



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

OPTION : BIOTECHNOLOGIE - MICROBIOLOGIE

Mémoire de Recherche pour l'obtention du Diplôme d'étude Approfondie en Biochimie

**FONCTIONNEMENT MICROBIEN DU SOL DE CULTURE DE HARICOT SOUS
L'EFFET DE L'INOCULATION PAR DES BACTERIES SYMBIOTIQUES
FIXATRICES D'AZOTE ET DE LA FERTILISATION PHOSPHATEE AU NIVEAU
DES PARCELLES PAYSANNES**

Présenté par :

RASON Lalaina Sarah

Maitre ès-Sciences

Soutenu publiquement le 13 Avril 2015 devant la commission d'examen composée de :

Président : Pr JEANNODA Victor

Rapporteurs : Dr RANDRIAMBANONA Herizo

Pr RAMANANKIERANA Heriniaina

Examineurs : Dr RAMAROSON Roseline

Dr RAZAFINDRAZAKA Vonimanitra



PRESENTATION DU PROJET FABATROPIMED

Le projet FABATROPIMED dans lequel la présente étude a été réalisée est un des 3 grands projets fédérateurs soutenus par Agropolis Fondation depuis 2011. Il regroupe pour une durée de quatre ans, 15 équipes de recherche, dont les UMR Eco&Sols, Innovation, LSTM et les unités SCA et Diascope du campus de Montpellier, en partenariat avec des Universités et des Institutions de Recherche de 5 pays Africains (Madagascar, Tunisie, Maroc, Sénégal, Burkina-Faso).

Le projet a pour objectif de valoriser les légumineuses à graines pour les systèmes de culture céréalière et pour l'environnement dans des agro écosystèmes d'Afrique méditerranéenne et tropicale :

- ♣ En réduisant l'utilisation des fertilisants minéraux ;
- ♣ En augmentant la séquestration du carbone et les interactions entre les microorganismes du sol pour l'acquisition et l'utilisation de l'azote et du phosphore par les plantes ;

Le projet présente 5 Work package (WP) dont une recherche participative dans six agro-écosystèmes sur la base d'un diagnostic agronomique et environnemental (WP1) associé à une étude de durabilité et d'innovation (WP5) en interdisciplinarité avec le suivi des cycles de C, N et P des sols (WP2), la caractérisation de la diversité fonctionnelle microbienne, symbiotique et rhizosphérique (i.e. dans la zone d'influence des racines) (WP3) où le mémoire ci-après s'inscrit, et finalement la recherche des gènes d'efficacité, d'acquisition et d'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique de l'azote (WP4).

Ainsi, ce mémoire a été mené avec la collaboration entre l'équipe de l'UMR Eco&Sols de l'IRD, du FOFIFA (Centre régional Antsirabe), du Laboratoire des Radio Isotopes et du Laboratoire de Microbiologie et de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE).

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie et de l'Environnement du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE) en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie - Microbiologie de l'Université d'Antananarivo, le Laboratoire de Radio Isotopes, le FOFIFA et l'Institut de Recherches pour le Développement (IRD). Mes sincères remerciements à chacune de ces institutions ainsi qu'aux différents Responsables de m'avoir accueillie et appuyée.

Il m'est agréable d'exprimer aussi ma sincère reconnaissance à tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce travail. Mes profondes reconnaissances vont à l'endroit de :

- Madame le Docteur Ando RANDRIANIERENANA, Chef du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Monsieur Le Professeur Marson RAHERIMANDIMBY, Doyen de la Faculté des Sciences et Responsable du parcours Biotechnologie, Madame le Professeur Blandine ANDRIANARISOA, Chef du Laboratoire de Biotechnologie et Microbiologie de m'avoir permis à réaliser ce stage.
- Monsieur le Professeur JEANNODA Victor, Professeur titulaire, à l'Université d'Antananarivo de nous avoir permis de soutenir ce mémoire et de nous faire l'honneur de le présider.
- Madame le Docteur RAZAFINDRAZAKA Vonimanitra et Madame le Docteur RAMAROSON Roseline qui ont répondu à notre sollicitation de siéger en tant que membres du jury.
- Mon encadreur académique et professionnel, à la fois Chef du Département « Ecosystèmes Terrestres » au CNRE, Monsieur le Professeur RAMANANKIERANA Heriniaina, qui a suivi ce travail pas à pas et qui m'a beaucoup aidée par ses compétences malgré ses différentes occupations.
- Monsieur le Docteur Rado RASOLOMAMPIANINA, Chef du Laboratoire de Microbiologie et de l'Environnement (LME) du Centre National de recherches sur l'Environnement (CNRE) de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.
- Monsieur le Docteur Thierry BECQUER, Directeur de Recherches à l'UMR Eco&Sols de l'IRD qui a accepté d'être mon encadreur scientifique et technique.
- Monsieur le Docteur Herizo RANDRIAMBANONA, chercheur au CNRE, pour son aimable aide dans les traitements statistiques des données, et d'avoir accepté d'être mon rapporteur.

- Madame le Professeur Félicitée REJO-FIENENA, Directeur du Centre National de recherches sur l'environnement de m'avoir donnée la permission de réaliser ce stage au sein de son institution.

J'exprime également ma gratitude à toute l'équipe du CNRE, surtout du LME, pour leurs aides et conseils dans la réalisation de ce stage.

Une grande reconnaissance s'adresse particulièrement :

- ♥ A Dieu tout puissant
- ♥ A mes parents RASON Hans Raymond et RAHARINTSOA Josiane pour leurs soutiens moraux, spirituels, et financiers dans la réalisation de ce mémoire
- ♥ A toute ma famille et mes ami(e)s

TABLES DES MATIERES

GLOSSAIRE	i
LISTE DES TABLEAUX	iii
LISTE DES ABREVIATIONS	iv
LISTE DES PHOTOS	v
INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. Le haricot.....	3
1. Origine et description	3
II. L'azote et le phosphore pour la plante.....	5
III. Nodules, Nodulation, Facteur Nod	6
IV. Mycorhize et association mycorhizienne.....	7
MATERIELS ET METHODES	11
I. Matériel d'étude.....	11
1. Haricot	11
2. Site d'étude.....	11
3. Les six souches de l'inoculum microbien.....	11
II. Echantillonnage et dispositif expérimental.....	11
III. Méthodes	13
1. Evaluation de la biomasse aérienne et racinaire	13
2. Détermination du taux de nodulation	14
3. Détermination du taux d'endomycorhization	14
4. Calcul du rendement de production.....	14
5. Activité des enzymes phosphatasiques du sol de culture	15
6. Evaluation de l'activité microbienne globale du sol.....	16
RESULTATS ET INTERPRETATIONS	18
I. Influence des différents traitements sur le développement de la plante et sur le rendement de la production.....	18
II. Impacts des différents traitements sur le taux de nodulation et le taux de mycorhization du haricot	20
III. Influence des différents traitements sur l'activité microbienne globale et l'activité phosphatasique du sol.....	22
IV. Corrélation entre les principaux paramètres étudiés selon l'analyse en composante principale	25
1. Corrélation entre les différents variables entre les sols et plantes du site 21.....	25
2. Corrélation entre les différents variables entre les sols et plantes du site 22.....	27

DISCUSSION.....	30
I. Influence des différents traitements sur le développement des plants et sur le rendement de la production chez le haricot de la variété RI 5-2	30
II. Influence des différents traitements sur le taux de nodulation et le taux de mycorhization du haricot de la variété RI 5-2	31
III. Influence des différents traitements sur l'activité phosphatasique et l'activité microbienne globale du sol de haricot de la variété RI 5-2.....	31
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	34
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	36
ANNEXES	44

GLOSSAIRE

Abiotique : Se dit d'un milieu qui ne permet pas la vie, ou d'un facteur qui ne concerne pas directement la vie.

Arbuscules : Structure formée à l'intérieur des cellules racinaires des plantes (lieu d'échange entre la plante hôte et le champignon mycorhizien à arbuscule).

Culture vivrière : est une agriculture essentiellement tournée vers l'auto consommation et l'économie de subsistance. Généralement, la production n'est destinée ni à l'industrie agroalimentaire ni à être exportée.

Hyphes : C'est un élément végétatif filamenteux multinucléaire, caractéristiques des champignons.

Inoculation : Introduction volontaire ou accidentelle d'un ou de plusieurs microorganismes dans le corps ou dans un milieu de culture.

Mycorhization : Phénomène de production de mycorhize.

Mycorhize : Il s'agit d'une association entre un champignon et la racine d'une autre plante ou de structures symbiotiques associant les cellules racinaires et les organes végétatifs des champignons.

Nodule : Structure qui se forme au niveau des racines des légumineuses après l'infection de la plante par des bactéries fixatrices d'azote conférant ainsi à la plante la capacité à utiliser l'azote atmosphérique.

Organisme chimiotrophe : Etre vivant qui utilise l'énergie de l'oxydation de composés chimiques comme source d'énergie.

Rhizosphère : Zone du sol directement soumise à l'influence de la racine et où coexistent diverses espèces de microorganismes bénéfiques ou non pour la plante.

Stress abiotique : C'est un stress exercé par un changement de l'environnement comme une carence en azote par exemple.

Symbiose : C'est l'association de deux êtres vivants à bénéfice réciproque.

Zygomorphe : Se dit des fleurs qui ont un seul plan de symétrie, généralement vertical.

Sidérophores : Chélateurs de fer synthétisés et sécrétés par les microorganismes pour leur permettre de puiser le fer nécessaire à leur développement.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Schéma du dispositif expérimental	12
Tableau 2: Répartition des traitements appliqués au sol.....	13
Tableau 3: Composition de chaque éppendorf pour la mesure des activités phosphatasiques.....	15
Tableau 4: Composition de chaque tube pour la mesure de l'activité microbienne globale du sol.....	16
Tableau 5 : Développement des plants au niveau des parcelles de traitement différent du site 21.....	18
Tableau 6 : Développement des plants au niveau des parcelles de traitement différent du site 22.....	19
Tableau 7: Effets des différents traitements sur le taux de nodulation et de mycorhization du site 21	20
Tableau 8: Effets des différents traitements sur le taux de nodulation et de mycorhization du site 22	21
Tableau 9: Quantité de fluorescéine et de p-Nitrophénol produit dans le sol soumis aux différents traitements du site 21	23
Tableau 10: Quantité de fluorescéine et de p-Nitrophénol produit dans le sol soumis aux différents traitements du site 22	24
Tableau 11: Matrice de corrélation entre les différents paramètres étudiés pour les parcelles du site 21	26
Tableau 12: Matrice de corrélation entre les différents paramètres étudiés pour les parcelles du site 22	28

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	: Analyse en Composantes Principales
ANOVA	: Analysis of Variance
CNRE	: Centre National de Recherches sur l'Environnement
FDA	: Fluorescéine Di Acétate
IRD	: Institut de Recherches pour le Développement
LME	: Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement
LRI	: Laboratoire des RadioIsotopes
MVA	: Mycorhize à Vésicules et à Arbuscules
DO	: Densité optique
pH	: Potentiel d'hydrogène
p-NPP	: para-Nitrophénylphosphate
TE	: Témoin enzyme
TS	: Témoin substrat
TM	: Taux de mycorhization
N	: Azote
P	: Phosphore
KOH	: Hydroxyde de potassium
M	: Molarité

LISTE DES FIGURES

Figure 1a et 1b : Interaction entre les différents paramètres étudiés sur les sols et les plantes du site 21	25
Figure 2a et 2b : Interaction entre les différents paramètres étudiés sur les sols et les plantes du site 22	Erreur ! Signet non défini.

LISTE DES PHOTOS

Photo 1: Biomasse aérienne de haricot	4
Photo 2: Nodules racinaires de haricot.....	7
Photo 3: Vésicules observées au niveau de la racine de haricot (à grossissement $\times 40$)	8
Photo 4: Structure anatomique de l'Ectomycorhize et de l'Endomycorhize à arbuscules et à vésicules	9

INTRODUCTION

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Face aux problèmes de malnutrition et de désertification des terres, l'augmentation des rendements en agriculture et la gestion de la fertilité du sol deviennent un enjeu majeur. Actuellement, la majorité des terres cultivées à Madagascar s'appauvrit en éléments nutritifs (Mamonjy – Madagascar, 2010) conduisant à une forte diminution de leur productivité. Or, 80 % de la population malagasy vit dans le secteur de l'agriculture. En valorisant différents types de ressources naturelles ou d'autres produits de synthèse, il est tout à fait possible de rendre le sol fertile. Pourtant, la gestion durable de cette fertilité constitue encore un grand défi. De ce fait, les agriculteurs actuels ne se contentent plus seulement de l'amélioration de leur rendement de production mais également de la qualité de leur sol de culture. Généralement, les plantes, pour leur croissance, et pour assurer une meilleure production, ont des besoins nutritionnels majeurs comme l'azote, le phosphore et le potassium, ainsi qu'en d'autres éléments tels que le calcium, le soufre, le magnésium et en divers oligoéléments comme le fer, le manganèse et le cuivre (Tyler & Olsson, 2001 ; Graham & Stangoulis, 2003 ; Morgan & Connolly, 2013). Naturellement, le sol héberge la plupart de ces éléments avec des teneurs variables suivant le type de sol (Marschner *et al.*, 2003 ; Jones *et al.*, 2004). A part ces éléments nutritifs, le sol abrite également des microorganismes qui sont impliqués dans la croissance et la protection des plantes contre les agents biologiques et les différentes maladies (El-yazeid *et al.*, 2007). La fertilité d'un sol repose alors sur un équilibre entre ses propriétés physiques, chimiques et biologiques. La présence et la forte activité de microorganismes sont souvent considérées comme des indices d'une bonne fertilité du sol (Patra *et al.*, 2008 ; Islam *et al.*, 2009). Dans ce sens, l'importance de certains groupes de microorganismes tels que les champignons mycorhiziens et les bactéries fixatrices d'azote est mieux connue (Allen, 1992 ; Garbaye, 1994 ; Smith & Read, 1997 ; Duponnois & Plenchette, 2003 ; Ramanankierana *et al.*, 2006 ; Smith & Read, 2008 ; Sanon, 2009). Grâce à l'évolution de la technologie, il est devenu possible d'introduire volontairement dans le sol de culture des microorganismes dont leur implication dans la mise en disponibilité des éléments nutritifs pour les plantes est bien connue. Il s'agit de la technologie d'inoculation microbienne appliquée soit dans le sol de culture soit directement sur la plante ou les semences. Les premiers essais d'inoculation de culture de légumineuse n'ont pas connu des réussites significatives (Jaubert, 1951 et 1952 ; Tardieu et Sene, 1962). En 1968, certains auteurs ont pu démontrer que l'inoculation bactérienne pourrait remédier au « nanisme jaune » en augmentant la valeur du pH. Depuis, plusieurs recherches (Ndiaye, 1980 ; Jara, 1981 ; Gueye, 1932) ont affirmé que les souches de *Rhizobium* présents dans le sol sont d'une

INTRODUCTION

efficience variable selon la légumineuse hôte et la localité justifiant ainsi la nécessité d'introduire des souches identifiées performantes.

Sur une surface de 83 000 hectares, le haricot est cultivé dans trois régions (hautes terres, Sud-Ouest et Nord-Ouest) de Madagascar. De nos jours, près de 500 millions de personnes dans le monde le consomment comme base dans leur ration quotidienne, essentiel pour sa forte teneur en protéine (25 à 30 % de la graine sèche). Cependant, la filière haricot devient de plus en plus mal exploitée tant en qualité qu'en quantité depuis quelques années. Or, la demande en haricot sur le marché mondial ne cesse d'augmenter et atteignait déjà presque les 6 millions de tonnes en 2011. Devant cette situation, la proposition de différentes techniques de production basées sur l'importance de différentes sources d'éléments nutritifs et sur la potentialité des microorganismes capables de fixer l'azote atmosphérique devient une nécessité urgente. Les effets néfastes de l'utilisation abusive d'engrais chimiques sur l'environnement et sur la durabilité de la productivité des sols de culture ne font que confirmer l'importance de la valorisation de ces ressources naturellement présentes dans le sol. Dans ce sens, la technologie d'inoculation microbienne utilisant des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote (*Rhizobium*) a été proposée pour améliorer le rendement de la production de haricot dans la région de Vakinankaratra. L'hypothèse de travail stipulait que « *l'introduction de souches efficaces de bactéries nodulant les légumineuses dans les itinéraires de culture de haricot permettrait d'établir un fonctionnement microbien favorable à la mobilisation d'éléments nutritifs au profit du développement de la plante et de la réduction de l'utilisation des fertilisants* ».

Rentrant dans le cadre d'une recherche – action entre paysans et scientifiques, la présente étude a comme objectif principal de décrire la structure et le fonctionnement des microorganismes du sol de culture dans des parcelles paysannes de culture de haricot où la performance en milieu naturel de six souches de *Rhizobium* déjà identifiées efficaces au laboratoire a été testée. Les effets des différents traitements couplant ou non l'inoculation et la fertilisation en phosphate et/ou en dolomie sur le développement des plantes ont été également évalués sur la variété de haricot RI 5-2.

Le présent document, rapportant les différents travaux réalisés, est divisé en quatre parties : la première est réservée à la synthèse de l'état de l'art dans le domaine de l'étude, la deuxième partie décrira les matériels et méthodes, la troisième rapporte les résultats obtenus suivis de la discussion, et la dernière présentera la conclusion et les éventuelles perspectives.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le haricot

1. Origine et description

Originnaire d'Amérique Latine et centrale, le haricot, connu sous le nom scientifique de *Phaseolus vulgaris*, figure parmi les légumineuses alimentaires, qui ont été domestiquées depuis plus de 8 000 ans (Gepts et Debouck, 1991) et occupe une place importante dans le système agricole de presque tous les pays tropicaux (Kaplan, 1981 ; Gepts, 1990). C'est une plante capable de former des nodules effectifs en s'associant avec des groupes bactériens génétiquement hétérogènes d'origine différente dont le plus connu est le genre *Rhizobium* (Piniero *et al.*, 1988 ; Martinez *et al.*, 1988 ; Laguerre *et al.*, 1993 ; Eardly *et al.*, 1995).

Le système racinaire est profond et peut descendre jusqu'à 1,20 m. Le plus grand nombre de racines se trouve entre 0,20 m et 0,25 m de profondeur sur un diamètre de 0,50 m autour de la tige. Après 15 à 30 jours de semis, des nodules peuvent se former sur ces radicelles (Adams *et al.*, 1985).

Les tiges de haricot sont plus ou moins longues selon les variétés. Deux à trois mètres de long chez les haricots à rames mais 30 à 40 cm de longueur chez les haricots nains. Les tiges sont plus ou moins couvertes de poils et sont cannelées et rugueuses.

Les premières feuilles, au nombre de deux, sont simples et les suivantes sont formées de trois folioles ovales, vertes de 10 à 12 cm de longueur environ, chacune terminée par une pointe. Les nervures sont bien visibles sur les feuilles. Morphologiquement, la fleur est de couleur blanche ou rose et la floraison est zygomorphe du type papilionacé possédant 5 sépales soudées, 5 pétales (3 libres et 2 soudés entre eux) et 10 étamines dont 9 soudées par leur filet et un sac ovarien multiple (Fatou, 2002). Ces fleurs apparaissent vers le 24 et 42ème jour après le semis suivant les conditions climatiques.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La position systématique du haricot est la suivante:

Règne :	Végétale
Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Ordre :	Fabales
Famille :	Fabacées
Genre :	<i>Phaseolus</i>
Espèce :	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Nom vernaculaire en français :	Haricot
Nom vernaculaire en Malgache :	Tsaramaso



Photo 1: Biomasse aérienne de haricot

Le haricot est la troisième culture vivrière après le riz et le manioc à Madagascar. Sa culture est pratiquée essentiellement sur les hautes terres, le Sud-Ouest et le Nord-Ouest de la Grande Île.

→ Production et exportation

De 87 500 tonnes par an en 2006, la production de haricot dans la grande île a régressé d'une façon spectaculaire à partir de l'année 2009 et la cause provient généralement de la désorganisation de la production semencière (Ministère de l'agriculture, 2014). La régression de la production influe automatiquement sur l'exportation. A titre d'exemple, en 1995, Madagascar a exporté 6.075 tonnes

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

de haricot sec pour chuter de moitié en 2000, et à 730 tonnes seulement en 2009 (Ministère de l'Agriculture, 2014). A part les problèmes dus aux ravageurs et aux maladies, le manque d'éléments nutritifs tels que l'azote et le phosphore dans le sol pourrait être également parmi les principales causes de cette baisse de production.

→ Importance économique du haricot

Pour le cas de Madagascar, la croissance de l'économie est liée à la performance des productivités dont 80 % de la population dépendent (Bene, 2005). Ainsi, le haricot se présente comme un produit à valeur économique non négligeable pour Madagascar (FAO, 2004). Il possède les qualités requises pour entrer sur le marché international. Pour cette raison, des demandes importantes de haricot de la part de pays Européens et de plusieurs îles sont enregistrées depuis des années.

→ Importance nutritionnelle

Par sa richesse en protéine, le haricot fournit les acides aminés essentiels et indispensables à l'homme. Notons qu'il joue également un rôle important dans la lutte contre la malnutrition chronique dans la région du Sud-Est de Madagascar (FOFIFA/ECABREN, 2013). Ci-dessous donc la valeur alimentaire des graines sèches de haricot selon Hubert en 1978 :

Eau : 10.5 %

Matières minérales : 3.5 %

Matières grasses : 3 %

Matières azotées : 24.5 %

Amidon : 55.5 %

Cellulose : 3 %

II. L'azote et le phosphore pour la plante

L'azote est un élément majeur pour la constitution de nombreuses molécules organiques (Zahran, 1999). Il est le facteur principal de la croissance des plantes et un facteur de qualité qui influe sur le taux de protéines végétales. L'azote stimule le développement et l'activité racinaire de la plante favorisant ainsi l'exportation des autres éléments minéraux et la croissance des plantes (Stevenson, 1986). Les plantes l'absorbent sous forme de nitrates et d'ammonium. Pour le cas du

haricot, la plante puise de l'azote de l'association qu'elle établit avec des microorganismes (*Rhizobium*) capables de fixer l'azote atmosphérique (Taiz, 2002). Généralement, une carence du sol en azote se traduit par le jaunissement des feuilles (Bertrand et Gigou, 2000). Ces mêmes auteurs ont affirmé que l'azote a un effet spectaculaire sur le rendement de la production.

Le phosphore est considéré avec l'azote et le potassium comme des constituants fondamentaux de la vie des êtres vivants ; c'est un élément majeur pour la plante. Il se présente sous forme de triacide (H_3PO_4) dans la solution du sol. Par une action conjuguée avec l'azote, le phosphore favorise la croissance de la plante, le développement des racines, la rigidité des tissus et la qualité des produits végétaux. Un apport convenable en phosphore permet donc un développement harmonieux des plantes. La quantité d'azote fixé par le haricot est fortement limitée par la carence des sols en phosphore (Graham et Rosas, 1979 ; Pereira et Bliss, 1987). D'ailleurs, Ssali et Keya en 1983, ont démontré que l'application de 150 kg P_2O_5 /ha sur le haricot, dans un Nitosol de Kenya, permet de multiplier par trois le nombre de nodules et par dix la quantité d'azote atmosphérique fixée et une augmentation de rendement en graines de l'ordre de 29 %. Chez le haricot, la formation des nodules est très sensible à la concentration en P dans le sol. La teneur en P des nodules est plus élevée que celle des racines simples, le nodule est donc un puits très attractif en milieu pauvre en phosphore (Graham et Rosas, 1979). De ce fait, le phosphore représente un rôle particulier pour la formation des nodules. Autrement, la déficience en phosphore provoque un stress abiotique majeur qui limite la croissance des plantes et la productivité des cultures sur bon nombre de sols à travers le monde (Miao *et al.*, 2007 ; Nian *et al.*, 2007).

III. Nodules, Nodulation, Facteur Nod

L'infection de la plante par les Rhizobia induit la différenciation et la division des cellules du cortex (Foucher et Kondorosi., 2000). Elle se traduit par la formation d'un organe spécifique appelé nodule à l'intérieur duquel vivent les bactéries fixatrices d'azote (Patriarca *et al.*, 2004 ; Gage, 2004 ; Stacey *et al.*, 2006). Lors de cette interaction, les composés phénoliques exsudés par la plante hôte entraînent chez la bactérie la production de lipo-saccharides spécifiques appelés facteurs nod. En fait, ce sont des signaux moléculaires qui déclenchent la division des cellules corticales de la racine conduisant à la formation de nodule ou nodosité. Ces nodules sont très fréquents chez les légumineuses.



Photo 2 : Nodules racinaires de haricot

IV. Mycorhize et association mycorhizienne

En plus des interactions avec les microorganismes dans la rhizosphère, les racines des plantes établissent des relations symbiotiques spécifiques avec certains microorganismes du sol connues sous l'appellation de mycorhizes (Djigal, 2003). Ce sont des organismes asexués et symbiontes obligatoires qui vivent à l'intérieur des racines en formant des prolongements mycéliens présents dans le sol (Diem *et al.*, 1998). Généralement, les mycorhizes stimulent la croissance des plantes hôtes en particulier lorsque les éléments minéraux dans le sol sont en faible quantité.

Association mycorhizienne

Certains champignons forment des mycorhizes, une association mutuelle avec la racine des végétaux supérieurs (Smith *et al.*, 1997). Cette association permet l'amélioration de la nutrition minérale (principalement le phosphore) et hydrique de la plante (Plenchette, 1982 ; Wallander & Wickman, 1999 ; Chena *et al.*, 2005) mais également l'apport en des assimilats photosynthétiques pour les champignons. Le mycorhize peut se développer soit à l'intérieur des cellules de la racine pour produire des vésicules (endomycorhize) soit à l'extérieur entourant un bout de racine pour former une sorte de structure racinaire très caractéristique (ectomycorhize) visible à l'œil nu (Meotto, 1996 ; Drénou, 2006 ; Balzergue, 2010). Ce sont les 2 principales formes d'associations mycorhiziennes qui sont les plus répandues et les plus étudiées (Brundrett, 2002 ; 2004 ; Smith & Read, 2008).



Photo 2: Vésicules observées au niveau de la racine de haricot (à grossissement x40)

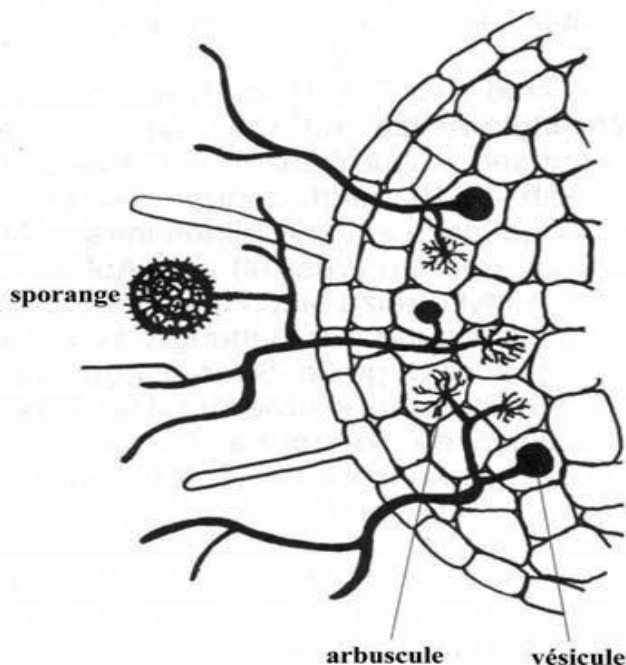
✚ Les Ectomycorhizes appartiennent aux groupes des champignons supérieurs à savoir les Basidiomycètes et les Ascomycètes (Miller, 1982). Le champignon forme une gaine d'hyphe externe dense sur les racines fines latérales de leurs plantes hôtes. L'hyphe ne pénètre pas dans les cellules de la plante, mais il se développe vers l'intérieur entre les cellules de l'épiderme et du cortex externe pour former le réseau de Hartig (Smith et Read, 1997).

✚ Chez les Endomycorhizes à vésicules et à arbuscules, les hyphes formés se développent à l'intérieur des racines et pénètrent dans les cellules de la paroi pour former des arbuscules microscopiques qui augmentent la surface de contact avec la plante hôte (Smith et Read, 1997). Cette symbiose se trouve dans tous les types de culture : les légumineuses dont le haricot fait partie, les formations à graminées, les cultures en serre et en pleins champs (riz, patate, arachides, tomate...). Les effets positifs des champignons mycorhizes à vésicules et à arbuscules (MVA) sur la plante sont attribués à l'intense exploration du sol par les hyphes fongiques pour prélever les éléments minéraux ; un centimètre de racines peut être enveloppé par plus d'un mètre de filaments mycéliens reliés aux arbuscules (Diop, 1996). Les plantes colonisées par les champignons MVA, ont une bonne régulation de leur alimentation en eau, car elles maintiennent une continuité hydrique au niveau de l'interface sol-racine, ce qui leur confère une résistance au stress hydrique (Hardie et Leyton, 1981 ; Gianinazzi-Pearson et Diem, 1982). Autrement, l'absorption du phosphore est facilitée par les hyphes mycéliens des champignons MVA mais l'absorption est encore améliorée par les mycorhizes par production des sidérophores (Azcon *et al.*, 1976 ; Tarafdar et Marschner, 1995).

La stimulation de croissance des plantes mycorhizées est, en effet, souvent associée à un effet bénéfique des champignons symbiotes sur la nutrition phosphatée des plantes-hôtes (Hatch, 1937 ; Mousain, 1989 ; Bolan, 1991). Les mycorhizes sont capables d'exploiter le phosphate du sol

au-delà d'épuisement de la racine et constituent en même temps le site d'accumulation du phosphore (Plenchette, 1982).

Endomycorhize VAM



Ectomycorhize

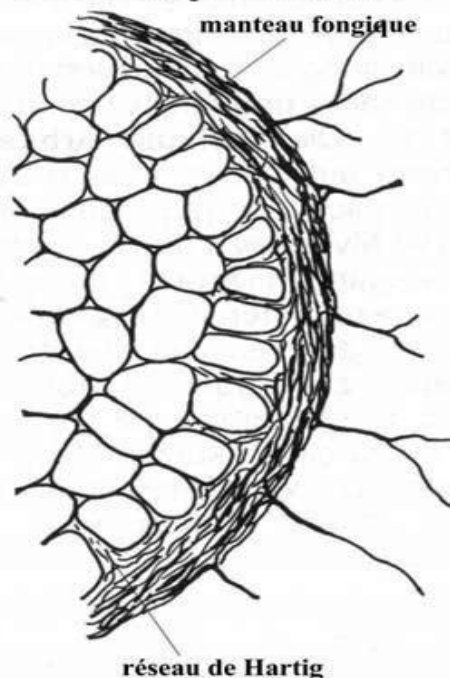


Photo 3: Structure anatomique de l'Ectomycorhize et de l'Endomycorhize à arbuscules et à vésicules

(Source : <http://www.prog-perception.com/IMG/jpg/Mycorhizes.jpg>)

V. Les Rhizobia et la symbiose fixatrice d'azote

1. *Rhizobium*

Du grec *rhiza* (racine) et *bio* (vie), *Rhizobium* signifie donc organisme vivant dans la racine. Appartenant à la grande famille des procaryotes, ce sont des microorganismes aérobies et chimiotrophes du sol. Ils sont de petite taille d'environ 0,5 à 0,9 micromètres de largeur et 1,2 à 3 micromètres de longueur. Les Rhizobia sont par ailleurs des bactéries à gram négatives possédant soit un flagelle polaire soit 2 à 6 flagelles péritricheux pour leur déplacement. La bactérie du genre *Rhizobium* représente l'une des bactéries fixatrices d'azote pouvant infecter les systèmes racinaires de nombreuses légumineuses. Ainsi, les espèces de légumineuses susceptibles d'être infectées par une même espèce de *Rhizobium* constituent un groupe d'inoculation croisée et les souches de *Rhizobium* capables de noduler les plantes appartenant à l'un de ces groupes sont considérées comme étant de la même espèce.

Les bactéries du genre *Rhizobium* appartiennent à la famille des Rhizobiaceae et comportent actuellement 22 espèces.

2. Symbiose fixatrice d'azote

Au cours de sa croissance, le haricot s'associe avec des microorganismes pour améliorer sa nutrition. *Rhizobium* et *Frankia* sont les 2 groupes de bactéries qui ont été identifiés comme fixatrices d'azote en association avec les plantes supérieures (Djigal, 2003). En particulier, la bactérie *Rhizobium* prélève du glucide nécessaire à sa nutrition carbonée tandis que la plante se bénéficie des substances azotées produites par les bactéries. Ce sont des associations spécifiques puisqu'elles impliquent un système de reconnaissance mutuelle entre les deux partenaires. Les symbioses fixatrices d'azote sont extrêmement importantes dans le maintien de la fertilité du sol. Elles sont utilisées dans les pratiques agricoles pour augmenter les rendements des cultures (Atlas et Bartha, 1993). Cette symbiose se traduit chez la plante hôte par la formation de structures différenciées et spécialisées, appelées nodules ou nodosités, localisées souvent au niveau des racines et dans certains cas au niveau des tiges (Dreyfus *et al.*, 1988). Ces nodules représentent de véritables organes d'échanges métaboliques.

Pour la plante, la symbiose permet une forte mobilisation de l'azote atmosphérique sous forme assimilable, un apport supplémentaire de nutriments suite à la dégénérescence des nodules dans la racine mais aussi une résistance au stress hydrique et aux certaines maladies. Pour la bactérie, la symbiose permet sa nutrition en sucre pour sa survie et sa prolifération. Elle peut profiter des conditions rhizosphériques qui semblent favorables à sa croissance.

Des interactions positives des champignons avec la bactérie du genre *Rhizobium* ont été notées dans l'amélioration de la fixation de l'azote et la nodulation des légumineuses (Barea *et al.*, 1992 ; Diop, 1995). La fixation d'azote est un processus à forte dépense énergétique qui nécessite des quantités suffisantes de phosphores et par conséquent une bonne mycorhization (Diop, 1996).

MATERIELS
ET
METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel d'étude

1. Haricot

Dans cette étude, le haricot de la variété RI 5-2 d'Andratsay, région de Vakinankaratra a été utilisé comme matériel végétal. Il s'agit d'une lignée, issue du croisement du haricot de la variété Ranjonomy et de la variété Ikinimba sélectionnée par le FOFIFA. Elle peut s'adapter sur des zones de 400 à 1200 m d'altitude et se trouve sensible à l'abondance de pluie qui peut nuire à la qualité de leurs graines. Cette variété exige moyennement un sol fertile pour sa croissance.

2. Site d'étude

Les expérimentations ont été réalisées dans le village d'Andratsay avec 2 sites différents représentés par 2 groupes de parcelles paysannes (deux paysans) comme suit :

- ❖ Parcelle 21 (ou site 21) pour Rasoanjanahary Vololona, S : 19°40'31.2'' E : 046°33'38.7'' Altitude : 1171 m.
- ❖ Parcelle 22 (ou site 22) pour Randriamampiany Livaniaina, S : 19°41'03.4'' E : 046°33'23.1'' Altitude : 1167 m.

3. Les six souches de l'inoculum microbien

L'inoculum microbien a été constitué par le mélange de six souches de bactéries fixatrices d'azote atmosphérique. Isolées à partir de nodules récoltés sur le système racinaire de haricot sur les hautes terres Malagasy, ces six souches ont été sélectionnées par leur capacité à re-noduler les haricots au laboratoire ainsi que leur aptitude à produire de l'acide Indole Acétique. Les souches ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE. Mélangées avec un support solide préalablement stérilisé qui est la tourbe, l'inoculum a été appliqué directement avec les semences, juste avant le semis à raison de 100 g d'inoculum pour 1kg de semence.

II. Echantillonnage et dispositif expérimental

Chaque site est constitué de 4 sous blocs de 96 m² avec 12 traitements pour chaque sous bloc. Pour chaque traitement, le haricot a été cultivé en 4 lignes avec un espacement de 50 cm entre les

MATERIELS ET METHODES

lignes et 20 cm entre les poquets. Dans chaque site, les traitements sont répartis en randomisation totale. Le schéma du dispositif expérimental est donné ci après :

Tableau 1: Schéma du dispositif expérimental

T 1	T 9	T 5	T 8	T 12	T 3	T 4	T 7
T 5	T 2	T 7	T 1	T 6	T 10	T 12	T 3
T 7	T 10	T 11	T 4	T 2	T 9	T 1	T 5
T 3	T 4	T 6	T 3	T 11	T 7	T 8	T 10
T 6	T 12	T 2	T 12	T 4	T 8	T 9	T 6
T 11	T 8	T 10	T 9	T 1	T 5	T 2	T 11
Répétition 1		Répétition 2		Répétition 3		Répétition 4	

Les lettres colorées représentent les traitements avec inoculation.

T : Traitement

Il s'agit d'une expérimentation à 3 facteurs avec 4 répétitions :

Facteur 1 : Niveau d'apport de phosphore (0, 50, 200 kg/ha)

Facteur 2 : Inoculation des graines avec le mélange de 6 souches de *Rhizobium* efficaces isolées à partir du haricot

Facteur 3 : Niveau d'apport de dolomie (0, 400 g)

Tableau 2: Répartition des traitements appliqués au sol

Traitements	Dose de P ₂ O ₅ (Kg/ha)	Niveau d'inoculation	Niveau de dolomie
T 1	0	+ Rh	+ Do
T 2	50	+ Rh	+ Do
T 3	200	+ Rh	+ Do
T 4	0	0 Rh	0 Do
T 5	50	0 Rh	0 Do
T 6	200	0 Rh	0 Do
T 7	0	+ Rh	0 Do
T 8	50	+ Rh	0 Do
T 9	200	+ Rh	0 Do
T 10	0	0 Rh	+ Do
T 11	50	0 Rh	+ Do
T 12	200	0 Rh	+ Do

(+Rh= avec inoculation ; 0Rh=sans inoculation ; +Do= avec dolomie ; 0Do= sans dolomie ; T1 : 0kg de P₂O₅/Inoculé/400g dolomie ; T2 : 50kg de P₂O₅/Inoculé/400g dolomie ; T3 : 200kg de P₂O₅/Inoculé/400g dolomie ; T4 : 0kg de P₂O₅/Non inoculé/0g dolomie ; T5 : 50kg de P₂O₅/Non inoculé/0 g dolomie ; T6 : 200kg de P₂O₅/Non inoculé/0 g dolomie ; T7 : 0kg P₂O₅/Inoculé/0g dolomie ; T8 : 50kg de P₂O₅/Inoculé/0g dolomie ; T9 : 200kg de P₂O₅/Inoculé/0g dolomie ; T10 : 0kg de P₂O₅/Non inoculé/400g dolomie ; T11 : 50kg de P₂O₅/Non inoculé/400g dolomie ; T12 : 200kg de P₂O₅/Non inoculé/400g dolomie)

Lors de l'échantillonnage, 4 plantes par traitement ont été choisies au hasard. Les plantes ont été prélevées avec leur système racinaire et les sols adhérents aux racines. Les nodules ont été prélevés en même temps avec le sol rhizosphérique.

III. Méthodes

1. Evaluation de la biomasse aérienne et racinaire

Après l'évaluation du taux de nodulation et de mycorhization, les systèmes racinaires et les parties aériennes de la plante ont été mis à sécher à l'étuve à 100 °C pendant 24 heures puis leurs poids secs ont été évalués.

2. Détermination du taux de nodulation

Le nombre, ainsi que le poids des nodules observés dans chaque plante font partie des critères très importants pour déterminer la réponse des plantes à une inoculation microbienne. Le taux de nodulation a été déterminé par le dénombrement des nodules observés au niveau du système racinaire de chaque plant. Le poids de la totalité des nodules observés dans chaque plante a été par la suite évalué sur une balance de précision.

3. Détermination du taux d'endomycorhization

D'après la méthode de Philips et Hayman (1970), les racines ont été colorées afin de déterminer le taux d'endomycorhization. Pour cela, elles ont été d'abord éclaircies dans une solution de KOH à 10 % pendant une durée d'incubation de 20 minutes à 90 °C. Elles ont été par la suite rincées à l'eau de robinet avant la coloration au Bleu Trypan (0,05 %) pendant 20 minutes. L'examen au microscope de l'infection mycorhizienne a été effectué sur des fragments de racine (d'environ 1 centimètre) établis entre lame et lamelle dans une goutte de glycérol à grossissement $\times 40$ (Brundett *et al.*, 1985).

La présence des vésicules et des hyphes indique que les racines de la plante sont colonisées par les champignons endomycorhiziens. Les vésicules et les mycéliums de champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules présents dans le cytoplasme sont colorés en bleu. Dix fragments ont été observés pour chaque système racinaire et le taux de mycorhization (TM) a été donné par la formule suivante :

$$TM = \frac{\text{Nombre de fragments de racines colonisés}}{\text{Nombre total de fragments de racines observés}} \times 100$$

4. Calcul du rendement de production

En se basant sur le poids des graines obtenus par parcelle, le rendement de production (RDT) en graines de haricot a été obtenu à partir de la formule suivante :

$$RDT = \frac{\text{Produit en kg de haricot des parcelles}}{\text{Surface en ha}} \times 100$$

5. Activité des enzymes phosphatasiques du sol de culture

La détermination de l'activité des enzymes est basée sur l'évaluation de la quantité du produit de l'hydrolyse en utilisant un substrat bien déterminé. Ces activités enzymatiques qui sont en grande partie d'origine microbienne dans le sol sont souvent utilisées pour évaluer le fonctionnement biologique des sols (Tabatabai et Dick, 2002).

Généralement, il existe 2 types d'enzymes phosphatasiques dans le sol selon le pH de leur activité : les phosphatases acides actives à pH aux environs de 6 et les phosphatases alcalines actives aux environs de 11 (Sall *et al.*, 2002 ; Samuel *et al.*, 2010). Le substrat utilisé étant le p-NPP ou para-NitroPhényl Phosphate et dans notre cas, seule l'activité des phosphatases acides a été évaluée. La quantité du produit de l'hydrolyse, le p-Nitrophénol, a été évaluée au spectrophotomètre.

Dosage du p-Nitrophénol

Une quantité précise (0,1 g) de sol est mise en suspension dans un mélange de 100 µl de p-NPP et de 400 µl de tampon Mc Ivain (Citrates Phosphate Buffer) dans un éppendorf de 2 ml. Trois essais (répétition), un témoin enzyme (TE) et un témoin substrat (TS) ont été établis pour chaque échantillon. Le témoin enzyme contient du sol (pas de substrat) tandis que le témoin substrat contient du p-NPP (pas de sol). Chaque tube est ensuite incubé à 37 °C sous faible agitation. Après 1 h d'incubation, la réaction d'hydrolyse est stopée en ajoutant 100 µl de solution de CaCl₂ à 0,5 M et 400 µl de NaOH à 0,5 M. Le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 10 000 tours/mn et puis le surnageant est récupéré pour une lecture au spectrophotomètre à 400 nm en prenant comme référence un témoin blanc H₂O. La composition de chaque tube est donnée dans le tableau suivant :

Tableau 3: Composition de chaque éppendorf pour la mesure des activités phosphatasiques

	TS	TE	E1	E2	E3
Tampon phosphate (µl)	400	400	400	400	400
p-NPP (µl)	100	-	100	100	100
Sol (g)	-	0,1	0,1	0,1	0,1
H₂O (µl)	-	100	-	-	-

(**TS** : Témoin substrat ; **TE** : Témoin enzyme ; **E1** : essai 1 ; **E2** : Essai 2 ; **E3** : Essai 3 ; **g** : gramme ; **µl** : microlitre)

6. Evaluation de l'activité microbienne globale du sol

Une méthode de mesure plus globale de l'activité enzymatique microbienne du sol a été proposée par Schuner et Rosswall (1982). Ces auteurs ont montré que la Fluorescéine diacétate (FDA) utilisée comme substrat est hydrolysée par la plupart des microorganismes du sol en donnant comme produit de l'hydrolyse la fluorescéine.

Pour chaque échantillon de sol, 1 g a été mélangé avec 15 ml de solution tampon et 200 µl de substrat (FDA) dans un tube à essai. Trois essais (Répétitions), un témoin enzyme (sans substrat) et un témoin substrat (sans sol) ont été établis pour chaque échantillon de sol. La composition dans chaque tube à essai est donnée dans le tableau suivant.

Tableau 4: Composition de chaque tube pour la mesure de l'activité microbienne globale du sol

	TS	TE	E1	E2	E3
Solution tampon (ml)	15	15	15	15	15
FDA (µl)	200	-	200	200	200
Sol (g)	-	1	1	1	1
H₂O (µl)	-	200	-	-	-

(TS : Témoin substrat ; TE : Témoin enzyme ; E1 : essai 1 ; E2 : Essai 2 ; E3 : Essai 3 ; g : gramme ; µl : microlitre)

Les mélanges ont été agités au vortex puis incubés pendant 1 h à 30 °C avant de mesurer la valeur de la densité optique au spectrophotomètre à 490 nm. La densité optique lue correspond à la quantité de la fluorescéine produite et peut être interprétée comme activité microbienne globale du sol de culture.

IV. Traitements statistiques des données

Les moyennes des différentes variables étudiées ont été analysées par l'analyse de variances (ANOVA) à l'aide du logiciel XLSTAT. L'objectif étant de vérifier l'influence des différents apports et traitements sur le fonctionnement du sol et sur le développement des plantes et de comparer l'intensité de ces effets entre les différents traitements. Dans ce sens, le test de Newman-Keuls a été utilisé pour détecter la différence entre les groupes de moyenne statistiquement homogène.

MATERIELS ET METHODES

Une analyse en composante principale (ACP) des données a été réalisée également pour décrire les interactions qui peuvent exister entre les différentes variables étudiées et les différents traitements.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I. Influence des différents traitements sur le développement de la plante et sur le rendement de la production

Le développement des plantes évalué par le poids sec de la biomasse aérienne et racinaire ainsi que le rendement de la production en gousse évalué par le poids sec des gousses est donné dans les tableaux 5 et 6 ci après.

Tableau 5 : Développement des plants au niveau des parcelles de traitement différent du site 21

	BA(g)	BR(g)	RDT (kg/ha)
T1	19.125 (ef)	3.925 (abcd)	932.750 (cd)
T2	35.125 (ab)	4.900 (ab)	2030.750 (a)
T3	40.350 (a)	5.350 (a)	2289.000 (a)
T4	10.350 (h)	2.950 (d)	420.000 (e)
T5	21.550 (defg)	3.425 (bcd)	626.500 (de)
T6	27.125 (bcde)	4.075 (abcd)	1041.250 (cd)
T7	16.225 (fgh)	3.150 (cd)	849.500 (cde)
T8	30.750 (bc)	4.500 (abc)	1313.250 (bc)
T9	34.625 (ab)	4.875 (ab)	1578.250 (b)
T10	14.125 (gh)	2.850 (d)	693.500 (de)
T11	24.500 (cdef)	3.500 (bcd)	886.000 (cde)
T12	28.900(cd)	4.550 (abc)	1238.500 (bc)

(Les données dans la même colonne suivie par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-keuls $p < 0,05$. **BA** : Biomasse aérienne ; **BR** : Biomasse racinaire ; **RDT** : Rendement ; **T1** : 0kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T2** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T3** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T4** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T5** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/0 g dolomie ; **T6** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T7** : 0kg P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T8** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T9** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T10** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T11** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T12** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie)

Pour le site 21, une inoculation microbienne couplée avec une dose élevée en phosphore (Traitement 3) a stimulé significativement la croissance de la biomasse aérienne et racinaire des plantes. Cette croissance a chuté lorsqu'on a enlevé le phosphore et l'inoculation (traitement

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

témoin). Par contre, la présence de dolomie seule dans le traitement T10 n'a aucun effet significatif sur le développement des plantes. C'est également sur ce traitement 10 qu'on a enregistré le développement racinaire le moins important.

Pour le rendement de la production, les résultats suivent la tendance du développement des plantes. C'est au niveau du traitement 3 où on a couplé l'inoculation avec l'apport de P qu'on a enregistré le rendement le plus élevé. Par rapport au traitement témoin (sans apport de P, pas d'inoculation ni de dolomie ou traitement 4), l'inoculation couplée avec l'apport de source de P a généralement stimulé le développement des plantes et a augmenté le rendement pour le cas des parcelles du site 21.

Tableau 6 : Développement des plants au niveau des parcelles de traitement différent du site 22

	BA (g)	BR (g)	RDT (kg/ha)
T1	12.750 (a)	3.350 (b)	1143.250 (bc)
T2	17.250 (a)	4.075 (ab)	2042.500 (a)
T3	19.900 (a)	3.875 (ab)	2351.000 (a)
T4	16.050 (a)	4.000 (ab)	509.250 (d)
T5	8.575 (a)	3.075 (b)	750.250 (cd)
T6	15.100 (a)	3.925 (ab)	1160.500 (bc)
T7	19.300 (a)	5.575 (a)	906.750 (cd)
T8	18.100 (a)	5.600 (a)	1603.000 (b)
T9	15.775 (a)	4.525 (ab)	2202.250 (a)
T10	16.200 (a)	4.625 (ab)	638.250 (cd)
T11	11.375 (a)	3.300 (b)	947.000 (cd)
T12	14.200 (a)	4.475 (ab)	1204.750 (bc)

(Les données dans la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-keuls $p < 0,05$. **BA** : Biomasse aérienne ; **BR** : Biomasse racinaire ; **RDT** : Rendement ; **T1** : 0kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T2** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T3** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T4** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T5** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/0 g dolomie ; **T6** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T7** : 0kg P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T8** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T9** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T10** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T11** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T12** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie)

Généralement, les résultats observés au niveau des parcelles du site 22 suivent la même tendance que ceux du site 21. Les traitements couplant l'inoculation avec l'apport de source de P

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

ont toujours stimulé significativement le développement des plantes et ont permis d'améliorer le rendement de la production. La présence de dolomie, seule ou en association avec les deux autres facteurs (apport de P et inoculation) n'a aucun effet significatif ni sur le développement des plantes ni sur le rendement de culture.

II. Impacts des différents traitements sur le taux de nodulation et le taux de mycorhization du haricot

Les taux de nodulation et de mycorhization pour les 2 sites (site 21 et 22) sont présentés dans les tableaux 7 et 8 ci-dessous.

Tableau 7: Effets des différents traitements sur le taux de nodulation et de mycorhization du site 21

Traitements	Taux de nodulation	Taux de Mycorhization (%)
T1	76.000 (c)	38.33 (bc)
T2	530.250 (ab)	43.889 (abc)
T3	736.500 (a)	42.917 (bc)
T4	13.750 (c)	69.44 (a)
T5	108.000 (c)	56.250 (ab)
T6	236.000 (bc)	53.333 (abc)
T7	47.000 (c)	35.417 (bc)
T8	520.250 (ab)	10.556 (d)
T9	592.250 (a)	28.004 (c)
T10	29.750 (c)	45.682 (abc)
T11	12.275 (c)	53.687 (abc)
T12	462.500 (ab)	41.111 (bc)

(Les données dans la même colonne suivie par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-keuls $p < 0,05$. **T1** : 0kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T2** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T3** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T4** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T5** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/0 g dolomie ; **T6** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/0 g dolomie ; **T7** : 0kg P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T8** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T9** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T10** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T11** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T12** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie)

La présence d'une source de phosphore couplée avec l'inoculation (Traitement 3 et 9) a fortement stimulé la nodulation pour les plantes du site 21. Les taux de nodulation dans ces deux

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

traitements sont significativement élevés par rapport à ceux enregistrés dans les autres traitements. Le taux de nodulation le plus élevé a été observé dans le traitement 3 où on a mis de la dolomie à dose de 400 g. Par contre, l'ajout de la dolomie n'a aucun effet sur la nodulation pour le traitement 10 où on n'a mis ni de P, ni d'inoculation.

Pour le taux de mycorhization, l'apport de P semble inhiber la formation des structures symbiotiques. En effet, le taux de mycorhization le plus élevé a été enregistré sur le traitement 4 où on n'a mis ni de P, ni d'inoculation. Aucune interaction positive n'a été observée également entre l'inoculation par les bactéries fixatrices d'azote et le taux de mycorhization. Au contraire, l'inoculation semble inhiber la formation des mycorhizes au niveau des systèmes racinaires pour les plants du site 21.

Tableau 8: Effets des différents traitements sur le taux de nodulation et de mycorhization du site 22

Traitements	Taux de nodulation	Taux de Mycorhization (%)
T1	45.750 (ab)	58.447 (c)
T2	112.000 (ab)	86.116 (ab)
T3	135.750 (a)	86.100 (ab)
T4	7.500 (ab)	90.593 (a)
T5	19.000 (b)	82.422 (ab)
T6	24.500 (b)	81.581 (ab)
T7	76.250 (ab)	79.409 (ab)
T8	107.000 (ab)	70.066 (b)
T9	104.000 (ab)	78.840 (ab)
T10	1.250 (b)	90.102 (a)
T11	4.750 (b)	76.577 (ab)
T12	13.500 (b)	82.276 (ab)

(Les données dans la même colonne suivie par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-keuls $p < 0,05$. **T1** : 0kg de P2O5/Inoculé/400g dolomie ; **T2** : 50kg de P2O5/Inoculé/400g dolomie ; **T3** : 200kg de P2O5/Inoculé/400g dolomie ; **T4** : 0kg de P2O5/Non inoculé/0g dolomie ; **T5** : 50kg de P2O5/Non inoculé/0 g dolomie ; **T6** : 200kg de P2O5/Non inoculé/0 g dolomie ; **T7** : 0kg P2O5/Inoculé/0g dolomie ; **T8** : 50kg de P2O5/Inoculé/0g dolomie ; **T9** : 200kg de P2O5/Inoculé/0g dolomie ; **T10** : 0kg de P2O5/Non inoculé/400g dolomie ; **T11** : 50kg de P2O5/Non inoculé/400g dolomie ; **T12** : 200kg de P2O5/Non inoculé/400g dolomie)

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Pour les plants du site 22, la formation des structures nodulaires semble être moins stimulée que celle observée chez les plants du site 21. Pourtant, les résultats suivent les tendances enregistrées dans le site 21. Le taux de nodulation le plus élevé a été observé chez les plants du traitement 3 où on a couplé l'apport de P, l'inoculation et l'apport de dolomie. Ce taux enregistre sa plus faible valeur quand on n'a mis ni de P, ni d'inoculation (T4, T10).

Pour la mycorhization, les taux observés sont plus élevés que ceux enregistrés chez les plants du site 21. On a toujours remarqué une sorte d'inhibition de la mycorhization quand on a apporté une source de P dans le sol. Le taux de mycorhization le plus élevé a été observé quand on n'a apporté ni de phosphore, ni d'inoculation (T4). L'apport de dolomie n'a pas d'effet significatif sur la formation des structures mycorhiziennes au niveau des racines.

III. Influence des différents traitements sur l'activité microbienne globale et l'activité phosphatasique du sol

L'influence des différents traitements sur l'activité microbienne globale et sur l'activité phosphatasique du sol est donnée dans le tableau (Tableau 9) suivant :

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Tableau 9: Quantité de fluorescéine et de p-Nitrophénol produit dans le sol soumis aux différents traitements du site 21

Traitements	Quantité de fluorescéine ($\mu\text{g/h/g}$ de sol)	Quantité de p-Nitrophénol ($\mu\text{g/h/g}$ de sol)
T1	90.540 (a)	223.810 (a)
T2	82.774 (ab)	212.560 (a)
T3	44.171 (bc)	154.563 (a)
T4	66.658 (abc)	166.958 (a)
T5	47.489 (bc)	143.790 (a)
T6	52.226 (bc)	207.282 (a)
T7	46.113 (bc)	165.496 (a)
T8	36.373 (c)	204.206 (a)
T9	36.133 (c)	200.714 (a)
T10	95.290 (a)	269.246 (a)
T11	23.701 (c)	228.016 (a)
T12	43.248 (bc)	237.103 (a)

(Les données dans la même colonne suivie par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-keuls $p < 0,05$. **T1** : 0kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T2** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T3** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T4** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T5** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/0 g dolomie ; **T6** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T7** : 0kg P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T8** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T9** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T10** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T11** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T12** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie)

L'activité microbienne globale et l'activité phosphatasique du sol sont représentées respectivement par la quantité de fluorescéine et de p-Nitrophénol produite lors de l'hydrolyse de la FDA et du p-NPP. Ces deux activités ont enregistré leur plus fortes intensités dans le traitement 10 où on a mis seulement 400g de dolomie (pas d'apport de P ni d'inoculation) et dans le traitement 1 (sans apport de P mais avec inoculation). Généralement, l'inoculation n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité microbienne globale et sur l'activité des enzymes phosphatasiques du sol. Pour les activités des enzymes phosphatasiques, aucune différence significative n'a été trouvée entre tous les traitements.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Tableau 10: Quantité de fluorescéine et de p-Nitrophénol produit dans le sol soumis aux différents traitements du site 22

Traitements	Quantité de fluorescéine ($\mu\text{g/h/g}$ de sol)	Quantité de p-Nitrophénol ($\mu\text{g/h/g}$ de sol)
T1	64.415 (ab)	207.619 (a)
T2	52.383 (abc)	177.672 (bc)
T3	2.853 (c)	132.619 (bc)
T4	25.360 (abc)	156.032 (bc)
T5	30.166 (abc)	286.984 (a)
T6	45.679 (abc)	209.524 (ab)
T7	47.281 (abc)	84.524 (c)
T8	81.436 (a)	116.786 (bc)
T9	19.435 (abc)	178.413 (bc)
T10	48.507 (abc)	182.937 (bc)
T11	16.991 (bc)	71.488 (c)
T12	40.854 (abc)	147.460 (bc)

(Les données dans la même colonne suivie par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-keuls $p < 0,05$. **T1** : 0kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T2** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T3** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T4** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T5** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/0 g dolomie ; **T6** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T7** : 0kg P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T8** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T9** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T10** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T11** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T12** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie)

Pour les sols du site 22, l'activité microbienne globale et l'activité des enzymes phosphatasiques les plus élevées ont été enregistrées respectivement dans le traitement 8 (50kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie) et le traitement 5 (50kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie). L'activité microbienne globale du sol a été fortement inhibée par l'apport en grande quantité de P et de dolomie (Traitement 3 : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie). Pour l'activité des enzymes phosphatasiques, l'inoculation n'a pas eu d'effet significatif.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

IV. Corrélation entre les principaux paramètres étudiés selon l'analyse en composante principale

L'analyse en composante principale a permis d'avoir un aperçu global sur les corrélations existantes entre les paramètres étudiés aussi bien sur les sols que sur les plantes et les traitements appliqués au niveau des parcelles.

1. Corrélation entre les différents variables entre les sols et plantes du site 21

Les figures ci-après représentent la projection sur le plan factoriel (F1 et F2) des données des variables étudiées sur la plante et sur les sols de culture au niveau du site 21.

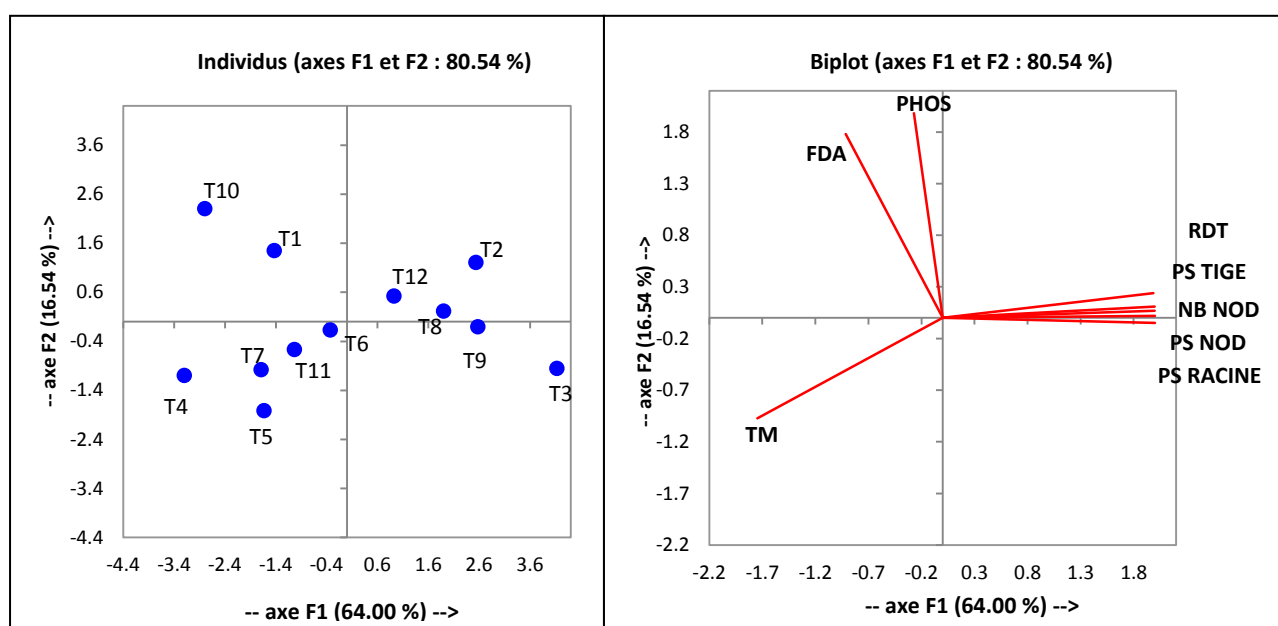


Figure 1a et 1b : Interaction entre les différents paramètres étudiés sur les sols et les plantes du site 21

(**FDA** : Activité microbienne globale ; **PHOS** : Activité phosphatasique ; **PS RACINE** : poids sec racine ; **PS TIGE** : Poids sec tige ; **PS NOD** : Poids sec des nodules ; **NBR NOD** : Nombre des nodules ; **RDT** : rendement ; **TM** : taux de mycorhization ; **T1** : 0kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T2** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T3** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; **T4** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T5** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; **T6** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/0 g dolomie ; **T7** : 0kg P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T8** : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T9** : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; **T10** : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T11** : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; **T12** : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie)

Les axes F1 et F2 des deux figures 1 et 2 qui absorbent 80,54 % de l'inertie totale sont utilisés pour évaluer les interactions entre les différents paramètres étudiés. Sur l'axe F1 qui représente 64% de l'inertie totale, il est remarqué que l'absence de l'apport de source en P correspond à des activités microbiennes globales et des enzymes phosphatasiques élevées (T1 et T10). Par contre,

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

l'axe F2 (16,54 % de l'inertie totale) illustre bien la correspondance entre l'apport de P et le bon développement des plantes. Sur cet axe, les traitements avec un apport de P (200 kg ou 50 kg/ha) que ce soit inoculés ou non inoculés, se sont montrés favorables à la fois au bon développement des plantes et à des nodulations plus stimulées. C'est également dans ces traitements qu'on a enregistré le rendement le plus élevé. Toujours sur l'axe F2, le taux de mycorhization est corrélé avec les traitements non inoculés et sans apport de P. La formation des mycorhizes s'oppose également à toutes les variables évaluant le développement des plantes.

Le tableau (Tableau 11) ci-après présente la matrice de corrélation montrant l'interaction positive et négative entre les différents paramètres étudiés. Ce tableau montre que le nombre et le poids des nodules sont positivement et fortement corrélés avec le développement aérien et racinaire de la plante ainsi qu'avec le rendement de la production. Par contre, ce dernier est négativement corrélé avec le taux de mycorhization, l'activité microbienne globale et l'activité des enzymes phosphatasiques du sol.

Tableau 11: Matrice de corrélation entre les différents paramètres étudiés pour les parcelles du site 21

	PS							
	NB NOD	PS NOD	PS TIGE	RACINE	RDT	TM	FDA	PHOS
NB NOD	1							
PS NOD	0.951	1						
PS TIGE	0.950	0.922	1					
PS RACINE	0.956	0.928	0.960	1				
RDT	0.919	0.977	0.922	0.931	1			
TM	-0.514	-0.363	-0.449	-0.481	-0.422	1		
FDA	-0.348	-0.180	-0.394	-0.259	-0.136	0.207	1	
PHOS	-0.092	-0.142	-0.081	-0.086	-0.076	-0.182	0.358	1

(*PS NOD* : Poids sec nodule ; *NBR NOD* : Nombre de nodules ; *PS TIGE* : Poids sec tige ; *PS RACINE* : Poids sec racine ; *RDT* : Rendement ; *TM* : Taux de mycorhization ; *PHOS* : Activité phosphatasique ; *FDA* : Activité microbienne global)

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

2. Corrélation entre les différents variables entre les sols et plantes du site 22

Les figures ci-après représentent la projection sur le plan factoriel (F1 et F2) des données des variables étudiées sur la plante et sur les sols de culture au niveau du site 22.

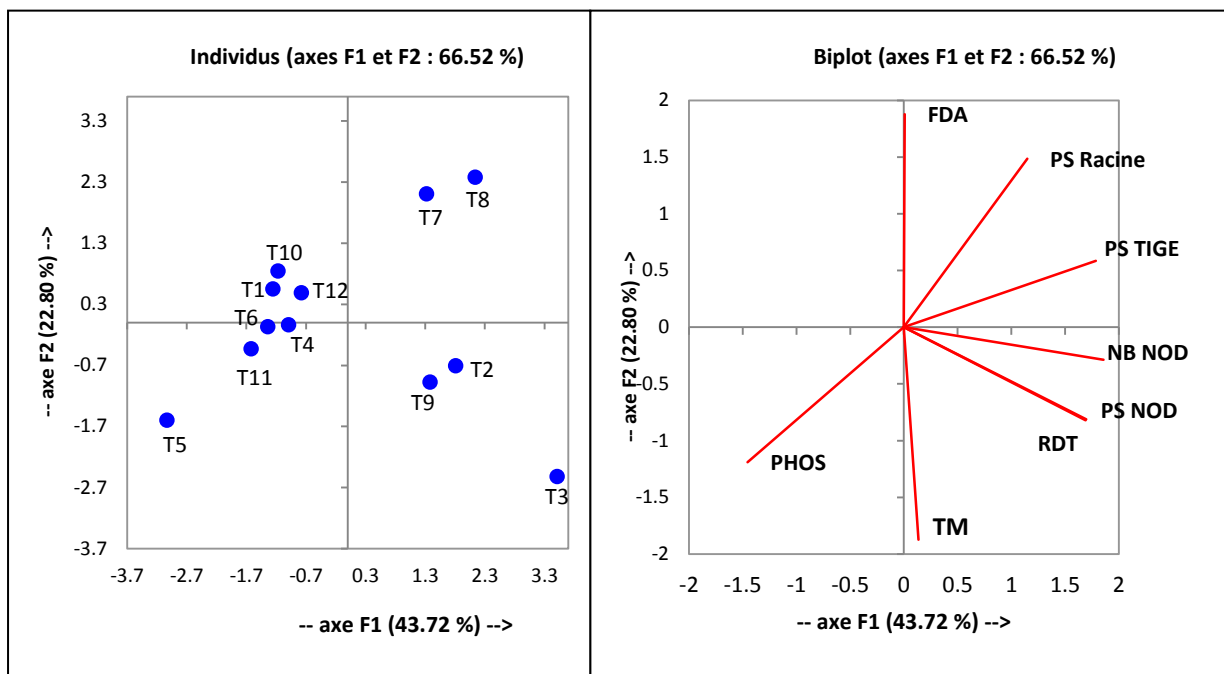


Figure 2a et 2b : Interaction entre les différents paramètres étudiés sur les sols et les plantes du site 22

(*PS RACINE* : poids sec racine ; *PS TIGE* : Poids sec tige ; *PS NOD* : Poids sec des nodules ; *NBR NOD* : Nombre de nodules ; *RDT* : rendement ; *TM* : taux de mycorhization ; *PHOS* : Activité phosphatasique ; *FDA* : Activité microbienne ; *T1* : 0kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; *T2* : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; *T3* : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/400g dolomie ; *T4* : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; *T5* : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/0g dolomie ; *T6* : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/0 g dolomie ; *T7* : 0kg P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; *T8* : 50kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; *T9* : 200kg de P_2O_5 /Inoculé/0g dolomie ; *T10* : 0kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; *T11* : 50kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie ; *T12* : 200kg de P_2O_5 /Non inoculé/400g dolomie)

Les axes F1 et F2 des deux figures 1 et 2 qui absorbent 66,52 % de l'inertie totale sont utilisés pour évaluer les interactions entre les différents paramètres étudiés. Sur l'axe F1 qui représente 43,72 % de l'inertie totale, il est remarqué que le taux de mycorhization s'oppose fortement à l'activité microbienne globale du sol. Par contre, cet axe ne permet pas de bien illustrer les interactions entre les autres paramètres.

L'axe F2 qui absorbe 22,80 % de l'inertie totale permet de grouper les différents paramètres (outre le taux de mycorhization et l'activité microbienne globale du sol) en deux groupes bien distincts. En effet, les paramètres évaluant le développement des plantes (taux de nodulation et

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

nombre des nodules, biomasse racinaire et aérienne) s'opposent tous à l'activité des enzymes phosphatasiques du sol. Sur la carte de présentation des traitements, il est bien présenté que ces paramètres liés au bon développement des plantes correspondent aux traitements couplant l'apport de P et l'inoculation.

Le tableau ci-après (Tableau 12) présente la matrice de corrélation entre les variables étudiées et les traitements appliqués au niveau des parcelles du site 22. Ce tableau montre la corrélation positive entre le taux de nodulation d'une part et le poids sec des nodules, le développement aérien et racinaire et le rendement de production d'autre part. Ce dernier paramètre est toujours négativement corrélé avec le taux de mycorhization, l'activité microbienne et l'activité des enzymes phosphatasiques du sol.

Tableau 12: Matrice de corrélation du site 22 entre les différents paramètres étudiés

	PS							
	NB NOD	PS NOD	PS TIGE	RACINE	RDT	TM	FDA	PHOS
NB NOD	1							
PS NOD	0.874	1						
PS TIGE	0.643	0.588	1					
PS RACINE	0.366	0.097	0.736	1				
RDT	0.881	0.850	0.437	0.126	1			
TM	-0.133	0.070	0.225	0.040	-0.083	1		
FDA	0.027	-0.208	0.103	0.451	-0.160	-0.498	1	
PHOS	-0.209	-0.178	-0.537	-0.497	-0.114	0.036	0.071	1

(*PS NOD* : Poids sec nodule ; *NBR NOD*: Nombre de nodules ; *PS TIGE* : Poids sec tige ; *PS RACINE* : Poids sec racine ; *RDT* : Rendement ; *TM* : Taux de mycorhization ; *PHOS* : Activité phosphatasique ; *FDA* : Activité microbienne globale)

DISCUSSION

DISCUSSION

La présente étude a été basée sur la combinaison d'une technologie moderne issue de recherches scientifiques au laboratoire qu'est la technologie d'inoculation microbienne et les techniques de fertilisation que les paysans ont l'habitude de pratiquer. L'objectif principal étant de décrire la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol ainsi que le développement des plantes et le rendement de la production selon différents traitements appliqués au sol couplant ou non l'apport de P, l'apport de dolomie et l'inoculation microbienne. Les expérimentations ont été établies dans des parcelles paysannes de la région de Vakinankaratra groupées en deux sites : site 21 et site 22.

I. Influence des différents traitements sur le développement des plants et sur le rendement de la production chez le haricot de la variété RI 5-2

L'azote et le phosphore font partie des éléments nutritifs les plus importants pour le développement des plantes. L'apport en ces deux éléments dans les systèmes de production de haricot a déjà fait l'objet de plusieurs études (Stevenson, 1986 ; Bertrand et Gigou, 2000). Les résultats de cette étude ont prouvés que l'inoculation des plantes avec des bactéries fixatrices d'azote qui se sont déjà montrées efficaces au laboratoire permet d'améliorer aussi bien le développement des plantes que le rendement de la production quand on ajoute dans le système culturale un apport de P (50 ou 200 kg/ha). Ces résultats corroborent ceux de Fox et Kamprath (1970) et Barber (1995) qui indiquent que la réussite de la technologie d'inoculation microbienne valorisant les bactéries fixatrices d'azote chez la culture des légumineuses exige la présence d'une quantité suffisante de P dans le sol. Cette quantité de P présente donc un effet « starter » sur les mécanismes de fixation de l'azote atmosphérique par ces bactéries (Bellouki, 1995). Par contre, nos résultats illustrent bien que la valorisation de ces bactéries fixatrices d'azote permet de réduire ou même de remplacer totalement l'apport d'azote dans les systèmes de production de haricot. En effet, les résultats de la présente étude ont montré que l'inoculation microbienne couplée avec l'apport de P a permis d'augmenter d'une manière significative le rendement des cultures par rapport aux traitements témoins.

II. Influence des différents traitements sur le taux de nodulation et le taux de mycorhization du haricot de la variété RI 5-2

Parmi tous les traitements appliqués, c'est dans le traitement de la parcelle témoin (traitement 4 sans apport) qu'on a enregistré un taux de mycorhization le plus élevé. Dans les autres traitements, le taux de mycorhization a été inversement proportionnel soit à la quantité de P apportée au sol soit à la présence de l'inoculation par des bactéries fixatrices d'azote. L'inhibition de la mycorhization par la présence d'une forte quantité de P dans le sol a été déjà rapportée (Boukcim et Mousain, 2000 ; Tsvetkova et Georgiev, 2003). Sous cette condition, les signaux moléculaires permettant d'établir des structures symbiotiques entre les plantes et les champignons mycorhiziens sont très faibles ou même inexistants (Balzergue, 2012). Nos résultats ont montré pourtant qu'avec les traitements où la mycorhization a été la plus élevée (traitement témoin), le développement des plantes ainsi que le rendement de la production restent faibles. Ce qui suggère que les mycorhizes natifs du sol de culture ne sont pas performants quant à la stimulation du développement des plantes via l'amélioration de l'acquisition des éléments nutritifs. L'introduction de souches de champignons mycorhiziens performants constitue une des solutions préconisées dans ces conditions.

Pour le taux de nodulation, l'apport de P de 50 et 200 kg/ha a permis d'obtenir des taux significativement élevés par rapport à ceux enregistrés dans les traitements sans apport de P. Ces résultats confirment l'importance de la présence de P dans le sol sur l'établissement et le fonctionnement des symbioses fixatrices d'azote. Il a été déjà rapporté qu'une bonne nodulation du haricot est toujours observée avec des bactéries performantes et en présence de P (Lof *et al.*, 1990 ; FAO, 2004 ; Miao *et al.*, 2007). Il a été déjà démontré également qu'un sol pauvre en P limite fortement la fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries (Graham et Rosas, 1979 ; Pereira et Bliss, 1987). Il est pourtant intéressant d'identifier les quantités de P les plus favorables au fonctionnement de ces structures symbiotiques. Une expérience avec un apport de phosphore (P_2O_5) à raison de 150 kg/ha et d'inoculation a déjà permis d'augmenter trois fois plus le nombre de nodules (Ssali et Keya 1986).

III. Influence des différents traitements sur l'activité phosphatasique et l'activité microbienne globale du sol de haricot de la variété RI 5-2

Généralement, les résultats de la présente étude ont montré que le bon développement des plantes et le rendement amélioré de la production n'ont pas été accompagnés par des activités

DISCUSSION

microbiennes globales et enzymatiques du sol. Autrement dit, l'inoculation microbienne couplée avec l'apport de P dans le sol n'a pas favorisé ces activités. La mesure des activités enzymatiques et microbiennes globales du sol est souvent utilisée pour évaluer d'une manière plus généralisée la fertilité biologique du sol (Hoffmann et Seegerer, 1951). Dans cette étude, les résultats suggèrent que l'activité des microorganismes natifs du sol serait inhibée par l'apport du P au profit du développement des souches introduites à travers l'inoculation. Ce qui pourrait expliquer également l'inhibition de la mycorhization là où l'inoculation a été couplée avec l'apport de P. Plusieurs raisons peuvent être à l'origine de cette situation. La plus probable reste les propriétés biologiques du sol avant les traitements.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En guise de conclusion, la présente étude nous a permis de montrer l'importance de l'action combinée de l'inoculation microbienne et de l'apport en phosphore sur l'amélioration du développement des plantes et du rendement de production chez le haricot de la variété RI 5-2. En effet, l'inoculation avec des souches de bactéries fixatrices d'azote couplée avec un apport en phosphore de quantité variable (50 ou 200 kg/ha de P_2O_5) a beaucoup participé à l'augmentation des biomasses totales, du rendement, et du taux de nodulation. Ce type d'amendement semble très intéressant étant donné qu'il participe non seulement à la croissance de la plante, mais favorise également et activement le phénomène de nodulation qui tient une place centrale dans la nutrition azotée de la plante. Tous les traitements inoculés présentent des valeurs élevées en terme de rendement, une raison de plus confirmant l'efficacité de cette technologie.

Concernant le taux d'infection des mycorhizes, les souches de champignons mycorhiziens natives des sols de culture ne se sont pas montrées compétitives vis-à-vis des souches de bactéries fixatrices d'azote introduites par l'inoculation. Il serait donc intéressant d'évaluer, dans les futures expérimentations, l'interaction entre les bactéries fixatrices d'azote et les champignons mycorhiziens dans le cadre d'une double inoculation (avec des bactéries fixatrices d'azote et des souches performantes de champignons mycorhiziens).

Faisant suite à d'autres recherches – développement menées dans la région de Vakinankaratra sur les différentes techniques de fertilisation du sol, la présente étude a montré clairement la performance de la technologie d'inoculation microbienne. La valorisation des résultats obtenus permet non seulement de réduire l'apport d'azote dans les systèmes de production de haricot mais aussi de comprendre le fonctionnement microbien des sols de culture facilitant la gestion durable de leur fertilité. Outre les retombées économiques que ces résultats peuvent apporter, ils ouvrent également plusieurs voies de recherche dont entre autre :

- ♣ L'étude incluant plusieurs groupes de microorganismes bénéfiques (Rhizobia, mycorhizes, actinomycètes,...) du sol et leur valorisation dans la gestion durable de la productivité des sols ;
- ♣ La mise au point des techniques de production sous plusieurs formes d'inoculation microbienne ;

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- ♣ Le suivi des souches introduites dans le sol et leur comportement vis-à-vis des microorganismes natifs du sol ;
- ♣ Le développement des études sur les microorganismes symbiotiques sur d'autres espèces de plantes cultivées ou d'autre intérêt ;
- ♣ De tester l'efficacité de l'inoculation microbienne sur d'autres types de sol.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams M., W., D. P. Coyne, J. H. C. Davis, P. H. Graham, C. A. Francis, (1985).** Common bean (*Phaseolus vulgaris L.*), In R. J. Summerfield and E. H. Roberts (eds), Grain Legume Crops, Colins, London. p. 433-476.
- Allen MF. (1992).** Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process. Chapman and Hall, New York. Pp 364.
- Atlas R. M., Bartha, R. (1993).** Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Third edition. Benjamin / Cummings Publishing Company. Redwood City. Canada. 563 p.
- Azcon R., Barea, J. M., Hayman, D. S. (1976).** Utilisation of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria.
- Balergue C. (2012).** Régulation de la symbiose endomycorhizienne par le phosphate. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France, 116 pages.
- Balergue C., Puech-Pages V., Becard G., Rochange, S.F. (2010).** The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate involves early and systemic signalling events. Journal of Experimental Botany 62, 1049-1060.
- Barea L. M., Azcon, R., Azcon-Angular, C. (1992).** Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen fixing system. In Varma A., Norris J R, Read D J (eds) Methods in Microbiology. Experiments with Mycorrhiza. New York, USA: Academic Press. 391-415.
- Bellouki Ouarda. (1995).** Contribution à l'étude de la fixation biologique d'azote chez *Acacia Cyanophylla* et *Acacia Horrida*. Thèse de doctorat Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences, Meknès.
- Bene S. (2005).** Institutions de service de proximité aux agriculteurs à Madagascar. Les besoins des agriculteurs et les marges de manœuvre pour y répondre. Colloque scientifique, FOFIFA/SCAC « Changements induits dans les campagnes malgaches par l'évolution des prix des produits agricoles » 6-7 Décembre 2005, Antananarivo.
- Bertrand R., Gigou, J. (2000).** La fertilité des sols Tropicaux. Edition *Maisonneuse & Larose*. Paris, 397 p.
- Blondel D. (1968).** Effet du pH sur l'activité fixatrice de la symbiose *Rhizobium/Arachide (Arachis hypogaea)* en sol sableux (IDior) Ann. du CHRA de Bambey.
- Bolan N.S. (1991).** A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* 134:189-207.
- Bouhot D. (1968).** Sur deux affections de l'arachide : "rabougrissement et nanisme jaune". *L'Agronomia tropical*. No 11, 1228-1230.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boukcim H., Mousain D. (2000).** Effet de la fertilisation phosphatée sur la mycorhization, la croissance et la nutrition en phosphore et en azote des semis de Cèdre (*Cedrus atlantica Manetti*) inoculés en pépinières par *Tricholoma tridentium* Sing. *Var. cedretorum* Bon. Montpellier. Pp 289-300.
- Brundett M.C., Piché, Y. Peterson, R.L. (1985).** A developmental study of the early stages in vesicular arbuscular mycorrhizal formation. *Canadian Journal of Botany* 63: 184-194.
- Brundrett M. (2004).** Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*; 79(3):473-95.
- Brundrett Mark C. (2002).** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* Volume 154, Issue 2, pages 275–304, May 2002.
- Chena M., Zhu, Y., Sua Y., Chena B., Fu B., Marschner P. (2007).** Effects of soil moisture and plant interactions on the soil microbial community structure. *European journal Soil Biology* 43: 31-38.
- Cortez j., Lossaint p., Billes G. (1972).** *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol*, 9, 1-19.
- Diem G.H., Dommergues Y., Duhoux E. (1998).** Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques et rôles dans les écosystèmes méditerranéens et tropicaux. IRD-FAO-CIRAD. 500p.
- Diop T. A. (1995).** Ecophysiologie des champignons mycorrhiziens à vésicules et à arbuscules associés à *Acacia albida* Del. dans les zones sahéliennes et soudano-guinéenne du Sénégal. Thèse de doctorat, Université d'Angers, France. 165 pages.
- Diop T. A. (1996).** Les mycorhizes à vésicules et à arbuscules. *Journal de la faculté des Sciences de l'Université de Dakar*, BI, 49-64.
- Drénou C. (2006).** Les racines face cachée des plantes. Institut pour le développement forestier, 335p.
- Djigal D. (2003).** Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorrhiziens) et les nématodes bactéricivores : Effets sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. Dakar (SEN); Dakar: UCAD; IRD, 2003, 143 p. multigr. Th. 3e cycle: Biologie Végétale, UCAD: Dakar.
- Dreyfus B., Garcia, J.L., Gillis, M. (1988).** Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of System Bacteriology*., 38 (1): p. 89-98.
- Duponnois R., Plenchette C. (2003).** A mycorrhiza helper bacterium (MHB) enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia species*. *Mycorrhiza* 13: 85-91.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Eardly-B-D, Wang F S, Whittam TS., Selander, R K. (1995).** Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Applied and Environmental Microbiology 61, 507-512.
- Eivazi F., Tabatabai M. A. (1977).** Phosphatases in soils. Soil Biology and Biochemistry, 9, 167-172.
- El-Yazeid A.A., Abou-Aly H.A., Mady M.A., Moussa S.A.M. (2007).** Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using phosphate dissolving microorganisms (bio phosphor) combined with boron foliar spray. *Research Journal Agriculture Biology Sciences* 3 (4): 274-286.
- FAO (2004).** Filière haricot : « Des semences de qualité pour l'exportation », Karoka n° 21, p. 14-17.
- Fatou N.D. (2002).** Utilisation des inocula de *Rhizobium* pour la culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*) au Sénégal. Thèse de doctorat en biologie végétale. Université Cheikh Anta Diop DAKAR. 2002, 112p. Fixation by beans. *Biology Agriculture and Horticulture* 1, 135-144.
- FOFIFA/ECABREN :** Contribution à la lutte contre l'anémie et la malnutrition. Disponible sur <http://agir.avec.madagascar.over-blog.com/article-fofifa-ecabren-contribution-a-la-lutte-contre-l-anemie-et-la-malnutrition-115970759.html>
- Foucher F., Kondorosi E. (2000).** Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago* Plant Molecular Biology 43: 773-786.
- Fox R.L., Kamprath E.J. (1970).** Phosphorus sorption isotherms for evaluating the phosphate requirements of soils. *Proceedings - Soil Science Society of America* 1970; 34: 902-907.
- Gage D.J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen - fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Microbiology Molecular Biology Review* 68, 280-300.
- Garbaye J. (1994).** Helper Bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128: 197-210.
- Gepts P., Debouck DG. (1991).** Origin, domestication, and evolution of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. In: Voysest O, Van Schoonhoven A (eds.), *Common beans: Research for crop improvement*. CAB, Oxon, UK: pp. 7-53.
- Gepts P. (1990).** Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (Fabaceae) bean, *Economic Botany* 44: 28-38.
- Gianinazzi S., Gianinazzi pearson V., Trouvelot A. (1982).** Les mycorhizes, partie intégrante de la plante : biologie et perspectives d'utilisation. Les Colloques de l'LN.R.A. Numéro 13, 397 p. I.N.R.A. Éditeur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Giller K.E., K.J. Wilson. (1991).** Nitrogen fixation in tropical cropping systems. Commonwealth Agricultural Bureau, London, UK.
- Graham P H., Rosas J C. (1979).** Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. *Agronomy Journal* 71, 925-926.
- Graham R.D., Stangoulis J.C.R. (2003).** Trace Element Uptake and Distribution in Plants. American Society for Nutritional Sciences. 133, 1502-1505.
- Gueye M. (1982).** *Vigna unyuiculata* en symbiose avec *Rhizobium* et *Glomus mosseae*. Thèse de Doctorat de 3e cycle 82p. Université Claude BERNARD - Lyon 1.
- Hardie K., Leyton, L. (1981).** The influence of VA mycorrhiza on growth and water relations of red clover. In phosphate deficient soil. *New Phytologist* 89, 599-608.
- Hatch A.B. (1937).** The physical basis of mycotrophy in the genus *Pinus*. Black Rock For. Bull.6, 1-168; In International Union of Geodesy Geophysics, Vol. 2, pp. 443 - 445.
- Hoffmann E., Seegerer A. (1951).** Soil enzymes as factors of fertility. In *Naturwissenschaften*, 38, pp 141-142.
- Hubert P. (1978).** Recueil de fiches techniques d'agriculture spéciale à l'usage des lycées agricoles à Antananarivo Madagascar, BDPA.
- Jara P. (1981).** Le *continium Rhizobium japonicum - Rhizobium cowpea*. Thèse de Doctorat de spécialité - 149. Université d'aix-Marseille 1.
- Jaubert P. (1951).** Première étude au Sénégal des bactéries symbiotiques de l'arachide. *Ann. du CRA.*, 58, 144-164.
- Jauzert P. (1952).** Deuxième étude de la symbiose bactérienne des légumineuses au Sénégal (Casamance). *Ann. du cm, a*, 77-97.
- Kaplan L. (1981).** What is the origin of the common bean? *Eton. Botany* 19:358-368.
- Laguerre G, Fernandez M.P, Edel V, Normand P, Amarger N (1993).** Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris L*. *International journal of Systematic Bacteriology*, 43, 761-767.
- Lof G., Tops A., Netjes J., (1990).** Le soja. *Agrodok-series N °10* ; 1^{ère} édition Française traduite par Evelyne Codazzi Page 1- 7.
- Mamonjy – Madagascar (2014).** Disponible sur <http://aidermadagascar.over-blog.com/article-agro-%C3%A9cologie-%C3%A0-madagascar-53745914.html>
- Marschner P., Fu Q.L., Rengel Z. (2003).** Manganese availability and microbial populations in the rhizosphere of wheat genotypes differing in tolerance to Mn deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166: 712–718.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Martinez R., E., Florès M., Brom S., Romero D., Davila G., Palacios R. (1988).** *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. *Plant Soil* 108, 179-184.
- Meotto F. (1996).** Identification of mycorrhizas in the field. *Cahiers Options Méditerranéennes* 20: 33-41.
- Miao Shy- Jie, Qiao Yun-Fa, Han Xiao- Zeng, M. (2007).** Nodule formation and development in Soybean (*Glycine max* L.) in response to Phosphorus supply in solution culture. China. Pp 36- 43.
- Miller O.K. (1982).** Taxonomy of ectomycorrhizal and ectendomycorrhizal fungi. In: *Methods and mycorrhizal researches* by N.C. Schenk. American Phytopathology Press, St Paul, Minesota pp. 510-517.
- Morgan J.B., Connolly, E. L. (2013).** Plant-Soil Interactions: Nutrient Uptake. *Nature Education Knowledge* 4 (8) : 2.
- Mousain D. (1989).** Étude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens. Montpellier : Université des Sciences et Technique du Languedoc, (Thèse de Doctorat d'État en Sciences).
- Nian H., Ju Ahn S, Yang Z. M., Matsumoto H. (2003).** Effect of phosphorus deficiency on aluminium - induced citrate exudation in soybean (*Glycine Max*). *Physiologia plantarum*. 117 (2) 229-236.
- Patra AK, Le Roux X, Grayston SJ, Loiseau P, Louault F. (2008).** Unraveling the effects of management regime and plant species on soil organic carbon and microbial phospholipid fatty acid profiles in grassland soils. *Bioresource Technology* 99, 3545–3551.
- Patriarca E.J., Tate, R., Ferraioli, S., Iaccarino, M. (2004).** Organogenesis of legume root nodules. *International Review Cytology* 234: 201–262.
- Pereira PA., Bliss FA. (1987).** Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus*)
- Phillips JM., Hayman DS. (1970).** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. Vol 55: pp. 158-161.
- Piniero D, Martinez E, Selander R.K. (1988).** Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*. *Applied and Environmental Microbiology* 54, pp. 2825-2832.
- Plenchette C. (1982).** Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA). Un potentiel à exploiter en agriculture. *Phytoprotection*, 63, pp. 86-108.
- Ramanankierana N, Rakotoarimanga N, Thioulouse J, Kisa M, Randrianjohany E, Ramaroson L, Duponnois R (2006).** The Ectomycorrhizosphere effect influences functional diversity of soil microflora. *International Journal of Soil Sciences* 1: pp. 8-19.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ruiz-lozano J.M., Azcon R., Gomez M. (1995).** Effect of arbuscular mycorrhizal *Gomus species* on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied Environnement Microbiology*; 61: 456-460.
- Sall S. N., Chotte J. L. (2002).** Phosphatase and urease activities in a tropical sandy soil as affected by soil water-holding capacity and assay conditions. Laboratoire de Bio-pédologie. Centre IRD-ISRA.
- Samuel A. D., Domuta C., Sandor M., Vuscan A. (2010).** Phosphatase activity of soil. University of Oradea. 179-182.
- Sanon A. A. (2009).** Le concept de niche écologique associé à la co-existence des espèces végétales : mise en évidence du rôle de la symbiose mycorhizienne et de sa microflore associée dans la structuration de la strate herbacée en milieu tropical. Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, Géosciences; 228p
- Schnurer J., Rosswall T. (1982).** *Applied Environnement Microbiology*, 43, 1256-1261
- Smith H.F., O'Connor P.J., Smith S.E., Smith F.A. (1997)** .Vesicular arbuscular mycorrhizas of durian and other plants of forest gardens in W. Kalimantan, Indonesia. Pp 192-199 in *Forest Soils in the Humid Tropics: Characteristics, Ecology and Management* eds by Schulte A., Ruhiyat D. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Smith S. E., Read D.J. (2008).** 'Mycorrhizal symbiosis. 3 édition. Academic Press Ltd.: Cambridge, UK.787p.
- Smith S.E., Read D.J. (1997).** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press, 2nd eds. London. 605 pages.
- Ssali H., Keya S.O. (1986).** The effects of phosphorus on nodulation, growth and dinitrogen fixation of three bean cultivars. SSSA. Special Publication number 28, Madison. Pp. 161-182.
- Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, May GD. (2006).** Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 110-121.
- Stanley A. Barber. (1995).** Soil Nutrient Bioavailability: A mechanistic approach, in Wiley Interscience publication. 414 pages.
- Stevenson J.F. (1986).** Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. John Wiley & Sons, New York.
- Tabatabai M.A. (1994).** Soil Enzymes, In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomlry, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties*.
- Tabatabai M.A., Dick, W.A. (2002).** Enzymes in Soil: Research and Developments in Measuring Activities, In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications* Marcel Dekker, New York, pp. 567-596.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Taiz L., Zeiger E. (2002). *Plant Physiology, Third Edition*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 690 pages.

Tarafdar J.C., Marschner, H. (1995). Dual inoculation with *Aspergillus fumigates* and *Glomus mossene* enhances biomass production and nutrient uptake in wheat. Supplied with organic phosphorus as naphytate. *Plant and soil* 173, 97-102.

Tsvetkova G.E., Georgiev G.I. (2003). Effect of Phosphorus nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient-use efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* - soybean (*Glycine Max L Merrill*) symbiosis. *Acad. M. Popov Institute of Plant physiology, Sofia 1113, Bulgaria* .pp, 331-335.

Tyler G., Olsson T. (2001). Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. *Plant & Soil*. 230(2):307-321. *vulgaris L.*) at different levels of phosphorus availability. *Plant Soil* 104, 79-84.

Wallander Hakan, Wickman Tonnie. (1999). Biotite and microcline as potassium sources in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 9:25-32.

Zahran H.H. (1999). *Rhizobium* - Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate, *Microbiology and Molecular biology Reviews*: 63 (4), pp 968-989.

Madagascar : Le haricot, une filière mal exploitée mais à fort potentiel. Disponible sur <http://www.afriquinfos.com/articles/2014/4/10/madagascar-haricot-filiere-exploitee-mais-fort-potentiel-251126.asp>

Le haricot, une filière mal exploitée. Disponible sur <http://www.vern-tiers-monde.org/category/madagascar/page/2/>

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Tampon Mc Ilvain ou (Citrates Phosphate Buffer)

Solution A à 0,1 M : Dissoudre 19,21 g d'acide citrique dans 1000ml d'eau déminéralisée.

Solution B à 0,2 M : Dissoudre 53,65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ (Dibasic Sodium Phosphate) ou dissoudre 71,7 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau déminéralisée.

Tampon à pH 6 : prélever 200 ml de la solution stock + 500 ml D'eau déminéralisée, ajusté le pH à 6 avec de HCl et compléter à 1L.

Annexe 2 : Mélanges des deux solutions A et B avec leur pH correspondants

A (X)	B (Y)	pH
44,6	5,4	2,6
42,2	7,8	2,8
39,8	10,2	3
37,7	12,3	3,2
35,9	14,1	3,4
33,9	16,1	3,6
32,3	17,7	3,8
30,7	19,3	4
29,4	20,6	4,2
27,8	22,2	4,4
26,7	23,3	4,6
25,2	24,8	4,8
24,3	25,7	5
23,3	26,7	5,2
22,2	27,8	5,4
21	29	5,6
19,7	30,3	5,8
17,9	32,1	6
16,9	33,1	6,2
15,4	34,6	6,4

ANNEXES

Annexe 2 : Les réactifs utilisés dans le dosage des phosphatases

Solution de CaCl_2 à 0,5 M : Dissoudre 73,5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1 L d'eau déminéralisée.

Solution de NaOH à 0,5 M : Dissoudre 20 g de soude dans 1 L d'eau déminéralisée. Les deux se conservent à la température ambiante.

Annexe 3 : Préparation du p-NPP

Solution de p-NPP 100 mg dans 10 ml à 5 mM d'eau déminéralisée à garder à - 20 °C et en flacon fumé ou par défaut protéger avec du papier aluminium. p-NPP signifie (p-Nitrophényl Phosphate).

Annexe 4 : Tampon potassium phosphate

Dissoudre 8,7 g de K_2HPO_4 et 1,3 g de KH_2PO_4 dans 800 ml d'eau déminéralisée.

Ajuster le pH à 7,6 avec de NaOH.

Compléter à 1 L et garder 4 °C.

Annexe 5 : Préparation de la solution de FDA

C'est la fluorescéine diacétate ou FDA : réf : F7378 (sigma)

Préparer une solution à 1mg / ml dans de l'acétone et conserver à -20 °C.

Annexe 6 : Composition du Bleu Trypan

Poudre de bleu Trypan : 5 g

Acide acétique : 250 ml

Eau distillée qsp : 1000 ml

Annexe 7 : Composition de l'Hydroxyde de Potassium

Poudre de KOH : 50 g

Eau distillée qsp : 500 ml

Annexe 8 : Description et composition de la dolomie

La dolomie est une roche sédimentaire carbonatée composée principalement de dolomite (entre 90 et 100 %) et de calcite, qui n'ont pas la même densité (dolomite : 2.87 ; calcite : 2.71),

ANNEXES

jouant un rôle fondamental dans l'érosion de la roche. Son nom vient de l'espèce minérale dominante : la dolomite.

Annexe 9 : Méthode de calcul des activités enzymatiques

1. Activité phosphatasique :

Les phosphatases se présentent sous forme acide ou basique selon le pH du sol. Dans le sol, ils hydrolysent le p-NPP (para-Nitrophényl Phosphate) en p-Nitrophénol dont sa quantité est mesurée par lecture de la densité optique de longueur d'onde 400 nm. Voici un exemple de calcul pour un échantillon :

Calcul de DO lu et DO réel :

DO LU	Echantillon 1
E1	2.405
E2	2.16
E3	2.126
DO REEL=DO lu - (TE+TS)	
DO REEL de l'échantillon	
TS	0.113
TE	0.513
TE+TS	0.626
E1	1.779
E2	1.534
E3	1.5

Calcul de la quantité de p-Nitrophénol (en µg) pour chaque DO réel :

10 µg de p-Nitrophénol correspondent à une DO réel de 0,42.

ANNEXES

DO réel	Quantité de p-Nitrophényl ($\mu\text{g/h}/0.1\text{g}$ de sol)	Quantité de p-Nitrophénol ($\mu\text{g/h/g}$ de sol)
E1	42.3571429	423.571429
E2	36.5238095	365.238095
E3	35.7142857	357.142857

Ces valeurs obtenues révèlent la quantité de p-Nitrophénol produit dans le mélange de sol et de réactif.

2. Hydrolyse de la FDA :

FDA est un des substrats de plusieurs groupes d'enzyme présents dans le sol à savoir : les protéases, estérases, lipases... Ces derniers peuvent hydrolyser le FDA incolore en fluorescéine de couleur vert jaunâtre. L'intensité de la couleur désigne la concentration de FDA hydrolysé en μg par heure et par gramme de sol. Cette valeur de la densité optique sera rapportée sur la droite de régression de la gamme étalon préparée à l'aide d'une solution standard de fluorescéine variant de 0 à 5 $\mu\text{g/ml}$.

Calcul de DO lu et DO réel :

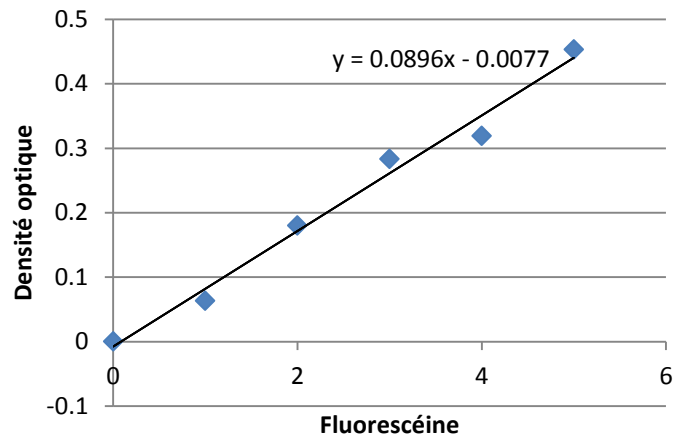
DO LU	Echantillon 1
E1	0.62
E2	0.477
E3	0.441
DO REEL=DO lu - (TE+TS)	
DO REEL de l'échantillon	
TS	0.106
TE	0.129
TE+TS	0.235
E1	0.385
E2	0.242
E3	0.206

ANNEXES

Calcul de l'activité enzymatique AE utilisant la courbe de la gamme étalon :

FDA (µg)	0	1	2	3	4	5
DO à 490nm	0	0.063	0.18	0.283	0.319	0.453

Courbe de la gamme étalon



Une équation de droite $y = 0.0896x - 0.0077$ a été déduite à partir de la courbe de la gamme étalon, avec $y = \text{DO réel}$ et $x = \text{AE}$.

L'activité enzymatique AE peut donc être calculée à partir de la formule suivante :

$$\text{AE} = (\text{DO réel} + 0.0077) / 0.0896$$

DO réel	Quantité de fluorescéine AE (µg)	Quantité de fluorescéine AE (µg/h/g de sol)
E1	4.3828125	88.825
E2	2.78683036	56.4797619
E3	2.38504464	56.4797619

0.75 ml seulement du volume total de 15.2 ml a été prélevé pour la lecture de la densité optique en donnant la valeur de l'activité enzymatique.

0.75 ml → AE µg

ANNEXES

15.2 ml → ? (µg/h/g de sol)

Nom : RASON

Prénoms : Lalaina Sarah

Mail : klax13@gmail.com

Titre : « Fonctionnement microbien du sol de culture de haricot sous l'effet de l'inoculation par des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote et de la fertilisation phosphatée au niveau des parcelles paysannes »

Le haricot tient la troisième place de culture vivrière après le riz et le manioc à Madagascar. La présente étude a comme objectif principal de décrire la structure et le fonctionnement des microorganismes du sol de culture dans des parcelles paysannes de culture de haricot où la performance en milieu naturel de six souches de *Rhizobium* déjà identifiées efficaces au laboratoire a été testée. Les expérimentations ont été menées sur le haricot de la variété RI 5-2 dans deux groupes de parcelles paysannes de la région Vakinankaratra.

Les résultats ont montré que l'inoculation microbienne couplée avec l'apport de phosphate de l'ordre de 50 à 200 kg/ha a permis d'améliorer significativement à la fois le développement des plantes et le rendement de la production. Ces traitements ont inhibé, par contre, l'activité microbienne globale du sol, l'activité des enzymes phosphatasiques et l'établissement des structures mycorhiziennes au niveau des racines par les champignons mycorhiziens natifs du sol. L'apport de dolomie de l'ordre de 400 kg/ha n'a pas eu d'effet significatif ni sur le développement des plantes, sur le rendement de la production ni sur le fonctionnement microbien du sol de culture. Ces résultats illustrant la performance de la technologie d'inoculation microbienne pour la production de haricot à Madagascar constituent des avancées significatives dans les programmes de réduction de l'utilisation des engrais chimiques. Leurs impacts sur les pratiques paysannes sont également importants étant donné qu'ils proposent la réduction de la fertilisation azotée pour la production de haricot.

Mots clés : *Rhizobium*, inoculation microbienne, Fonctionnement microbien du sol, haricots.

Name : RASON

Surnames : Lalaina Sarah

Mail : klax13@gmail.com

Title : “Soil microbial functioning of common bean after nitrogen fixing bacteria inoculation and phosphate application within plots of farmer’s fields.”

ABSTRACT

Common bean takes the third place in food crop after rice and cassava in Madagascar. The main objective of this study was to describe the structure and functioning of soil microbial communities within plots where common bean (Variety RI 5-2) were inoculated by a mixed of six strains of nitrogen fixing bacteria identified as efficiency strains at laboratory condition. Experiments were established in two blocs of farmer’s fields in the high plateau of Madagascar (Region of Vakinankaratra).

Our results showed that microbial inoculation combined with soil fertilization by phosphate (P_2O_5 50kg to 200 kg/ha) stimulated significantly plant development of common bean and increase bean yield. However, global microbial and phosphatase activities were inhibited by these treatments. Mycorrhizal rates of inoculated plants with nitrogen fixing bacteria were less important than those recorded to the other treatments. Soil fertilization by dolomite had no effect on soil development stimulation, common yield and on soil microbial functioning. The performance of microbial inoculation technology was illustrated by these results on bean crop without nitrogen application. These finding constitute a significant progress in reducing the use of chemical fertilizers. Impacts of these results on farmer’s practices are significant allowing them to stop the use of expensive fertilizers.

Keys words: *Rhizobium*, Microbial inoculation, soil microbial functioning, common bean.