

## VARIABILITÉ GÉNOTYPIQUE DE L'EFFICACITÉ D'UTILISATION DU PHOSPHORE POUR LA FIXATION SYMBIOTIQUE D'AZOTE CHEZ LE HARICOT

LAZALI Mohamed<sup>1\*</sup>, BRAHIMI Samira<sup>1</sup>, AMENC Laurie<sup>2</sup>, ABADIE Josiane<sup>2</sup>, BLAVET Didier<sup>2</sup> et DREVON Jean Jacques<sup>2</sup>

1. Laboratoire de recherche ERP, Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, Algérie

2. UMR Eco&Sols, Institut National de la Recherche Agronomique, Place Pierre Viala 34060 Montpellier, France

Reçu le 25/05/2019, Révisé le 09/06/2019, Accepté le 12/06/2019

### Résumé

**Description du sujet :** La faible disponibilité des sols en phosphore (P) est l'un des facteurs limitant la production des légumineuses fixatrices de N<sub>2</sub>, en particulier dans les zones méditerranéennes. Le haricot, est considéré comme un mauvais fixateur d'azote et apparait plus exigeant en P que les autres légumineuses.

**Objectifs :** Ce travail s'intéresse à l'évaluation de l'efficacité d'utilisation du phosphore pour la fixation d'azote chez la symbiose rhizobienne d'haricot sous déficience en phosphore.

**Méthodes :** Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de quatre lignées recombinantes contrastantes d'haricot commun. Après leur germination, les plantules sont inoculées avec une souche de référence *Rhizobium tropici* CIAT899 et transférées dans des bacs contenant la solution nutritive déficiente ou suffisante en P.

**Résultats :** Les résultats obtenus montrent que la fixation d'azote est un processus sensible à la déficience en P. Il est influencé par la nodulation et l'allocation en P inorganique particulièrement nodulaire. Les activités phosphatases sont fortement stimulées dans les lignées tolérantes par rapport aux lignées sensibles. Ces enzymes sont impliquées dans l'efficacité d'utilisation du P pour la fixation d'azote et pourraient constituer un mécanisme d'adaptation de ces lignées à la déficience en P.

**Conclusion :** Il est conclu que ces différences génétiques pour la fixation d'azote sous bas P dépendent de l'efficacité d'utilisation du phosphore, qui est liée à la répartition du phosphore entre les organes.

**Mots clés :** Symbiose, haricot, phosphore, légumineuse, fixation d'azote, phosphatase

### GENOTYPIC VARIABILITY IN PHOSPHORUS USE EFFICIENCY FOR SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN COMMON BEAN

#### Summary

**Description of the subject:** The low availability of soil phosphorus (P) is one of the factors limiting the production of N<sub>2</sub>-fixing legumes, particularly in Mediterranean areas. The common bean is considered a species with low N<sub>2</sub> fixation and required more P than other grain legumes.

**Objective:** Our work aims to assess the phosphorus use efficiency for N<sub>2</sub> fixation in the legume-rhizobia symbiosis grown under phosphorus deficiency.

**Methods:** In this study, nodules of four common bean recombinant inbred lines were induced by *Rhizobium tropici* CIAT899 under hydroaerobic culture with sufficient versus deficient P supply.

**Results:** Results showed that the symbiotic N<sub>2</sub> fixation is a sensitive physiological process to P-deficiency and appears to be influenced by nodulation and the inorganic P allocation. In addition, the phosphatase activities are strongly stimulated in tolerant lines compared to sensitive ones. These enzymes are shown involved in the efficiency in use of P for N<sub>2</sub> fixation and could provide a mechanism for tolerance of these lines to P-deficiency.

**Conclusion:** It is concluded that these genotypic differences depend on the efficiency in use of P for N<sub>2</sub> fixation, which is linked to the partitioning of P in plants.

**Keywords:** Symbiosis, common bean, phosphorus, legumes, nitrogen fixation, phosphatases.

\* Auteur correspondant: LAZALI Mohamed, e-mail : m.lazali@yahoo.fr

## INTRODUCTION

En réponse à la déficience P, les légumineuses nodulées mettent en œuvre deux stratégies adaptatives [1]. La première stratégie consiste à développer un système d'acquisition plus efficace du P en augmentant la surface d'échange racinaire [2] ou en sécrétant des acides organiques [3] et des phosphatases [4] dont le rôle est de dissoudre le P insoluble du sol. Cette stratégie concerne l'exigence externe en P de la plante, c'est-à-dire la concentration minimale en P de la solution du sol pour une croissance optimale de la plante. La seconde stratégie consiste à optimiser l'efficacité métabolique d'utilisation du P (EUP) pour la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> (FSN) en produisant plus de biomasse ou en fixant plus de N<sub>2</sub> par unité de P consommée. Cette stratégie concerne l'exigence interne en P [5], c'est-à-dire la teneur minimale en P de la plante pour une croissance optimale. En effet, la sélection des symbioses tolérantes à la déficience en P pourrait porter sur l'EUP pour la fixation de N<sub>2</sub> qui semble spécifique à l'interaction des deux symbiotes [5]. L'intérêt des légumineuses nodulées à forte EUP pour la FSN concerne prioritairement les zones agricoles où des impératifs sociologiques ou écologiques exigent une gestion plus économe du fertilisant P [6]. Des différences génotypiques d'EUP pour la FSN chez le soja [7] et le haricot [8], justifient l'importance d'une sélection variétale basée sur ce critère qui dépendrait en partie de l'allocation du P aux nodosités. Celles-ci contenant jusqu'à 20% du P total de la plante et constituent des puits additionnels pour le P qui limite la proportion de son allocation aux autres organes, notamment les feuilles [9]. Une forte EUP pour la FSN de la symbiose reposerait sur certains mécanismes favorisant l'allocation précoce du P aux nodosités et la remobilisation du P à partir des organes sénescents. Chez *Acacia mangium*, les génotypes les plus tolérants à la déficience en P sont ceux qui ont un taux de N<sub>2</sub> fixé non affecté par la déficience en P [10], suggérant que l'adaptation à la déficience en P est le maintien de l'activité nitrogénase grâce au maintien de la teneur nodulaire en P.

L'objectif de cette étude réalisée sous serre est d'analyser la relation qui pourrait exister entre la stimulation de l'activité fructose 1,6 bisphosphatase (FBPase) sous déficience en P dans les nodosités de quatre génotypes d'haricot et l'EUP pour la FSN. Pour cela, l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) et l'allocation des nodosités en P sont analysés en relation avec l'EUP pour la FSN. La quantité de N<sub>2</sub> fixée ainsi que l'enrichissement en <sup>15</sup>N sont déterminées par la méthode de dilution isotopique dans les plantes et nodosités de l'ensemble des génotypes d'haricot testés.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Culture des plantes en hydroaéroponie

Quatre lignées recombinantes i.e. RILs 147, 115, 34 et 29 d'haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) sont utilisées dans cette étude. Elles ont été caractérisées comme des génotypes tolérantes à la déficience en P (RILs 115 et 34) et sensibles à la déficience en P (RILs 147 et 29) [11]. Les graines sont stérilisées en surface avec 3% d'hypochlorite de calcium, rincées 5 fois avec l'eau distillée puis mises à germer. Après cinq jours, les plantules sont inoculées avec la souche *Rhizobium tropici* CIAT899 et transférées dans des bacs de 40 litres contenant la solution nutritive de Hernandez et Drevon [12]. Elle contient 75 ou 250 µmol de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pour les traitements respectivement déficients et suffisants en phosphore (P). Cette solution nutritive intensément aérée est maintenue à pH 7 par du CaCO<sub>3</sub> et renouvelé chaque semaine après le premier changement à deux semaines de cultures. Un apport initial de 2 µM d'urée stimule la nodulation et préserve la plante d'une carence azotée.

### 2. Mesure de l'activité phosphatase et FBPase

Les phosphatases désignent les enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons ester phosphorique pour libérer l'ortho-phosphate (Pi). Pour leurs extractions, des échantillons de nodosités fraîches correspondant à 60 mg de poids frais sont récoltés à 42 jours après la transplantation des plantes. Chaque échantillon est broyé séparément dans 900 µl du tampon d'extraction d'acétate de Na (50 mM, pH 5.5) contenant 5 mM de dithiotrietol [13].

L'activité phosphatase est déterminée dans le surnageant en utilisant comme substrat, le para-nitrophényl phosphate (pNPP) (5 mM, pH 5.5). La phosphatase réagit avec le pNPP pour libérer une molécule de Pi en produisant le para-nitrophénol (PNP) de coloration jaune. 100 µl d'extrait de cotylédons ou de nodosités sont incubés pendant 20 min à 37°C avec un mélange de 300 µl de tampon acétate (0.2 M, pH 5.5) et 100 µl de pNPP. La réaction est arrêtée en ajoutant dans le milieu réactionnel 500 µl de NaOH (1N). Cette dernière réagit avec le PNP pour donner le paranitrophénolates coloré en jaune. Le blanc est préparé en ajoutant le substrat au mélange réactionnel préalablement arrêté par 500 µl de NaOH. L'activité phosphatase est déterminée par la mesure de la formation de la para-nitrophénolate à 410 nm. L'activité spécifique de la phosphatase est définie comme étant la quantité de protéines hydrolysant 1 nmol de pNPP par minute et par gramme de matière fraîche.

Pour le dosage de l'activité FBPase, le substrat utilisé est le fructose 1,6 bisphosphate (10 µM, pH 5.5). L'hydrolyse de ce dernier conduit à la libération d'orthophosphate (Pi) et d'intermédiaire de fructose 6- phosphate. 100 µl d'extrait de nodosités est incubé pendant 20 min à 37°C avec un mélange de 300 µl de tampon d'acétate de sodium (0.2 M, pH 5.5) et 100 µl de substrat. La réaction est arrêtée par l'addition de 0.5 ml d'acide trichloracétique à 10%, et le mélange est centrifugé à 20 000 g pendant 6 min. Le blanc est préparé en ajoutant 100 µl d'extrait de nodosités au mélange réactionnel préalablement arrêté au TCA (10%) sans incubation et le mélange est centrifugé. La concentration de Pi libérée est mesurée par spectrophotométrie à 630 nm en utilisant le vert de malachite. Une gamme étalon est préparée avec des concentrations en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  allant de 0 à 20 mg l<sup>-1</sup>. L'activité FBPase est ensuite exprimée en nmol de Pi libéré par min par g de matière fraîche.

### 3. Récolte des plantes et détermination des biomasses

La récolte des plantes est effectuée à 42 jours après la transplantation coïncidant avec le stade de floraison des plantes d'haricot.

Les biomasses sèches des parties aériennes, racinaires et des nodosités sont déterminées et leurs teneurs en P sont aussi dosées. L'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne est estimée par la pente du modèle de régression de la biomasse des plantes sur la biomasse nodulaire [14].

### 4. Dosage de l'azote total et l'enrichissement en <sup>15</sup>N

Le dosage de l'azote total et le rapport <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N est réalisé par spectrométrie de masse sur des échantillons de feuilles, racines et nodules finement broyés et préalablement séchés à 60°C pendant 72 heures à l'étuve. Un aliquote de 3 mg pour les feuilles et racines et 2 mg pour les nodules est injecté dans un analyseur élémentaire pour mesurer le δ<sup>15</sup>N. L'abondance naturelle en <sup>15</sup>N de chaque échantillon est ensuite calculée en utilisant l'équation de Shearer et Kohl [15]:  $\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = [(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \text{ échantillon} - \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \text{ atmosphère}) / \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \text{ atmosphère}] \times 1000$  sachant que le rapport <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N de l'atmosphère égale à 0.3663%.

### 5. Estimation de la quantité de N<sub>2</sub> fixée

La quantité de N<sub>2</sub> fixée est estimée comme étant égal à la différence d'azote total accumulée dans les plantes récoltées au stade floraison (42 jours après la transplantation) et avant la nodulation (15 jours après la transplantation) [16].

### 6. Analyse statistique

Le dispositif expérimental adopté est un bloc aléatoire complet. Les valeurs des différents paramètres étudiés représentent les moyennes de sept répétitions. L'analyse des données est réalisée par ANOVA à deux facteurs avec le logiciel R (2.14.1). Les comparaisons entre les différentes moyennes sont effectuées par le test de Tukey HSD à 5% de probabilité. Les relations entre les différents paramètres sont testées par analyse de régressions linéaires.

## RÉSULTATS

### 1. Efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne

L'effet de la déficience en P sur la nodulation et la croissance des plantes est analysé chez quatre lignées d'haricot en symbiose avec *R. tropici* CIAT899 (Fig. 2).

L'analyse statistique des données montre que des différences significatives sont attribuées aussi bien aux génotypes qu'aux interactions génotype x niveau en P. Cette contrainte induit une diminution significative (de 23 à 38%) de la biomasse nodulaire des lignées testées (figure 2a). Les résultats montrent que les lignées 115 et 147 enregistrent respectivement la forte et la faible biomasse nodulaire sous suffisance et sous déficience en P. Egalement, la nodulation est évaluée en analysant le degré de corrélation entre la biomasse des nodosités et leurs teneurs en P total. Il en ressort que, sous déficience en P,

la biomasse nodulaire est significativement corrélée à la teneur en P total ( $R^2 = 0,91^{**}$ ). Cependant, sous suffisance en P, aucune différence significative n'est observée entre ces deux paramètres.

En réponse à la déficience en P, une variabilité génotypique évidente est décelée en termes de biomasses des parties aériennes des plantes des différents génotypes étudiés (figure 2b). Sous cette contrainte, la biomasse diminue significativement chez l'ensemble des lignées mais de façon plus prononcée chez la lignée 34 (37%) et la lignée 147 (33%).



Figure 1. Différence d'expression entre deux lignées d'haricot les plus contrastantes à la déficience en P inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous déficit en P en hydroaéroponie sous serre.

La fixation symbiotique de  $N_2$  est évaluée par la droite de régression des biomasses aériennes en fonction des biomasses nodulaires. Ainsi, l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) entre les différentes lignées est calculée à partir de la pente de régression. Sous suffisance en P, l'EUSR des lignées sensibles 147 et 29 est significativement le plus élevé, avec plus de 12 g MS aérienne par g MS nodulaire comparées avec celle des lignées tolérantes 115 et 34 (Fig. 2c). Sous déficience en P, l'EUSR est plus élevée chez les lignées tolérantes 115 (23%) et 34 (19%) par rapport à celle des lignées sensibles 147 et 29.

## 2. Activités *FBPase* et *phosphatase*

Les résultats obtenus sur les activités *FBPase* et *phosphatase* nodulaires montrent des variations significatives qui semble dépendre à la fois des génotypes et du niveau du P appliqué (Fig. 3). Les nodosités des plantes exposées à la déficience en P présentent des activités *FBPase* significativement élevées chez les lignées tolérantes 115 et 34 ( $46 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ) que chez les lignées sensibles ( $37 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ). Cette augmentation est plus importante chez la lignée 34 (44%) suivit par la lignée 29 (34%) qui montrent une activité *FBPase* plus faible sous suffisance en P en comparaison avec la lignée tolérante 115 (Fig. 3a). Similairement, cette contrainte provoque une augmentation

significative de l'activité phosphatase dans les nodosités de toutes les lignées étudiées (Fig. 3b). En réponse à cette contrainte, l'activité phosphatase présente des variations irrégulières selon les génotypes. Cependant, l'activité

phosphatase augmente de 28% et 31%, respectivement dans les nodosités des lignées 115 et 29 testées sous déficience en P comparativement aux autres lignées.

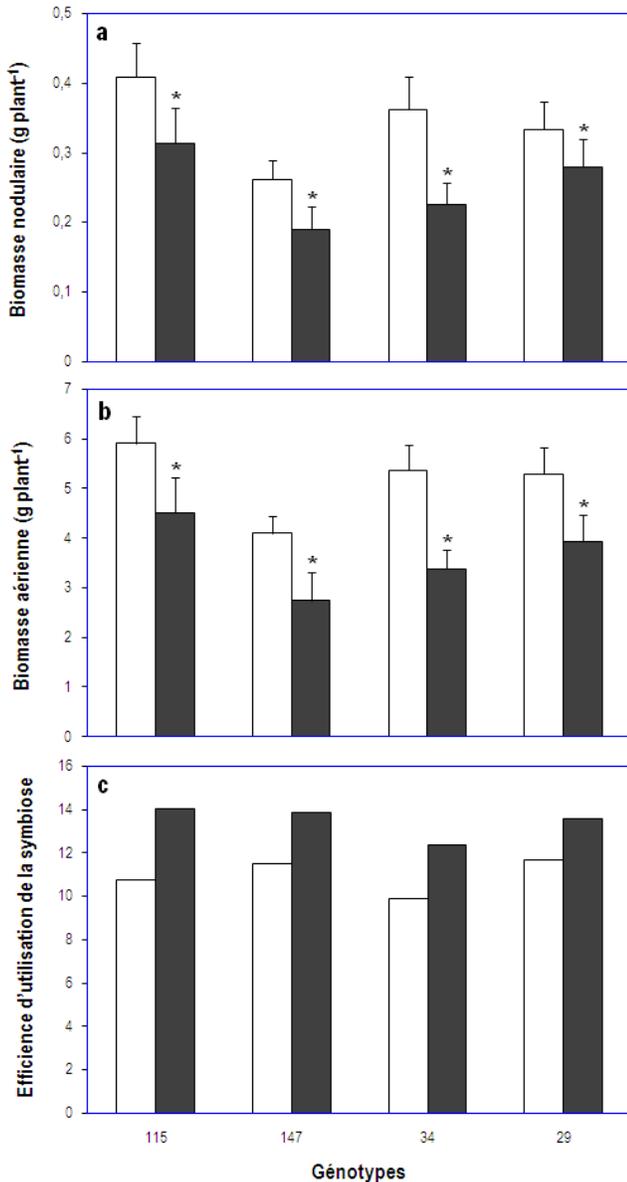


Figure 2. Nodulation (a), croissance (b) et efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (c) de quatre lignées recombinantes contrastantes d'haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

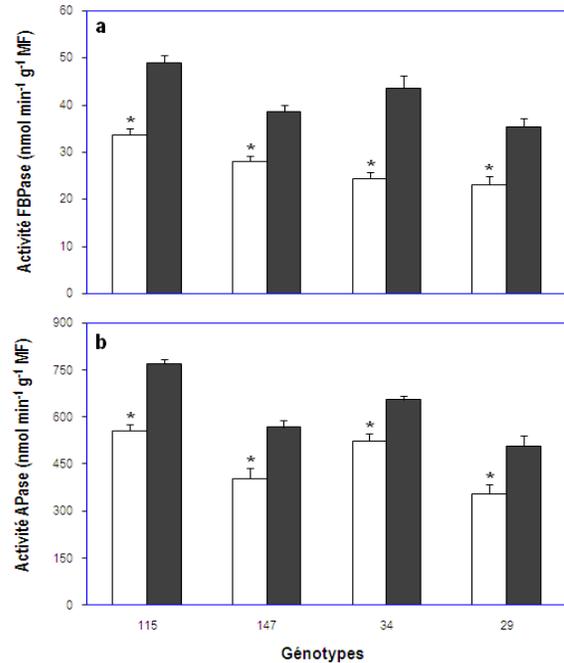


Figure 3. Activité FBPase (a) et phosphatase (b) dans les nodosités de quatre lignées recombinantes contrastantes d'haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

### 3. Teneur des nodosités en P et efficacité de son utilisation pour la FSN

Les résultats indiqués dans la figure IV.5 montrent que la teneur des nodosités en P total et inorganique varie d'une manière significative entre les génotypes testés et le niveau du P appliqué. Sous suffisance en P, les lignées tolérantes 115 et 34 montrent des teneurs moyennes en P total nodulaire élevées par rapport aux lignées sensibles 147 et 29 (Fig. 4a). Par contre, la déficience en P induit une baisse considérable de l'accumulation en P total dans les nodosités des lignées 115 et 34 (25%) mais moins importante dans les nodosités de la lignée sensible 147 (20%).

L'EUP pour la FSN des différentes lignées d'haricot testées dans cette expérience montre une légère variabilité en réponse à la déficience en P (Fig. 4b). En effet, une augmentation significative de l'EUP pour la FSN (14%) est observée sous déficience en P chez la lignée tolérante 115 ayant la haute valeur en EUP pour la FSN parmi les quatre génotypes évalués. En revanche, les augmentations observées de l'EUP pour la FSN sous déficience en P pour le reste des génotypes ne sont pas statistiquement significatives.

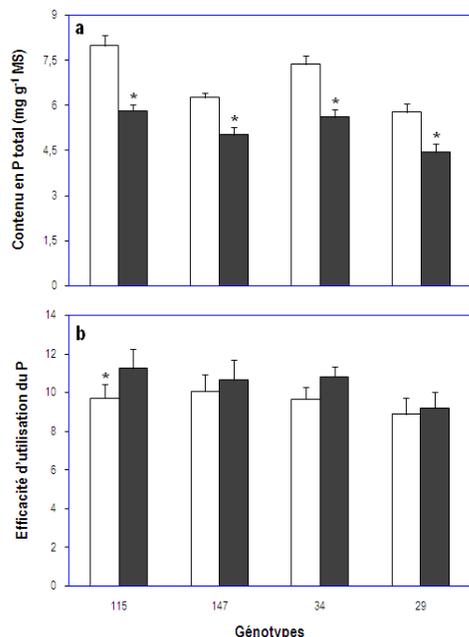


Figure 4. Teneur des nodosités en P total (a) et l'efficacité de son utilisation (b) de quatre lignées recombinantes contrastantes d'haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

#### 4. Rôle de FBPase dans l'efficacité d'utilisation du P pour la FSN

La remobilisation de P par l'enzyme FBPase pour la fixation symbiotique de N<sub>2</sub> est évaluée en analysant la relation entre l'EUP et l'hydrolyse de fructose 1,6 bisphosphate par l'enzyme FBPase (Fig. 5). L'analyse des résultats montre que la libération de Pi par l'enzyme FBPase est significativement corrélée avec l'augmentation de l'efficacité d'utilisation de Pi libéré pour la FSN quel que soit le niveau du P appliqué.

Indépendamment des génotypes, cette corrélation est plus importante sous déficience (R<sup>2</sup>=0,79\*\*) que sous suffisance en P (R<sup>2</sup>=0,68\*).

#### 5. Fixation symbiotique de N<sub>2</sub> et discrimination contre le <sup>15</sup>N

Les résultats obtenus en termes de la fixation de N<sub>2</sub> et l'enrichissement des plantes et nodosités en <sup>15</sup>N montrent des variations significatives qui semblent dépendre à la fois du génotype et du niveau du P appliqué (tableau 1). Dans les nodosités des plantes soumises à la déficience en P, une diminution significative du rapport <sup>15</sup>N/N-total est notée chez les lignées tolérantes 115 et 34. En revanche, la réduction de ce dernier rapport demeure statistiquement non significative pour les lignées sensibles 147 et 29. Des différences génotypiques du rapport <sup>15</sup>N/N-total dans les feuilles sont observées sous déficience en P. En conditions de déficience en P, le rapport <sup>15</sup>N/N-total a diminué significativement chez toutes les lignées testées à l'exception de la lignée sensible 29. Ce dernier génotype enregistre le même rapport <sup>15</sup>N/N-total sous suffisance que sous déficience en P. La variation du ratio <sup>15</sup>N/N-total dans les racines est comparable à celle des feuilles. Ainsi, sous déficience en P, une diminution significative du ratio <sup>15</sup>N/N-total est notée chez les lignées tolérantes 115 et 34 alors que chez les autres lignées, cette diminution n'est pas statistiquement significative. En outre, quel que soit le niveau du P appliqué, le ratio moyen <sup>15</sup>N/N-total nodulaire est plus élevé que celui des parties aériennes et racinaires indiquant une discrimination contre le <sup>15</sup>N dans ces parties de la plante. Quant à la fixation de N<sub>2</sub>, des diminutions significatives sont observées et sont plus prononcées chez la lignée sensible 29 (22%) que chez lignées tolérantes 115 et 34 (14%). Sous suffisance en P, la quantité de N<sub>2</sub> fixée varie de 50 à 78 mg de N<sub>2</sub> fixé plant<sup>-1</sup> respectivement pour les lignées 29 et 115.

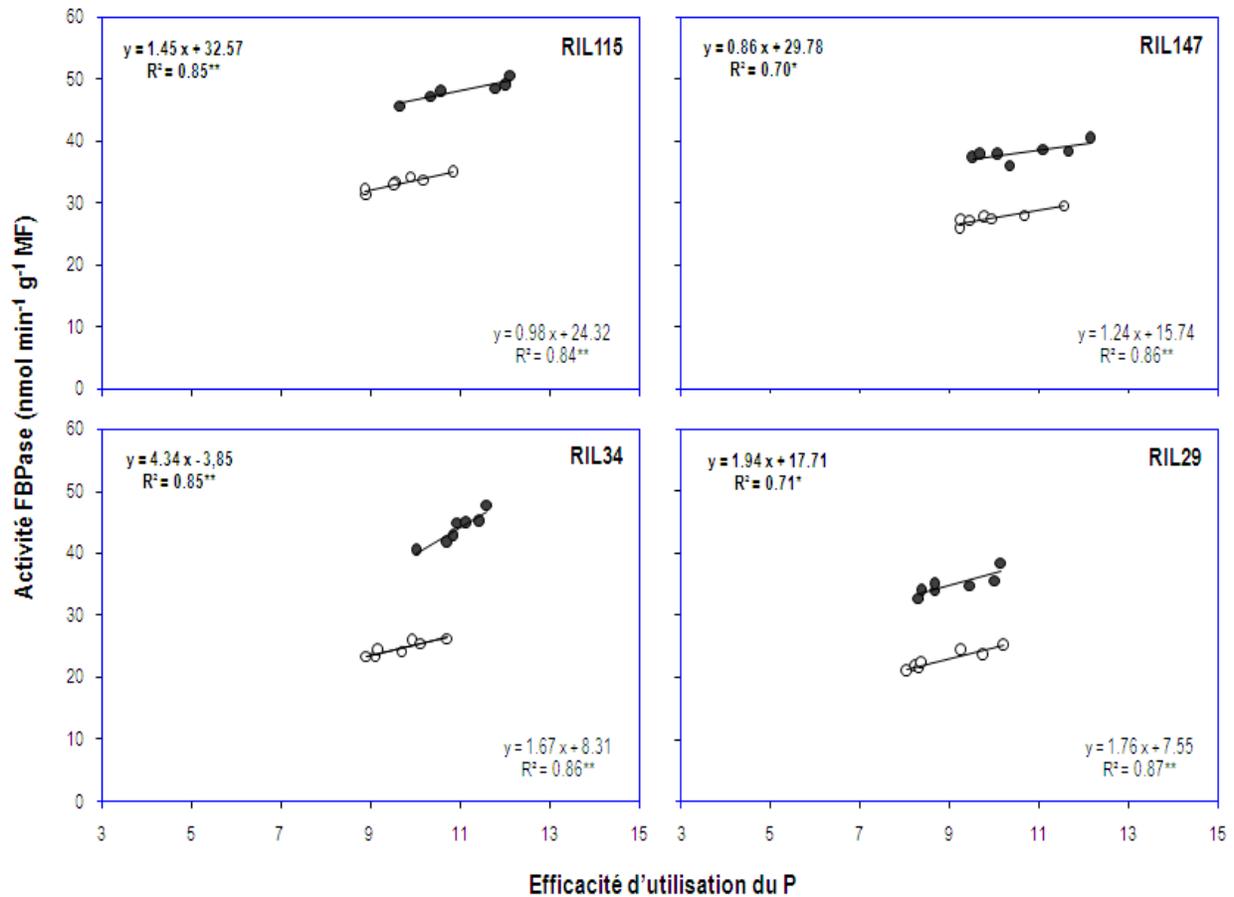


Figure 5. Relation entre l'efficacité d'utilisation du P et l'activité FBPase dans les nodosités de quatre lignées recombinantes contrastantes d'haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance (blanc) versus déficience (gris) en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation.

Tableau 1. Variation du ratio <sup>15</sup>N/N-total et la quantité de N<sub>2</sub> fixée par quatre lignées recombinantes contrastantes d'haricot inoculées avec *R. tropici* CIAT899 et cultivées sous suffisance versus déficience en P. Les données représentent les moyennes de sept répétitions récoltées à 42 jours après la transplantation. Pour chaque paramètre, les valeurs des moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$ .

Lignées	<sup>15</sup> N/N total (%)						N <sub>2</sub> fixée (mg plant <sup>-1</sup> )	
	Nodosités		Feuilles		Racines		P-déficient	P-suffisant
	P-déficient	P-suffisant	P-déficient	P-suffisant	P-déficient	P-suffisant		
115	0.3686 <sup>a</sup>	0.3692 <sup>bc</sup>	0.3649 <sup>a</sup>	0.3658 <sup>c</sup>	0.3656 <sup>a</sup>	0.3661 <sup>cd</sup>	65.24 <sup>a</sup>	76.77 <sup>c</sup>
147	0.3685 <sup>bc</sup>	0.3688 <sup>cd</sup>	0.3644 <sup>bc</sup>	0.3651 <sup>d</sup>	0.3655 <sup>bcd</sup>	0.3657 <sup>cd</sup>	52.69 <sup>b</sup>	62.75 <sup>d</sup>
34	0.3684 <sup>ab</sup>	0.3690 <sup>d</sup>	0.3643 <sup>ab</sup>	0.3655 <sup>d</sup>	0.3653 <sup>ab</sup>	0.3660 <sup>d</sup>	60.58 <sup>cd</sup>	70.80 <sup>e</sup>
29	0.3686 <sup>bc</sup>	0.3688 <sup>cd</sup>	0.3649 <sup>c</sup>	0.3649 <sup>c</sup>	0.3659 <sup>abc</sup>	0.3659 <sup>bc</sup>	39.88 <sup>e</sup>	50.62 <sup>f</sup>

## DISCUSSION

La déficience en P a entraîné une diminution importante de la nodulation et par conséquent la fixation de N<sub>2</sub> mais a stimulé certaines activités enzymatiques liés à l'EUP pour la FSN. L'analyse des corrélations significatives entre l'activité FBPase et l'EUP pour la FSN (R<sup>2</sup>=0,79\*\*) au niveau des nodosités déficientes en P laissent supposer que les nodosités pourraient contribuer à l'EUP pour la FSN par une forte stimulation de l'activité FBPase en conditions de déficience en P comparativement en conditions de suffisance en P (R<sup>2</sup>=0,68\*\*). Dans cette étude, la compréhension de la physiologie nodulaire fut une opportunité intéressante pour expliquer plausiblement que l'augmentation de l'EUP pour la FSN serait due à la stimulation de l'activité FBPase dans les nodosités des lignées cultivées sous déficience en P.

Sous déficience en P, les activités FBPase et phosphatase dans les nodosités ont fortement augmenté chez les lignées tolérantes par rapport aux lignées sensibles (figure 3). Cette augmentation s'est associée à une augmentation significative de la quantité de N<sub>2</sub> fixée par unité de biomasse nodulaire et a révélé une corrélation positive entre le N<sub>2</sub> fixé et la teneur des nodosités en P. Ces résultats qui ont montré l'importance des exigences en P des nodosités des lignées tolérantes suggèrent que cet élément pourrait exercer un rôle spécifique dans le développement et le fonctionnement nodulaire sous conditions de déficience en P. Une situation comparable a été analysée chez d'autres génotypes d'haricot montrant que la variabilité

génotypique était plus importante vis-à-vis des exigences en P que de la teneur des plantes en azote [8]. Similairement, Rotaru et Sinclair [16] avaient trouvé des corrélations positives entre la teneur des plantes de soja en azote, la biomasse des nodosités et leurs teneurs en P. Ces auteurs ont ajouté que l'élévation de la concentration en P dans les nodosités signifie une capacité importante de la fixation de N<sub>2</sub> par unité de masse nodulaire. Dans ce sens, des variations dans les ratios <sup>15</sup>N/N-total sont observées entre les différentes parties des génotypes testés (tableau1).

Ce paramètre est significativement réduit chez les lignées tolérantes 115 et 34 par rapport aux lignées sensibles qui n'ont présenté aucune diminution significative sous déficit en P. En revanche, sous suffisance en P, la lignée 115 a enregistré un taux fort en termes de fixation de N<sub>2</sub> par g de biomasse nodulaire. Généralement, cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de certaines interactions significatives entre le ratio <sup>15</sup>N/N-total et la quantité de N<sub>2</sub> fixée et aussi l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne. Il en ressort aussi que le faible taux de fixation de N<sub>2</sub> enregistré pour la lignée sensible 29, indépendamment du niveau du P, pourrait être dû à la faible nodulation et en conséquence à une efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne médiocre. Ainsi, il a été argumenté que la capacité de fixation de N<sub>2</sub> était plus faible chez les plantes d'haricot soumises à une déficience en P aussi bien précoce que permanente par rapport aux plantes modérément alimentées en P [17].

De plus, de nombreux travaux [15,18] ont mis en évidence l'existence d'un phénomène interne de fractionnement isotopique de l'azote assimilé par les légumineuses pendant la fixation de  $N_2$ . Ce phénomène entraînant l'appauvrissement en  $^{15}N$  de la légumineuse, explique les ratios  $^{15}N/N$ -total plus faibles dans les parties aériennes et racinaires comparativement aux nodosités (tableau 1). Il est aussi à l'origine de la valeur B lorsque la légumineuse dépend exclusivement de l'azote atmosphérique. Selon Peoples *et al.* [19], la valeur B est beaucoup moins dépendante de la variété de la légumineuse, que de la souche rhizobienne impliquée dans la fixation de  $N_2$ .

Globalement, ces résultats montrent que les teneurs des nodosités en P et leurs biomasses ont varié différemment sous déficience en P en relation avec la FSN. La tendance de l'évolution de la FSN semble dépendre des génotypes dont la fixation de  $N_2$  est positivement influencée par l'allocation de leurs nodosités en P. Nos interprétations sont en accord avec les travaux de Tang *et al.* [20] suggérant que l'approvisionnement en P des nodules pourrait induire une augmentation de l'activité spécifique de la nitrogénase.

En effet, les différences génotypiques pour l'accumulation d'azote en fonction de la nutrition en P sont plus prononcées lorsque les plantes dépendent de la FSN. En conséquence, les différences de quantité de  $N_2$  fixée entre les lignées (tableau 1) s'expliqueraient par des différences d'EUP pour la FSN (figure 2b). Cette dernière apparaît donc bien un meilleur paramètre d'estimation de tolérance de la symbiose rhizobienne à la déficience en P, comme l'ont argumenté Lazali *et al.* 2013 [21]. L'EUP pour la FSN est donc un paramètre fiable pour discriminer le besoin optimal en P de génotypes chez les légumineuses dépendant de la fixation de  $N_2$ . En effet, l'allocation de P aux nodosités représente 10 à 20% du P total de la plante, et une plus forte proportion de P est allouée aux nodosités des lignées 115 et 34. Ces résultats sont en accord avec les travaux montrant une variabilité génotypique dans l'allocation de P aux nodosités de la luzerne. Les valeurs d'allocation nodulaire du P obtenues dans notre travail sur le haricot sont comparables à celles trouvées chez le soja [22] et le niébé [23]. Ceci explique pourquoi des recherches ont

été entreprises pour améliorer la fixation de  $N_2$  par la sélection des génotypes nodulant abondamment. Nos résultats suggèrent qu'une masse nodulaire importante peut permettre une importante activité fixatrice seulement si les nodosités sont aussi très efficaces métaboliquement. En effet, l'augmentation de l'efficacité d'utilisation de la symbiose rhizobienne (EUSR) sous déficit en P chez les lignées tolérantes 115 et 34 par rapport aux lignées sensibles, pourrait constituer une sorte d'adaptation impliquant des mécanismes ajustant la croissance pondérale de la plante et sa biomasse nodulaire. La teneur en P des nodosités de la lignée 115 a légèrement diminué sous déficience en P alors que celle de la lignée 147 a fortement diminué. Or, la fraction du P impliqué dans le métabolisme est plus sensible à la déficience en P que la fraction structurale et il est donc possible que cette diminution ait affecté la fraction du P impliquée dans le métabolisme. Ces résultats montrent que des génotypes peuvent avoir des potentiels de fixation de  $N_2$  différents avec une masse nodulaire semblable, comme c'est le cas de la lignée 34. Cette différence serait associée à une différence d'EUP pour la FSN dans les nodosités.

Nos résultats suggèrent aussi qu'une large proportion du P de la nodosité est structurale. Ceci expliquerait la forte réduction de la masse nodulaire sous déficience en P [24].

Bien que le haricot englobe un grand nombre de génotypes dont une partie s'est montrée contrastant vis-à-vis du déficit en P, elles n'ont pas montré des différences importantes dans l'EUP pour la FSN. En effet, dans cette étude, l'EUP pour la FSN a montré une variation importante entre les différents génotypes testés. Il apparaît alors que les lignées 115 et 34 sont plus efficaces pour l'utilisation du P que les lignées 147 et 29 (figure 4c). Ceci conforte les résultats d'autres travaux justifiant qu'une meilleure fixation de  $N_2$  sous déficience en P est aussi associée à une meilleure EUP pour la FSN [7]. Nos résultats sont en accord avec ceux de Lazali *et al.* [18] qui montrent qu'il est possible de sélectionner pour l'EUP afin d'améliorer la fixation symbiotique de  $N_2$ . Une sélection pour l'EUP serait importante en termes de ressource en P du sol puisque l'EUP pour la FSN consiste à fixer davantage de  $N_2$  par unité de P allouée,

donc permettant une meilleure gestion des éléments minéraux.

## CONCLUSION

En conclusion, nos résultats ont suggéré qu'en réponse à la déficience en P, des différences importantes sont observées entre les génotypes testés pour leurs activités FBPase, leurs demandes nodulaires en P et leurs capacités de FSN. Face au déficit en P, les lignées 115 et 34 sont les plus efficaces pour l'utilisation de P pour la FSN par rapport aux lignées 147 et 29. La performance des génotypes étudiés en termes de fixation de N<sub>2</sub> pourrait dépendre de la corrélation significative ainsi observée entre l'activité FBPase et l'EUP pour la FSN indiquant l'importance de la haute demande des légumineuses nodulées en P. Les différences d'EUP pour la FSN que nous avons mises en évidence entre les lignées testées permettent d'envisager une sélection basée sur l'efficacité d'utilisation des éléments minéraux dans l'agriculture. Une sélection pour l'EUP pour la FSN serait importante en termes de ressource en P du sol puisque l'EUP consiste à fixer davantage de N<sub>2</sub> par unité de P allouée, donc permettant une meilleure gestion des éléments minéraux. Ainsi, des cultures possédant une forte EUP pour la FSN exerceraient une moindre pression sur des agroécosystèmes de moindre fertilité. Ces différences dans la physiologie des nodosités d'haricot influenceraient la fixation de N<sub>2</sub> qui dépendrait principalement des facteurs génétiques.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1]. Araujo A.P., Plassard C. and Drevon J.J. (2008). Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. *Plant and Soil*, 312:129-138.

[2]. Hinsinger P., Herrmann L., Lesueur D., Robin A., Trap J., Waithaisong K. and Plassard C. (2018). Impact of roots, microorganisms and microfauna on the fate of soil phosphorus in the rhizosphere. *Annual Plant Reviews online*, 377-407.

[3]. Lazali M. and Bargaz A. (2017). *Examples of belowground mechanisms enabling legumes to mitigate phosphorus deficiency*, In Legume nitrogen fixation in soils with low phosphorus availability (Sulieman S. & Tran L.S.P., eds). Springer International Publishing, Switzerland. pp. 135–152.

[4] Wang L. and Liu D. (2018). Functions and regulation of phosphate starvation-induced secreted acid phosphatases in higher plants. *Plant science*, 271: 108-116.

[5]. Wang M., Ma, L., Strokal M., Chu Y. and Kroeze C. (2018). Exploring nutrient management options to increase nitrogen and phosphorus use efficiencies in food production of China. *Agricultural systems*, 163: 58-72.

[6]. Clarkson D.T. and Hawkesford M.J. (1993). *Molecular biological approaches to plant nutrition*. In: Plant Nutrition—from Genetic Engineering to Field Practice (Barrow NJ. ed). Kluwer Academic Publishers, pp. 23-33.

[7]. Adjei-Nsiah S., Kumah J.F., Owusu-Bennoah E. and Kanampiu F. (2019). Influence of P sources and rhizobium inoculation on growth and yield of soybean genotypes on Ferric Lixisols of Northern Guinea savanna zone of Ghana. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1-16.

[8]. Vadez V., Lasso J.H., Beck D.P. and Drevon J.J. (1999). Variability of N<sub>2</sub>-fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under P deficiency is related to P use efficiency. *Euphytica*, 106: 231-242.

[9]. Vadez V. and Drevon J.J., (2001). Genotypic variability in phosphorus use efficiency for symbiotic N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomie*, 21: 691-699.

[10]. Taliman N. A., Dong Q., Echigo K., Raboy V. and Saneoka H. (2019). Effect of Phosphorus Fertilization on the Growth, Photosynthesis, Nitrogen Fixation, Mineral Accumulation, Seed Yield, and Seed Quality of a Soybean Low-Phytate Line. *Plants(Basel)*, 8(5) : E119.

[11]. Lazali M., Merabet C., Brahimi S., Latati M., Benadis C., Maougal R., Blavet D., Drevon J.J. and Ounane S.M. (2016). Nodular diagnosis of contrasting recombinant inbred lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in multi-local field tests under Mediterranean climate. *European Journal of Soil Biology*, 73: 100-107.

- [12]. **Benadis C., Bekki A., Khoulassa S., Boukhatem Z.F. and Drevon J.J. (2014).** Mycorrhizal colonization decreases respiration of common bean nodulated root in hydroaerobic culture. *Symbiosis*, 62: 135-142.
- [13]. **Lazali M., Bargaz A., Brahimi S, Amenc L., Abadie J. and Drevon J.J. (2016).** Expression of a phosphate-starvation inducible fructose-1,6-bisphosphatase gene in common bean nodules correlates phosphorus use efficiency. *Journal of Plant Physiology*, 205: 48-56.
- [14]. **Lazali M. and Drevon J.J. (2014).** The nodule conductance to O<sub>2</sub> diffusion increases with phytase activity in N<sub>2</sub>-fixing *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 53-59.
- [15]. **Carlsson G., Palmberg C. and Huss-Danell K. (2006).** Discrimination against <sup>15</sup>N in three N<sub>2</sub>-fixing *Trifolium* species as influenced by Rhizobium strain and plant age. *Acta Agric Scand B: Soil Plant Sci*, 56: 31–38.
- [16]. **Lazali M., Bargaz A., Carlsson G., Ounane S.M. and Drevon J.J. (2014).** Discrimination against <sup>15</sup>N among recombinant inbred lines of *Phaseolus vulgaris* L. contrasting in phosphorus use efficiency for nitrogen fixation. *Journal of Plant Physiology*, 171: 199-204.
- [17]. **Rotaru V. and Sinclair T.R. (2009).** Interactive influence of phosphorus and iron on nitrogen fixation by soybean. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 94-99.
- [18]. **Lazali M., Blavet D., Pernot C., Desclaux D. and Drevon J.J. (2017).** Efficiency of phosphorus use for dinitrogen fixation varies between common bean genotypes under phosphorus limitation. *Agronomy Journal*, 109: 283-290.
- [19]. **Peoples M.B., Giller K.E., Herridge D.F. and Vessey J.K. (2002).** *Limitations to biological nitrogen fixation as a renewable source of nitrogen for agriculture*. In: Nitrogen fixation: global perspectives. (Fina MT, O'Brian MR, Layzell DB, Vessey JK, Newton W. eds). Proceedings of the 13<sup>th</sup> International Congress of Nitrogen Fixation, Canada, CABI Publishing. pp. 346-351.
- [20]. **Tang C., Hinsinger P., Jaillard B., Rengel Z. and Drevon J.J. (2001).** Effect of phosphorus deficiency on the growth, symbiotic N<sub>2</sub> fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie*, 21 : 683-689.
- [21]. **Lazali M., Zaman-Allah M., Amenc L., Ounane G., Josiane A. and Drevon J.J. (2013).** A phytase gene is over-expressed in root nodules cortex of *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis under phosphorus deficiency. *Planta*, 238: 317-324.
- [22]. **Bargaz A., Ghoulam C., Faghire M., Attar H.A. and Drevon J.J. (2011).** The nodule conductance to O<sub>2</sub> diffusion increases with high phosphorus content in the *Phaseolus vulgaris*-rhizobia symbiosis. *Symbiosis*, 53 : 157-164.
- [23]. **Alkama N., Bi Bolou E.B., Vailhe H., Roger L., Ounane S.M. and Drevon J.J. (2009).** Genotypic variability in P use efficiency for symbiotic nitrogen fixation is associated with variation of proton efflux in cowpea rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1814-1823.
- [24]. **Lazali M., Brahimi S. and Drevon J.J. (2018).** High yields in a low-P tolerant recombinant inbred line of common bean under field conditions. *Rhizosphere*, 8: 27-33.