



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO  
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME  
D'ETUDES APPROFONDIES EN SCIENCES DE LA VIE

Option : BIOTECHNOLOGIE – MICROBIOLOGIE

# Effets de différents niveaux de fertilisation phosphatée sur le fonctionnement microbien du sol de la région Vakinankaratra: cas du haricot (*Phaseolus vulgaris*)

Présenté par : RAZAFINDRAMBOA Stella

Maître ès Sciences

Soutenu publiquement le 24 Avril 2015 devant la commission d'examen composée de:

Président : Professeur RAZANAMPARANY Louissette

Examineurs : Professeur RAKOTO Danielle Doll

Docteur RANDRIANARIVO Ranjàna

Rapporteurs : Docteur RANDRIAMBANONA Herizo A.



## CADRE DE L'ETUDE

« Services écologiques des Légumineuses pour les cycles biochimiques de l'azote et du phosphore et la séquestration du carbone dans les systèmes de culture céréaliers en Afrique et dans le bassin Méditerranéen ».

Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet FABATROPIMED qui est un des trois grands projets fédérateurs soutenus par Agropolis Fondation à partir de 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 dans cinq pays africains (Madagascar, Tunisie, Maroc, Sénégal, Burkina-Faso).

L'objectif du projet est d'analyser les apports par des Légumineuses à graines sur le système de culture et sur l'environnement dans des agro-écosystèmes d'Afrique méditerranéenne et tropicale :

- par réduction de l'utilisation des fertilisants minéraux et augmentation de la séquestration du carbone ;
- par augmentation des interactions entre les microorganismes du sol pour l'acquisition et l'utilisation de l'azote et du phosphore par les plantes.

Cinq principaux Work Package (WP) sont prévus dans le cadre de ce projet :

- 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)
- la recherche des gènes d'efficacité, d'acquisition et d'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique de l'azote (WP4).

## REMERCIEMENTS

Devant l'accomplissement de ce travail, je rends grâce au Seigneur, Maître de toutes choses qui m'a dispensé depuis toujours clairvoyance, force, courage et santé dont j'avais grandement besoin.

*« Seigneur, tu m'as confié cinq talents : voilà j'en ai gagné 5 autres. » Matthieu : 25,<sup>20</sup>*

Ce mémoire est le fruit d'une collaboration étroite entre le Département de la Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences d'Antananarivo, l'Institut de Recherches pour le Développement (IRD), le Laboratoire de Microbiologie et de l'Environnement du Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE) et le Laboratoire des Radio Isotopes (LRI).

Ainsi, je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance :

- au Professeur RAHERIMANDIMBY Marson, Doyen de la Faculté des Sciences à l'Université d'Antananarivo,
- au Docteur RANDRIANIERENANA Ando, Chef du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée,
- au Professeur REJO-FIENENA Félicitée, Directeur du Centre National de Recherche sur l'Environnement,
- au Docteur HDR Thierry BECQUER, Directeur de Recherche à l'UMR Eco&Sols de l'IRD,
- au Professeur RAMANANKIERANA Heriniaina, Chef du Département Ecosystèmes terrestres du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE),
- au Docteur RASOLOMAMPIANINA Rado, Chef du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE),
- au Docteur RAKOTOARIMANGA Nirina et au Docteur BAOHANTA Rondro ; Chercheurs au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE).

Mes humbles remerciements vont également à l'endroit des membres du jury :

- au Professeur RAZANAMPARANY Louissette, Président de Jury de ce mémoire,
- aux Examineurs : Professeur RAKOTO Danielle Doll et Docteur RANDRIANARIVO Ranjàna,
- au Docteur Herizo RANDRIAMBANONA, Chercheur au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE), rapporteur de ce mémoire pour sa grande disponibilité, ses critiques constructives et instructives.

J'aimerais exprimer mes sincères remerciements à toute l'équipe du LME/CNRE principalement celle de l'unité 2 et à mes collègues de stage pour leur soutien mutuel et compréhensions à tout moment.

Je remercie du plus profond de mon cœur mon mari, mon père, ma mère, mes 2 frères ainsi que la famille entière pour leur soutien et encouragement.

# TABLES DES MATIERES

|  |             |
|--|-------------|
| <b>CADRE DE L'ETUDE .....</b>                                      | <b>i</b>    |
| <b>REMERCIEMENTS.....</b>  | <b>ii</b>   |
| <b>TABLES DES MATIERES .....</b>                                   | <b>iv</b>   |
| <b>GLOSSAIRE.....</b>  | <b>vi</b>   |
| <b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>                                    | <b>viii</b> |
| <b>LISTE DES FIGURES.....</b>                                      | <b>ix</b>   |
| <b>LISTE DES PHOTOS.....</b>                                       | <b>ix</b>   |
| <b>LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....</b>                       | <b>x</b>    |
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>                               | <b>3</b>    |
| <b>I. Matériels biologiques.....</b>                               | <b>3</b>    |
| I.1. Le haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....               | 3           |
| I.2. Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL).....                | 5           |
| <b>II. Le sol.....</b>   | <b>6</b>    |
| II.1. Sol : une niche écologique et un réservoir de diversité..... | 6           |
| II.2. Sols ferralitiques .....                                     | 7           |
| II.3. Rhizosphère.....   | 9           |
| <b>III. Symbiose .....</b>   | <b>9</b>    |
| III.1. Symbiose entre plante-champignons mycorhiziens.....         | 9           |
| III.2. Symbiose fixatrice d'azote .....                            | 12          |
| III.3. Symbiose légumineuse-rhizobium .....                        | 14          |
| <b>IV. Fertilisants et fertilité du sol .....</b>                  | <b>14</b>   |
| <b>V. Phosphore.....</b>   | <b>15</b>   |
| <b>MATERIELS ET METHODES .....</b>                                 | <b>18</b>   |
| <b>I. Sites d'étude .....</b>                                      | <b>18</b>   |
| <b>II. Variétés de haricot utilisées.....</b>                      | <b>19</b>   |
| <b>III. Dispositif expérimental.....</b>                           | <b>19</b>   |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>IV. Protocole de collecte d'échantillons de végétaux et de sol.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>V. Mesure du rendement de haricot par hectare .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>VI. Etude au laboratoire .....</b>  | <b>22</b> |
| VI.1. Influence de l'apport en phosphore de différents niveaux sur la nodulation .....   | 22        |
| VI.2. Evaluation du taux de mycorhization de la racine .....   | 22        |
| VI.3. Influence de l'ajout de phosphore sur l'activité enzymatique du sol .....  | 23        |
| <b>VII. Traitements statistiques des données.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>RESULTATS ET INTERPRETATIONS .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>I. Influence de la quantité de phosphore apportée sur la variété RIL 115 .....</b>  | <b>26</b> |
| I.1. Influence sur la nodulation, le développement de la plante et le rendement.....   | 26        |
| I.2. Influence de l'apport de P sur le nombre de nodule et sur le taux de mycorhization pour la variété RIL 115 .....          | 28        |
| I.3. Influence sur l'activité microbienne du sol de culture de la variété RIL 115 .....  | 28        |
| <b>II. Influence de l'apport en phosphore sur la variété RIL 147 .....</b>   | <b>29</b> |
| II.1. Influence sur la nodulation, le développement de la plante et le rendement .....   | 29        |
| II.2. Influence de l'apport de P sur le nombre de nodule et sur le taux de mycorhization pour la variété RIL 147.....          | 30        |
| II.3. Influence sur l'activité microbienne du sol de culture de haricot RIL 147 .....  | 31        |
| <b>III. Influence de l'apport en phosphore en quantité variable sur la variété</b>   |           |
| <b>SOAFIANARANA .....</b>  | <b>32</b> |
| III.1. Influence sur la nodulation, le développement de la plante et le rendement.....   | 32        |
| III.2. Influence de l'apport de P sur le nombre de nodule et sur le taux de mycorhization pour la variété SOAFIANARANA.....    | 33        |
| III.3. Influence sur l'activité microbienne du sol de culture de la variété SOAFIANARANA .....                                 | 34        |
| <b>IV. Influence des 3 niveaux de phosphore sur les activités microbiennes et la production des 3 variétés de haricot.....</b> | <b>34</b> |
| <b>DISCUSSION .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>ANNEXES.....</b>  | <b>54</b> |

## GLOSSAIRE

**Amendement** : ensemble de produits apportés aux sols pour augmenter leur fertilité en améliorant leur pH (chaux, nitrate d'ammonium), leur structure (sable, vermiculite) ou leurs teneurs en éléments nutritifs (compost, cendres de bois).

**Appressorium** : système utilisé par les champignons pour pénétrer dans une cellule hôte.

**Arbuscule** : organe ramifié en forme de petit arbre. Point d'échange entre les racines d'une plante et les filaments d'un champignon endomycorhizien.

**Azote 15 (<sup>15</sup>N)** : isotope de l'azote dont le noyau est constitué de 7 protons et de 8 neutrons. C'est le second des deux isotopes stables de l'azote, et représente 0,364 % de l'azote présent sur terre.

**Bactéroïdes** : bactéries de forme dilatée et irrégulière dont l'aspect s'apparente à des bâtonnets, tout particulièrement les rhizobiums présents dans les nodosités racinaires.

**Composés flavoniques** : métabolites secondaires des plantes partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, chaîne souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa- ou pentagonal.

**Composite** : constitué de plusieurs composants distincts.

**Cycle biogéochimique** : En écologie et plus généralement en sciences de la Terre, un cycle biogéochimique est le processus de transport et de transformation cyclique d'un élément ou composé chimique entre les grandes réservoirs que sont la géosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère, dans lesquels se retrouve la biosphère.

**Désorption** : abandon par un solide des gaz absorbés ou adsorbés.

**Facteur Nod** : lipochitooligosaccharides (LCO), formés d'une suite de 4 ou 5 unités de N-acétyl-D-glucosamine réunies par des liaisons β (1 → 4) (structure de la chitine), et comprenant une chaîne lipidique (acétyl), intervenant dans le phénomène de nodulation.

**Goethite** : minéral composé d'hydroxyde de fer, de formule FeO(OH), de dureté de 5,5 et d'une densité de 4,3.

**Hyphes** : filaments fongiques de taille microscopique de 3 à 15 microns, issus d'un champignon mycorhizien, ce sont aussi des cellules allongées pouvant être cloisonnées ou non

**Mycélium** : ensemble de fins filaments constituant la formation morphologique de base du champignon. Il se forme à partir de la germination des spores du champignon.

**Nitrification** : processus se déroulant dans les sols sous l'action de certains microorganismes spécifiques et qui conduit à la transformation de l'ammoniac (ou de l'ammonium) en nitrate.

**Nodosités ou nodules** : excroissances ou renflements formés sur les racines d'une plante (légumineuse en général) envahis par des bactéries symbiotiques, fixatrices d'azote, du genre *Rhizobium*.

**Pédogénèse** : mode de formation et d'évolution des sols.

**Poquet** : trou dans lequel on met plusieurs graines lors du semis.

**Réseau Hartig** : réseau d'hyphes qui s'insèrent entre les cellules de l'écorce racinaire.

**Rhizosphère** : partie du sol adhérente à la racine et est directement influencée par les différents types de substances excrétées par elle.

**Sesquioxyde** : oxyde qui contient trois atomes d'oxygène pour deux atomes de métal.

**Spore** : cellule isolée, ou amas pluricellulaire pouvant contribuer, en germant, à la propagation d'une espèce par la voie végétative. Autrement dit, c'est une cellule reproductrice non sexuée des champignons.

**Symbiose** : une association intime, durable et à bénéfice mutuel entre deux organismes hétérosécifiques et parfois plus de deux. Les organismes sont qualifiés de **symbiotes**, ou, plus rarement **symbiontes** (anglicisme) ; le plus gros peut être nommé hôte.



## LISTE DES TABLEAUX

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1.</b> Caractéristiques de la zone agroécologique des Hautes-Terres .....   | 19 |
| <b>Tableau 2.</b> Doses de Phosphore et de TSP apportées dans chaque traitement.....   | 20 |
| <b>Tableau 3</b> Effet de l'apport en quantité différente de phosphore sur le développement et la production de la variété RIL 115.....  | 26 |
| <b>Tableau 4.</b> Tableau représentant l'ANOVA de l'effet des différents niveaux de P sur le taux de nodulation et le taux de mycorhization de RIL 115 .....                             | 28 |
| <b>Tableau 5.</b> Tableau représentant l'ANOVA de la variation des activités enzymatiques du sol de culture de la variété de haricot RIL 115 sous l'effet de l'apport en phosphore ..... | 28 |
| <b>Tableau 6.</b> Effet de différents apports en phosphore sur le développement et le rendement sur la variété RIL 147.....  | 29 |
| <b>Tableau 7.</b> L'effet des différents niveaux de P sur le taux de nodulation et le taux de mycorhization de RIL 147.....  | 31 |
| <b>Tableau 8.</b> Variation des activités enzymatiques du sol de culture de la variété RIL 147 sous l'effet de l'apport en phosphore .....   | 31 |
| <b>Tableau 9.</b> Effet de la différence d'apport en phosphore sur le développement et la production de la plante de haricot SOAFIARANA .....  | 32 |
| <b>Tableau 10.</b> Influence de la quantité de phosphore apportée sur la nodulation et sur le taux de mycorhization de la variété SOAFIARANA.....  | 33 |
| <b>Tableau 11.</b> Influence de la quantité de phosphore apportée sur les activités enzymatiques du sol de culture de haricot SOAFIARANA .....   | 34 |
| <b>Tableau 12.</b> Tableau récapitulatif des effets des différences de niveaux sur les paramètres des 3 variétés. ....   | 35 |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.</b> Répartition des sols ferrallitiques de Madagascar (Bases de données : FTM) .....                                | 8  |
| <b>Figure 2.</b> Les mycorhizes et la nutrition minérale des plantes (Germon, 2013 ). .....                                      | 11 |
| <b>Figure 3.</b> Cycle du phosphore (Robert, 2011) .....   | 16 |
| <b>Figure 4.</b> Les 19 parcelles (P1, P3,...P20) d'étude (Base de données : FTM).....   | 18 |
| <b>Figure 5.</b> Schéma du dispositif expérimental .....   | 20 |
| <b>Figure 6.</b> Variété RIL 115 : Projection des trois niveaux d'apport de phosphore (A) et cercle de corrélation (B). .....    | 27 |
| <b>Figure 7.</b> Variété RIL 147 : Projection des trois niveaux d'apport de phosphore (A) et cercle de corrélation (B). .....    | 30 |
| <b>Figure 8.</b> Variété SOAFIANARANA : Projection des trois niveaux d'apport de phosphore (A) et cercle de corrélation (B)..... | 33 |

## LISTE DES PHOTOS

|  |    |
|--|----|
| <b>Photos 1.</b> Racines fines observées au microscope optique (10×10) ..... | 12 |
| <b>Photos 2.</b> Produit de la symbiose : nodule.....                        | 13 |

## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>ACP</b>              | : Analyses en composantes principales  |
| <b>ANOVA</b>            | : Analysis Of Variance   |
| <b>BNL</b>              | : Bactéries Nodulant les Légumineuses  |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> | : Chlorure de Calcium  |
| <b>CNRE</b>             | : Centre National de Recherche sur l'environnement                                       |
| <b>DO</b>               | : Densité Optique  |
| <b>FDA</b>              | : Fluorescéine DiAcétate   |
| <b>FOFIFA</b>           | : Foibem-pirenena momban'ny fikarohana ampiharina ho fampandrosoana ny eny ambanivohitra |
| <b>FTM</b>              | : Foibe Taotsaritan'ny Madagasikara  |
| <b>GPS</b>              | : Global Positioning System  |
| <b>IRD</b>              | : Institut de Recherche pour le Développement  |
| <b>KOH</b>              | : Hydroxyde de Potassium   |
| <b>LRI</b>              | : Laboratoire des Radio-isotopes   |
| <b>NaOH</b>             | : Hydroxyde de Sodium  |
| <b>P</b>                | : Phosphore  |
| <b>pNPP</b>             | : paraNitroPhénylPhosphate   |
| <b>RIL</b>              | : Recombinant Inbred Lines   |
| <b>TE</b>               | : Témoin Enzyme  |
| <b>TS</b>               | : Témoin Substrat  |
| <b>TSP</b>              | : Triple SuperPhosphate  |

# **INTRODUCTION**

# INTRODUCTION

En raison de la démographie galopante et des besoins alimentaires qui s'ensuivent, la production agricole doit être revue afin d'accroître le rendement pour subvenir aux besoins de la population mondiale (**Nyembo *et al.*, 2012**). En effet, la meilleure perspective permettant de remédier à cette situation est d'augmenter les rendements soit par la gestion des superficies de terres mises en valeur pour l'agriculture, soit par la maîtrise des matières fertilisantes à rajouter aux sols.

Cette tendance a également été observée au niveau de Madagascar qui est considéré comme un pays à vocation agricole étant donné qu'environ 85% de la population habite dans les zones rurales, dont 80 % accaparée par les activités agricoles, principalement, l'agriculture, l'élevage, les forêts (**Rabenandrianina, 2003**). C'est la raison pour laquelle des actions et des financements ont été orientés vers le secteur agricole visant à entreprendre des études en vue d'une amélioration de la qualité de sol de culture de haricot. Etant un aliment riche en protéine, phosphore, fer, vitamine B, fibre et dépourvu de cholestérol (**Kowthar, *et al.*, 2013**), il a déjà eu sa place dans la lutte contre la malnutrition chronique dans la région Sud-Est (**Andriamanazaoro, 2014**). Les paysans et agriculteurs ne doivent pas négliger l'importance de la bonne rentabilité du champ. Il est impératif de trouver le moyen d'atteindre les objectifs pour une amélioration en les orientant vers de nouvelles perspectives telles que l'utilisation des fertilisants biologiques de qualité ou encore l'amélioration des techniques de culture (**Niggli, 2009**).

Non seulement, les études vont être portées sur la couverture des besoins alimentaires mais aussi, elles vont intervenir dans l'amélioration de l'économie malagasy.

Cependant, au niveau international, **Razafindramiadana (2014)** a affirmé que les haricots en provenance de Madagascar ne pourront pas obtenir de meilleurs prix cette année car la qualité reste médiocre par rapport à celle des haricots produits par les gros concurrents que sont l'Argentine, la Chine et l'Égypte. Selon certains exportateurs, le haricot de Madagascar n'est pas assez blanc (couleur) et les grains sont plus petits par rapport aux normes requises à l'exportation. L'une des principales causes de ces handicaps est l'insuffisance d'entretien du sol de culture et un déséquilibre au niveau de la teneur en certains éléments nutritifs essentiels. En effet, il est bien connu que, les plantes utilisent l'azote, le phosphore et le potassium en quantités importantes, les réserves du sol en ces éléments doivent être donc périodiquement réapprovisionnées afin de maintenir une bonne productivité (**Moughli, 2000**). Ainsi la production de fertilisants azotés, phosphatés et

potassiques s'est considérablement accrue (**Walker, 2010**). Par ailleurs de nombreuses expérimentations de longue durée ont montré qu'une gestion rationnelle des engrais minéraux et des amendements organiques ont permis d'augmenter les rendements de culture et de maintenir durablement la fertilité des sols (**Pichot et al. 1981 ; Berger et al., 1987 ; Pieri, 1989 ; Bado et al., 1997**). L'objectif devrait donc passer par la recherche d'un équilibre entre les besoins en éléments nutritifs des cultures et les apports en fertilisants (**Walker, 2010**), afin d'éviter l'apparition de différents problèmes culturaux. Il faut cependant gérer la quantité de fertilisants à apporter car l'application de doses supérieures à celles recommandées ne mène pas forcément à l'obtention de rendements plus élevés (**Choulnard & Massicole, 2000**).

C'est dans ce contexte de faible productivité malgré d'énormes potentialités agricoles dont disposent la région de Vakinankaratra, que des essais de culture du haricot portant sur l'apport et de l'utilisation de différents niveaux de fertilisation phosphatée ont été mis en place dans certaines parcelles paysannes de la région par le projet FABATROPIMED.

L'objectif principal de cette étude est de décrire le niveau de fertilisation phosphatée adéquat afin d'améliorer la fertilité du sol de culture de haricot et d'augmenter le rendement. Cette étude est conduite selon deux hypothèses :

- i. la variation au niveau de l'apport de phosphore aurait des impacts positifs sur la nutrition phosphatée et les rendements des cultures ;
- ii. cette variation affecterait également les propriétés microbiologiques des sols.

Les objectifs spécifiques sont de déterminer les effets de différents apports de phosphore :

- sur le développement de la plante en les basant sur les rendements et la biomasse totale en effectuant les tests avec différentes variétés de haricot ;
- sur les activités phosphatasiques et les activités microbiennes globales du sol de culture en tenant compte des deux types de symbioses, la symbiose fixatrice d'azote et la symbiose mycorhizienne.

Ainsi, ce travail débutera par un état de connaissances sur la dynamique du phosphore dans le système sol-plante, suivi par les méthodologies adoptées. Les résultats seront par la suite présentés et interprétés puis une discussion axée sur les hypothèses avancées. Et enfin, une conclusion et quelques perspectives clôtureront ce mémoire.

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. Matériels biologiques

### I.1. Le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)

#### I.1.1. Origine et importance économique

Le haricot est originaire d'Amérique latine où il a été domestiqué depuis plus de 8000 ans (Gepts et Debouck, 1991). Il est en Amérique latine et dans plusieurs pays d'Afrique et d'Asie, l'une des plus importantes cultures vivrières et constitue une grande source de protéines végétales pour la consommation humaine et animale (Ndéye, 2002).

#### I.1.2. Description et position systématique

Le haricot commun est une plante herbacée annuelle, de la famille des Fabacées ou Légumineuses qui représente une part importante de l'alimentation humaine (Agrobio, 2012). Il a été décrit par Linné en 1753 et il a donné pour nom d'espèce : *Phaseolus vulgaris* L. (CIRAD, 2002). Il y a deux types de haricots : les haricots nains qui ont environ 50 cm de hauteur et ceux à rames ou grimpants d'environ 2 à 3 m de hauteur (Deslauriers, 2014). Le haricot est une plante autogame, les ovaires de ses fleurs sont fécondés par les pollens des mêmes fleurs (Sirtori et Boffelli, 2007). Le haricot présente des fruits en forme de gousses entre 8 et 20 cm de long contenant des graines (Polese, 2006). Le haricot peut pousser dans plusieurs types de sols avec un pH optimal se situant entre 6,0 et 6,5 (Aguiar *et al.*, 1999 ; Polese, 2006).

#### Classification (USDA, 2014)

**Règne** : Plantae

**Sous-règne** : Tracheobionta

**Super-division** : Spermatophyta

**Division** : Magnoliophyta

**Classe** : Magnoliopsida

**Sous-classe** : Rosidae

**Ordre** : Fabales

**Famille** : Fabaceae

**Genre** : *Phaseolus*

**Espèces** : *Phaseolus vulgaris* L.





**Nom vernaculaire :** Tsaramaso en Malagasy; Haricot commun en Français ; Common bean en Anglais.

Son adaptabilité, son cycle de vie court, son absence d'exigence vis-à-vis du type de sol attirent les agriculteurs (**Kowthar, et al., 2013**). Les sols légers sont plus favorables à cause d'un réchauffement plus rapide et d'une germination rapide, mais la culture réussit aussi sur les sols lourds (**Bouché, 2012**).

De nombreuses Légumineuses constituent une source majeure de protéines et d'huiles végétales (**Graham & Vance, 2003**) et elles sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. De ce fait, les Légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées (**Patriarca et al., 2004 ; Stacey et al., 2006**).

Les plantes de la famille des Fabacées présentent une particularité dans leur système racinaire, une symbiose avec une bactérie du sol, le *Rhizobium*. Ce dernier permet un accès privilégié à l'azote de l'air ou azote atmosphérique pour la croissance de la plante (**Bouché, 2012**). Ainsi, par cette symbiose, les plantes s'affranchissent de la teneur en azote dans le sol (**Zohra, 2008**). Cette voie est donc l'une des plus intéressantes qui pourra améliorer la productivité agricole d'autant plus que ce processus est accentué par la présence de nombreux microorganismes du sol qui favorisent, avec les *Rhizobia*, la mise en disponibilité des nutriments notamment du phosphore et de l'azote (**Henintsoa, 2013**). Cette symbiose aide aussi les plantes de la famille des Légumineuses à s'adapter à des sols très pauvres et très dégradés (**Zohra, 2008**).

### **I.1.3. Culture du haricot à Madagascar**

La production de haricot suscite maintenant l'intérêt des producteurs. En culture traditionnelle, les rendements en haricot sec sont très faibles : 500 à 700 kg/ha. En culture améliorée : la production est de 2 t/ha en haricot sec avec 3 t de tiges et feuilles (**Hubert, 1978**).

Elle se stabilise autour de 80 000 tonnes en 2010. Cependant, l'offre demeure insuffisante, elle est toujours loin de la situation des années 60-80 avec 140 000 tonnes de haricots par an. (**Andriamanazaoro, 2014**). L'absence de mécanisation et l'accès aux semences améliorées ont été évoqués comme étant les principaux facteurs de la médiocrité de la filière haricot (**Razafindramiadana, 2014**). La production de semences améliorées est passée de 400 kilos en 2009 à 2100 kilos en 2013 au niveau national. Grâce aux nouvelles techniques culturales, des régions qui ne produisaient pas de haricot sont devenues propices à la culture (**Andriamanazaoro, 2014**).

#### I.1.4. Cycle végétatif

Le cycle végétatif du haricot comprend les phases suivantes (**Hubert, 1978**) :

##### - Phase de germination

Les graines lèvent en 4 à 8 jours suivant la température. Elles doivent toutes être sorties de terre au bout de 8 jours. Un à deux jours après l'apparition des crosses, les cotylédons sortis du sol, s'ouvrent et la première paire de feuilles apparaît.

##### - Phase de croissance

Trois à quatre jours après la levée, les cotylédons commencent à se faner. Cinq à six jours après la levée apparaît la première feuille trifoliolée. Cinq à six jours après l'apparition de la première feuille trifoliolée apparaît la deuxième. Au bout d'un mois, le pied de haricot possède une dizaine de feuilles trifoliolées et il atteint sa hauteur définitive de 30 à 40 cm pour les variétés naines.

##### - Phase de floraison

Elle débute 3 semaines à 1 mois environ après le semis. Elle dure 1 mois à 1 mois et demi suivant les conditions climatiques. La jeune gousse met une douzaine de jours environ pour atteindre sa taille définitive.

##### - Phase de maturation

Une fois la taille définitive atteinte, les graines se forment en 15-20 jours. Il faut attendre encore 20 à 30 jours pour que les gousses s'ouvrent d'elles-mêmes, les graines étant mûres. Le cycle végétatif complet du haricot est en moyenne de : 90 à 100 jours pour le haricot.

#### I.2. Bactéries nodulant les Légumineuses (BNL)

Les BNL sont divisées en deux grands groupes, les Rhizobia et les non-Rhizobia.

Les Légumineuses sont capables d'établir une interaction symbiotique avec des bactéries du sol, collectivement appelées Rhizobia (**Mbengue, 2010**). « Rhizobia » est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui sont capables d'induire des nodules sur les Légumineuses, et d'y fixer l'azote atmosphérique en symbiose. Actuellement on préfère substituer au terme de « Rhizobia », qui est un terme dérivé du nom du genre *Rhizobium*, le terme de BNL (**Zakhia et al., 2004**).

Les BNL non Rhizobia sont des symbionts capables de noduler les racines des Légumineuses et répertoriées dans les sous-classes de  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -*Proteobacteria* (**Balachandar et al., 2007**). La particularité de ces microorganismes, aussi bien les Rhizobia que les non-Rhizobia, donc les BNL sont capables de s'associer aux racines de ces plantes avec la plupart

des espèces de Légumineuses en formant des nodosités sur les racines dont lesquelles ils réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac (**Zohra, 2008**).

D'un point de vue morphologique et microscopique, les BNL se présentent sous forme de bâtonnets à Gram négatif, mobiles (**Werner, 1992**). Les microorganismes fixateurs d'azote isolés à partir des nodosités des Légumineuses sont des bactéries que l'on range classiquement dans la famille des Rhizobiaceae. Toutes ces bactéries fixatrices d'azote appartenaient initialement au genre *Rhizobium* (**Ndoye, 1990**).

### **Souche bactérienne : *Rhizobium***

Le *Rhizobium* est parmi les microflores du sol, responsable de la nodulation des plantes Légumineuses. Beaucoup de germes du sol sont capables de fixer l'azote atmosphérique tels : *Rhizobium* des Légumineuses, *Azotobacter*,... (**Moureaux, 1973**), mais chaque genre et chaque espèce a sa spécificité de hôte.

Le genre *Rhizobium* comprend quatre espèces toutes à croissance rapide et dont le temps de génération est inférieur à 6 heures: *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium fredii* et *Rhizobium loti* (**Ndoye, 1990**).

### **Classification**

**Règne** : Bacteria

**Embranchement** : Proteobacteria

**Classe** : Alpha Proteobacteria

**Ordre** : Rhizobiales

**Famille** : Rhizobiaceae

**Genre** : *Rhizobium* (Frank.1889)

Pour que la légumineuse puisse soutirer le maximum d'azote atmosphérique, le sol doit contenir la bactérie qui lui est appropriée. La bactérie *Rhizobium phaseoli* est adaptée au haricot *Phaseolus vulgaris* (**D'Haeze & Holsters, 2002**).

## **II. Le sol**

### **II.1. Sol : une niche écologique et un réservoir de diversité**

Le sol représente la couche superficielle de la croûte terrestre, le sol est le milieu de développement des végétaux et la base de la vie des animaux et des hommes. Le sol est le produit de la transformation, sur une très longue période, de substances minérales et

organiques à la surface de la terre, sous l'influence de facteurs environnementaux et ayant une organisation et une morphologie définies (**Kedi et al., 2011**).

Le sol est une structure vivante et dynamique. D'ailleurs, cette structure affecte les conditions de culture pour les plantes ainsi que les méthodes culturales utilisées. Dans les systèmes labourés, la structure du sol est principalement créée par les opérations de travail du sol tandis que dans les systèmes non travaillés la structure est principalement créée par l'action du climat et par des processus biologiques (**Oorts, 2006**). La structure d'un sol doit être étudiée car elle influence le développement de la plante (**Ritchie & Amato, 2002**).

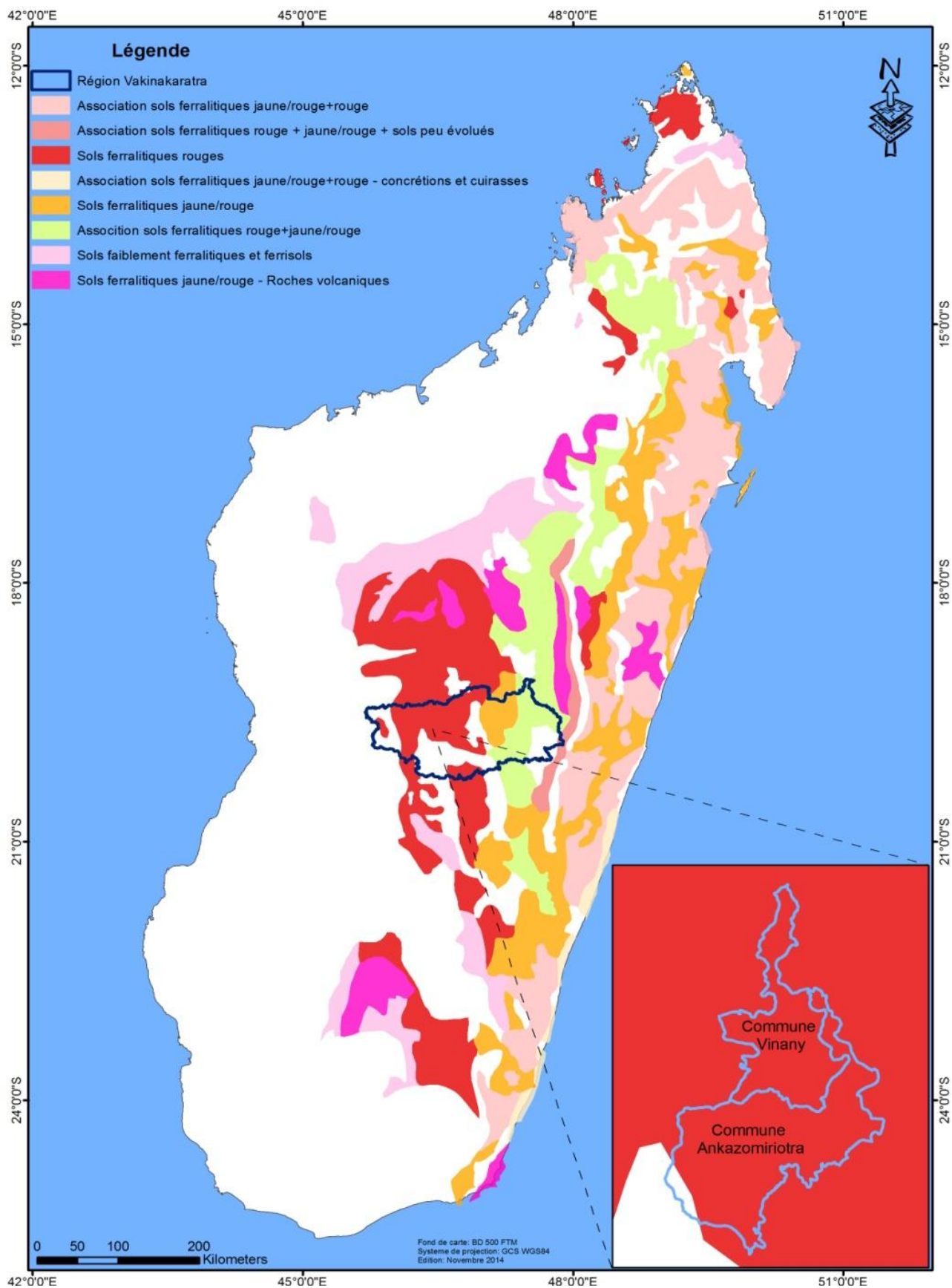
En plus de sa structure, le sol renferme aussi de la biomasse qui est formée par la microflore et la faune du sol ; elle représente jusqu'à 5 % de la matière organique du sol (**Huber & Schaub, 2011**).

## II.2. Sols ferralitiques

A Madagascar, les sols ferralitiques couvrent les 2/3 de l'île, et sont répartis sur la côte-Est et les hauts-plateaux du centre de Madagascar (**Riquier, 1966**). Ce sont des sols profonds, caractérisés par une décomposition très poussée des minéraux primaires qui ont une forte teneur en sesquioxydes de fer et d'aluminium (**Bourgeat & Aubert, 1971**). Ces sols peuvent se former directement à partir de la roche-mère, mais le plus souvent, ils se constituent à partir d'un manteau d'altération ancien, profond et lixivié (**Bourgeat, 1970**). La couleur généralement vive des horizons supérieurs est liée à la présence de fortes quantités de sesquioxydes de fer individualisés. Les sols ferralitiques ont une teneur élevée en matières organiques avec une très faible activité microbienne (**Balesdent, 1998**).

Les sols ferralitiques sont subdivisés en 4 sous classes **Riquier (1966)** :

- Sols faiblement ferralitiques
- Sols ferralitiques typiques kaoliniques
- Sols ferralitiques typiques gibbsitiques
- Sols ferralitiques humifères.



**Figure 1** Répartition des sols ferrallitiques de Madagascar (Bases de données : FTM)

Les sols ferrallitiques de « *tanety* » sont caractérisés par leur acidité et leur faible disponibilité en phosphore (P) (**Henintsoa, 2013**). Ce sont des sols acides voire très acides, pauvres en matières organiques, avec une faible capacité d'échange, de faibles teneurs en cations et généralement carencés en phosphore. Cette forte acidité est due surtout à la présence d'une forte teneur en aluminium échangeable, ce qui limite fortement la disponibilité en phosphore phytodisponible malgré une teneur potentielle élevée de P dans ces sols (**Rahajaharitombo, 2004**). Cependant, le phosphore et l'aluminium peuvent former des interactions qui engendreraient une augmentation de la tolérance des plantes de la toxicité de l'Aluminium et l'importance de ces interactions aluminium-phosphore Al-P dans les sols acide a été reconnue depuis 1920. (**Marschner, 1991**).

### II.3. Rhizosphère

C'est Lorenz Hiltner en 1904 qui utilisa le premier, le terme de rhizosphère, provenant du grec « *rhiza* » signifiant racine et « *sphere/sphaera* » signifiant cercle d'influence (**Balzengue, 2012**). La rhizosphère est définie comme étant la zone du sol influencée par l'activité des racines, elle est liée à la libéralisation ou l'exsudation par les racines de composés organiques qui stimulent l'activité microbienne (**Rahajaharitombo, 2004**). Cette zone est différente biologiquement, chimiquement et physiquement de la zone située à l'extérieur (**Firdaus, 2001**).

Elle constitue le siège des interactions complexes et variées entre les racines, les microorganismes telluriques et les composantes physico-chimiques du sol entraînant « l'effet rhizosphérique » (**Katznelson et al., 1962 ; Lemanceau & Heulin, 1998**).

## III. Symbiose

La symbiose est définie comme étant une association entre plusieurs organismes vivants qui s'apportent des bénéfices mutuels. Les plantes surtout comme les Légumineuses effectuent différentes sortes de symbioses, telles : la symbiose entre plante-mycorhize, la symbiose fixatrice d'azote, la symbiose légumineuse-rhizobium,...

### III.1. Symbiose entre plante-champignons mycorhiziens

La symbiose entre une plante vasculaire et un champignon mycorhizien donne naissance à un organe particulier appelé mycorhize (**Sarasin, 2011**). Si l'organe en question se forme à l'extérieur des cellules racinaires, on parle d'ectomycorhize, par contre si l'organe se retrouve à l'intérieur des cellules corticales, c'est l'endomycorhize (**Seddas et al., 2009**).

Ce dernier se subdivise encore en plusieurs sous-groupes mais les plus couramment rencontrés dans la nature sont les endomycorhizes à vésicules et à arbuscules qui font également l'objet de cette étude (**Smith and Read, 2008**). Dans cette symbiose, la plante fournit au champignon le carbone sous forme de sucres élaborés par la photosynthèse et le champignon en échange, fournit à la plante des éléments comme l'Azote, Phosphore, et d'autres substances minérales mobilisés grâce à aux connexions hyphales avec le sol et nécessaires à sa croissance (**Kedi et al., 2011 ; Germon, 2013**).

La symbiose mycorhizienne est très largement répandue dans le règne végétal et contribue largement à l'amélioration de la nutrition minérale des plantes et à leur protection contre les stress biotiques ou abiotiques et les agents phytopathogènes (**Germon, 2013**). De même, cette symbiose représente un mécanisme général contre les carences hydrique et phosphatée, mais le principal avantage repose sur l'amélioration de la nutrition phosphatée, étant donné que le phosphore est un élément majeur pour la croissance des plantes (**Balergue, 2012**). De plus, les mycorhizes peuvent diminuer l'impact de certaines maladies et favoriser l'absorption d'eau et des minéraux (**Le Lan, 2012**).

Une autre forme d'entrée du phosphore via la racine est le réseau très dense et très étendu constitué par les filaments mycéliens des mycorhizes qui permet une augmentation considérable à la fois du volume prospecté et de la surface d'absorption (**Rahajaharitombo, 2004**). Les champignons mycorhiziens sont des symbiotes obligatoires, nécessitant donc la présence d'un hôte pour compléter leur cycle vital (**Sarasin, 2011**).

On distingue actuellement au moins sept types différents d'associations mycorhiziennes, dont les deux principales sont les mycorhizes à arbuscules et à vésicules (VAM) et les ectomycorhizes (EMC) (**Seddas et al., 2009**).

### III.1.1. Les endomycorhizes

Les endomycorhizes sont très répandues et concernent environ 80% des espèces végétales (**Béreau et al., 2003**). Elles se caractérisent par l'absence de manteau fongique autour de la racine. On les rencontre essentiellement chez les plantes herbacées et chez quelques espèces ligneuses telles que les Peupliers et les Eucalyptus. Ces symbiotes, à vie saprophytique réduite, sont peu spécifiques, et leur observation s'effectue généralement sous microscope et après des séances de coloration particulière (**Balergue, 2012**). Si leur mise en culture hors plante hôte était un problème par le passé, de nos jours il est possible de produire

des cultures monospérales de champignon AM *in vitro* pour la production d'inoculum (Abdoulaye, 2003).

### III.1.2. Les ectomycorhizes

Ce sont des associations où le mycélium s'insinue entre les cellules du cortex racinaire, mais ne pénètre pas dans les cellules vivantes. A l'extérieur de la racine les champignons forment une sorte de manchon d'hyphes. Ils transforment les racines latérales à structure primaire en les revêtant d'un manteau fongique (Balzergue, 2012). Les hyphes pénètrent également la racine en formant dans le cortex un système intercellulaire complexe appelé réseau de Hartig avec peu ou pas de pénétration cellulaire (Rajaonarimamy, 2010). Ce type de mycorhize est très facile à détecter (à l'œil nu) grâce à la déformation de la morphologie des racines qui l'ont contracté (Bâ *et al.*, 2011).

### III.1.3. Les ectendomycorhizes

Ce sont des types d'associations intermédiaires entre les deux précédentes : un manteau externe coexiste avec des hyphes qui pénètrent à l'intérieur des cellules racinaires, soit sous forme de pelotons (mycorhizes arbutoïdes), soit sous forme d'hyphes très courtes (mycorhizes monotropoïdes). Ils ont un manteau réduit ou absent, mais possédant un réseau Hartig bien développé et des hyphes qui pénètrent dans les cellules racinaires (Béreau *et al.*, 2003).

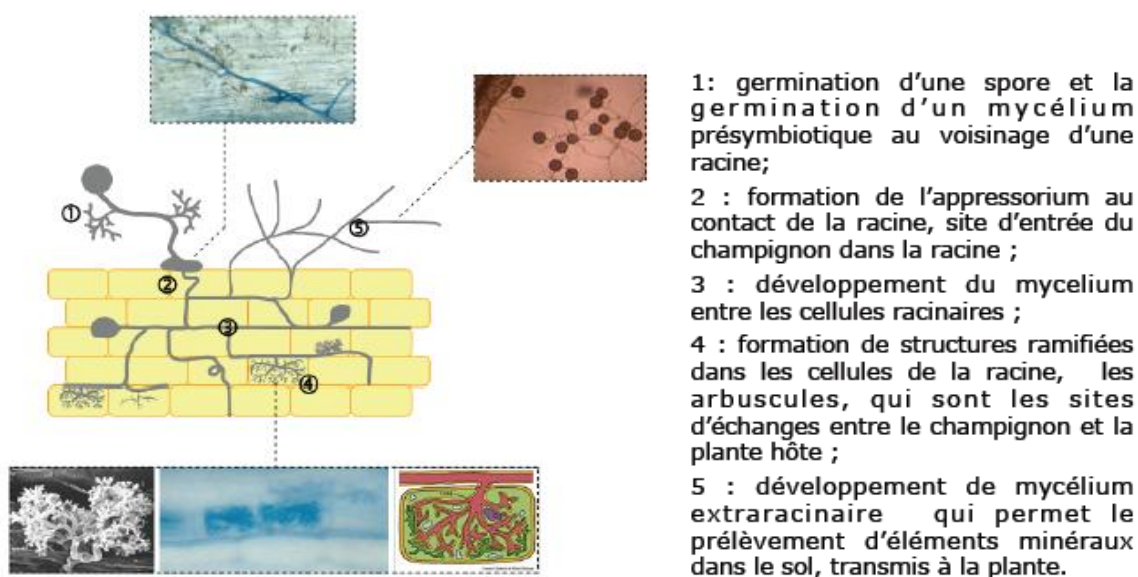
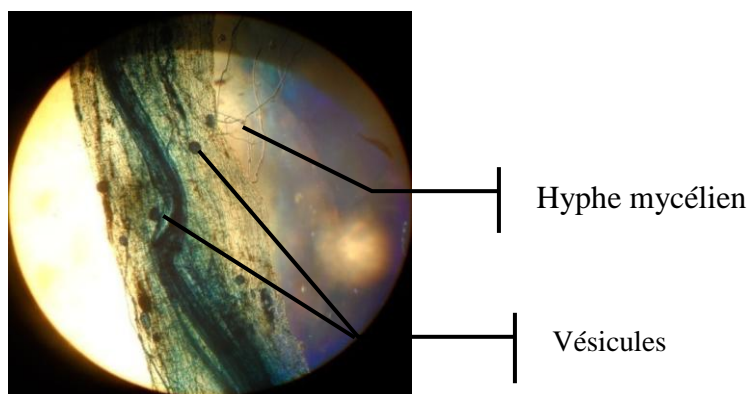


Figure 2. Les mycorhizes et la nutrition minérale des plantes (Germon, 2013).



### Mycorhizes Arbusculaires

Les Mycorhizes Arbusculaires (MA) se distinguent des autres types de mycorhizes par leur capacité à former des structures particulières appelées arbuscules. Ce sont des points d'échange entre le mycète et la plante qui se développent à l'intérieur des cellules corticales des racines de la plante hôte. Les MA forment aussi des vésicules intracellulaires (ou intercellulaires) ayant une fonction de stockage, caractéristique des MA (**Sarasin, 2011**).



**Photos 1** Racines fines observées au microscope optique (10×10)

(Source : **Razafindramboa, 2014**)

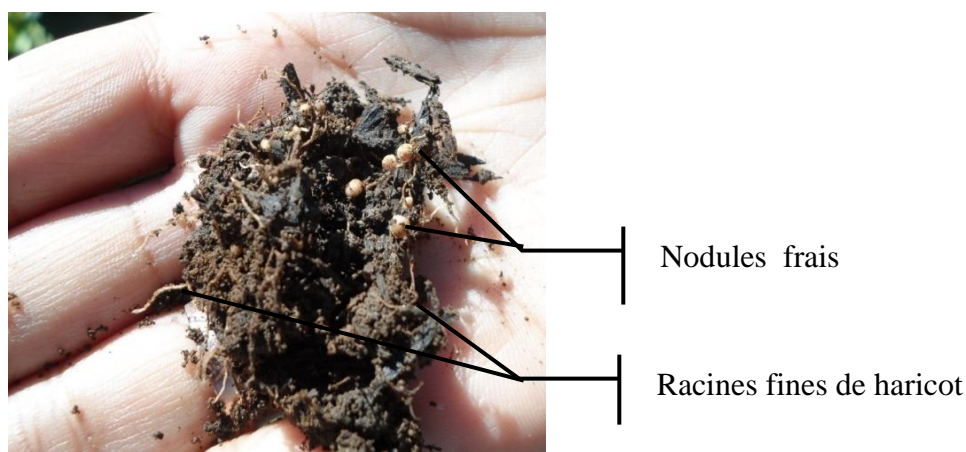
### **III.2. Symbiose fixatrice d'azote**

Approximativement, 80% de l'atmosphère est constitué par l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) (**UNIFA, 2005**). Mais la plupart du temps, c'est la forme ammoniac qui est utilisée par les êtres vivants pour fabriquer les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques pour le bon fonctionnement de l'organisme (**Lindemann & Glover, 1990**). La rareté de l'azote est très accentuée dans les sols tropicaux; d'ailleurs c'est l'un des facteurs limitant de la fertilité du sol. La fixation de l'azote atmosphérique est réalisée grâce à la Nitrogénase (**Moureaux, 1973**).

Les cultures de Légumineuses fixatrices d'azote constituent une alternative pour améliorer la nutrition azotée (**Bado, 2002**). Elles ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) grâce à l'intervention des bactéries nodulant les Légumineuses, du genre : *Rhizobium*. Celles-ci sont logées dans une excroissance appelée encore : nodule (**Lindemann & Glover, 1990**). Cette symbiose apparaît d'un intérêt stratégique renforcé tant pour sa capacité à fournir de l'azote à faible coût aux systèmes de culture que pour ses répercussions environnementales (voie de limitation de production des gaz à effets de serre: absence d'usage de carburants fossiles pour la fourniture d'azote assimilable, absence d'émissions de  $N_2O$  au cours du développement de la plante) (**Germon, 2013**). Cette fixation

biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniac. Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux (Zohra, 2008). D'ailleurs, cette enzyme a la capacité de catalyser plusieurs réactions de réduction dont celle du diazote ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3$ ), forme de l'azote assimilable par les végétaux. Le microorganisme produit alors de l'ammoniac pour le partenaire végétal en échange de molécules carbonées issues de la photosynthèse (Mbengue, 2010).

Les rotations comportant des Légumineuses améliorent la nutrition azotée et les rendements en augmentant l'azote disponible dans le sol et le recouvrement de l'azote apporté par l'engrais (Bado, 2002).



**Photos 2.** Produit de la symbiose : nodule  
(Source : Razafindramboa, 2014)

Le nodule est un nouvel organe produit par la plante hôte au sein duquel les bactéries, différenciées en bactéroïdes, fixent l'azote atmosphérique (Ott *et al.*, 2005). Les nodules sont majoritairement racinaires. La formation d'un nodule fonctionnel peut être divisée en trois étapes : l'infection, l'organogenèse, la fixation de l'azote (Mbengue, 2010).

Les nodules sont des excroissances provoquées par l'infestation par des bactéries du genre *Rhizobium*. Ces bactéries vivent en symbiose avec la plante : elles reçoivent par la sève des hydrates de carbone et lui fournissent de l'ammonium synthétisé à partir de l'azote atmosphérique. Les principales espèces nodulant le haricot sont *Rhizobium etli* et *Rhizobium phaseoli*. Les conditions optimales pour le développement des nodosités sont une température

de 25 à 30°C et un pH de 6 à 7. La quantité d'azote fixée peut atteindre 200 kg à l'hectare (FAO, 2004).

### III.3. Symbiose légumineuse-rhizobium

La symbiose légumineuse-*Rhizobium* continue à constituer le principal mécanisme biologique d'apport d'azote dans les systèmes de production agricole car il y a abondance isotopique en  $^{15}\text{N}$  qui permet de distinguer spécifiquement l'azote issu de la fixation, de celui apporté par les fertilisants (Boddey *et al.*, 2000).

Les racines de légumineuses sécrètent dans la rhizosphère des composés de nature flavonoïque qui stimulent la sécrétion des facteurs *Nod* par le rhizobium (D'Haeze & Holsters, 2002). La plante capte les facteurs *Nod* grâce à des récepteurs de facteurs *Nod* (Karaboneye, 2013). Ce phénomène déclenche la courbure des poils absorbants et la formation de cordon d'infection. Par la suite, les rhizobiums pénètrent à travers le poil absorbant, se transforment en bactéroïdes et initient la fixation du  $\text{N}_2$  (Karaboneye, 2013). Les bactéroïdes réduisent l'azote atmosphérique en ammoniacque ( $\text{NH}_4^+$ ) grâce à l'enzyme nitrogénase, puis en acides aminés, et en cèdent une partie à la plante en échange de glucides afin de transformer le  $\text{N}_2$  en  $\text{NH}_4^+$  (Lindermann & Glover, 1990). Il convient de noter que certaines Légumineuses sont plus efficaces que d'autres pour fixer l'azote atmosphérique. Par exemple, le haricot est un mauvais fixateur, fixant moins de 60 kg N/ha, ce qui est inférieur à ses besoins en N (Deslauriers, 2014).

## IV. Fertilisants et fertilité du sol

Quand on parle du secteur agriculture, il y a sous entendu l'expression « fertilité du sol ». Fertilité du sol car toute amélioration que ce soit au niveau qualité ou quantité repose sur celle-ci. Les fertilisants sont soit d'origine organique, soit inorganique (engrais minéraux) (Weill & Duval, 2009).

Les plantes ont besoin d'au moins 16 éléments nutritifs essentiels pour accomplir leur cycle de croissance. Ces éléments sont carbone, hydrogène, oxygène, azote, phosphore, potassium, calcium, magnésium, soufre, fer, manganèse, zinc, cuivre, bore, molybdène, chlore (Moughli, 2000). Les végétaux puisent ces minéraux nécessaires à leur croissance dans la solution de sol, au contact des racines (Elalaoui, 2007). Pour avoir un bon rendement de culture, les racines des plantes ont besoin d'une qualité suffisante de nutriments, de quantités adéquates d'eau et d'une structure de sol meuble. Ce qui indique une bonne fertilité du sol.

Une fertilisation optimale favorise l'obtention de bons rendements tout en maximisant la rentabilité des cultures. Beaucoup de méthodes sont utilisées pour améliorer la fertilité d'un sol, mais ici, l'étude se focalise sur l'apport de fertilisants sur le sol de culture. Les plantes ont besoin de fertilisants tant en minéral qu'en organique (**Elalaoui, 2007**). Les amendements organiques ne suffisent pas pour atteindre des rendements optimaux des plantes (**Zohra, 2008**), alors des alternatives ont été prises comme l'apport d'azote (N), de phosphore (P), ou d'autres éléments minéraux. La fertilisation minérale a pour but d'apporter le complément nécessaire à la fourniture du sol en vue de répondre aux besoins physiologiques des plantes pour une croissance et un développement optimaux (**Elalaoui, 2007**). Mais cette fertilité est aussi influencée par le climat, la végétation et la situation géographique du milieu.

Les apports nécessaires d'engrais sont exprimés en kg/ha d'azote (N), de phosphate ( $P_2O_5$ ) ou de potasse ( $K_2O$ ). Le rapport d'analyse donne les unités fertilisantes (en %) de chacun de ces éléments par 100 kg de l'engrais ou du mélange d'engrais, de même que le taux d'application recommandé (en kg/ha) (**Directions de l'aménagement des terres, 2001**).

## V. Phosphore

Le phosphore constitue l'un des trois éléments majeurs indispensables à l'alimentation des cultures et il est un facteur qui peut sérieusement limiter la production agricole, surtout dans les sols ferrallitiques (**Rahajaharitompo, 2004**). Il se présente sous deux formes : phosphore inorganique et phosphore organique. Mais ce dernier a l'avantage d'être assimilable plus rapidement par les plantes (**Bouvier, 2012**).

Le phosphore provient en général des roches phosphatées, et celui-ci est non disponible pour la plante, alors pour le rendre plus soluble, ces roches sont attaquées avec l'acide sulfurique pour produire de l'acide phosphorique. Les processus de fabrication vont aboutir au superphosphate simple ou triple qui est utilisé directement comme engrais phosphatés (**Moughli, 2000**). Le phosphore est peu mobile dans le sol, il est présent sous les deux principales formes suivantes :  $H_2PO_4^-$  et  $HPO_4^{2-}$  (**Soltner, 1988**). Entre pH=5,5 et pH=7,5, il y a dans le sol une majorité d'ions  $H_2PO_4^-$  et une quantité croissante d'ions  $HPO_4^{2-}$  est présente jusqu'à un pH de 11 (**Soltner, 1988**). Comme tous les éléments minéraux, le phosphore est prélevé par les racines et ses auxiliaires à l'état dissous sous forme ionique (**Morel et al., 2006**).

La forme ionique la plus soluble et la plus facilement assimilable pour la plante est le  $H_2PO_4^-$ , c'est entre les pH=5,5 et pH=7 que le phosphore est le plus facilement utilisable,

parce qu'il est adsorbé en grande partie par les argiles (Soltner, 1988). En dessous du pH=5,5, la fixation par le fer et l'alumine devient de plus en plus forte. Au-dessus du pH=7, le calcium forme avec le phosphore des phosphates de plus en plus insolubles (Soltner, 1988).

Le cycle du phosphore se déroule exclusivement dans la biosphère (Kedi *et al.*, 2011). La fertilité phosphatée des écosystèmes agricoles des sols ferralitiques représente un enjeu considérable non seulement pour augmenter la productivité des terres mais aussi pour la gestion durable de ces sols de «tanety» des Hautes Terres malgaches (Rahajaharitombo, 2004).

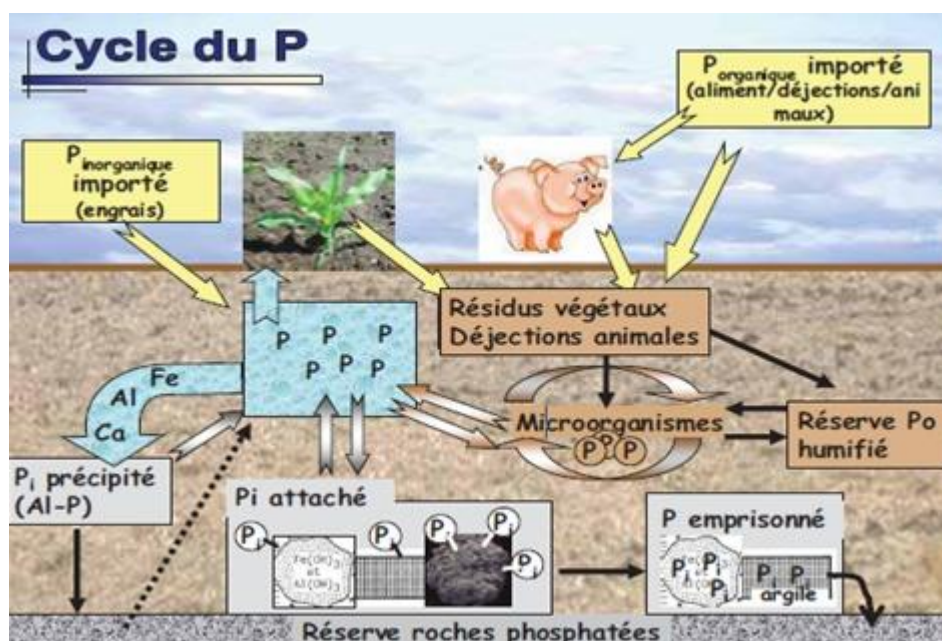


Figure 3. Cycle du phosphore (Robert, 2011)

La biodisponibilité du phosphore dans les sols est donc le résultat de l'interception par les racines et ses auxiliaires de l'offre du sol en P (Rahajaharitombo, 2004).

### Importance du phosphore pour les plantes

Le phosphore est un nutriment important pour les plantes et constitue environ 0,2 % de la masse sèche de la plante (Salisbury & Ross, 1992). Le phosphore est une partie intégrante du métabolisme énergétique, un constituant des acides nucléiques et des membranes cellulaires chez les plantes. En général, une carence en P entraîne un retard de maturité de la plante (Salisbury & Ross, 1992). Par conséquent les plantes ne peuvent pas se développer sans un bon approvisionnement de ce nutriment (Schachtman *et al.*, 1998).

Le symptôme typique du manque de P chez la plante est le changement graduel de la coloration du feuillage, allant du vert foncé chez les feuilles plus jeunes au pourpre chez les feuilles plus vieilles. La déficience de P induit aussi une réduction de la croissance, de la taille et du nombre de fleurs et de graines et réduit une grande partie de la productivité des plantes **(Kedi et al., 2011 )**

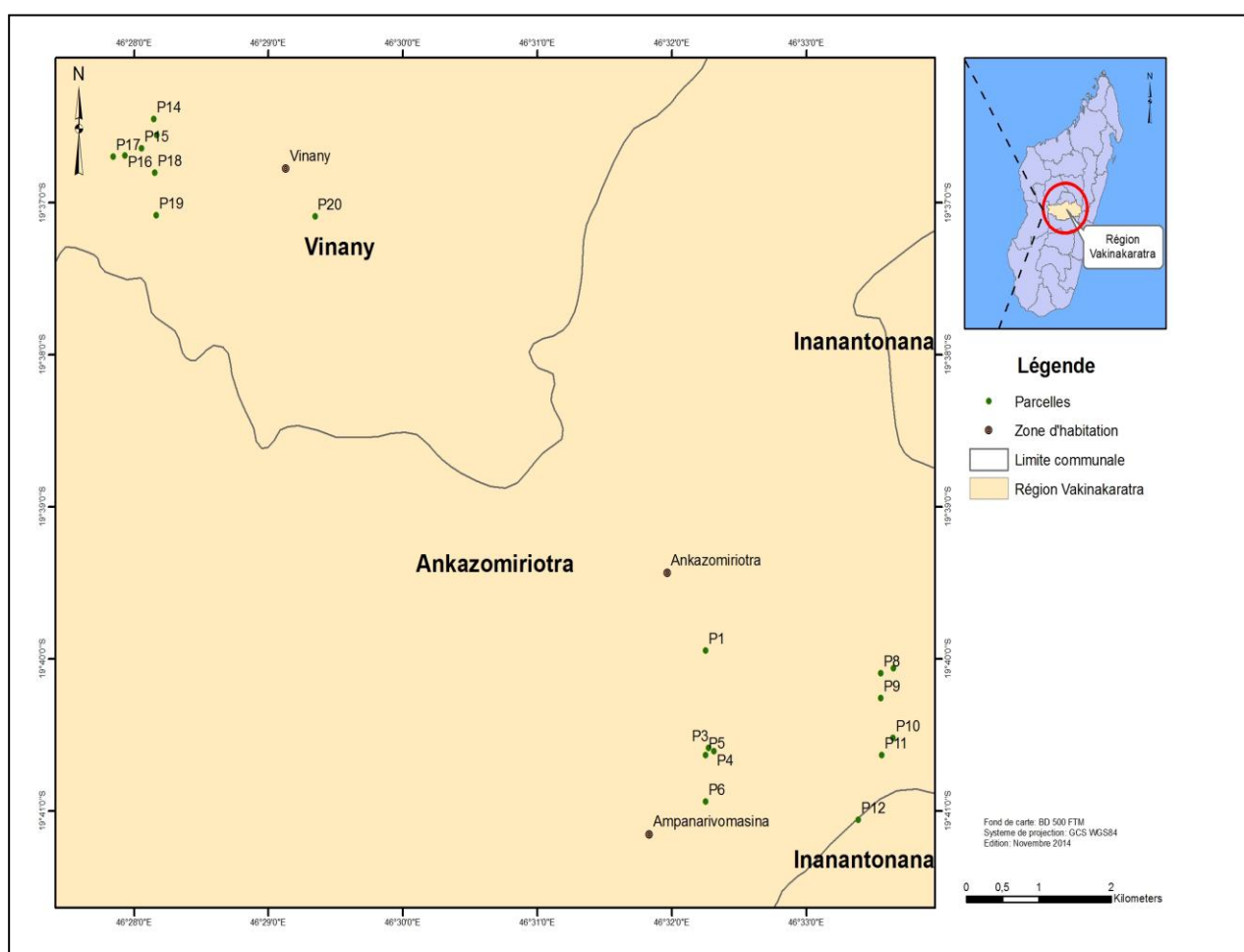
Afin de favoriser l'absorption du P organique, la plante libère dans la rhizosphère des phosphatases qui hydrolysent le phosphore et le libèrent sous forme d'ions orthophosphates absorbables par les racines **(Zimmermann, 2003)**. L'ion phosphate se fixe très rapidement aux oxy-hydroxydes de fer et d'aluminium ou aux carbonates de calcium dans les sols acides et calcaires, respectivement. Il est donc peu mobile. Alors, il est préférable de l'appliquer à proximité des racines pour en favoriser l'absorption **(Deslauriers, 2014)**.

# **MATERIELS ET METHODES**

# MATERIELS ET METHODES

## I. Sites d'étude

Les sites d'étude sont situés dans 3 localités de la Région de Vakinankaratra, District de Betafo en l'occurrence Andratsay, Ankazomiriotra et Vinany (figure 5). Les coordonnées géographiques des 19 parcelles sont données en Annexe 6. Les parcelles 1, 3, 4, 5, 6 sont localisées à Ankazomiriotra, les parcelles 7 à 12 à Andratsay et 13 à 20 à Vinany. Ces champs d'expérimentation ont été mis en place en janvier 2014.



**Figure 4.** Les 19 parcelles (P1, P3,...P20) d'étude (Base de données : FTM).

La région de Vakinankaratra présente les mêmes caractéristiques (tableau 1) que celles des zones agroécologiques des Hautes Terres où les sols ferrallitiques prédominent (Arrivets, 1998, Rahajaharitombo, 2004).



**Tableau 1.** Caractéristiques de la zone agroécologique des Hautes-Terres

| Caractéristiques   | Hautes-Terres   |
|--|---|
| Roche mère   | Socle granito-gneissique  |
| Sols dominants   | Ferralitiques   |
| Morphopédologie  | Colline ou tanety convexe en « demi-orange »  |
| Climat   | Tropical d'altitude   |
| Végétation dominante   | Steppe  |
| Agriculture (pluviale, plaines d'alluvionnement récentes, et Bas-fond) | Maraîchage développé, arbres fruitiers tempérés, manioc, patate douce, maïs, haricots, riz, pomme de terre, blé,... |

## II. Variétés de haricot utilisées

Le haricot (*Phaseolus vulgaris*) a été utilisé comme plante d'étude pour déterminer l'efficacité de l'apport en phosphore sur le sol de culture et sur le rendement.

Trois variétés de haricot ont été utilisées dont deux qui sont des lignées RIL (*Recombinant Inbred Lines*) à caractères contrastants et une variété locale. Ces variétés sont :

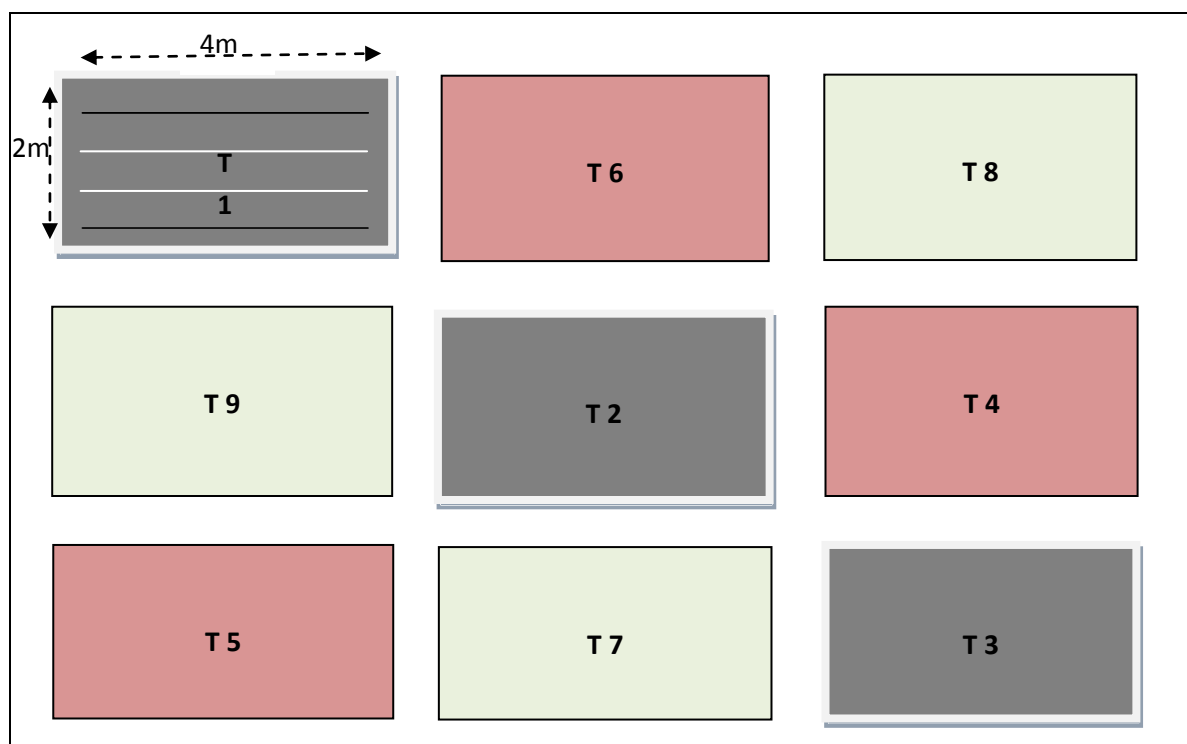
- RIL 115, tolérante en carence en Phosphore ; (Drevon, 1991)
- RIL 147, sensible en carence en Phosphore ; (Drevon, 1991)

Les 2 variétés RILs sont issues de la descendance du croisement de lignées de haricot BAT 477 et DOR 364, réalisé dans le cadre de coopération CIAT-INRA en 1995-98. Les semences ont été obtenues auprès du centre de recherche INRA à Montpellier (France).

- SOAFIANARANA ou *Tsaramaso fotsy* (sensible à la fertilité du sol) a été utilisée comme témoin local. C'est une variété que les paysans ont l'habitude de cultiver et qui est la plus répandue dans la zone.

## III. Dispositif expérimental

Chaque parcelle est constituée par 9 traitements disposés au hasard (figure 6). Un traitement est formé par 4 lignes de 4m avec une surface de 8m<sup>2</sup>. D'où la surface d'une parcelle est de 72 m<sup>2</sup> environ.



**Figure 5.** Schéma du dispositif expérimental

Ces 9 traitements placés au hasard se différencient selon l'apport en phosphore et la variété mise en culture (tableau 2) ainsi, le Triple Super Phosphate (TSP) 46% a été utilisé. (Annexe 5).

**Tableau 2.** Doses de Phosphore et de TSP apportées dans chaque traitement

| Traitements | Variétés   | Fertilisation en $P_2O_5$ (kg/ha) | Quantité équivalente en TSP (g) |
|-------------|------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| T 1         | RIL 115    | 0                                 | 0                               |
| T 2         |            | 50                                | 86,956                          |
| T 3         |            | 200                               | 347,824                         |
| T 4         | RIL 147    | 0                                 | 0                               |
| T 5         |            | 50                                | 86,956                          |
| T 6         |            | 200                               | 347,824                         |
| T 7         | SOAFIARANA | 0                                 | 0                               |
| T 8         |            | 50                                | 86,956                          |
| T 9         |            | 200                               | 347,824                         |

### ✓ Préparation du sol

La préparation du sol a été effectuée par labour manuel à l'aide d'angady.

### ✓ Préparation des semences

Le semis en ligne a été adopté à raison de 20 graines par ligne. La distance entre les lignes a été de 50 cm et celle entre les poquets de 20 cm.

### ✓ Préparation des engrais utilisés

Une balance de précision a été utilisée pour peser la quantité de TSP nécessaire pour chaque traitement.

## IV. Protocole de collecte d'échantillons de végétaux et de sol

### IV.1. Echantillons de végétaux

Dans chaque parcelle, dix (10) plantes choisies au hasard ont été prélevées avec leurs systèmes racinaires à l'aide d'une bêche (*angady*). Les plantes ont été conservées dans des sacs en papier. Ces échantillons ont été destinés pour le comptage de nodules, la mesure de biomasse et de taux de mycorhization.

### IV.2. Prélèvement d'échantillons de sol pour la mesure des activités enzymatiques

Le prélèvement d'échantillon de sols rhizosphériques a été réalisé en enlevant à la main l'ensemble du sol adhérent aux racines en faisant attention à ce que les nodules fixés sur les racines ne se détachent pas. Les sols rhizosphériques des plantes ont été mis dans une bassine et mélangés afin de former un échantillon composite. 250g d'échantillon composite ont été prélevés et conservés au frais dans une glacière contenant des bacs de glace jusqu'au laboratoire.

## V. Mesure du rendement de haricot par hectare

Le rendement du haricot a été évalué par pesage successif des gousses produites. Ce rendement est exprimé en kg de gousses par hectare de sol de culture (kg/ha).

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Produits en kilos de haricot des parcelles}}{\text{Surface en ha des parcelles}}$$

## VI. Etude au laboratoire

### VI.1. Influence de l'apport en phosphore de différents niveaux sur la nodulation

Evaluation du taux de nodulation

Au laboratoire, les parties aériennes et les systèmes racinaires ont été séparés. A l'aide d'une pince à pointe fine, les nodules ont été détachés des racines et comptés. Les échantillons de nodules ont été ensuite pesés à l'état frais et divisés en 2 lots :

- un lot de 8 à 10 nodules est conservé dans des cryotubes contenant de coton hydrophile et des silicagels pour absorber l'humidité ambiante. Les nodules conservés ont été réhydratés, stérilisés et écrasés pour l'isolement des souches pures de Rhizobia.
- un deuxième lot a été séché à l'étuve à 60°C pendant une semaine afin de déterminer leur biomasse sèche.

### VI.2. Evaluation du taux de mycorhization de la racine

Le principe de la méthode est de vider les cellules racinaires de tous les constituants en conservant leurs parois (**Helme & Selosse, 2010**), puis d'effectuer une coloration à chaud avec le Bleu Trypan selon la méthode décrite par **Phillips & Hayman (1970)** (cf. Annexe 2).

Des racines fines ont été prélevées sur le système racinaire de la plante puis mises dans des tubes à essais contenant de la potasse (KOH 10%) afin d'éclaircir le cytoplasme des cellules. Le tout est ensuite incubé dans un bain marie à 90°C pendant 30 min, ce qui rend la solution rouge-brune et détruit le contenu des cellules. Après l'incubation, la potasse est jetée et les racines sont rincées abondamment avec de l'eau courante. La coloration à chaud se fait ensuite à 90°C pendant 15 min après ajout de bleu Trypan dans chaque tube. L'observation se fait sous microscope optique au grossissement x100 après rinçage des racines à l'eau courante. Pour l'étalement entre lame et lamelle, les racines fines ont été coupées en des morceaux de 1cm de longueur et ensuite étalées sur une lame imbibée de glycérol puis recouverte par une lamelle. L'observation se fait pour chaque racine fine de l'étalement et elle est notée en (+) si présence de vésicules ou d'arbuscules et en (-) s'il y a aucun des deux (02).

#### Le taux de mycorhization

Le taux de mycorhization se calcule à partir de l'évaluation des observations sous microscope, selon la formule : (**Marx et al., 1977**).

$$\text{Taux de mycorhization} = \frac{\text{nombre de racines mycorhizées}}{\text{nombre de racines observées}} \times 100$$

### VI.3. Influence de l'ajout de phosphore sur l'activité enzymatique du sol

L'estimation de la biomasse microbienne est indispensable pour étudier les flux de certains éléments (C, N, P,...) dans le sol. De plus, depuis un demi-siècle les méthodes de mesure d'activités enzymatiques sont utilisées pour évaluer la "fertilité" des sols (**Hoffmann & Seegerer, 1951**). De nombreux travaux ont été effectués dans ce domaine; la plupart portent sur des hydrolases (amylase, saccharase, protéase, uréase) ou sur des oxydoréductases (catalase, peroxydase, déshydrogénase, glucose-oxydase) (**Nicolardot *et al.*, 2010**).

L'intérêt de l'étude de l'activité enzymatique est qu'elle peut donner une information précieuse sur l'origine de nombreux enzymes (**De Prado *et al.*, 1982**).

Dans le cadre de cette étude, deux méthodes ont été utilisées à savoir celle de la mesure de l'hydrolyse de Fluorescéine DiAcétate ou FDA pour évaluer l'activité microbienne globale du sol et celle de l'activité phosphatasique avec la mesure de l'hydrolyse du para-Nitrophénylphosphate ou pNPP.

#### VI.3.1. Mesure de l'activité microbienne globale

Les extraits de sol provenant de chaque parcelle ont fait l'objet de la mesure de l'activité microbienne en utilisant la méthode décrite par **Schnurer & Rosswall (1982)** qui étudie l'hydrolyse de la Fluorescéine di-Acétate. L'objectif est de mettre le sol en présence d'une solution de FDA, puis de mesurer par colorimétrie la quantité de fluorescence produite qui reflète l'activité microbienne globale du sol étant donné que de nombreuses enzymes sont responsables de l'hydrolyse (protéases, lipases, estérases) (**Nicolardot *et al.*, 2010**).

#### Dosage de la Fluorescéine produite

3 tubes ont été considérés comme essai (E1, E2, E3). Un gramme de sol de l'échantillon a été mis dans chaque tube puis additionné de 15 ml de solution tampon à 60 mM de pH=7,6 (Annexe 4); ainsi que de 200 µl de solution de FDA.

1 tube a été utilisé comme témoin enzyme (TE) pour chaque échantillon. Sa composition se diffère des essais par le remplacement de la solution de FDA par 200 µl d'eau distillée.

1 tube considéré comme témoin substrat (TS) a été effectuée pour chaque manipulation. Ce dernier contenait : 15 ml de tampon et 200 µl de solution de FDA.

Les préparations ont été ensuite incubées 1h sous agitation à 30°C. Pour arrêter la réaction, 750 µl de chaque solution a été transférée dans 750 µl d'acétone distillée. Les mélanges ont

été ensuite centrifugés à 1000 tours/mn pendant 5mn. Enfin le surnageant a été récupéré pour la lecture de la densité optique au spectrophotomètre à 490 nm.

### Détermination du produit d'hydrolyse

La quantité de fluorescéine en  $\mu\text{g}$  par heure et par gramme de sol a été obtenue après les lectures et en les projetant sur la courbe obtenue avec la gamme étalon ayant une concentration allant de 0 à  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

### VI.3.2. Mesure de l'activité des phosphatases du sol

Les extraits de sol provenant de chaque parcelle ont fait l'objet de mesure des activités phosphatasiques par la méthode décrite par **Tabatabai & Bremner (1969)**. L'activité de la phosphatase qui dépend fortement du pH a été évaluée par la méthode d'hydrolyse d'une solution de para-NitroPhénylPhosphate (p-NPP), tamponnée d'une part à pH compris entre 5,8 et 6 pour la phosphatase acide et d'autre part à pH 11 pour la phosphatase alcaline, en para-Nitrophénol (**Tabatabai, 1982**).

Les phosphatases acides prédominent dans les sols à  $\text{pH} < 6$  et l'activité des monoestérases est beaucoup plus élevée que celle des diestérases (**Eivazi & Tabatabai 1977; Rojo et al., 1990**). Aussi n'avons-nous mesuré dans cette étude que l'activité des phosphomonoestérases à pH 6 (**Feller et al., 1993**).

Les échantillons de sol ont été pesés et mis dans des eppendorfs en raison de 0,1g.

3 eppendorfs ont été supposés comme essai (E1, E2, E3) et additionnés de 400  $\mu\text{l}$  de tampon Mc Ilvain (Citrate Phosphate Buffer) (Annexe 3) et 100  $\mu\text{l}$  de la solution de pNPP.

1 eppendorf a été utilisé comme témoin enzyme (TE) pour chaque échantillon. Sa composition se diffère des essais par le remplacement de la solution de pNPP par de l'eau distillée de 100  $\mu\text{l}$ .

1 eppendorf considéré comme témoin substrat (TS) a été effectuée pour chaque manipulation et ce dernier a été additionné de 400  $\mu\text{l}$  de tampon et 100  $\mu\text{l}$  de la solution de pNPP.

Les préparations ont été ensuite incubées 1h sous agitation à  $37^{\circ}\text{C}$ . 100  $\mu\text{l}$  de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) et de 400  $\mu\text{l}$  d'hydroxyde de sodium ont été ajoutés pour complexer et arrêter la réaction. Les mélanges ont été ensuite centrifugés à 5000 tours/mn pendant 10 mn. Enfin le surnageant a été récupéré pour la lecture de la densité optique.

## VII. Traitements statistiques des données

Les traitements statistiques des données adoptés doivent permettre ou, du moins faciliter une interprétation claire et précise des résultats. Deux types d'analyses statistiques ont été utilisés : une analyse simple ou univariée qui est l'analyse de variance ou ANOVA et une analyse multivariée ou analyse factorielle : l'Analyse en Composantes Principales (ACP).

L'analyse de variance ou ANOVA a été utilisée pour comparer les moyennes des différentes variables mesurées (nombre de nodules, rendement, taux de mycorhization,...). En d'autres termes, elle consiste à savoir si l'effet traitement des doses croissantes d'apport en P sur les différentes variables est significatif ou non au risque d'erreur ou seuil de probabilité.

L'ACP sert à décrire des tableaux " $n$  individus ou observations /  $p$  variables quantitatives" de grande dimension c'est-à-dire beaucoup de variables et beaucoup d'individus (**Gonzalez et al., 1984**). C'est l'une des méthodes factorielles fondées sur des recherches d'axes principaux qui produisent essentiellement des visualisations graphiques et planes des éléments à décrire (**Simier, 1998**). Lorsque les individus ou observations sont décrits par un nombre important de variables, aucune représentation graphique simple ne permet de visualiser le nuage de points formé par les données. Ainsi, elle permet d'explorer les liaisons entre variables (nombre de nodules, rendement, taux de mycorhization...) et les ressemblances entre individus ou observations (doses croissantes d'apport en P). Le nuage des points des variables sont projetés à l'intérieur d'un « cercle de corrélation » où ils se positionnent en fonction de leur corrélation aux axes considérés ce qui permet de donner une signification aux axes (**Simier, 1998**).

Pour les deux types d'analyses (ANOVA, ACP), le logiciel XLSTAT-Pro2008 a été utilisé.

# **RESULTATS ET INTERPRETATIONS**



## RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Afin de tester les effets de la dose croissante de l'apport en Phosphore (0kg/ha, 50kg/ha et 200kg/ha) sur trois variétés de haricot (RIL115, RIL147 et SOAFIANARANA) dans trois localités de la région de Vakinankaratra, des ANOVA ont été réalisés sur les variables telles que nombre de nodules, la biomasse, le rendement, taux de nodulation, taux de mycorhization et les activités enzymatiques du sol.

Puis les deuxièmes analyses ont été effectuées en utilisant l'ACP afin de détecter la corrélation entre les traitements et les variables. La combinaison de ces deux traitements des données a permis d'interpréter les résultats de voir les effets des différents apports de P sur le sol selon les variétés de haricots.

### I. Influence de la quantité de phosphore apportée sur la variété RIL 115

#### I.1. Influence sur la nodulation, le développement de la plante et le rendement

Le tableau 3 montre les résultats de l'ANOVA des trois (03) niveaux d'apport de P sur les poids de nodules, le développement de la plante et le rendement pour la variété RIL 115.

**Tableau 3** Effet de l'apport en quantité différente de phosphore sur le développement et la production de la variété RIL 115

| Apport en phosphore (kg/ha) | Poids sec nodule (g) | Biomasse aérienne sèche (g) | Biomasse racinaire sèche (g) | Biomasse totale (g) | Rendement (kg/ha) |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|-------------------|
| 0P                          | 0,000 (b)            | 8,7 (b)                     | 3,2 (a)                      | 11,9 (b)            | 143,4 (c)         |
| 50P                         | 0,001 (b)            | 13,4 (ab)                   | 3,4 (a)                      | 16,8 (ab)           | 393,1 (b)         |
| 200P                        | 0,005 (a)            | 16,8 (a)                    | 4,3 (a)                      | 21,1 (a)            | 794 (a)           |

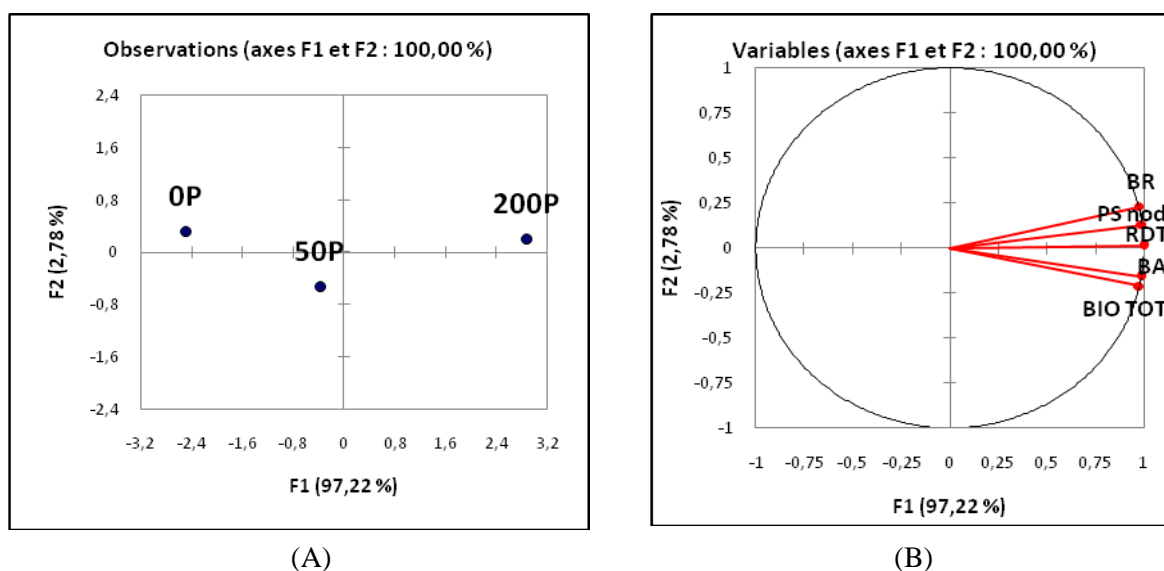
*Les données sur la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman Keuls ( $p < 5\%$ )*

L'apport de P à 200 kg/ha augmente significativement le poids de nodules et la biomasse totale. Le rendement le plus élevé (794 kg/ha) a été obtenu par l'apport de 200 kg/ha de phosphore.

Pour la variété RIL 115, l'apport de quantité de phosphore à 200 kg/ha affecte la production et le développement de la plante, et une différence significative est observée par rapport aux résultats obtenus dans des parcelles sans apport de P.

Les résultats de l'ACP effectués sur les trois niveaux d'apport de phosphore avec les 5 variables correspondantes sont résumés sur les figures 6(A) et 6(B). La projection du nuage de points sur le plan constitué par les deux axes F1 et F2 représente 100 % de l'inertie qui est une bonne approximation de la structure des données.

La projection des trois traitements suivant le premier axe factoriel F1 (97,22%) permet de séparer le traitement sans phosphore (0P) et à 50 kg/ha en abscisse négative avec celle à 200kg/ha de P en abscisse positive.



**Figure 6.** Variété RIL 115 : Projection des trois niveaux d'apport de phosphore (A) et cercle de corrélation (B).

(BA : Biomasse aérienne ; BIO TOT : Biomasse totale ; BR : Biomasse racinaire ; PSnod : Poids sec nodules ; RDT : Rendement ; 0P : 0 kg/ha de phosphore ; 50P : 50 kg/ha de phosphore ; 200P : 200 kg/ha de phosphore)

Le cercle de corrélation (figure 6B) permet de conclure que l'axe F1 est fortement corrélé aux variables relatives au développement des plantes de haricot (biomasses), la nodulation et le rendement. On peut retenir de cette ACP que l'apport de 200 kg/ha de P a eu un effet positif sur le rendement et le développement de la variété RIL 115. Etant une variété tolérante en carence en P, l'apport de P a donc fait augmenter le rendement et le développement de la plante.

## I.2. Influence de l'apport de P sur le nombre de nodule et sur le taux de mycorhization pour la variété RIL 115

Le tableau 4 montre les effets des doses de P sur le taux de mycorhization et le taux de nodulation de la variété RIL 115.

**Tableau 4.** Tableau représentant l'ANOVA de l'effet des différents niveaux de P sur le taux de nodulation et le taux de mycorhization de RIL 115

| Apport en P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg/ha) | Nombre de nodules | Taux de mycorhization (%) |
|---|-------------------|---------------------------|
| 0P  | 1,3 (c)           | 42,4 (a)                  |
| 50P   | 13,2 (b)          | 57,1 (a)                  |
| 200P  | 31,9 (a)          | 50,0 (a)                  |

*Les données sur la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman Keuls ( $p < 5\%$ )*

L'apport en phosphore à 200kg/ha s'avère efficace pour augmenter le nombre de nodules et permet d'avoir une différence significative par rapport au traitement sans P. Par contre l'apport 50 kg/ha ou 200 kg/ha de P n'a aucun effet sur le taux de mycorhization, aucune différence significative n'a été observée avec le traitement sans P.

Etant une variété tolérante en carence en phosphore, RIL 115 est affectée par l'apport en cet élément.

## I.3. Influence sur l'activité microbienne du sol de culture de la variété RIL 115

Le tableau 5 résume l'effet des différents niveaux de Phosphore sur les activités microbiennes du sol telles: mesure de FDA, mesure de l'activité phosphatasique du sol de culture de haricot RIL 115.

**Tableau 5.** Tableau représentant l'ANOVA de la variation des activités enzymatiques du sol de culture de la variété de haricot RIL 115 sous l'effet de l'apport en phosphore

| Quantité de Phosphore (kg/ha) | Activité microbienne globale (µg de fluorescéine/h/g de sol) | Phosphatase acide (µg de p-nitrophenol/h/g de sol) |
|-------------------------------|--|--|
| 0P                            | 22,5 (b)   | 130,7 (a)  |
| 50P                           | 27,9 (ab)  | 112,6 (a)  |
| 200P                          | 34,1 (a)   | 111,6 (a)  |

*Les données sur la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman Keuls ( $p < 5\%$ )*

Une différence significative a été observée sur les valeurs de FDA issues des trois apports en P. La valeur la plus élevée (34,1  $\mu\text{g/h/g}$  de sol) a été obtenue avec le traitement avec 200P. Alors que pour l'activité des phosphatases, il n'y a pas eu de différence significative entre les 3 niveaux d'apports.

## II. Influence de l'apport en phosphore sur la variété RIL 147

### II.1. Influence sur la nodulation, le développement de la plante et le rendement

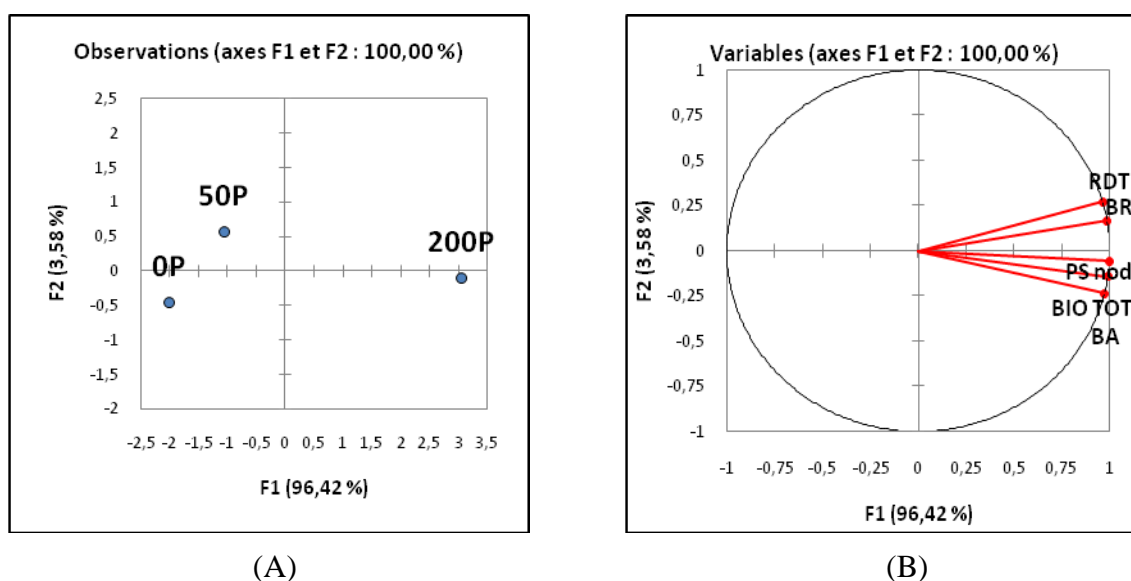
Le tableau 6 indique les résultats des trois différents apports en P sur les poids de nodules, le développement de la plante et sur le rendement. Une différence significative a été observée sur les valeurs du poids de nodules, de biomasse totale et de rendement; C'est l'apport en phosphore à 200 kg/ha qui a permis d'obtenir des valeurs les plus élevées avec 2,7 g pour la biomasse totale, et 417,1 kg/ha pour le rendement

**Tableau 6** Effet de différents apports en phosphore sur le développement et le rendement sur la variété RIL 147

| Apport en phosphore (kg/ha) | Poids sec nodule(g) | Biomasse aérienne (g) | Biomasse racinaire (g) | Biomasse totale (g) | Rendement (kg/ha) |
|-----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| 0P                          | 0,000 (b)           | 7,5 (b)               | 2,1 (b)                | 9,6 (b)             | 79,1 (c)          |
| 50P                         | 0,000 (b)           | 7,1 (b)               | 2,8 (ab)               | 9,9 (b)             | 196 (b)           |
| 200P                        | 0,001 (a)           | 13,3 (a)              | 3,7 (a)                | 16,9 (a)            | 417,1 (a)         |

*Les données sur la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman Keuls ( $p < 5\%$ )*

Les résultats de l'ACP effectués sur les différents apports avec les variables de croissance et de développement et de production sont illustrés sur la figure 7(A) et 7(B). La projection sur le plan factoriel F1×F2 représente 100% de l'inertie, ce qui indique une bonne approximation de la structure des données L'axe F1 à 96,42% oppose l'apport de phosphore (200 kg/ha) en abscisses positives aux autres traitements (0 et 50 kg/ha) en abscisses négatives (figure 7A).



**Figure 7** Variété RIL 147 : Projection des trois niveaux d'apport de phosphore (A) et cercle de corrélation (B).

(BA : Biomasse aérienne ; BIO TOT :Biomasse totale ; BR : Biomasse racinaire ; PSnod : Poids sec nodules ; RDT : Rendement ; 0P : 0 kg/ha de phosphore ; 50P : 50 kg/ha de phosphore ; 200P : 200 kg/ha de phosphore)

Le cercle de corrélation (figure 7B) permet également de conclure que l'axe F1 est fortement corrélé aux variables d'étude de développement et de la croissance de haricot, la nodulation ainsi que le rendement de culture. On peut en déduire que l'apport à 200 kg/ha de phosphore affecte plus le développement et la production du haricot de la variété RIL 147.

Etant une variété sensible en phosphore, RIL 147 a besoin d'une quantité assez élevée de phosphore pour avoir une bonne croissance et une production rentable.

## II.2. Influence de l'apport de P sur le nombre de nodule et sur le taux de mycorhization pour la variété RIL 147

L'apport à 200 kg/ha de phosphore s'avère efficace pour la nodulation, et une différence significative a été observée pour les trois traitements (tableau 7). Par contre pour le taux de mycorhization, les résultats ne présentent pas de différence significative.

Tableau 7. L'effet des différents niveaux de P sur le taux de nodulation et le taux de mycorhization de RIL 147

| Apport en P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg/ha) | Nombre de nodules | Taux de mycorhization (%) |
|---|-------------------|---------------------------|
| 0P  | 0,1 (b)           | 58,78 (a)                 |
| 50P   | 1,7 (b)           | 47,92 (a)                 |
| 200P  | 11,3 (a)          | 50,28 (a)                 |

*Les données sur la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman Keuls (p<5%)*

On peut en déduire que 200 kg/ha de phosphore sur le sol de culture de la variété RIL 147, affecte plus la nodulation que la mycorhization, étant donné qu'elle est sensible en carence en phosphore.

### II.3. Influence sur l'activité microbienne du sol de culture de haricot RIL 147

Le tableau 8 présente les effets des différentes quantités de phosphore sur la mesure de FDA et sur l'activité phosphatasique.

**Tableau 8.** Variation des activités enzymatiques du sol de culture de la variété RIL 147 sous l'effet de l'apport en phosphore

| Quantité de Phosphore (kg/ha) | Activité microbienne globale (µg de fluorescéine/h/g de sol) | Phosphatase acide (µg de p-nitrophenol/h/g de sol) |
|-------------------------------|--|--|
| 0P                            | 23,4 (b)   | 89,4 (a)   |
| 50P                           | 40,6 (a)   | 99,7 (a)   |
| 200P                          | 35,1 (a)   | 94,5 (a)   |

*Les données sur la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman Keuls (p<5%).*

L'apport de P à partir de 50 kg/ha favorise l'activité microbienne globale du sol. Une différence significative a été observée entre les traitements avec P et le témoin. Par contre, les niveaux différents de phosphore n'affectent pas l'activité phosphatasique.

RIL 147, étant une variété sensible en carence en phosphore, a besoin de quantité assez importante de phosphore pour ses activités microbiennes du sol.

### III. Influence de l'apport en phosphore en quantité variable sur la variété SOAFIANARANA

#### III.1. Influence sur la nodulation, le développement de la plante et le rendement

Le tableau 9 montre les résultats de l'ANOVA des trois (03) niveaux d'apport de P sur les poids de nodules, le développement de la plante et le rendement pour la variété SOAFIANARANA.

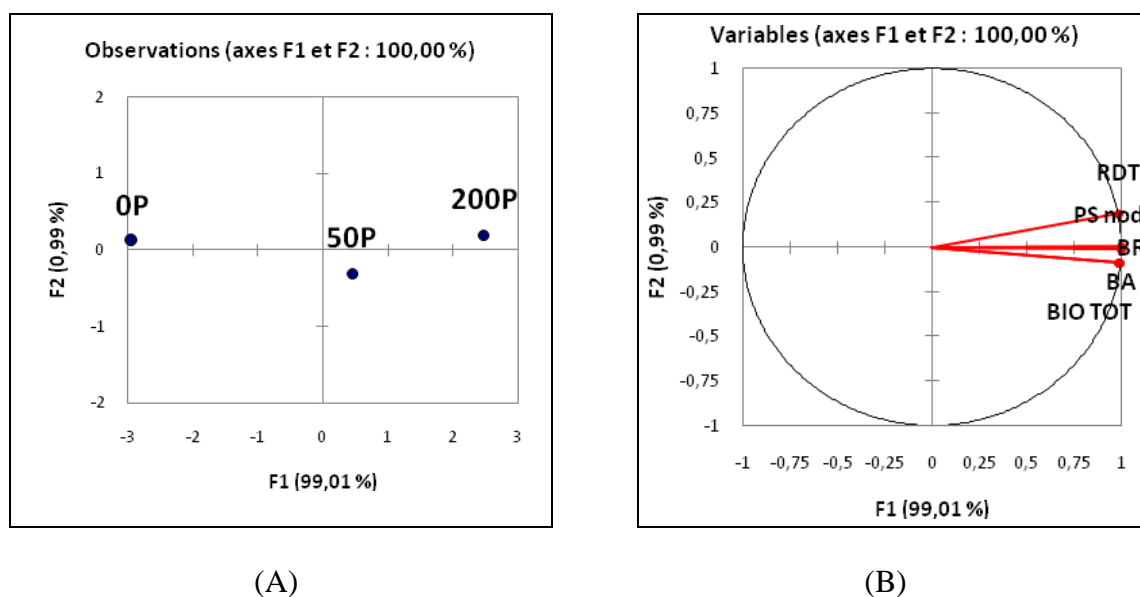
**Tableau 9.** Effet de la différence d'apport en phosphore sur le développement et la production de la plante de haricot SOAFIANARANA

| Apport en phosphore (kg/ha) | Poids sec nodule(g) | Biomasse aérienne (g) | Biomasse racinaire (g) | Biomasse totale (g) | Rendement (kg/ha) |
|-----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| 0P                          | 0,000 (b)           | 11,2 (b)              | 4,1 (a)                | 15,3 (b)            | 181,1 (c)         |
| 50P                         | 0,003 (a)           | 16,2 (ab)             | 4,8 (a)                | 21 (ab)             | 517,9 (b)         |
| 200P                        | 0,004 (a)           | 18,3 (a)              | 5,2 (a)                | 23,4 (a)            | 907,5 (a)         |

*Les données sur la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman Keuls ( $p < 5\%$ )*

Une différence significative a été observée sur les rendements obtenus. Le traitement avec 200P a permis d'obtenir un rendement presque double de celui 50P et quadruple du témoin 0P. On peut conclure que le traitement 200P agit sur le développement ainsi que sur la production de la variété SOAFIANARANA. Ainsi, pour le poids sec des nodules et les biomasses, une différence significative existe entre s'il y a apport en phosphore.

La projection des trois traitements suivant le premier axe factoriel F1 (99,01%) permet de séparer le traitement sans phosphore (0P) en abscisse négative et le traitement avec phosphore en particulier 200P en abscisse positive, d'après la figure (8B). La figure (8A) montre que tous les paramètres relatifs au développement de la plante ainsi que le rendement sont projetés en abscisses positives et sont corrélés à l'apport de 200 kg/ha de P.



**Figure 8** Variété SOAFIANARANA : Projection des trois niveaux d'apport de phosphore (A) et cercle de corrélation (B).

(BA : Biomasse aérienne ; BIO TOT : Biomasse totale ; BR : Biomasse racinaire ; PSnod : Poids sec nodules ; RDT : Rendement ; 0P : 0 kg/ha de phosphore ; 50P : 50 kg/ha de phosphore ; 200P : 200 kg/ha de phosphore)

L'apport en phosphore à une dose de 200 kg/ha favorise donc le développement et la production de SOAFIANARANA.

### III.2. Influence de l'apport de P sur le nombre de nodule et sur le taux de mycorhization pour la variété SOAFIANARANA

Le tableau 10 montre les effets des doses de P sur le taux de mycorhization et le taux de nodulation de la variété SOAFIANARANA.

**Tableau 10.** Influence de la quantité de phosphore apportée sur la nodulation et sur le taux de mycorhization de la variété SOAFIANARANA

| Apport en P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (kg/Ha) | Nombre de nodules | Taux de mycorhization (%) |
|---|-------------------|---------------------------|
| 0P  | 4,1 (b)           | 55,8 (a)                  |
| 50P   | 21,6 (a)          | 56,6 (a)                  |
| 200P  | 32,3 (a)          | 54,8 (a)                  |

*Les données sur la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman Keuls ( $p < 5\%$ )*

Les apports à partir de 50 kg/ha affectent plus l'accroissement des nodules. Par contre pour la mycorhization de la plante, les apports en phosphore de différentes quantités n'ont pas un effet car les valeurs ne présentent pas une différence significative.



Alors étant une variété sensible à la fertilité du sol, SOAFIARANA après apport en phosphore à 50 kg/ha est affectée pour sa nodulation et son taux de mycorhization.

### III.3. Influence sur l'activité microbienne du sol de culture de la variété SOAFIARANA

Le tableau 11 récapitule les résultats de l'effet de la quantité de phosphore sur les activités microbiennes et enzymatiques du sol de culture de SOAFIARANA.

**Tableau 11.** Influence de la quantité de phosphore apportée sur les activités enzymatiques du sol de culture de haricot SOAFIARANA

| Quantité de Phosphore<br>(kg/ha) | Activité microbienne globale<br>( $\mu\text{g}$ de fluorescéine/h/g de sol) | Phosphatase acide ( $\mu\text{g}$ de p-nitrophenol/h/g de sol) |
|----------------------------------|---|--|
| 0P                               | 41,2 (a)  | 120,7 (a)  |
| 50P                              | 35,4 (a)  | 151,9 (a)  |
| 200P                             | 34,3 (a)  | 133,7 (a)  |

*Les données sur la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman Keuls ( $p < 5\%$ )*

Aucune différence significative n'a été observée sur les résultats de FDA et sur les activités phosphatasiques du sol. On peut en déduire alors que pour la variété SOAFIARANA qui est sensible à la fertilité du sol, l'apport en phosphore n'affecte pas les activités microbiennes et enzymatiques du sol.

## IV. Influence des 3 niveaux de phosphore sur les activités microbiennes et la production des 3 variétés de haricot.

Le tableau 12 résume les effets de la différence d'apport de phosphore sur les paramètres d'étude des 3 variétés de haricot.

**Tableau 12.** Tableau récapitulatif des effets des différences de niveaux sur les paramètres des 3 variétés.

| Quantité de phosphore (kg/ha) | Paramètres d'étude      |                    |                       |                        |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
|                               | Croissance et Rendement | Taux de nodulation | Taux de mycorhization | Activités enzymatiques |
| 0                             | -                       | -                  | +                     | +                      |
| 50                            | +                       | +                  | ++                    | ++                     |
| 200                           | ++                      | ++                 | -                     | -                      |

- : Inefficace, + : Efficace, ++ : Très efficace

Les résultats révèlent que l'apport de 200 kg/ha de phosphore a favorisé la croissance, le rendement ainsi que la nodulation des 3 variétés de haricot. Ce niveau est donc le plus efficace par rapport aux 2 autres pour ces variables.

Par ailleurs, les activités enzymatiques et le taux de mycorhization sont diminués avec ce même niveau d'apport, mais se trouvent stimuler avec un apport de 50 g/ha de phosphore. Cet apport est donc le plus efficace pour influencer positivement ces paramètres d'étude.

# **DISCUSSION**

## DISCUSSION

L'objectif de ce travail a été de déterminer le niveau de fertilisation adéquat pour l'amélioration de la fertilité du sol de culture de haricot, de type ferrallitique caractérisé par une forte acidité et généralement une carence en phosphore. Afin d'améliorer et de modifier ces caractéristiques, des expériences ont été effectuées sur 3 variétés de haricot (RIL 115, RIL 147, *SOAFIANARANA*). Les apports en phosphore retenus ont été 0 kg/ha, 50 kg/ha, 200 kg/ha. Les études ont été focalisées sur le développement de la plante, la production, la nodulation, l'endomycorhization de la plante ainsi que les activités enzymatiques du sol de culture.

### Effets de l'apport en phosphore sur la croissance et la production des 3 variétés de haricot

D'après les résultats obtenus, il a été observé que pour les 3 variétés de haricot, l'apport en phosphore a raison de 200 kg/ha influence positivement le développement ainsi que la production de la plante. Les résultats ont démontré que la variété *SOAFIANARANA* a été la plus affectée par l'apport en phosphore à 200 kg/ha. Etant une variété sensible à la fertilité du sol, elle a été stimulée au niveau de sa croissance (23,4 g) et sa production (907,5 kg/ha). Ces résultats renforcent les constatations faites concernant la différence de réaction des deux variétés face à la variation de la teneur en l'apport de phosphore sur le sol de culture. En effet, il a été établi que la variété *SOAFIANARANA* est sensible à la fertilité du sol (**Andriamihaja 2013**).

Ces résultats sont imputables au type de sol de culture des 3 variétés, d'origine ferrallitique pour les trois sites. Sachant que ce dernier est un type de sol caractérisé par son acidité et sa faible disponibilité en phosphore (**Henintsoa, 2013**). De même, **Andriamaniraka (2009)** a affirmé que l'importance du phosphore dans la fertilisation des cultures peut être estimée à partir de son effet sur le rendement de la plante qui peut se manifester par le développement des organes de la plante. Un apport en phosphore en quantité suffisante est nécessaire. Dans le cadre de cette étude, 200 kg/ha ont été l'amendement adéquat. Par ailleurs, **Kedi et al. (2011)** ont confirmé que la déficience en phosphore induit une réduction de la croissance, de la taille et du nombre des fleurs d'où l'abaissement de la productivité des plantes. **UNIFA (2005)** a rapporté que la fertilisation phosphatée a pour objectif de satisfaire les besoins en phosphore de la plante selon les objectifs de rendement et de qualité, et donc de compléter l'offre du sol en maintenant son potentiel de production.

**Randriamboavonjy *et al.* (2013)** ont également mentionné que face à la faible productivité des sols ferrallitiques caractérisés par une acidité élevée et une faible capacité d'échange et de stockage d'éléments minéraux, des études de fertilisations adaptées, utilisant en particulier les ressources locales s'avèrent nécessaires pour un meilleur rendement agricole. Les besoins de la plante en phosphate sont en petite quantité mais sa présence est importante dès le stade plantule. Il favorise un enracinement solide et participe à la croissance de la plante (**Schiffers, 2011**).

En effet, bien que le phosphore soit important pour les végétaux, son excès entrainerait une croissance végétative exagérée.

### **Influence du niveau de phosphore apporté sur la nodulation et la mycorhization de la plante**

Les deux paramètres d'étude sont issus de deux types de symbioses distinctes : la nodulation dérive de la symbiose entre le rhizobium et les racines de la plante, et la mycorhization provient de la symbiose entre un champignon mycorhizien et les racines d'une plante hôte. Généralement, l'établissement de ces symbioses se font dans la rhizosphère, dont les acteurs principaux qui interviennent sont les racines, le sol rhizosphérique, les *Rhizobia* ou les champignons mycorhiziens.

Les résultats ont révélé que l'apport en phosphore à 200 kg/ha a favorisé positivement la nodulation des 3 variétés de haricots étudiés et la valeur la plus élevée en taux de nodulation a été enregistrée avec la variété SOAFIANARANA. Par contre, l'apport de 50kg/ha de P a amélioré significativement le taux de mycorhization des 3 variétés. Les résultats supposent qu'à une quantité élevée de phosphore correspond une valeur élevée de la nodulation. Ceci pourrait être dû au rôle du phosphore pour la plante. **Salisbury & Ross (1992)** ont noté que le phosphore est l'un des principaux nutriments dont les plantes ont besoin à travers tout leur cycle de développement. La symbiose entre la plante et les bactéries nodulant les Légumineuses peut se faire si et seulement si la plante aurait tous les éléments nécessaires pour son développement et sa croissance et parmi ces éléments sont les phosphores. Selon **Graham & Rosas (1979)**, chez le haricot, la concentration en P est très importante pour la formation des nodules. De même, **Ndéye (2002)** a affirmé aussi que la formation des nodules est très sensible à la concentration de phosphore dans le sol.

Par contre les transports de phosphores du milieu extra-racinaire sont favorisés par les mycorhizes des racines. Aussi **Weill et Duval (2009)** ont affirmé que les filaments des racines

permettent de chercher les éléments nutritifs à une distance de quelques millimètres seulement aux environs de la surface racinaire, alors que les mycorhizes grâce aux hyphes fongiques leur permettent d'aller chercher jusqu'à une distance qui peut aller jusqu'à 1m. Ce qui augmente la surface d'absorption des nutriments. Selon **Plénet *et al.* (2000)**, parmi les interactions les plus connues, on peut citer alors celle entre la disponibilité du P du sol et la croissance de la culture. Quelle que soit l'intervention des mycorhizes sur l'absorption des éléments minéraux disponibles dans le sol, les quantités élevées en phosphore diminuent le taux de mycorhization de la plante (**Piererat, 2012**). D'après résultats, avec un apport de P de 200 kg/ha, les taux de mycorhization ne sont pas proportionnels aux taux de nodulation. Avec un taux élevé de phosphore, l'établissement de l'association mycorhizienne a été inhibée (**Weill et Duval ; 2009**). L'apport d'une importante quantité de phosphore a diminué le taux de mycorhization de la plante de haricot. Même si l'apport de phosphore peut améliorer le sol de culture à faible disponibilité de phosphore, il faut bien doser pour que la capacité à mycorhizer les racines ne soit pas affectée. Par ailleurs, **Bouvier (2012)** a affirmé que l'excès de la quantité de phosphore apportée risque d'inhiber les mycorhizes du sol et peut causer une pollution de la nappe phréatique et de l'eau. Il est bien connu que la mycorhization est affectée négativement par la présence de phosphate en abondance dans le milieu (**Branscheid *et al.*, 2010**).

Par conséquent, le phosphore est le plus fréquent ou même le premier facteur limitant pour la croissance et le développement des plantes (**Vance *et al.*, 2003**). Les Fabacées ne supportent généralement pas des terres trop riches d'après **Agrobio (2012)**.

On peut dire que la nodulation ainsi que la mycorhization interviennent en même temps dans le phénomène d'absorption des éléments nutritifs pour la plante. La différence est la nodulation qui assure la fixation d'azote atmosphérique que les plantes non-Légumineuses ne peuvent pas absorber. Les nodules emmagasinent ces azotes pour les besoins de la plante. Alors on peut en déduire que seul l'azote atmosphérique est mis en évidence dans la nodulation. Quant à la mycorhization, c'est un phénomène qui peut améliorer l'absorption de l'eau et des éléments nutritifs pour la plante sans spécificité d'éléments. D'après **ITAB (2002)**, la mycorhization des racines améliore l'alimentation hydrique et minérale de la plante.

## Effet de l'apport en quantité différente de phosphore sur les activités phosphatasiques et l'activité microbienne globale du sol de culture des 3 variétés de haricots d'étude

La présence d'activités ou de synthèses d'enzymes signifie que le sol présente dans son contenu des activités d'êtres vivants. La présence de l'activité d'êtres vivants dans le sol se traduit par la synthèse de toutes sortes d'enzymes **ITAB (2002)**. Les deux activités étudiées sont classées dans les groupes des enzymes hydrolases. La différence est que l'hydrolyse de la FDA permet une mesure plus globale de l'activité enzymatique microbienne.

Conformément aux résultats obtenus, c'est à la dose 0 kg/ha de phosphore que l'activité microbienne globale est la plus élevée (41,2 µg/h/g de sol), pour la variété SOAFIANARANA. En outre, l'activité phosphatasique des sols la plus élevée (151,9 µg/h/g de sol) a été obtenue pour la même variété avec un niveau de phosphore de 50 kg/ha.

Ces résultats suggèrent que l'activité microbienne globale est favorisée à faible apport en phosphore et que l'activité phosphatasique à un niveau assez élevé de l'apport. Ces résultats sont dus au pH du sol. Comme le cas de l'hydrolyse de FDA qui est pratiquée à pH 7,6, quel que soit le pH initial du sol étudié. D'ailleurs, **Chantelot (2002)** a affirmé que les activités enzymatiques sont souvent pratiquées dans des conditions standard qui ne sont pas forcément celles régnant *in situ*.

Concernant l'activité phosphatasique, l'apport en quantité considérable de P diminue le taux de para-nitrophénols produits. C'est dû, en premier lieu par la formation de l'enzyme. **ITAB (2002)** a mentionné que les activités phosphatase (phosphatase acide, phosphatase alcaline) séparent l'ion ortho-phosphate d'une molécule organique. La synthèse de l'enzyme est inhibée par l'ion orthophosphate ce qui désigne que l'activité est donc dépendante de la concentration en ions  $PO_4^{4-}$  dans le sol. Un apport d'engrais phosphatés entraînera une diminution de cette activité, ce qui est le cas. Les résultats obtenus suggèrent donc qu'il y a eu un effet substrat. En second lieu, c'est dû au fait du pH du sol, car à 200 kg/ha de phosphore, le pH augmente et l'activité phosphatasique sera inhibée. **Chunderova (1970)** a apporté que l'activité phosphatasique acide diminue lorsque le pH du sol augmente.

Dans le cadre de cette étude, les expériences sur l'activité phosphatasique acide ont été retenues car les localités d'étude présentent un sol très acide de type ferralitique. De plus **Eivazi & Tabatabai (1977)** ont confirmé que l'activité acide est prédominante dans les sols acides et l'activité basique dans les sols basiques. De même, **Tena et al., (1981)** ont réaffirmé que c'est le pH d'un sol qui détermine le type d'activité, acide ou basique. Ceci a permis de

considérer que beaucoup de causes probables peuvent modifier les résultats, **Bergstrom et al., (1998)** ont rappelé qu'historiquement les mesures d'activités enzymatiques se pratiquaient sur des échantillons de sol séchés à l'air. Mais le séchage et les modalités de conservation des échantillons entre prélèvement au champ et mesure au laboratoire peuvent affecter les résultats.



# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats dans cette étude révèlent que les 3 variétés de haricot (RIL 115, RIL 147 et SOAFIANARANA) ont un comportement presque égal car c'est l'apport à 200P qui a le plus affecté les paramètres d'étude pour les 3 variétés. Les résultats obtenus suggèrent donc que l'ajout de phosphore à partir de 50kg/ha dans le sol de culture influence la production. Le rôle du phosphore dans la croissance de la plante a été mis en évidence par ces expérimentations. Nous pouvons en tirer aussi que l'amendement du sol en phosphore affecte en général les paramètres retenus. En d'autres termes, l'apport de P a amélioré, à la fois, la qualité microbiologique des sols et le rendement de production. Cette qualité va persister même si on n'apporte pas des inoculants pour la culture suivante.

D'après les résultats, les hypothèses avancées ont été vérifiées. L'analyse des résultats nous a permis d'apprécier les rôles et l'importance de la symbiose Rhizobium-Légumineuses et de la symbiose Plante-Mycorhize. On a pu constater que la symbiose Rhizobium-Légumineuse joue un rôle important dans la nutrition azotée des plantes, caractérisée par l'existence des nodules sur les racines qui stockent l'azote assimilable pour la plante. De même, la symbiose Plante-Mycorhize a fait augmenter la surface d'absorption de l'eau et des éléments nutritifs nécessaire à la croissance et au développement de la plante. Vu ces résultats, on pourrait en déduire que les activités microbiennes d'un sol sont corrélées avec son contenu en phosphore.

En outre, cette étude confirme qu'un apport en phosphore est indispensable et recommandable pour améliorer la qualité de sol de type ferrallitique de la région de Vakinakaratra, en tenant compte des quantités à apporter, ainsi l'amélioration de la production s'ensuit. D'ailleurs, seule une petite fraction du phosphore apporté et présent dans le sol est susceptible d'être absorbée par les racines et participe à la nutrition des cultures. Cette fraction est d'une importance capitale pour la plante et elle représente le phosphore biodisponible ; en d'autres termes, elle conditionne la fertilité du sol de culture.

Cette étude nous a permis aussi d'améliorer les connaissances et de se familiariser avec les outils et matériels utilisés au laboratoire de microbiologie du sol et de l'environnement.

Par ailleurs, il est essentiel de sauvegarder la flore fongique et sa diversité car elles contribuent en plus grande partie dans l'absorption des éléments nutritifs et augmentent la résistance des plantes au stress.

De ces résultats, nous recommandons que d'autres études soient conduites :

- Etude des paramètres qui pourront compléter les informations déjà obtenues tels : Phosphatase basique, test pour mettre en évidence les bactéries solubilisatrices de phosphate, l'étude du Potentiel Infectio-Mycorhyzien ou PIM...
- Mise en œuvre de programme de suivi sur plusieurs années au niveau des parcelles afin de vérifier l'effet des améliorations apportées,
- Etude des effets de l'apport en phosphore sur le fonctionnement microbien du sol avec d'autres variétés de haricots ayant des tolérances ou sensibilités sur d'autres éléments nutritifs, ou avec d'autres types de sol,
- Etude de la combinaison de l'apport de phosphore avec l'inoculation microbienne et/ou l'inoculation de mycorhize,
- Etude des effets des apports d'autres éléments majeurs tels les engrais potassiques et/ou azotés sur le fonctionnement microbien et la structure du sol.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdoulaye, T., 2003.** *In vitro* culture of arbuscular mycorrhizal fungi: advances and future prospects. *African Journal of Biotechnology*, **2 (12)** : 692-697.
- Agrobio, 2012.** La production de semences de Fabacées. Bio d'Aquitaine: 1-6.
- Aguiar, J., Franklin, L., Aziz, B. & Keith, S.M., 1999.** Snap Bean Production in California. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 7240.
- Andriamanazaoro, 2014.** Exportation – Les haricots répondent aux normes. *in EXPRESS de Madagascar*.
- Andriamaniraka, J.H., Juin 2009.** Etude et modélisation de la biodisponibilité du phosphore dans un sol cultivé de Madagascar en fonction des pratiques culturales. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Université d'Antananarivo, Madagascar. 145p.
- Andriamihaja, D.J., 2013.** Détermination de la capacité de nodulation de quelques lignés du haricot cas du Moyen Ouest de Madagascar. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du grade Master 2. Mention : Sciences Agronomiques. Athénée Saint Joseph Antsirabe, Madagascar. 35p.
- Arrivets, J., 1998.** Réflexion sur la fertilité des sols à Madagascar. CIRAD-CA Programme Cultures Alimentaires D'après aide mémoire d'une mission effectuée pour le Centre d'investissement de la FAO.
- Bado, B.V., 2002.** Rôle des Légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones Guinéenne et Soudanienne du Burkina Faso. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor*. Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval Québec. 148p.
- Bâ, A., Duponnois, R., Diabaté, M., Dreyfus, B., 2011.** Les champignons ectomycorhiziens des arbres forestiers de l'Afrique de l'Ouest. IRD Editions, Marseille. 200p.
- Bado, B.V., Sedogo, M.P., Cescas, M.P, Lompo, F. et Bationo, A., 1997.** Effet à long terme des fumures sur le sol et les rendements du maïs au Burkina Faso. *Cahiers Agricultures*, **6 (6)**: 571-575.
- Balachandar, D., Raja, P., Kumar, K. and Sundaram, SP., 2007.** NonRhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, **2(2)**: 049-057.
- Balesdent, J., 1998.** Les biotransformations du carbone et de l'azote. *In* : Sol : interface fragile, Edition INRA. pp. 67-82.
- Balergue, C. 2012.** Régulation de la symbiose endomycorhizienne par le phosphate. Doctorat de l'Université de Toulouse, France. 115p.
- Béreau, M., Louisanna, E., Agnès de Grandcourt, Garbaye, J., 2003.** Symbiose mycorhizienne et nutrition minérale. *Revue Forestière Française*, **55** : 74-83.
- Berger, M., Belem, P. C., Dakouo, D. et Hien, V., 1987.** Le maintien de la fertilité des sols dans l'Ouest du Burkina Faso et la nécessité de l'association agriculture-élevage. *Revue Coton et Fibres tropicales*, **62(3)** : 10p.
- Bergstrom, D.W., Monreal, C.M. and King, D.J., 1998.** Sensitivity of soil enzyme activities to conservation practices. *Soil Science Society of America Journal*, **62**: 1286-1295.

- Boddey, R.M., Peoples, M.B., Palmer, B., Dart, P.J., 2000.** The use of <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **57** : 235-270.
- Bouché, M., 2012.** Les Légumineuses. Formations à la production de semences maraîchères. Nature et Progrès/Semailles : 1-6.
- Bourgeat, F., 1970.** Contribution à l'étude des sols sur socle ancien à Madagascar. Types de différenciation et interprétation chronologique au cours du quaternaire. Thèse Strasbourg, Publ. prov. Ronéo O.R.S.T.O.M., 310p.
- Bourgeat, F. et Aubert, T.G., 1971.** Les sols ferrallitiques à Madagascar. O.R.S.T.O.M. Madagascar. 31p.
- Bouvier, E., 2012.** Adapter les apports organiques au sol. Maison des Agriculteurs, Provence, France. *Matières organiques*, fiche n°3 : 1-8.
- Branscheid, A., Sieh, D., Pant, B.D., May, P., Devers, E.A., Elkrog, A., Schauser, L., Scheible, W.R., Krajinski, F., 2010.** Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **23** : 915–926.
- CDAQ, 2005.** Quelques notions de fertilisation. Longueuil Québec : 1-46.
- Chancelot, E., 2002.** L'activité biologique des sols. Méthodes d'évaluation : 1-4 [Disponible sur : [www.itab.asso.fr](http://www.itab.asso.fr) (consulté le 20 Mai 2014)].
- Choulnard, P., Massicole, D., 2000.** Besoins en fertilisation des cultures : comment les déterminer ? Quebec. Module 4- Fertilisation, Feuillet 4-B: 1-14.
- Chunderova, A.N., 1970.** Enzyme activity and pH soil. *Soviet Soil Science*, **3** : 167-172.
- CIRAD, 2002.** Memento de l'agronome. Ministère des affaires étrangères, France. 1691p.
- D'Haeze, W. & Holster, M., 2002.** Nod factor structure, response and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, **12** : 79-105.
- De Prado, R., Tena, M. et Pinilla, J.A., 1982.** Relation entre la teneur en matière organique et les activités phosphatasiques de différents sols. *Agronomie*, **2 (6)** : 539-544.
- Deslauriers, G., 2014.** Méta-analyse d'essais de fertilisation N, P et K sur le haricot et le pois. Université Maitrise en sols et environnement LAVAL, Québec. 59p.
- Diaz-Zorita, M., Grove, J.H., Murdock, L., Herbeck, J. & Perfect, E., 2004.** Soil Structural Disturbance Effects on Crop Yields and Soil Properties in a No-Till Production *System Agronomy Journal*, **96** : 1651-1659.
- Directions de l'aménagement des terres, 2001.** Guide de fertilisation des cultures. Canada. 20p.
- Drevon, J.J., 1991.** Bacterial acid phosphatase activity and localization in *Phaseolus vulgaris* nodules. INRA, UMR Eco&Sols, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France.
- Egli, S. et Brunner, I., 2002.** Les mycorhizes. Une fascinante biocénose en forêt. Allemagne. *Notice pour le praticien*, **38** :1-8.
- Eivazi, F. & Tabatabai, M.A., 1977.** Phosphatas in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **9** : 167-172.
- Elalaoui, A.C., 2007.** Fertilisation Minérale des cultures. Les éléments minéraux secondaires et les oligo-éléments. Meknès, Maroc. *Transfert de Technologie en Agriculture*, **156** :1-4.
- FAO, 2004.** Glossaire de la gestion intégrée des éléments nutritifs. Rome.

- Feller, C., Frossard, E. et Brossard, M., 1993.** Activités phosphatasiques de quelques sols tropicaux à argile. ORSTOM, 34032 Montpellier, France:121-129.
- Frank, B., 1889.** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **7**: 332–346.
- Gepts, P. and Debouck, D., 1991.** *Origin, domestication and evolution of the common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. In Common bean : Research for crop improvement. Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia. A Van Shoonhoven & O voysest Eds. C. A. B International: 7-53.
- Germon, J.C., 2013.** Quelques apports de la microbiologie des sols à l'agronomie et au développement des plantes cultivées. INRA Agroécologie Dijon, France.1-15.
- Gonzalez, P.L., Bonifas, L., Escouffier, Y. et Sabatier, R., 1984.** Choix de variables en analyse en composantes principales. *Revue de statistique appliquée*, **32(2)** : 5-15.
- Graham, P.H. and Rosas, J.C., 1979.** Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. *Agronomy Journal*, **71**: 925-926.
- Graham, P.H. et VANCE, C.P., 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, **131**: 872-877.
- Helme,G.A. & Selosse M.A., 2010.** Coloration des mycorhizes. *Biologie Géologie*, **4** : 1-6.
- Henintsoa, M., 2013.** Disponibilité et dynamique du carbone, de l'azote et du phosphore sous association culturale Riz-Haricot soumise à différents types de fertilisation phosphatée apportée à dose croissante. Cas de l'expérimentation agronomique de Lazaina sur sol ferrallitique de « tanety» .Mémoire de DEA, Département des eaux et forêts. Université d'Antananarivo, Madagascar. 57p.
- Hoffmann, E. & Seegerer, A., 1951.** Soil enzymes as factors of fertility. *Naturwissenschaften*, **38**:141-142.
- Hocking, J.P., Randall, P.J., Delhaize, E., Keerthisinghe, G., 2000.** The role of organic acids exuded from roots in phosphorus nutrition. In Management and conservation of tropical acid soils for sustainable crop production. Processing of a consultants meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna: 61-70.
- Huber, G. & Schaub, C., 2011.** La fertilité des sols : l'importance de la matière organique. Chambre d'agriculture Bas-Rhin. 41p.
- Hubert, P., 1978.** Recueil de fiches techniques d'agriculture spéciale à l'usage des lycées agricoles à Madagascar. Antananarivo, BDPA.
- ITAB, 2002.** Activités biologiques et fertilité des sols. Intérêts et limites des méthodes analytiques disponibles. 149 rue de Bercy 75595 Paris. Première édition : 1-24.
- Karaboney, F., 2013.** Caractérisation de l'efficacité symbiotique de lignées africaines de soya à haute promiscuité. Université Laval. Québec.
- Katznelson, H., Rouatt, J.W., Peterson, E.A, 1962.** The rhizosphere effect of mycorrhizal and non mycorrhizal roots of yellow birch seedlings. *Canadian Journal of Botany*, **40**: 337-382.
- Kedi, A.B.B., Staunton, S. , Quiquampoix, H., 2011.** Fonctionnement des phosphatases dans les sols tropicaux: influence de la composition organo-minérale sur l'expression de l'activité enzymatique .Mémoire Doctorat Ecosystèmes. Université de COCODY, Abidjan. 138p.

- Kowthar, G.E., Magdi, T.A., Samia, A.E., 2013.** Physiological response of purslane weed (*Portulaca oleracea*) and two common beans (*Phaseolus vulgaris*) recombinant inbred lines to Phosphorus fertilizer and bentazon herbicide. *Journal of Applied Sciences Research. Botany Department, National Research Centre, 33 Al Behoos Street, Dokki 12622, Cairo, Egypt* **9(4):** 2743-2749.
- Le Lan, M., 2012.** Intérêts de la mycorhization pour différentes cultures d'hiver et d'été. Morbihan, Belgique. *Chambre d'Agriculture*, **56:** 1-10.
- Leclerc, N., 2012.** Amélioration de la technique d'enrobage de graines d'espèces endémiques avec des spores de champignons mycorhiziens pour la revégétalisation de sites miniers par hydroseeding. Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage Spécialisé en Gestion Durable du Végétal en Horticulture et aménagement paysager. Nouvelle Calédonie. 47p.
- Lindemann, W.C. & Glover, C.R., 1990.** Nitrogen Fixation by Legumes. [Disponible sur: <http://www.csun.edu/~hcbio027/biotechnology/lec10/lindemann.html> (consultée le 15 Septembre 2014)].
- Marschner, 1991.** Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil*, **134:** 1-20.
- Marx, D.H., Hatch, A.B., et Mendicino, J.F., 1977.** High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany*, **55:** 1569-1574.
- Mbengue, M., 2010.** Perception et transduction du signal bactérien facteur Nod dans l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse : recherche et caractérisation de partenaires du LysM-RLK LYK3, un récepteur putatif des facteurs Nod chez *Medicago truncatula*.. Doctorat en Biosciences Végétales. Université de Toulouse. 128p.
- Morel, C., Le Clech, B., Linères, M. et Pellerin, S., 2006.** Gare à la baisse de la biodisponibilité du phosphore. *Alternative Agriculture*, **79:** 21-23.
- Moughli, L., 2000.** Les engrais minéraux. Caractéristiques et utilisations. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. *Transfert de technologie en agriculture*, **72:**1-4.
- Moureaux, Cl., 1973.** Cours de Microbiologie du sol. O.R.S.T.O.M : 1-24.
- Nassr, N., 2012.** Rôle de la vie microbienne du sol, les stratégies d'application aux cultures hors-sol. Astrechor. Journées techniques: 1-29.
- Ndéye, F., 2002.** Utilisations des inoculum de rhizobium pour la culture des haricots (*Phaseolus vulgaris*) au Sénégal. Diplôme pour l'obtention du grade de Docteur du 3<sup>è</sup> cycle de Biologie Végétale. Université CHEIKH ANTA DIOP, Sénégal. Dakar. 83p.
- Ndoye, I., 1990.** Contribution à l'étude de la symbiose entre *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Sesbania rostrata*. Docteur de l'USTL. Spécialité: microbiologie. Université des Sciences et techniques de Lille. 132p.
- Nicholardot, B., Chaussod, R. et Catroux, G., 2010.** Revue des principales méthodes disponibles pour mesurer la biomasse microbienne et ses activités. Association Française pour l'Etude du Sol, Laboratoire de Microbiologie des sols. I.N.R.A : 253-261.
- Niggli, U., 2009.** Projet d'une plate-forme technologique européenne sur l'agriculture biologique : Une vision pour la recherche en agriculture biologique à l'horizon 2025. Innovations agronomiques. Institut de recherche de l'agriculture biologique (FiBL), 5070 Frick Suisse. **4** : 473-482.



- Nyembo, K.L., Useni, S.Y., Mpundu, M.M., Bugeme, M.D., Kasongo, L.E., Baboy, L.L., 2012.** Effets des apports des doses variées de fertilisants inorganiques (NPKS et Urée) sur le rendement et la rentabilité économique de nouvelles variétés de *Zea mays* L. à Lubumbashi, Sud-Est de la RD Congo. *Journal of Applied Biosciences*, **59**: 4286-4296.
- Oorts, K., 2006.** Effect of tillage system on soil organic matter stocks and C and N fluxes in cereal cropping systems on a silt loam soil in Northern France. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris. 142p.
- Ott, T., van Dongen, J.T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M.K., 2005.** Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology*, **15**: 531-535.
- Patriarca, E.J., Tatè, R., Ferraioli, S. et Iaccarino, M., 2004.** Organogenesis of legume root nodules. *International Review of Cytology*, **234**: 201-262.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 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*, **55**: 158-161.
- Pichot, J., Sédogo, M. P. et Poulain, J.F., 1981.** Évolution de la fertilité d'un sol ferrugineux tropical sous l'influence des fumures minérales et organiques. *Agronomie Tropicale*, **36**: 122-133.
- Pierart, 2012.** Interactions entre mycorrhization, nutrition en phosphore et adaptation de la plante à la toxicité du nickel sur substrat ultramafique Vers une optimisation de la Mycorrhization d'*Alphitonia neocaledonica*. Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage. Université de la Nouvelle-Calédonie. 34p.
- Pieri, C., 1989.** Fertilité des terres de savane. Bilan de 30 années de recherche et de développement agricoles au sud du Sahara. Agridoc-International Paris. 444p.
- Plenet, D., Etchebest, S., Mollier, A. and Pellerin, S., 2000.** Growth analysis of maize field crops under phosphorus deficiency. I. *Leaf growth*. *Plant & Soil*, **223**: 113-130.
- Polese, J.M., 2006.** La culture des haricots et des pois. Artémis éditions, Paris, France.
- Rabenandrianina, R., 2003.** L'agriculture et l'environnement à Madagascar. Université d'Antananarivo, Madagascar. Filière : Economie. Mémoire de Maitrise. 46p.
- Rahajaharitombo, R. L., 2004.** Gestion de la fertilité et de la fertilisation phosphatée des sols ferrallitiques des Hautes Terres de Madagascar. Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences, Département Biologie et Ecologie Végétales. Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences Naturelles. 172p.
- Rajaonarimamy, E. 2010.** Influence de la diversité mycorrhizienne sur la Symbiose *Dalbergia trichocarpa-Rhizobia* et sur la Structure de la microflore tellurique. Mémoire pour l'obtention de diplôme d'études approfondies En sciences de la vie Option : biotechnologie-microbiologie, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo, Madagascar. 52p.
- Randriamboavonjy, J.C., Randrianja, R. et Ramboazanaka, M., 2013.** Recherche en vue de l'amélioration de la productivité des sols et des rendements de récolte sur les hautes terres centrales de Madagascar par la fertilisation et l'amendement avec des broyats de roches. *Madamines*, **5** : 13-24.

- Rasamiarivelo, A.V., 2014.** Partage des éléments nutritifs entre deux espèces végétales par l'intermédiaire des symbiotes fongiques et rhizobiens dans un système de culture riz pluvial-haricot sur les Hautes Terres malgaches. Mémoire de DEA en Sciences de la Vie Option Biotechnologie-Microbiologie, Université d'Antananarivo, Madagascar.52p.
- Rasatandrianombana, N.A., 2014.** Effet de la fertilisation du sol sur la dynamique des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote et des champignons endomycorhiziens. Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences, Mémoire de DEA en Sciences de la Vie, Option : Biotechnologie-Microbiologie.38p.
- Razafindramiadana, L., 2014.** Filière haricot – La médiocrité de la qualité reste un gros handicap. Actualités Economie. in *EXPRESS de Madagascar*.
- Riquier, J., 1966.** Les sols ferrallitiques de Madagascar. O.R.S.T.O.M FAO, Rome.75-88.
- Ritchie, J.T. & Amato, M. 2002.** Spatial distribution of roots and water uptake of maize as affected by soil structure. *Crop Science*, **42** : 773-780.
- Robert, L., 2011.** Le phosphore dans le sol : comprendre comment ça fonctionne. Agriculture, Pêcheries et Alimentation. Québec. 1-43.
- Rojo, M.J., Garcedo, S.G. et Mateos, M.P., 1990.** Distribution and characterization of phosphatase and organic phosphorus in soils fractions. *Soil Biology & Biochemistry*, **22**: 169-174.
- Salisbury, F.B. & Ross, C.W., 1992.** Plant physiology. *Wadsworth Publishing, Belmont, CA*, **4**: 116-129.
- Sarasin, G., 2011** Biotechnologie des symbioses racinaires en restauration écologique des écosystèmes dégradés à Madagascar. Mémoire dans le cadre du programme de maîtrise en Agroforesterie pour l'obtention du grade de maître ès sciences Université Laval, Québec, 75p.
- Saoudi, M., 2008.** Mémoire de Magister : Génétique et Amélioration des plantes. Option : Génomique et Techniques Avancées des Végétaux. Université Mentouri de Constantine, Algérie. 73p.
- Schachtman, D.P., Reid, J.R. and Ayling, S.M., 1998.** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology*, **116**: 447-453.
- Schiffers, B., 2011.** Itinéraire technique Haricot vert (*Phaseolus vulgaris*). Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. 93p.
- Schnurer, J., Rosswall, T., 1982.** Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, **6**: 1256-1261.
- Seddas, P.M.A., Arias, C.M., Arnould, C., van Tuinen, D., Godfroy, O., Benhassou, H.A., Gouzy, J., Morandi, D., Dessaint, F., Gianinazzi, P.V., 2009.** Symbiosis-related plant genes modulate molecular responses in an arbuscularmycorrhizal fungus during early rootinteractions. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, **22**: 341–51.
- Simier, M., 1998.** Analyse des données multivariées. ORSTOM, Montpellier, Laboratoire HEA et Cellule de Biométrie et Statistique. 20p.
- Sirttori, G. & Boffelli, E., 2007.** Haricots et Petits Pois. Culture, Soins, Conseils pratiques. De Vecchi, Paris, France.

- Soltner, D., 1988.** Les bases de la production végétale. Sciences et Techniques agricoles. Angers, France. *Le sol.*, **1(16)**: 1-168.
- Stacey, G., Libault, M., Brechenmacher, L., Wan, J. et May, G.D., 2006** - Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opin Plant Biology*, **9**: 110-121.
- Tabatabai, M.A. & Bremner, J.M., 1969.** Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology & Biochemistry*, **1**: 301-307.
- Tabatabai, M.A., 1982.** Soils enzymes .In A. L. Page, R. H. Miller et D. R. Keeney (éd.): *Methods of Soil Analysis*. Part 2: *Chemical and microbiological properties*, **9(2)**: 903-942.
- Thomson, B.D., Robson, A.D., Abbott, L.K., 1991.** Soil mediated effects of phosphorus supply on the formation of mycorrhizas by *Scutellisporacalospora* (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders on subterranean clover. *New Phytologist*, **118** : 463-469.
- UNIFA, Edition 2005.** Principaux éléments fertilisants. Parlons fertilisations : 1-6.
- UNILET.** Union Nat interprofessionnelle des Légumes Transformés. Alésia, Paris. [Disponible sur : <http://www.unilet.fr/cultures/haricots/haricots.php?page=Plantes> (Consulté le 15 Décembre 2014)].
- USDA, 2014.** Natural resources Conservation service. [Disponible sur: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=PHVU&display=31>(Consulté le 11 Décembre 2014)].
- Vance, C.P., Uhde, S.C., Allan, D.L., 2003.** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, **157**: 423-447.
- Velde, B. & Barré, P., 2010.** Soils, plants and clay minerals: mineral and biologic interaction. Springer, Berlin : 171-264.
- Walker, V.M., 2010.** Impact de l'inoculation de microorganismes phytobénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zeamays* L. Ecole doctorale évolution, écosystèmes microbiologie modélisation. Université Claude Bernard Lyon. 146p.
- Weill, A. et Duval, J., 2009.** Les fertilisants autres que les fumiers et les composts. Guide de gestion globale de la ferme maraîchère biologique et diversifiée. In: Amendement et fertilisation, Module 7, Chap 13: 1-8.
- Werner, D., 1992** .Symbiosis of plants and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*. Acad sin: 39.
- Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet, M., Gillis, M., Dreyfus, B., and de Lajudie, P., 2004.** Characterisation of wild legumes nodulating bacteria(LNB). In the infrared zone of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**: 143-153.
- Zimmermann, P., 2003.** Root-secreted phosphomonoesterases mobilizing phosphorus from rhizosphere. A molecular physiological study in *Solanum tuberosum*. A dissertation submitted to the Swiss Federal Institute of Technology Zurich.80p.
- Zohra, S.F., 2008.** Les bactéries nodulant les Légumineuses (B.N.L): caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse Fourragère, *Hedysarum perrauderianum* . Thèse pour l'obtention de Magister en Génétique et Amélioration des plantes Algérie, Université de Mentouri de Constantine. 79p.

# **ANNEXES**

# ANNEXES

## **Annexe 1. Système de codage des enveloppes et sachets contenant les échantillons de matériels végétaux et de sols**

L'encodage des paquets contenant les échantillons végétaux et de sol a été fait par des notations numériques et alphabétiques.

a : l'enveloppe contenant les pieds de haricot prélevés aura le codage suivant :

- Année d'expérimentation
- Numéro de la parcelle des paysans cultivateurs noté de 1 à 20
- Variété de haricot utilisé (RIL,...)
- Traitement (T1, T2, T3)

Le traitement appliqué à la variété étudiée est noté T1 (0 kg de P/ha), T2 (50 kg de P/ha), T3 (200 kg de P/ha)

. Ex : A<sub>2</sub>/1/RIL/T1

b : - codage de sol rhizosphérique de haricot

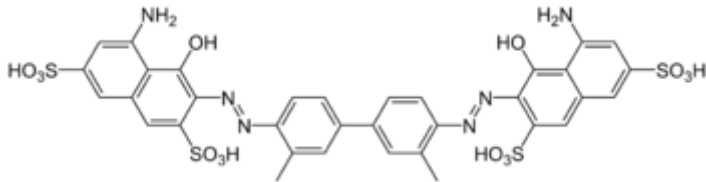
- Année d'expérimentation
- Numéro de la parcelle des paysans cultivateurs noté de 1 à 20
- Variété de haricot utilisé
- Traitement (T1, T2, T3)
- Sol frais (SF)
- Sol sec (SS)
- Destination des échantillons (L pour LRI et C pour CNRE)

. Ex : A<sub>2</sub>/1/RIL/T1/SF/L

## Annexe 2. Taux de mycorhization

### Réactifs :

#### ✓ Bleu trypan



La coloration au bleu de trypan est une méthode de coloration des cellules mortes. Le colorant utilisé, le bleu de trypan, a tendance à entrer dans les cellules qu'il rencontre. Une autre explication réside dans le fait que chez une cellule vivante, la membrane intacte empêche l'entrée de la coloration dans le cytoplasme, alors qu'au contraire chez une cellule morte, la membrane lésée laisse passer le colorant ce qui aboutit à la coloration de la cellule en bleu.

#### Composition du Bleu Trypan 0,05 %

Le Bleu Trypan est obtenu en prélevant 0,5g de poudre de Bleu Trypan additionné de 100ml d'acide acétique et de 900ml d'eau distillée.

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| Poudre de bleu trypan ..... | 0,5g  |
| Acide acétique .....        | 100ml |
| Eau distillée .....         | 900ml |

#### ✓ Potasse à 10% :

La solution de potasse 10% ou KOH 10% est obtenue en ajoutant et en mélangeant 500 ml d'eau distillée dans 50g de KOH en pastilles.

#### Composition de la potasse

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| Hydroxyde de Potassium ..... | 50 g  |
| Eau distillée .....          | 500ml |

### Annexe 3. Phosphatase

#### ✓ Tampon Mc Ilvain ou (Citrate Phosphate Buffer):

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

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

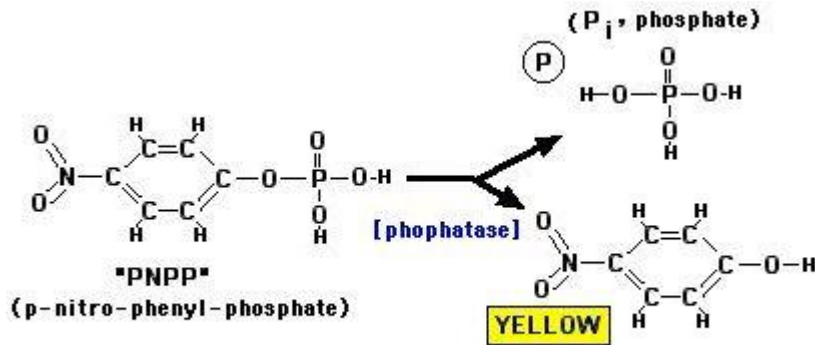
Pour préparer le tampon proprement dit au pH voulu, on fait le mélange des deux solutions A et B selon le tableau ci-après :

Exemple : x ml d'A + y ml de B dilué à un volume total de 100 ml.

Voir tableau de correspondance ci-dessous.

| <b>A(X)</b> | <b>B(Y)</b> | <b>pH</b> |
|-------------|-------------|-----------|
| 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       |
| 13,6        | 36,4        | 6,6       |
| 9,1         | 40,9        | 6,8       |
| 6,5         | 43,6        | 7         |

✓ **Réaction chimique**



✓ **Substrat** (p- Nitrophenyl Phosphate)

La solution de pNPP est préparée à partir de 100mg de poudre de pNPP avec 10ml d'eau distillée et garder à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le tout est mis dans un flacon protégé de la lumière (fumé).

✓ **Les réactifs**

La solution de  $\text{CaCl}_2$  0,5M se prépare à partir de 73,5g de  $\text{CaCl}_2$  dissouts dans 1l d'eau déminéralisée ou d'eau distillée.

La solution de  $\text{NaOH}$  0,5M se prépare à partir de 20g de soude dissouts dans 1l d'eau déminéralisée.

✓ **Méthode de calcul**

Pour obtenir la quantité en  $\mu\text{g}$  de para-nitrophénol dégagés par gramme de sol et par heure, 3 calculs doivent être faits successivement :

✚ Calcul de la DO réelle

Celle-ci est obtenue en déduisant le DO lu par la somme du témoin enzyme et du témoin substrat.

$$DO_{\text{réel}} = DO_{\text{lu}} - (\text{TE} + \text{TS})$$

✚ Calcul du para-nitrophénol dégagé

$DO_{\text{réel}}$  de 0,2 correspond à  $10\mu\text{g}$  de pNP dégagés

$DO_{\text{réel}}$  essai correspond à combien  $\longrightarrow$  x ??? ( $\mu\text{g}/\text{h}$ )

✚ Calcul du para-nitrophénol dégagé par gramme de sol

0,1 g de sol utilisé correspond à x pNP dégagés

1g de sol utilisé correspond à combien  $\longrightarrow$  ??? ( $\mu\text{g}/\text{h}/\text{g}$  de sol)

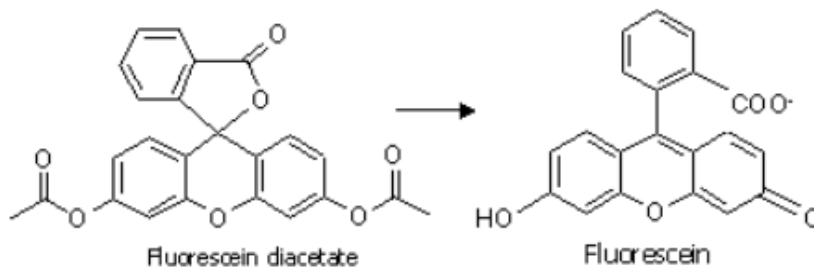


## Annexe 4. FDA

### ✓ Tampon potassium phosphate

Le tampon est obtenu à partir de la solution stock de  $K_2HPO_4$  et de  $KH_2PO_4$  à 60 mM, en dissolvant 8,7g de  $K_2HPO_4$  et 1,3g de  $KH_2PO_4$  dans 800ml d'eau déminéralisée ou eau distillée, puis le pH est ajusté à 7,6 avec de l'hydroxyde de sodium NaOH et le chlorure d'hydrogène HCl. Puis le volume est complété à 1l par de l'eau distillée et garder à 4°C.

### ✓ Réaction chimique



### ✓ Méthode de calcul

Pour obtenir la quantité en  $\mu\text{g}$  de fluorescéine par gramme de sol et par heure, 3 calculs doivent être faits successivement :

#### ✚ Calcul de densité optique(DO) réelle

La DO est obtenue en déduisant le DO lue par la somme du témoin enzyme et du témoin substrat.

$$DO_{\text{réel}} = DO_{\text{lue}} - (TE + TS)$$

#### ✚ Calcul de la fluorescéine obtenue

La fluorescéine produite est obtenue en utilisant la courbe et l'équation de la gamme étalon.

### **Gamme étalon de la fluorescéine.**

#### 1) Solution mère de fluorescéine à 1mg /ml

Dissoudre 100mg de fluorescéine (F 7505 SIGMA) dans 100ml d'acétone.

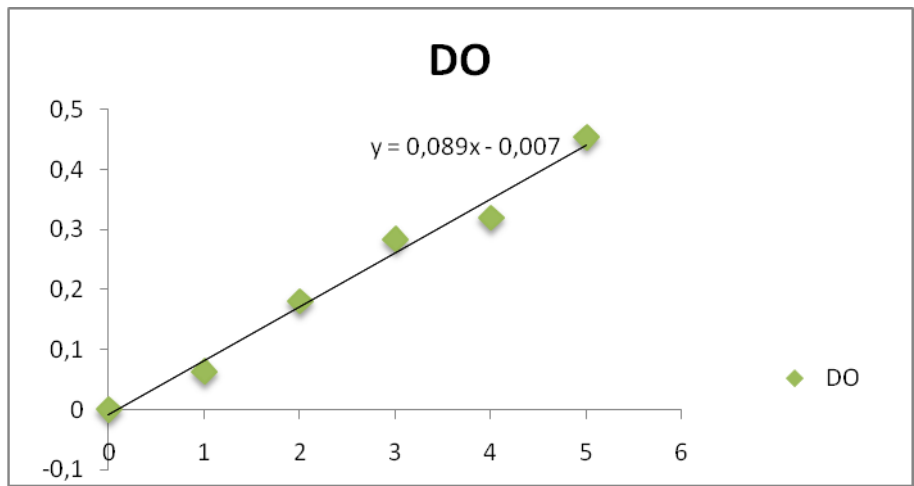
#### 2) Solution fille de fluorescéine à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Diluer 1ml de la solution – mère dans 9ml d'acétone

Calibration des standards : Faire 6 points de gamme de la manière suivante :

0µg : 1000µl de tampon + 1000µl d'acétone + 0µl de la solution standard  
 1µg : 990µl de tampon + 990µl d'acétone + 10µl de la solution standard  
 2µg : 980µl de tampon + 980µl d'acétone + 20µl de la solution standard  
 3µg : 970µl de tampon + 970µl d'acétone + 30µl de la solution standard  
 4µg : 960µl de tampon + 960µl d'acétone + 40µl de la solution standard  
 5µg : 950µl de tampon + 950µl d'acétone + 50µl de la solution standard  
 Passage au vortex et lecture de la DO à 490 nm.

| <b>GAMME ETALON FDA</b> |   |       |      |       |       |       |
|-------------------------|---|-------|------|-------|-------|-------|
| FDA(µg)                 | 0 | 1     | 2    | 3     | 4     | 5     |
| DO                      | 0 | 0,063 | 0,18 | 0,283 | 0,319 | 0,453 |



$y = 0,089x - 0,007$

avec x : quantité de Fluorescéine produite en µg/h

y : DO réel

d'où, on peut tirer x

✚ Calcul de la fluorescéine obtenue par gramme de sol

0,75 ml de la solution initiale correspond à x (quantité de fluorescéine produite en µg/h)

15,2ml (pour 1g de sol utilisé) de la solution initiale correspond à combien  $\longrightarrow$  y ???  
 (µg/h/g de sol)

## **Annexe 5. TSP**

L'industrie offre aux agriculteurs une gamme variée de fertilisants phosphatés qui dérivent presque tous des phosphates naturels, qu'elle importe essentiellement d'Afrique. Ils se caractérisent par leur teneur en anhydride phosphorique  $P_2O_5$ . Les superphosphates sont obtenus par traitement des phosphates naturels par l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique, ou un mélange des deux.

Selon l'acide employé, différentes réactions se produisent pour donner naissance à 3 types de superphosphates :

- ✓ Le superphosphate normal, issu de la réaction phosphate naturel + acide sulfurique.
- ✓ Le superphosphate concentré, issu du phosphate naturel + acide phosphorique.
- ✓ Le superphosphate triple, issu du phosphate naturel + acide phosphorique.

Les superphosphates sont présentés sous forme de granulés.

## Annexe 6. Coordonnées géographiques et précédents culturels de chaque parcelle

| Parcelles | Paysans   | Localités      | Coordonnées géographiques                            | Précédents culturels |
|-----------|-----------|----------------|--|----------------------|
| 1         | Paysan 1  | Ankazomiriotra | S19°39'56.8'' E046°32'15.1''<br>Altitude : 1143 m    |                      |
| 3         | Paysan 3  | Ankazomiriotra | S19°40'35.1''; E 046°32'16.4''<br>Altitude : 1133 m  | Maïs, arachide       |
| 4         | Paysan 4  | Ankazomiriotra | S19°40'36.4''; E 046°32'18.8''<br>Altitude : 1124 m  |                      |
| 5         | Paysan 5  | Ankazomiriotra | S19°40'37.9''; E 046°32'15.1''<br>Altitude : 1121 m  | Maïs                 |
| 6         | Paysan 6  | Ankazomiriotra | S19°40'56.3''; E 046°32'15.1''<br>Altitude : 1146 m  | Manioc, soja         |
| 7         | Paysan 7  | Andratsay      | S 19°40'03.7''; E 046°33'38.8''<br>Altitude : 1190 m | Manioc               |
| 8         | Paysan 8  | Andratsay      | S 19°40'05.7''; E 046°33'33.2''<br>Altitude : 1177 m |                      |
| 9         | Paysan 9  | Andratsay      | S 19°40'15.5''; E 046°33'33.1''<br>Altitude : 1182 m |                      |
| 10        | Paysan 10 | Andratsay      | S 19°40'31.2''; E 046°33'38.7''<br>Altitude : 1171 m | Arachide             |
| 11        | Paysan 11 | Andratsay      | S 19°40'38.0''; E 046°33'33.7''<br>Altitude : 1167 m | Arachide             |
| 12        | Paysan 12 | Andratsay      | S 19°41'03.4''; E 046°33'23.1''<br>Altitude : 1167 m | Manioc               |
| 13        | Paysan 13 | Vinany         | S 19°36'33.2''; E 046°28'10.2''<br>Altitude : 1030 m | Stylosanthes         |
| 14        | Paysan 14 | Vinany         | S 19°36'27.0''; E 046°28'08.9''<br>Altitude : 1026 m | Riz pluvial          |
| 15        | Paysan 15 | Vinany         | S 19°36'38.6''; E 046°28'03.4''<br>Altitude : 1030 m |                      |
| 16        | Paysan 16 | Vinany         | S 19°36'41.3''; E 046°27'56.1''<br>Altitude : 1026 m |                      |
| 17        | Paysan 17 | Vinany         | S 19°36'41.8''; E 046°27'50.8''<br>Altitude : 1009 m | Riz pluvial          |
| 18        | Paysan 18 | Vinany         | S 19°36'48.2''; E 046°28'09.4''<br>Altitude : 1018 m | Pois de terre        |
| 19        | Paysan 19 | Vinany         | S 19°37'04.9''; E 046°28'10.0''<br>Altitude : 1001 m | Manioc, arachide     |
| 20        | Paysan 20 | Vinany         | S 19°37'05.4''; E 046°29'20.8''<br>Altitude : 1080 m |                      |

## ABSTRACT

**Theme: “Result of phosphated fertilization level in the soil microbial functioning: case of bean (*Phaseolus vulgaris*)”.**

The study intend to identify the suitable fertilization level in order to improve the fertility of the bean growing soil and to increase the productivity in three areas include in the region of Vakinankaratra. Three phosphorus doses: 0 kg/ha, 50 kg/ha and 200 kg/ha were added on the growing soil of three variety of bean: RIL115 tolerant phosphorus' deficiency, RIL147 can't stand and local variety witness SOAFIANARANA sensitive to the soil fertility.

The results display that the productivity of fertilized soil based on 50 kg/ha was increased. Just as with 200 kg/ha, that the productivity is nearly the double. Then it was quadrupled the variety witness 0kg/ha. The number of the nodule 32.3 was also greatly affected by the phosphorus dose with 200kg/ha compared to the process without phosphore of which the number is not excede 4.1. The added phosphorus with 200 kg/ha increased the microbial activities for the three variety of soil: the produced fluoresceines values are significantly different compared to both others. Moreover, the soil phosphatase activity and mycorrhization were not affected by the added phosphorus whatever the quantity. The comparison of the three varieties results allow to conclude that local variety SOAFIANARANA was the most stimulated concerning the growth, the microbial activities and the productivity compared to both other varieties.

The outputs show the importance of phosphorus in growing soil with low availability of phosphorus. Then the supply of phosphorus is essential for ferralitic soil

Keywords: Madagascar, microbial activities, enzymatic activities, ferralitic soil, phosphorus, symbiosis.

## RESUME

### **Thème : « Effets de différents niveaux de fertilisation phosphatée sur le fonctionnement microbien du sol de la région Vakinankaratra : cas du haricot (*Phaseolus vulgaris*) ».**

Cette étude se propose d'identifier le niveau de fertilisation en phosphore adéquat afin d'améliorer la fertilité du sol de culture de haricot et d'augmenter le rendement dans trois localités de la région de Vakinankaratra dont le sol est de type ferralitique caractérisé par un taux de phosphore pratiquement faible et un pH acide. Trois doses de phosphore de 0 kg/ha, 50 kg/ha et 200 kg/ha ont été apportées sur les sols de culture de trois variétés de haricot RIL115 tolérante en carence en phosphore, RIL147 sensible à la carence en phosphore et une variété témoin locale SOAFIANARANA sensible à la fertilité du sol.

Les résultats ont montré que la fertilisation du sol à partir de 50 kg/ha de phosphore a augmenté le rendement des trois variétés de haricot. Avec 200 kg/ha de phosphore, les valeurs des rendements sont presque les doubles de ceux de 50 kg/ha et quadruples des témoins 0 kg/ha. Le nombre de nodules 32,3 a également été affecté significativement par le niveau de phosphore de 200 kg/ha par rapport au traitement sans phosphore avec un nombre ne dépassant pas 4,1. L'apport de phosphore à 200 kg/ha a augmenté les activités microbiennes du sol pour les trois variétés : les valeurs de fluorescéines produites présentent une différence significative par rapport aux deux autres apports. Par ailleurs, la mesure de l'activité phosphatasique du sol et la mycorhization n'ont pas été affectées par l'apport de Phosphore quelque soit la quantité. La comparaison des résultats des trois variétés, a permis de conclure que la variété locale SOAFIANARANA a été la plus stimulée au niveau de la croissance, de l'activité microbienne et surtout au niveau de rendement de culture par rapport aux deux autres variétés. Ces résultats suggèrent l'importance du phosphore dans un sol de culture à faible disponibilité en phosphore. Ce qui affirme que l'apport en phosphore est indispensable pour les sols de type ferralitique.

Mots clés : Madagascar, activités microbiennes, activités enzymatiques, phosphore, sol ferralitique, légumineuses, symbioses.

Nombre de pages : 43

Nombre de tableaux : 12

Nombre de figures : 8

Nombre de photos : 2

Impétrante : Stella RAZAFINDRAMBOA

Email : razafindramboastell@gmail.com