasse de la partie aérienne

D'après l'ANOVA les couples symbiotiques et le traitement phosphaté ont eu un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) sur le poids sec de la partie aérienne, en revanche l'interaction couples symbiotiques-traitement phosphaté n'a aucun effet significatif sur ce dernier paramètre.

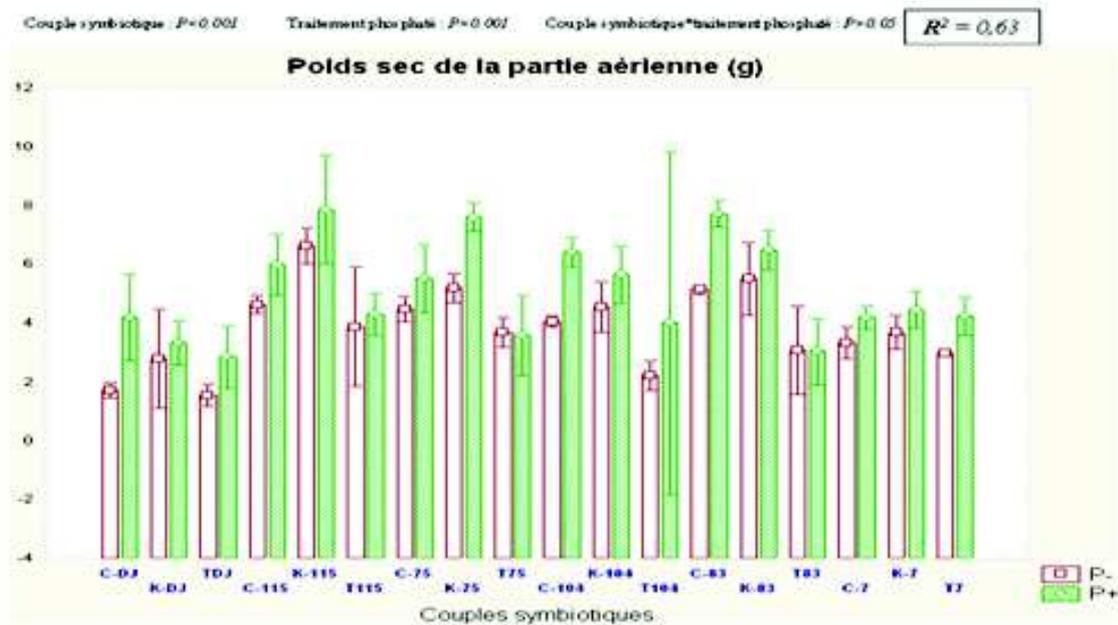


Fig 17 : Variation du poids sec de la partie aérienne chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

D'après la figure 17, soit en condition de déficience ou de suffisance, toutes les lignées inoculées avec la souche CIAT899 (C) ou avec celle de KA (K) présentent un poids sec de la partie aérienne supérieur à celui du témoin non inoculé.

En outre, dans un sol suffisant en P, la biomasse sèche de la partie aérienne la plus importante est enregistrée avec le couple K-115 (7.87g), alors que la faible biomasse est représentée par le couple symbiotique K-Dj (3.39g). Parallèlement, dans un sol déficient en P, la biomasse sèche de la partie aérienne la plus importante et celle la plus faible est enregistrée chez les deux mêmes couples précédents dont les valeurs sont respectivement 6.66g et 2.79g.

La déficience en P a provoqué une diminution de la biomasse aérienne chez tous les couples symbiotiques, le taux le plus élevé de cette diminution est celui noté chez le couple C-83 (33.8%), alors, que le taux le plus faible est présenté par le couple symbiotique K-115 (14%).

D'après Alkama (2010), la déficience en P provoque une diminution de la biomasse sèche de la partie aérienne des différentes lignées du haricot vert (115, 28, 75, 34, 104 et la 83) inoculées par la CIAT 899, la plus forte diminution est de 36% obtenue chez les lignées 124 et la 83. Cependant Jebara *et al.* (2005) ont noté sous déficience en P un taux de diminution du poids sec de la partie aérienne de 57% chez la variété du haricot (*Phaseolus vulgaris*) NAG310.

Diaw (2002), rapporte un effet significatif de la déficience en P sur la diminution de la biomasse de la partie aérienne chez le haricot. Le taux de cette diminution est en fonction du type de l'association entre la variété et la souche rhizobienne ainsi que la dose de phosphore appliquée.

Ronnie (1986) et Zarrin *et al.* (2007) ont montré que l'inoculation et le traitement phosphaté ont un effet significatif sur la croissance de la plante plus particulièrement sur le poids sec de la partie aérienne du soja (*Glycine max* L) ; les mêmes auteurs ont noté

que l'interaction souche-traitement phosphaté n'a pas un effet significatif sur le poids sec de la partie aérienne.

La biomasse sèche de la partie aérienne est un paramètre important pour l'évaluation de la sensibilité des légumineuses à la déficience en phosphore (Vadez *et al.*, 1996 ; PAN *et al.*, 2008; Alkama, 2010). Alkama (2010), a rapporté que la lignée 83 es la plus sensible et que les lignées 104 et 115 sont les plus tolérantes à la déficience en P. Ces résultats sont similaires aux nôtres ; la lignée 83, associées à la souche CIAT 899 est la plus sensible à la déficience en P ; la lignée 115, en association à la souche KA, est la plus tolérante.

2.1.2. Effet de la déficience en phosphore sur la biomasse de la partie racinaire

L'ANOVA n'a montré aucun effet significatif des couples symbiotiques et du traitement phosphaté, ni même de l'interaction entre les deux facteurs sur le poids sec des racines.

D'après la figure 18, tous les couples symbiotiques montrent une augmentation de leur biomasse sèche racinaire par rapport aux témoins non inoculés (déficience ou non).

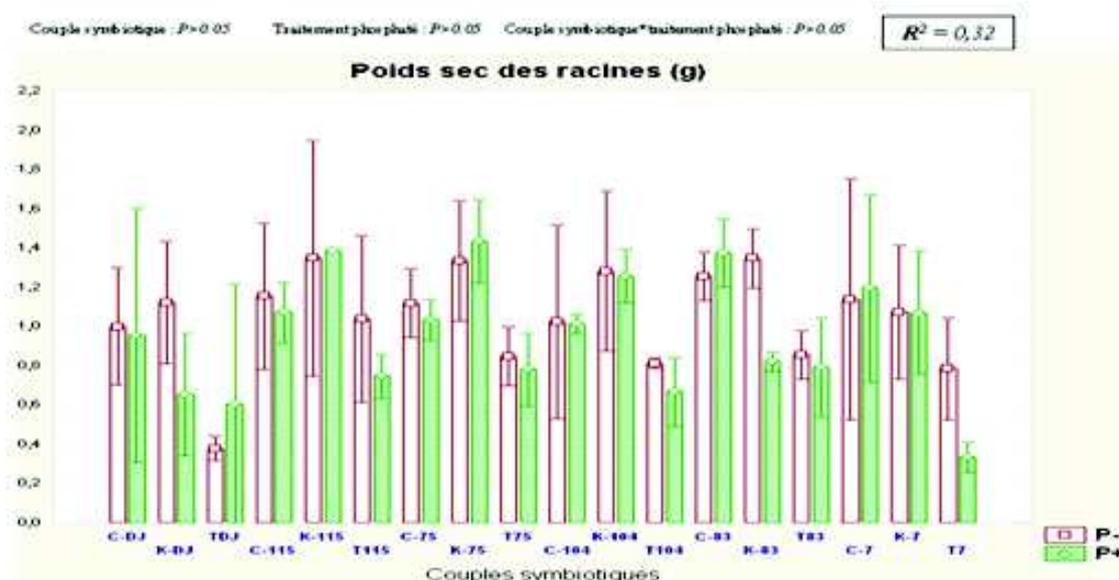


Fig 18 : Variation du poids sec des racines chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

A l'exception des couples symbiotiques C-75, k115, C-83 et le C-7 chez qui une légère augmentation, sous suffisance de P, est observée dans leurs biomasses sèches racinaires avec respectivement 8%, 13%, 11% et 14%. Chez le reste des couples symbiotiques, la déficience en P a provoqué une augmentation plus ou moins importante dans le poids sec des racines dont le taux le plus élevé est noté avec la variété Dj inoculée par la souche KA (69%).

L'augmentation de la biomasse racinaire chez certains couples symbiotiques sous déficience en P peut être justifiée par le changement de la morphologie racinaire ; dans un sol déficient en P, le haricot peut développer de longs poils absorbants qui permettent aux plantes d'avoir à leur disposition un plus grand volume de sol et par conséquent un meilleur prélèvement des éléments minéraux plus particulièrement du phosphore (Djadjaglo *et al.*, 2008).

Cependant nos résultats sont en contradiction avec ceux rapportés par plusieurs auteurs chez *Phaseolus vulgaris* (Vadez *et al.*, 1996 ;Shamseldin *et al.*, 2005 ; Kouas *et al.*, 2009 ;Alkama *et al.*, 2009 ; Alkama, 2010), chez *Pisum sativum*(Geneva *et al.*, 2006), et chez *Glycine max* (Zarrin *et al.*, 2007). Ces auteurs rapportent que l'inoculation et le traitement phosphaté ont un effet significatif sur la biomasse racinaire, tandis que l'interaction inoculation*traitement phosphaté n'a aucun effet sur la biomasse racinaire. D'après Jebara *et al.* (2005), la biomasse racinaire est moins affectée par le traitement phosphaté que la biomasse aérienne.

En revanche, PAN *et al.* (2008) ont constaté que le traitement phosphaté n'a aucun effet significatif sur le poids sec des racines de soja. En outre, Djadjaglo *et al.* (2008) notent sous déficience en phosphore, que la biomasse racinaire développée chez le haricot est plus importante que celle développée sous suffisance en P.

Des travaux montrent aussi que la déficience en P affecte les paramètres de croissance chez le haricot mais la croissance racinaire est beaucoup moins inhibée. (Bernal *et al.*, 2005).

Il se peut aussi que la croissance des plantes dans notre dispositif expérimentale soit limitée par le volume des pots alors qu'en réalité les racines des plantes peuvent pénétrer des couches plus profondes du sol.

2.1.3. Effet de déficience en phosphore sur la hauteur de la tige

D'après la figure 19, chaque couple symbiotique présente une hauteur de la tige supérieure à celle enregistrée chez les traitements témoins non inoculés déficients ou suffisants.

L'ANOVA a montré une différence hautement significatif ($P < 0.01$) des couples symbiotiques sur la hauteur de la tige. Sous P suffisant, la valeur la plus élevée (24,9cm) est notée chez les deux lignées 115 et la 75 inoculées par la même souche de KA. La hauteur de la tige la plus faible est observée chez le couple symbiotique C-7 (16.9cm). Dans un sol déficient en P, la plus haute tige est observée chez le couple symbiotique K-83 (18.23cm) contrairement au couple symbiotique K-104 avec une taille caulinaire de 13cm.

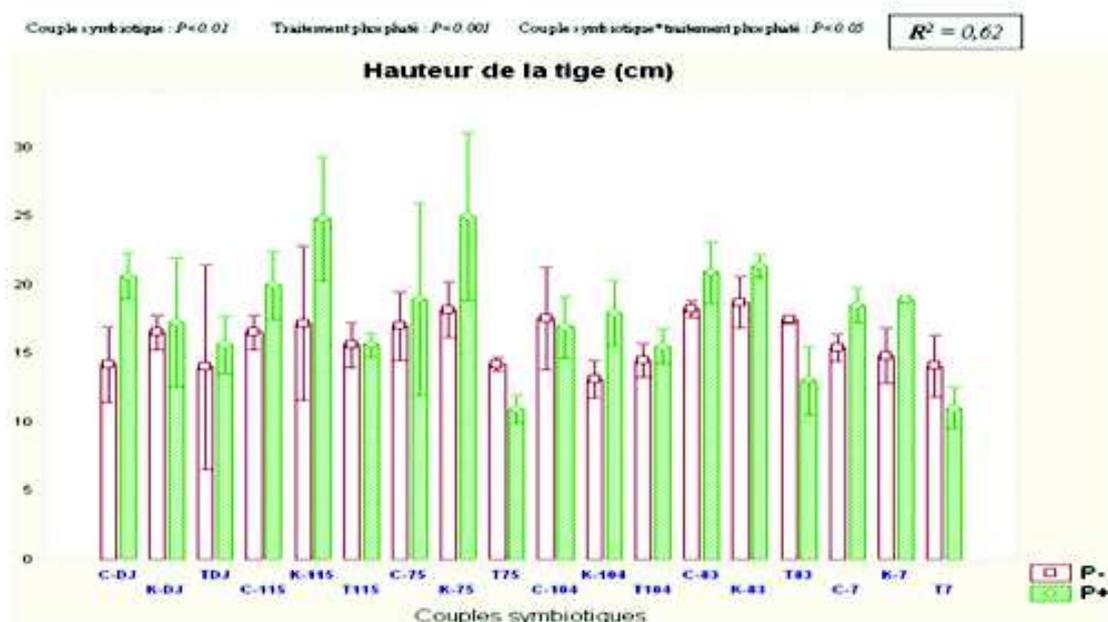


Fig 19 : Variation de la hauteur de la tige chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

Cependant, l'apport phosphaté (sol efficient) a un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) sur l'augmentation de la hauteur de la tige chez tous les couples symbiotiques à l'exception de C-104. Le taux le plus élevé de cette augmentation est observé chez la lignée 115 inoculée par la souche KA (46%), tandis que la variété El Djadida associée avec la souche KA observe la plus faible augmentation (4%).

L'effet de l'interaction entre le traitement phosphaté et les couples symbiotiques a été aussi significative ($P < 0.05$) avec la hauteur de la tige

Nos résultats sont en accord avec ceux de Djadjaglo *et al.* (2008) qui rapportent chez le haricot une réduction de 20% de la hauteur des tiges avec un sol pauvre en phosphore par rapport à un sol ayant reçu un apport phosphaté.

2.1.4. Effet de la déficience en phosphore sur la surface foliaire

La figure 20, représente la variation de la surface foliaire en fonction des couples symbiotiques et du traitement phosphaté.

Tous les témoins non inoculés présentent une surface foliaire moins importante que celle enregistrée des couples symbiotiques.

L'ANOVA a montré un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) des couples symbiotiques et de l'interaction traitement phosphaté*couples symbiotiques sur la surface foliaire. Par contre cet effet n'est pas significatif avec le traitement phosphaté.

Dans des conditions de limitation du P dans le milieu, la plus grande valeur de la surface foliaire est notée chez le couple symbiotique K-75 (47.69cm^2). La surface foliaire la plus faible est observée chez la variété d'El Djadida inoculée avec la souche CIAT 899 (17.25cm^2).

Sous P suffisant, le couple symbiotique K-75 présente la plus grande surface foliaire (36.53cm^2), alors que le couple K-Dj enregistre la plus faible valeur de la surface foliaire ($19,95\text{cm}^2$).

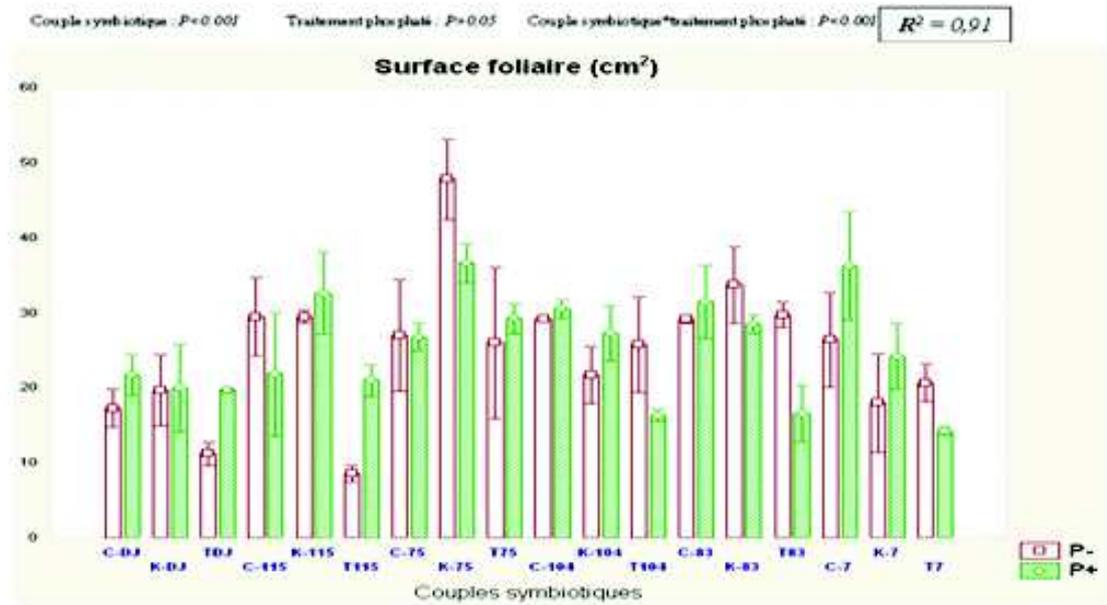


Fig 20 : Variation de la surface foliaire chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

Sous déficience en P les couples symbiotiques, C-115, K-75, C-75 et K-83 ont subi une augmentation plus ou moins importante de leur surface foliaire dont le taux le plus élevé est noté chez le K-75 (35%). Chez le reste des couples symbiotiques, la surface foliaire était plus importante sous suffisance en P.

Selon Saad *et al.* (2009), le traitement phosphaté n'a aucun effet significatif sur la surface foliaire chez le *Phaseolus vulgaris*. Jensen *et al.* (2002) rapportent qu'un apport supplémentaire de phosphore dans le sol n'apporte aucun effet significatif sur la surface foliaire chez *Trifolium repens* L.

2.2. Effet de la déficience en phosphore sur la concentration en phosphore dans la plante

2.2.1. Effet de la déficience en phosphore sur la concentration en phosphore dans la partie aérienne

La figure 21 représente la variation de la concentration en P dans la partie aérienne chez l'ensemble des couples symbiotiques étudiés.

D'après cette figure, sur l'ensemble des couples symbiotiques étudiés, tous les traitements témoins non inoculés sous déficience ou sous suffisance en P présentent une concentration en P plus faible que celle observée chez leurs couples symbiotiques correspondants.

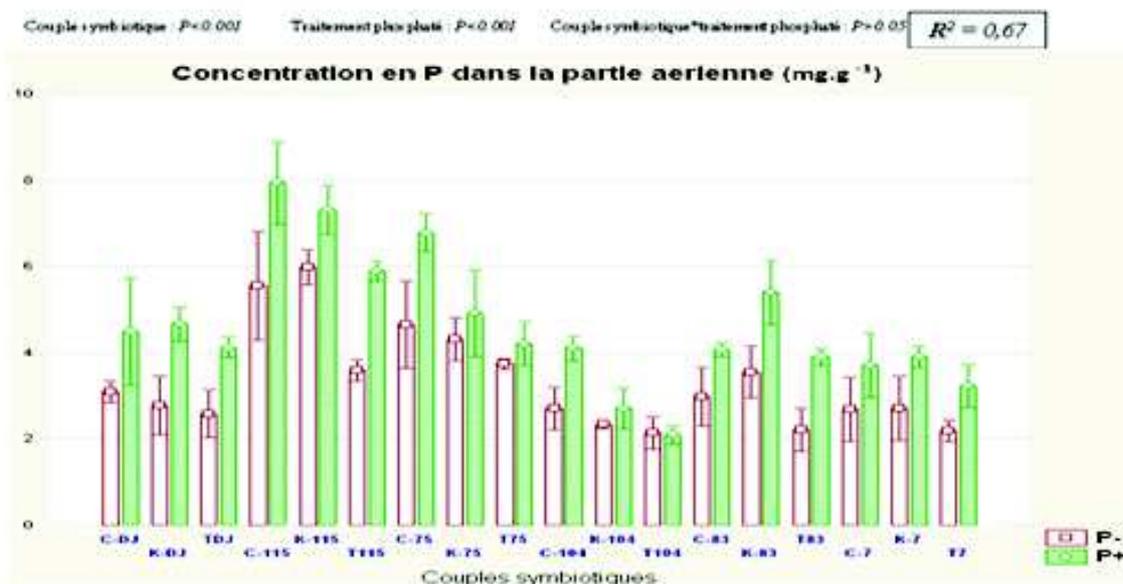


Fig 21 : Variation de la concentration en P dans la partie aérienne chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

Les couples symbiotiques et le traitement phosphaté ont montré une différence très hautement significatif ($P < 0.001$) sur la variation de la concentration en P dans la partie aérienne, tandis que l'interaction entre les deux facteurs n'a pas eu d'effet sur ce dernier paramètre.

En condition de suffisance en P, la forte concentration en P est enregistrée chez la lignée 115 inoculée par la souche CIAT 899 (7.94mg.g). Sous les conditions de limitation en P dans le sol, c'est la même lignée (115) qui a enregistré la plus forte concentration en P dans la partie aérienne (6mg.g) mais cette fois ci quand elle est associée avec la souche KA. Cependant, la lignée 104 inoculée par la souche KA présente la plus faible concentration en P dans la partie aérienne que ça soit sous déficience en P (2.32mg.g) ou sous suffisance en P (2.72mg.g).

La déficience en P provoque une diminution remarquable de la concentration en P dans la partie aérienne chez l'ensemble des lignées quelles soient inoculées par la souche CIAT 899 ou par la souche KA. La plus importante diminution est constatée chez la lignée 115 inoculée par la souche CIAT 899 (25%), tandis que chez la lignée 104 inoculée par la souche KA a enregistré le plus faible taux (5%) de diminution de la concentration en P dans la partie aérienne sous la déficience en P dans le sol.

Plusieurs auteurs rapportent que la déficience en P provoque la réduction de la teneur du P dans la partie aérienne chez le *Phaseolus vulgaris* (Vadez *et al.*, 1999 ; Zarrin *et al.*, 2007 ; Kouas *et al.*, 2009 et Alkama, 2010).

Alkama (2010), rapporte que la variabilité génétique des RILs ainsi que le niveau de P dans le sol ont un effet significatif sur la teneur en P dans la partie aérienne, et que les lignées 115 et 34 du haricot inoculées par la souche rhizobienne CIAT 899 en hydro-aéroponie, ont présenté une concentration en P dans la partie aérienne sou suffisance en P qui est plus élevée 1.5 à 2 fois que celle observée en condition de déficience en P.

D'après Zarrin *et al.* (2007), l'inoculation par les rhizobies et l'application du traitement phosphaté ont un effet significatif sur l'augmentation de la concentration en P dans la partie

aérienne et racinaire chez le soja (*Glycine max*). PAN *et al.* (2008) rapportent que la déficience en P provoque la diminution de la concentration en P dans la partie aérienne chez le soja avec un taux de 61%.

Diaw (2002), observe qu'un apport supplémentaire de P augmente la teneur du P total dans la partie aérienne de *Phaseolus vulgaris*, et que l'inoculation par *Glomus aggregatum* seul ou associée à *Pseudomonas fluorescens* apporte une augmentation de 40% dans le premier cas et de 81% dans le deuxième cas.

En revanche, Ronnie, (1986) a montré qu'il n'y pas d'effet de l'inoculation sur la concentration en P dans la partie racinaire ; par contre l'interaction du taux d'inoculation et du traitement phosphaté ont un effet significatif.

2.2.2. Effet de la déficience en phosphore sur la concentration en phosphore dans la partie racinaire

Sur l'ensemble des couples symbiotiques, soit en condition de suffisance ou de déficience, les traitements témoins non inoculés présentent les plus faibles valeurs de la concentration en P dans les racines par rapport à leurs couples symbiotiques correspondants.

Le traitement phosphaté et les couples symbiotiques ne présentent aucun effet significatif sur la concentration en P dans les racines ; par contre l'interaction entre les deux facteurs montre un effet significatif ($P < 0.05$) sur la concentration en P dans la partie racinaire.

Sous déficience en P, la plus forte concentration en P dans la partie racinaire est observée chez la lignée 75 inoculée par la souche CIAT 899 (4mg.g), alors que la plus faible valeur est enregistrée avec la variété El Djadida inoculée par la souche KA (1.45mg.g). Cependant, sous P suffisant phosphaté dans le sol, la lignée 115 inoculée par la souche CIAT 899 a montré la plus forte concentration en P dans les racines (3.90mg.g), alors que la faible concentration en P est notée chez la lignée 7 inoculée par la souche KA (1.97mg.g).

Les couples symbiotiques K-115, C-75, C-104 et K-7 ont enregistré une augmentation de la concentration en P dans les racines sous déficience en P dont le taux le plus élevé de cette augmentation est observé chez le C-104 (62%). Tandis que sous P suffisant cette augmentation est constatée pour le reste des couples symbiotiques dont le K-104 est celui qui a présenté le taux le plus élevé (28%).

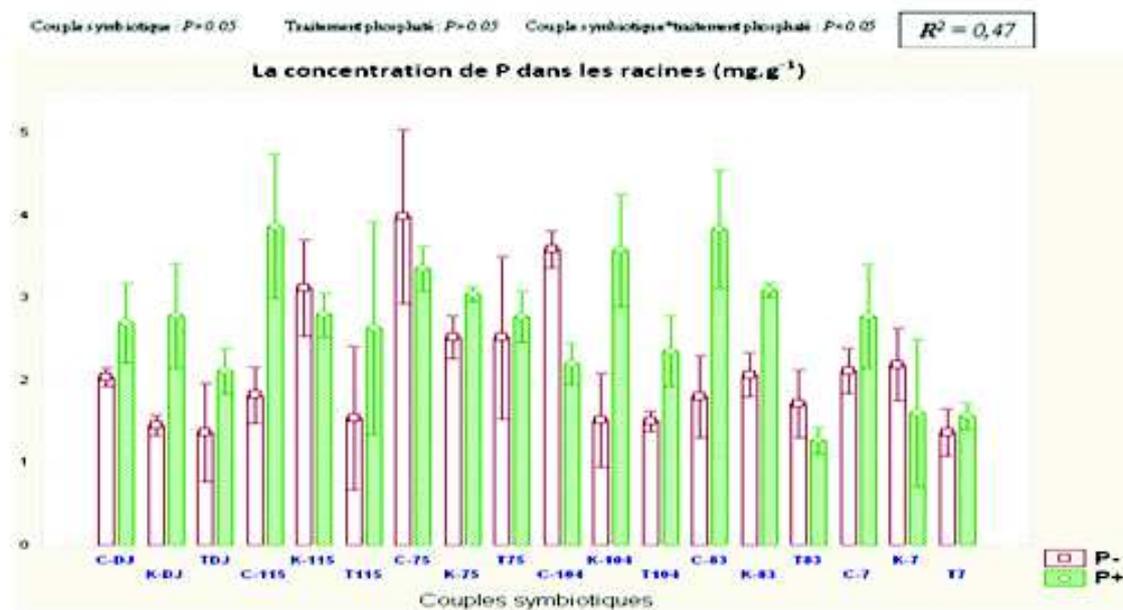


Fig 22 : Variation de la concentration en P de la partie racinaire chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

Plusieurs auteurs observent une diminution de la concentration en P racinaire sous déficience en P dans le sol, chez *Pisum sativum* (Geneva *et al.*, 2006), *Glycine max* (Shu-Jie *et al.*, 2007 ; PAN *et al.*, 2008) et *Phaseolus vulgaris* (Vadez *et al.*, 1996 ; Vadez et Drevon, 2001 ; Kouas *et al.*, 2009 ; Alkama, 2010).

L'effet significatif de l'interaction entre le traitement phosphaté et les couples symbiotiques peut expliquer la variation présentée par les différents couples symbiotiques dans la réponse au traitement phosphaté. Il se peut que l'inoculation par la souche KA ou CIAT 899 n'a pas le même effet sur les différentes lignées inoculées, ni sur les deux niveaux de traitement phosphaté (déficient et suffisant).

Lorsque la KA est en association avec les lignées 115 et 7, l'interaction symbiotique résulte en une forte concentration en P dans les racines sur sol déficient que sur sol suffisant en P ; le même effet est observé avec la souche CIAT 899 associée aux lignées 75 et 104.

Pour mieux expliquer l'effet du traitement phosphaté ainsi que celui des couples symbiotiques sur le statut du phosphore dans la plante, nous avons eu recours au calcul de phosphore total prélevé par la plante et qui est représenté la somme de P contenu dans la partie aérienne et celui contenu dans les racines.

La figure 23 représente la variation du phosphore total prélevé par la plante chez les différents couples symbiotiques.

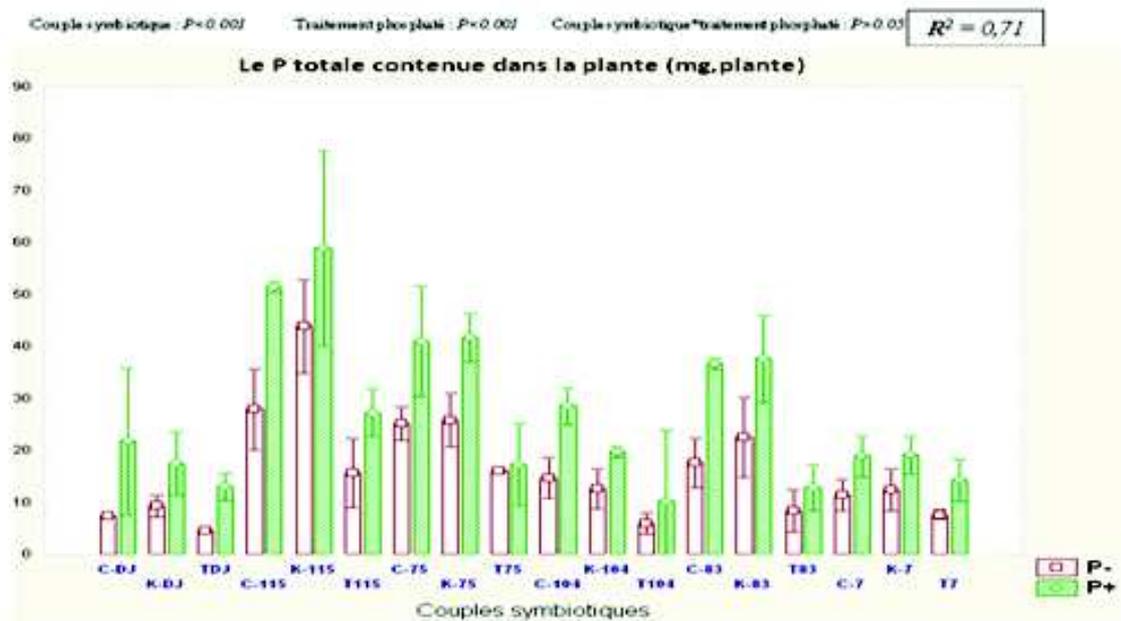


Fig 23 : Variation du P total contenu dans la plante chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

L'ANOVA montre un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) du traitement phosphaté et des couples symbiotiques sur le P total prélevé par la plante, par contre l'interaction entre les deux facteurs n'a aucun effet significatif.

En condition de suffisance, la lignée 115 inoculée par la souche KA présente la plus grande valeur (61.27mg/plante) du P total prélevé par la plante alors que la variété d'El Djadida inoculée par la même souche a montré la plus faible valeur du P total (17.69 mg/plante). Dans un sol déficient en P, la plus grande valeur de P total prélevé est enregistré avec le couple symbiotique K-115 ; la plus faible est observée avec C-Dj (7.17mg/plante).

La déficience en P a provoqué une diminution hautement significative de P total prélevé chez les différentes lignées étudiées ; le taux le plus élevé de cette diminution est constaté chez le couple symbiotique C-115 (45%) ; la plus faible diminution (35%) de P total prélevé est observée chez le couple K-104.

Quel que soit la souche inoculée (CIAT 899 ou KA), la lignée 115 est toujours celle qui présente la plus forte teneur en P total prélevé. La variété locale d'El Djadida a accumulé la plus faible teneur en P total.

Alkama, (2010) rapporte que chez la variété locale d'El Djadida et les RILs (lignées contrastantes du haricot), La diminution significative du phosphore dans la partie aérienne et racinaire est accompagnée par une diminution significative de P total prélevé.

2.2.3. Effet de la déficience en phosphore sur l'efficacité du prélèvement de phosphore par les racines (RPAE)

L'efficacité d'absorption de P par les racines (RPAE) représente le rapport entre le P total prélevé par la plante et la biomasse racinaire. C'est un indicateur pour l'évaluation de la capacité de la racine à prélevé le phosphore à partir du sol (Gerloff et Gabelman, 1983).

La figure 24 représente la variation RPAE en fonction des différents couples symbiotiques étudiés.

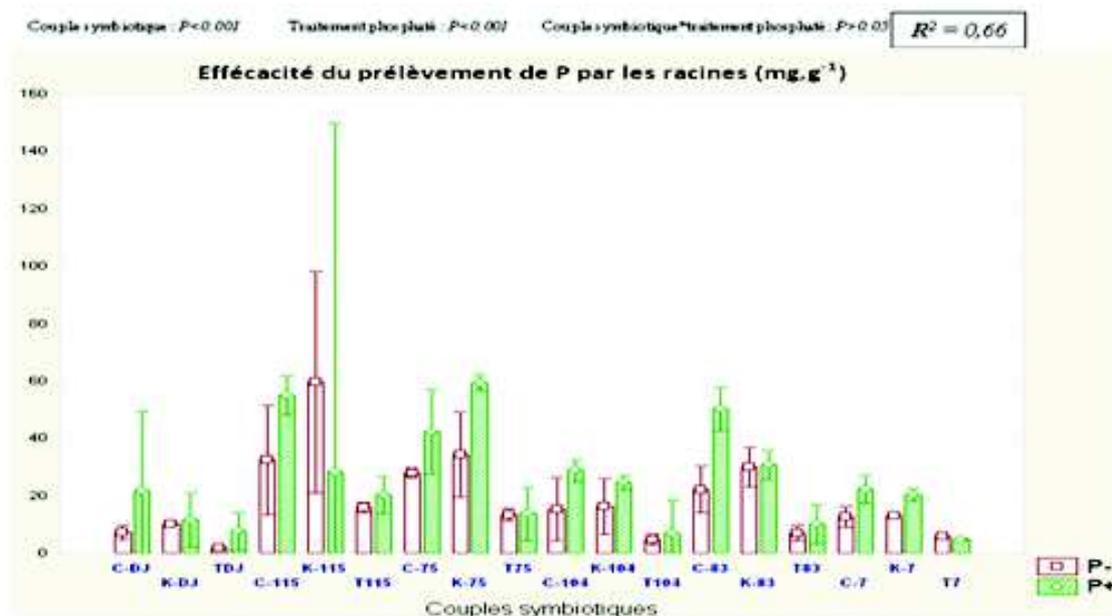


Fig 24 : Variation de l'efficacité du prélèvement du P par les racines chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

L'ANOVA montre un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) du traitement phosphaté et des couples symbiotiques sur l'efficacité du prélèvement du P par la plante, par contre l'interaction entre les deux facteurs n'a eu aucun effet significatif.

La lignée 115 inoculée par la souche KA se caractérise par la plus grande efficacité d'absorption de P (84.7 mg.g^{-1})   partir d'un sol suffisant en P alors que la variété locale d'El Djadida inoculée par la même souche présente la plus faible valeur de RPAE (11.32 mg.g^{-1}).

En condition de déficience en P, la lignée 115 inoculée par la souche KA présente toujours la meilleure RPAE (57.8 mg.g^{-1}), alors que la variété locale d'El Djadida inoculée par la souche CIAT 899 enregistre la plus faible valeur de RPAE (7.14 mg.g^{-1}).

La déficience en P a engendré une diminution hautement significative de RPAE chez tous les couples symbiotiques ; le taux le plus élevé de cette diminution est observé chez le couple symbiotique C-83 (110%), alors que, le couple K-Dj enregistre la plus faible diminution (9%).

La déficience en P contribue à la diminution hautement significative de RPAE chez le soja avec un taux de diminution de 55% (PAN *et al.*, 2008).

Mollier (1999), rapporte chez le maïs que la quantité de P prélevé par les racines est de 2.5 fois supérieure dans un sol qui a reçu un apport de P par rapport à celui qui n'a rien reçu. Il explique cela par la réduction de la biomasse racinaire sous la déficience en P dans le sol.

2.2.4. Effet de la déficience en phosphore sur l'efficacité d'utilisation de P par la plante (PUE)

L'efficacité d'utilisation de P par la plante est représentée par le rapport du poids sec totale de la plante sur le P totale prélevé par la plante (ou bien contenu dans la plante). Ce paramètre indique l'efficacité de la plante à utiliser le phosphore prélevé pour la formation de la biomasse (Gerloff et Gabelman, 1983).

Dans ce cas la PUE est relative à la biomasse végétale sèche, alors que certains auteurs (Sungthongwise *et al.*, 2009 ; Alkama, 2009) se réfèrent à la PUE relative à la biomasse nodulaire sèche pour évaluer l'efficacité d'utilisation de P par la plante.

La variation de l'efficacité d'utilisation du P par la plante (PUE) des différents couples symbiotiques est représentée par la figure 25.

D'après la figure 25, une augmentation de la PUE est observée dans chaque traitement témoins non inoculé par rapport son couple symbiotique correspondant, et ceci pour tous traitements phosphatés confondus.

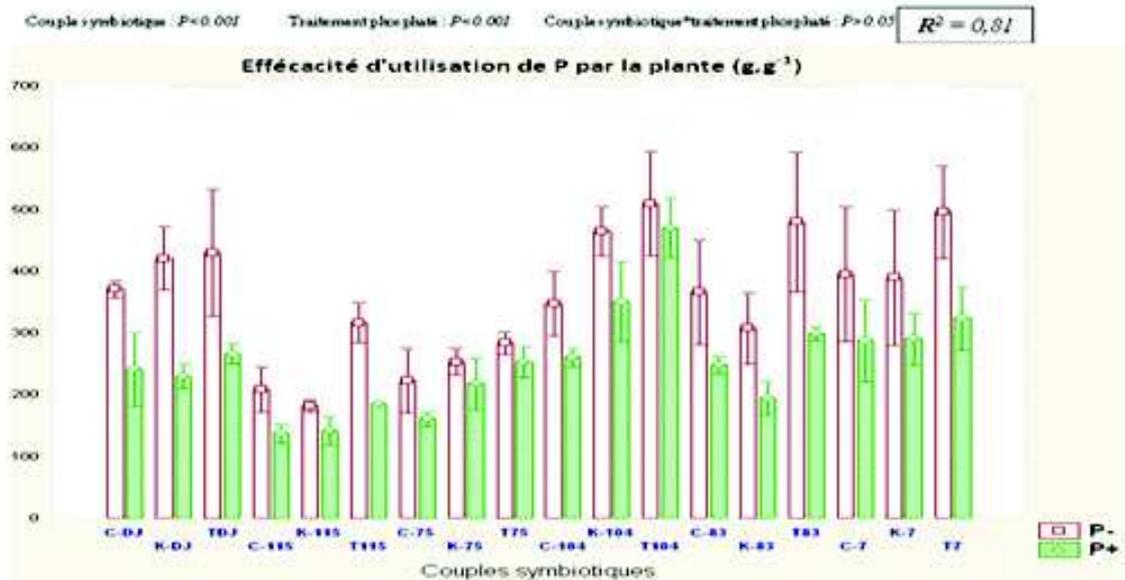


Fig 25: Variation de l'efficacité d'utilisation du P par la plante chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

L'ANOVA montre un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) des couples symbiotiques sur l'efficacité d'utilisation de phosphore par les différents couples symbiotiques.

En conditions de déficience en P, la PUE la plus importante est observé chez la lignée 104 inoculée par la souche KA (467g.g^{-1}), contrairement à la lignée 115 inoculée par la souche KA chez qui on retrouve la plus faible valeur (181g.g^{-1}) de PUE. En conditions de suffisance en P, la lignée 104 inoculée par la souche KA présente la plus grande valeur du PUE (347g.g^{-1}) alors que la plus faible valeur du PUE est observée chez la lignée 115 inoculée par la souche KA (181g.g^{-1}).

En comparant les valeurs du PUE enregistrées chez l'ensemble des couples symbiotiques par rapport à celles notées chez les traitements témoins non inoculés correspondants, il est constaté que l'inoculation par la souche KA ou la CIAT 899 a induit une diminution de l'efficacité d'utilisation de P chez les différentes lignées du haricot. Dans un sol déficient en P, le couple symbiotique K-83 a enregistré la plus forte diminution (83%) par rapport au témoin non inoculé. En conditions de suffisance en P, le couple symbiotique C-104 enregistre la plus faible réduction (45%) par rapport au témoin non inoculé.

La déficience en P a un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) sur l'augmentation du PUE chez les différents couples symbiotiques étudiés. La plus importante augmentation est notée chez le couple symbiotique K-Dj (82%) contrairement au couple symbiotique K-115 qui présente la plus faible amélioration (18%) de l'efficacité d'utilisation de P sous l'effet de déficience de P dans le sol.

PAN *et al.*, (2008) observent une augmentation de 72% de l'efficacité d'utilisation de P chez 96 génotypes de soja (*Glycine max*) sous déficience en P.

Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Sungthongwises *et al.* (2009) qui observent une réduction de la PUE sous suffisance en P chez trois variétés niébés (*V. unguiculata* cv.305, *V. unguiculata* cv Kabyle et *V. unguiculata* cv. Danila) en hydro-aéroponie et rhizotron.

La notion du PUE est définie par Siddiqui et Glass (1981) et discutée par Gourley *et al.* (1993) ; elle a une importance économique dans la gestion de la circulation des engrais chimiques dans l'environnement, soit pour une culture intensive ou dans les terres marginales dont le coût d'engrais limite leur utilisation.

Vadez *et al.* (1999) ont constaté que l'effet de la variation génotypique dans la fixation de N_2 sous déficience en P est très probablement dû aux différences dans PUE.

Sous la déficience en P, les plantes efficaces en P, augmentent leur efficacité d'utilisation de phosphore par différents mécanismes cellulaires internes qui contribuent à l'utilisation du phosphore absorbé par la plante (Raghothama 1999 ; Bates et Lynch 1996; Vance *et al.*, 2003).

2.3. Effet de la déficience en phosphore sur la solubilisation du phosphore dans la rhizosphère

2.3.1. Effet de la déficience en phosphore sur l'acidification de la rhizosphère

L'acidification rhizosphérique, est mesurée par le pH de la solution du sol rhizosphérique.

La variation du pH rhizosphérique chez les différents couples symbiotiques étudiés aux deux niveaux de traitement phosphaté est représentée par la figure 26.

D'après la figure 26, les témoins non inoculés déficients ou suffisants présentent la plus haute valeur du pH rhizosphérique par rapport aux couples symbiotiques.

L'ANOVA montre un effet hautement significatif ($P < 0.01$) des couples symbiotiques et un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) de l'interaction couples symbiotiques*traitement phosphaté sur le pH rhizosphérique ; par contre le traitement phosphaté n'a eu aucun effet significatif sur la variation du pH rhizosphérique.

Dans un sol déficient, toutes les lignées inoculées par la souche rhizobienne KA ont enregistré une diminution du pH rhizosphérique par rapport à celles qui se trouvent en conditions de suffisance, le taux le plus élevé de cette diminution est noté chez le couple symbiotique K-115 (7.85%). Chez la souche CIAT 899, il est également enregistré une légère diminution du pH rhizosphérique avec toutes les lignées à l'exception de la 75.

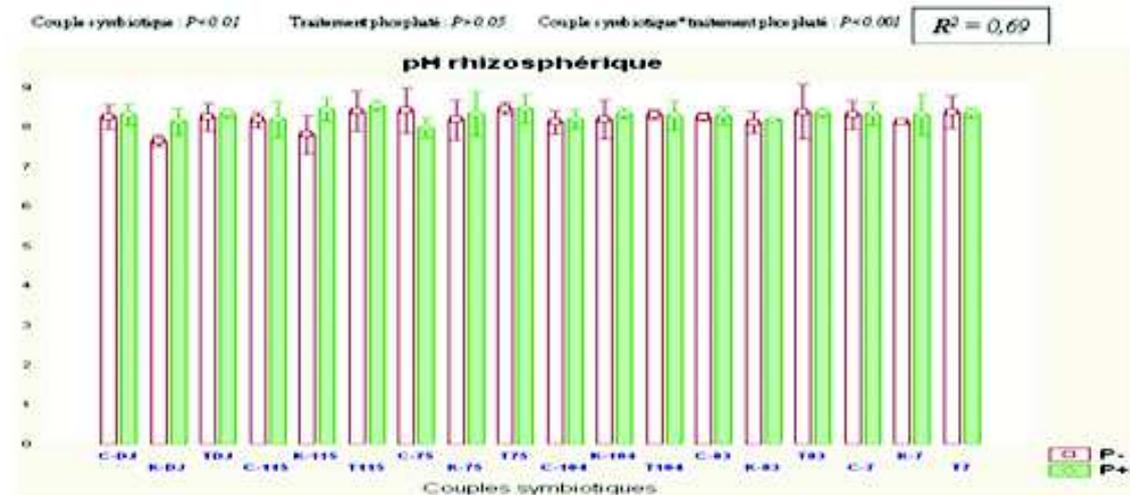


Fig 26 : Variation du pH rhizosphérique chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

Le phénomène de l’acidification a notamment été identifié chez le maïs (*Zea mays* L.) (Hinsinger *et al.*, 2003) et le lupin blanc (*Lupinus albus*) (Shen *et al.*, 2006). Il est particulièrement important chez les légumineuses (Kouas *et al.*, 2009 ; Alkama *et al.*, 2009 et Alkama, 2010). Ainsi, le pH de la rhizosphère peut être différent du sol non rhizosphérique, pouvant atteindre une différence d’une ou deux unités de pH. Cette stratégie s’avère très intéressante dans les sols calcaires (Jaillard *et al.*, 2003).

Alkama, (2010) rapporte que sous culture rhizotronique, les RILs inoculées par la souche CIAT 899 et l’interaction RILs*traitement phosphaté affectent significativement le pH rhizosphérique ; par contre le traitement phosphaté n’a aucun effet. Ces résultats sont similaires aux nôtres pour toutes les lignées sauf la 115.

Tang *et al.* (2001) et Kouas *et al.* (2009), observent une variation de l’augmentation du flux de H⁺ dans la rhizosphère sous déficience en P chez certains génotypes du haricot.

2.3.2. Effet de la déficience en phosphore sur la teneur en P assimilable dans la rhizosphère

La figure 27 représente la variation de la teneur en P assimilable dans la rhizosphère en fonction des différents couples symbiotiques étudiés.

Les traitements témoins non inoculés déficients ou suffisants présentent des valeurs plus ou moins différentes par rapport à leurs couples symbiotiques correspondants, le couple symbiotique K-7 a enregistré une teneur de P assimilable plus faible que celle de son témoin (T-7).

L’ANOVA n’a montré aucun effet significatif des couples symbiotiques, ni celui du traitement phosphaté sur la teneur de P assimilable. En revanche l’interaction entre les deux facteurs a montré un effet significatif (P<0.05) sur ce dernier paramètre.

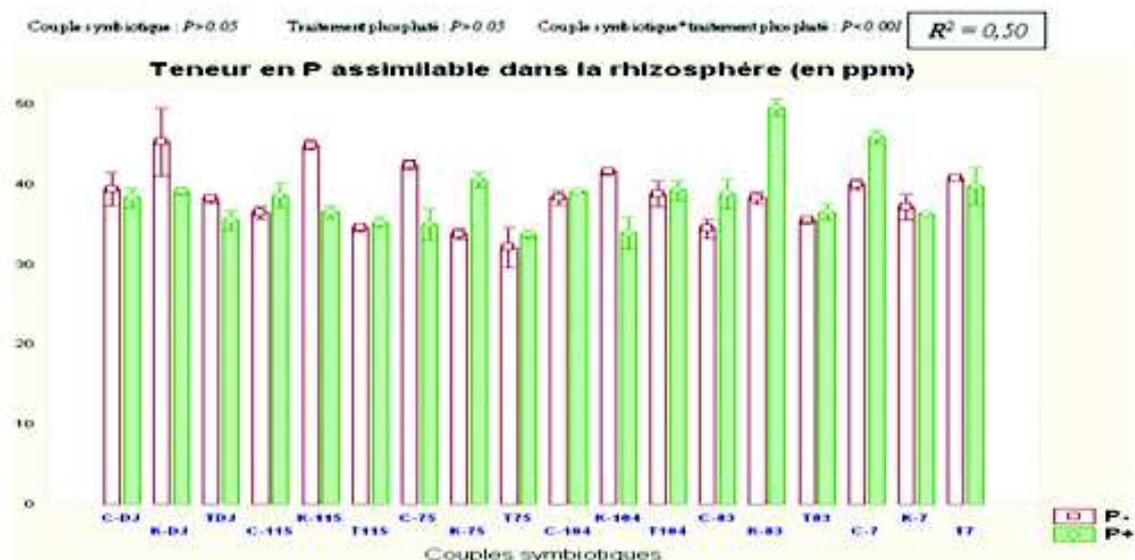


Fig 27 : Variation de la teneur du P assimilable dans la rhizosphère chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

En condition de déficience en P, l'ensemble des lignées inoculées par la souche KA à l'exception de celle de la 75 et 7, ont enregistré les meilleures teneurs en P assimilable dans la rhizosphère.

L'effet significatif de l'interaction couples symbiotique*traitement phosphaté explique les multiples réponses exprimées par les différentes combinaisons symbiotiques sur un sol déficient et sur un autre suffisent. Par conséquent, le traitement phosphaté et les couples symbiotiques ont un effet combiné sur le statut de P assimilable dans la rhizosphère.

D'après Raghothama (1999), la disponibilité du P dans la rhizosphère dépend également de l'état racinaire de la plante ; elle peut par endomycorhization, développer sa biomasse racinaire et produire même des racines spécialisées appelées protéoïdes leur permettant d'excréter d'avantage d'acides organiques et d'enzymes.

D'après Hinsinger et Gilkes (1997) l'acidification de la rhizosphère peut contribuer à l'adaptation des génotypes et des espèces légumineuses à la déficience en P par son effet sur la biodisponibilité du P dans la rhizosphère. En outre, si le P est sous forme complexée, comme le phosphate tricalcique, la réaction de solubilisation de P sous l'effet de flux H^+ est la suivante :



Nous avons essayé de vérifier cette dernière hypothèse pour tester l'effet de l'acidification de la rhizosphère sur la variation de la teneur en P assimilable. Pour cela nous avons représenté la corrélation entre le pH rhizosphérique et le P assimilable dans la rhizosphère sous conditions de déficience en P dans le sol, en fonction des différentes lignées étudiées inoculées soit par la souche KA ou celle du CIAT 899.

La teneur du P assimilable dans la rhizosphère est négativement corrélé ($R = -0.7$) avec le pH rhizosphérique dans le cas où les différentes lignées sont inoculées par la souche KA sous conditions de déficience. Sous les mêmes conditions de déficience, la souche CIAT 899 a enregistré un coefficient de corrélation de 0.29 (Figure 27.1).

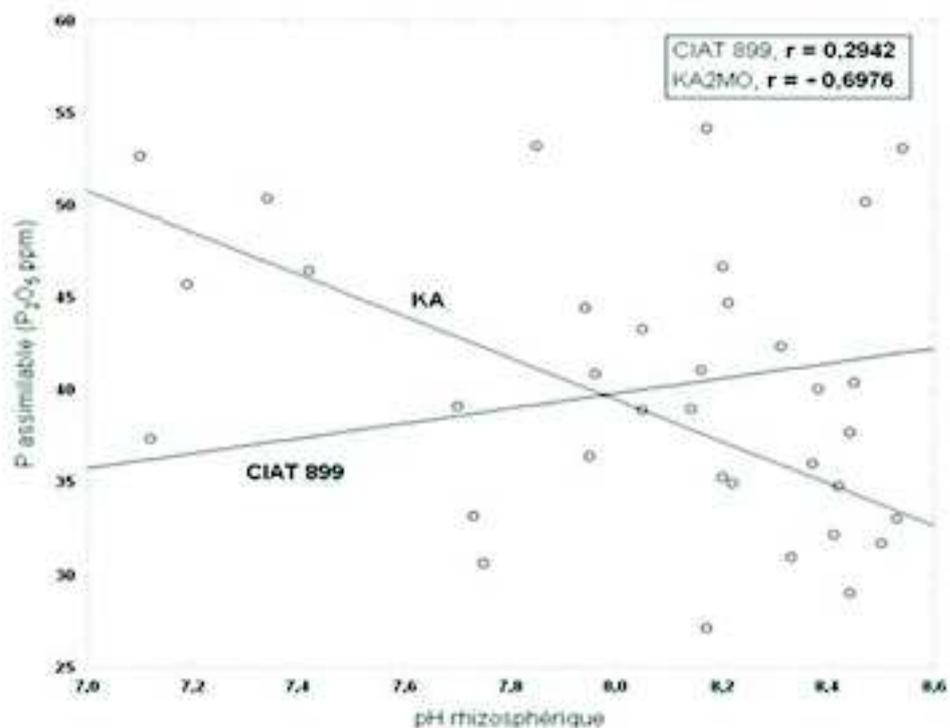


Fig 27.1 : *Corrélation entre le pH rhizosphérique et la teneur de P assimilable dans la rhizosphère chez la souche KA et CIAT 899 sous déficience en P dans le sol.*

La forte corrélation négative ($R = -0.70$) entre le pH rhizosphérique et la teneur en P assimilable peut être expliquée par la forte solubilisation de phosphore tricalcique provoquée par la souche de KA sous limitation du P dans le sol, ce qui confirme son pouvoir de solubilisation du PTC in vitro sur le milieu PKV (Figure 15).

2.4. Effet de la déficience en phosphore sur la fixation symbiotique de l'azote

2.1.1. Effet de la déficience en phosphore sur la biomasse nodulaire

L'ANOVA montre une différence très hautement significative ($P < 0.001$) de la biomasse nodulaire entre les différents couples symbiotiques. En conditions de suffisance en P, le couple symbiotique K-115 présente la biomasse nodulaire la plus importante (0.30g), la biomasse nodulaire la plus faible est enregistrée avec le couple C-Dj (0.19g). En conditions de déficience en P, la plus grande biomasse nodulaire est constatée toujours chez le couple K-115 (0.47g) alors que la plus faible est notée chez le couple symbiotique C-Dj (0.12g).

L'effet du traitement phosphaté est très hautement significatif ($P < 0.001$) sur la biomasse sèche des nodules. Tous les couples symbiotiques présentent une biomasse nodulaire supérieure sous suffisance en P que sous déficience. La plus importante amélioration est notée chez le couple C-7 (66%), la plus faible chez le couple K-7 (25%). Cependant chez les lignées 115, 75 et 83 inoculées avec la souche KA l'inverse est observé ; la plus forte augmentation est obtenue chez le couple symbiotique K-115 (56%).

L'interaction entre le traitement phosphaté et les couples symbiotiques a eu un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) sur la biomasse nodulaire.

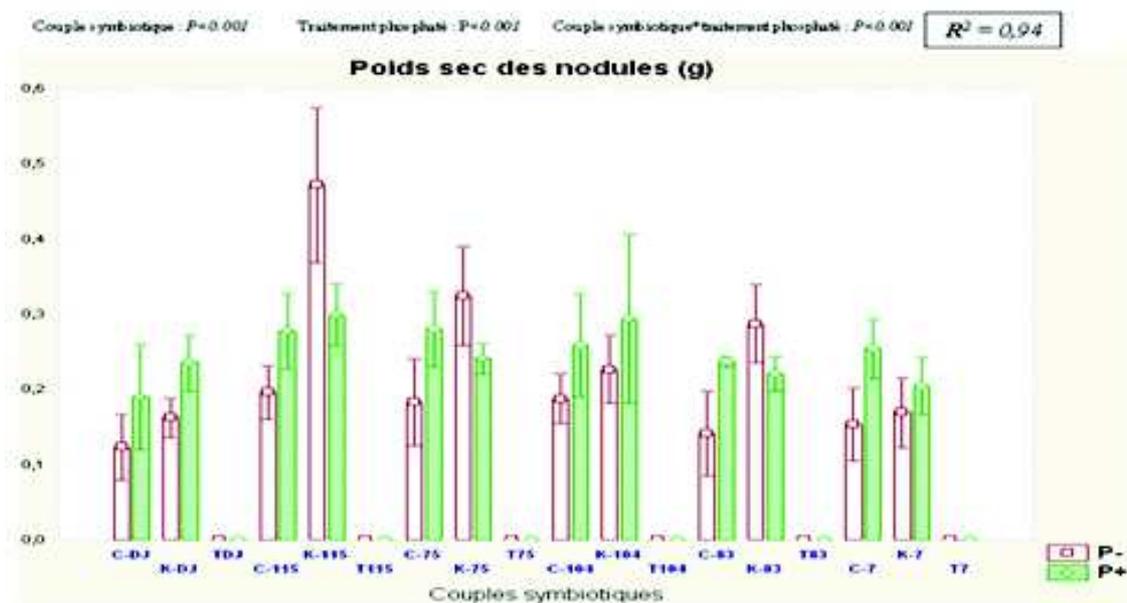


Fig 28 : Variation du poids sec des nodules chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

La diminution de la biomasse nodulaire sous déficience de P a été rapportée par plusieurs auteurs chez de nombreuses espèces ; *Phaseolus vulgaris* (Vadez *et al.*, 1996 ; Shamseldine *et al.*, 2005 ; Djadjaglo *et al.*, 2008 ; Kouas *et al.*, 2009 et Alkama, 2010), *Pisum sativum* (Geneva *et al.*, 2006), *Glycine max* (Ronnie, 1986 ; Shu-Jie *et al.*, 2006 ; Zarrin *et al.*, 2007 et PAN *et al.*, 2008).

Nos résultats sont similaires à ceux observés par Alkama (2010). Selon cet auteur, la déficience en P provoque une diminution de la biomasse nodulaire chez 7 lignées contrastantes (115, 104, 75 et la 83) du haricot inoculées par la souche CIAT 899 dont la plus importante diminution est de 71%. Le même auteur a également rapporté une meilleure nodulation chez la variété El Djadida par rapport aux lignées contrastantes.

En revanche, Diaw (2002), rapporte qu'aucun effet significatif des souches de Rhizobium ou des variétés de haricot (Bronco et de Nérina) sur le poids sec des nodules ainsi qu'aucune interaction entre les deux facteurs (souche rhizobia*variété du haricot).

Tang *et al.*, 2001 constatent que la déficience en P a un effet déterminant sur le développement des nodules en limitant l'approvisionnement en métabolites provoquant ainsi la diminution de la biomasse nodulaire.

2.4.2. Effet de déficience en phosphore sur l'Activité Réductrice d'Acétylène (ARA)

L'activité réductrice d'acétylène (ARA) est mesurée pour évaluer la fixation symbiotique de l'azote par les différentes associations symbiotiques étudiées.

La figure 29 représente la variation de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) chez l'ensemble des couples symbiotiques étudiés sous les deux niveaux de traitement phosphaté

L'ANOVA montre un effet très hautement significatif ($P < 0.001$) des couples symbiotiques, le traitement phosphaté et de l'interaction entre les deux sur l'ARA.

La déficience en P induit une diminution hautement significative de l'ARA chez l'ensemble des associations symbiotiques à l'exception de K-75, K115 et K-83 qui ont une fixation très importante sous les conditions de limitation de P.

En condition de déficience, la lignée 115 associée à la souche KA présente la plus grande valeur de l'ARA (42,6 $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$), la plus faible valeur est observée chez la lignée 7 inoculée par la souche CIAT 899 (7.75 $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$).

En condition de suffisance de P dans le sol, la lignée 115 inoculée par la souche KA est toujours celle qui a enregistré la meilleure valeur de l'ARA (36 $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$) alors qu'avec la lignée 7 inoculée par la souche CIAT 899, on observe la plus faible valeur (13 $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{h/plante}$).

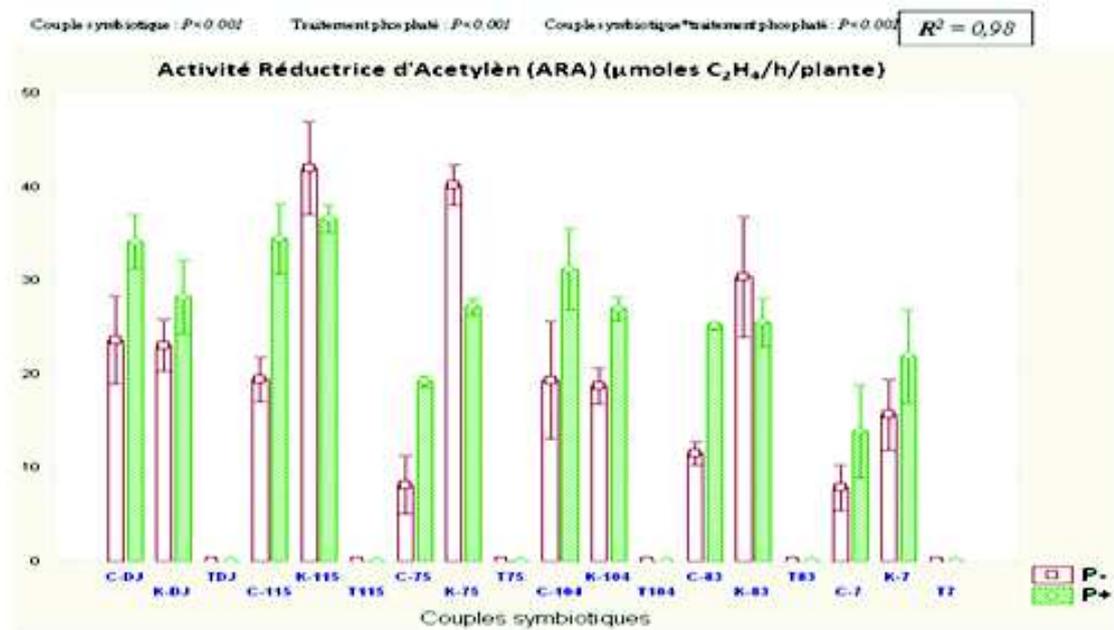


Fig 29 : Variation l'Activité Réductrice d'Acétylène (ARA) chez les couples symbiotiques en fonction du traitement phosphaté.

Shamsldine *et al.* (2005) rapportent que l'inoculation avec la souche EBRI 21 a un effet positif sur l'ARA chez le haricot où une augmentation significative de l'activité réductrice d'acétylène est observée par rapport à la souche CIAT 899.

Diaw (2002), note un effet significatif de la variation génotypique chez le haricot et l'inoculation rhizobienne sur l'ARA. D'après TANG *et al.* (2001), la suffisance en P induit une augmentation de l'ARA accompagnée par une augmentation de la concentration en l'azote de la partie aérienne.

L'augmentation de la fixation symbiotique représentée par l'augmentation de l'ARA sous condition de suffisance en P est due à la stimulation du développement nodulaire. Ce constat est discuté par plusieurs auteur chez de nombreuses espèces à savoir le trèfle *Trifolium* (Hogh-Jensen *et al.*, 2002) ; *Pisum sativum* (Geneva *et al.*, 2006), *Glycine max* (Shu-Jie *et al.*, 2006) et *Phaseolus vulgaris* (Vadez *et al.*, 1996 ; Kouas *et al.*, 2009 ; Alkama *et al.*, 2009 et Alkama, 2010).

Par contre, la perturbation des fonctions nodulaires sous la déficience en P induit l'inhibition des réactions énergétiques au sein des cellules nodulaires, ce qui résulte en

une diminution de la biomasse bactérienne et par conséquent la fixation symbiotique (Sa et Israel, 1991).

Les lignées 115, 75 et la 83 associées avec la souche rhizobienne KA montrent une meilleure fixation symbiotique sous les conditions de déficience en phosphore, cette forte fixation symbiotique est accompagnée par une biomasse nodulaire importante et une forte biomasse sèche de la partie aérienne.

La corrélation de la biomasse nodulaire avec la biomasse de la partie aérienne et de l'ARA a permis d'expliquer le comportement contrastant observé chez les trois couples symbiotiques (K-115, K-75 et le K-83) sous déficience en P lorsqu'elles sont associées avec la souche KA.

La biomasse nodulaire est corrélée positivement avec l'ARA (0,67 (P+) ; 0,87 (P-)) et la biomasse sèche de la partie aérienne ((0,02 (P+) ; 0,57 (P-)) lorsque les lignées sont inoculées avec la souche KA. Cette corrélation est d'avantage significative sous conditions de déficience en P (Figure 30).

Sous déficience en P, la souche KA par rapport à la CIAT 899, a induit une stimulation de la biomasse nodulaire particulièrement avec les lignées 115, 75 et la 83, ce qui a permis une forte fixation symbiotique accompagnée par une forte accumulation de la biomasse sèche de la partie aérienne (Figure 30).

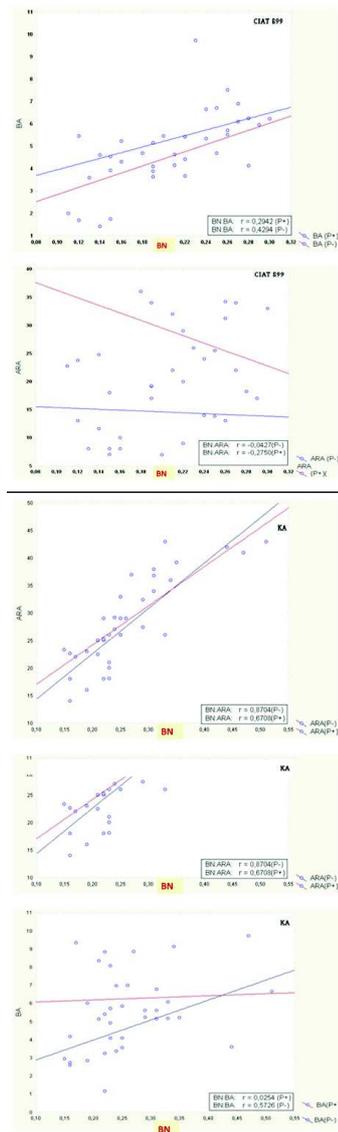


Fig 30 : Corrélation de la biomasse nodulaire avec l'ARA et la biomasse sèche de la partie aérienne (BA) (P-: Sol déficient ; P+ : Sol suffisant).

3. Discussion générale et synthèse

3.1 Réponse des différents couples symbiotiques à la déficience en P

Afin de déterminer la nature et le degré de divergence entre les différents couples symbiotiques étudiés vis-à-vis de l'adaptation à la déficience en P dans le sol, une analyse en composantes principales (ACP) et une classification hiérarchique ont été effectués sur les différents paramètres étudiés.

Seuls les deux premiers axes de l'ACP (Figure 31) expriment 72,50% de la variabilité. L'axe I (facteur 1) a absorbé 56,35% de la variation, cet axe associe les paramètres suivants: surface foliaire, hauteur de la tige, biomasse de la partie aérienne et celle de la partie racinaire, la concentration en P dans la partie aérienne, le P totale prélevé, efficacité du prélèvement de P, l'ARA et la biomasse nodulaire, et qui participent à 86% de sa formation.

L'axe 2 qui a expliqué 16,15% de la variation, définit les variables pH rhizosphérique, la concentration en P dans les racines et le P assimilable, qui ont contribué à 59% de la variation (Figure 31).

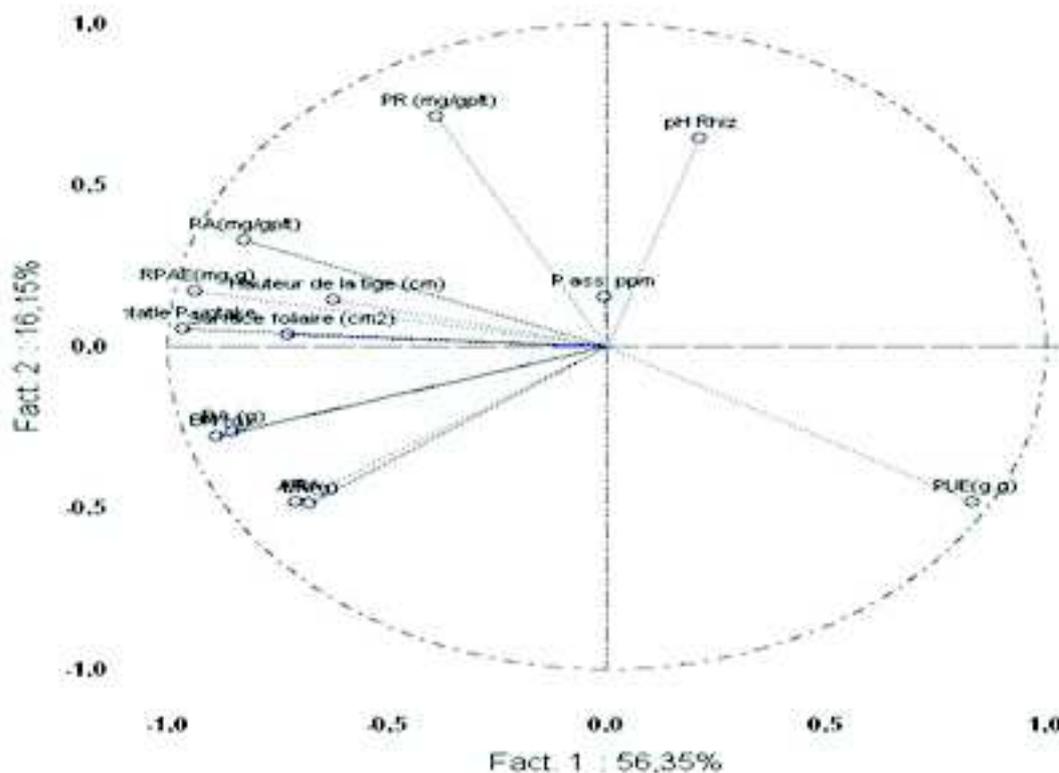


Fig 31 : Analyse des composantes principales qui représente la circule de corrélations entre les différents paramètres en conditions de déficience en P.

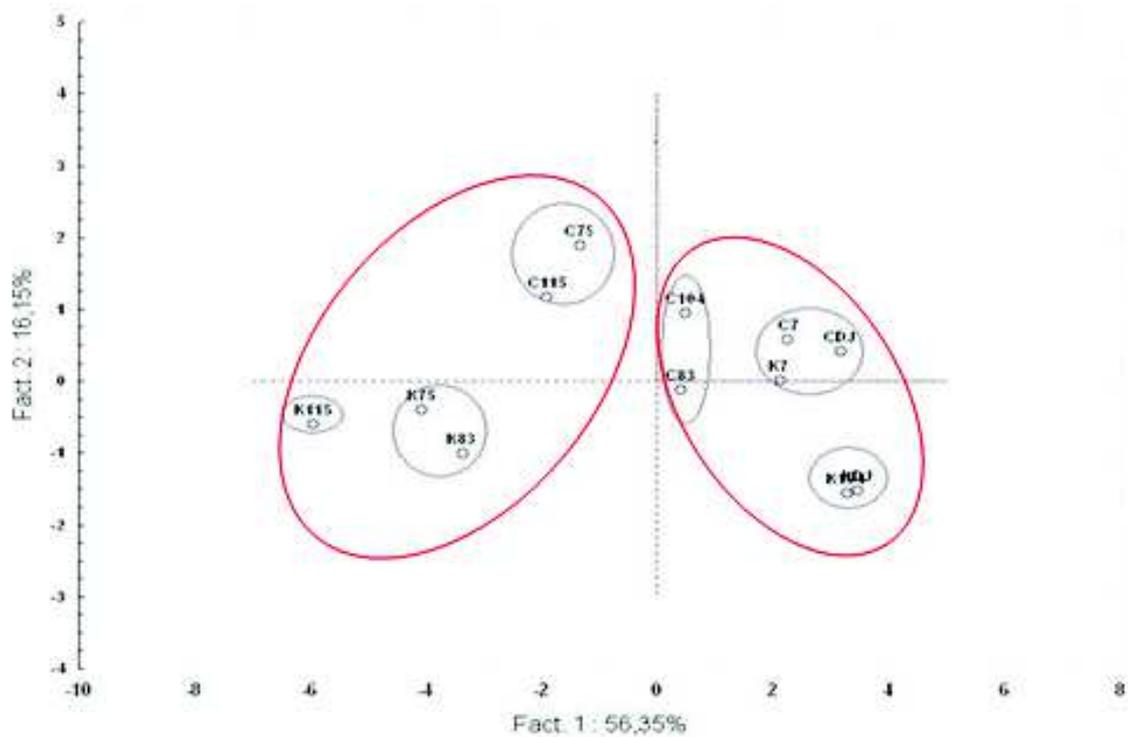


Fig 32 : Représentation graphique de la distribution spatiale des 12 couples symbiotiques dans les plan1-2 d'une analyse en composantes principales sous déficience en P.

La projection (Figure 32) des points moyens des différents couples symbiotiques étudiés sur le plan défini par les axes 1 et 2 a montré leur réponse à la déficience en P en fonction des paramètres étudiés. Suivant l'axe 1, un regroupement plus homogène des couples symbiotiques selon leur tolérance à la déficience a été observé. En effet une opposition nette a été enregistrée entre les couples tolérants et sensibles. Les couples symbiotiques sensibles à la déficience en P dans le sol et qui sont : C-7, K-7, C-Dj, K-Dj, C104, K-104 et le C-83, sont caractérisés par une faible biomasse sèche, une faible teneur en P totale, une faible efficacité du prélèvement de P, une faible fixation symbiotique et une grande efficacité d'utilisation de P. tandis que les couples symbiotiques tolérants à la déficience en P; K-83, K-115, C-115, K-75 et le C-75 sont caractérisée par une : biomasse sèche élevé, une forte teneur de P, une forte efficacité du prélèvement de P, forte fixation azoté et une faible efficacité d'utilisation de P.

L'analyse du dendrogramme construit avec la méthode de WARD (Figure 33) a permis de distinguer deux groupes différents pour leur tolérance à la déficience en P selon les variables étudiées, la séparation des groupes par ACH rejoint celle établie par l'ACP.

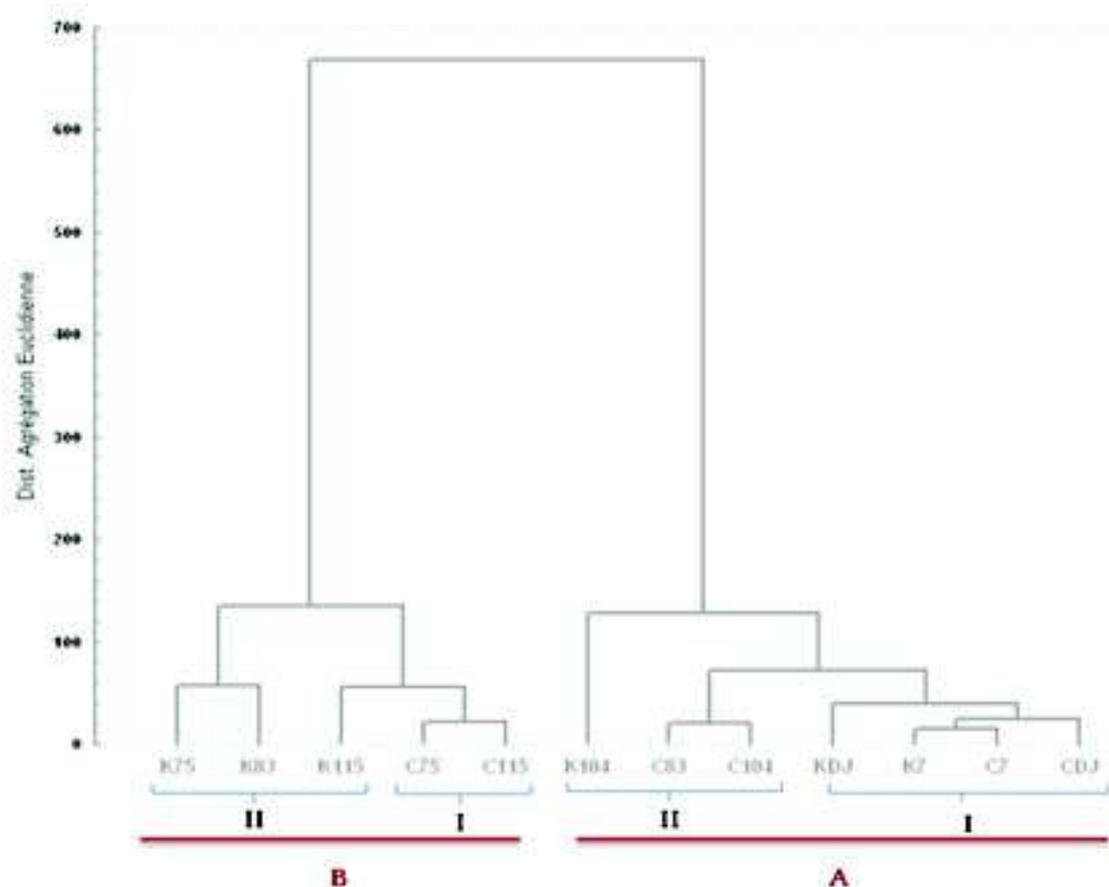


Fig 33: Classification hiérarchique des différents couples symbiotiques sous déficience en P, selon la méthode de Ward.

Le premier groupe (B) (Figure33) comporte les interactions symbiotiques tolérantes à la déficience en P et caractérisées par une forte croissance végétative, une forte teneur en phosphore totale, une efficacité du prélèvement de P élevé, une faible efficacité d'utilisation de P et une forte fixation symbiotique. Ce groupe se subdivise en deux sous-groupes, le premier sous-groupe (I) présente une faible tolérance à la déficience en P, il est constitué par la lignée 115 et la 75 associées avec la souche CIAT 899, le deuxième sous-groupe (II) est caractérisé par une forte tolérance et comporte les lignées 75, 83 et la 115 associée avec la souche KA.

Le deuxième groupe (A) (Figure33) comporte les couples symbiotiques sensibles à la déficience en P. Il est caractérisé par une faible croissance végétative, une faible teneur en phosphore totale, une efficacité de prélèvement de P faible, une grande efficacité d'utilisation de P et une faible fixation symbiotique. Ce groupe est subdivisé en deux sous-groupes, le premier sous-groupe (I) présente une forte sensibilité, il est constitué par la variété Dj et la lignée 7 associées avec la souche CIAT 899 ou KA, le deuxième sous-groupe (II) est caractérisé par une faible sensibilité à la déficience ; il comporte les associations symbiotiques C104, K-104 et le C-83.

3.2. Screening de l'efficacité d'utilisation du P (PE) chez les différents couples symbiotiques

Pour évaluer l'efficacité d'utilisation du P (Phosphorus efficiency : PE) des différentes lignées du haricot qui sont en interaction avec les deux types de souches étudiées, des méthodes de screening de PE ont été utilisées.

Il existe deux méthodes pour le screening de PE ; une méthode directe qui consiste en la comparaison directe d'un seul paramètre à savoir la biomasse de la partie aérienne (Ozturk *et al.* 2005) ou le P totale prélevé (Gill *et al.* 2004). La deuxième méthode est basée sur l'évaluation du PE en fonction de multiples paramètres. Cette dernière méthode nécessite l'utilisation de l'analyse de classification hiérarchique (ACH) (Cao et Pan, 2000 ; Li *et al.*, 2003).

La technique multiple dont divers paramètres sont utilisés pour le screening du PE est la meilleure technique par rapport aux méthodes singulières car les interactions entre les paramètres seront prises en compte. Cependant l'utilisation de l'ACH n'explique pas la contribution relative des différents paramètres au PE, ce qui peut avoir comme conséquence l'incertitude dans l'estimation du PE (Pan *et al.*, 2008).

L'analyse en composantes principales (ACP) est une technique récemment utilisée pour le screening du PE ; elle a été employée pour l'évaluation de la qualité du sol (Sui *et al.*, 2005; Fang et Xie, 2004) et pour étudier la variabilité génétiques (Jin, 1990).

PAN *et al.* (2008) ont présenté la première tentative de l'utilisation de l'ACP couplée avec ACH pour le screening du PE sur plusieurs génotypes de soja. Nous avons employé la même technique utilisée par ce dernier auteur pour l'évaluation du PE des différentes lignées du haricot et qui sont en interactions avec les deux types de souche à savoir la CIAT 899 et la souche KA.

La PE est estimée par une ACP entre les différents paramètres étudiés à P- (déficience en P) et les index des paramètres en P- relative aux ceux à P+ (suffisance en P) ; généralement seules les composantes principales (CPs) dont la valeur propre est supérieure à 1 sont pris dans l'ACP. Trois CPs de chaque couple symbiotique ont été maintenus pour l'estimation, le taux de contribution cumulative de ces CPs est 87% c'est-à-dire qu'elles représentent 87% de la variation entre les différents paramètres étudiés.

Le poids relatif de chaque PC (PR) est calculé pour chaque couple symbiotique à travers le taux de contribution relatif de chaque PC à la variation entre les différents paramètres.

La composante des paramètres (la valeur F) pour l'évaluation de PE des différentes interactions symbiotiques est calculée à travers les PCs retenus et leurs poids relatifs correspondants pour chaque couple symbiotique à savoir :

$$F = \sum_{k=1}^{n=12} PC_k + PR_k$$

La valeur F a permis l'estimation du PE des différentes associations symbiotiques en fonction des différents paramètres physiologiques et morphologiques étudiés. Pour comparer la PE des différents couples symbiotiques selon la valeur F, un ACH pour classer les différentes interactions symbiotiques en fonction de leur PE a été réalisé (valeur F).

La classification ascendante des différents couples symbiotiques en fonction de leur efficacité d'utilisation de P est représentée par la figure 34.

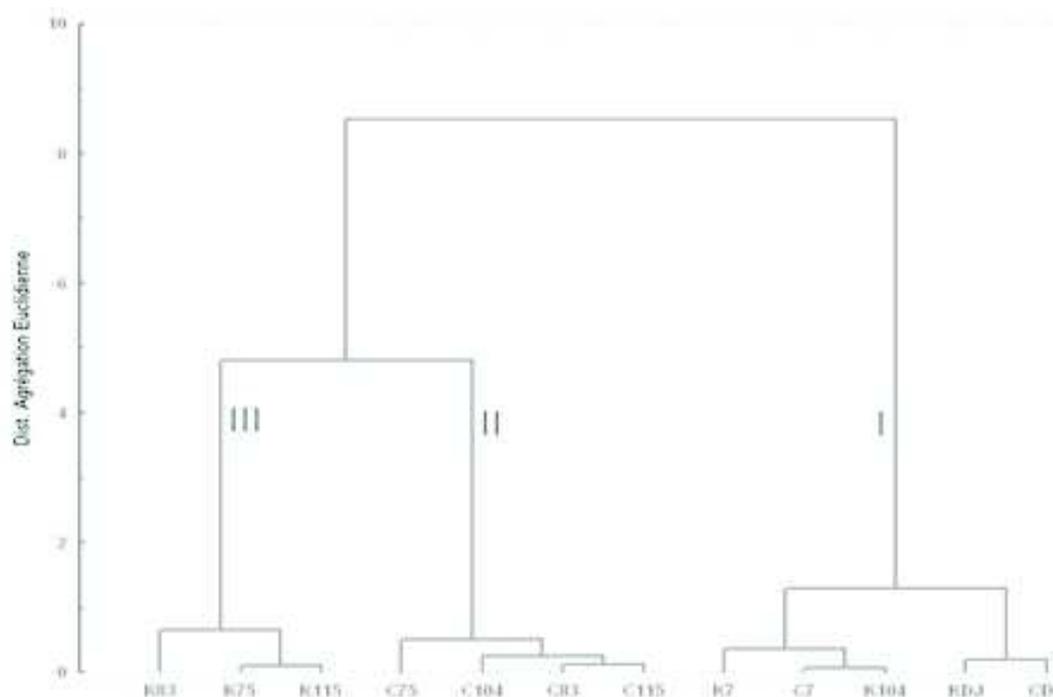


Fig 34 : Classification hiérarchique par la méthode de Ward des différents couples symbiotiques en fonction de PE (valeur F) ; I, II et III représentent respectivement PE faible, PE modéré et PE élevée.

L'analyse du dendrogramme construit avec la méthode de Ward (Figure 34) a permis de distinguer trois groupes différents pour leur PE.

Le premier groupe comporte la catégorie dont la PE est le plus faible ($F > 0,7$), cette catégorie est constituée par la lignée El Djadida et la lignée 7 qu'elles soient inoculées par la souche CIAT 899 ou KA, et par la lignée 104 inoculée par la souche KA.

Le deuxième groupe est constitué par les couples symbiotiques C-115, C- C-75, C-104 et le C-83 ; cette catégorie est caractérisée par une PE modérée ($0,7 > F > -0,7$). Enfin le troisième groupe qui comporte les interactions symbiotiques les plus efficaces en phosphore ($F < -0,7$), se sont les lignées 115, 83 et la 75 associées à la souche rhizobienne KA.

D'après ces résultats, on constate que la variété locale d'El Djadida et la lignée 7 sont celles les moins efficaces en P par rapport aux autres lignées.

Les différentes lignées inoculées par la souche KA sont caractérisées par la meilleure PE à l'exception de la ligne 104 qui présente la meilleure PE lorsqu'elle est associée avec la souche CIAT 8999.

L'inoculation par la souche KA a permis l'augmentation de la PE des différentes lignées plus particulièrement la 83, la 75 et la 115.

La variation des différents paramètres utilisés pour le screening de la PE des différents couples symbiotiques en fonction de l'augmentation de la PE est représentée par la figure 35.

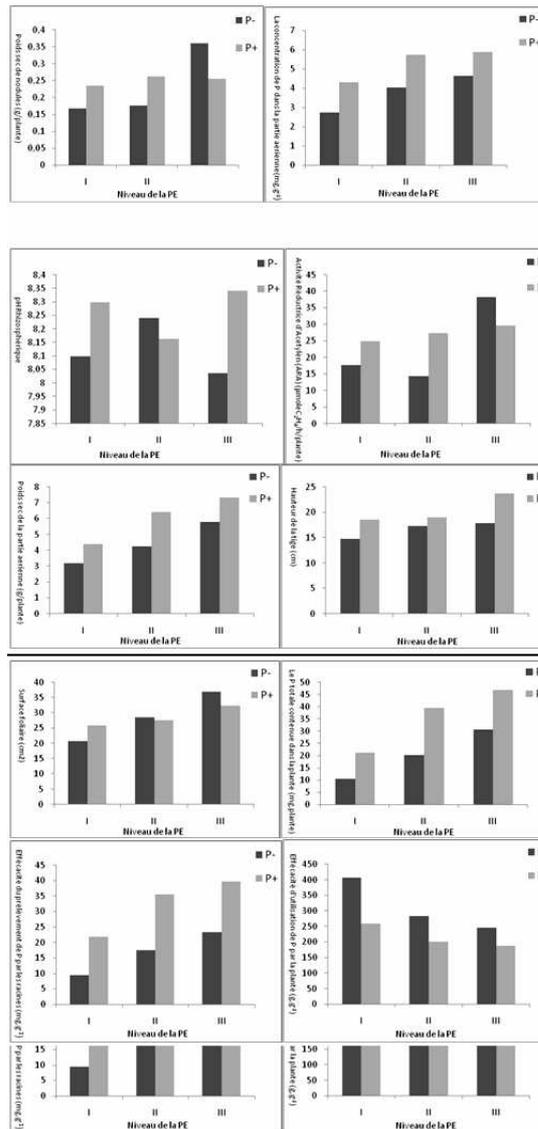


Fig 35: variation des différents paramètres utilisés dans le screening de la PE dans les conditions de déficiences et celle de suffisances en fonction de l'augmentation de niveau de la PE : I, II et III représentent respectivement le niveau faible de PE, le niveau modéré et le niveau élevé.

D'après la figure 35, sous déficience ou suffisance en P dans le sol, les couples symbiotiques les plus efficaces en P sont ceux qui possèdent la plus importante biomasse sèche aérienne, une grande hauteur de la tige et surface foliaire, une meilleure efficacité du prélèvement de P, une forte teneur en P totale et une forte concentration en P dans la partie aérienne.

Cependant, en condition de déficience en P, les couples symbiotiques les plus efficaces en P sont ceux qui ont enregistré la meilleure fixation symbiotique, le pH rhizosphérique le plus faible et la plus grande biomasse nodulaire, par contre ils ont la plus faible efficacité d'utilisation du P.

L'augmentation de l'efficacité d'utilisation de phosphore est une stratégie importante pour tolérer la déficience en phosphore (Raghothama, 1999 ; Bates et Lynch, 2001 ; Vance *et al.*, 2003).

PAN *et al.* (2008) rapportent que l'augmentation du PE chez le soja est accompagnée par une augmentation de l'efficacité d'utilisation du P et une diminution de l'efficacité du prélèvement de P.

Alkama, (2010) rapporte aussi que les lignées du haricot les plus tolérantes à la déficience en P sont caractérisées par une forte fixation symbiotique et une efficacité d'utilisation de P importante.

D'après nos résultats, il y a une augmentation de la fixation symbiotique et du prélèvement du P ainsi qu'une diminution de l'efficacité d'utilisation de P par la plante chez les interactions symbiotiques les plus efficaces en P. Ceci peut être expliqué par la forte acidification de la rhizosphère notée chez les lignées associées plus particulièrement avec la souche KA afin de constituer une forte interaction symbiotique caractérisée par une grande capacité de solubilisation de P dans la rhizosphère. A cet effet, la teneur de P assimilable augmente ce qui va permettre à la plante d'augmenter son prélèvement en P. Par conséquent, l'efficacité d'utilisation de P par la plante va diminuer car le phosphore est suffisamment disponible dans la rhizosphère.

Dans la pratique, les paramètres qui sont choisis pour faire le screening de la PE sont ceux qui doivent avoir une forte relation avec la PE et qui sont faciles à mesurer (Pan *et al.*, 2008). Ding et Li (1998) ont rapporté que la surface foliaire, l'activité de la phosphatase, la biomasse sèche et la teneur en azote totale sont corrélés significativement avec les paramètres du rendement ; ils sont donc nécessaires à l'évaluation de la PE des légumineuses. Tong et Yan (1999) ont noté que le P total prélevé et la biomasse sèche sont deux paramètres intéressants pour le screening de la PE chez le soja. Cependant, Tong *et al.* (2000) ont démontré que le P contenu dans la partie aérienne présente une forte corrélation avec la PE, et le considèrent comme un indice très important dans l'évaluation de la PE.

Dans notre travail la PE des différents couples symbiotiques a été évaluée à partir de dix paramètres qui ont présenté une différence significative avec les couples symbiotiques. Sous déficience en P, la PE a présenté une forte corrélation (Tableau 11), avec les paramètres symbiotiques (biomasse nodulaire et ARA), les paramètres de croissance (hauteur de la tige, surface foliaire et la biomasse sèche de la partie aérienne), la PUE, l'efficacité du prélèvement du P, la concentration en P dans la partie aérienne et le P total prélevé par la plante. En revanche, en condition de suffisance en P, la PE a présenté de faibles corrélations avec les différents paramètres de screening par rapport à celles observées sous déficience en P.

Ces derniers résultats sont similaires avec ceux rapportés par Pan *et al.* (2008) qui notent une faible corrélation sous conditions de suffisance en P des différents paramètres employés pour le screening de la PE chez le soja.

Paramètres	P-	P+	P-/P+
Biomasse nodulaire sèche(g)	-0,802609	-0,380675	-0,804038
Biomasse de la partie aérienne sèche (g)	-0,898417	-0,702423	-0,311407
Concentration en P dans la partie aérienne (mg/g ¹)	-0,615055	-0,349511	-0,559389
Activité Réductrice d'Acétylène (ARA)	-0,647698	-0,213602	-0,653332
pH Rhizosphérique	0,243180	-0,178353	0,151180
Surface foliaire (cm ²)	-0,872701	-0,334625	-0,594898
Hauteur de la tige (cm)	-0,700429	-0,557372	0,157565
Phosphore total prélevé (mg.plante)	-0,842526	-0,611302	-0,707551
RPAE (mg.g ¹)	-0,786589	-0,459076	-0,619851
PUE (g.g ¹)	0,684302	0,383008	0,625780

Tableau 11: Corrélation entre la PE et la valeur des différents paramètres sous déficience en phosphore (P-) sous suffisance (P+) et le rapport P-/P+.

CONCLUSION GENERALE

La réponse du haricot (*Phaseolus vulgaris*) à la déficience en phosphore et son influence sur la biodisponibilité du phosphore dans la rhizosphère, sont étudiés sur cinq lignées recombinantes de haricot (7, 75, 83, 104 et la 115) et une variété cultivée localement (El Djadida). Deux souches rhizobiales ont été choisies pour l'inoculation ; une souche de référence CIAT 899 et une souche isolée native dénommée KA, isolée à partir d'un sol d'El Kala.

Contrairement à la souche de référence, la souche KA présente *in vitro* un pouvoir de solubilisation de phosphore sur les milieux PVK et NBRIP. L'indice de solubilisation de phosphore (IS) enregistré après 15 jours d'incubation est respectivement de 0,83 et 0,58.

La déficience en phosphore affecte la croissance et la fixation symbiotique du haricot. Des réductions significatives sont observées au niveau du poids sec des parties aériennes (33.8%), de la surface foliaire (23%), de la hauteur des tiges (27%), du poids sec de nodules et de l'activité réductrice d'acétylène à l'exception des lignées 115, 75 et la 83 associées à la souche KA.

La limitation du P dans le sol a également induit une réduction de la concentration en P dans la partie aérienne (25%), le P totale prélevé (45%) et l'efficacité de prélèvement de P (110%). En revanche l'efficacité d'utilisation de P a connu une augmentation significative (82%).

L'inoculation du haricot se traduit par un effet complémentaire en synergie avec l'apport phosphaté. Les plantes inoculées ont présenté une meilleure, biomasse sèche, teneur en P total, efficacité de prélèvement du P et la disponibilité du P dans la rhizosphère par rapport au témoin fertilisé et non fertilisé. Cette dernière amélioration est plus marquée avec la souche KA qu'avec la souche CIAT 899.

L'analyse statistique des données indique une différence significative entre les deux traitements phosphatés d'une part et entre les couples symbiotiques d'autre part. Par ailleurs, le screening de l'efficacité vis-à-vis du P des différents couples symbiotiques révèle la présence de trois groupes. Le premier groupe comporte les couples symbiotiques les plus efficaces qui sont la lignée 83, 75 et la 115 inoculées par la souche KA ; le deuxième groupe se caractérise par une efficacité en P modérée, il comporte les lignées 115, 104, 83 et la 75 inoculées par la souche CIAT 899 ; le troisième groupe comporte les combinaisons symbiotiques K-104, C-Dj, K-Dj, C-7 et le K-7 qui sont les moins efficaces vis-à-vis du phosphore.

Dans notre étude, l'inoculation et particulièrement par la souche solubilisatrice de phosphore (KA), a joué un rôle dans l'adaptation de la plante hôte à la déficience en phosphore améliorant ainsi sa tolérance à ce stress. Nos résultats permettent d'envisager l'utilisation des bactéries solubilisatrices de phosphore dans les pratiques agronomiques, ce qui va aider non seulement à excentrer le coût élevé d'engrais phosphatés mais aussi à mobiliser le phosphore insoluble dans les engrais et les sols.

La sélection des associations symbiotiques ayant un potentiel de fixation élevé, efficaces dans l'utilisation de phosphore et les plus productives, sera d'une importance

stratégique. En effet, leur emploi permettrait de résoudre le problème lié aux réserves de phosphore dans le sol.

A partir des résultats obtenus, des recommandations et des perspectives peuvent être proposées pour compléter ce travail :

- Il serait intéressant de poursuivre ce travail, d'une part, par la sélection des lignées ayant un potentiel de fixation d'azote élevé, efficaces dans l'utilisation de phosphore et qui présentent une meilleure adaptation à la déficience en phosphore sous serre. D'autre part, par une étude de comportement, des couples symbiotiques attestés tolérants à la déficience en phosphore, en condition de plein de champ.
- Une caractérisation moléculaire, phénotypique et biochimique approfondie du partenaire microbien afin de connaître les mécanismes et les gènes impliqués dans le contrôle de la solubilisation du phosphore dans la rhizosphère.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abaidoo R.C., George T., Bohlool B.B., Singleton P.W., 1989.** Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strain in field-grown soybean and common bean. *Microbiol* 36, 92-96.
- Abdenour H., 1982.** Etude de la fixation de l'azote chez quelques légumineuses. Thèse d'ing. ENSA (Ex. INA), EL HERRACH, 72p.
- Adams M.W., Coyne D. P., Davis J.H., Graham P.H., Francis C.A., 1985.** Common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Ed. In R. J. Summer field and E. H. Roberts, Colins, London, Grain Legume Crops, 433-476.
- Alem C., Labhilili M., Brahmi K., Jibene M., Nasrallah N., Filali-Maltouf A., 2002.** Adaptation hydrique et photosynthétique du blé dur et du blé tendre au stress salin. *Compte Rendu Biologie* 325, 1097-1109.
- Alikhani H.A., Rastin N.S., Antoun H., 2006.** Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant Soil* 287, 35-41.
- Alkama N. , Bolou Bi Bolou E., Vailhe H. , Lucien 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. *SoilBiology and Biochemistry* 41, 1814-1823.
- Alkama N., 2010.** Adaptation de la symbiose rhizobienne chez le haricot à la déficience en phosphore : Détermination de la réponse de la plante en termes d'échange gazeux et de flux minéraux échangés avec la rhizosphère. Thèse doc. ENSA. El Harrach, Alger, 174p.
- Amijee F., Barroclough P.B., Tinker P.B., 1991.** Modeling phosphorus uptake and utilization by plants. *72a*, 62-75.
- APG, 2003.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141, 399-436.
- Assuero S.G., Mollier A., Pellerin S., 2004.** The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. *Plant Cell and Environment* 27, 887-895.
- Balandreau J., Dommergues Y., 1970.** Mesure insitu de l'activité nitrogénase. *C.R. AcadSci* 273, 2020-2023.
- Bariola P.A., Howard C.J., Taylor C.P., Verburg M.T., Jaglan V.D., Green P.J., 1994.** The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J* 6, 673-85.
- Bates T.R., Lynch J.P., 1996.** Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorous availability. *Plant Cell Environ* 19, 529-38.

- Baudoin J.P., Camarena F., Lobo M., 1995.** Amélioration de quatre espèces de légumineuses alimentaires tropicales *Phaseolus vulgaris*, *P. coccineus*, *P. polyanthus* et *P. lunatus*. Sélection intra- et interspécifique. In Quel Avenir Pour l'amélioration des Plantes? Ed. AUPELF-UREF John Libbey Eurotext. Paris, 31-49.
- Beau C.H., 1983.** Essais d'inoculation « NIFTAL ». FAO/GRET, VI EXPE 6, 1-7.
- Blondeau, R., 1980. Fixation Biologique de l'azote atmosphérique. Libraire Vuibert, Paris. 103p.
- Bernal L., Coello P., Martinez-Barajas E., 2005.** Possible role of R1 protein on starch accumulation in bean seedling (*Phaseolus vulgaris* L.) under phosphate deficiency. Plant Physiol 162, 970-976.
- Bergersen F.J., 1966.** Some properties of nitrogen-fixing breis prepared from soybean root nodules. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subject 130 (28), 304-312.
- Bergey's., 1984.** Manuel of systematic bacteriology. Vol. 1. Ed. Noel, R., Krieg, Paris, 122 p.
- Bliss F.A., 1993.** Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. Plant Soil 152, 71-79.
- Broughton W.J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J., 2003.** Beans (*Phaseolus* sp). Model food legumes. Plant and Soil 252, 55-128.
- Canado I.C., Doussinague C., Villena E., 2003.** Technicien en agriculture. Ed. Cultural S. A., Madrid. 519p.
- Cao L.M., Pan X.H., 2000.** Screening and identification of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes on the tolerance to low phosphorus environment. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis 22, 162-168.
- Carswell M.C., Grant B.R., Plaxton W.C., 1997.** Disruption of the phosphate starvation response of oil seed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. Planta 203, 67-74.
- Chen Z., Ma S., Liu L.L., 2008.** Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. Biores Technol 99, 6702-6707.
- Danso S.K.A., 1995.** Assessment of biological nitrogen fixation. Fertilizer research 42, 33-41.
- Darrah P., 1993.** The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. Plant Soil 155-156, 1-120.
- Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. INRA. Paris. 383p.
- Debouck D., 1991.** In Common bean: Research for crop improvement. Ed. A Van Shoonhoven and Voysest. C.A.B International, Wallingford, UK and CIAT, Colombia, systematics and morphology, 55-118.
- De Lajudie P., Willems A., Nick G., Mohamed S.H., Torck U., Coopman R., Filali-Malouf A., Kersters K., Dreyfus B., Lindstrom K., Gillis K., 1999.** Agrobacterium bv. 1 strains isolated from nodules of tropical legumes. Systematic and Applied Microbiology 22, 119-132.

- Diaw N.F., 2002.** Utilisation des inoculums de rhizobium pour la culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*) au Sénégal. Thèse doc. Université Cheikh AntaDiop. Dakar, 97p.
- Ding H., Li S.X., 1998.** Genetic differences in tolerance to low phosphorus and response to phosphorus fertilizer for soybean varieties. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers* 4, 257-263.
- Diouf A., 1997.** Caractérisation et utilisation des souches rhizobium isolées du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.) dans la zone des Niayes au Sénégal. Thèse doc, UCAD. Dakar, 96p.
- Djadjaglo D., Richter C., 2008.** Efficacité du prélèvement du phosphore par les plantes *Sorghum bicolor* L., *Moench* et *Phaseolus vulgaris* L. *Agro Solution* 19 (2), 45-50.
- Djili K., 2000.** Contribution à la connaissance des sols du Nord de l'Algérie, création d'une banque de données informatisée et utilisation d'un système d'information géographique pour la spatialisation et la valorisation des données pédologiques. Thèse doc. ENSA, Alger, 243p.
- Domergues Y., et Mangenot B., 1970.** Ecologie microbienne du sol. Ed. Masson et Cie Paris, 796 p.
- Downie JA., 2005.** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol* 15, 6 p.
- Doyle JJ., Luckow MA., 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131, 900-910.
- Drevon J.J., Hartwig U.A., 1997.** Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soy bean and alfalfa. *Planta* 201, 463-469.
- Drevon J.J., Ounane M.S., 2009.** Coopération sur le thème : Efficacité d'utilisation du phosphore et fixation symbiorhizobienne d'azote dans la culture du haricot. Rapport de mission. Relation internationale. INRA, Paris, 6p.
- Duff S.M.G., Sarath G., Plaxton W.C., 1994.** The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Planta* 90, 791-800.
- Duque F.F., Neves M.C.P., Franco A.A., Victoria L.R., Boddey R.M., 1985.** The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N₂-fixation using I⁵N. *Plant Soil* 88, 333-343.
- Eaglesham A.R.J., 1989.** Rhizobium inoculants: Microbial inoculation of crop plants. Ed. Campbell and Macdonald. IRL Press, Oxford.
- Elkan G.H., 1992.** Taxonomy of rhizobia. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 446-450.
- Etchebest S., 2000.** Croissance foliaire du maïs (*Zeamays* L.) sous déficience en phosphore. Analyse à l'échelle de la plante et à l'échelle de la feuille. PhD Thesis, INAPG, Paris. 99 p.
- Fang P., Xie J.L., 2004.** Integrative evaluation of nutrient status in the paddy soil. *Journal of Zhejiang University(Agriculture and Life Sciences)* 30, 17-21.
- Fankem H., Nwaga D., Deubel A., Dieng L., Merbach W., 2006.** Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *African J. Biotechnol.* 5 (24), 2450-2460.

- Fankem H., 2007.** Diversity and potentials of phosphate solubilizing microorganisms associated with palm-tree (*Elaeis guineensis* Jacq.) rhizosphere in Cameroon. These PhD, University of Yaounde I. 118p.
- FAO., 1996.** Tunisie: Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO sur les ressources phylogénétiques, Ministère de L'Agriculture Tunis.
- FAO.STAT., 2009,** [http://faostat.fao.org/site/339/default](http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx) . aspx.
- George T., Singleton P.W., Bohlool B.B., 1987.** Yield soil nitrogen uptake and nitrogen fixation by soybean from four maturity groups grown at three elevations. *Agron* 80, 563-567.
- Gerloff G.C., Gabelman W.H., 1983.** Genetic basis of inorganic plant nutrition. Ed. Encyclopedia Plant Physiology. New Series, Springer-Verlag 15B, 453-476.
- Geneva M., Zehirov G., Djonova E., Kaloyanova N., Georgiev G., Stancheva I., 2006.** The effect of inoculation of pea plants with mycorrhizal fungi and *Rhizobium* on nitrogen and phosphorus assimilation. *Plant soil environ* 52 (10), 435-440.
- Gill H.S., Singh A., Sethi S.K., Behl R.K., 2004.** Phosphorus uptake and use efficiency in different varieties of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science* 50, 563-572.
- Goldstein A.H., 1992.** Phosphate starvation inducible enzymes and proteins in higher plants. In Society for Experimental Biology Seminar Series 49: Inducible Plant Proteins. Ed. JL Wray. Cambridge, pp. 25-44.
- Gourley C.J.P., Allan D.L., Russelle M.P., 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, 98-112.
- Graham P.H., Temple S.R., 1984.** Selection of improved nitrogen fixation in *Glycine max* (L.) Merr. And *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* 82, 315-327.
- Graham P.H., et Vance C.P., 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131, 872-877.
- Green P.J., 1994.** The ribonucleases of higher plants. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 45, 421-45.
- Gunawardena S.F.B.N., Danso S.K.A., Zapata F., 1992.** Phosphorus requirement and nitrogen accumulation in *Vigna radiate* L (*Welzke*) cultivar. *Plant Soil* 147, 267-274.
- Gull M., Hafeez F.Y., Saleem M., Malik K.A., 2004.** Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilizing bacteria and amixedrhizobial culture. *Exp. Agric* 44, 623-628.
- Hash C.T., Schaffert R.E., Peacock J.M., 2002.** Prospects for using conventional techniques and molecular biological tools to enhance performance of 'orphan' crop plants on soils low in available phosphorus. *Plant and Soil* 245, 135-146.
- Hardarson G., Bliss F.A., Cigales-Rivero M.R., Henson A.R., KipeNolt J.A., Longeri L., Manrique A., Pena-Cabriaes J. J., Pereira P. A. A., Sanabria C. A., Tsai S. M., 1993.** Genetic variation in nitrogen fixation by common bean. *Plant Soil*. 152, 59-70.

- Hart M.R., Quin B.F., Nguyen M.L., 2004.** Phosphorus runoff from agricultural land direct fertilizer effects: review, *Journal of Environmental Quality* 33 (6), 1954-1972.
- Hammond J.P., Broadly M.R., White P.J., 2004.** Genetic responses to phosphorus deficiency. *Ann Bot (Lond)* 94, 323-332.
- Hawkesford M.J., Belcher A.R., 1991.** Differential protein synthesis in response to sulfate and phosphate deprivation: identification of possible components of plasma-membrane transport systems in cultured tomato roots. *Planta* 185, 323-29.
- Hellsten A., Huss-Danell K., 2001.** Interaction effects of nitrogen and phosphorus on nodulation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica. Soil Plant Sci.* 50, 135-142.
- Hernandez G., Ramirez M., Valdes Lopez O., Tesfaye M., Graham M.A., Czechawski T., Schlerdh A., Wandrey M., Erban A., Cheng F., 2007.** Phosphorus stress in common bean : Root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol* 144, 225-265.
- Hinsinger P., Gilkes, R.J., 1997.** Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five plant species grown in acid, P-fixing mineral substrate. *Geoderma* 75, 231-249.
- Hinsinger P., 1998.** How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 64, 225-265.
- Hinsinger P., 2001.** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes. *Plant and Soil* 13, 173-195.
- Hinsinger P., Plassard C., Tang C., Jaillard B., 2003.** Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints. *Plant and Soil* 248, 43-59.
- Jansa J., Mozafar A., Anken T., Ruh R., Sanders I.R., Frossard E., 2002 .** Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12, 225 - 234.
- Jaillard B., Hinsinger P., 1993.** Alimentation minérale des végétaux dans le sol. *Techniques agricoles* 1210, 6p.
- Jaillard B., Plassard C., Hinsinger P., 2003.** Measurements of H⁺ fluxes and concentrations in the rhizosphere. In: Rengel Z, Ed. *Handbook of soil Acidity*. New York, USA, Marcel Dekker, 231-266.
- Isoi T., et Yoshida S., 1991.** Low nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *SoilSci. and Plant Nutrition* 37, 559-563.
- Israel D.W., 1987.** Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiology* 84, 835.
- Jebara M., Aouani M.E., Payre H., Drevon J.J., 2005.** Nodule conductance varied among common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes under phosphorus deficiency. *Plant Physiology* 162, 309-315.
- Jensen H.H., Schjoerring J.K., Soussana J.F., 2002.** The influence of phosphorus efficiency on growth and nitrogen fixation of White Clover plant. *Annals of Botany* 90, 745-753.

- Jin W.L., 1990.** Study on germplasm resources of local adzuki beans in north of China ? Application of principal component analysis to evaluating germplasm resources of local adzuki beans. *Journal of Beijing Agricultural College* 1, 1-6.
- Jones D., 1998.** Organic acids in the rhizosphere. *Plant and Soil* 205, 25-44.
- Jordan D. C., 1984.** International committee on systematic bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 34, 248p.
- Jungk A., Seeling B., Gerke J., 1993.** Mobilization of different phosphate fractions in the rhizosphere. *Plant Soil* 156, 91-94.
- Jungk A., Claassen N., 1997.** Ion diffusion in the soil-root system. *Adv Agron*, 61, 53-110.
- Kania A., Langlade N., martinoia E., Neumann G., 2002.** A physiological and molecule approach to study organic exudation and development of cluster roots in *Lupinus albus* L. Thèse doc, Université de Neuchâtel, n°1614 Ch.
- Kaplan L., 1981.** What is the origin of the common bean? *Eton Bot* 19, 358-368.
- Kentour S., 1999.** Contribution à l'étude des propriétés des graines du haricot dolique (*Vigna unguiculata* L. walp) au cours d'un essai à l'ITMA de Boukhalfa wilaya de Tizi-ouzou. DES de biologie. 44p.
- Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A., 2007.** Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. *Agron Sustain Dev* 27, 29-43.
- Khan MS., Zaidi A., Musarrat J., 2010.** *Microbes for Legume Improvement*. Ed. SpringerWienNewYork, Printed in Germany, 535p.
- Khiari L., Parent L.E., 2003.** Les engrais organo-minéraux à valeur ajoutée, pour une meilleure fertilisation intégrée des agroécosystèmes. Colloque de l'Association québécoise des spécialistes en sciences du sol (AQSSS), 17^e congré. Université de Sherbrooke.
- Kolawole G., TianGuang L., Singh, B.B., 2000.** Differential response of cowpea lines to aluminium and phosphorus application. *Journal of Plant Nutrition* 23, 731-740.
- Kondorosi E., Pierre M., Cren M., Haumann U., Hoffman B., Schell J., Kondorosi A., 1991.** Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the nod regulation in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol* 222, 885-896.
- Kouas S., Debez A., Plassard C., Drevon J.J., Abdelly C., 2009.** Effect of phosphorus limiting on phytase activity, proton efflux and oxygen consumption by nodulated roots of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *African Journal of Biotechnology* 8 (20), 5301-5309.
- Kulkarni S., Surange S., Nautiyal C.S., 2000.** Crossing the limits of *Rhizobium* existence in extreme conditions. *Curr. Microbiol* 41, 402-409.
- Lazrek Ben Friha F., 2008.** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse doc, université de Toulouse III. Toulouse, 254p.
- Lee K.H., Larue T.A., 1992.** Exogenous ethylene inhibits nodulation of *Pisum sativum* L. cv. Sparkle. *Plant Physiol* 100, 1759-1763.

- Lefebvre D.D., Duff S.M.G., Fife C.A., Julien-Inalsingh C., Plaxton W.C., 1990.** Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol*, 93, 504-11.
- 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.
- Li S.C., Gong J., Wang J., 2003.** Screening maize inbred lines seedling for tolerance to low phosphate stress. *Journal of Maize Science* 11, 85-89.
- Link J., Graeff S., Batchelor W.D., Claupein W., 2006.** Evaluating the economic and environmental impact of environmental compensation payment policy under uniform and variable-rate nitrogen management. *Agricultural Systems* 91, 135-153.
- 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 Science* 167, 217-223.
- Lodwig E.M., Hosie A.H.F., Bourdès A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie J.A., Poole P.S., 2003.** Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–rhizobium symbiosis. *Nature* 422, 722-726.
- Lucrecia M., Ramos G., Boddey R.M., 1987.** Yield and nodulation of *Phaseolus vulgaris* and the competitiveness of introduced *Rhizobium*: effect of lime, mulch and repeated cropping. *Soil Biol. Biochem* 19, 171-177.
- Maire V., 2005.** Evaluation expérimentale d'un modèle de prélèvement du phosphore par une culture de maïs irriguée sur un sol sableux landais. Rapport de stage de recherche. Université Sciences Techniques Bordeaux 1. Ed. INRA. Bordeaux, 43p.
- Marschner A., 1995.** Minéral nutrition of high plants. Academic press London. 889p.
- Mengel K., Kirkby E., 2001.** Principles of plant nutrition. 5^{ème} édition. Klumer Academic Publishers. 849p.
- Mollier A., Pellerin S., 1999.** Maize root system and development as influenced by phosphorus deficiency. *Exp Bot.* 50, 487-497.
- MO-MET-UVV., 2007.** Dosage du P par la méthode au vert malachite. Version 2. INRA, 5p.
- Morel C., Tunney H., Plénet D., Pellerin S., 2000.** Transfer of phosphate ion between soil and solution : Perspectives in soil testing. *Journal of Environmental Quality* 29, 50-59.
- Morel C., 2002.** Caractérisation de la phyto-biodisponibilité du phosphore du sol par la modélisation du transfert des ions phosphates entre le sol et la solution. Mémoire HDR. INP, Lorraine, 80p.
- Morel C., Le Clech B., Linères M., Pellerin S., 2006.** Gare à la baisse de la biodisponibilité du phosphore. *Alter Agri* 79, 21-23.
- Mozafar A., Anken T., Ruh R., Frossard E., 2000.** Tillage intensity, mycorrhizal and non mycorrhizal fungi and nutrient concentrations in maize, wheat and canola. *Agronomy Journal* 92, 1117-1124.

- Mulder L., Mogg B., Bersoult A., cullimore J.V., 2005.** Integration of sigmalling pathways in the establishment of the legumes-rhizobia symbiosis. *Physiol Plant* 123, 207-218.
- Mullen M.D., Israël D.W., Wollum A.G., 1988.** Effects of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean (*Glycine max* L.), phosphorus nutrition on nodulation and dinitrogen fixation. *Applied Env. Microbiol* 54, 2387-2392.
- Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T., 1995.** Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cel* 17, 869-885.
- Obaton M., 1983.** Généralité sur la symbiose fixatrice d#azote: *Rhizobium-légumineuses*. Rome: FAO. 4p.
- Olivera M., Tejera N., Iribarne C., Ocana A., Lluch C., 2004.** Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiol Plant* 121, 498-505.
- Ozturk L., Eker S., Torun B., Cakmak I., 2005.** Variation in phosphorus efficiency among 73 bread and durum wheat genotypes grown in a phosphorus-deficient calcareous soil. *Plant and Soil* 269, 69-80.
- Pan X.W., LI W.B., Zhang Q.Y., LI Y.H., LIU M.H., 2008.** Assessment on Phosphorus efficiency Characteristics of Soybean Genotypes in phosphorus-deficient Soils. *Agricultural Sciences in China* 7(8), 958-969.
- Pansu M., Gautheyrou J ., 2003.** L'analyse du sol : mineralogique, organique et minerale. Ed. IRD-Springer, pp: 993.
- Plaxton W.C., 1996.** The organization and regulation of plant glycolysis. *Plant Physiol. Mol Biol* 47,185-214.
- Plaxton W.C., Carswell M.C., 1999.** Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. In *Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to genome reorganization*. Ed. HR Lerner, New York, 349-72.
- Pelmont J., 1993.** Bactéries et environnement. *Adaptations physiologiques*, 899 p.
- Peoples MB., Herridge DF., Ladha JK., 1995.** Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil* 174, 3-28.
- POCHON., 1981.** La prairie permanente à base de trèfle blanc. Ed. L'institut technique de l'élevage bovin. Paris. 104p.
- Poonguzhali S., Madhaiyan M., Sa T., 2008.** Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. *Microbiol Biotechnol* 18, 773-777.
- 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.
- Raghothama K.G., Muchhal U.S., Kim D.H., Bucher M., 1998.** Molecular regulation of plant phosphate transporters. See Ref 99a, 271-80.
- Raghothama K.G., 1999 .** Phosphate acquisition. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 50, 665–693.

- Rengel Z., 1999.** Physiological mechanisms underlying differential nutrient efficiency of crop genotypes. In: Rengel Z, ed, Mineral Nutrition of Crops: Fundamental mechanisms and implications. Haworth Press, New York. pp. 227-265.
- Rennie R.J., Kemp G.A., 1983.** N₂-fixation in field beans quantified by ¹⁵N isotope dilution: Effect of strains of *Rhizobium*. *Agr* 75, 640-644.
- Ribet J., Drevon J.J., 1995.** Increase in permeability to oxygen diffusion and oxygen uptake of soybean nodules under limiting phosphorus nutrition. *Physiologia Plantarum* 94, 298–304.
- Ronnie C., 1986.** The effect of rhizobium strain, phosphorus applied, and inoculation rate on nodulation and yield of soybean (*Glycine max* L.). Thèse master. Université Hawati, 92p.
- Ruschel A.P., Vose P.B., Victoria R.L., Saito M.T., 1982.** Field evaluation of N₂-fixation and N-utilisation by *Phaseolus vulgaris* varieties determined by ¹⁵N isotope dilution. *Plant Soil* 65, 397-407.
- Sa T., Israël D.W., 1991.** Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. *Plant Physiology* 97, 928-935.
- Stantan W. R., 1970.** Les légumineuses à graines en Afrique. Ed. Lavoisier. 365p.
- Saad A.S., Muna A.A., El Tahir A.O., Tageldin E.M.H., 2009.** Phosphorus Supply and *Phaseolus vulgaris* performance grown in shamb at clay alkaline Soil and Influenced by farmyard manure. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3), 2598-2606.
- Salez P., Saint Macary H., 1987.** Inoculation du haricot (*Phaseolus vulgaris*) par *Rhizobium phaseoli* au Cameroun. *Agr Trop* 42, 269-274.
- Shamseldin A.A.Y., Vinuesa B., Thierfelder H., Werner D., 2005.** *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate *Phaseolus vulgaris* in Egyptian Soils and Display Cultivar-Dependent Symbiotic Efficiency. *Symbiosis* 38, 145-161.
- Shekhar-Nautiyal C., 1999.** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170, 265-270.
- 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.
- Schneider A., Morel C., 2000.** Relationship between the isotopically exchangeable and resinextractable phosphate of deficient to heavily fertilized soil. *Soil Science* 51, 709-715.
- Sheu S.Y., Sprent J.I., Vandamme P., 2006.** *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa spp. from Taiwan and South America. *Syst. Evol. Microbiol* 56, 1847-1851.
- Shu-Jie M., Yun-Fa Q., Xiao-Zeng H., AN M., 2007.** Nodule Formation and Development in Soybeans (*Glycine max* L.) in Response to Phosphorus Supply in Solution Culture. *Pedosphere* 17(1), 36-43.
- Schulze J., Drevon J.J., 2005.** P-deficiency increases the O₂ uptake per N₂ reduced in alfalfa. *Journal of Experimental Botany* 56, 1779-1784.

- Shushan, H., Betty, H., Sydney M.F., Rial D.R., 1981.** Rapid method that aid indistinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Clinical Microbiology* 13(3), 444- 448.
- Siddiqi M.M., Glass A.D.M., 1981.** Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *Plant Nut* 4, 289-302.
- Ssali H., Keya S.O., 1986.** The effects of phosphorus and nitrogen fertilizer level on nodulation, growth and dinitrogen fixation of three bean cultivars. *Trop. Agric* 63, 105-109.
- Ström L., Andrew G., Owen, Douglas L., Godbold, David L., Jones., 2005.** Organic acid behaviour in calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 1-9.
- Sui Y.Y., Jiao X.G., Zhang X.Y., Meng K., Zhang J.M., 2005.** Research on the integrated assessment of black soil fertility in farmland. *Soils and Fertilizers* 5, 46-48.
- Sunthongwiset K., Poss R., Drevon J.J., 2009.** Relation among growth, nodulation, P efficiency and proton efflux for annual legumes. *Asian Journal of plant Science* 8 (5), 335-343.
- Tang, C., McLay C.D.A., Barton, L., 1997.** A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 37, 563-570.
- Tang C., Fang R.Y., Raphael C., 1998.** Factors affecting soil acidification under legumes: Effect of phosphorus supply. *Australian Journal of Agricultural Research* 49, 657-664.
- Tang C., Hinsinger P., Drevon J.J., Jaillard B., 2001.** Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* L. *Annals of Botany* 88, 131-138.
- 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 and Soil* 260, 59-68.
- Thies J.E., Singleton P.W., Bohlool B.B., 1991.** Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Ed. Appl and Environ, Microbiol* 57, 19-28.
- 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.
- Tong X.J., Yan X., 1999.** Study on characteristics of phosphorus efficiency of soybean native germplasm in Guangdong Province: Differences of soybean genotypes in characteristics of phosphorus efficiency and relationship between phosphorus efficiency and content of soil availability phosphorus. *Acta Pedologica Sinica* 36, 404-412.
- Tong X.J., Lu Y.G., Yan X., 2000.** Studies on the characteristics of phosphorus efficiency of native soybean (*Glycine max* L.) germplasm: Differences in

- characteristics of phosphorus efficiency of shoot and root among soybean genotypes and correlation analysis. *Journal of Chinese Oil Crops* 22, 48-53.
- Ueki K., 1978.** Control of phosphatase release from cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol* 19, 385–92.
- 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. Thèse PhD, Montpellier, 150 p.
- 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* 346, 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 P use efficiency for symbiotic N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 21, 691-699.
- 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.
- Vincent J.M. 1970.** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: *International Biological Programme Handbook n°. 15.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 73-97.
- Vincent J. M., 1977.** Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In *the biology of nitrogen fixation quispel*. Ed. North-holland, Amsterdam, 256-341.
- Zahrán H.H., 1999.** Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 968-989.
- Zahrán H.H., Karsitol A.M., Lindstrom K., 1994.** Alternation of lipopolysaccharides and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *Word. Microbiol. Biotech* 10, 100-105.
- Zaidi A., Khan M.S., Amil M., 2003.** Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicerarietinum* L.). *Eur J Agron* 19, 15-21.
- Zaidi A., Khan M.S., Ahemad M., Oves M., 2009.** Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiol et Immunol Hung* 56, 283-284.
- Zapata E., Roy R.N., 2004.** Utilisation des phosphates naturels pour une agriculture durable. *Bulletin FAO : engrais et nutrition végétale* 13, 25-29.
- Zarrin F., Muhammad Z., Fayyaz-Chaudhary M., 2007.** Interactive effect of rhizobium strains and P on soybean yield, nitrogen fixation and soil fertility. *Pak. Bot* 39(1), 255-264.
- Xie B., Chen D., Cheng G., Ying Z., Xie F., Li Y., Zhou J., 2009.** Effects of the pur L gene expression level on the competitive nodulation ability of *Sinorhizobium fredii*. *Curr Microbiol* 59, 193-198.

<http://www.fondation-nicolas-hulot.org/page.php?id=1>

<http://www.crdp-toulouse.fr/>

ANNEXES

Annexe I : Teste de signification obtenu par l'analyse de la variance (ANOVA) et regroupement des couples symbiotiques selon le teste de Newman et Keuls ($\alpha < 0.05\%$)

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Poids sec des nodules (g)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,380 ^a	23	,017	27,891	,000
Intercept	3,944	1	3,944	6666,178	,000
Couples	,239	11	,022	36,713	,000
Sol	,016	1	,016	27,841	,000
Couples * Sol	,124	11	,011	19,073	,000
Error	,028	48	,001		
Total	4,352	72			
Corrected Total	,408	71			

Test of Newman and Keuls								
Couples symbiotiques		N	Subset					
			1	2	3	4	5	6
Student-Newman-Keuls ^{a,b}	C-Dj	6	A					
	k-L07	6	A	B				
	C-L83	6	A	B				
	K-Dj	6		B	C			
	C-L07	6		B	C			
	C-L104	6		B	C	D		
	C-L75	6			C	D		
	C-L115	6			C	D		
	K-L83	6				D	E	
	K-L104	6				D	E	
	K-L75	6					E	
	K-L115	6						F

1. Poids sec des nodules

2. Poids sec de la partie racinaire

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Poids sec des racines (g)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5,926 ^a	23	,258	,992	,491
Intercept	99,060	1	99,060	381,572	,000
Couples	2,874	11	,261	1,006	,455
Sol	,505	1	,505	1,943	,170
Couples * Sol	2,547	11	,232	,892	,554
Error	12,461	48	,260		
Total	117,447	72			
Corrected Total	18,387	71			

a. R Squared = ,322 (Adjusted R Squared = -,002)

3. Poids sec de la partie aérienne

Test of Newman and Keuls			
Couples symbiotiques		N	Subset
			1
Student-Newman-Keuls ^{a,,b}	K-Dj	6	A
	C-Dj	6	A
	k-L07	6	A
	C-L104	6	A
	C-L75	6	A
	K-L83	6	A
	C-L115	6	A
	C-L83	6	A
	K-L104	6	A
	K-L115	6	A
	K-L75	6	A
	C-L07	6	A

3. Poids sec de la partie aérienne

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Poid sec de la partie aerienne (g)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	170,254 ^a	23	7,402	3,522	,000
Intercept	1943,678	1	1943,678	924,663	,000
Couples	109,961	11	9,996	4,756	,000
Sol	52,545	1	52,545	24,997	,000
Couples * Sol	7,748	11	,704	,335	,973
Error	100,898	48	2,102		
Total	2214,830	72			
Corrected Total	271,152	71			

a. R Squared = ,628 (Adjusted R Squared = ,450)

4. La concentration de P dans les racines

Test of Newman and Keuls					
Couples symbiotiques		N	Subset		
			1	2	3
Student-Newman-Keuls ^{a,,b}	C-Dj	6	A		
	K-Dj	6	A		
	C-L07	6	A	B	
	C-L75	6	A	B	C
	K-L104	6	A	B	C
	C-L104	6	A	B	C
	C-L115	6	A	B	C
	k-L07	6	A	B	C
	K-L83	6		B	C
	K-L75	6		B	C
	C-L83	6		B	C
	K-L115	6			C

4. La concentration de P dans les racines

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: la concentration de P dans les racines (mg.g)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	55,294 ^a	23	2,404	1,861	,035
Intercept	563,356	1	563,356	436,075	,000
Couples	16,592	11	1,508	1,168	,334
Sol	2,960	1	2,960	2,291	,137
Couples * Sol	35,742	11	3,249	2,515	,014
Error	62,010	48	1,292		
Total	680,660	72			
Corrected Total	117,304	71			

a. R Squared = ,471 (Adjusted R Squared = ,218)

5. La concentration de P dans la partie aérienne

Test of Newman and Keuls			
Couples symbiotiques		N	Subset
			1
Student-Newman-Keuls ^{a,,b}	K-Dj	6	A
	C-Dj	6	A
	C-L07	6	A
	K-L104	6	A
	K-L83	6	A
	K-L115	6	A
	C-L83	6	A
	K-L75	6	A
	C-L104	6	A
	C-L115	6	A
	C-L75	6	A
	k-L07	6	A

5. La concentration de P dans la partie aérienne

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: la concentration de P dans la partie aeriene (mg.g)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	161,224 ^a	23	7,010	4,219	,000
Intercept	1503,526	1	1503,526	904,935	,000
Couples	112,597	11	10,236	6,161	,000
Sol	42,355	1	42,355	25,492	,000
Couples * Sol	6,271	11	,570	,343	,971
Error	79,751	48	1,661		
Total	1744,500	72			
Corrected Total	240,974	71			

a. R Squared = ,669 (Adjusted R Squared = ,510)

6. Le P totale prélevé par la plante

Test of Newman and Keuls						
Couples symbiotiques		N	Subset			
			1	2	3	4
Student-Newman-Keuls ^{a,,b}	K-L104	6	A			
	C-L104	6	A	B		
	C-L83	6	A	B		
	K-Dj	6	A	B		
	C-Dj	6	A	B		
	K-L83	6	A	B	C	
	K-L75	6	A	B	C	D
	C-L07	6	A	B	C	D
	k-L07	6	A	B	C	D
	C-L75	6		B	C	D
	K-L115	6			C	D
	C-L115	6				D

6. Le P totale prélevé par la plante

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Le P totale contenue dans la plante (mg.plt)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12956,805 ^a	23	563,339	5,167	,000
Intercept	56836,711	1	56836,711	521,320	,000
Couples	8597,389	11	781,581	7,169	,000
Sol	3999,555	1	3999,555	36,685	,000
Couples * Sol	359,862	11	32,715	,300	,983
Error	5233,183	48	109,025		
Total	75026,700	72			
Corrected Total	18189,989	71			

a. R Squared = ,712 (Adjusted R Squared = ,574)

7. Efficacité d'utilisation de P par la plante

Test of Newman and Keuls						
Couples symbiotiques		N	Subset			
			1	2	3	4
Student-Newman-Keuls ^{a, b}	K-Dj	6	A			
	C-Dj	6	A			
	K-L104	6	A	B		
	C-L104	6	A	B	C	
	C-L07	6	A	B	C	
	C-L83	6	A	B	C	
	k-L07	6	A	B	C	
	K-L83	6	A	B	C	
	C-L75	6		B	C	
	K-L75	6		B	C	
	C-L115	6			C	
	K-L115	6				D

7. Efficacité d'utilisation de P par la plante

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Efficacité d'utilisation de P par la plante (g.g)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	570486,676 ^a	23	24803,769	8,960	,000
Intercept	5233769,935	1	5233769,935	1890,638	,000
Couples	368410,885	11	33491,899	12,099	,000
Sol	157017,708	1	157017,708	56,721	,000
Couples * Sol	45058,083	11	4096,189	1,480	,170
Error	132876,275	48	2768,256		
Total	5937132,886	72			
Corrected Total	703362,951	71			

a. R Squared = ,811 (Adjusted R Squared = ,721)

8. Efficacité du prélèvement de P par la plante

Test of Newman and Keuls					
Couples symbiotiques		N	Subset		
			1	2	3
Student-Newman-Keuls ^{a,,b}	C-L115	6	A		
	K-L115	6	A		
	C-L75	6	A		
	K-L75	6	A	B	
	k-L07	6	A	B	
	C-L07	6	A	B	
	K-L83	6	A	B	
	C-L83	6		B	
	C-L104	6		B	
	C-Dj	6		B	
	K-Dj	6		B	
	K-L104	6			C

8. Efficacité du prélèvement de P par la plante

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Efficacité du prélèvement de P par les racines					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	11567,002 ^a	23	502,913	4,096	,000
Intercept	48506,081	1	48506,081	395,076	,000
Couples	5442,539	11	494,776	4,030	,000
Sol	4902,116	1	4902,116	39,927	,000
Couples * Sol	1222,348	11	111,123	,905	,543
Error	5893,274	48	122,777		
Total	65966,357	72			
Corrected Total	17460,276	71			

a. R Squared = ,662 (Adjusted R Squared = ,501)

9. pH rhizosphérique

Test of Newman and Keuls						
Couples symbiotiques		N	Subset			
			1	2	3	4
Student-Newman-Keuls ^{a, b}	K-L104	6	A			
	C-Dj	6	A	B		
	K-Dj	6	A	B	C	
	C-L104	6	A	B	C	D
	C-L83	6	A	B	C	D
	C-L07	6	A	B	C	D
	K-L75	6	A	B	C	D
	k-L07	6	A	B	C	D
	C-L75	6		B	C	D
	K-L83	6			C	D
	C-L115	6			C	D
	K-L115	6				D

9. pH rhizosphérique

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: pHrhizosphérique					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6,424 ^a	23	,279	4,055	,000
Intercept	4222,256	1	4222,256	61301,406	,000
Couples	2,132	11	,194	2,814	,008
Sol	,075	1	,075	1,085	,304
Couples * Sol	4,061	11	,369	5,360	,000
Error	2,893	42	,069		
Total	4360,338	66			
Corrected Total	9,317	65			

a. R Squared = ,690 (Adjusted R Squared = ,519)

10. P assimilable (P₂O₅ en ppm)

Test of Newman and Keuls				
Couples symbiotiques		N	Subset	
			1	2
Student-Newman-Keuls ^{a,,b,,c}	K-L104	6	A	
	K-Dj	5	A	B
	K-L115	6	A	B
	K-L75	4	A	B
	C-L104	5	A	B
	C-L75	6	A	B
	C-L115	5	A	B
	k-L07	6	A	B
	C-Dj	5	A	B
	K-L83	6	A	B
	C-L83	6	A	B
	C-L07	6		B

10. P assimilable (P₂O₅ en ppm)

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: le P assimilable (P2O5ppm)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2476,868 ^a	23	107,690	1,911	,032
Intercept	107827,379	1	107827,379	1913,069	,000
Couples	947,843	11	86,168	1,529	,156
Sol	3,637	1	3,637	,065	,801
Couples * Sol	1489,424	11	135,402	2,402	,020
Error	2479,996	44	56,364		
Total	113541,588	68			
Corrected Total	4956,864	67			

a. R Squared = ,500 (Adjusted R Squared = ,238)

11. Surface foliaire

Test of Newman and Keuls			
Couples symbiotiques		N	Subset
			1
Student-Newman-Keuls ^{a,,b,,c}	k-L07	6	A
	C-L83	6	A
	K-L104	5	A
	K-L75	6	A
	C-L115	6	A
	C-L104	6	A
	C-Dj	6	A
	K-L115	6	A
	C-L07	6	A
	K-Dj	5	A
	C-L75	6	A
	K-L83	4	A

11. Surface foliaire

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Surface foliaire (cm ²)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3218,140 ^a	23	139,919	21,587	,000
Intercept	54455,757	1	54455,757	8401,503	,000
Couples	2606,917	11	236,992	36,563	,000
Sol	8,410	1	8,410	1,297	,260
Couples * Sol	602,054	11	54,732	8,444	,000
Error	304,638	47	6,482		
Total	58390,690	71			
Corrected Total	3522,778	70			

a. R Squared = ,914 (Adjusted R Squared = ,871)

12. Hauteur de la tige

Test of Newman and Keuls						
Couples symbiotiques		N	Subset			
			1	2	3	4
Student-Newman-Keuls ^{a,,b,,c}	C-Dj	6	A			
	K-Dj	6	A			
	k-L07	6	A			
	K-L104	6		B		
	C-L115	6		B		
	C-L75	5		B	C	
	C-L104	6			C	
	C-L83	6			C	
	K-L115	6			C	
	C-L07	6			C	
	K-L83	6			C	
	K-L75	6				D

12. Hauteur de la tige

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Hauteur de la tige (cm)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	558,559 ^a	23	24,285	3,085	,001
Intercept	21930,800	1	21930,800	2785,641	,000
Couples	232,100	11	21,100	2,680	,010
Sol	127,182	1	127,182	16,155	,000
Couples * Sol	191,770	11	17,434	2,214	,031
Error	346,403	44	7,873		
Total	23240,400	68			
Corrected Total	904,962	67			

a. R Squared = ,617 (Adjusted R Squared = ,417)

13. Activité réductrice d'Acétylène (C₂H₄.h.plante)

Test of Newman and Keuls				
Couples symbiotiques		N	Subset	
			1	2
Student-Newman-Keuls ^{a,,b,,c}	C-L75	6	A	
	K-L104	6	A	
	k-L07	6	A	B
	C-L07	5	A	B
	C-L104	6	A	B
	C-Dj	6	A	B
	K-Dj	6	A	B
	C-L115	6	A	B
	C-L83	6	A	B
	K-L83	6	A	B
	K-L75	4		B
	K-L115	5		B

13. Activité réductrice d'Acétylène (C₂H₄.h.plante)

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Activité Réductrice d'Acétylène (C ₂ H ₄ .h.plt)					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6222,396 ^a	23	270,539	122,844	,000
Intercept	42928,000	1	42928,000	19492,381	,000
Couples	4399,552	11	399,959	181,610	,000
Sol	472,073	1	472,073	214,355	,000
Couples * Sol	1350,772	11	122,797	55,759	,000
Error	105,710	48	2,202		
Total	49256,106	72			
Corrected Total	6328,107	71			

a. R Squared = ,983 (Adjusted R Squared = ,975)

Annexe 2 : Matrice de corrélation

	BN (g)	BR(g)	BA (g)	PR (mg gpl)	RA(mg gpl)	ARA	pH Rhiz	Surface foliaire (cm ²)	Hauteur de la tige (cm)	totale P uptake	RPAE(mg/g)	PLE(g/g)	P assi ppm
BN (g)	1,00000												
BR(g)	0,692063	1,000000											
BA (g)	0,796302	0,863327	1,000000										
PR (mg gpl)	0,279659	-0,126386	0,122125	1,000000									
RA(mg gpl)	0,634688	0,396040	0,515400	0,409236	1,000000								
ARA	0,825918	0,556879	0,554300	0,017659	0,444491	1,000000							
pH Rhiz	-0,394527	-0,140617	-0,344600	0,238460	-0,068504	-0,537424	1,000000						
Surface foliaire	0,535080	0,634103	0,634827	0,278263	0,431017	0,508750	0,120925	1,000000					
Hauteur de la tige (cm)	0,517651	0,394540	0,523802	0,346957	0,583672	0,512487	-0,108882	0,707138	1,000000				
totale P uptake	0,864173	0,396185	0,831249	0,367962	0,886590	0,613968	-0,197457	0,561529	0,482539	1,000000			
RPAE(mg/g)	0,800487	0,482598	0,764907	0,433780	0,925051	0,533654	-0,157992	0,515518	0,467955	0,958126	1,000000		
PLE(g/g)	-0,584860	-0,247723	-0,502595	-0,586283	-0,953483	-0,410940	-0,050208	-0,554346	-0,557766	-0,848331	-0,895678	1,000000	
P assi ppm	0,226306	-0,054385	-0,143882	0,108882	0,108320	0,070364	-0,489815	-0,438655	-0,254514	0,070441	0,054734	0,035425	1,000000

Annexe 3 : Composantes (CPs) principales et poids relatif (PR) des différents couples symbiotiques

1. Composantes principales

	CP1	CP2	CP3
CDj	2,709623	0,527824	0,090916
KDj	1,771665	1,031006	1,807155
C115	-1,18631	3,119939	-1,63531
K115	-4,66789	4,254886	0,89114
C75	0,269881	2,042115	-2,50499
K75	-3,1763	1,368964	-0,5474
C104	0,180604	0,406678	-0,51363
K104	1,409488	-0,29166	0,819113
C83	-0,00891	0,134793	-1,51445
K83	-1,98497	0,912853	-0,2179
C7	1,66802	-0,14072	-1,14319
K7	1,611917	0,550002	0,16131

2. Poids relatif de chaque composante principale

	PC1	PC2	PC3
PR	0,523587	0,250528	0,100235

3. Valeur F de chaque couple symbiotique

Couples symbiotiques	PE (valeur F)
CDJ	1,560071
KDJ	1,367058
C115	-0,00342
K115	-1,28875
C75	0,401825
K75	-1,37497
C104	0,144962
K104	0,747025
C83	-0,1227
K83	-0,83245
C7	0,7
K7	0,997939