

DEPARTEMENT D'ÉCOLOGIE ET ENVIRONNEMENT

N°...../SNV/2020

THÈSE

Présentée par

MANSOURI Lahouaria Mounia

Pour l'obtention du Diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES**

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: **BIOTECHNOLOGIE**

THÈME

ETUDE DES EFFETS DES FACTEURS BIOTIQUES  
ET ABIOTIQUES SUR LA NODULATION CHEZ LE HARICOT  
(*PHASEOLUS VULGARIS* L.)

Soutenue publiquement le ...../...../2020

DEVANT LE JURY

Président	Mr CHAFAA Smail	Pr. <u>Université de Batna 2</u>
Rapporteur	Mme HELEILI Nouzha	Pr. <u>Université de Batna 1</u>
Co-rapporteur	Mme BOUKHATEM Zineb Faïza	MCA. <u>Université d'Oran 1</u>
Examineurs	Mr MAMI Anas	Pr. <u>Université d'Oran 2</u>
	Mr MERADSI Fouad	MCA. <u>Université de Batna 2</u>

Année universitaire : 2020/2021

## **Remerciements**

---

*Je suis reconnaissante à Dieu pour la bonne santé et le bien-être qui ont été nécessaires pour terminer cette thèse.*

*Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire du Département Ecologie et Environnement (Université de Batna 2, Algérie) et du Laboratoire de l'institut des sciences agronomiques et vétérinaires (Université de Batna 1, Algérie).*

*Je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude à :*

**Professeur Heleili N. (Université de Batna 1)**, les mots ne peuvent pas exprimer à quel point je suis reconnaissante envers Mme Heleili, pour la confiance qu'elle m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire et pour m'avoir guidée et soutenue. Je vous remercie pour votre patience, motivation, enthousiasme et vos immenses connaissances. Vos conseils m'ont aidé dans tout le temps de recherche et de la rédaction de cette thèse.

**Docteur Boukhatem Z.F. (Université d'Oran 1)**, pour m'avoir guidée, aidée et encouragée pendant mon travail et même avant ma thèse. Sans votre aide et implication dévouée à chaque étape du processus, ce travail et ce document n'aurait jamais été réalisé. Je vous remercie également pour votre disponibilité et votre professionnalisme.

**Docteur Meradsi F. (Université de Batna 2)**, Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour sa disponibilité et son professionnalisme et d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

**Professeur Mami A. (Université d'Oran 2)**, que je remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour sa disponibilité malgré la distance et les conditions.

Je tiens à remercier sincèrement **Professeur Chafaa Smail (Université de Batna 2)**, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que président et pour ses encouragements continus, sa sympathie et sa disponibilité et son professionnalisme.

Je suis extrêmement reconnaissante et redevable au Dr. Kheloufi A. pour l'étude statistique, ainsi que pour les conseils et les encouragements sincères et précieux qui m'ont été fournis.

Je remercie ma collègue et amie Mme Meradi M. pour ses précieux conseils et encouragements.

Je tiens à remercier mes étudiants en particulier Mr Belatreche R. pour son aide et son sérieux sur le terrain. Je souhaite également montrer mon appréciation de l'assistance fournie par Dr. Abdou I., et Mme Labed H. et également pour leur gentillesse et leur aide.

Je suis reconnaissante à Melle Larouk C. de m'avoir fournie les produits nécessaires. Je saisi également cette occasion pour exprimer ma gratitude à tous les membres du département pour leur aide et leur soutien : Melle Zekri J., Melle Neffar F., Melle Khater N. et Melle Nouri L.

Je tiens également à remercier mes amis et ma famille qui m'ont toujours soutenue.

---

*Mansouri Lahouaria Mounia*

## Résumé

---

La famille des légumineuses (Fabacées) comprend un certain nombre de plantes agricoles et alimentaires importantes. Elle occupe une place considérable dans l'économie, l'agriculture et la sécurité alimentaire. En effet, les légumineuses sont considérées comme engrais vert en raison de leur participation dans la rotation des cultures. Ceci est dû à la capacité de s'associer aux microorganismes bénéfiques du sol tels que les rhizobiums qui sont impliqués dans la fixation biologique de l'azote, ce qui rend ces plantes indépendantes aux engrais chimiques. Cependant, à côté du changement climatique et sous un climat aride qui domine la plupart des sols algériens qui accentue en particulier la salinisation des sols, il est nécessaire de tester et de sélectionner les légumineuses, les variétés ainsi que leurs auxiliaires microbiens, aptes à croître dans ces conditions tout en donnant un meilleur rendement.

Le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) a été sélectionné parmi deux autres légumineuses en raison de ses capacités à germer dans 50% d'eau de mer. Après cette sélection et avant de passer au champs, l'effet de cinq sels ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et  $\text{CaCl}_2$ ) avec des concentrations allant de 100 mM jusqu'à 300 mM a été testé sur la germination des graines de *P. vulgaris* var. *djedida*. Cette étude a révélé des effets inhibiteurs très forts du  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  comparés au  $\text{CaCO}_3$  et au  $\text{KCl}$ . Ainsi au passage au champs situé dans la région aride de Aïn Naga (wilaya de Biskra) caractérisée par un sol salin, des teneurs élevées en  $\text{CaCO}_3$  et en phosphore assimilable, un faible taux de matière organique, et avec un amendement via un fertilisant chimique (Urée 46%). L'enquête nodulaire sur *P. vulgaris* var. *djedida* en présence et en absence d'engrais azoté sur ce site a révélé un nombre de nodules faible ou presque absent, cela a conduit à plusieurs hypothèses qui ont des retours sur les facteurs biotiques et abiotiques contraignant l'établissement de la symbiose, imposant ainsi un second essai au champ (sous presque les mêmes conditions, avec deux autres variétés (*Nelson* et *Jalila*) et deux niveaux d'urée 46%). Les résultats ont montré que la meilleure nodulation a été obtenue chez la variété *Nelson* suivi de *Djedida* et enfin la variété *Jalila* avec un effet de fertilisation positif qui semble augmenter l'indice de rendement de 18% chez *Djedida* et de 20% chez *Jalila* par rapport aux plantes non fertilisées.

En parallèle et au cours du premier essai au champ, *P. vulgaris* L. var. *djedida* a révélé sa capacité de mycorhization importante et intéressante sous les mêmes conditions précédentes même si elles sont contraignantes à son établissement. Enfin, l'isolement des rhizobiums à partir des nodules de *P. vulgaris* var. *djedida* et var. *Nelson* sur le milieu YEM additionné au rouge Congo a permis l'obtention de 59 isolats dont 29 qui n'ont pas absorbé le colorant et 27 qui l'ont absorbé. Ainsi lors du teste de nodulation, majoritairement les deux groupes ont pu induire une nodulation chez la variété *Djedida* avec un effet significatif sur la croissance des plants, mais l'activité phytasiques et nodulatrice à la fois s'est révélé positif que chez 15 souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo et deux souches qui ont absorbé le rouge Congo (AN37 et AS25B).

---

**Mots clés :** Légumineuse, Haricot, nodule, rhizobiums, aridité, salinité, azote, solubilisation du phosphore.

## Abstract

---

The family Fabaceae includes a number of important agricultural and food plants. It occupies a considerable place in the economy, agriculture and food security. Indeed, legumes are considered as green manure because of their participation in crop rotation. This is due to the ability to associate with beneficial soil microorganisms such as rhizobia that are involved in biological nitrogen fixation, making these plants independent of chemical fertilizers. However, alongside climate change and in an arid climate which dominates most Algerian soils which in particular accentuates soil salinization, it is necessary to test and select legumes, varieties as well as their microbial auxiliaries, capable of growing under these conditions while giving a better yield.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) was selected among two other legumes because of its ability to germinate in 50% seawater. After this selection and before going to the fields, the effect of five salts (CaCO<sub>3</sub>, NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub>) with concentrations ranging from 100 mM up to 300 mM was tested on the germination of seeds of *P. vulgaris* var. *djedida*. This study revealed very strong inhibitory effects of NaCl, CaCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> compared to CaCO<sub>3</sub> and KCl. Thus, when passing through the fields located in the arid region of Aïn Naga (wilaya of Biskra) characterized by a saline soil, high levels of CaCO<sub>3</sub> and assimilable phosphorus, a low rate of organic matter, and with an amendment via a chemical fertilizer (Urea 46%). The nodular survey on *P. vulgaris* var. *djedida* in the presence and absence of nitrogen fertilizer on this site revealed a low or almost absent number of nodules, which led to several hypotheses which have feedback on the biotic and abiotic factors constraining the establishment of the symbiosis, thus imposing a second field trial (under almost the same conditions, with two other varieties (*Nelson* and *Jalila*) and two levels of 46% urea). The results showed that the best nodulation was obtained in the Nelson variety followed by *Djedida* and finally the *Jalila* variety with a positive fertilization effect which seems to increase the yield index by 18% in *Djedida* and by 20% in *Jalila* compared to unfertilized plants.

In parallel and during the first assay in the field, *P. vulgaris* L. var. *djedida* has revealed its important and interesting mycorrhization capacity under the same previous conditions even if they are restrictive to its establishment. Finally, the isolation of rhizobia from the nodules of *P. vulgaris* var. *djedida* and var. *Nelson* on YEM medium added to Congo red yielded 59 isolates, 29 of which did not absorb the dye and 27 which did. Thus, during the nodulation test, mainly the two groups were able to induce nodulation in the variety *Djedida* with a significant effect on the growth of the plants, however, both phytase and nodulator activity was positive in only 15 strains that did not take up Congo red and two strains that did take up Congo red (AN37 and AS25B).

---

**Key words :** Legumes, Common bean, nodule, rhizobia, aridity, salinity, nitrogen, solubilization of phosphorus.

## ملخص

تضم عائلة البقوليات (Fabaceae) عددًا من النباتات الزراعية والغذائية المهمة. تحتل مكانة مهمة في الاقتصاد ، كما في الزراعة والأمن الغذائي وبالتالي في تناوب المحاصيل. ويرجع ذلك إلى القدرة على الارتباط بالكائنات الحية الدقيقة المفيدة في التربة مثل البكتيريا الجذرية والفطرية والبكتيريا ذات التأثير PGPR ، والتي تشارك على التوالي في تثبيت البيولوجي للنيتروجين ، وتعبئة الفوسفور وغيرها ، وإنتاج الهرمونات النباتية ، مما يجعل هذه النباتات مستقلة عن الأسمدة الكيماوية. ومع ذلك ، جنبًا إلى جنب مع تغير المناخ وفي ظل المناخ الجاف الذي يهيمن على معظم الترب الجزائرية والذي يزيد بشكل خاص من تملح التربة ، من الضروري اختبار واختيار البقوليات وحتى الأصناف المناسبة للنمو في ظل هذه الظروف. مع إعطاء أداء أفضل.

تم اختيار الفاصوليا (*Phaseolus vulgaris* L.) من بين البقوليات الأخرى نظرًا لقدرتها على الإنبات في مياه البحر بنسبة 50٪ وبعد هذا الانتقاء وقبل الذهاب إلى الحقل ، أدر خمسة أملاح ( $\text{CaCO}_3$  ،  $\text{NaCl}$  ،  $\text{KCl}$  ،  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  و  $\text{CaCl}_2$ ) بتركيزات تتراوح من 100 ملي مولار حتى 300 ملي مولار على إنبات بذور *P. vulgaris* var. *djedida*. كشفت هذه الدراسة عن تأثيرات مثبطة قوية جدا لكل من  $\text{NaCl}$  و  $\text{CaCl}_2$  و  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  مقارنة مع  $\text{CaCO}_3$  و  $\text{KCl}$ . وهكذا ، عند المرور عبر الحقول الواقعة في منطقة عين النجا القاحلة (ولاية بسكرة) التي تتميز بالتربة المالحة مع مستويات عالية من كربونات الكالسيوم والفوسفور القابل للاستيعاب ، تم الحصول على تحسن طفيف في معدل المادة العضوية مع إضافة سماد كيماوي (يوريا 46٪). التحقيق في *P. vulgaris* var. *djedida* كشفت جديدا في وجود غياب السماد النيتروجيني في هذا الموقع عن وجود عدد منخفض أو شبه غائب من العقيدات مما يؤدي إلى عدة فرضيات مع تغذية راجعة حول العوامل الحيوية واللاحياتية التي تقيد إنشاء التكافل. قادنا هذا إلى تجربة ميدانية ثانية (في ظل نفس الظروف تقريبًا وبمستويين 46٪ من اليوريا وصنفين آخرين (نيلسون وجليلة) ، وأظهرت النتائج أنه تم الحصول على أفضل عقدة في صنف نيلسون بليه صنف جديدة وأخيرًا صنف جليلة ذو تأثير تسميد إيجابي يبدو أنه يزيد من مؤشر الغلة بنسبة 18٪ في الجديدة وبنسبة 20٪ في جليلة مقارنة بالنباتات غير المخصبة.

بالتوازي وأثناء الاختبار الأول في الحقل ، *P. vulgaris* var. *djedida* كشفت عن قدرتها المثيرة للاهتمام على الفطريات في ظل نفس الظروف السابقة حتى لو كانت مقيدة لتأسيسها. أخيرًا ، تم عزل الجذور من عقيدا *vulgaris* var. *djedida* و *Nelson* var. على وسط YEM المضاف إلى أحمر الكونغو أنتج 59 عزلة ، 29 منها لم تمتص الصبغة و 27 عزلة لم تمتص. وهكذا ، خلال اختبار الإيماء ، كانت المجموعتان بشكل أساسي قادرتين على إحداث عقدة في صنف جديدة مع تأثير معنوي على نمو النباتات ، ومع ذلك ، كان كل من نشاط إنزيم الفايبيز والعقدة إيجابيًا في 15 سلالة فقط لم تتناول أحمر الكونغو وسلالتين تناولتا أحمر الكونغو (AN37 و AS25B).

**الكلمات المفتاحية :** البقوليات ، الفول ، العقيدات ، الجذور ، الجفاف ، الملوحة ، النيتروجين ، إذابة الفوسفور.

# SOMMAIRE

# Sommaire

	<b>Page</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I - Le haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) et la symbiose légumineuse-microorganismes</b>	<b>5</b>
I Le Haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	5
I.1 Les légumineuses alimentaires	5
I.2 Historique et origine du haricot	6
I.3 Descriptions botanique	7
I.3.1 Le port (tige)	7
I.3.2 Les feuilles	8
I.3.3 Les fleurs	8
I.3.4 Les fruits	8
I.3.5 Les graines	9
I.3.6 Le système racinaire	9
I.4 Le cycle végétatif chez le haricot	10
I.5 Intérêts cultureux de haricot	11
I.5.1 Intérêt agronomique	11
I.5.2 Intérêt alimentaire	11
I.6 Exigence de la culture de haricot	12
I.6.1 Exigence climatique	12
I.6.2 Exigence agronomique	12
I.7 Production mondiale et nationale de haricot	12
I.8 Contraintes majeures de la production de haricot	14
I.8.1 Les facteurs biotiques	15
I.8.2 Les facteurs abiotiques	15
II La symbiose légumineuse-microorganismes	16
II.1 Généralités sur la symbiose légumineuse-rhizobium	16
II.2 Les facteurs affectant l'établissement de la symbiose	16
II.2.1 Les facteurs abiotiques	16
II.2.2 Les facteurs biotiques	17
II.3 Les fertilisants azotés organiques et inorganiques	18
II.4 Les biofertilisants via la symbiose microorganismes chez le haricot	19
II.5 Les microsymbiotes de haricot	22
II.5.1 Les mycorhizes	22
II.5.2 Les rhizobia	22
<b>Chapitre II - Effet de l'eau de mer diluée sur la germination et la croissance des plantules chez trois légumineuses alimentaires (pois, pois chiche et haricot)</b>	<b>24</b>
1 Objectif de l'étude	24
2 Matériels et méthodes	25
2.1 Dispositif expérimental et traitement	25
2.2 Paramètres de germination	25
2.3 Paramètres de croissance des plantules	26
2.4 Analyses statistiques	26
3 Résultats et discussion	27
3.1 Paramètres de germination	27
3.2 Paramètres de croissance des plantules	29
4 Conclusion	32
<b>Chapitre III - Germination et établissement de la racine en relation avec le type et la concentration du sel chez le haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>djedida</i>)</b>	<b>33</b>
1 Objectif de l'étude	33
2 Matériel et méthodes	33
2.1 Dispositif expérimental et application du stress salin	33
2.2 Analyses statistiques	35
3 Résultats et discussion	35
3.1 Cinétique de germination	35

3.2 Pourcentage de germination final	36
3.3 Longueur de la racine pivotante	37
3.4 Nombre de racines secondaires	37
3.5 Poids sec des cotylédons	40
3.6 Poids sec des plantules	41
4 Conclusion	42
<b>Chapitre IV - Effet de la fertilisation azotée sur la croissance, la nodulation et l'infection mycorhizienne à différents stades de développement chez <i>P. vulgaris</i> L. var. <i>djedida</i></b>	<b>43</b>
1 Objectif de l'étude	43
2 Matériel et Méthodes	43
2.1 Emplacement du site de culture	43
2.2 Matériel végétal	45
2.3 Fertilisation	45
2.4 Dispositif expérimental et traitement	45
2.5 Cinétique de croissance, des composants de rendement et de la nodulation	46
2.6 Infection mycorhizienne	48
2.7 Analyses statistiques	50
3 Résultats et Discussion	50
3.1 Caractéristiques du sol avant le semis	50
3.2 Effet de la fertilisation azotée sur la croissance, le rendement et la nodulation	51
3.3. Effet de la fertilisation azotée sur l'infection mycorhizienne	54
3.3.1 Nombre de spores	54
3.3.2 Intensité mycorhizienne et arbusculaire	56
4 Conclusion	59
<b>Chapitre V - Effet de l'engrais azoté sur la croissance, la floraison, la fructification et la nodulation chez trois variétés de haricot commun dans la région aride de Biskra</b>	<b>60</b>
1 Objectif de l'étude	60
2 Matériel et méthodes	60
2.1 Localisation du site de culture	60
2.2 Matériel biologique	61
2.3 Choix de l'engrais azoté	62
2.4 Conception expérimentale et fertilisation	63
2.5 Détermination de la cinétique de croissance	64
2.6 Détermination de certaines composantes de rendement	64
2.7 Analyses statistiques	65
3 Résultats et discussion	65
3.1 Effet de la fertilisation azotée sur la cinétique de développement	65
3.2 Effet combiné des variétés et de la fertilisation sur certains paramètres de rendement	67
4 Conclusion	70
<b>Chapitre VI - Isolement des bactéries à effet PGPR à partir des nodules de haricot commun (<i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>djedida</i>)</b>	<b>71</b>
1 Objectif de l'étude	71
2 Matériel et méthodes	72
2.1 Matériel biologique	72
2.2.1 Lieu et période de l'étude	72
2.2.2 Isolats bactériens	72
2.2.3 Matériel végétal	73
2.2 Méthodologie	73
2.2.1 Isolement des souches bactériennes	73
2.2.2 Test de nodulation et sélection des souches performantes	74
2.2.2.1 Désinfection et semis des graines <i>in vitro</i>	74
2.2.2.2 Préparation de l'inoculum	74
2.2.2.3 Culture et inoculation des plantules <i>in vitro</i>	75
2.2.3 Evaluation de la nodulation et des paramètres de croissance	76
2.2.4 Test de solubilisation du phosphore sur milieu solide	76
2.4 Analyses statistiques	76
3 Résultats et discussion	77



---

3.1 Résultat de l'absorption du rouge Congo	77
3.2 Test de nodulation et d'efficience	78
3.2.1 Nombre de nodules	78
3.2.2 Paramètres morpho-physiologiques	79
3.3 Solubilisation du phosphore	85
3.4 Résumé des résultats	87
4 Conclusion	89
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>90</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>93</b>
<b>Annexe</b>	
<b>Production scientifique</b>	

---

## Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Stades phénologiques chez <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Code BBCH).	10
2	Les principales pathogènes et ravageurs du haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	14
3	Espèces de rhizobiums isolées à l'origine de nodules de <i>Phaseolus vulgaris</i> et de symbiovars de ces espèces nodulant cette légumineuse.	23
4	Effets de différentes concentrations d'eau de mer (SW) chez trois espèces de légumineuses ( <i>P. sativum</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>P. vulgaris</i> ) pendant 8 jours.	29
5	Analyse de variance de l'effet du temps, des espèces ( <i>P. sativum</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>P. vulgaris</i> ) et des traitements à l'eau de mer sur les paramètres de germination.	30
6	Analyse de la variance de l'effet des espèces ( <i>P. sativum</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>P. vulgaris</i> ) et du traitement à l'eau de mer sur la variation des paramètres de croissance chez les plantules.	31
7	Analyse de la variance pour les paramètres étudiés chez <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>djedida</i> en réponse au stress salin utilisant différents types de sel (NaCl, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , CaCO <sub>3</sub> et KCl) à différentes concentrations de (0, 100, 200 et 300 mM).	39
8	Analyse de la variance pour chaque solution saline (NaCl, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , CaCO <sub>3</sub> and KCl) utilisée pour étudier la réponse de <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>djedida</i> au stress salin.	40
9	Données climatiques pendant la période expérimentale dans la région aride d'Aïn Naga (Biskra, Algérie) (WCD Tutienpo, 2019).	44
10	Effet de la fertilisation azotée et du stade de développement sur certains paramètres de croissance chez <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>djedida</i> de la région aride d'Aïn Naga (Biskra, Algérie).	52
11	Fréquence de la mycorhization (F%), intensité de la mycorhization (M%), intensité mycorhizienne des fragments mycorhizés (m%), intensité arbusculaire de la partie mycorhizée (a%) et intensité arbusculaire dans le système racinaire (A%) chez les plantes de <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>djedida</i> soumises à deux niveaux de fertilisation azotée.	56
12	Données climatiques pendant la période expérimentale à Aïn Naga (Biskra).	61
13	Caractéristiques biométriques des graines des trois variétés de haricot communs utilisés dans l'étude.	62
14	Effet de la variété, du stade de croissance et du traitement sur certains paramètres de croissance chez trois variétés de <i>Phaseolus vulgaris</i> dans la région aride de Aïn Naga (Biskra).	66
15	Effets combinés des variétés et de la fertilisation sur le nombre de fleurs, gousses, graines, nodules, poids des graines et indice de rendement par plante chez <i>Phaseolus vulgaris</i> au stade de floraison et de fructification dans la région aride de Aïn Naga (Biskra).	68
16	Résumé du test de nodulation et de solubilisation du phosphore des souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.	88
17	Résumé du test de nodulation et de solubilisation du phosphore des souches qui ont absorbé le rouge Congo.	88

## Liste des Figures

Figure	Titre	Page
1	Stades de développement du haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).	9
2	Production de légumes secs par type en Algérie (2016-2017).	13
3	Effets de diverses concentrations d'eau de mer (0 à 100%) sur la cinétique de germination de trois légumineuses ( <i>P. sativum</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>P. vulgaris</i> ) dans des boîtes de Pétri sur une période de 8 jours.	27
4	Dispositif expérimental et mesures.	34
5	Effet de différents types de solutions salines (NaCl, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , CaCO <sub>3</sub> et KCl) à différentes concentrations de (0, 100, 200 et 300 mM) sur la cinétique de germination de <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>djedida</i> après 10 jours d'incubation dans des boîtes de Pétri.	36
6	Effet d'interaction des types et des concentrations de sel sur: (A) le pourcentage de germination final, (B) la longueur de la racine pivotante, (C) le nombre de racines secondaires, (D) le poids sec des cotylédons et (E) le poids sec des plantules chez <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>djedida</i> après 10 jours d'incubation dans des boîtes de Pétri.	38
7	Localisation du site de l'expérimentation.	44
8	Préparation du terrain de la culture de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>djedida</i> , installation du système d'arrosage goutte à goutte et démarrage du semis à Aïn Naga, Biskra.	46
9	Les différentes périodes d'échantillonnage des plants de haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>djedida</i> ) in situ (Aïn Naga, Biskra). (A) stade 2-4 feuilles, (B) stade floraison et (C) fructification.	47
10	Racines de <i>P. vulgaris</i> var. <i>djedida</i> colorées au bleu trypan 0.1%.	48
11	Notation du degré de mycorhization des fragments de racine. L'échelle va de 0 (pas de mycorhization) jusqu'à 5 (au moins 90% du fragment est mycorhizé).	49
12	Notation de l'abondance des arbuscules dans les fragments de racines.	49
13	Plantes de <i>P. vulgaris</i> var. <i>djedida</i> montrant l'effet de la fertilisation azotée sur la croissance et la densité des plantes dans la région aride d'Aïn Naga (Biskra).	53
14	Nodules de <i>P. vulgaris</i> L. var. <i>djedida</i> au stade fructification (sans fertilisation azotée).	54
15	Microphotographies de spores de champignons mycorhiziens à arbuscules isolées à partir de sols rhizosphériques de <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>djedida</i> .	55
16	Effet de la fertilisation azotée (Urée 46) sur le nombre de spores pour 100 g de sol rhizosphérique extrait du haricot commun ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>djedida</i> ) à différentes périodes de croissance (y compris avant le semis).	56
17	Microphotographies de structures de champignons mycorhiziens arbusculaires dans le cortex racinaire chez <i>P. vulgaris</i> L. var. <i>djedida</i> : arbuscules (A), hyphes (B), vésicules (C, D).	57
18	Graines des différentes variétés de <i>Phaseolus vulgaris</i> utilisées dans l'étude : (A) <i>Djedida</i> , (B) <i>Nelson</i> et (C) <i>Jalila</i> .	62
19	Dispositif expérimental et application de l'engrais azoté :(3 variétés de <i>Phaseolus vulgaris</i> × 2 niveaux de fertilisation × 4 répétitions).	63
20	Aperçu général de la conception expérimentale des différentes étapes de développement du haricot commun à Aïn Naga (Biskra).	64
21	Racines de haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>djedida</i> ) avec des nodules dans la région de Aïn Naga (Biskra).	72
22	Echantillons de plantes ayant servies pour l'étude des rhizobia et leur conservation. (A) Plants de haricot prélevés in natura de la région de Aïn Naga (Biskra). (B) Nodules de haricot conservés dans des tubes contenant du glycérol (60%).	72
23	Ecrasement des nodules sur le milieu YMA contenant du rouge Congo.	73
24	Graines de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>djedida</i> mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant une eau gélosée 0.8%.	74
25	Préparation de l'inoculum. (A) Isolat SN14 sur le milieu YEM solide après 3 jours d'incubation à 28°C. (B) Repiquage de l'isolat SN14 sur le milieu YEM liquide.	74

---

26	Graines de <i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>djedida</i> après 4 jours de germination à température ambiante et à l'obscurité.	75
27	Mise en culture et inoculation des plantules de <i>Phaseolus vulgaris</i> variété <i>djedida</i> .	75
28	Aspect des isolats sur milieu YMA contenant du rouge Congo. (A) Aspect de l'isolat SN10 qui n'absorbe pas le rouge Congo. (B) Aspect de l'isolat AN11 qui absorbe le rouge Congo.	77
29	Souches isolées à partir des nodules de <i>P. vulgaris</i> var. <i>djedida</i> sur milieu YEM solide sans le rouge Congo. (A) Souche SN10 ; (B) Souche AN11.	77
30	Plantes de <i>Phaseolus vulgaris</i> âgées de 2 semaines (à gauche) et de 4 semaines (à droite).	78
31	Nodules obtenus des racines de <i>P. vulgaris</i> L. var <i>djedida</i> inoculé avec la souche SN33.	78
32	Nombre de nodules par plantes de <i>Phaseolus vulgaris</i> âgées de 50 jours et inoculées avec les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.	80
33	Longueurs (cm) de la racine et de la tige principale des plants de <i>P. vulgaris</i> âgées de 50 jours inoculées avec les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.	80
34	Nombre de feuilles et de gousses par plant de <i>P. vulgaris</i> âgées de 50 jours et inoculées avec les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.	80
35	Nombre de nodule par plantules de <i>P. vulgaris</i> âgées de 50 jours inoculées avec les souches qui ont absorbé le rouge Congo.	81
36	Longueur (cm) de la racine et de la tige principale des plants de <i>P. vulgaris</i> âgées de 50 jours inoculées avec les souches qui ont absorbé le rouge Congo.	81
37	Nombre de feuilles et de gousses par plant de <i>P. vulgaris</i> âgées de 50 jours et inoculées avec les souches qui ont absorbé le rouge Congo.	81
38	Poids sec des différentes parties des plants de <i>P. vulgaris</i> âgées de 50 jours et inoculées avec les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.	82
39	Poids sec des différentes parties des plants de <i>P. vulgaris</i> âgées de 50 jours et inoculées avec les souches qui ont absorbé le rouge Congo.	84
40	Indice de solubilisation du phosphore de toutes les souches isolées à partir des nodules de <i>P. vulgaris</i> .	86
41	Test qualitatif de solubilisation du phosphore sur milieu PVK solide. (A) Souche AS23 avec absence de solubilisation du phosphore. (B) Souche SN3 avec solubilisation du phosphore en créant un halo jaune.	86

---

## Liste des Abréviations

### Abréviations

---

A%	Intensité arbusculaire dans le système racinaire
a%	Intensité arbusculaire de la partie mycorhizienne
ABA	Acide abscissique
AMF	Champignons mycorhiziens arbusculaires
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt et Chemische Industrie
BCMV	Virus de la mosaïque commune du haricot
BCTV	Virus du sommet bouclé du haricot
BGMV	Virus de la mosaïque dorée du haricot
BSP	Bactéries solubilisant le phosphate
BYMV	Virus de la mosaïque jaune du haricot
CaCl <sub>2</sub>	Dichlorure de calcium
CaCO <sub>3</sub>	Carbonate de calcium
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Carbonate
COTYDW	Poids sec des cotylédons
DDL	Degré de Liberté
DW	Poids sec
ERM	Mycélium extraradical
ES	Efficacité de la solubilisation
F%	Fréquence de mycorhization
FERT	Fertilisation
FGP	Taux de germination final
FLO	Floraison
FRU	Fructification
FW	Poids frais
GES	Gaz à effet de serre
GLM	Modèle linéaire généralisé
GRI	Indice de taux de germination
GS	Stade de croissance
HARVEST	Indice de rendement
HCN	Cyanure d'hydrogène
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonate
HI	Indice de rendement
IAA	Acide indole acétique
IRAD	Institut de Recherche Agronomique pour le Développement
ITGC	Institut Technique des Grandes Cultures
KCl	Chlorure de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
LR	Longueur de la racine
LTR	Longueur de la racine principale
M%	Intensité de la mycorhization
m%	Intensité mycorhizienne des fragments mycorhizés
MC	Teneur en humidité (en eau)
Mg <sup>+2</sup>	Magnésium
MGT	Temps moyen de germination
mM	Millimole
Mn	Manganèse
N <sub>2</sub>	Diazote (azote atmosphérique)
N <sub>2</sub> O	Protoxyde d'azote
Na <sup>+</sup>	Sodium
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaClO	Hypochlorite de sodium
NBG	Nombre de gousse

---

---

NBGG	Nombre de graines par gousse
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrate
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentoxyde de phosphore
PFG	Poids frais des gousses (sans graines)
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PVK	Pivovskaya
PMV	Virus de la marbrure des gousses
PSG	Poids sec des gousses (sans graines)
PSGr	Poids sec des graines par plante
PSM	Micro-organismes solubilisant le phosphate
RDW	Poids sec des racines
RFW	Poids frais des racines
RL	Longueur des racines
RMC	Teneur en eau des racines
SBMV	Virus de la mosaïque du haricot austral
SDW	Poids sec des tiges
SECROOT	Nombre de racines secondaires
SFW	Poids frais des tiges
SL	Longueur des tiges
SDW	Poids sec des plantules
SMC	Teneur en humidité des tiges
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfate
SP	Espèce
TCP	Phosphate tricalcique
TRT	Traitement
VEG	Végétative
WCD	World climatic data
YMA	Yeast Mannitol Agar

---

INTRODUCTION

**INTRODUCTION**

GENERALE

**GENERALE**

## Introduction générale

Les légumineuses alimentaires jouent un rôle important dans les systèmes de culture et dans le régime alimentaire des populations y compris pour la population algérienne (Sinclair et Vadez, 2012; World Health Organization, 2020; Vasconcelos *et al.*, 2020). En Algérie, les légumineuses couvrent une superficie de 79.600 ha pour une production de 832.000 quintaux. Les besoins sont estimés à 2.8 millions de quintaux dont 30% sont produits localement et 1.9 millions de quintaux sont importés pour un prix de 234 millions DA. A cet effet, l'état a souhaité être autonome afin de satisfaire ses besoins et réduire les importations en élaborant un programme s'étalant de 2016 jusqu'à 2021 dans le but d'augmenter la superficie des légumineuses à 218.000 hectares au niveau national (Ait Allouache, 2020). L'intérêt porté aux légumineuses revient à côté de leur prix bas ainsi que de leur richesse en protéines et en fibres alimentaires tout en étant pauvre en matière grasse. Ils contiennent également plusieurs micronutriments et composés phytochimiques qui présenteraient divers avantages pour la santé (Messina, 1999; Cheng *et al.* 2020). D'après une étude récente de Zhang *et al.* (2020), certaines légumineuses alimentaires ont des capacités antioxydantes comme le haricot velours de Hechi.

Les légumineuses entretiennent également une relation étroite et très privilégiée avec la rhizosphère (Taylor *et al.*, 2020). Leur intérêt agronomique résulte de leur capacité à établir une symbiose mutualiste avec des bactéries appartenant à la famille *Rhizobia* pour l'utilisation de l'azote atmosphérique comme source d'azote (Gaur et Sen, 1979; Giri et Joshi, 2010; Iantcheva *et al.*, 2013; Andrews & Andrews, 2017; Sabagh *et al.*, 2020). On estime qu'environ 40 à 60 millions de tonnes métriques d'azote atmosphérique sont fixées annuellement par les légumineuses cultivées (Robertson *et al.*, 2013). En effet, cette symbiose leur permet de produire des protéines en abondance même en absence de fertilisation azotée (Pérez-Montañó *et al.*, 2014, Kumar *et al.*, 2020). Ils jouent par conséquent un rôle clé dans la rotation des cultures (Nemecek *et al.*, 2015; Kebede *et al.*, 2020).

En Algérie, les faibles rendements sont principalement dus aux fluctuations de l'environnement enregistrées au cours des différentes saisons (Lakdhary, 2009). En effet, le climat algérien se caractérise par des précipitations irrégulières dans le temps et l'espace, ainsi qu'une tendance à plus d'aridité et donc un impact accru de la sécheresse (Kheloufi *et al.*, 2018). Ces conditions sont considérées comme des facteurs de perte de production partielle ou totale (Famarzi *et al.*, 2013). Les stress abiotiques tels que la sécheresse, la salinité, les températures extrêmes, la toxicité chimique et le stress oxydatif sont de graves menaces pour l'agriculture et entraînent une détérioration de l'environnement (Kusvuran *et al.*, 2016; Yadav *et al.*, 2020; Basu et Kumar *et al.*, 2020). Le stress abiotique est la principale cause de pertes de récoltes dans le



monde, réduisant les rendements moyens de la plupart des grandes cultures (Lobell, 2014; Wien, 2020). En effet, la sécheresse et la salinité se répandent dans de nombreuses régions et peuvent entraîner une sérieuse salinisation de plus de 50% de toutes les terres arables d'ici 2050 (Galford *et al.*, 2010). Munns (2005) a estimé plus de 800 millions d'hectares de terres sont affectés par la salinité au niveau mondial. Le stress abiotique peut entraîner à son tour une série de changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires qui affectent la croissance et la productivité des plantes (Zandalinas *et al.*, 2018; Boscaiu et Fita, 2020).

L'identification et la sélection de certaines variétés de légumineuses cultivées et tolérantes aux principaux facteurs limitant tel le déficit hydrique et le stress salin s'avère donc cruciale pour l'économie du pays. Parmi ces légumineuses, le haricot ou le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) reconnu comme l'une des espèces les plus anciennes en représentant une partie importante du régime alimentaire chez l'homme (Bevilaqua et Antunes, 2015). En plus de son intérêt comme l'une des principales légumineuses fournissant de l'énergie, les haricots sont également une source importante de protéines dans les pays en développement (Blair, 2013; Priya et Manickavasagan, 2020). Selon Alkama (2010), la culture du haricot commun (*P. vulgaris*) peut jouer un rôle important dans les systèmes agricoles en Algérie, bien que sa production reste marginalisée par la forte instabilité des rendements due au déficit hydrique et à la carence en phosphore, qui caractérisent la plupart des régions méditerranéennes. En plus de ces contraintes, on estime qu'environ 5 à 30% des régions de production de haricots communs sont affectées par la salinité du sol (Egamberdieva, 2011; Mansouri et Kheloufi, 2017; Mansouri *et al.*, 2019). En effet, la salinité peut inhiber la croissance et réduire le rendement du haricot commun en raison de la toxicité ionique, du déséquilibre osmotique et du potentiel hydrique réduit des plantes (Flowers et Yeo, 1986; Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2003; Rady et Mohamed, 2015; Arteaga *et al.*, 2020).

Afin d'atténuer ces facteurs environnementaux et d'augmenter les rendements, les agriculteurs se sont orientés vers l'usage des engrais chimiques. Cependant, un manque de connaissances nécessaires en termes de propriétés du sol, l'utilisation des engrais industriels pourront affecter à long terme les propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sol (Giller *et al.*, 1998; Bünemann *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2015; Luan *et al.*, 2020). Ce changement dans la diversité et la densité des microorganismes du sol reflète un changement profond de la fertilité du sol (Patra *et al.*, 2006; Islam *et al.*, 2009; Gorovtsov *et al.*, 2019). Les champignons mycorrhiziens et les bactéries fixatrices d'azote sont parmi les indicateurs microbiologiques les plus sensibles aux changements dans la disponibilité des nutriments dans le sol (Chen *et al.*, 1991; Jeffries *et al.*, 2003; Osorio Vega, 2007; Mbuthia *et al.*, 2015; Meena *et al.*, 2020). En

effet, ces deux principales composantes sont fortement impliquées dans le cycle biogéochimique et l'amélioration de la croissance des plantes et ceci même sous des conditions stressantes de l'environnement (Azcón-Aguilar et Barea, 1992; Nadeem *et al.*, 2014; Afkhami *et al.*, 2020).

De nombreuses recherches récentes ont montré que le développement et la productivité ainsi que la qualité des gousses de haricots communs sont fortement liés à la symbiose que la plante établit avec les sol bénéfique micro-organismes, y compris les bactéries fixatrices d'azote et les champignons endomycorhiziens à vésicules et à arbuscules (Garg et Chandel, 2011; Porcel *et al.*, 2012; Muleta, 2017; Massa *et al.*, 2020; Amin *et al.*, 2020). D'autres recherches ont indiqué que le haricot commun est une légumineuse qui nodule légèrement ou avec difficulté, et donc sa culture nécessite un amendement d'engrais azoté (George et Singleton, 1992; Fustec *et al.*, 2010; Osdaghi *et al.*, 2011; García-Garijo *et al.*, 2014; Pastor-Bueis *et al.*, 2019; Mansouri *et al.*, 2020).

Dans ce travail, nous avons tous d'abord procédé à une sélection d'une légumineuse comme matériel végétal de notre étude et c'est le haricot *Phaseolus vulgaris* qui a été choisi parmi deux autres légumineuses alimentaires à savoir le petit pois (*Pisum sativum*) et le pois chiche (*Cicer arietinum*). En effet, le haricot commun et précisément la variété *Djedida* a été sélectionné suite à ses capacités de germer dans 50% de l'eau de mer avec une stabilité dans sa croissance au stade émergence des plantules. Cette **première étude** a été réalisé afin de caractériser la tolérance de ces trois légumineuses à la salinité générée par un tout autre facteur environnemental que la sécheresse. En effet, cette étude préliminaire vise la production agricole proches du littoral où le facteur de l'intrusion de l'eau de mer s'avère aussi important que la salinité des zones arides et semi-arides en Algérie (Mansouri et Kheloufi, 2017). Suite à cette sélection et avant de passer au champ, les graines de haricot ont fait l'objet d'une seconde étude qui est l'effet de cinq sels (les plus dominant dans le sol) sur la germination des graines de *P. vulgaris* var. *djedida*. Cette **seconde étude** a été entrepris dans le but de caractériser la tolérance de cette légumineuse aux conditions de culture dans un climat aride de la région de Biskra, qui est connu pour ses terres salines.

Le **troisième objectif** est l'étude de l'effet des facteurs abiotiques *in vivo* (engrais azoté chimique, propriétés du sol, salinité, ...) sur le développement et les capacités symbiotiques de *Phaseolus vulgaris* dont la nodulation et la mycorhization. Le **quatrième objectif** est l'étude de l'effet biotique représenté par le facteur variété. C'est une enquête nodulaire réalisé toujours au champ à Aïn Naga (Biskra) avec en plus de la variété *Djedida*, deux autres variétés de haricot commun à savoir les variétés *Nelson* et *Jalila*. Dans le même contexte, nous avons profité de

tester une seconde fois l'effet abiotique du fertilisant chimique azoté afin d'élire la variété quiodule le mieux sous ces conditions avec un meilleur rendement en termes de biomasse sèche, production de gousses et de graines et d'indice de rendement. Le **cinquième et dernier objectif** est l'isolement et caractérisation de bactéries nodulant le haricot (*P. vulgaris* var. *djedida*) et des bactéries à effet PGPR à partir des nodules récoltés *in vivo* lors du premier test au champ.

Afin d'étudier l'effet des facteurs biotiques et abiotiques sur la nodulation chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), ce document est arrangé sous forme de cinq chapitres. Chaque chapitre commence par une introduction et se termine par une conclusion qui concernera la thématique du chapitre proposé. Une conclusion générale est rédigée à la fin du document et fera l'objet de synthèse des différents chapitres. Nous avons procédé par un ordre chronologique décrit comme suit : **Le premier chapitre** met l'accent sur les avantages des légumineuses alimentaires et illustre les principales façons par lesquelles les légumineuses contribuent à la sécurité alimentaire, à la nutrition, à la santé humaine et environnementales y compris à la lutte contre les changements climatiques et à la biodiversité, puis il se focalise sur le haricot (*Phaseolus vulgaris*) tout en donnant un aperçu sur ses caractéristiques botaniques et culturaux ainsi ses intérêts agronomiques et alimentaires mais aussi sur les contraintes dont il fait face. Ce chapitre se clôturera par les propriétés symbiotiques de *P. vulgaris* avec notamment les rhizobia et leur capacité à fixer le l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) et son avantage *vis-à-vis* de l'environnement et les contraintes qui estompe l'établissement de cette symbiose. **Le second chapitre** concerne l'effet d'eau de mer sur la germination de trois légumineuses alimentaires, tout en exposant l'action de l'un des facteurs abiotiques qui est la salinité sur les plantes. **Le troisième chapitre** est consacré à l'effet du type et de la concentration du sel sur la germination et l'émergence des plantules chez *P. vulgaris* variété *Djedida*. **Le quatrième chapitre** étudie l'effet de la fertilisation azotée chimique sur la nodulation et l'infection mycorhiziennes à différents stades de développement (végétative, floraison et fructification) chez *P. vulgaris* sous un climat aride de la région de Aïn Naga (Biskra). Suite aux résultats obtenus, **un cinquième chapitre** concernera l'effet de l'engrais azoté chimique sur la croissance, la floraison, la fructification et la nodulation chez trois variétés de haricot commun sous le même climat. **Le sixième et dernier chapitre** est consacré à l'isolement des bactéries associées à *P. vulgaris* var. *djedida* à partir des nodules récoltés *in vivo* particulièrement les rhizobiums ainsi que les bactéries à effet PGPR. Enfin, **une conclusion générale** englobera les conclusions pertinentes retenues pour chaque étude et qui se terminera par des perspectives. Les différents articles scientifiques publiés au cours de la réalisation de cette thèse sont classés à la fin du document dans la section production scientifique.

# CHAPITRE : I

## Chapitre I - Le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) et la symbiose légumineuse-microorganismes

### I Le Haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)

#### I.1 Les légumineuses alimentaires

La famille des légumineuses ou fabacées renferme environ 20 000 espèces (Sierra et Tournebize, 2019). Il s'agit de plantes dicotylédones, qui sont largement valorisées pour l'alimentation animale et humaine. Dans le domaine agricole, on distingue 2 types de légumineuses : les légumineuses fourragères (luzerne, trèfles) et les légumineuses alimentaires. Ces dernières se divisent en 3 groupes : les « légumes secs » (lentilles, pois cassés, pois chiches, fèves, haricots secs...), les oléagineux (arachide, soja ...) et les légumes à gousses (petit pois, haricots verts...) (Rémond et Walrand, 2017).

Les légumineuses sont considérées comme la deuxième source alimentaire la plus importante après les céréales (Kouris-Blazos *et al.*, 2016). Elles sont très appréciées en raison de leur faible teneur en matières grasses et leur richesse en protéines (20 à 45%) avec des acides aminés essentiels, des glucides complexes ( $\pm$  60%), des fibres alimentaires (5 à 37%), des minéraux et des vitamines essentiels (Maphosa et Jideani, 2017). Les légumineuses ont obtenu la nomination de viande maigre pour les pauvres (IRAD, 2013) et leur incorporation dans les régimes alimentaires, en particulier dans les pays en développement, pourrait jouer un rôle majeur dans l'éradication de la malnutrition (Maphosa et Jideani, 2017). En plus de leur supériorité nutritionnelle, les légumineuses se voient également attribuer des rôles économiques, culturels, physiologiques et médicaux en raison de leur possession de composés bioactifs bénéfiques (Phillips, 1993; Bouchenak et Lamri-Senhadji, 2013; Rémond et Walrand 2017). En effet, des recherches ont montré que la plupart des composés bioactifs des légumineuses ont des propriétés antioxydantes (Zhang *et al.*, 2020), qui jouent un rôle dans la prévention de certaines maladies (Lee et Lee, 2009; Maphosa et Jideani, 2017).

Les plantes de la famille des légumineuses offrent un avantage dans le maintien de la fertilité des sols et le développement de systèmes de culture efficaces grâce à leur capacité d'établir une symbiose avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium* (Gebhard *et al.*, 2013; Reckling *et al.*, 2020). Cette association aboutit à la fixation de l'azote atmosphérique, qui représente un réel intérêt économique et écologique (Cortignani et Dono, 2020), ainsi qu'une solution alternative à l'utilisation d'engrais azotés chimiques (Sierra et Tournebize, 2019). Les légumineuses sont également classées comme cultures attractives pour les pollinisateurs et participent ainsi au service écosystémique de pollinisation (Decourtye *et al.*, 2010). D'autre part les systèmes racinaires pivotants des légumineuses peuvent également contribuer à la

structuration du sol (Köpke et Nemecek, 2010) comme ils sont le siège de symbiose avec les rhizobiums et les mycorhizes (Azcón et Al-Atrash, 1997; Xiao *et al.*, 2019 ; Sharma *et al.*, 2020). Cette relation symbiotique aide les plants à absorber plus d'eau et de nutriments, comme le phosphore et l'azote, et à augmenter le processus de nodulation pour les rhizobiums (de Novais *et al.*, 2020; Giovannini *et al.*, 2020).

L'incorporation de légumineuses dans la rotation des cultures augmente considérablement la production agricole sans intrants supplémentaires (Gathumbi *et al.*, 2002; Papastylianou, 2004; Ojiem *et al.*, 2007). De ce fait, la productivité des céréales en rotation avec les légumineuses est largement utilisée pour l'amélioration de la fertilité et de la santé des sols en réduisant les pertes d'azote et la lixiviation des nutriments (Drinkwater *et al.*, 1998; Sarabia *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Bryant *et al.*, 2020). Ainsi, la rotation des cultures avec les légumineuses est conçue comme une source de diversification et d'élimination des cycles des maladies, des ravageurs et des mauvaises herbes (Yusuf *et al.*, 2009; Franke *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020), générant ainsi une amélioration de la sécurité alimentaire et des revenus économiques (David, 1999; Nyabyenda, 2005, Reckling *et al.*, 2020). Des augmentations de rendement des céréales suite à la rotation des légumineuses ont déjà été rapportées par plusieurs travaux de recherches (Bagayoko *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2020; Cortignani et Dono, 2020, Muzangwa *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2020).

Un autre exemple concernant la contribution des légumineuses en association et pas en rotation dans l'économie comme dans l'écologie à travers les travaux de Sarabia *et al.* (2020) qui ont montré que la qualité du fourrage a pu augmenter de plus de 100% par rapport aux pâturages en monoculture et ceci grâce à l'association des légumineuses et des graminées fourragères. Par conséquent, les coûts de production liés à l'achat de céréales importées et d'engrais azotés sont réduits; ainsi que les émissions de gaz à effet de serre (GES). En résumé, les légumineuses détiennent une place considérable en raison de leurs vertus dans tous les domaines (alimentaires, agronomiques, économiques et écologique) en favorisant la durabilité de l'agriculture, en contribuant à atténuer le changement climatique et en encourageant la biodiversité, que l'on considère désormais comme engrais vert (Naher *et al.*, 2020; N'guessan *et al.*, 2020).

## **I.2 Historique et origine du haricot**

Selon la répartition géographique, la plupart des espèces appartenant au genre *Phaseolus* sont originaire d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud (Andes) (Freytag et Debouck, 2002; Delgado-Salinas *et al.*, 2006). Il fut par la suite introduit en Europe et en Afrique par les espagnols et les portugais au 16<sup>ème</sup> siècle (Wortmann *et al.*, 1998; Nyabyenda, 2005). Le genre

*Phaseolus* est grand, comprenant environ 80 espèces cultivées et sauvages, mais *P. vulgaris* est l'espèce la plus cultivée (Purseglove, 1968; Bailey, 1975; Freytag et Debouck, 2002; Porch *et al.*, 2013).

La première description botanique du Haricot commun fut par les botanistes Tragus et Fuchs en 1542, sous le nom de *Smilax hortensis*. Le nom générique de *Phaseolus* a été introduit par Carl Linné en 1753, et avait classé les haricots à son époque en deux genres *Phaseolus* et *Dolichos*. Il répertorie 11 espèces de *Phaseolus* dont 6 espèces cultivées et 5 espèces sauvages. Après diverses révisions taxonomiques, The Plant List a conservé trois noms d'espèce de Linné : la première *Phaseolus vulgaris* qui est le haricot commun, la seconde *Phaseolus coccineus* qui est le haricot d'Espagne, et la dernière *Phaseolus lunatus* qui est le haricot de Lima. Les autres binômes ont été traités comme non acceptés, non résolus ou bien ont été reclassés dans les genres *Vigna* ou *Glycine*. Actuellement, les haricots d'origine asiatique du genre *Phaseolus* ont été transférés au genre *Vigna*, si bien que l'adoption d'une conception restrictive du genre *Phaseolus* en fait un genre homogène et exclusivement américain.

### I.3 Descriptions botanique

Le Haricot, ou Haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.), est une espèce de plantes annuelles de la famille des Fabaceae (Papilionacées), du genre *Phaseolus*, et selon la classification décrite par Chaux et Foury (1994) et Charles (1998), la position taxonomique du haricot est la suivante :

Règne : Plantae

Super division : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Phaseolus*

Espèce : *Phaseolus vulgaris* L.

Le haricot est une est une plante herbacée, annuelle, qui est composée de :

#### I.3.1 Le port (tige)

Selon le type de port on distingue deux grands groupes (Ecocrop, 2013) :

**Les haricots grimpants** (à croissance déterminée, dits haricots à rames) : Au port volubile, ils ont l'avantage d'occuper peu de place et la cueillette des gousses est à portée de main. En revanche, les haricots grimpants développent de très longues tiges qui s'enroulent autour de leur support dans le sens inverse des aiguilles d'une montre et qui peuvent grimper à plus de deux mètres de haut ce qui nécessite l'installation des tuteurs peut s'avérer compliqué.



*Les haricots nains* (à croissance indéterminée) : A port érigé et plus ramifié, prenant un port buissonnant ou dressé, dont la taille ne dépasse pas 60 cm de haut et qui est la forme privilégiée en grande culture.

### **I.3.2 Les feuilles**

Les feuilles sont composées de 3 folioles (trifoliées) ovales se terminant en pointe, mesurant de 7.5 à 14 cm. Les deux premières feuilles au sommet de l'hypocotyle sont simples. Les feuilles suivantes sont composées et disposées de façon alterne (Kroll, 2000).

### **I.3.3 Les fleurs**

Les fleurs sont de type papilionacé, blanc, rose, jaune, rouge ou violacées selon les variétés (Ecoport, 2013). Elles sont groupées en grappes de 4 à 10 fleurs, naissant à l'aisselle des feuilles. Elles restent naturellement fermées et étant hermaphrodites, l'autofécondation est donc prépondérante. Ceci permet une maintenance de variétés et de lignées pures et une fois pollinisée, chaque fleur donne naissance à une gousse. Les 10 étamines sont organisées en deux groupes : neuf d'entre elles sont soudées par le filet, la dixième étant libre. L'ovaire, supère, est formé d'un seul carpelle à placentation pariétale. Les ovules sont fixés sur la suture ventrale.

### **I.3.4 Les fruits**

Les fruits sont des gousses « cosses » déhiscentes de forme et de longueur variable refermant 4 à 8 graines. En particulier leur section peut être cylindrique, ovale ou aplatie (haricots plats) (Wortmann, 2006). Chez certaines variétés, se développent des structures fibreuses qui forment à un stade de maturité plus ou moins avancé le « fil » et le « parchemin ». On distingue ainsi :

*Les variétés à parchemin* qui sont des haricots verts filets dont les gousses selon les variétés, varient entre le jaune (haricots beurre), le vert et le violet vertes, longues, extra-fines ne peuvent être consommées qu'en grain. Ou en haricots verts à condition de récolter les gousses très jeunes (tous les 2 jours) avec un arrosage et des soins attentifs pour que leurs qualités gustatives soient optimums car ils prennent le fil rapidement en grossissant, ou lorsque les conditions culturales ne leur conviennent pas.

*Les variétés sans parchemin* sont dites haricots verts mangetout dont les gousses sont de couleur vertes, violettes ou jaunes (haricot beurre), moins longues que les haricots filets, ne prennent pas le fil et la gousse reste tendre (sans parchemin). On peut donc les manger plus gros que les haricots filets à un stade de maturité plus avancé correspondant au début de la formation des graines. De saveur moins fine, leur rendement est cependant souvent meilleur et les récoltes peuvent être espacées. Ce sont généralement les variétés de mangetout qui supportent le mieux la congélation.



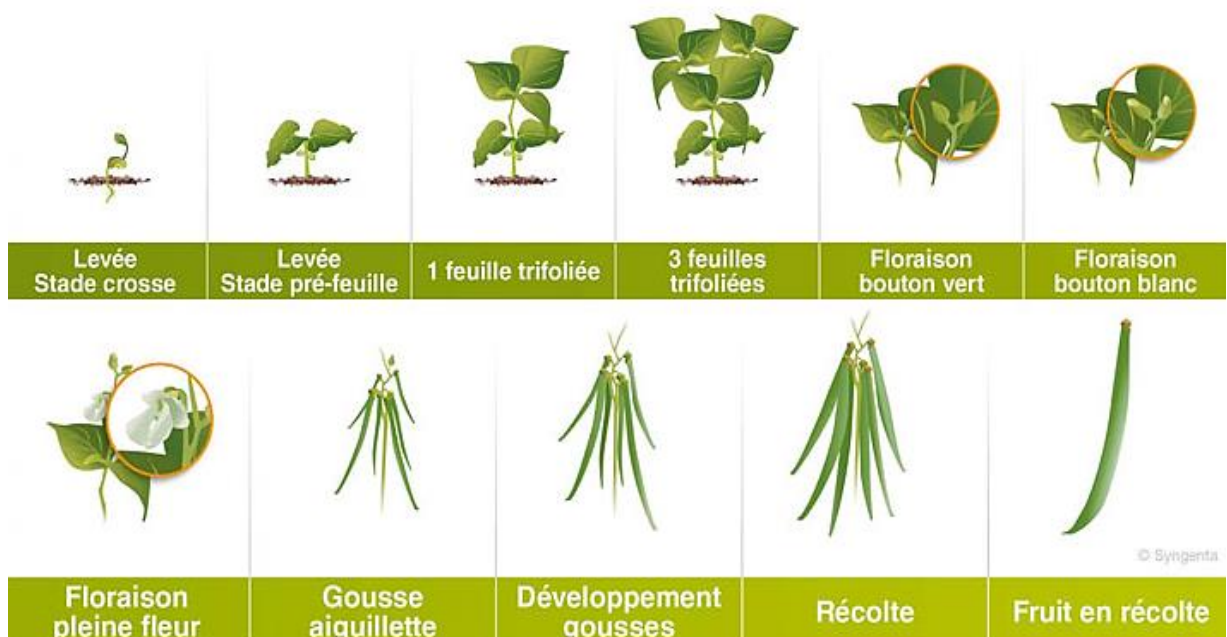
*Des variétés plus récentes* sont issues de croisements entre les deux groupes et sont appelées haricots filet-mangetout ou « filets sans fil » ou « faux filets ». Les gousses rappellent celles des haricots filets en vert plus clair. L'apparition du fil est plus tardive que chez ces derniers.

### I.3.5 Les graines

Les graines chez le haricot sont de taille, de forme et de couleur variable selon les variétés. Respectivement, la taille des graines pour les petites sont inférieure à 25 g/100 graines, les moyennes oscillent entre 25 à 40 g/100 graines et les grandes sont supérieures à 40 g/100 graines, dont la forme la plus commune est dite « réniforme », typique des haricots. On peut rencontrer des grains plus sphériques (d'où l'appellations locales de données à certaines variétés de pois). Les graines de haricot sont brillantes et opaques dont la couleur est : blanche, crème, beige, jaune, brune, marron, rose, rouge, pourpre ou violet et noir. La germination des haricots est dite épigée (les cotylédons émergent au-dessus du sol) et les graines peuvent garder leur faculté germinative de 3 à 5 ans (Nyabyenda, 2005).

### I.3.6 Le système racinaire

La plante se développe à partir d'une racine principale non dominante qui est très rapidement complétée de racines latérales. Le système racinaire explore principalement la zone entre 20 et 30 cm mais les racines peuvent atteindre une profondeur variante entre 45 et 70 cm. La partie racinaire du haricot est le siège du phénomène de nodulation, qui sont des excroissances provoquées par l'infection des rhizobiums d'où sa capacité à fixer l'azote du sol.



**Figure 1.** Stades de développement du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) (Feller *et al.*, 1995).

## I.4 Le cycle végétatif chez le haricot

**Tableau 1.** Stades phénologiques chez *Phaesolus vulgaris* L. var. *nanus* (Code BBCH) (Feller *et al.*, 1995).

<b>Stade principal 0</b>		<b>Germination</b>
00		Semence sèche
01		Début de l'imbibition de la graine
03		Imbibition complète
05		La radicule sort de la graine
07		Hypocotyle et cotylédons percent les téguments de la graine
08		Hypocotyle et cotylédons se dirigent vers la surface du sol
09		Levée : les cotylédons percent la surface du sol
<b>Stade principal 1</b>		<b>Développement des feuilles</b>
10		Les cotylédons sont étalés
12		2 feuilles sont étalées (une paire de feuilles est étalée)
13		3 feuilles étalées (première feuille trifoliolée)
13-19		Et ainsi de suite...
19	9 ou davantage de feuilles étalées (2 feuilles simples et 7 ou davantage de feuilles trifoliolées)	
<b>Stade principal 2</b>		<b>Formation de pousses latérales</b>
21		La première pousse latérale est visible
22		2 pousses latérales sont visibles
23		3 pousses latérales sont visibles
29		Et ainsi de suite...
<b>Stade principal 5</b>		<b>Apparition de l'inflorescence</b>
51		Les premiers boutons floraux sont visibles et dépassent les feuilles
55	Les premiers boutons floraux individuels, mais toujours fermés sont visibles et dépassent les feuilles	
59	Les premiers pétales sont visibles, les boutons floraux sont nombreux mais toujours fermés	
<b>Stade principal 6</b>		<b>La floraison</b>
60		Les premières fleurs sont ouvertes (sporadiquement)
61		Début de la floraison (2)
62		20% des fleurs sont ouvertes (1)
63		30% des fleurs sont ouvertes (1)
64		40% des fleurs sont ouvertes (1)
65		Pleine floraison : 50% des fleurs sont ouvertes (1) Période de floraison principale (2)
67		La floraison s'achève : la majorité des pétales sont tombés ou desséchés (1)
69		Fin de la floraison : les premières gousses sont visibles (1)
<b>Stade principal 7</b>		<b>Développement du fruit</b>
71	10% des gousses ont atteint leur longueur finale (1)	Début du développement des gousses (2)
72		20% des gousses ont atteint leur longueur finale (1)
73		30% des gousses ont atteint leur longueur finale (1)
74		40% des gousses ont atteint leur longueur finale (1)
75	50% des gousses ont atteint leur longueur finale, les graines commencent à remplir la gousse (1)	
76		60% des gousses ont atteint leur longueur finale (1)
77	70% des gousses ont atteint leur longueur finale, les gousses se cassent proprement (1)	
78		80% des gousses ont atteint leur longueur finale (1)
79	Les gousses ont atteint leur longueur finale, les haricots sont visibles individuellement (1)	
<b>Stade principal 8</b>		<b>Maturation des fruits et graines</b>
81	10% des gousses sont mûres (les gaines sont dures) (1)	Début de la maturation des graines (2)
82		20% des gousses sont mûres (les graines sont dures) (1)
83		30% des gousses sont mûres (les graines sont dures) (1)
84		40% des gousses sont mûres (les graines sont dures) (1)
85	50% des gousses sont mûres (les graines sont dures) (1)	Période de maturation principale (2)
86		60% des gousses sont mûres (les graines sont dures) (1)
87		70% des gousses sont mûres (les graines sont dures) (1)
88		80% des gousses sont mûres (les graines sont dures) (1)
89	Maturation complète : les gousses sont mûres (les graines dures) (1)	
<b>Stade principal 9</b>		<b>Sénescence</b>
97		La plante est morte
99		Produit après récolte

(1) Pour les variétés à période de floraison limitée; (2) Pour les variétés à période de floraison non limitée.

La durée des stades de développement varie considérablement en fonction de la variété et des conditions environnementales (Adams *et al.*, 1985). Le cycle de végétation se déroule pendant les périodes les plus chaudes de l'année. Sous climat méditerranéen, le semis s'effectue

généralement à partir de la fin d'avril allant jusqu'à la fin mai. Le haricot est une plante très sensible au froid. Les fortes chaleurs excédant 30 °C sont préjudiciables, faisant avorter les fleurs (Diouf, 1997; Silva *et al.*, 2020). Le tableau 1 décrit le code BBCH (une échelle universelle pour identifier le stade des cultures) des stades phénologiques du haricot (*Phaesolus vulgaris* L. var. *nanus*) (Feller *et al.*, 1995). La figure 1 illustre également les principaux stades de développement chez le haricot commun.

## **I.5 Intérêts cultureux de haricot**

### **I.5.1 Intérêt agronomique**

Sur le plan agronomique et en tant que légumineuse, le haricot peut s'intégrer dans les systèmes de production biologique qui utilisent la bio-fertilisation. En effet, sa culture laisse des reliquats azotés. A cet effet, il est utilisé avec d'autres légumineuses dans les systèmes des rotations et d'associations culturales avec d'autres cultures notamment les céréales dans le but d'assurer la meilleure efficacité d'utilisation des ressources en azote (Canado *et al.*, 2003). Ainsi le maïs (*Zea mays* L.) est principalement cultivé en culture intercalaire avec les haricots à rame comme plante tuteur (Singh 1992; Nyabyenda, 2005). L'effet ne se limite pas au support mais pour une amélioration réciproque des deux cultures (Nassary, 2020). Fischer *et al.* (2020) ont démontré que la culture intercalaire du maïs-haricot améliore l'approvisionnement en énergie et en protéines du fourrage cultivé à la ferme. D'autre part, le système de culture du tournesol avec le haricot commun a produit des valeurs de rendement net plus élevées que la monoculture du tournesol ou la monoculture de haricot commun unique (Hamd-Alla *et al.*, 2020). Ernest (2019) a également démontré que le système de co-culture riz pluvial-haricot permettait un meilleur développement des plantes et une acquisition de ainsi qu'un meilleur partage des éléments nutritifs des plants de riz.

### **I.5.2 Intérêt alimentaire**

La culture du haricot est destinée à la consommation humaine (les gousses ou graines sont consommées à l'état frais ou les graines à l'état sec) et à l'alimentation des animaux (les résidus de cultures tels que les gousses et tiges séchées (paille) (Wortmann, 2006; Kakon *et al.*, 2016.). En effet, le haricot constitue un aliment de base pour près de 500 millions d'êtres humains par sa richesse en protéines (25% environ) (Pujola *et al.*, 2007).

Sur le plan nutritionnel et comme beaucoup de légumineuses à graines, ils apportent un sentiment de satiété chez les patients atteints de syndromes métaboliques (Reverri *et al.*, 2017). Ils sont une source riche et peu coûteuse de protéines, d'acides aminés, de glucides, de fibres alimentaires, de vitamines (Kan *et al.*, 2018), d'acides phénoliques et de flavonoïdes (Giusti *et al.*, 2017). Via les protéines, leur consommation contribue à la diminution du taux de cholestérol

et à la régulation du diabète (Toews et Wang, 2013), tandis que la composition phénolique réduit l'incidence du cancer (Cominelli *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2020). La consommation de haricot réduit le risque d'accident cardio-vasculaire (Gomes *et al.*, 2020) et d'autres effets ont été rapporté comme anti-obésité (Shi *et al.*, 2020), antioxydants et anti-inflammatoires (Chen *et al.*, 2019; Carbas *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020). Les acides phénoliques réduisent le risque de maladies dans le tube digestif (Moreno-Jiménez *et al.*, 2015) et la quantité élevée d'amidon résistant réduit l'indice glycémique et le risque de maladies chroniques (Mojica *et al.*, 2017).

Sur le plan industriel, les haricots sont utilisés dans le développement de nombreux produits alimentaires en tant que stabilisateurs de produits surgelés et en tant que conservateurs alimentaires en raison de leur stabilité thermique plus élevée (Carbas *et al.*, 2018), et leurs propriétés essentielles dans la fabrication de gel et de film (Yang *et al.*, 2018).

## **I.6 Exigence de la culture de haricot**

### **I.6.1 Exigence climatique**

Le haricot (*P. vulgaris*) est une plante sensible à la compaction, au gel, de même qu'aux excès d'eau et de température. C'est une légumineuse de saison chaude qui se porte mieux dans des conditions subtropicales et tempérées. Il peut être trouvé dans les zones tropicales mais ne supporte pas trop les conditions humides car elles provoquent des attaques fongiques et la chute des fleurs. D'autre part, le haricot aime les apports réguliers en eau et craint les excès qui limitent son développement et peuvent induire des maladies en affaiblissant son système racinaire (Tableau 2).

La température optimale de croissance de haricot varie de 15 à 25 °C. En effet, les fleurs avortent lorsque la température excède 30 °C (Silva *et al.*, 2020). Le haricot a également une légère tolérance au gel mais la croissance s'arrête en dessous de 10 °C et le gel entrave le rendement à différents stades de croissance (Smoliak *et al.*, 1990; Wortmann, 2006).

### **I.6.2 Exigence agronomique**

Le haricot commun pousse bien sur une grande variété de sols avec un pH allant de 4 à 9. Cependant, il se comporte mieux sur des sols bien drainés, loam sableux, loam limoneux ou loam argileux, riches en contenu organique (Ecoport, 2013).

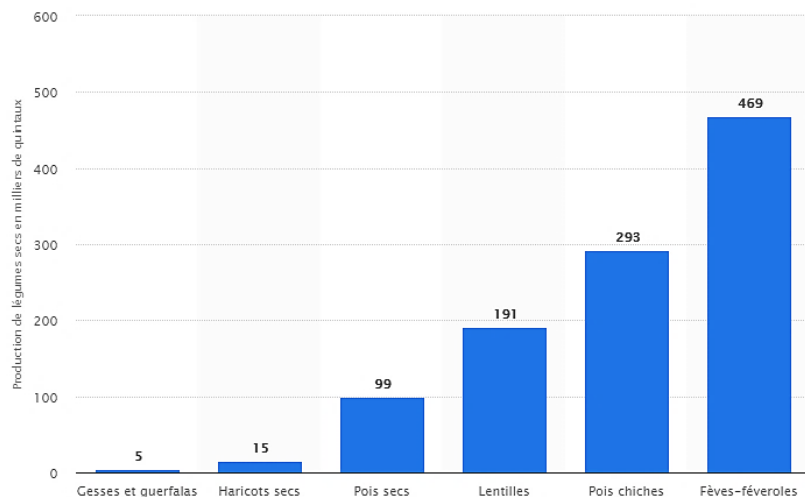
## **I.7 Production mondiale et nationale de haricot**

Dans le genre *Phaseolus*, le haricot commun (*P. vulgaris* L.) est économiquement la plus importante avec plus de 90% de la production mondiale (Broughton *et al.*, 2003), où 35 millions d'hectares sont cultivés par an dans le monde (Mulas *et al.*, 2011; FAOSTAT, 2019) en comprenant différents types de haricot commun de couleurs et de tailles distinctes. Le Brésil, les États-Unis et le Mexique sont les trois les plus grands producteurs de haricots communs au

monde, contribuant à environ 5,6 millions de tonnes de production annuelle suivi de l'Afrique qui est également un producteur de haricot commun qui représente chez ces derniers une culture de subsistance importante pour les petits exploitants agricoles (Broughton *et al.*, 2003; Petry *et al.*, 2015).

En Algérie, les légumineuses alimentaires économiquement accessibles occupent une place importante dans la sécurité alimentaire (Boudjenouia *et al.*, 2003). La bibliographie concernant les légumineuses alimentaires fait mention des cultures traditionnelles importantes qui sont : la lentille (*Lens culinaris L.*), le pois chiche (*Cicer arietinum L.*), le pois (*Pisum sativum L.*), la fève (*Vicia faba L.*) et le haricot (*Phaseolus vulgaris L.*) (Bouzerzour *et al.*, 2003).

Les statistiques illustrées dans la figure 2 montrent que la production de légumes secs en Algérie entre 2016 et 2017 (par type de légumes) est marquée par une production importante de la fèves-féveroles avec environ 500.000 quintaux suivi dans l'ordre décroissant de pois chiches, lentilles, pois secs, haricots secs et enfin la gesse. La production de haricots secs se trouve en cinquième position s'estimant à environ 15.000 quintaux (Statista Research Department, 2019). Ils sont moins produits car ils consomment selon les agriculteurs beaucoup d'eau. En effet, les travaux de Molina *et al.* (2001) et de Arteaga *et al.* (2020) ont montré que *P. vulgaris* n'est pas considéré comme très tolérant au stress hydrique.



**Figure 2.** Production de légumes secs par type en Algérie (2016-2017) (Statista Research Department, 2019).

Ioutichène (2012) mentionne l'introduction de 17 variétés de Haricot sec : Big Borloto, Bronco, Coco de Prague, Coco Rose, Condender, Djadida, Goya, Hadiya, Ifri, Jeto, Matilda, Michelet, Mosta, Rondo, Sun Ray, Super Violet et Topper. D'après l'institut technique des cultures maraichères et industrielles (ITCMI, 2010) de Staouali à Alger, les haricots les plus cultivées en Algérie sont :

- ✚ *Haricot nain mange tout* : Contender, Djedida, Molière.
- ✚ *Haricot nain à écosser* Coco de Prague, Pactole...
- ✚ *Haricot à rames mange tout* : Sidi Fredj, Blanc de juillet.
- ✚ *Haricot à rames à écosser* : Coco blanc, Coco de Prague.

### I.8 Contraintes majeures de la production de haricot

La production du haricot commun (*P. vulgaris* L.) est influencée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques qui interagissent au cours de son cycle de croissance (Milognon *et al.*, 2020; Dhaliwal *et al.*, 2020).

**Tableau 2.** Les principales pathogènes et ravageurs du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.).

Stades concernés	Pathogènes et ravageurs
<b>Ravageurs des semis</b>	Vers gris (Agrotis et Spodoptera); Asticots de la tige du haricot ou mouche du haricot; ( <i>Ophiomyia phaseoli</i> , <i>O. spencerella</i> , <i>O. Centrosematis</i> ); Coléoptère du haricot ( <i>Ootheca bennigseni</i> et <i>O. mutabilis</i> )
<b>Ravageurs des fleurs</b>	Coléoptères des fleurs et du pollen plusieurs espèces de Mylabris et Coryna
<b>Ravageurs de gousses et de graines</b>	Foreurs de gousses ( <i>Helicoverpa paamigera</i> ); Foreurs de gousses ( <i>Maruca vitrata</i> ) (= testulalis); Punaises suçant les gousses, plusieurs espèces : <i>Clavigralla</i> (= <i>Acanthomyia</i> ), <i>C. tomentosicollis</i> , <i>C. schadabi</i> , <i>C. elegata</i> , <i>C. hystricodes</i> ; <i>Riptortus dentipes</i> ; <i>Anoplocnemi scurvipes</i> et <i>A. madagascariensis</i> , <i>Nezaraviridula</i> ; Pucerons ( <i>Aphis fabae</i> , <i>A. craccivora</i> ); Aleurode blanche : <i>Bemishia tabaci</i>
<b>Ravageurs du stockage</b>	<b>Bruchids des haricots</b> Charançon commun des haricots : <i>Acanthoscelides obtectus</i> Charançon mexicain du haricot : <i>Zabrotes subfasciatus</i>
<b>Maladies des feuilles et des gousses</b>	<b>Taches foliaires, brûlures foliaires et maladies décolorantes</b> Brûlure bactérienne commune (CBB) : <i>Xanthomonas phaseoli</i> La graisse à Halo : <i>Pseudomonas savastanoipv. phaseolicola</i> , <i>Pseudomonas syringaepv. Phaseolicola</i> ; Tache foliaire angulaire : <i>Phaseoropsis griseola</i> Anthracnose ( <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ); Tache foliaire d'Ascochyta : <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i> , Maladie de la toile : <i>Rhizoctonia solani</i>
	<b>Excroissances anormales sur les feuilles et les gousses</b> Mildiou poudreux (l'oïdium) : <i>Erysiphepolygoni</i> Tache foliaire farineuses : <i>Mycovellosiella phaseoli</i> Moisissure blanche : <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Rouille des feuilles : <i>Uromyces appendiculatus</i>
	<b>Malformation et déformation des feuilles et des gousses</b> Virus de la mosaïque commune du haricot (BCMV), Virus de la mosaïque jaune du haricot (BYMV), virus de la mosaïque dorée du haricot (BGMV), Virus de la mosaïque du haricot austral (SBMV), virus du sommet bouclé du haricot (BCTV), virus de la marbrure des gousses (PMV) La gale : <i>Elsinoe phaseoli</i>
	<b>Pourriture des racines des haricots</b> Pourriture des racines de pythium ( <i>Pythium spp</i> ) Pourriture sèches des racines fusarium ( <i>Fusarium solani f. sp. Phaseoli</i> ); Pourriture des racines de Rhizoctonia ( <i>Rhizoctonia Solani</i> ); Pourriture des racines du sclérote ( <i>Sclerotium rolfsii</i> ) Pourriture charbonneuse sèche/brûlure de la tige cendrée ( <i>Macrophomina phaseolina</i> ); Pourriture noire ( <i>Thielaviopsis basicola</i> ); Flétrissement fusarium / Jaunes fusarium ( <i>Fusarium oxysporum f. sp. Phaseoli</i> ); Les nématodes à galles : <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Meloidogyne javanica</i> ; Nématode des lésions : <i>Pratylenchus brachyurus</i>



D'après Allen (1996), les principales contraintes agronomiques dans l'ordre décroissant de haricot sont : la tache anguleuse est la contrainte la plus grave suivie par les carences en azote du sol, les carence en phosphore, puis l'antracnose, les attaques pendant le stockage dues aux bruches, la bactériose commune, les pucerons et virus de la mosaïque commune du haricot.

### **I.8.1 Les facteurs biotiques**

Diverses maladies et ravageurs agressent le haricot commun (*P. vulgaris*). Il existe environ 50 espèces de champignons, virus et bactéries qui provoquent des pertes économiques (Sofkova *et al.*, 2010). Les insectes et les nématodes qui sont des vecteurs des virus comme le BYMV (transmis par les pucerons), BGMV, BGYMV (transmis par l'aleurode) et BCTV (transmis par cicadelles), causent de graves pertes (35 à 100%) de la qualité et du rendement (Singh et Schwartz, 2010). Les principales maladies des haricots verts sont citées dans le tableau 2 (Buruchara *et al.*, 2010; Milognon *et al.*, 2020; Dhaliwal *et al.*, 2020).

### **I.8.2 Les facteurs abiotiques**

Le haricot est extrêmement sensible aux contraintes abiotiques suivantes :

**Les hautes températures** (>30 °C le jour et >20 °C la nuit) affectent négativement tous les stades du développement reproducteur et provoquent des pertes de rendement en grains (Hall, 2004; Rainey et Griffiths, 2005; Omae *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2020).

**La salinité du sol** peut réduire le rendement du haricot commun (Brown, 2019; Kouadria *et al.*, 2020).

**Le déficit hydrique** réduit le rendement en grain (Godoy Androcioli *et al.*, 2020; Aserse *et al.*, 2020; Sánchez-Reinoso *et al.*, 2020; Fenta *et al.*, 2020; Rai *et al.*, 2020).

**La toxicité des métaux lourds** tels que l'aluminium (Al) et le manganèse (Mn) entraîne des niveaux élevés d'acidité dans le sol qui est problématique dans la productivité du haricot en particulier en Afrique et en Amérique latine (Rao *et al.*, 2016).

**La carence en azote**, Nimac *et al.* (2020) ont constaté des modifications négatives majeurs dans l'architecture racinaire et une diminution en chlorophylle et en protéines foliaires comme la Rubisco, provoquant une réduction de la capacité photosynthétique et finalement à des dommages aux feuilles.

Ces contraintes biotiques et abiotiques sont aussi dues à l'absence de variétés tolérantes ou résistantes à ces contraintes d'où la nécessité de sélection variétale (Milognon *et al.*, 2020; Dhaliwal *et al.*, 2020; Sánchez-Reinoso *et al.*, 2020).

## II La symbiose légumineuse-microorganismes

### II.1 Généralités sur la symbiose légumineuse-rhizobium

Sous la déficience en azote minérale, la plupart des légumineuses (88%) forment une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote compatibles (de Faria *et al.*, 2010) appartenant aux protéobactéries endosymbiotiques  $\alpha$  et  $\beta$  (Poole *et al.*, 2018) qu'on appelle les rhizobiums (ou rhizobia) qui induisent la formation d'un nouvel organe appelé « nodule » dans lequel les rhizobiums se différencient en bactéroïdes et résident en tant que symbiotes intracellulaires et convertissent l'azote atmosphérique en ammoniac qui peut être facilement assimilé par les plantes hôtes (Day *et al.*, 2001). La formation de nodules et la fixation symbiotique de l'azote est coûteuse pour la légumineuse (Layzell *et al.*, 1981; Kaur *et al.*, 2019) et des réserves considérables et adéquates de carbone (C) (Minchin et Witty, 2005; Pringle, 2016). La symbiose améliore non seulement la disponibilité de l'azote de la plante hôte, mais stimule également la fixation du carbone (Concha et Doerner, 2020), comme elle améliore l'activité de la Fe-réductase racinaire (Derylo et Skorupska, 1992; Jin *et al.*, 2014).

Cette réaction est possible grâce à une enzyme bactérienne la nitrogénase, qui catalyse la réaction suivante :  $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16 ATP \Rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP$

Cette enzyme est très sensible vis-à-vis de l'oxygène et son fonctionnement est rendu possible grâce à l'environnement pauvre en oxygène situé au cœur du nodule. Toutefois, cette symbiose entre les deux partenaires est vulnérable à plusieurs facteurs de stress abiotiques et biotiques qui réduisent l'efficacité de la fixation de l'azote (Concha et Doerner, 2020).

### II.2 Les facteurs affectant l'établissement de la symbiose

#### II.2.1 Les facteurs abiotiques

Parmi les facteurs abiotiques : les hautes températures (Lie, 1971; Bordeleau et Prévost, 1994), les basses températures (Graham, 1992; Zhang *et al.*, 1995; Duzan *et al.*, 2006), La sécheresse avec ses deux principales composantes « le stress hydrique et la salinité » exerce aussi un effet significatif sur la symbiose légumineuse-microorganismes (Dita *et al.*, 2006; Borucki et Sujkowska, 2008; Cesar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2020), les carences en éléments nutritifs (Henzell, 1988) et l'acidité et l'alcalinité des sols (Bordeleau et Prévost, 1994). On peut également citer la toxicité due à certains éléments tels que les pesticides (Fox *et al.*, 2007, Ahemad et Khan, 2013). En effet, parmi ces derniers, l'effet négatif de l'antifongique Thirame sur les rhizobiums (*Rhizobium meliloti*) a été indiqué par Osman *et al.* (2012). Également, l'effet négatif des antifongiques Furadan, Mancomax et du Forum qui réduisent significativement 50 à 84% le nombre de nodules chez le Niébé (*Vigna unguiculata*) (Koffi *et*



al., 2019). Chez le haricot les principales contraintes de l'établissement de la symbiose rhizobienne sont :

**La température** ou des températures de 35 °C ou plus peut affecter la symbiose de *P. vulgaris-R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* (Hungria M. & Franco, 1993).

**La salinité** inhibe l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse au cours des différentes étapes du processus et en général aux premières étapes de la nodulation (Zahran, 1999). En effet, la croissance des rhizobiums du sol peut être affectée par le stress salin en limitant la colonisation des racines, l'inhibition des infections, la production et le fonctionnement des nodules (Mustafakulova & Qobilov., 2020);

**Le stress hydrique (la sécheresse)** réduit l'activité de la nitrogénase et modifie la structure des nodules (Ramos *et al.*, 2003; Fenta *et al.*, 2020).

Tembo *et al.* (2019) estiment que **la faible disponibilité du phosphore** entraîne une diminution de la biomasse nodulaire et une faible fixation biologique du N<sub>2</sub> chez le haricot commun.

Steiner *et al.* (2019) et de Sousa *et al.*, (2020) ont conclu que l'augmentation des taux **d'application de l'engrais azoté** inhibe la formation et la croissance des nodules racinaires des haricots communs entraînant ainsi un faible rendement.

D'autre part, Biswas *et al.* (2020) ont constaté que **l'application de 100% de molybdène** en présence de rhizobium, augmente la taille des nodules et évite la sénescence nodulaire, maintenant ainsi une plus longue période de fixation efficace de l'azote dont le résultat se remarque dans le rendement avec une augmentation du nombre, du diamètre et de la longueur des gousses par plante (Vieira *et al.*, 1998). Le molybdène agit comme un cofacteur essentiel pour stimuler l'activité de *P. vulgaris* (Vakhaniya *et al.*, 1990, Reyes *et al.*, 2016).

## II.2.2 Les facteurs biotiques

Les facteurs biotiques tels que les génotypes des plantes hôtes et les souches microbiennes, absence de souche de *Rhizobium* efficace (Laguerre *et al.*, 2003; Saidi *et al.*, 2014), les maladies causées par les bactéries, les virus et les mycoses, ainsi que des infections par des nématodes qui s'attaquent aux nodosités perturbent l'établissement de la symbiose (Corre-Hellou et Crozat, 2005) et Ramos *et al.* (2003) affirment que les facteurs affectant le développement des plantes peuvent altérer la formation et la croissance des nodules.

En plus de ces contraintes qui entrave l'établissement de la symbiose légumineuse-rhizobium entraînant ainsi un faible rendement (Beebe *et al.*, 2012), le haricot (*P. vulgaris* L.) est une légumineuse à faible potentiel de fixation d'azote atmosphérique (Graham, 1981; Bliss, 1993b; Hardarson, 1993; Farid et Navabi, 2015). Ceci est lié selon certains auteurs aux souches inefficaces indigènes de rhizobium qui nodulent le haricot (Mhamdi *et al.*, 2002; Faghir, 2012;

da Conceição Jesus *et al.*, 2018 ; El Attar; *et al.*, 2019). De plus, les travaux de Shamseldin *et al.* (2012), Argaw *et al.*, (2015), Mbabazi (2019) et ceux de Nimac *et al.* (2020) ont montré que la limitation de production des haricots est liée aux carences en azote, par conséquent, la production et le rendement de haricots sont médiocres en graine et en fruit. Afin de soulever cette limitation, les agriculteurs ont eu recours à des fertilisations intensives, aux engrais organiques comme le fumier et à des engrais azotés inorganiques (qu'on appelle également engrais synthétique azoté, engrais azoté chimique, ou encore engrais minérale azoté) (El Attar *et al.*, 2019; Dhaliwal *et al.*, 2020). Ces derniers engendrent divers impacts cités ci-dessous (Dhaliwal *et al.*, 2020).

### **II.3 Les fertilisants azotés organiques et inorganiques**

L'utilisation d'engrais organiques apporte une augmentation dans la teneur en matière organique du sol, une amélioration du système racinaire et donc une amélioration de la structure physique et physiologique du sol (Singh, 2020). De même, l'application des engrais azotés inorganiques entraîne une augmentation significative de la production alimentaire via le processus Haber-Bosch (Smil, 2002; Crews et Peoples 2004).

Cependant, l'engrais organique (comme le fumier) est rarement disponible pour les petits agriculteurs, et relativement faibles en contenu nutritif, donc qui nécessite des volumes plus importants pour fournir suffisamment de nutriments pour la croissance et le rendement des cultures (Gichangi *et al.*, 2012). De plus, le taux de libération des nutriments est trop lent pour répondre aux besoins des cultures en peu de temps. Ceci qui peut entraîner une carence en nutriments, et une application à long terme ou intensive sur les sols agricoles peut à son tour entraîner une accumulation de sel, de nutriments ou de métaux lourds (Singh *et al.*, 2020). Selon une étude récente de Ray *et al.* (2020), l'ajout de fertilisant organique contribue à l'effet serre par l'émission de CO<sub>2</sub> et cette émission varie d'un sol à un autre et à un amendement organique à un autre.

D'autre part, l'engrais azotés inorganique est coûteux et inabordable pour les petits exploitants pauvres en ressources (Koskey *et al.*, 2020). L'utilisation d'engrais azotés chimiques est souvent mal géré. En effet, et le manque de connaissance des agriculteurs les conduisent à une gestion médiocre de ces intrants dont le plus souvent est un excès, sont néfaste pour l'environnement. D'après Azeez *et al.* (2020), l'application d'engrais chimiques peut hausser le niveau de radioactivité naturelle du sol. Berg (2017) a démontré que la non gestion du fumier animal et des engrais commerciaux affectent négativement la vie végétale et animale (y compris les humains) en se mélangeant aux autres polluants. Parmi ces impacts, on peut citer l'épuisement de l'oxygène dans les eaux de surface, des agents pathogènes et des nitrates dans

l'eau potable et l'émission d'odeurs et de gaz dans l'air. D'après Wang et Lu (2020), l'application de grandes quantités d'engrais azotés pour la production agricole en Chine a un impact sur l'environnement et la santé humaine. L'utilisation d'engrais azotés chimiques avec excès contribue au réchauffement climatique, au trou dans la couche d'ozone via les émissions de protoxyde d'azote ( $N_2O$ ), à l'eutrophisation des eaux superficielles, à l'acidification des sols, conduisant à une baisse de leur fertilité et un risque accru de lessivage des métaux lourds, à une réduction de la biodiversité, et à la pollution de l'air par l'ammoniac et les oxydes d'azote qui augmente le risque de nombreuses maladies pulmonaires (Aubert, 2018; Fagodiya *et al.*, 2020; Rashmi *et al.*, 2020).

#### **II.4 Les biofertilisants via la symbiose microorganismes chez le haricot**

À cet égard, l'appel aux biofertilisants via les microorganismes bénéfiques du sol serait un soulagement pour l'environnement et un respect à la nature (Singh *et al.*, 2020; Kour *et al.*, 2020). Néanmoins, il est nécessaire de sélectionner des souches natives efficaces (El Attar *et al.*, 2019) et résistantes aux facteurs biotiques et abiotiques qui se sont déjà adaptés aux contraintes environnementales (Cesaro *et al.*, 2020, Zhang *et al.*, 2020; Aserse *et al.*, 2020 ; Sindhu *et al.*, 2020). En effet, Koskey *et al.* (2018) ont testé sur terrain au Kenya l'efficacité symbiotique entre haricots grimpants (deux variétés) et rhizobiums natifs ainsi qu'à des rhizobiums commerciaux. Les résultats de cet essai *in vivo* se sont avérés positifs avec un gain significatif du poids sec des nodules et du rendement en grains par rapport au témoin non inoculé et ceci grâce aux souches indigènes. Cependant, l'inoculation avec le meilleur isolat natif, l'isolat ELM3 qui a donné le rendement de semences le plus élevé avec un gain de 89% par rapport au témoin non inoculé et 30% par rapport aux rhizobiums commerciaux.

Khaitov *et al.* (2020) ont conclu que l'inoculation de *P. vulgaris* (L.) avec des souches autochtones de rhizobium à savoir *Rhizobium phaseoli* R9 et *Mesorhizobium ciceri* R6 isolées respectivement à partir d'un sol salé rhizosphérique de soja et de pois chiche améliorent la productivité du haricot dans un sol salé avec un rapport significatif dans le nombre de nodules par plante, le poids sec des nodules et la longueur de la tige de haricot. Par rapport à l'inoculation simple, la double inoculation avec les deux souches était plus efficace dans tous les paramètres de la plante et a augmenté le rendement en graines de 35.1 et 37.9%, au cours des deux saisons consécutives par rapport au témoin non inoculé. Aserse *et al.* (2020) ont prouvé que l'inoculation avec des souches rhizobiennes autochtones éthiopiennes qui ont été au préalable sélectionnées, ont amélioré la tolérance à la sécheresse, la biomasse et les rendements en grains de haricot commun (*P. vulgaris* L.) avec des gains plus cohérents par rapport aux témoins.

Notamment, la co-inoculation avec *Rhizobium tropici* et *Bradyrhizobium spp.* peut favoriser la nodulation, le développement et la fixation biologique de l'azote de *P. vulgaris* (de Carvalho *et al.*, 2020). En plus de fixer l'azote atmosphérique, les rhizobiums stimulent l'immunité (Tonelli *et al.*, 2020) de la plante et réduisent l'incidence de plusieurs maladies grâce à l'expression de propriétés directes de lutte biologique (Arora *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 2019; Volpiano *et al.*, 2019) via la synthèse d'antibiotiques et d'enzymes hydrolytiques actifs contre diverses bactéries et champignons dans les sols (Bhattacharya *et al.*, 2012; Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Benezech *et al.* (2020) affirment que la formation des nodules constitue une sorte de barrière empêchant la propagation du pathogène au-delà des nodules. En outre, Kanouni *et al.* (2018) ont rapporté que les rhizobia inhibaient la croissance mycélienne des agents pathogènes.

Les rhizobiums utilisent une grande variété de sources de carbone, surpassant les autres membres du sol (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). Certaines souches produisent des sidérophores qui chélatent le fer (Datta, & Chakrabarty, 2014; Srinivasan, 2017; Gupta *et al.*, 2018; Avadhanam, 2020) et solubilisent le phosphore inorganique qui est également l'un des éléments le plus limitant pour la croissance des plantes, la nodulation et la fixation d'azote, y compris pour le haricot (Vadez *et al.*, 1999; Adnane, 2012; Drevon, 2017, Tembo *et al.*, 2019). Cette stratégie constitue un réel atout pour une agriculture saine et durable sans intrant chimique. En se conformant à Hamane *et al.* (2020), la sélection des souches de rhizobium isolées à partir de nodules de plantes *Hydesarum pallidum* ayant différentes activités en plus de solubiliser le phosphore tels que la sécrétion des sidérophores, de cyanure d'hydrogène (HCN), d'acide indole acétique (IAA), constitue un biofertilisant efficace qui peut stimuler la croissance des plantes et est considéré comme l'un des agents de lutte biologique d'où la désignation de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1986).

Outre que les rhizobiums, cette nomination désigne également les bactéries libres (sans la formation de nodule comme les rhizobiums) qui améliorent la croissance des plantes via la synthèse d'hormones importantes comme les auxines, cytokinines, gibbérellines, et aident à fournir les éléments essentiels comme l'azote, le phosphore, le potassium (Yu *et al.*, 2019). Elles produisent également du cyanure d'hydrogène (HCN). En effet, *Pseudomonas japonica* et *Bacillus megaterium* ont pu inhiber la croissance d'*Agrobacterium tumefaciens* et affecter la viabilité des juvéniles de *Meloidogyne incognita in vitro* via du cyanure d'hydrogène (Abd El-Rahman *et al.*, 2019).

Yadegari et Asadi Rahmani (2014) ont apporté que la double inoculation avec les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (*Pseudomonas fluorescens* P-93 et

*Azospirillum lipoferum* S-21) et deux souches de *Rhizobium* très efficaces, produit un meilleur rendement en graines de haricot commun (*P. vulgaris* L.).

D'autre part, Steiner *et al.* (2019) ont soutenu que la co-inoculation avec *Rhizobium tropici* et *Azospirillum brasilense* améliore la nodulation racinaire et le rendement en grains des haricots communs (*P. vulgaris*) lors de la culture pendant la saison sèche dans la région de la savane brésilienne.

D'autres biofertilisants jouent un rôle clé et complémentaire aux rhizobies et aux bactéries à effet PGPR. Ce sont les mycorhizes et incontestablement Massa *et al.* (2020) ont démontré lors d'un essai sur terrain qu'une double inoculation de *P. vulgaris* avec des endomycorhizes et rhizobiums (très efficaces en fixation d'azote, solubilisant le phosphore) adaptées aux conditions locales améliorent les caractéristiques et la qualité des graines du haricot dans des conditions de fertilisation réduite.

En dernier, Seyahjani *et al.* (2020) ont conclu que la triple inoculation du haricot rouge (cv. Goli) avec des rhizobiums, mycorrhizes et *Pseudomonas* dans des conditions de stress dû à la sécheresse, a augmenté le rendement en grains par rapport au témoin. Ces résultats sont aussi satisfaisants même quand ces composantes de symbiose sont utilisées individuellement ou simultanément. Ils ont également réduit les effets négatifs du stress de la sécheresse sur les haricots. Il s'est avéré alors que l'utilisation d'une symbiose tripartite entre haricot-rhizobium-bactérie à effet PGPR et mycorhize est une stratégie prometteuse pour la mobilisation d'éléments nutritifs au profit du développement de la plante et de la réduction de l'utilisation des fertilisants et qui favorise un effet bénéfique synergique entre les micro-organismes symbiotiques afin de contrer les facteurs biotiques et abiotiques Seyahjani *et al.* (2020).

Une seconde suggestion selon Hardarson *et al.* (1993), la sélection des variétés de haricot est un bon potentiel de fixation d'azote même sous contraintes environnementales. Ainsi, Kayakez *et al.* (2017) ont conclu que le rendement en graines de haricot commun est influencé par la variété. Nyabyenda (2005) et Aserse *et al.*, (2020) suggèrent que la sélection variétale aboutie à une amélioration du rendement et de résistance aux maladies.

Récemment, les travaux de Baez-Gonzalez *et al.* (2020) et ceux de Sánchez-Reinoso *et al.* (2020) proposent également une sélection variétale afin de contrer le stress hydrique. Arteaga *et al.* (2020) suggèrent également une sélection variétale afin de contrer le stress salin et le stress hydrique estimant que ce sont les facteurs les plus limitants de la production du haricot.

Par ailleurs, Barbosa *et al.* (2018) ont distingué des différences génotypiques significatives dans la capacité de fixation symbiotique azotée ainsi de bonnes lignées peuvent

fixer jusqu'à 92 kg d'azote par hectare sans intrants azotés chimiques. D'après Ramaekers *et al.* (2013), les haricots grimpants présentent une capacité de fixation d'azote plus élevée que celles des haricots nains.

## **II.5 Les microsymbiotes de haricot**

*P. vulgaris* peut former une double symbiose à la fois avec les champignons mycorrhiziens arbusculaires (AMF), des biotrophes obligatoires appartenant au phylum Glomeromycota et les bactéries appartenant au genre *Rhizobium* (Jansa *et al.*, 2011; Nanjareddy *et al.*, 2017; Amin *et al.*, 2020; Massa *et al.*, 2020; da Silva *et al.*, 2020).

### **II.5.1 Les mycorhizes**

Des haricots communs tolérants à la sécheresse se sont avérés positifs à la colonisation par un mélange d'endomycorhizes (AMF) comme *Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata* et *Gigaspora rosea* (Recchia *et al.*, 2018). La colonisation par *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* et *Gigaspora margarita* ont également été mentionnés par Erdinc *et al.* (2017).

### **II.5.2 Les rhizobia**

*P. vulgaris L.* est une légumineuse capable de noduler par au moins 27 espèces de rhizobiums (Dall'Agnol *et al.*, 2013) par le biais de quatre genres de bactéries, isolées de nodules de *P. vulgaris L.* et d'autres légumineuses d'où l'origine de symbiovars. Il est donc considéré comme un hôte à haute promiscuité (Cordeiro *et al.*, 2017; Mwenda, 2017; Mwenda *et al.*, 2018; Pastor-Bueis *et al.*, 2019; Shamseldin et Velázquez, 2020).

Ces espèces de rhizobiums et symbiovars sont génétiquement hétérogènes d'origines différentes appartenant aux phylum Alpha-Protéobactéries et Bêta-Protéobactéries (Peix *et al.*, 2015) (Tableau 3). Cette promiscuité du haricot est considérée comme négatif car ces espèces ne sont pas toutes infectives et efficaces à la fois (Laguerre *et al.*, 1993; Eardly *et al.*, 1995; Moushine *et al.*, 2007). C'est-à-dire qu'il existe des espèces qui sont capables d'induire la nodulation mais ne fixent que des quantités d'azote médiocres voire nulles (Pastor-Bueis *et al.*, 2019).

Ce sont ces mêmes bactéries qui sont les plus compétitifs que les espèces efficaces ce qui entraîne une BNF médiocre et qui considère le haricot comme le plus faible parmi les légumineuses à grains les plus cultivées (Martínez-Romero, 2003).



**Tableau 3.** Espèces de rhizobiums isolées à l'origine de nodules de *Phaseolus vulgaris* et de symbiovars de ces espèces nodulant cette légumineuse d'après Shamseldin et Velázquez (2020).

<b>Espèce</b>	<b>Pays</b>	<b>Références</b>
<b>Phylum alpha-Proteobacteria</b>		
<i>Rhizobium aethiopicum</i>	Ethiopie (Afrique)	Aserse <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhizobium acidisoli</i> Symbiovar <i>phaseoli</i>	Mexique Amérique)	Román-Ponce <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhizobium azibense</i> Symbiovar <i>gallicum</i>	Tunisie (Afrique)	Mnsari <i>et al.</i> (2014)
<i>Rhizobium chutanense</i> Symbiovar <i>phaseoli</i>	China (Asia)	Huo <i>et al.</i> (2019)
<i>Rhizobium ecuadorensis</i> Symbiovar <i>phaseoli</i>	Equateur (Amérique)	Ribeiro <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhizobium etli</i> Symbiovar <i>phaseoli</i>	Mexique (Amérique)	Segovia <i>et al.</i> (1993)
<i>Rhizobium esperanzae</i> Symbiovar <i>phaseoli</i>	Mexique (Amérique)	Cordeiro <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhizobium freirei</i> Symbiovar <i>tropici</i>	Brésil (Amérique)	Dall'Agnol <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhizobium gallicum</i> Symbiovar <i>Gallicum</i> Symbiovar <i>phaseoli</i>	France (Europe)	Amarger <i>et al.</i> (1997)
<i>Rhizobium hidalgonense</i> Symbiovar <i>phaseoli</i>	Mexique (Amérique)	Yan <i>et al.</i> (2017)
<i>Rhizobium leucaenae</i> Symbiovar <i>tropici</i>	Brésil (Amérique)	Ribeiro <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhizobium lusitanum</i> Symbiovar <i>phaseoli</i> / Symbiovar <i>tropici</i>	Portugal (Europe)	Valverde <i>et al.</i> (2006); Ormeño-Orrillo <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhizobium mesoamericanum</i>	Mexique Amérique)	López-López <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhizobium paranaense</i>	Brésil (Amérique)	Dall'Agnol <i>et al.</i> (2014)
<i>Rhizobium phaseoli</i> Symbiovar <i>phaseoli</i>	USA (Amérique)	Dangeard (1926); Ramírez-Bahena <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizobium tropici</i> Symbiovar <i>tropici</i>	Colombie (Amérique)	Martínez-Romero <i>et al.</i> (1991), Mouhsine <i>et al.</i> (2007) Ormeño-Orrillo <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhizobium vallis</i> Symbiovar <i>phaseoli</i>	Chine (Asie)	Wang <i>et al.</i> (2011)
<i>Pararhizobium giardini</i> Symbiovar <i>giardinii</i> / Symbiovar <i>phaseoli</i>	France (Europe)	Amarger <i>et al.</i> (1997), Mousavi <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i>	NS	Jordan. (1984); Ramirez-Bahena <i>et al.</i> (2008)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Espagne (Europe)	Zurdo-Piñeiro <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i>	Brésil (Amérique)	Michiels <i>et al.</i> (1998)
<i>Rhizobium gallicum</i> biovar <i>phaseoli</i>	France (Europe)	Amarger <i>et al.</i> (1997)
<i>Rhizobium oryzae</i>	Chine (Asie)	Peng <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizobium paranaense</i>	Brésil (Amérique)	Dall'agnol <i>et al.</i> (2014)
<i>Rhizobium rhizogenes</i>	Espagne (Europe)	Velazquez <i>et al.</i> (2005)
<i>Rhizobium vallis</i>	Chine	Wang <i>et al.</i> (2011)
<i>Rhizobium endophyticum</i>	NS	López-López <i>et al.</i> (2010)
<i>Paraburkholderia nodosa</i>	Brésil (Amérique)	Dall'Agnol <i>et al.</i> (2016)
<i>Rhizobium grahamii</i>	Mexique (Amérique)	López-López <i>et al.</i> (2012)
<i>Sinorhizobium americanum</i>	Tunisie (Afrique)	Mnasri <i>et al.</i> (2012)
<i>Burkholderia phymatum</i>	Maroc (Afrique)	Talbi <i>et al.</i> (2010)
<i>Rhizobium sophorae</i>	Chine (Asie)	Jiao <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhizobium sophoriradicis</i>	Chine (Asie)	Jiao <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhizobium pisi</i>	NS	Ramirez-Bahena <i>et al.</i> (2008)
<i>Rhizobium mongolense</i>	Mongolie (Asie)	Van Berkum <i>et al.</i> (1998)
<i>Sinorhizobium fredii</i>	Espagne (Europe)	Spain Herrera-Cervera <i>et al.</i> (1999)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	NS	Hungria et Kaschuk (2014)
<b>Phylum bêta-protéobactéries</b>		
<i>Cupriavidus necator</i>	Brésil (Amérique)	DaSilva <i>et al.</i> (2012)
<i>Phyllobacterium endophyticum</i>	Espagne (Europe)	Flores-Felix <i>et al.</i> 2013)

\*NS-Non spécifié

# CHAPITRE : II



## **Chapitre II - Effet de l'eau de mer diluée sur la germination et la croissance des plantules chez trois légumineuses alimentaires (pois, pois chiche et haricot)**

### **1 Objectif de l'étude**

La salinité est l'un des principaux facteurs abiotiques qui limitent la croissance et la productivité des plantes dans de nombreuses régions du monde en raison de l'utilisation croissante d'une eau de mauvaise qualité pour l'irrigation et la salinisation des sols (Chen et Jiang, 2010; D'Odorico *et al.*, 2013; Shrivastava et Kumar, 2015). Un taux de 20% des terres cultivées dans le monde contiennent des concentrations de sel suffisamment élevées pour provoquer un stress salin pour les plantes (Shelef *et al.*, 2012).

En effet, dans les terres arides et semi-arides, la production agricole nécessite une irrigation supplémentaire surtout avec le manque de pluie (Chen *et al.*, 2010). Ces ressources en eau d'irrigation proviennent généralement des eaux souterraines et contiennent des quantités variables de sels dissous (Prasanth *et al.*, 2012). Dans les pays méditerranéens comme l'Algérie, les légumineuses sont souvent cultivées à proximité des régions côtières où l'on assiste à une augmentation du stress salin. Par conséquent, une large utilisation des eaux d'irrigation appelle l'intrusion d'eau de mer. L'intrusion d'eau de mer est le mouvement de l'eau de mer dans les aquifères d'eau douce en raison de processus naturels ou d'activités humaines. En effet, l'intrusion d'eau de mer est causée par des diminutions des niveaux d'eau souterraine ou par des augmentations des niveaux d'eau de mer (Werner *et al.*, 2013). L'utilisation d'eau de mauvaise qualité entraîne donc une augmentation du niveau de salinisation du sol qui peut avoir des effets négatifs sur le rendement (Arslan, 2013). En revanche, les ressources en eau douce disponibles pour l'agriculture ont diminué en matière de quantité et de qualité des systèmes d'eau de surface et souterraine (Liu *et al.*, 2016).

Par conséquent, l'utilisation d'eau de qualité inférieure à des fins d'irrigation est inévitable pour maintenir des cultures économiquement viables. Selon les niveaux de dilution testés sur certaines plantes, l'eau de mer s'est avérée même un excellent engrais naturel et peut contenir plusieurs minéraux très utiles pour la croissance des plantes (Glenn *et al.*, 1998; Tawfik *et al.*, 2011; Ventura *et al.*, 2015; Kheloufi *et al.*, 2016a).

L'adaptation des plantes en milieu salin est cruciale au stade germination pour une meilleure implantation des espèces. La première étape de développement est donc la plus vulnérable dans cette contrainte saline car le passage de celle-ci va déterminer l'évolution des espèces cultivées. En effet, la salinité peut affecter la germination en créant un potentiel osmotique qui empêche l'imbibition d'eau, ou en exerçant des effets toxiques sur la viabilité

de l'embryon (Chaves *et al.*, 2009). L'amélioration de certaines espèces tolérantes au sel est donc d'une importance majeure. Ainsi, la recherche scientifique devrait se concentrer sur les mécanismes impliqués dans cette tolérance au sel.

Le but de la présente étude est d'évaluer l'effet de l'irrigation par l'eau de mer sur la croissance et la germination des graines de trois légumineuses alimentaires (*Pisum sativum*, *Cicer arietinum* et *Phaseolus vulgaris*). Ces trois espèces ont été irriguées avec de l'eau de mer méditerranéenne à différentes concentrations (0, 10, 30, 50 et 100%) pour une période de 8 jours. Divers paramètres tels que la cinétique de germination, le temps moyen de germination, l'indice de taux de germination, la longueur des tiges et des racines, le poids frais et sec et la teneur en humidité ont été analysés.

## **2 Matériels et méthodes**

### **2.1 Dispositif expérimental et traitement**

Des combinaisons factorielles de trois espèces et de cinq niveaux ont été des traitements d'essai de salinité. Des graines de pois (*P. sativum* var. *Arvense*), de pois chiche (*C. arietinum* var. *Temouchent*) et de haricot (*P. vulgaris* var. *djedida*) ont été fournies par l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC), Sidi bel Abbes (Algérie). L'eau de mer a été récolté du littoral d'Oran (Algérie) (35°40'36.82" N; 1°1'30.54" O).

Différentes concentrations d'eau de mer de 0, 10, 30, 50 et 100% ont été créées en utilisant de l'eau distillée. Trois répétitions de 15 graines chacune ont été utilisées pour chaque traitement. Des expériences de germination ont été réalisées dans des boîtes en plastique (5 cm de hauteur, 15 cm de longueur et 8 cm de largeur) avec du papier filtre humide à deux couches (Whatman n°1) imbibées avec 25 ml de la solution appropriée d'eau de mer ou d'eau distillée à 0% (Témoin).

Le taux de germination a été enregistré tous les 2 jours pendant 8 jours. Tout d'abord, les graines ont été stérilisées en surface avec 5% d'hypochlorite de sodium pendant 5 minutes afin d'éviter la contamination fongique, puis lavées à l'eau distillée. Les graines ont été incubées dans l'obscurité continue à 23 °C ( $\pm 2$  °C) (Celsius) dans une chambre de culture. Les papiers ont été changés avec le même traitement tous les 2 jours afin d'éviter l'accumulation de sel. Les graines ont été imbibées avec les solutions appropriées d'eau de mer et maintenues humides tout au long de l'expérience. Les graines sont considérées comme germées lorsque la radicule avait dépassé d'une longueur de 2 mm (Côme, 1970).

### **2.2 Paramètres de germination**

Afin de caractériser la tolérance à la salinité, plusieurs paramètres ont été estimé :

**La cinétique de germination** : pour mieux appréhender la signification physiologique du comportement germinatif, le nombre de graines germées a été compté tous les 2 jours jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour de l'expérience.

**Le pourcentage final de germination (FGP)** : ce paramètre constitue le meilleur moyen d'identification de la concentration en eau de mer qui présente la limite physiologique de germination. Elle s'exprime au 8<sup>ème</sup> jour de l'expérience par l'équation suivante :

$$\text{FGP (\%)} = \frac{\text{Nombre de graines germées}}{\text{Total des graines testées}} \times 100$$

**L'Indice de taux de germination (GRI)** : il reflète le pourcentage de germination pour chaque jour de la période de germination (Maguire, 1962). Il est calculé ainsi :

$$\text{GRI (\%)} = \sum \frac{\text{Nombre de graines germées}}{\text{Nombre de jours}}$$

**Le temps moyen de germination (MGT)** :

$$\text{MGT (jours)} = \frac{\sum(ti \cdot ni)}{\sum ni}$$

Où MGT est le temps moyen de germination,  $t_i$  est le nombre de jours depuis le début de l'essai,  $n_i$  est le nombre de graines germées enregistrées à l'instant  $t(i)$ , et  $\sum n_i$  est le nombre total de graines germées (Orchard, 1977).

### 2.3 Paramètres de croissance des plantules

Après une période de 8 jours, la longueur des tiges a été immédiatement mesurée par un pied à coulisse. Les racines et les tiges ont été séparées et séchées. Le poids frais (FW) a été immédiatement déterminé, puis les échantillons ont été étuvé dans une étuve à 80 °C pendant 48 h afin d'obtenir le poids sec (DW). La teneur en humidité (MC) a été estimée en utilisant la formule suivante telle que décrite par Wu *et al.* (2013):

$$\text{MC (\% FW)} = \frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{FW}} \times 100$$

La moyenne de la teneur en eau de la plante est actuellement une méthode très utilisée pour estimer l'état hydrique de la plante en condition de stress hydrique/osmotique.

### 2.4 Analyses statistiques

L'expérience a été réalisée sous la forme d'un plan complètement randomisé avec 3 répétitions de 15 graines ( $n = 3$ ) pour les paramètres de germination et avec 15 répétitions ( $n = 15$ ) pour les paramètres de croissance des plantules. Les données ont été traitées statistiquement par l'analyse de variance (ANOVA). Le modèle linéaire généralisé (GLM) a été utilisé dans la cinétique de germination (analyse des mesures répétées de la variance). Les tests à comparaisons multiples de Duncan ont été réalisés pour déterminer s'il y avait une

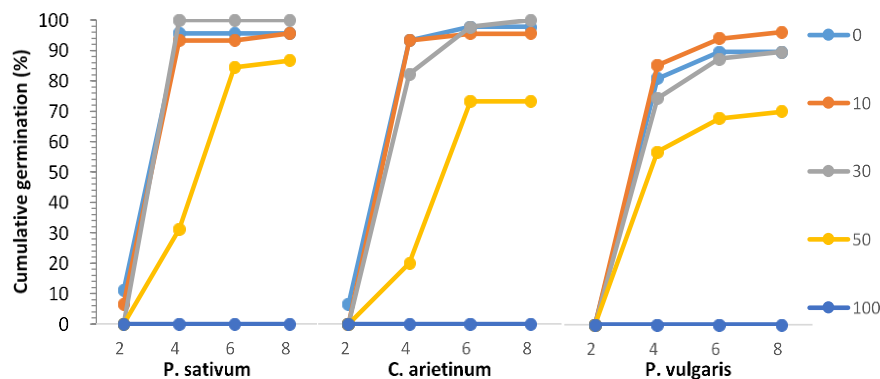
différence significative entre les moyennes à 5% en utilisant le logiciel SAS version 9.0 (SAS 2002).

### 3 Résultats et discussion

Dans cette étude, cinq concentrations (0, 10, 30, 50 et 100%) d'eau de mer ont été utilisées pour irriguer trois légumineuses afin d'évaluer l'effet de la salinité de l'eau de mer sur la germination et la croissance des plantules.

#### 3.1 Paramètres de germination

L'effet de la salinité sur la cinétique de germination est présenté sur la figure 3. Tout d'abord, l'utilisation d'une concentration élevée d'eau de mer (100%) a entraîné une inhibition totale de la germination. L'effet de la salinité externe sur la germination des graines peut être une toxicité partiellement osmotique ou ionique qui peut altérer des processus physiologiques tels que l'activation enzymatique (El-Keblawy, 2004; Chinnusamy *et al.*, 2005; Nichols *et al.*, 2009). Cet effet toxique peut entraîner des changements dans les processus métaboliques des plantules, et dans le cas extrême, la mort d'embryons par l'accumulation d'ions (El-Keblawy, 2004). L'effet osmotique ou toxique peut être vérifié par un test de réversibilité de l'action de la salinité (Kheloufi *et al.*, 2016b).



**Figure 3.** Effets de diverses concentrations d'eau de mer (0 à 100%) sur la cinétique de germination de trois légumineuses (*P. sativum*, *C. arietinum* et *P. vulgaris*) dans des boîtes de Pétri sur une période de 8 jours.

L'ANOVA à deux facteurs a indiqué que la cinétique de germination des trois espèces de légumineuses était significativement affectée par le facteur espèce ( $F = 3.73$ ,  $P = 0.0357$ ), le facteur temps ( $F = 1839.52$ ,  $P < 0.0001$ ), le facteur concentration en eau de mer ( $F = 390.56$ ,  $P < 0.0001$ ) et par leur corrélation ( $F = 4.65$ ,  $P < 0.0001$ ) (Tableau 5). Par rapport au témoin, la germination des graines des trois espèces n'a pas été affectée à 30% d'eau de mer. En effet, le pourcentage de germination final a été maintenu entre 90 et 100%. L'augmentation de la salinité (50% de l'eau de mer) a perturbé le FGP de toutes les espèces étudiées avec (86.7%) dans le cas de *P. sativum*, suivi de (73.3%) et (71.1%) pour *C. arietinum* et *P. vulgaris*, respectivement. La diminution de FGP est une conséquence de

l'augmentation de la pression osmotique externe, ce qui perturbe l'absorption d'eau par les graines et/ou à une accumulation d'ions ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) dans l'embryon (Debouba *et al.*, 2006; Ghogdi *et al.*, 2013).

Le FGP le plus élevé a été enregistré chez le témoin et plus élevé dans les graines de *P. sativum* et *C. arietinum* que dans les graines de *P. vulgaris* et ceci dans tous les traitements. Sous stress salin, le taux de germination le plus élevé (100%) a été enregistré chez les graines de *P. sativum* et *C. arietinum* à 30% d'eau de mer et le taux le plus élevé de 97.7% a été obtenu à 10% de l'eau de mer dans les graines de *P. vulgaris*. Chez les trois espèces, la germination a été complètement inhibée à 100% d'eau de mer. Chez le témoin, la germination la plus élevée a été enregistrée à 3.77 jours de MGT chez *P. sativum*, suivi par 3.95 jours et 4.19 jours de MGT pour *C. arietinum* et *P. vulgaris*, respectivement (Tableau 4). Les données présentées sur la figure 3 ont également montré des différences significatives au moment de l'induction et de l'achèvement de la germination. Le MGT a augmenté de manière significative ( $P < 0.0001$ ) en augmentant la concentration en eau de mer. En effet, l'augmentation de la salinité a également retardé la germination à 50% de l'eau de mer où le taux le plus élevé a été atteint au 6<sup>ème</sup> jour avec des valeurs réduites chez les graines de *C. arietinum* et au 8<sup>ème</sup> jour chez les graines de *P. sativum* et *P. vulgaris* (Figure 3). Le retard de germination suite à l'augmentation de la concentration en eau de mer peut s'expliquer par le potentiel osmotique plus faible de la solution (Nonogaki *et al.*, 2010).

Par rapport au témoin, une solution de 50% d'eau de mer a réduit de manière significative l'indice de taux de germination (GRI) ( $P < 0.05$ ) et a augmenté le temps de germination moyen (MGT) (Tableau 5). Il a été démontré qu'un FGP et un GRI très élevé avec un MGT plus faible représentaient une germination plus élevée et très rapide (Panuccio *et al.*, 2014; Kheloufi, 2017).

Les résultats ont également montré que les trois espèces de légumineuses pouvaient germer à différentes concentrations de salinité. Nos résultats ont indiqué qu'une salinité élevée inhibait significativement la germination des graines et retardait le temps de germination chez toutes les espèces étudiées. Des résultats similaires ont été indiqués chez d'autres cultures telles que la féverole (*Vicia faba*) (Yang *et al.*, 2013), le blé (*Triticum aestivum*) (Hussain *et al.*, 2013) et la lentille (*Lens culinaris*) (Al-Quraan *et al.*, 2014).

Le retard de la germination observé chez toutes les espèces par rapport aux témoins s'explique par le temps nécessaire aux graines de mettre en place des mécanismes permettant d'ajuster leur pression osmotique interne (Farissi *et al.*, 2011). En outre, la mobilisation des

réserves de graines dépend de l'activation des enzymes d'hydrolyse (Tan-Wilson et Wilson, 2012).

### 3.2 Paramètres de croissance des plantules

L'ANOVA à deux facteurs présentée dans le tableau 6 montre que les espèces et le traitement ainsi que leur corrélation (Traitement × Espèce) affectent de manière significative ( $P < 0.0001$ ) tous les paramètres de croissance des plantules. Le tableau 4 montre que des longueurs élevées ont été enregistrées chez des plantules traitées avec 10% d'eau de mer. Une concentration de 10% d'eau de mer a augmenté la longueur des tiges chez toutes les espèces par rapport aux témoins. En effet, la longueur des tiges de *P. vulgaris* est passée de 16.6 cm à 20.43 cm. Celle de *P. sativum* passe de 4.75 cm à 6.07 cm et enfin les tiges de *C. arietinum* sont passées de 5.30 cm à 5.93 cm (Tableau 4). Sous la même solution diluée d'eau de mer, la longueur des racines a également augmenté, mais uniquement chez les plantules de *P. sativum* et *P. vulgaris* avec des valeurs moyennes de 8.73 cm et 8.29 cm, respectivement.

**Tableau 4.** Effets de différentes concentrations d'eau de mer (SW) chez trois espèces de légumineuses (SP) (*P. sativum*, *C. arietinum* et *P. vulgaris*) pendant 8 jours.

SP	SW (%)	Germination			Croissance des tiges				Croissance des racines			
		FGP (%)	MGT (day)	GRI (%)	SL (cm)	SFW (g)	SDW (g)	SMC (%)	RL (cm)	RFW (g)	RDW (g)	RMC (%)
<i>P. sativum</i>	0	95.6 <sup>a</sup>	3.77 <sup>b</sup>	57.3 <sup>a</sup>	4.75 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	0.14 <sup>c</sup>	50.8 <sup>a</sup>	5.12 <sup>b</sup>	0.41 <sup>a</sup>	0.15 <sup>c</sup>	62.7 <sup>a</sup>
	10	95.6 <sup>a</sup>	3.94 <sup>b</sup>	54.2 <sup>a</sup>	6.07 <sup>a</sup>	0.32 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	49.2 <sup>a</sup>	8.73 <sup>a</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.16 <sup>a</sup>	56.3 <sup>b</sup>
	30	100 <sup>a</sup>	4.00 <sup>b</sup>	54.2 <sup>a</sup>	3.84 <sup>c</sup>	0.23 <sup>c</sup>	0.16 <sup>a</sup>	29.5 <sup>b</sup>	3.66 <sup>c</sup>	0.24 <sup>c</sup>	0.15 <sup>b</sup>	37.8 <sup>c</sup>
	50	86.7 <sup>a</sup>	5.32 <sup>a</sup>	32.7 <sup>b</sup>	1.41 <sup>d</sup>	0.18 <sup>d</sup>	0.16 <sup>b</sup>	11.9 <sup>c</sup>	1.64 <sup>d</sup>	0.18 <sup>d</sup>	0.13 <sup>d</sup>	24.9 <sup>d</sup>
	100	0.00 <sup>b</sup>	-	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>d</sup>	-	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>
<i>C. arietinum</i>	0	97.8 <sup>a</sup>	3.95 <sup>b</sup>	55.2 <sup>a</sup>	5.30 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	73.2 <sup>a</sup>	8.17 <sup>a</sup>	0.41 <sup>a</sup>	0.10 <sup>b</sup>	73.9 <sup>a</sup>
	10	95.6 <sup>a</sup>	4.04 <sup>b</sup>	51.2 <sup>a</sup>	5.93 <sup>a</sup>	0.32 <sup>ab</sup>	0.10 <sup>a</sup>	66.6 <sup>b</sup>	6.81 <sup>b</sup>	0.43 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	73.7 <sup>a</sup>
	30	100 <sup>a</sup>	4.40 <sup>b</sup>	49.35 <sup>a</sup>	3.68 <sup>b</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.10 <sup>a</sup>	63.5 <sup>b</sup>	4.09 <sup>c</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	57.72 <sup>b</sup>
	50	73.3 <sup>b</sup>	5.45 <sup>a</sup>	26.4 <sup>b</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	-	0.58 <sup>d</sup>	0.14 <sup>c</sup>	0.09 <sup>c</sup>	33.0 <sup>c</sup>
	100	0.00 <sup>c</sup>	-	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	-	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	-
<i>P. vulgaris</i>	0	91.1 <sup>a</sup>	4.19 <sup>a</sup>	47.1 <sup>a</sup>	16.6 <sup>b</sup>	1.03 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>	88.4 <sup>a</sup>	6.14 <sup>b</sup>	0.18 <sup>c</sup>	0.04 <sup>c</sup>	75.8 <sup>a</sup>
	10	97.8 <sup>a</sup>	4.28 <sup>a</sup>	49.8 <sup>a</sup>	20.4 <sup>a</sup>	1.66 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	89.8 <sup>a</sup>	8.29 <sup>a</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.09 <sup>a</sup>	77.2 <sup>a</sup>
	30	91.1 <sup>a</sup>	4.39 <sup>a</sup>	45.1 <sup>a</sup>	5.76 <sup>c</sup>	0.40 <sup>c</sup>	0.08 <sup>c</sup>	80.5 <sup>b</sup>	7.43 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	67.2 <sup>b</sup>
	50	71.1 <sup>b</sup>	4.44 <sup>a</sup>	34.8 <sup>b</sup>	0.51 <sup>d</sup>	0.08 <sup>d</sup>	0.03 <sup>d</sup>	66.8 <sup>c</sup>	1.60 <sup>c</sup>	0.08 <sup>d</sup>	0.03 <sup>d</sup>	70.1 <sup>b</sup>
	100	0.00 <sup>c</sup>	-	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>e</sup>	-	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	-

FGP-Le pourcentage de germination final; MGT- temps moyen de germination; GRI-indice de taux de germination; SL-longueur des tiges; SFW-poids frais des tiges; SDW-poids sec des tiges; SMC-teneur en humidité des tiges; RL-longueur des racines; RFW-poids frais des racines; RDW-poids sec des racines; RMC-teneur en eau des racines. <sup>a,b,c,d,e</sup>: Les moyennes suivies des mêmes lettres dans la même colonne et dans le même âge ne sont pas significativement différentes ( $p < 0,05$ ). Les valeurs sont la moyenne de 3 répétitions de 15 graines pour les paramètres de germination et la moyenne de 15 répétitions pour les paramètres de croissance des semis.

La longueur des racines a diminué de manière significative ( $P < 0.0001$ ) avec l'augmentation de la salinité jusqu'à atteindre un faible développement à 50% d'eau de mer

avec des valeurs moyennes proches de 1 cm chez les trois légumineuses. L'augmentation de la concentration d'eau de mer jusqu'à 30% a retardé considérablement le développement en diminuant les longueurs de moitié chez *P. sativum* et *C. arietinum*, et de quatre fois chez les plantules de *P. vulgaris*. À 50% d'eau de mer, aucune tige n'est apparue chez *C. arietinum*. En revanche, les plantules de *P. sativum* et *P. vulgaris* ont enregistré des longueurs de 1.41 cm et 0.51 cm, respectivement (Tableau 4).

**Tableau 5.** Analyse de variance de l'effet du temps, des espèces (Sp) (*P. sativum*, *C. arietinum* et *P. vulgaris*) et des traitements à l'eau de mer (TRT) sur les paramètres de germination.

Paramètres	Sources de variation	Degré de liberté	F de Fisher	P
<b>Cinétique de germination</b>	Species 'Sp'	2	3.73	0.0357
	Temps	3	1 839.52	<0.0001
	Concentration d'eau de mer 'TRT'	4	390.56	<0.0001
	Sp × Time	6	1.28	0.2745
	Sp × TRT	8	1.73	0.1320
	Temps × TRT	12	142.22	<0.0001
	Sp × Temps × TRT	24	4.65	<0.0001
<b>FGP</b>	TRT	4	316.28	<0.0001
	Sp	2	2.18	0.1306
	TRT × Sp	8	1.13	0.3723
<b>MGT</b>	TRT	4	46.64	<0.0001
	Sp	2	2.67	0.0899
	TRT × Sp	8	8.09	<0.0001
<b>GRI</b>	TRT	4	346.90	<0.0001
	Sp	2	5.69	0.0081
	TRT × Sp	8	2.75	0.0208

FGP-Le pourcentage de germination final; MGT- temps moyen de germination; GRI-indice de taux de germination.

Les conditions salines ont réduit les paramètres de croissance comme le poids frais et sec des tiges ainsi que le poids sec des racines chez les trois espèces étudiées. Ceci corrobore avec les résultats de plusieurs auteurs (Long *et al.*, 2010; Ventura *et al.*, 2011; Vibhuti *et al.*, 2015; Petrović *et al.*, 2016).

La réduction des poids secs due à l'augmentation de la salinité peut être le résultat d'une combinaison d'effets osmotiques et d'ions spécifiques (Khan *et al.*, 2015). L'un des premiers effets de la salinité sur les plantes est la réduction du taux de croissance (Munns *et al.*, 1995). Ces résultats sont également en accord avec les résultats de Hirich *et al.* (2014) qui ont signalé une baisse significative de la longueur des tiges à des niveaux de salinité élevés.

Les données présentées dans le tableau 4 montrent que le poids frais des tiges et des racines a diminué avec les différentes concentrations d'eau de mer, à l'exception de la solution d'eau de mer à 10%. L'utilisation d'une concentration élevée d'eau de mer (50%) a entraîné un déclin significatif chez les racines que chez les tiges. De plus, les données du tableau 4 montrent que le poids sec des tiges et des racines était constant sous 10, 30 et 50% d'eau de mer, à l'exception des les plantules de *P. vulgaris*. La réduction du FW à haute salinité



pourrait être due à une mauvaise absorption de l'eau du milieu de culture en raison de la sécheresse physiologique (Munns et Gillham, 2015).

**Tableau 6.** Analyse de la variance de l'effet des espèces (SP) (*P. sativum*, *C. arietinum* et *P. vulgaris*) et du traitement à l'eau de mer (TRT) sur la variation des paramètres de croissance chez les plantules.

Paramètres	Sources de variation	Degré de liberté	F de Fisher	P	
Partie aérienne	SL	TRT	4	663.53	<0.0001
		Sp	2	491.59	<0.0001
		TRT × Sp	8	153.07	<0.0001
	SFW	TRT	4	359.81	<0.0001
		Sp	2	376.64	<0.0001
		TRT × Sp	8	134.96	<0.0001
	SDW	TRT	4	922.34	<0.0001
		Sp	2	604.30	<0.0001
		TRT × Sp	8	120.39	<0.0001
	SMC	TRT	4	2 583.22	<0.0001
		Sp	2	1 603.99	<0.0001
		TRT × Sp	8	219.82	<0.0001
Partie racinaire	RL	TRT	4	344.01	<0.0001
		Sp	2	11.06	<0.0001
		TRT × Sp	8	17.20	<0.0001
	RFW	TRT	4	469.08	<0.0001
		Sp	2	48.96	<0.0001
		TRT × Sp	8	35.37	<0.0001
	RDW	TRT	4	6 416.88	<0.0001
		Sp	2	6 433.16	<0.0001
		TRT × Sp	8	514.27	<0.0001
	RMC	TRT	4	230.30	<0.0001
		Sp	2	372.09	<0.0001
		TRT × Sp	8	60.48	<0.0001

SL-longueur des tiges; SFW-poids frais des tiges; SDW-poids sec des tiges; SMC-teneur en humidité des tiges; RL-longueur des racines; RFW-poids frais des racines; RDW-poids sec des racines; RMC-teneur en eau des racines.

Le tableau 4 montre également l'effet de la concentration en eau de mer sur la teneur en eau. La diminution de la teneur en humidité commence à partir de la solution de 30% d'eau de mer par rapport au témoin chez les plantules de *P. sativum* et *C. arietinum*. Cependant, la teneur en eau des plantules de *P. vulgaris* est restée stable par rapport au témoin. Un autre caractère connexe important pour le fonctionnement des plantes est la capacité de maintenir la teneur en eau dans les tissus à des niveaux optimaux face au stress environnemental. Les plantes stressées perdent souvent de l'eau de leurs tissus, ce qui peut avoir des effets rapides et importants sur l'expansion cellulaire, la division cellulaire, l'ouverture stomatique, l'accumulation d'acide abscissique, etc. (Hsiao et Xu, 2000). La plupart de ces effets deviennent évidents sans modification de la pression de turgescence, bien que le potentiel hydrique puisse devenir plus négatif en raison du potentiel osmotique devenant plus négatif (Negrão *et al.*, 2016).

Au stade de la germination, l'émergence des racicules serait contrôlée par l'osmolarité de l'environnement, tandis que la croissance ultérieure des plantules serait limitée par la



mobilisation des réserves et leur transport vers l'axe embryonnaire (Hager *et al.*, 2014). L'étude des effets de diverses concentrations d'eau de mer sur la germination des graines a montré que ni le FGP, ni le MGT et le GRI ne sont affectés par le sel à une concentration de 30% d'eau de mer. Cependant, à des concentrations plus élevées, ils deviennent sensibles. Une réduction de la croissance des plantules a également été enregistrée en réponse à l'augmentation du stress salin. Chez les espèces glycophytes, la salinité peut réduire la croissance des plantes ou endommager les plantes par effet osmotique (elle provoque un déficit hydrique); effets toxiques des ions; et le déséquilibre de l'absorption des nutriments essentiels (Roy *et al.*, 2014; Parihar *et al.*, 2015).

#### **4 Conclusion**

L'utilisation de l'eau de mer en agriculture peut offrir un substitut alternatif à l'eau douce mais avec une dilution respectée pour chaque espèce végétale. Les résultats ont montré que de *P. sativum*, *C. arietinum* et *P. vulgaris* pouvaient germer à différents niveaux de salinité, à l'exception de 100% d'eau de mer, ce qui entraînait une inhibition totale de la germination. Par rapport au témoin, la germination des graines chez toutes les espèces n'a pas été affectée jusqu'à 30% des traitements à l'eau de mer. En effet, le pourcentage de germination final s'est maintenu entre 90 et 100%. Une solution de 50% d'eau de mer a considérablement réduit l'indice de taux de germination et augmenté le temps moyen de germination. 10% de l'eau de mer a augmenté la longueur des tiges et des racines chez toutes les espèces par rapport au témoin. Les conditions salines ont réduit le paramètre de croissance, comme la biomasse fraîches et sèches des tiges et le poids sec des racines des trois espèces étudiées. Le poids sec des tiges et des racines était stable à 10, 30 et 50% de l'eau de mer, sauf pour les plantules de *P. vulgaris*. La diminution de la teneur en humidité commence à partir de 30% de la solution d'eau de mer par rapport au témoin chez les plantules de *P. sativum* et *C. arietinum*. Cependant, il est resté stable pour *P. vulgaris* par rapport au témoin.

# CHAPITRE : III

## Chapitre III - Germination et établissement de la racine en relation avec le type et la concentration du sel chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L. var. *djedida*)

### 1 Objectif de l'étude

Les sols salins contiennent plusieurs types de composants de sels solubles, chacun ayant un effet différent sur la croissance initiale des plantes (Bernstein, 1958; Munns et Termaat, 1986; Shannon et Grieve, 1998; Kheloufi *et al.*, 2016a), et la composition des sels solubles dans les sols salins diffère considérablement d'un endroit à l'autre (Tobe *et al.*, 2002; Kheloufi *et al.*, 2017). Bien que la plupart de ces rapports soient basés sur des expériences avec NaCl, il a été indiqué que les autres sels ont des effets similaires sur la fonction cellulaire, mais à des degrés différents (Tobe *et al.*, 2004). Parmi les cations et les anions associés à la salinité, on peut citer le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), le sodium ( $\text{Na}^+$ ), le chlorure ( $\text{Cl}^-$ ), le sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) et le bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ). Dans certains cas, le potassium ( $\text{K}^+$ ) et le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) peuvent participer à la salinité. En outre, lorsque le pH est supérieur à 9, le  $\text{CO}_3^{2-}$  devient un anion problématique (Schabes et Sigstad, 2005).

La germination des graines est l'étape la plus importante du cycle de vie d'une plante. L'eau, l'air, la température et la lumière sont tous essentiels au processus de germination des graines, à commencer par l'imbibition et l'activation des enzymes d'hydrolyse des réserves (Bradford, 1995; Bewley et Black, 2012; Finch-Savage et Bassel, 2015). Chez les espèces de glycophytes, la salinité peut réduire la croissance des plantes ou endommager les plantes par effet osmotique (elle provoque un déficit hydrique), des effets toxiques des ions et un déséquilibre de l'absorption des nutriments essentiels (Parihar *et al.*, 2015).

Les sols salins contiennent plusieurs types de sel, chacun d'eux peut exercer un effet différent sur la germination des graines et la croissance des plantules. Dans la présente étude, nous avons comparé les effets de différents types de sels sur la germination des graines et la croissance des plantules de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* var. *Djedida*). Cette variété fait partie des variétés de haricots les plus cultivées en Algérie. Elle a déjà fait l'objet de plusieurs études évaluant sa tolérance au NaCl (Bouزيد et Rahmoune, 2012; Adda *et al.*, 2014; Taïbi *et al.*, 2016) et même à l'eau de mer (Mansouri et Kheloufi, 2017).

### 2 Matériel et méthodes

#### 2.1 Dispositif expérimental et application du stress salin

Ce projet de recherche a été réalisé en 2018, au laboratoire du Département d'Ecologie et d'Environnement, Université de Batna 2, Algérie. Les graines de *P. vulgaris* var. *Djedida* (longueur :  $12.9 \pm 0.63$  mm; largeur :  $6.46 \pm 0.51$  mm; épaisseur :  $5.69 \pm 0.42$  mm; moyenne

± SE; n=50) ont été fournis par SARL AGROSEED (Date de récolte : 2016; conditionnement des semences : France; origine : USA; référence : DJ0512). Le poids de mille graines est de 273 g.

Dans le but d'évaluer la tolérance au sel pendant la germination, un total de quatre répétitions de dix graines ont été désinfectées avec 1% d'hypochlorite de sodium, rincées à l'eau distillée et immédiatement semées dans des boîtes de Pétri de 9 cm contenant 0.8% d'eau gélosée. L'eau gélosée a été préparée avec divers sels : NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub> et KCl, avec des concentrations de 0, 100, 200 et 300 mM. Les graines ont été incubées à 25 °C, dans l'obscurité, pendant 10 jours (Mansouri et Kheloufi, 2017).

Les expériences ont été réalisées dans un bloc complètement randomisé. Des comptages de germination ont été réalisés quotidiennement pour évaluer la cinétique de germination. Les graines sont considérées comme germées uniquement lorsque des racicules de 2 mm sont émergées (Figure 4). À la fin de la période de germination, le pourcentage de germination final, la longueur de la racine pivotante, le nombre de racines secondaires, le poids sec des cotylédons et des plantules (sans cotylédons) ont été enregistrés. Le système racinaire du haricot commun est caractérisé par une racine pivotante. Les racines qui en résultent sont appelées racines secondaires, celles qui en sont formées sont appelées racines tertiaires (Díaz-Ruiz, 2012).



**Figure 4.** Dispositif expérimental et mesures.

Les cotylédons et les plantules ont été pesés séparément après séchage dans une étuve à 80 °C pendant 48 heures. Un nombre de 12 répétitions a été utilisé pour les estimer les paramètres de croissance, à savoir trois échantillons de chacune des 4 boîtes de Pétri.

Dans les tests de germination, le pourcentage de germination final (FGP) pour chaque type et niveau de sel a été calculé en utilisant la formule suivante (Côme, 1970) :

$$\text{FGP (\%)} = \frac{\text{Nombre de graines germées}}{\text{Total des graines testées}} \times 100$$

## 2.2 Analyses statistiques

Les expériences ont été menées avec quatre répétitions de dix graines ( $n=4 \times 10$ ) pour la germination des graines et avec 12 répétitions ( $n=12$ ) pour les caractéristiques morphologiques. Les résultats ont été exprimés en moyenne ( $\pm$ écart-type). Toutes les données ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) à un seul et deux facteurs et au test à comparaison multiples de Duncan ( $P < 0.05$ ) à l'aide du logiciel SAS version 9.0 (*Statistical Analysis System*) (2002).

## 3 Résultats et discussion

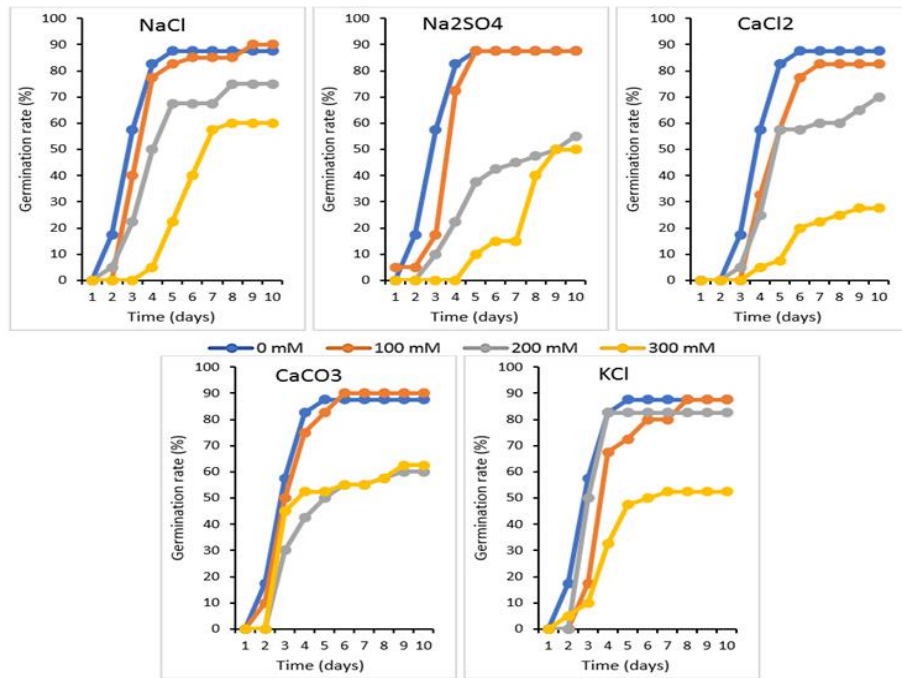
Les résultats de l'analyse de la variance ont indiqué que les effets des types et des concentrations de sel et leur effet d'interaction ont été significatifs au niveau de tous les paramètres étudiés ( $P < 0.01$ ) (Tableau 7). La comparaison des moyennes pour chaque type de sel est présentée dans le tableau 8. Ces données ont montré que parmi les différents sels, les effets inhibiteurs les plus faibles sur la germination et les paramètres les plus mesurés appartenaient à  $\text{CaCO}_3$  et  $\text{KCl}$ , et l'inhibiteur le plus élevé était lié à  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et  $\text{CaCl}_2$ . D'un autre côté, l'effet de la concentration en sel est évident. L'effet inhibiteur le plus élevé a été relié à 300 mM de tous les sels (Tableau 8).

### 3.1 Cinétique de germination

D'après nos résultats, les graines de haricot commun ont pu germer en l'absence et/ou en présence d'une salinité faible/élevée. Elles sont tolérantes en présence de sels; sauf que cette tolérance diffère d'une solution saline à l'autre, car le type de sel joue un rôle déterminant dans l'induction pour la germination des graines (Kheloufi *et al.*, 2016b).

Les résultats représentés sur la figure 5 indiquent que dans les conditions salines des cinq types de sels ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  et  $\text{KCl}$ ), la cinétique de germination exprime trois phases: une première phase de latence, exprimée par l'imbibition des graines; une deuxième phase exponentielle où l'on assiste à une accélération de la germination et enfin une troisième phase caractérisée par un stade stationnaire indiquant une interruption de la germination. Enfin, quel que soit le type de sel utilisé, la capacité germinative des graines stressées par le sel est réduite et ceci pour les trois concentrations utilisées. Dans des conditions salines de 100 mM pour tout type de sel, la dynamique de la capacité germinative est légèrement perturbée. Les graines ont manifesté leur sensibilité à partir de la concentration de 200 mM en exprimant un taux de germination très réduit avec une phase exponentielle très lente et qui dure beaucoup plus longtemps pour être stabilisé au 10<sup>ème</sup> jour de l'expérience. Les sels concernés par cette observation sont le  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{CaCO}_3$  (Figure 5). Selon Rejili *et al.* (2010), les effets osmotiques se traduisent par l'incapacité des graines à

absorber des quantités suffisantes d'eau pour les ramener à leur seuil critique d'humidité, nécessaire à la libération du processus de germination. Cependant, les effets toxiques sont liés à une accumulation cellulaire de sels qui provoquent des perturbations des enzymes impliquées dans la physiologie de la germination des graines, empêchent la rupture de dormance des embryons et conduisent à une diminution de la capacité de germination.



**Figure 5.** Effet de différents types de solutions salines (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub> et KCl) à différentes concentrations de (0, 100, 200 et 300 mM) sur la cinétique de germination de *Phaseolus vulgaris* var. *Djedida* après 10 jours d'incubation dans des boîtes de Pétri.

### 3.2 Pourcentage de germination final

Selon la figure 3A, l'interprétation de l'effet d'interaction des types de sel et des concentrations sur le pourcentage de germination a montré qu'une germination maximale a été obtenue dans des conditions non salines (traitement témoin) (87.5%). Le FGP le plus bas a été obtenu sous 300 mM de tous les sels enregistrant les valeurs suivantes : 60% (NaCl), 60% (CaCO<sub>3</sub>), 52.5% (KCl), 50% (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et 27.5% (CaCl<sub>2</sub>). Cette réduction du FGP induite par une augmentation du stress salin a été décrite par de nombreux auteurs pour la même espèce de légumineuse (Beltagi *et al.*, 2006; Taffouo *et al.*, 2010; Cokkizgin, 2012; Mena *et al.*, 2015). La diminution de la germination est probablement due à un potentiel osmotique soluble réduit, à des ions toxiques élevés et à un déséquilibre des nutriments des graines (Hu et Schmidhalter, 2005). On suppose également qu'en plus des effets toxiques de certains ions, une concentration plus élevée de sel réduit le potentiel hydrique du milieu, ce qui entrave l'absorption d'eau pour la germination des graines et réduit ainsi la germination (Jamil *et al.*, 2006; Tavakkoli *et al.*, 2010).

La germination des graines de haricot commun par divers sels a été de l'ordre de  $\text{NaCl} > \text{KCl} > \text{CaCO}_3 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{CaCl}_2$  (Tableau 8). Kaymakanova (2009) a également montré que les trois cultivars de *P. vulgaris* étudiés étaient inhibés plus fortement par le  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  que par le traitement au  $\text{NaCl}$ . Cela peut être attribué au fait que différents sels ont différents effets inhibiteurs sur l'induction de la suppression de la germination en abaissant le potentiel osmotique du milieu (Moghaddam *et al.*, 2018). La plupart des études ont montré que l'effet des sels sur la germination est principalement osmotique et peu de chercheurs ont montré qu'il pouvait être à la fois ionique et osmotique (Duan *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010).

### 3.3 Longueur de la racine pivotante

La longueur des racines est le paramètre le plus important relié au stress salin. En effet, les racines sont en contact direct avec le sol et absorbent l'eau du sol et le fournit au reste de la plante. Pour cette raison, la longueur des racines fournit un paramètre important en réponse au stress salin (Munns, 2011; Kheloufi *et al.*, 2018). La longueur de la racine pivotante a montré une différence très significative entre l'effet d'interaction de divers sels et différentes concentrations de salinité (Figure 6B). En augmentant les niveaux de salinité, la longueur de la racine pivotante a diminué. La longueur de racine la plus élevée a été enregistrée dans le traitement témoin (6.97 cm) (Figure 6B). L'effet inhibiteur des sels sur la longueur des racines a été indiqué dans notre précédente étude avec trois cultures de légumineuses, à savoir : haricot commun, pois et pois chiche (Mansouri et Kheloufi, 2017).

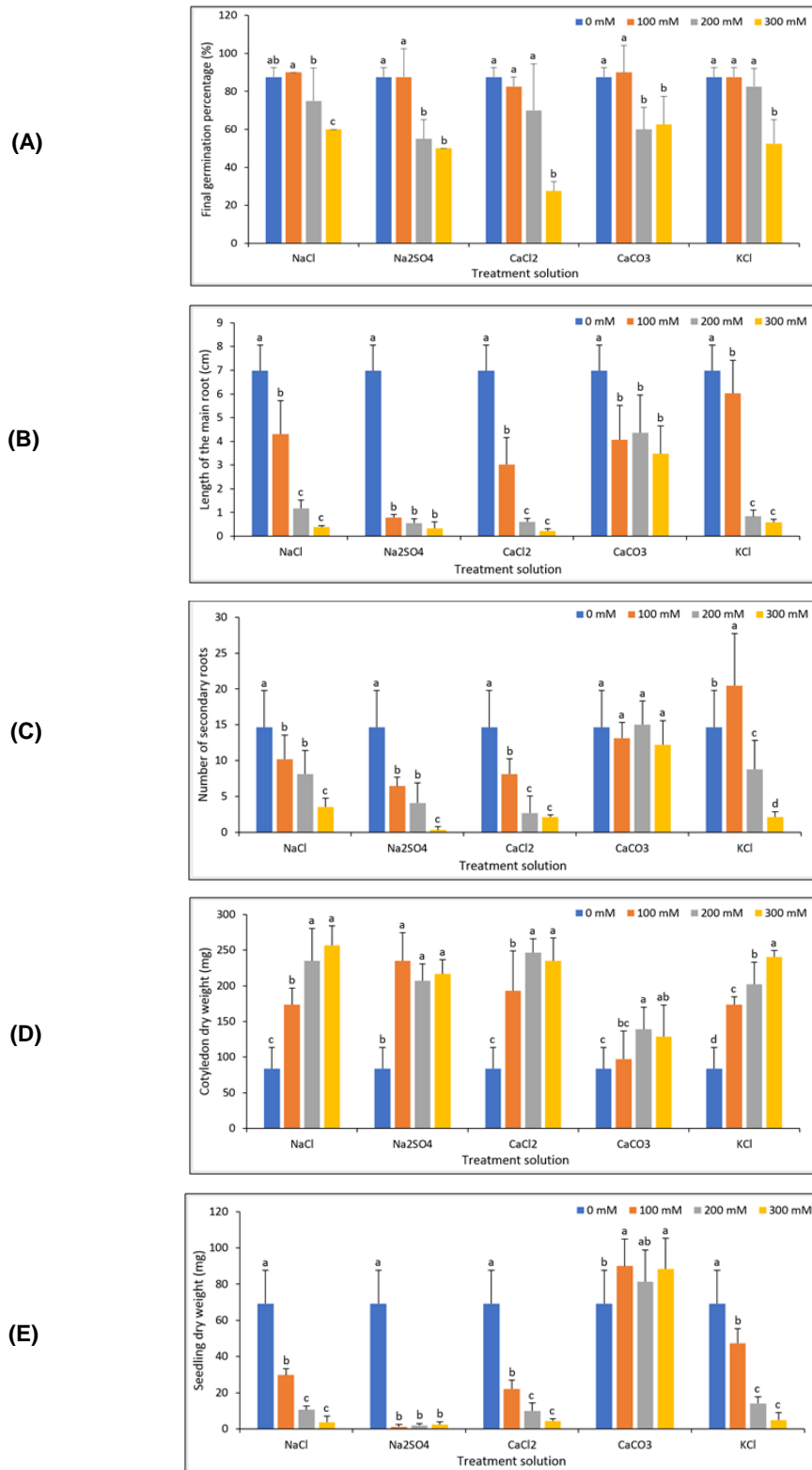
La longueur de la racine pivotante des divers sels a été de l'ordre de  $\text{CaCO}_3 > \text{KCl} > \text{NaCl} > \text{CaCl}_2 > \text{Na}_2\text{SO}_4$  (Tableau 8). La diminution de la longueur des plantes et d'autres paramètres de croissance sont les effets les plus distincts et les plus évidents du stress salin, car l'inhibition de la croissance est probablement la réponse la plus générale des plantes au stress (Munns et Tester, 2008). Bayuelo-Jimenes (2002) a rapporté que les espèces tolérantes au sel telle que *P. vulgaris* maintenaient une croissance racinaire relativement élevée même à 180 mM de  $\text{NaCl}$ .

### 3.4 Nombre de racines secondaires

Le développement d'un système racinaire robuste est crucial pour la survie des plantes et la compétition pour les ressources du sol (Schenk, 2006). Il y a effectivement une différence significative entre les divers sels et chaque niveau de salinité sur les racines secondaires. Ces effets de sels sur les fonctions des membranes cellulaires et des parois cellulaires peuvent affecter le potentiel hydrique du cytosol et l'extensibilité cellulaire, et ainsi, affecter la croissance des plantules (Kheloufi *et al.*, 2018). Les résultats de l'effet



d'interaction ont montré que les racines secondaires ont été enregistrées principalement chez le contrôle et sous 200 mM de NaCl, CaCO<sub>3</sub> et KCl (Figure 6C).



**Figure 6.** Effet d'interaction des types et des concentrations de sel sur: (A) le pourcentage de germination final, (B) la longueur de la racine pivotante, (C) le nombre de racines secondaires, (D) le poids sec des cotylédons et (E) le poids sec des plantules chez *Phaseolus vulgaris* var. *Djedida* après 10 jours d'incubation dans des boîtes de Pétri (pour chaque solution de traitement, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à 5% de probabilité).



D'un autre côté, les graines de *P. vulgaris* ont conservé la capacité de produire des racines secondaires (jusqu'à 12) uniquement avec le  $\text{CaCO}_3$  et ceci même sous la concentration de 300 mM. En effet, aucun effet significatif n'a été observé sur le nombre de racines secondaires sous  $\text{CaCO}_3$  (Tableau 8).

Alors que sous le même niveau, les effets inhibiteurs de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$  et  $\text{KCl}$  ont été plus accrus (Figure 6C). Selon la même figure, la valeur la plus élevée de racines secondaires est obtenu à 100 mM de  $\text{KCl}$  (approximativement 20). Il s'est avéré qu'une salinité élevée produisait une sécheresse physiologique dans la plante. Nos résultats corroborent avec ceux de Nuñez-Barrios *et al.* (1998) où le haricot commun a dupliqué le nombre de racines secondaires et tertiaires avec une architecture modifiée en réponse à la sécheresse. Un système racinaire profond et étendu a été préconisé pour augmenter la productivité des légumineuses alimentaires dans des conditions de sécheresse et de salinité. La longueur des racines pourrait être un paramètre important pour aider à la sélection *in vitro* de variétés de haricots résistantes à la salinité avec une capacité améliorée d'acquérir de l'eau (Mena *et al.*, 2015).

**Tableau 7.** Analyse de la variance pour les paramètres étudiés chez *Phaseolus vulgaris* var. *Djedida* en réponse au stress salin utilisant différents types de sel ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  et  $\text{KCl}$ ) à différentes concentrations de (0, 100, 200 et 300 mM).

Paramètres	Sources de variables	Degré de liberté	F de Fisher	P
<b>FGP</b>	TRT	3	56,48	< 0,0001
	TYPE	4	3,43	0,0136
	TRT × TYPE	12	2,74	0,0051
<b>LTR</b>	TRT	3	383,59	< 0,0001
	TYPE	4	39,25	< 0,0001
	TRT × TYPE	12	15,64	< 0,0001
<b>SECROOT</b>	TRT	3	70,27	< 0,0001
	TYPE	4	25,48	< 0,0001
	TRT × TYPE	12	8,10	< 0,0001
<b>COTYDW</b>	TRT	3	157,81	< 0,0001
	TYPE	4	37,42	< 0,0001
	TRT × TYPE	12	7,30	< 0,0001
<b>SLDW</b>	TRT	3	165,92	< 0,0001
	TYPE	4	173,03	< 0,0001
	TRT × TYPE	12	23,19	< 0,0001

TRT-concentration en sel, FGP-Pourcentage de germination final (n=4\*10), LTR-longueur de la racine principale (n=12), SECROOT-nombre de racines secondaires (n=12), COTYDW-poids sec des cotylédons (n=12), SLDW-poids sec des plantules (n=12).

Duan *et al.* (2013) ont constaté que les racines primaires et latérales ont des programmes de réponse intrinsèquement différents à la salinité. Les racines latérales ayant une abscission plus forte que les racines primaires après traitement au sel. Sous haute salinité, la production d'acide abscissique (ABA) est induite et elle est nécessaire à la suppression des

racines latérales. La capacité du système racinaire à contrôler l'entrée des ions dans la partie aérienne a une importance cruciale pour la survie des plantes en présence de sel (Chinnusamy, 2005). De plus, une salinité élevée peut inhiber la croissance des plantules et particulièrement l'allongement des racines en ralentissant l'absorption d'eau par la plante (Munns, 2002).

**Tableau 8.** Analyse de la variance pour chaque solution saline (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub> et KCl) utilisée pour étudier la réponse de *Phaseolus vulgaris* var. *Djedida* au stress salin.

Type de sel	Paramètres	Sources de variables	Degré de liberté	F de Fisher	P
NaCl	FGP	TRT	3	9,31	0,0019
	LTR	TRT	3	101,33	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	15,32	< 0,0001
	COTYDW	TRT	3	50,00	< 0,0001
	SLDW	TRT	3	84,97	< 0,0001
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	FGP	TRT	3	18,86	< 0,0001
	LTR	TRT	3	290,04	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	36,15	< 0,0001
	COTYDW	TRT	3	50,14	< 0,0001
	SLDW	TRT	3	119,20	< 0,0001
CaCl <sub>2</sub>	FGP	TRT	3	17,62	0,0001
	LTR	TRT	3	141,49	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	33,54	< 0,0001
	COTYDW	TRT	3	36,50	< 0,0001
	SLDW	TRT	3	82,16	< 0,0001
CaCO <sub>3</sub>	FGP	TRT	3	6,97	0,0057
	LTR	TRT	3	12,03	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	1,15	0,3449
	COTYDW	TRT	3	4,54	0,0092
	SLDW	TRT	3	2,77	0,0578
KCl	FGP	TRT	3	15,11	0,0002
	LTR	TRT	3	129,21	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	23,18	< 0,0001
	COTYDW	TRT	3	77,80	< 0,0001
	SLDW	TRT	3	74,13	< 0,0001

TRT-concentration en sel, FGP-Pourcentage de germination final (n=4\*10), LTR-longueur de la racine principale (n=12), SECROOT-nombre de racines secondaires (n=12), COTYDW-poids sec des cotylédons (n=12), SLDW-poids sec des plantules (n=12).

### 3.5 Poids sec des cotylédons

Au cours du processus de germination, la mobilisation des réserves des graines est initiée des cotylédons à l'axe embryonnaire (Bewley et Black, 1985). Ce processus se poursuit jusqu'au stade de plantules, dans lequel les sources primaires sont épuisées et la plantule devient autotrophe pour former des feuilles qui effectuent la photosynthèse, la source la plus importante de photosynthétat pour la plante (Munier-Jolain *et al.*, 1998). L'axe embryonnaire se compose de la plumule et de la radicule qui exigent des nutriments de la graine au début de la germination et qui sont fournis exclusivement par les cotylédons (Bewley et Black, 1985).

La biomasse sèche des cotylédons par les divers sels a été de l'ordre de  $\text{CaCl}_2 > \text{NaCl} > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{KCl} > \text{CaCO}_3$  (Tableau 8). La tolérance des cotylédons au stress salin élevé peut être une stratégie adaptative chez le haricot pour survivre sous des facteurs environnementaux défavorables (Ruffino *et al.*, 2010). Des études menées par Wang *et al.* (2012) ont également indiqué que les cotylédons de la vesce (*Vicia cracca*) ont été plus tolérants au NaCl par rapport aux tiges.

Selon Bathellier *et al.* (2008), lors de l'imbibition de la graine de *P. vulgaris*, la masse des cotylédons diminue lentement, mais au bout de trois jours, il s'est avéré qu'elle s'est accélérée de façon marquée. Les cotylédons ont réduit leur poids sec car ce sont les seules structures qui fournissent des nutriments aux plantules (Díaz-Ruiz, 2012). Selon la figure 6D, la réduction de la biomasse sèche des cotylédons est proportionnelle aux taux de germination et au développement de plantules en biomasse sèche et en taille. Cela établit les relations entre la croissance de la tige et de la racine et fournit des nutriments provenant des cotylédons, qui peuvent être exprimés par l'accumulation de matière sèche dans la tige et la racine et pour perdre la matière sèche des cotylédons (Milberg et Lamont, 1997; Koyro *et al.*, 2008). Au cours du processus de germination, les cotylédons perdent de la matière sèche métabolique et conservent la matière sèche structurale au cours du développement des plantules afin de devenir les seules structures qui meurent (Díaz-Ruiz, 2012).

### 3.6 Poids sec des plantules

Selon la figure 6E, le poids sec maximum des plantules a été enregistré sous 100 mM de  $\text{CaCO}_3$  (89.94 mg), tandis que le minimum a été enregistré sous 100 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1.18 mg). En effet, sous une solution saline opérée par le  $\text{CaCO}_3$ , les plantules ont enregistré les valeurs les plus élevées sous toutes les concentrations et également par rapport au témoin. Ensuite, la biomasse sèche des plantules par les divers sels a été de l'ordre de  $\text{CaCO}_3 > \text{KCl} > \text{NaCl} > \text{CaCl}_2 > \text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Généralement, les diminutions de la croissance des plantules, dues à l'augmentation de la concentration en sel, sont causées par des effets physico-chimiques ou par des sels osmotiques toxiques qui existent dans les solutions salines (Sarker *et al.*, 2014). Les réductions de la biomasse de *P. vulgaris* dans des conditions salines ont été indicatrices de limitations sévères de croissance à la concentration de 300 mM (Figure 6E), à l'exception de la solution de traitement au  $\text{CaCO}_3$ .

Chez plusieurs légumineuses, comme la féverole (*Vicia faba*) (Tammam, 2003; Bulut et Akinci, 2010), le soja (*Glycine max*) (Panneerselvam *et al.*, 1998) et le pois chiche (*Cicer arietinum*) (Akhter *et al.*, 2004), la salinité réduit la biomasse sèche des plantules. La

réduction du développement des plantules peut être due aux effets toxiques du sel utilisé, ainsi qu'à une absorption déséquilibrée des nutriments par les plantules (Jamil *et al.*, 2006). Bayuelo-Jiménez *et al.* (2002) indiquent que le terme « tolérance au sel pendant la germination des graines » est utilisé uniquement pour désigner les situations où les graines germent rapidement dans des conditions de stress salin. Aucune distinction n'est faite entre les effets osmotiques et ioniques du stress salin. De même, la tolérance au sel pendant la croissance précoce des plantules est évaluée sur la croissance absolue à une concentration de sel donnée, ainsi que le pourcentage de croissance sous stress salin par rapport à la croissance dans des conditions sans stress. Les mêmes auteurs démontrent que la tolérance à la salinité chez les espèces de *Phaseolus* peut également varier selon les stades de développement. La tolérance au sel à la germination et au stade de l'émergence des plantules semble être contrôlée par plus d'un gène et est fortement influencée par le type et la concentration de sel (Yamaguchi et Blumwald, 2005; Munns, 2005).

#### 4 Conclusion

Au stade de la germination, l'émergence des racines serait contrôlée par l'osmolarité de l'environnement de culture, tandis que la croissance ultérieure des plantules serait limitée par la mobilisation des réserves. Les résultats de l'analyse de la variance ont indiqué que les effets des types et des concentrations de sel et leur effet d'interaction étaient significatifs au niveau tous les paramètres mesurés ( $P < 0.01$ ). Cependant, aucun effet significatif n'a été observé sur le nombre de racines secondaires et la biomasse sèche des plantules avec la solution de traitement au  $\text{CaCO}_3$ . Selon les résultats, les effets inhibiteurs des cinq types de sel diffèrent considérablement. En effet, la germination des graines de haricot commun variété *Djedida* par divers sels était de l'ordre de  $\text{NaCl} > \text{KCl} > \text{CaCO}_3 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{CaCl}_2$ . Cependant, la longueur de la racine pivotante, le nombre de racines secondaires et le poids sec des plantules par les divers sels étaient de l'ordre de  $\text{CaCO}_3 > \text{KCl} > \text{NaCl} > \text{CaCl}_2 > \text{Na}_2\text{SO}_4$ . L'effet de la concentration en sel était également évident. La réduction de la biomasse sèche des cotylédons est proportionnelle aux taux de germination et au développement de plantules en biomasse sèche et en taille. Les graines de *P. vulgaris* var. *Djedida* a pu germer sous toutes les concentrations des différents types de sel. Le pourcentage de germination final (FGP) le plus bas a été obtenu sous 300 mM de tous les sels enregistrant les valeurs suivantes :  $\text{CaCO}_3$  - 60%,  $\text{NaCl}$  - 60%,  $\text{KCl}$  - 52.5%,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  - 50% et  $\text{CaCl}_2$  - 27.5%.

# CHAPITRE : IV

## **Chapitre IV - Effet de la fertilisation azotée sur la croissance, la nodulation et l'infection mycorhizienne à différents stades de développement chez *Phaseolus vulgaris* L. var. *djedida***

### **1 Objectif de l'étude**

Le haricot commun *Phaseolus vulgaris* L. a fait l'objet de plusieurs études et a été décrit par de nombreux auteurs comme une légumineuse à faible potentiel de fixation d'azote par rapport à d'autres espèces de légumineuses. Le premier objectif de cette étude est d'évaluer le développement et la croissance de *P. vulgaris* L. var. *djedida* et son rendement à différents stades de développement (végétatif, floraison et fructification), en présence et en absence d'engrais azoté (Urée 46) sous un climat aride et dans un sol contenant un taux élevé en CaCO<sub>3</sub> et en phosphore assimilable. Le deuxième objectif est de réaliser une enquête sur la nodulation, le nombre de spores ainsi que d'évaluer l'infection mycorhizienne dans ces mêmes conditions.

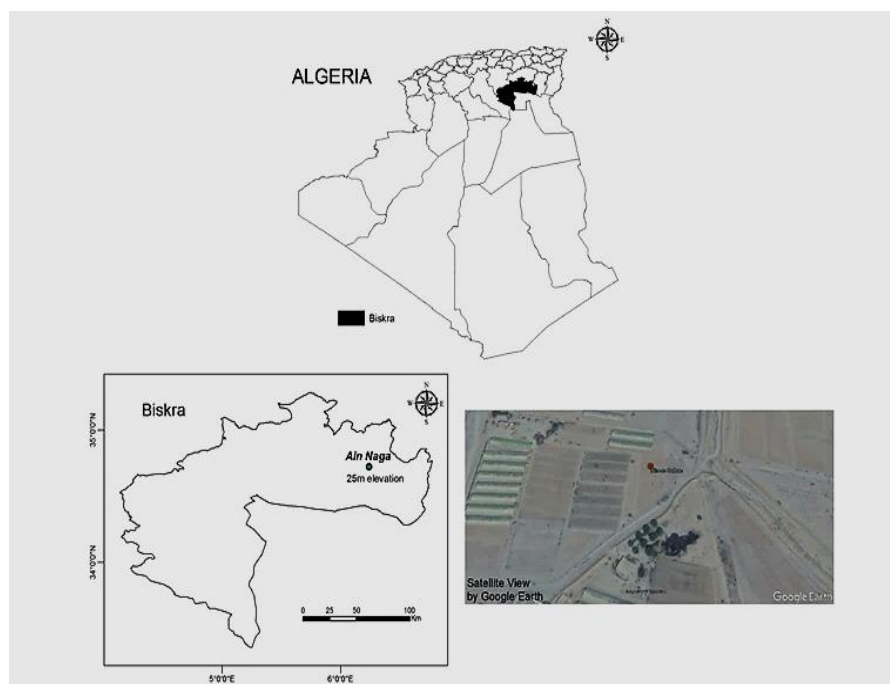
Dans ce contexte, ces travaux permettront de comparer les rendements de *P. vulgaris* dans deux parcelles ayant reçu ou non une fertilisation azotée. Ce travail déterminerait si la symbiose pouvait d'abord s'exprimer dans un climat aride puis si elle couvrirait les besoins de la plante en azote. Au même temps, cela va nous aider à évaluer le potentiel des champignons vésiculaires et des mycorhizes arbusculaires au cours des différentes stades de la croissance du haricot commun. Plusieurs hypothèses peuvent se présenter concernant le rendement de la parcelle fertilisée. Un rendement inférieur dans la parcelle non fertilisée indiquerait que le fonctionnement de la symbiose est limitant. Ces besoins peuvent cependant être faibles si le rendement des plantes est fortement lié à un autre facteur que la nutrition azotée. D'un autre côté, un faible rendement dans la parcelle fertilisée suggérerait que de nouvelles modifications de la culture soient apportées immédiatement.

### **2 Matériel et Méthodes**

#### **2.1 Emplacement du site de culture**

Cette étude a été réalisée pendant la saison de culture en 2018 dans une exploitation agricole à Aïn Naga, une ville située dans la région aride de la wilaya de Biskra (sud-est de la capitale Alger) en Algérie (Figure 7). Précisément, ce site est situé à la latitude de 34°43'16.24 " N et la longitude de 6°14'38.95" E pour une altitude de 25 mètres. Biskra est située dans la région aride selon l'indice d'aridité De Martonne (Kheloufi *et al.*, 2018). Selon la période climatique (1980-2018), le climat de Biskra est caractérisé par un été très chaud et sec avec une température moyenne de 43.4 °C et une humidité relative moyenne de 12%. L'hiver est très froid (température minimale moyenne 4 °C). Les précipitations totales annuelles sont de

160,6 mm avec une moyenne de 30 jours de pluie au cours de l'année (WCD Tutiempo, 2019).



**Figure 7.** Localisation du site de l'expérimentation.

Les données météorologiques de la période expérimentale sont présentées sur le tableau 9. Selon ce tableau, la quantité de précipitations est faible. Ces conditions climatiques enregistrées lors de notre étude représentaient un avantage car de fortes pluies pouvaient perturber notre plan expérimental surtout si l'engrais azoté se déplaçait vers une parcelle visant à représenter le bloc témoin (sans fertilisation).

**Tableau 9.** Données climatiques pendant la période expérimentale dans la région aride d'Aïn Naga (Biskra, Algérie) (WCD Tutiempo, 2019).

Paramètres climatiques		Mois (Année 2018)		
		Septembre	Octobre	Novembre
<b>Précipitations</b>	Quantité (mm)	13.2	27.7	0.76
	Nombre de jours de pluie	1	8	1
	Maximum	35.9	27.1	21.6
<b>Température (°C)</b>	Moyenne	30.4	22.1	16.7
	Minimum	25.1	17.4	12.1
<b>Humidité relative (%)</b>		42.8	54.4	56.3

Le site destiné à cette étude n'a pas été exploité pour des cultures végétales depuis trois années. Cette parcelle de (6 × 8 m) a été divisée en deux sous-parcelles destinées aux deux traitements de fertilisation. Les résultats de l'analyse du sol (à 25-30 cm de profondeur) avant l'expérience ont révélé un pH de 7.78; 0.17% d'azote total; 182.8 mg.kg<sup>-1</sup> de phosphore (JORE HEBERT) et 1.22 meq.kg<sup>-1</sup> de potassium. Le sol a une texture limoneuse avec une conductivité électrique de 2.58 ms.cm<sup>-1</sup>. Cette conductivité électrique élevée interprétée par une salinité élevée du sol est due à la forte concentration en ions calcium (20.3 meq/100 g<sub>sol</sub>)

par rapport à 1.36 meq/100 g<sub>sol</sub> de Mg<sup>2+</sup>, 1.18 meq/100 g<sub>sol</sub> de K<sup>+</sup> et 1.25 meq/100 g<sub>sol</sub> de Na<sup>+</sup>. Le sol a été classé comme très calcaire avec 53.1% du CaCO<sub>3</sub> total. Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire d'Analyse Physique et Chimique de l'Eau et des Sols (SARL Echems Hydro-Construction, Batna, Algérie).

## 2.2 Matériel végétal

Cette étude est menée sur une variété de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L. var. *djedida*). Cette variété est la plus dominante sur le marché agricole et la plus cultivée en Algérie. Les graines de *P. vulgaris* var. *djedida* (longueur : 12.9 ± 0.63 mm; largeur : 6.46 ± 0.51 mm; épaisseur : 5.69 ± 0.42 mm; moyenne ± SD; n=50) ont été fournis par SARL AgroSeed (Date de récolte : 2016; conditionnement des semences : France; origine : USA; référence : DJ0512). Le poids de mille graines était de 273 g (Mansouri *et al.*, 2019). Les graines ont été traitées avec Thiram (un fongicide non systémique). La maturité des graines de cette variété est de 85 à 100 jours.

## 2.3 Fertilisation

L'engrais azoté a été fourni sous forme d'urée granulée à 46% pour les parcelles fertilisées. C'est un engrais azoté formé entièrement d'urée. Sous forme de granulés hydrosolubles, il fournit un apport en azote très riche pour les cultures avec une très bonne aptitude à l'étalement grâce à sa granulométrie homogène et régulière (1.8 mm de diamètre moyen). Dans le sol, l'urée doit d'abord être hydrolysée en ammoniac pour être pleinement utilisable par la plante. La vitesse de traitement dépend de la température et de l'humidité du sol pendant des heures, voire des jours après l'épandage. Son utilisation nécessite une attention particulière en raison du phénomène de volatilisation de l'ammoniac dans l'atmosphère.

## 2.4 Dispositif expérimental et traitement

Les expériences ont été suivies un plan de randomisation totale avec cinq répartitions pour chaque traitement (équivalent à 5 lignes, chaque ligne contenait 150 à 160 graines). L'engrais a formé les parcelles principales, mesurant chacune (4 × 3 m) avec une allée de 0.5 m entre les lignes pour minimiser les interactions entre parcelles. Les parcelles ont été séparées par deux lignées de la même espèce. Le facteur de fertilisation a compris deux niveaux : fertilisé (0.5 kg d'engrais/parcelle) et non fertilisé (témoin) (0 kg d'engrais/parcelle). L'engrais azoté n'a été ajouté qu'une seule fois avant la floraison (50 jours après le semis) d'une semaine. La parcelle témoin n'a reçu aucun des traitements comme source d'azote.

La préparation des terres a été effectuée manuellement fin août 2018 en deux opérations : labour et hersage. Après avoir préparé le sol, deux graines ont été placées dans les



sillons à l'espacement recommandé avec une densité de 800 graines par parcelle (150-160 graines  $\times$  5 lignes) (Figure 8). Pendant toute l'expérience, les plantes n'ont reçu aucun traitement herbicide, ou insecticide. Les mauvaises herbes ont été contrôlées et éliminées manuellement. Il est à noter qu'aucune attaque d'origine biotique n'a été rapportée au cours de cette étude.



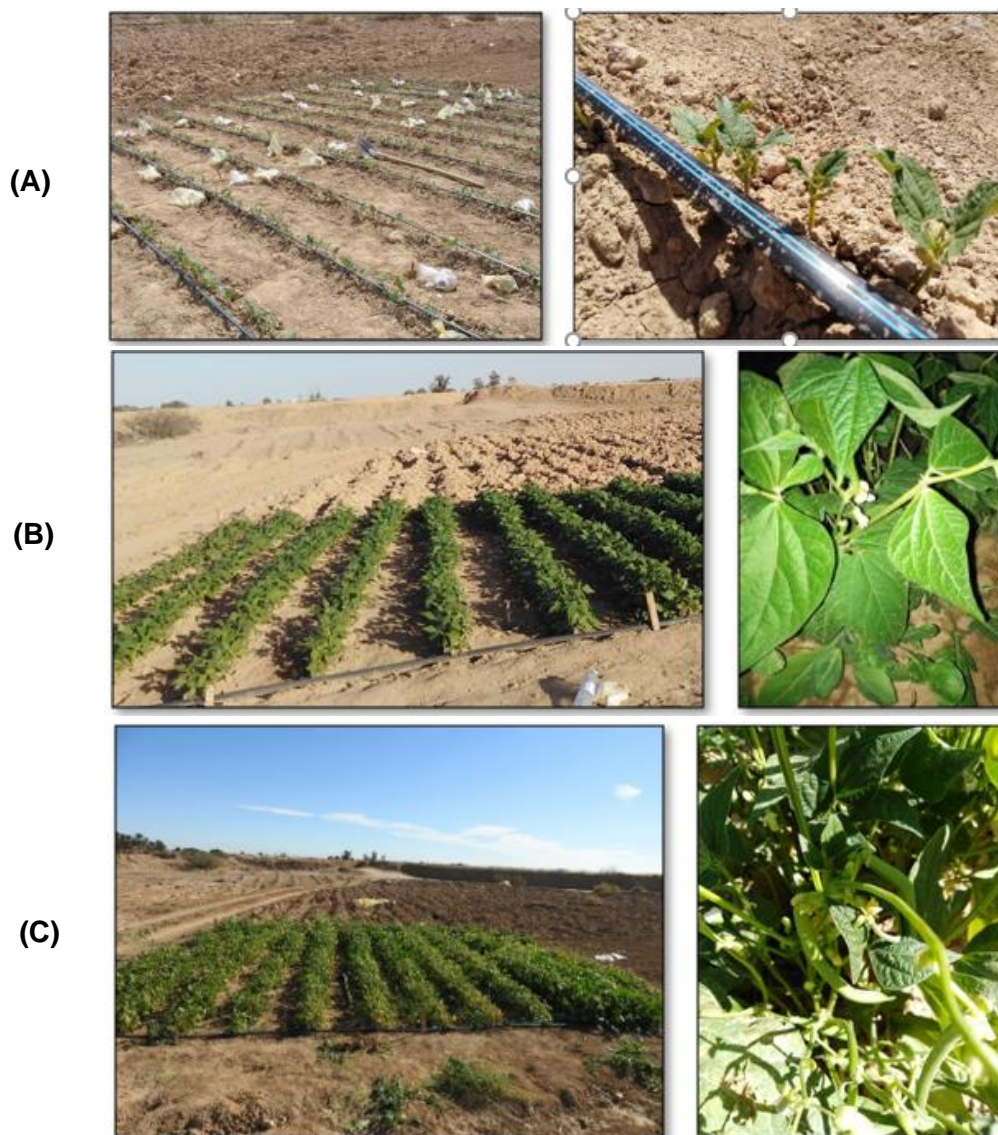
**Figure 8.** Préparation du terrain de la culture de *Phaseolus vulgaris* L. var. *djedida*, installation du système d'arrosage goutte à goutte et démarrage du semis à Aïn Naga, Biskra.

Un modèle de système d'irrigation à la goutte à goutte (Figure 8) a été utilisé pour les raisons suivantes : la perte d'engrais et de nutriments est minimisée en raison d'une application localisée et d'une lixiviation réduite, l'efficacité de l'application d'eau est élevée si elle est gérée correctement et la mise à niveau du champ n'est pas nécessaire. La fréquence d'irrigation pendant toute l'expérience était tous les 3-4 jours. Les deux parcelles (fertilisées et non fertilisées) ont été séparées par deux lignes de la même espèce végétale (Figure 8, Figure 13).

### **2.5 Détermination de la cinétique de croissance, des composants de rendement et de la nodulation**

La cinétique de croissance concernait les trois principaux stades de vie des plantes, à savoir : végétative (Figure 9A), floraison (Figure 9B) et fructification (Figure 9C). Le stade végétatif correspond au stade de 2 à 4 feuilles. À chaque accomplissement complet de la période de croissance, la biomasse sèche des plantes, la longueur des parties aériennes et racinaires ainsi que le nombre de racines secondaires ont été évalués. Le nombre d'échantillons utilisés a été de (20 plantes  $\times$  2 parcelles  $\times$  2 traitements  $\times$  3 stades de croissance). Les plantes ont été soigneusement déterrées avec une pelle sur un sol humide afin d'éviter un déracinement brutal. Les pousses et les racines ont été séparées, lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée et séchées dans une étuve à 70 °C pendant 48 h pour la

détermination de la biomasse sèche. Il est à noter que la biomasse sèche de la plante a été pesée sans les fleurs au stade de la floraison et sans les gousses au stade de la fructification.



**Figure 9.** Les différentes périodes d'échantillonnage des plants de haricot (*Phaseolus vulgaris* L. *djedida*) *in situ* (Aïn Naga, Biskra). (A) stade 2-4 feuilles, (B) stade floraison et (C) fructification.

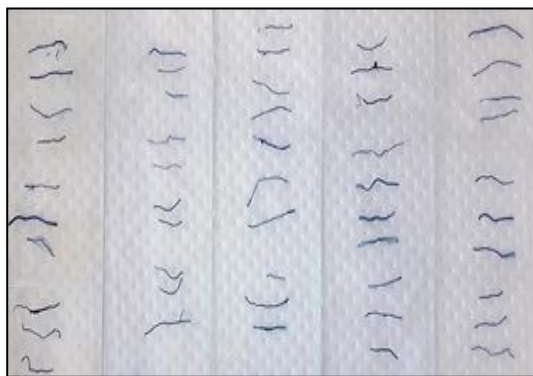
La récolte à la fin de la phase de fructification a été effectuée 90 jours après le semis lorsque des signes de maturité ont été observés (jaunissement des feuilles et dessèchement des gousses). Un nombre de 20 plantes ont été sélectionnées aléatoirement dans chaque parcelle. Les racines ont été soigneusement lavées. Les nodules ont été prélevés sur les racines et leur nombre et leur poids sec ont été enregistrés pour chaque plante. Le nombre de gousses et de graines par plante a également été évalué (nombre et poids sec). Le nombre de graines par gousse et l'indice de rendement (HI) ont également été estimés. Donald (1962) a défini l'indice de rendement HI (%) comme le rapport entre le poids sec des grains et le poids de la matière sèche totale à maturité.

## 2.6 Infection mycorhizienne

Pour chaque échantillon des deux blocs et à chaque stade de croissance de *P. vulgaris* (végétatif, floraison et fructification et même avant le semis), 100 g d'un mélange de sol composite ont été analysés par la technique de tamisage humide décrite par Gerdemann et Nicolson (1963). *Les spores* ainsi récupérées ont été montées entre lame et lamelle et observées au microscope optique (grossissement total 400X).

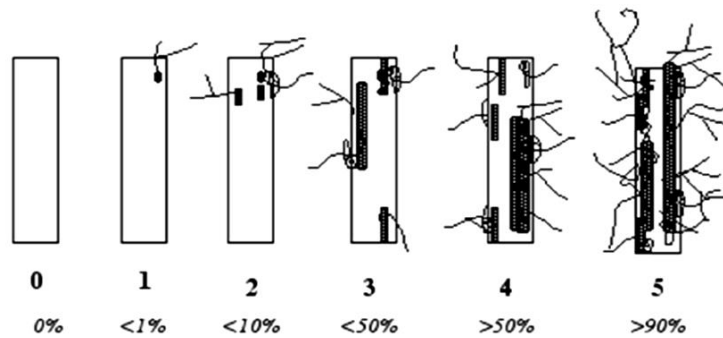
*Le taux de colonisation mycorhizienne* des plantes de *P. vulgaris* a été estimé pour les deux traitements à différents stades de sa croissance, à savoir la floraison et la fructification. Cependant, au stade végétatif (stade 2-4 feuilles), l'évaluation n'a pas pu être réalisée car il n'y avait que très peu de racines secondaires.

Afin d'estimer la *fréquence de l'infections endomycorhizienne* des racines de *P. vulgaris* dans les deux blocs (avec et sans fertilisation), la méthode décrite par Philips et Hayman (1970) a été suivie. Dans chaque site, des échantillons de fines racines ont été fournis à partir du système racinaire de *P. vulgaris*. Ces racines ont été bien lavées et placées dans une solution d'hydroxyde de potassium à 10% (KOH) pendant 15 minutes à 90 °C. Ils ont ensuite été soigneusement lavés avec de l'eau distillée. Les racines ont ensuite été colorées dans une solution de 0.1% de bleu trypan dans du lactophénol pendant 20 minutes. Toutes les racines ainsi traitées ont été coupées en plusieurs fragments d'environ un centimètre de longueur. Un nombre de 50 fragments choisi aléatoirement ont été montés entre lame et lamelle dans du lactophénol à raison de 10 fragments par lame (Figure 10). Les fragments ont ensuite été observés au microscope optique (grossissement total 400X) dans une goutte de glycérol pour l'estimation de la fréquence endomycorhizienne. Cela a permis de les annoter selon une échelle de classes et ainsi d'estimer le degré de colonisation mycorhizienne de chaque fragment au moyen de six classes notées de 0 à 5 (Figure 11) et la richesse arbusculaire de quatre classes notées (A0, A1, A2 et A3) (Figure 12).

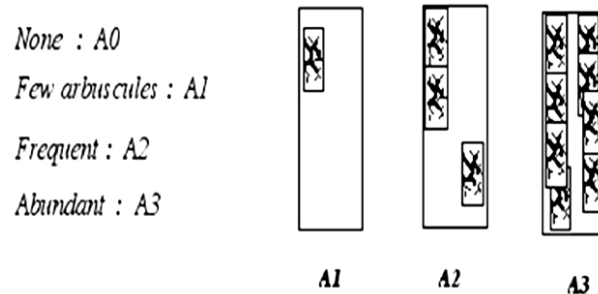


**Figure 10.** Racines de *P. vulgaris* var. *djedida* colorées au bleu trypan 0.1%.





**Figure 11.** Notation du degré de mycorhization des fragments de racine. L'échelle va de 0 (pas de mycorhization) jusqu'à 5 (au moins 90% du fragment est mycorhizé) (Trouvelot *et al.*, 1986).



**Figure 12.** Notation de l'abondance des arbuscules dans les fragments de racines (Trouvelot *et al.*, 1986).

Au total, cinq paramètres sont à calculer : F%, M%, m%, a% et A% :  
 (1) **Fréquence de mycorhization (F%)** - elle reflète l'importance des points de pénétration du système racinaire la colonisation.

$$F\% = \left( \frac{\text{nombre de fragments mycorhizés}}{\text{nombre total de fragments observés}} \right) \times 100$$

(2) **Intensité de la mycorhization (M%)** - Intensité de colonisation du cortex racinaire (proportion du cortex colonisé estimée par rapport à l'ensemble du système racinaire et exprimée en %), elle reflète l'importance de la colonisation du système racinaire.

$$M\% = \frac{(95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1)}{\text{nombre total de fragments observés}}$$

où n<sub>5</sub> - nombre de fragments mycorhizés noté 5; n<sub>4</sub> - nombre de fragments mycorhizés noté 4; n<sub>3</sub> - nombre de fragments mycorhizés notés 3, n<sub>2</sub> - nombre de fragments mycorhizés notés 2; n<sub>1</sub> - nombre de fragments mycorhizés notés 1. Ce paramètre reflète mieux le degré de mycorhization.

(3) **Intensité mycorhizienne des fragments mycorhizés (m%)** - Contenu arbusculaire de la colonisation dans la partie mycorhizienne du système racinaire (proportion colonisée contenant des arbuscules).

$$m\% = M \times \left( \frac{\text{nombre total de fragments observés}}{\text{nombre de fragments mycorhizés}} \right) = \frac{M}{F} \times 100$$

(4) **Intensité arbusculaire de la partie mycorhizienne (a%)** - intensité de colonisation développée dans la partie mycorhizée du système racinaire (proportion du cortex colonisé dans la partie mycorhizée du système racinaire exprimée en%).

$$a\% = M \times \frac{(100m_{A3} + 50m_{A2} + 10m_{A1})}{100}$$

Où: m<sub>A3</sub>, m<sub>A2</sub>, m<sub>A1</sub> sont les% de m respectivement affectés par les notes A<sub>3</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>.  
 Avec:

$$m_{A3} = M \times \left[ \frac{(95n_{5A3} + 70n_{4A3} + 30n_{3A3} + 5n_{2A3} + n_{1A3})}{\text{nombre de fragments mycorhizés}} \right] \times \frac{100}{m}$$

Il en va de même pour  $m_{A2}$  et  $m_{A1}$ .

(5) **Intensité arbusculaire dans le système racinaire (A%)** - Teneur arbusculaire de la colonisation par rapport à l'ensemble du système racinaire (proportion du système racinaire contenant des arbuscules, exprimée en%).

$$A\% = a \times \left( \frac{M}{100} \right)$$

## 2.7 Analyses statistiques

Les résultats pour chaque variable ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $\pm$  SD). Toutes les données ont été soumises à une analyse de variance à un seul facteur et deux facteurs (ANOVA) et au test à comparaisons multiples de Duncan ( $P < 0.05$ ) à l'aide du logiciel SAS (*Statistical Analysis System*) version 9.0 (2002).

## 3 Résultats et Discussion

### 3.1 Caractéristiques du sol avant le semis

L'analyse granulométrique du sol a révélé que le sol est de structure limoneuse fine. En revanche, les analyses chimiques indiquent que le sol est bien alimenté en matière organique (3.69%), moyennement riche en azote (0.17%) avec un rapport C/N élevé (12.3%). Selon Fog (1988), ces valeurs indiquent une activité biologique réduite conduisant à une lente décomposition de la matière organique. Selon les normes de sol établies par Hénin *et al.* (1969), l'analyse du  $\text{CaCO}_3$  total et actif, a révélé un sol à forte teneur en calcaire (53.1%). Certaines études ont montré que le sol calcaire est utile pour la germination des graines et la croissance du haricot commun (Ceyhan *et al.*, 2014). En effet, dans notre étude précédente de Mansouri *et al.* (2019), nous avons constaté que les graines de *P. vulgaris* var. *djedida* a pu germer sous diverses concentrations et types de sel, en particulier dans des conditions calcaires élevées. Cependant, lorsque le pH s'approche de la neutralité, le  $\text{CaCO}_3$  exerce un rôle protecteur pour empêcher le fer libre d'absorber les ions phosphore. Selon les résultats de l'analyse, le sol est basique et permet au  $\text{CaCO}_3$  de se combiner avec le phosphore et ainsi être disponible pour la plante.

Le pH du sol étudié est légèrement alcalin (pH 7.78) qui est un pH courant pour les sols des régions arides justifiant cette alcalinité par des taux élevés de  $\text{CaCO}_3$  (Mathieu et Pielain, 2003). Ce pH est favorable à la croissance de *P. vulgaris* car la plupart des cultivars de haricots communs sont sensibles au pH acide, de sorte que le pH optimal se situe entre 6.1 et 7.6. Ce pH est également favorable à l'activité microbienne, et parmi ces microorganismes capables de s'associer aux haricots communs, on trouve les rhizobia et les endomycorhizes arbusculaires. Le pH est l'un des facteurs limitant la fixation symbiotique (Hungria et Vargas,

2000). Chez les rhizobia, le pH optimal pour la croissance se situe entre 6 et 7 (Somasegaran et Hoben, 2012). Le pH du sol est également l'un des principaux facteurs qui affectent la densité et la germination des spores, la formation des hyphes et le taux de colonisation des mycorhizes arbusculaires (Ramírez-Viga *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). De plus, les endomycorhizes arbusculaires se développent à différents pH et l'optimum pour la majorité des espèces se situe entre 6 et 7 (Postma *et al.*, 2007; Bothe *et al.*, 2010).

Le sol destiné à notre culture de haricot est très salin avec une conductivité électrique égale à  $2.71 \text{ ms.cm}^{-1}$  ce qui pourrait perturber toute activité biologique. Selon les résultats de la CEC (capacité d'échange cationique), le sol est moyennement fertile avec une valeur de  $24.3 \text{ meq}/100\text{g}_{\text{sol}}$ , tandis que le  $\text{P}_2\text{O}_5$  est de  $182.84 \text{ mg.kg}^{-1}$ , ce qui indique une valeur élevée selon le CRAAQ (2003). Cette teneur en phosphate assimilable représente un avantage pour les plantes pour tolérer le stress abiotique et pour l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse (Bawa, 2020). À cette fin, Tembo *et al.*, (2019) ont montré que la quantité d'azote fixée par le haricot commun est limitée significativement par la carence en phosphore du sol. La carence en cet élément dans le sol réduit le nombre et la masse des nodules ainsi que l'activité de la nitrogénase du haricot commun (Mbabazi, 2019). La teneur en K est égale à  $1.22 \text{ meq.kg}^{-1}$ , ce qui est une valeur aussi élevée. Cet élément favorise la nodulation uniquement en présence de quantités suffisantes de phosphore (Khanam *et al.*, 2016).

### **3.2 Effet de la fertilisation azotée sur la cinétique de croissance, les composants de rendement et la nodulation**

Avant l'application du traitement azoté, la biomasse sèche totale moyenne des plantes a été de  $0.26 \text{ g}$  au stade deux feuilles. À ce stade, il n'y a pas de différence significative entre les deux parcelles (Tableau 10). L'absence d'amendement à ce stade vise à éviter de prédisposer les jeunes plants de *P. vulgaris* à des maladies telles que le feu bactérien et les attaques de pucerons.

Au stade de la floraison et après une semaine de fertilisation azotée, l'effet du traitement a été significatif sur la biomasse sèche de la plante ( $P < 0.0001$ ), la biomasse sèche de la partie aérienne ( $P = 0.0027$ ), la biomasse sèche des racines ( $P < 0.0001$ ), la longueur des tiges ( $P < 0.0001$ ), la longueur des racines ( $P = 0.0183$ ) et le nombre de racines secondaires ( $P = 0.0002$ ). En effet, la fertilisation azotée a amélioré la biomasse sèche totale de la plante de 60%, la biomasse sèche de la partie aérienne de 65%, la biomasse sèche des racines de 34%, la longueur des tiges de 37% et la longueur des racines de 16%, et cela par rapport aux plantes non fertilisées (Tableau 10).

Cependant, il y avait une absence totale de nodosités sur les racines des plantes de *P. vulgaris* au stade de deux feuilles et au stade de floraison lors de l'échantillonnage dans les

deux traitements. L'effet positif de la fertilisation azotée conduit à une augmentation de la biomasse aérienne mais avec une diminution de la biomasse nodulaire (de Sousa *et al.*, 2020).

**Tableau 10.** Effet de la fertilisation azotée et du stade de développement sur certains paramètres de croissance chez *Phaseolus vulgaris* var. *djedida* de la région aride d'Aïn Naga (Biskra, Algérie) (n=20).

Paramètres	Stade de développement					
	Végétative		Floraison		Fructification	
	Fertilisé	Non Fertilisé	Fertilisé	Non Fertilisé	Fertilisé	Non Fertilisé
<b>Biomasse sèche totale (g)</b>	0.26 ±0.06 <sup>a</sup>	0.26 ±0.06 <sup>a</sup>	6.66 ±1.91 <sup>a</sup>	2.62 ±0.78 <sup>b</sup>	6.61 ±2.39 <sup>a</sup>	4.18 ±0.99 <sup>b</sup>
<b>Poids sec partie aérienne (g)</b>	0.19 ±0.05 <sup>a</sup>	0.19 ±0.05 <sup>a</sup>	6.47 ±1.42 <sup>a</sup>	2.28 ±0.73 <sup>b</sup>	6.22 ±2.28 <sup>a</sup>	3.89 ±0.96 <sup>b</sup>
<b>Poids sec des racines (g)</b>	0.07 ±0.01 <sup>a</sup>	0.07 ±0.01 <sup>a</sup>	0.50 ±0.11 <sup>a</sup>	0.33 ±0.07 <sup>b</sup>	0.38 ±0.09 <sup>a</sup>	0.28 ±0.07 <sup>b</sup>
<b>Longueur tige (cm)</b>	--	--	41.5 ±3.33 <sup>a</sup>	26.3 ±2.51 <sup>b</sup>	35.7 ±5.57 <sup>a</sup>	29.9 ±5.51 <sup>b</sup>
<b>Longueur racine (cm)</b>	--	--	12.7 ±1.78 <sup>a</sup>	10.7 ±1.31 <sup>b</sup>	12.8 ±4.56 <sup>a</sup>	12.9 ±2.83 <sup>a</sup>
<b>Nombre racines secondaires</b>	--	--	7.00 ±0.64 <sup>b</sup>	8.30 ±1.26 <sup>a</sup>	7.15 ±0.67 <sup>b</sup>	8.45 ±1.14 <sup>a</sup>
<b>Nombre de gousses/plante</b>	--	--	--	--	13.2 ±3.43 <sup>a</sup>	9.35 ±2.18 <sup>b</sup>
<b>Poids sec des gousses/plante (g)</b>	--	--	--	--	5.58 ±1.86 <sup>a</sup>	3.77 ±1.11 <sup>b</sup>
<b>Nombre de graines par gousse</b>	--	--	--	--	5.47 ±0.65 <sup>a</sup>	4.15 ±0.87 <sup>b</sup>
<b>Poids sec des graines/plante (g)</b>	--	--	--	--	3.61 ±0.96 <sup>a</sup>	2.21 ±0.99 <sup>b</sup>
<b>Indice de rendement/plant (%)</b>	--	--	--	--	52.9 ±12.6 <sup>a</sup>	51.1 ±12.2 <sup>a</sup>

Pour chaque stade de croissance, les mêmes lettres de l'alphabet le long de la colonne n'indiquent aucune différence de signification (Duncan Multiple Range Test) au seuil de 5%.

À la phase de fructification, l'effet du traitement a été significatif sur la biomasse sèche de la plante ( $P = 0.0002$ ), la biomasse sèche de la partie aérienne ( $P = 0.0001$ ), la biomasse sèche des racines ( $P = 0.0414$ ), la longueur des tiges ( $P = 0.0019$ ), le nombre de racines ( $P < 0.0001$ ), le nombre de gousses par plante ( $P = 0.0002$ ), biomasse sèche des gousses ( $P = 0.0006$ ), poids sec des graines ( $P = 0.0072$ ) et nombre de graines par gousse ( $P < 0.0001$ ). En effet, à ce stade de développement, la fertilisation azotée a amélioré la biomasse sèche de la plante de 37%, la biomasse sèche de la partie aérienne de 38%, la biomasse racinaire sèche de 26%, la longueur des tiges de 16%, le nombre de gousses par plant de 29%, la biomasse sèche des gousses de 33%, le poids sec des graines de 39% et le nombre de graines par gousse de 15% (Tableau 10). En revanche, la fertilisation azotée n'a pas eu d'effet significatif sur l'indice de rendement (HI) ( $P = 0.7776$ ) et sur la longueur des racines ( $P = 0.9845$ ).

Un effet significatif ( $P < 0.0001$ ) de la fertilisation azotée a été observé sur le nombre de racines secondaires au stade de la floraison et de la fructification. Cependant, la fertilisation a réduit ce nombre de 16% au stade de la floraison et de la fructification par rapport au témoin (Tableau 10). L'augmentation du nombre de racines secondaires dans la

parcelle sans fertilisation azotée peut s'expliquer par une hypothèse d'amplification des racines dans l'exploration de l'azote minéral. La figure 13 montre des plantes de *P. vulgaris* var. *djedida* indiquant l'effet de la fertilisation azotée sur la croissance et la densité des plantes dans la région aride d'Aïn Naga (Biskra).



**Figure 13.** Plantes de *P. vulgaris* var. *djedida* montrant l'effet de la fertilisation azotée sur la croissance et la densité des plantes dans la région aride d'Aïn Naga (Biskra, Algérie).

Jusqu'au stade de fructification ou même de la maturation, il n'y a eu qu'un faible nombre de nodules formés dans les racines des plantes de *P. vulgaris* n'ayant pas reçu d'engrais azoté. Selon Samago *et al.* (2018), les mesures de la nodulation peuvent évaluer l'état de la symbiose. Un faible nombre ou une absence totale de nodules peut être dû soit à une faible population de rhizobiums dans le sol, soit à l'inhibition de la nodulation par des facteurs environnementaux défavorables tels que la salinité. En effet, d'après les résultats de l'analyse du sol, le sol est très salin avec  $2.71 \text{ ms.cm}^{-1}$  de CE. Cette salinité inhibe l'établissement de la symbiose rhizobium-légumineuse pendant les différentes étapes du processus et en général les premières étapes de la nodulation (Zahran, 1999). En effet, la croissance des rhizobia du sol peut être affectée par le stress salin en limitant la colonisation des racines, l'inhibition de l'infection, la production et le fonctionnement des nodules (Sharma *et al.*, 2020).

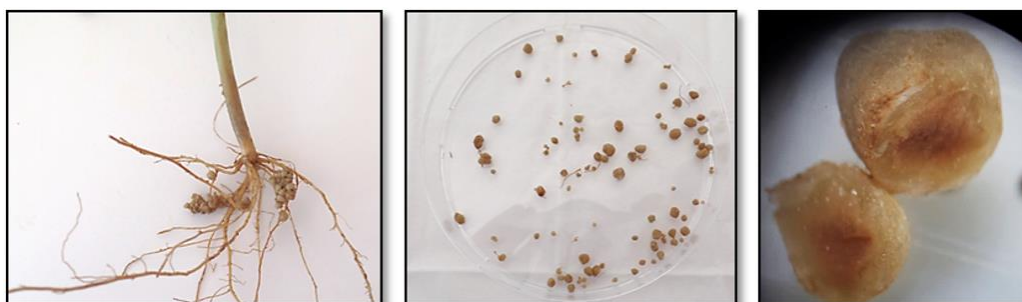
Deux autres hypothèses peuvent expliquer le nombre insignifiant de nodules sur les racines de haricot commun. Le premier est celui des températures élevées car la région de Biskra est connue pour ses températures élevées. En septembre 2018, lors de la culture du haricot commun, une température maximale de  $35.9 \text{ °C}$  a été enregistrée (Tableau 7). Les températures élevées ( $> 40 \text{ °C}$ ) inhibent la nodulation et réduisent l'activité de fixation de l'azote (Hongrie et Kaschuk, 1993). La seconde hypothèse est peut-être due à l'incompatibilité des souches natives de rhizobiums avec le génotype de la variété utilisée qui est une variété



non locale. En revanche, les cultivars modernes sont sélectionnés sur des sols européens et leur capacité à établir une symbiose avec des souches efficaces.

D'autres observations sur les trois prélèvements effectués au cours des trois stades de développement de *P. vulgaris* sont celles de l'absence totale de nématodes (sur la partie racinaire) et de pucerons (sur la partie aérienne). La raison de la mention de ces deux phytopathogènes est d'exposer l'hypothèse d'une attaque de nématodes sur les racines du haricot commun car cela affectera la symbiose fixatrice d'azote en inhibant la nodulation et en limitant la fixation de l'azote atmosphérique. Cette absence est peut-être due à la présence d'endomycorhizes qui, selon plusieurs auteurs, pourraient protéger la plante contre les attaques d'agents pathogènes ou l'effet des températures élevées ou encore la résistance de la variété cultivée.

Nous pouvons conclure à travers cette enquête nodulaire que la croissance de *P. vulgaris* var. *djedida* nécessite plus de phosphore inorganique que la nutrition azotée minérale. Cette exigence apparaît particulièrement élevée chez le haricot commun, qui est en fait plus affecté par la carence en phosphore que les autres espèces de légumineuses (Vadez *et al.*, 1996).



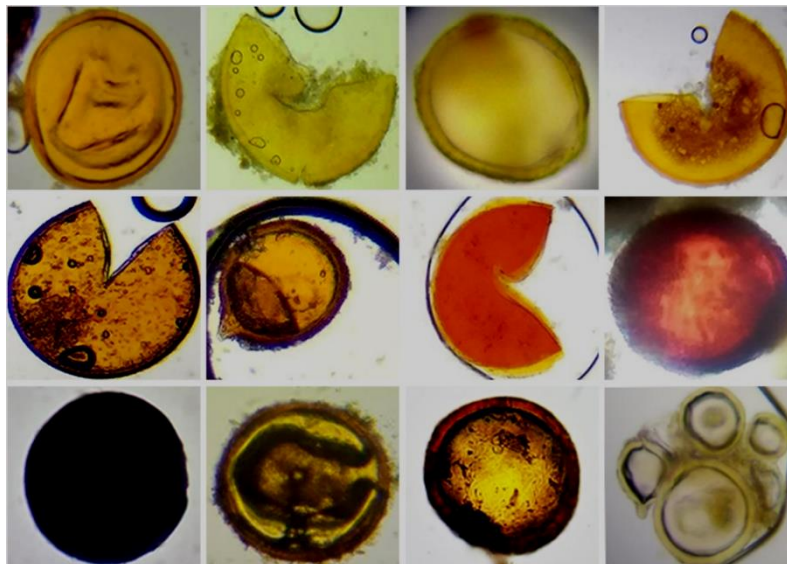
**Figure 14.** Nodules de *P. vulgaris* L. var. *djedida* au stade fructification (sans fertilisation azotée).

### 3.3. Effet de la fertilisation azotée sur l'infection mycorhizienne

#### 3.3.1 Nombre de spores

L'observation des spores par tamisage humide du sol des deux blocs (avec et sans azote) a révélé l'existence de morphotypes importants de spores appartenant aux Glomeromycota. Les spores observées sont comparées aux spécimens de la collection INVAM (2019). Des structures caractéristiques telles que la couleur, la forme, la présence de sacs produisant des spores et des boucliers de germination permettent d'identifier les spores (Bâ *et al.*, 1996). En revanche, il nous est impossible de les identifier sur la base de la morphologie des spores lorsque leurs structures caractéristiques sont absentes (Bago *et al.*, 1998). En effet, dans cette étude, certaines caractéristiques structurelles ont pu être perdues pendant le processus d'extraction des spores et il est donc difficile d'attribuer un genre précis aux morphotypes.

C'est ainsi que dans notre cas, la différenciation des spores n'est basée que sur la couleur. Nous avons donc pu distinguer des spores de couleur jaune, noire, translucide blanche et brune (Figure 15).

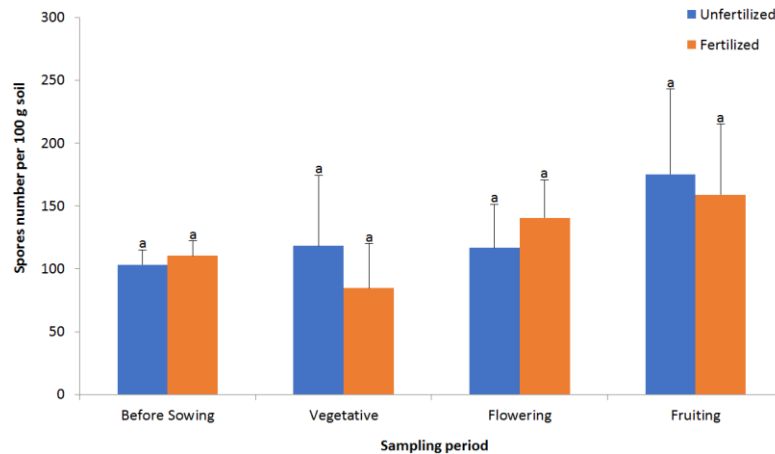


**Figure 15.** Microphotographies de spores de champignons mycorhiziens à arbuscules isolées à partir de sols rhizosphériques de *Phaseolus vulgaris* var. *djedida*.

Selon l'ANOVA à deux facteurs, aucun effet significatif ( $P > 0.05$ ) n'a été indiqué sous fertilisation azotée et ceci aux différents stades de développement du haricot : végétatif, floraison et fructification et également avant le semis (Figure 16). Cependant, une augmentation significative du nombre de spores a été signalée pendant la période de fructification (Figure 16). Avant le semis, le nombre de spores dans la première parcelle (sans fertilisation) est de 103 spores/100g<sub>sol</sub>, et celui de la deuxième parcelle (avec fertilisation) est de 110 spores/100g<sub>sol</sub>. À ce stade, la présence de spores est une forme de survie dans des conditions défavorables telles que des nutriments insuffisants ou la sécheresse (Mansouri, 2011).

Dans le deuxième échantillon au stade à deux feuilles, le nombre de spores a augmenté de 18 spores dans la parcelle non fertilisée, tandis que celui de la parcelle fertilisée, le nombre a diminué de 17 spores (Figure 16). À la période de floraison et après l'ajout de l'engrais chimique, le nombre de spores est resté stable dans la parcelle non fertilisée par rapport au premier échantillonnage. En revanche, au niveau de la parcelle qui a reçu un traitement fertilisant, le nombre de spores a augmenté de 40 spores par rapport au premier prélèvement. Au stade de la fructification, le nombre de spores dans la parcelle non fertilisée est légèrement supérieur à celui de la deuxième parcelle, atteignant en moyenne 175 spores/100 g<sub>sol</sub> (Figure 16). De plus, il y a eu une augmentation du nombre de spores entre le stade de floraison et le stade de fructification de 116 à 175 spores/100 g<sub>sol</sub> dans la parcelle non fertilisée et de 140 à

159 spores/100 g<sub>sol</sub> dans la parcelle fertilisée mais l'effet de la fertilisation n'est pas significatif ( $P = 0.7638$ ).



**Figure 16.** Effet de la fertilisation azotée (Urée 46) sur le nombre de spores pour 100 g de sol rhizosphérique extrait du haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L. var. *djedida*) à différentes périodes de croissance (y compris avant le semis). Pour chaque période, les mêmes lettres de l'alphabet n'indiquent aucune différence de signification (*Duncan Multiple Range Test*) au seuil de 5%.

Le nombre de spores dans le sol dépend de plusieurs facteurs qui interfèrent avec les propriétés physico-chimiques, biochimiques et microbiologiques du sol (Mahmoudi *et al.*, 2020). Il est donc difficile de démontrer l'effet de l'engrais azoté chimique sur la dynamique des spores endomycorhiziennes dans le sol. De plus, Fisher *et al.* (2007) ont montré qu'une surfertilisation avec des éléments azotés influence négativement la formation de spores de champignons endomycorhiziens. En outre, Gosling *et al.* (2006) ont montré qu'un engrais azoté (facilement soluble) pouvait réduire la colonisation et/ou la diversité des champignons endomycorhiziens.

### 3.3.2 Intensité mycorhizienne et arbusculaire

L'étude sur la fréquence de mycorhization (F%) au stade de la floraison et de la fructification est restée élevée et stable avec un taux de 100% dans les deux parcelles (avec et sans fertilisation azotée) (Tableau 11).

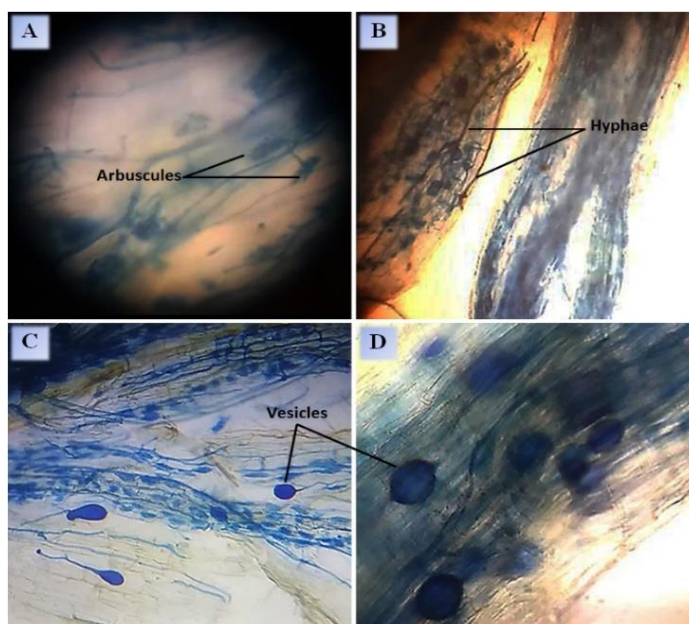
**Tableau 11.** Fréquence de la mycorhization (F%), intensité de la mycorhization (M%), intensité mycorhizienne des fragments mycorhizés (m%), intensité arbusculaire de la partie mycorhiée (a%) et intensité arbusculaire dans le système racinaire (A%) chez les plantes de *Phaseolus vulgaris* var. *djedida* soumises à deux niveaux de fertilisation azotée (n=50).

Période	N Fertilisé	Intensité Mycorhizienne			Intensité Arbusculaire	
		F (%)	M (%)	m (%)	a (%)	A (%)
Floraison	Fertilisé	100 <sup>a</sup>	53,2 ± 4,29 <sup>a</sup>	53,2 ± 4,29 <sup>a</sup>	22,1 ± 4,27 <sup>a</sup>	11,8 ± 2,83 <sup>a</sup>
	Non Fertilisé	100 <sup>a</sup>	37,9 ± 0,90 <sup>b</sup>	37,9 ± 0,90 <sup>b</sup>	10,9 ± 1,06 <sup>b</sup>	4,11 ± 0,36 <sup>b</sup>
Fructification	Fertilisé	100 <sup>a</sup>	55,8 ± 9,53 <sup>a</sup>	55,8 ± 9,53 <sup>a</sup>	18,3 ± 9,07 <sup>ba</sup>	10,7 ± 6,45 <sup>a</sup>
	Non Fertilisé	100 <sup>a</sup>	53,8 ± 5,84 <sup>a</sup>	53,7 ± 5,84 <sup>a</sup>	18,2 ± 6,33 <sup>ba</sup>	9,73 ± 3,33 <sup>ba</sup>
<i>Probabilité</i> (période)		--	0.0098	0.0098	0.5615	0.2741
<i>Probabilité</i> (Fertilisation)		--	0.0132	0.0132	0.0846	0.0468
<i>Probabilité</i> (période × Fertilisation)		--	0.0490	0.0490	0.0831	0.1087

Les mêmes lettres de l'alphabet le long de la colonne n'indiquent aucune différence de signification (*Duncan Multiple Range Test*) au seuil de 5%.

Lors de la coloration des racines de *P. vulgaris*, on a pu observer la présence de vésicules de forme sphérique (Figure 17C, Figure 17D).

En présence d'engrais azoté, l'intensité de la colonisation mycorhizienne du cortex racinaire (M%) a atteint 53.2% au stade de la floraison puis elle n'a augmenté que de 2%, donnant un pourcentage de 55.8% au stade de la fructification (Tableau 11). Cependant, en absence d'engrais azoté, le M% a atteint 37.9% au stade de la floraison, puis il a augmenté jusqu'à 53.6% au stade de la fructification, soit le même taux que les racines ayant reçu la fertilisation azotée. L'effet de la fertilisation et la période d'échantillonnage ont été clairement significatifs (Tableau 11).



**Figure 17.** Microphotographies de structures de champignons mycorhiziens arbusculaires dans le cortex racinaire *P. vulgaris* L. var. *djedida*: arbuscules (A), hyphae (B), vésicules (C, D).

L'intensité de colonisation développée dans la partie mycorhizienne du système racinaire (m%) au niveau de la parcelle avec fertilisation azotée a atteint 53.2% au stade de la floraison puis 55.8% au stade de la fructification. Cependant, dans la parcelle sans fertilisation et au stade de floraison, elle a atteint 37.9% puis elle a également augmenté jusqu'à 53.6% au stade de fructification (Tableau 11). On peut en déduire que les taux de M% et m% ont été proportionnels. Plusieurs recherches ont rapporté que les endomycorhizes contribuaient à l'absorption des éléments minéraux et parmi eux l'azote minéral. La contribution de l'engrais azoté favorise l'intensité de la colonisation du cortex racinaire au stade de la floraison, de sorte que les plantes nécessitent beaucoup d'énergie, y compris de l'azote, ce qui peut expliquer l'augmentation de cette intensité. Dans la parcelle fertilisée, l'intensité de la colonisation dans la partie mycorhizienne du système racinaire (a%) a atteint 22.1% au stade de la floraison puis elle a diminué au stade de la fructification jusqu'à 18.3%. En revanche,

dans la parcelle non fertilisée, le (a%) a atteint 10.9% au stade de la floraison, puis a augmenté jusqu'à 18.2% au stade de la fructification (Tableau 11).

L'intensité arbusculaire de la colonisation dans l'ensemble du système racinaire (A%) de la parcelle fertilisée a atteint 11.8% au stade de la floraison, puis a légèrement diminué à 10.7% au stade de la fructification. Cependant, une augmentation de ce même paramètre a été observée chez les plantes témoins avec une valeur de 4.11% au stade de floraison puis de 9.73% au stade de fructification. Selon les résultats de l'ANOVA, l'effet de la fertilisation sur ce paramètre n'est pas significatif (Tableau 11). Au stade de la fructification, il n'y avait pas d'effet significatif de la fertilisation azotée sur les plants de *P. vulgaris*. Cependant, tous les paramètres liés à l'infection mycorhizienne à savoir F%, M%, m%, a% et A% ont été améliorés par l'apport d'engrais azoté de 29%, 29%, 51% et 65%, respectivement par rapport aux plantes témoins. Dans le cas des arbuscules, une différence peut être montrée dans les racines ayant reçu ou non un engrais. L'azote disponible offre une mycorhization rapide mais qui diminue au stade de la fructification car la durée de vie des arbuscules est éphémère, contrairement aux racines sans engrais où elle commence par un faible pourcentage puis atteint le même pourcentage de racines ayant reçu un engrais (He *et al.*, 2003).

Le rôle des arbuscules au sein des racines dans l'acquisition de l'azote a été confirmé et plusieurs études ont montré l'implication des champignons mycorhiziens dans la mobilisation de nutriments tels que l'azote et le phosphore à partir de substrats naturels (Plassard et Dell, 2010). Par ailleurs, Miransari (2011) a confirmé qu'un climat aride favorisait l'élimination de l'azote par voie symbiotique où les hyphes des endomycorhizes prendront de l'azote sous forme d'ammonium (suite à l'hydrolyse de l'urée en ammonium). Il est ensuite transformé en arginine et transporté à travers les hyphes jusqu'aux arbuscules où il est transmis à la plante sous forme d'ammonium. Elle sera ensuite absorbée par la plante via des transporteurs d'ammonium spécifiquement exprimés lors de la mycorhization dans les arbuscules (Parniske, 2008).

D'après Baath et Spokes (1989), la source d'azote n'a aucune influence sur la réaction aux mycorhizes. À de faibles niveaux de P dans le sol et l'ajout de N n'affecte pas le taux de colonisation mycorhizienne. De même, une teneur élevée en P et une faible teneur en N ont peu d'influence. De plus, la germination des spores et l'infection mycorhizienne de *P. vulgaris* n'ont pas pu être inhibées malgré des températures dépassant 35 °C à Biskra, alors que la température est l'un des facteurs qui influencent la germination des spores et la colonisation des racines (Liu *et al.*, 2014). En effet, Sheikh et Sanders (1988) ont rapporté qu'une température comprise entre 20 °C et 30 °C est une température optimale pour la germination des spores. En revanche, il a été observé que malgré la forte salinité du sol, les plants de



haricots communs étaient mycorhizés, tandis que Tian et al. (2004) et Sheng et al. (2008) ont rapporté que la salinité supprimait ou réduisait la formation de mycorhizes. Hirrel et Gerdemann (1980) et Sheng *et al.* (2008) ont montré que la salinité affecte négativement la capacité de colonisation, la germination des spores et la croissance des hyphes des champignons mycorhiziens.

Dans cette étude, il y avait eu une relation entre les teneurs élevées en phosphore assimilable et la présence d'une infection mycorhizienne, alors que De Miranda et Harris (1994) ont indiqué que la germination des spores des champignons mycorhiziens est inhibée par une forte teneur en phosphore assimilable. Selon Galvan *et al.* (2009), la relation entre la teneur du sol en P et le nombre de spores est souvent absente.

#### **4 Conclusion**

Le sol de notre site de culture est un sol salin et contient une teneur élevée en  $\text{CaCO}_3$ , un faible niveau de matière organique et une teneur élevée en phosphore assimilable. Les résultats ont montré que l'application des engrais azotés avant la floraison est principalement significative sur les différents paramètres morphologiques. En effet, une grande amélioration a été observée sur la majorité des paramètres morphologiques avec des pourcentages considérables. Cependant, aucun effet significatif n'a été observé pour la longueur des racines et l'indice de rendement. D'après ces résultats, on peut conclure que la variété *Djedida* a donné un bon rendement avec une faible teneur en azote et ceci dans un sol riche en phosphore. L'enquête nodulaire sur *P. vulgaris var. djedida* en présence et en absence d'engrais azoté sur ce site de culture a révélé un nombre minimal de nodules ou presque absent, ce qui nous conduit à plusieurs hypothèses ayant des répercussions sur les facteurs biotiques et abiotiques contraignant l'établissement de la symbiose. La salinité représentera alors le facteur abiotique et le facteur biotique est la variété. En effet, *Djedida* est une variété non locale qui peut être incompatible avec les souches natives de la région aride de Biskra. Aucun effet significatif sur le nombre de spores n'a été signalé. De plus, l'effet de la fertilisation s'est révélé significatif sur l'intensité arbusculaire (a%, A%) et sur la colonisation mycorhizienne (M%, m%) des racines. Le sol de la région aride de Biskra a montré un potentiel mycorhizogène important, bien que les conditions dans cette région ne soient pas très favorables à leur développement. Ceci pourrait constituer une ressource biologique efficace pour améliorer la tolérance des plantes hôtes aux contraintes biotiques et abiotiques. Enfin, nous recommanderons des recherches sur les quantités optimales d'engrais azotés afin de diminuer l'impact des engrais chimiques en excès sur l'environnement et la santé. D'autres de recherches sur la fixation de  $\text{N}_2$  dans le haricot commun sont également nécessaires.

# CHAPITRE : V

## **Chapitre V - Effet de l'engrais azoté sur la croissance, la floraison, la fructification et la nodulation chez trois variétés de haricot commun dans la région aride de Aïn Naga (Biskra)**

### **1 Objectif de l'étude**

Dans le chapitre précédent, *Phaseolus vulgaris* var. *djedida* n'a pu donner qu'un nombre faible de nodule dans un sol contenant un taux élevé de CaCO<sub>3</sub> et de phosphore assimilable et sous un climat aride. De ce fait, plusieurs hypothèses ont été évoquées. En plus des facteurs abiotiques comme la température et la salinité, citant le facteur biotique qui est l'incompatibilité des souches autochtones avec la variété utilisée.

Dans ce présent travail, des expériences sur le terrain ont été menées dans le but d'étudier la réponse du haricot commun d'une part sur sa capacité à noduler avec d'autres variétés de haricot autre que *Djedida* afin de confirmer l'hypothèse de compatibilité ou non de la variété avec les souches natives. Et d'autre part, d'évaluer dans ce même concept, l'effet de l'engrais azoté sur ces trois variétés.

Donc l'objectif principal est de décrire l'évolution des plantes chez trois variétés de haricot commun (*Djedida*, *Nelson* et *Jalila*) en fonction de la quantité d'engrais adoptée et ceci pendant deux périodes principales (floraison et fructification) et sur certains paramètres morpho-physiologiques liés au rendement dans la région aride de Biskra (Algérie). Un deuxième objectif est d'évaluer la capacité de nodulation de ces trois variétés. Le facteur principal comprend l'engrais (Urée granulée 46% N), composé de deux niveaux : aucune fertilisation (0 kg/parcelle : témoin) et avec fertilisation (0.4 kg/parcelle). Le facteur secondaire est la variété. La conception expérimentale est une conception de blocs complets randomisés avec un arrangement de parcelles divisées et répliquées quatre fois. L'effet de la fertilisation est évalué à deux stades de développement (floraison et fructification) pour chaque variété et ceci sur la biomasse sèche totale, la longueur des parties aériennes et racinaires ainsi que sur le nombre de racines secondaires. D'autre part, l'effet combiné de la fertilisation et de la variété a été étudié sur certains paramètres de rendement comme le nombre de fleurs, de gousses, de graines et l'indice de récolte. De plus, le nombre de nodules à la fin de la maturation des graines a été également évalué.

### **2 Matériel et méthodes**

#### **2.1 Localisation du site de culture**

Cette étude a été réalisée pendant la saison de culture de haricot en 2019 dans une exploitation agricole à Aïn Naga, une ville située dans la région aride de la wilaya de Biskra (sud-est de la capitale Alger) en Algérie. Exactement, ce site est situé à une latitude de



34°43'12.37" N et une longitude de 6°14'32.98" E pour une altitude de 23 m. Biskra est située dans la région aride selon l'indice d'aridité *De Martonne* (Kheloufi *et al.*, 2018). Selon la période climatique (1980-2019), le climat de Biskra a été caractérisé par un été très chaud et sec avec une température moyenne de 43.5 °C et une humidité relative moyenne de 12%. L'hiver est très froid (température minimale moyenne 4 °C). Les précipitations sont rares et ne dépassent pas 30 jours par an.

Les données météorologiques enregistrées au cours de la période expérimentale sont présentées dans le tableau 12. Selon ce tableau, la quantité de précipitations est presque nulle. Ces données ont été confirmées et corroborées *in situ* en enregistrant un nombre de jour nul de précipitations. Ces conditions climatiques enregistrées lors de notre ont représenté un avantage car de fortes pluies auront pu perturber notre plan expérimental surtout si l'engrais azoté se déplaçait vers des parcelles visant à représenter des parcelles témoins (sans fertilisation).

**Tableau 12.** Données climatiques pendant la période expérimentale à Aïn Naga (Biskra).

Paramètres climatiques		Mois (Année 2019)		
		Octobre	Novembre	Décembre
<b>Precipitations</b>	Quantité (mm)	0.51	8.38	2.28
	Nombre de jours de pluie	0	0	0
<b>Températures (°C)</b>	Maximum	29.6	20.4	20.3
	Moyenne	24.3	15.8	15
	Minimum	18.9	10.7	10
<b>Humidité relative (%)</b>		43	53.4	51.6

Source: World Climate Data: *Tutiempo* (<https://fr.tutiempo.net/climat/2019/ws-605250.html>)

Le site de culture destiné à cette étude (15 m × 30 m) n'a pas été exploité depuis cinq ans par aucune culture végétale. Les résultats de l'analyse du sol (25-30 cm de profondeur) avant l'expérience ont révélé un pH de 7.7; 0.119% d'azote total; 182.8 mg/kg<sub>sol</sub> de phosphore (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) et 1.22 meq/kg<sub>sol</sub> de potassium. Le sol se caractérise d'une texture limoneuse avec une conductivité électrique de 2.58 ms.cm<sup>-1</sup>. Cette conductivité électrique élevée interprétée par une salinité élevée du sol est due à la forte concentration en ions calcium (20.3 meq/100g<sub>sol</sub>) par rapport à (1.36 meq/100 g<sub>sol</sub>) de Mg<sup>+2</sup>, (1.18 meq/100 g<sub>sol</sub>) de K<sup>+</sup> et (1.25 meq/100 g<sub>sol</sub>) de Na<sup>+</sup>. Le sol a été classé comme très calcaire avec 53.1% de CaCO<sub>3</sub> total.

## 2.2 Matériel biologique

Cette étude a concerné trois variétés de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.). Ces trois variétés sont les plus dominantes sur le marché agricole et les plus cultivées dans le sud de l'Algérie. L'origine de ces trois variétés, à savoir *Djedida*, *Nelson* et *Jalila*, est Griffaton Producteur Grainier (France) distribué en Algérie par la SARL Agroseed. Les graines de ces

trois variétés ont été récoltées en 2017 et seul *Djedida* et *Nelson* ont été traités avec du Thiram (un fongicide non systémique).

Nous avons d'abord évalué les caractéristiques biométriques des graines pour chaque variété et les résultats sont présentés sur le tableau 13. Selon l'analyse de la variance, il y a un effet significatif ( $P < 0.0001$ ) de la variété sur le poids de 1000 graines et sur la taille des graines. Selon le test de *Duncan Multiple Range*, le classement des graines en fonction de la taille est la suivante *Djedida* > *Jalila* > *Nelson* (Tableau 13, Figure 18).



**Figure 18.** Graines des différentes variétés de *Phaseolus vulgaris* utilisées dans l'étude : (A) *Djedida*, (B) *Nelson* et (C) *Jalila*.

**Tableau 13.** Caractéristiques biométriques des graines des trois variétés de haricot communs utilisés dans l'étude.

Variétés	Poids de 1000 grains (g) (n=4)	Taille de la graine (n=50)			Maturité des semences (jours)
		Longueur (mm)	Largeur (mm)	Épaisseur (mm)	
<i>Djedida</i>	283.6 ± 2.00 <sup>a</sup>	12.7 ± 0.73 <sup>a</sup>	6.19 ± 0.39 <sup>a</sup>	5.29 ± 0.44 <sup>a</sup>	85-100
<i>Nelson</i>	213.1 ± 0.73 <sup>c</sup>	11.4 ± 0.66 <sup>c</sup>	5.37 ± 0.37 <sup>c</sup>	4.68 ± 0.49 <sup>c</sup>	85-100
<i>Jalila</i>	231.7 ± 1.07 <sup>b</sup>	11.9 ± 0.80 <sup>b</sup>	5.76 ± 0.26 <sup>b</sup>	5.26 ± 0.25 <sup>b</sup>	85-100
F de Fisher	2817.5	36.4	70.1	75.6	-
Probabilité	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	-

Les mêmes lettres de l'alphabet le long de la colonne n'indiquent aucune différence de signification au seuil de 5% (Duncan Multiple Range Test).

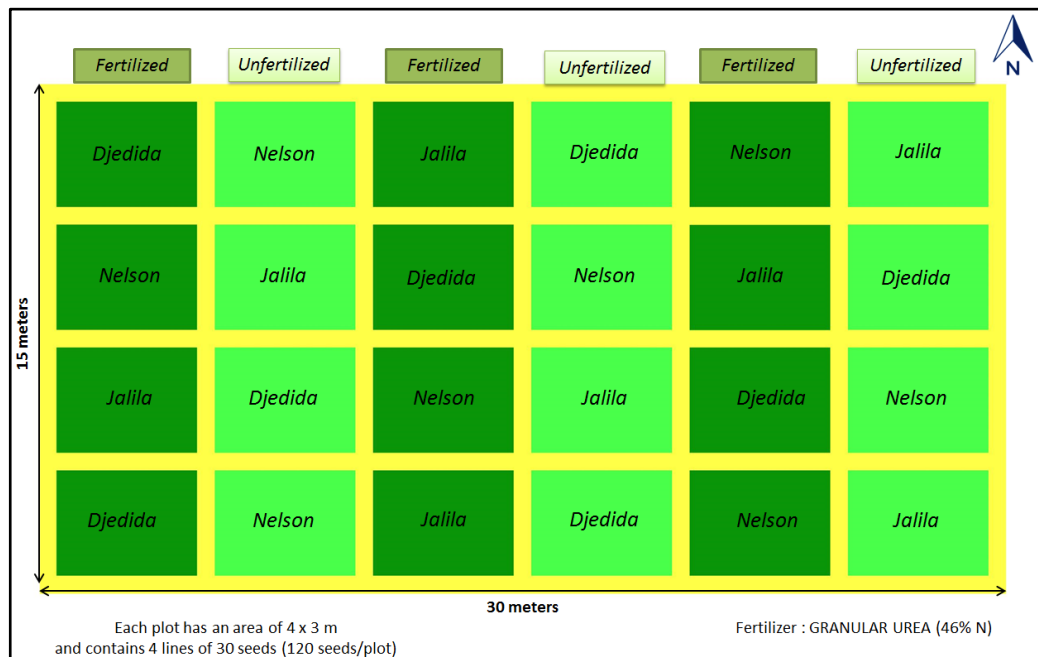
### 2.3 Choix de l'engrais azoté

L'engrais azoté a été fourni sous forme d'urée granulée à 46% pour les parcelles fertilisées. C'est un engrais azoté entièrement sous forme d'urée. Sous cette structure de granules hydrosolubles, il fournit un apport en azote très riche pour les cultures avec une très bonne aptitude à l'étalement grâce à sa granulométrie homogène et régulière (1.8 mm de diamètre moyen). Dans le sol, l'urée doit d'abord être hydrolysée en ammoniac pour être pleinement utilisable par la plante. La vitesse de traitement dépend de la température et de l'humidité du sol pendant des heures, voire des jours après l'épandage. Son utilisation nécessite une attention particulière en raison du phénomène de volatilisation de l'ammoniac dans l'atmosphère.

## 2.4 Conception expérimentale et fertilisation

Les expériences ont été présentées dans une conception de blocs complets randomisés avec un arrangement de parcelles divisées et répliquées quatre fois pour chaque traitement (Figure 19, Figure 20). L'engrais a formé les parcelles principales et les variétés de haricot commun les parcelles secondaires, mesurant chacune (4 × 3 m) avec une allée de 0.7 m entre les parcelles et les blocs afin de réduire l'interférence entre parcelles. Le facteur de fertilisation a compris deux niveaux : fertilisé (0.4 kg d'engrais/parcelle) et non fertilisé (0 kg d'engrais/parcelle). L'engrais azoté a été ajouté deux fois: avant le stade de floraison (50 jours après le semis) et avant le stade de fructification (70 jours après le semis) d'une semaine. Les parcelles témoins n'ont reçu aucun traitement. La période végétative (40 jours à partir du semis) n'a pas reçu de fertilisation.

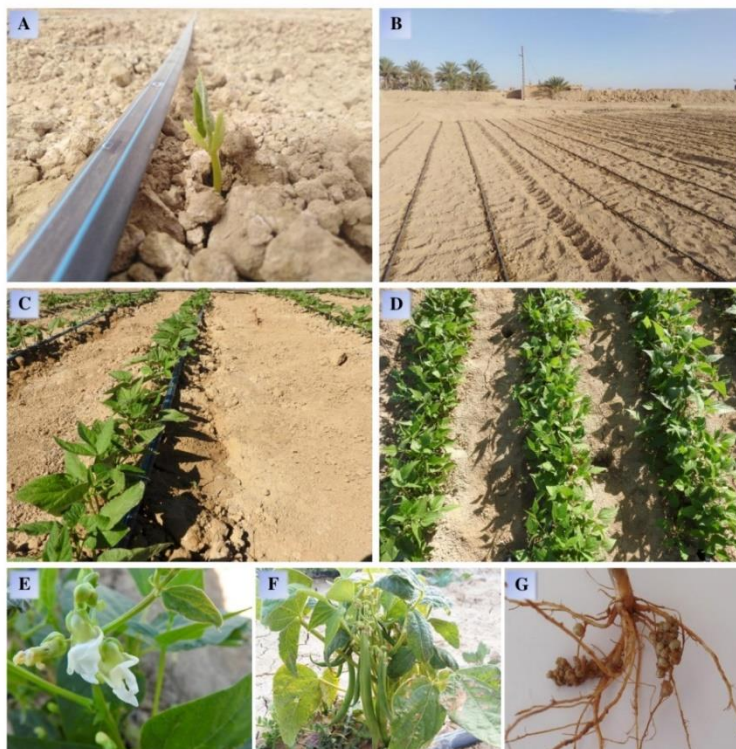
La préparation du sol a été réalisée en début de septembre en deux opérations : labour et hersage. Après avoir préparé le plan de culture sur le champ, deux graines ont été placées dans les sillons à l'emplacement recommandé avec une densité de 120 graines par parcelle (30 graines × 4 lignes). Durant toute l'expérience, les plantes n'ont reçu aucun traitement herbicide ou insecticide. Les mauvaises herbes ont été contrôlées et éliminées manuellement. Il est essentiel de noter qu'aucune attaque d'origine biotique n'a été signalée au cours de cette étude, à l'exception d'une contamination de 5% par des pucerons qui ont colonisé quelques plantes dans une seule parcelle de la variété *Nelson*.



**Figure 19.** Dispositif expérimental et application de l'engrais azoté : (3 variétés de *Phaseolus vulgaris* × 2 niveaux de fertilisation × 4 répétitions).

Un modèle de système d'irrigation « goutte à goutte » a été utilisé pour les raisons suivantes : la perte d'engrais et de nutriments est minimisée en raison d'une application

localisée et d'une lixiviation réduite. L'efficacité de l'application de l'eau est élevée si elle est gérée correctement et le nivellement du champ n'est pas nécessaire. La fréquence d'irrigation pendant toute l'expérience a été tous les 3-4 jours.



**Figure 20.** Aperçu général de la conception expérimentale et des différentes étapes de développement du haricot commun à Aïn Naga (Biskra) : (A) émergence des plantules, (B) installation du modèle d'irrigation 'goutte à goutte', (C) phase végétative, (D, E) phase de floraison, (F) phase de fructification et (G) Aspect des nodules et des racines.

## 2.5 Détermination de la cinétique de croissance

Pour les trois variétés de haricot commun, la cinétique de croissance a concerné les trois principaux stades de vie des plantes, à savoir végétative, floraison et fructification. À chaque accomplissement complet de la période de croissance, la biomasse sèche des plantes, la longueur des tiges et des racines ainsi que le nombre de racines secondaires ont été évalués. Pour chaque variété, le nombre d'échantillons utilisé a été de (10 plantes  $\times$  4 parcelles  $\times$  2 traitements  $\times$  3 stades de croissance). Les plantes ont été soigneusement déterrées avec une pelle sur un sol humide pour éviter un déracinement brutal. Les plantes ont été séchées dans une étuve à 70 °C pendant 48 h pour la détermination de la biomasse sèche. Il convient de noter que le poids sec des plantes a été pesé sans les fleurs au stade de la floraison et sans les gousses au stade de la fructification.

## 2.6 Détermination de certaines composantes de rendement

Le nombre de fleurs par plante a été déterminé *in situ* lorsqu'une floraison générale a été atteinte chez les trois variétés et ceci 60 jours après le semis. La récolte à la fin de la phase



de fructification a été effectuée 95 jours après le semis lorsque des signes de maturité ont été observés (jaunissement des feuilles et dessèchement des gousses). Un nombre de 10 plantes a été sélectionné aléatoirement dans chaque parcelle. Les racines ont été soigneusement lavées. Les nodules ont été soigneusement prélevés des racines et leur nombre a été enregistré pour chaque plante. Le nombre de gousses, de graines par plante ainsi que l'indice H de rendement (HI) a également été évalué. Donald (1962) a défini l'indice H (HI) de rendement (%) comme le rapport entre le poids sec des grains et le poids de la matière sèche totale à maturité.

## 2.7 Analyses statistiques

Les résultats de chaque variable étudiée ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $\pm$  SD). Toutes les données ont été soumises à une analyse de variance à un seul et à deux facteurs (ANOVA) et au test à comparaisons multiples Duncan ( $P < 0.05$ ) à l'aide du logiciel SAS (*Statistical Analysis System*) version 9.0 (2002).

## 3 Résultats et discussion

### 3.1 Effet de la fertilisation azotée sur la cinétique de développement

Selon le tableau 14, l'effet des facteurs (fertilisation  $\times$  temps  $\times$  variété) a été significatif sur la biomasse sèche totale ( $P < 0.0001$ ), la longueur des tiges ( $P < 0.0001$ ), la longueur des racines ( $P < 0.0001$ ) et le nombre de racines secondaires ( $P = 0.0143$ ). En revanche, une augmentation très marquée de toutes les variables étudiées a été observée au cours du temps (stades de développement) et ceci chez les trois variétés. Cependant, cette augmentation a été différente d'un traitement à l'autre (Tableau 14). Les trois variétés de haricot commun, traitées ou non, ont commencé à fleurir et à fructifier simultanément. En effet, la fertilisation N n'a aucun rapport avec les caractéristiques phénologiques de la plante (Swiader *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2001; Dumka *et al.*, 2004).

L'accumulation de matière sèche dans la plante varie selon les niveaux d'azote et la période de croissance. La fertilisation azotée a permis d'augmenter la biomasse sèche totale des plantes au stade de la fructification des variétés *Djedida* et *Jalila* de 16% et 20%, respectivement par rapport au témoin (plantes non fertilisées). Cependant, l'effet de la fertilisation sur la variété *Nelson* n'a été significatif qu'au stade de la floraison, enregistrant une augmentation de 35% par rapport au témoin (Tableau 14). La production de matière sèche est directement liée à l'approvisionnement en azote. Lorsque l'apport d'azote est faible, la production de matière sèche est plus faible, en particulier chez les feuilles, ce qui affecte la production de photo-assimilats et leur distribution vers les organes reproducteurs (Dordas *et al.*, 2008). L'un des objectifs de la présente étude est de déterminer comment l'application de la fertilisation N pouvait affecter l'accumulation de matière sèche chez le haricot.

L'accumulation de matière sèche peut être affectée par le cultivar et les conditions de croissance existantes *in situ* (Papakosta *et al.*, 1991; Seppänen *et al.*, 2018). L'azote est l'un des nutriments les plus importants pour la croissance des plantes car il affecte l'accumulation de matière sèche chez de nombreuses espèces de légumineuses (Guinet *et al.*, 2018).

**Tableau 14.** Effet de la variété, du stade de croissance et du traitement sur certains paramètres de croissance chez trois variétés de *Phaseolus vulgaris* dans la région aride de Aïn Naga (Biskra) (n=40).

Variétés	Stades de croissance	Fertilisation	Biomasse sèche des plantes (g)	Longueur tige (cm)	Longueur racine (cm)	Nombre de racines secondaires
<i>Djedida</i>	VEG	Fertilisé	2.52 ± 0.64 <sup>a</sup>	11.7 ± 0.29 <sup>a</sup>	8.11 ± 1.20 <sup>a</sup>	7.40 ± 0.93 <sup>a</sup>
		Non fertilisé	2.52 ± 0.64 <sup>a</sup>	11.7 ± 0.29 <sup>a</sup>	8.11 ± 1.20 <sup>a</sup>	7.40 ± 0.93 <sup>a</sup>
	FLO	Fertilisé	4.97 ± 0.12 <sup>a</sup>	18.9 ± 3.66 <sup>a</sup>	12.5 ± 1.60 <sup>b</sup>	6.85 ± 1.29 <sup>b</sup>
		Non fertilisé	4.92 ± 0.12 <sup>a</sup>	19.5 ± 2.49 <sup>a</sup>	14.5 ± 2.63 <sup>a</sup>	8.35 ± 1.44 <sup>a</sup>
	FRU	Fertilisé	5.68 ± 0.11 <sup>a</sup>	21.9 ± 2.48 <sup>a</sup>	13.2 ± 2.85 <sup>a</sup>	7.85 ± 1.96 <sup>b</sup>
		Non fertilisé	4.75 ± 0.11 <sup>b</sup>	20.9 ± 2.87 <sup>a</sup>	13.6 ± 2.54 <sup>a</sup>	9.10 ± 2.31 <sup>a</sup>
<i>Nelson</i>	VEG	Fertilisé	1.46 ± 0.12 <sup>a</sup>	17.2 ± 1.90 <sup>a</sup>	10.6 ± 2.09 <sup>a</sup>	6.70 ± 1.64 <sup>a</sup>
		Non fertilisé	1.46 ± 0.12 <sup>a</sup>	17.2 ± 1.90 <sup>a</sup>	10.6 ± 2.09 <sup>a</sup>	6.70 ± 1.64 <sup>a</sup>
	FLO	Fertilisé	5.13 ± 1.50 <sup>a</sup>	19.8 ± 1.57 <sup>a</sup>	12.1 ± 1.21 <sup>a</sup>	7.20 ± 2.23 <sup>a</sup>
		Non fertilisé	3.29 ± 0.76 <sup>b</sup>	18.3 ± 3.54 <sup>b</sup>	12.6 ± 1.34 <sup>a</sup>	6.70 ± 2.64 <sup>a</sup>
	FRU	Fertilisé	4.98 ± 1.07 <sup>a</sup>	22.6 ± 6.10 <sup>a</sup>	12.3 ± 1.63 <sup>b</sup>	7.40 ± 2.92 <sup>a</sup>
		Non fertilisé	4.69 ± 1.22 <sup>a</sup>	20.5 ± 3.35 <sup>a</sup>	15.7 ± 4.52 <sup>a</sup>	7.65 ± 1.67 <sup>a</sup>
<i>Jalila</i>	VEG	Fertilisé	1.55 ± 0.11 <sup>a</sup>	13.1 ± 1.97 <sup>a</sup>	10.3 ± 1.59 <sup>a</sup>	5.70 ± 1.81 <sup>a</sup>
		Non fertilisé	1.55 ± 0.11 <sup>a</sup>	13.1 ± 1.97 <sup>a</sup>	10.3 ± 1.59 <sup>a</sup>	5.70 ± 1.81 <sup>a</sup>
	FLO	Fertilisé	4.69 ± 1.60 <sup>a</sup>	18.9 ± 2.12 <sup>a</sup>	11.5 ± 1.47 <sup>b</sup>	6.60 ± 2.13 <sup>a</sup>
		Non fertilisé	4.59 ± 1.14 <sup>a</sup>	17.3 ± 2.66 <sup>b</sup>	12.6 ± 1.69 <sup>a</sup>	6.20 ± 1.77 <sup>a</sup>
	FRU	Fertilisé	5.55 ± 1.25 <sup>a</sup>	23.2 ± 4.87 <sup>a</sup>	12.0 ± 2.70 <sup>b</sup>	6.20 ± 1.68 <sup>b</sup>
		Non fertilisé	4.40 ± 0.88 <sup>b</sup>	18.9 ± 3.67 <sup>b</sup>	13.7 ± 2.67 <sup>a</sup>	7.05 ± 1.61 <sup>a</sup>
<b>F Fisher (VAR×GS×FERT)</b>			14.95	6.27	7.52	3.15
<b>Probabilité (VAR×GS×FERT)</b>			< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0143

Pour chaque stade de croissance, les mêmes lettres de l'alphabet le long de la colonne n'indiquent aucune différence de signification au seuil de 5% (Duncan Multiple Range Test). VEG-végétative; FLO-floraison; FRU-fructification; GS-stade de croissance; FERT-fertilisation.

Pour la longueur des tiges, l'effet de la fertilisation a été beaucoup plus exprimé chez la variété *Jalila* aux stades de floraison et de fructification avec une amélioration de 8% et 18%, respectivement. L'effet de fertilisation a également été observé chez la variété *Nelson* avec une amélioration de 8% par rapport au témoin au stade de floraison, qui est similaire à celui obtenu par la variété *Jalila*. Cependant, aucun effet de la fertilisation n'a été observé chez la variété *Djedida* (Tableau 14). Ces variations sont liées aux différences de potentiel génétique, de croissance et d'autres caractéristiques intrinsèques de chaque cultivar (Beebe *et al.*, 2013; Inostroza *et al.*, 2015).

Pour les racines, la fertilisation a eu un effet négatif sur la croissance en longueur des trois variétés étudiées mais à différents stades de développement. En effet, la croissance en longueur des racines au stade de floraison des variétés *Djedida* et *Jalila* a été retardée respectivement de 16% et 10%. Au stade de la fructification, cette même variable a été retardée chez la variété *Nelson* et *Jalila* avec respectivement 28% et 14% par rapport aux plantes non fertilisées (Tableau 14). Kohls et Baker (1989) ont rapporté que la fertilisation azotée réduit le nombre de racines secondaires et de poils racinaires et inhibe ainsi la

nodulation chez les plantes actinorhiziennes. En utilisant *P. sativum*, *V. faba*, *V. sinensis* et *P. vulgaris* comme matériel d'étude, Wahab *et al.* (1996) ont constaté que le nitrate d'azote supprime la formation des poils racinaires et réduit également le nombre de racines secondaires et, par conséquent, réduit l'infection des rhizobiums et la nodulation des racines. De plus, Costa *et al.* (2002) ont rapporté que la longueur des racines et la surface des racines augmentaient sous les niveaux intermédiaires de l'engrais azoté et que la croissance des racines diminuait sous des niveaux de fertilisation plus élevés.

L'effet de la fertilisation a également été négatif sur le nombre de racines secondaires. Ceci a été observé chez la variété *Djedida* au stade de la floraison avec une diminution de 20% et au stade de la fructification avec une diminution de 16% par rapport au témoin (Tableau 14). Cet effet a également été indiqué chez les plantes de la variété *Jalila*, mais seulement au stade de la fructification avec une réduction de 14% par rapport aux plantes non fertilisées. En revanche, aucun effet de la fertilisation n'a été observé chez la variété *Nelson* sur le nombre de racines secondaires et ceci aux deux phases de développement où la fertilisation azotée a été appliquée (Tableau 14). Il a été démontré que la fertilité des sols et les organismes de la rhizosphère altéraient considérablement la croissance et l'architecture des racines. Wiersum (1958) a montré que des concentrations élevées d'azote pouvaient stimuler la longueur des racines et le nombre de racines primaires, tandis que la carence en phosphate pouvait réduire à la fois la longueur des racines ainsi que le nombre de racines secondaires et tertiaires sans modifier le nombre de racines primaires (Bowen et Rovira, 1999).

### **3.2 Effet combiné des variétés et de la fertilisation sur certains paramètres de rendement**

Selon le tableau 15, l'interaction engrais-variété a pu influencer de manière significative le nombre de fleurs par plante ( $P < 0.0001$ ), le nombre de gousses par plante ( $P < 0.0001$ ), le nombre de graines par plante ( $P < 0.0001$ ), le nombre de nodules par plante ( $P < 0.0001$ ), le poids sec des graines ( $P < 0.0001$ ) et l'indice H de rendement ( $P < 0.0001$ ).

L'application d'engrais azoté avant l'induction florale est bien connue pour augmenter le nombre de fleurs. Le plus grand nombre de fleurs a été enregistré chez les plantes fertilisées et ce parmi toutes les variétés étudiées. L'augmentation est d'environ 30%, 50% et 16%, respectivement, chez les variétés *Nelson*, *Jalila* et *Djedida*, par rapport aux plantes témoins (Tableau 15). Monti *et al.* (2016) ont indiqué qu'une faible disponibilité en azote entraînait une réduction de l'azote des feuilles, un nombre réduit de fleurs, une faible nouaison et un faible rendement.

Le nombre de gousses par plante a également été influencé par la fertilisation des trois variétés. Cette variable a été améliorée de 18%, 17% et 33%, respectivement à *Djedida*,

*Nelson* et *Jalila*, par rapport aux plantes non fertilisées (Tableau 15). Blair *et al.* (2009) ont noté que les variétés de haricots communs se comportaient très différemment par rapport à la fertilité du sol. En effet, ils ont observé qu'il existait des variétés qui n'exprimaient leur potentiel génétique que sur un environnement fertile.

**Tableau 15.** Effets combinés des variétés et de la fertilisation sur le nombre de fleurs, gousses, graines, nodules, poids des graines et indice de rendement par plante chez *Phaseolus vulgaris* au stade de floraison et de fructification dans la région aride de Aïn Naga (Biskra) (n=40).

Variétés	Fertilisation	Nombre par plante				Poids sec des graines (g)	HI (%) (par plante)
		Fleurs	Gousses	Graines	Nodules		
<i>Djedida</i>	Fertilisé	23.2 ±4.29 <sup>b</sup>	11.7 ±3.17 <sup>a</sup>	32.5 ±6.67 <sup>a</sup>	1.60 ±1.21 <sup>d</sup>	4.09 ±1.25 <sup>a</sup>	88.6 ±9.31 <sup>a</sup>
	Non fertilisé	19.4 ±2.18 <sup>c</sup>	9.60 ±3.68 <sup>bc</sup>	32.5 ±12.6 <sup>a</sup>	6.80 ±2.01 <sup>b</sup>	4.16 ±1.08 <sup>a</sup>	72.8 ±9.43 <sup>b</sup>
<i>Nelson</i>	Fertilisé	28.2 ±9.31 <sup>a</sup>	10.6 ±2.22 <sup>ab</sup>	15.7 ±4.05 <sup>b</sup>	3.80 ±2.72 <sup>c</sup>	1.91 ±1.02 <sup>c</sup>	36.8 ±12.1 <sup>d</sup>
	Non fertilisé	19.7 ±7.61 <sup>c</sup>	8.80 ±1.68 <sup>c</sup>	13.8 ±4.04 <sup>b</sup>	13.4 ±4.51 <sup>a</sup>	1.54 ±0.47 <sup>c</sup>	33.1 ±6.04 <sup>d</sup>
<i>Jalila</i>	Fertilisé	27.1 ±7.44 <sup>a</sup>	9.40 ±1.93 <sup>c</sup>	29.4 ±7.80 <sup>a</sup>	0.80 ±1.55 <sup>d</sup>	3.44 ±1.42 <sup>b</sup>	71.8 ±11.2 <sup>b</sup>
	Non fertilisé	13.7 ±5.38 <sup>d</sup>	6.25 ±2.16 <sup>d</sup>	17.5 ±9.70 <sup>b</sup>	3.50 ±2.36 <sup>c</sup>	4.24 ±2.33 <sup>a</sup>	59.9 ±13.1 <sup>c</sup>
F de Fisher (VAR×FERT)		27.7	20.5	48.3	124.1	30.4	110.1
Probabilité (VAR×FERT)		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

Les mêmes lettres de l'alphabet le long de la colonne n'indiquent aucune différence de signification au seuil de 5% (Duncan Multiple Range Test). VAR-variété; FERT-fertilisation; HI-Indice H de rendement.

Selon le tableau 15, le nombre de graines par plante a été amélioré par la fertilisation azotée chez les variétés *Nelson* et *Jalila* avec des pourcentages de 12% et 40%, respectivement. Cependant, la variété *Djedida* n'a pas été influencée par l'apport d'engrais pour cette même variable en enregistrant des valeurs similaires de 32 graines/plante et ceci chez les plantes fertilisées et non fertilisées. Le rendement en graines a été observé comme l'une des caractéristiques morphologiques les plus stables chez de nombreuses espèces végétales (Chmielewski et Ruit, 2002).

De plus, le poids sec total des graines n'a été affecté que par la fertilisation de la variété *Jalila*. Une fois de plus, la variété *Djedida* ne semble pas être affectée par la fertilisation pour cette variable, enregistrant une moyenne de 4 g. Cette valeur est la plus élevée par rapport aux autres variétés avec un ratio de 114% supérieur à la variété *Nelson*.

Pour l'indice H de rendement, seules les variétés *Djedida* et *Jalila* semblent être affectées par la fertilisation. L'effet de la fertilisation est positif et semble augmenter l'indice H de 18% à *Djedida* et de 20% à *Jalila* par rapport aux plantes non fertilisées (Tableau 15). Aucun effet significatif n'a été observé chez la variété *Nelson*, qui a enregistré les valeurs les plus faibles avec une moyenne de 35% d'indice H sous les deux traitements (Tableau 15).

Cette réponse inter-variétale du rendement du haricot commun pourrait être due au patrimoine génétique des différentes variétés utilisées en favorisant ou défavorisant l'une ou l'autre variété utilisée dans les conditions édapho-climatiques de l'environnement. Cette découverte a également été observée par Remans *et al.* (2008). En effet, non seulement ils ont constaté que différents génotypes pouvaient induire des différences de rendement très



importantes, mais aussi, le rendement du même génotype était significativement influencé par l'environnement. Cette différence de rendement entre les parcelles fertilisées et non fertilisées peut s'expliquer par le fait que la productivité des haricots communs est fortement influencée par la fertilité des sols (Fageria et Baligar, 1997; Fageria et Baligar, 2003; Jansa *et al.*, 2011).

La nutrition azotée du haricot commun est accomplie par deux processus complémentaires au cours du cycle de croissance des plantes : soit par assimilation de l'azote minéral du sol, soit par fixation symbiotique de l'azote atmosphérique par la formation de nodules racinaires (Unkovich et Pate, 2000). Le nombre de nodules par plante est la variable la plus affectée par la fertilisation. Ce nombre a été plus élevé chez les plantes non fertilisées et cela chez les trois variétés de haricot commun étudiées. Le classement selon les valeurs obtenues est *Nelson*>*Djedida*>*Jalila*. Ce nombre de nodule a été augmenté de 253%, 325% et 338%, respectivement chez *Nelson*, *Djedida* et *Jalila* par rapport aux valeurs enregistrées chez les plantes fertilisées pour ces mêmes variétés (Tableau 15).

Des effets inhibiteurs de l'engrais azoté ajouté à la nodulation et la fixation d'azote ont été signalés pour plusieurs légumineuses : *Glycine max* (Bezdicsek *et al.*, 1974); *Trifolium subterraneum* (Chambers *et al.*, 1980); *Vicia faba* (Wahab et Abd-Alla, 1995 ); *Gliricidia sepium* (Thomas *et al.*, 2000); *Cicer arietinum* (Anderson *et al.*, 2004) et *Phaseolus vulgaris* (Kawaka *et al.*, 2018). Kakraliya *et al.* (2018) ont observé que l'application d'engrais azoté provoquait une dégénérescence des nodules sur les haricots verts. De plus, Drevon *et al.* (2015) ont signalé que des niveaux élevés de l'azote inhibaient les divisions cellulaires précoces au niveau le cortex, ce qui inhiberait la nodulation.

Selon Otieno *et al.* (2009), l'application d'engrais azoté a considérablement réduit le nombre de nodules par plante chez le lablab (*Lablab purpureus*) et le haricot commun (*P. vulgaris*), mais n'a eu aucun effet significatif sur le mung bean (*Vigna radiata*) et le haricot de Lima (*Phaseolus lunatus*). La nutrition azotée des légumineuses est d'abord assurée par la réduction du  $\text{NO}_3^-$  du sol avant que la fixation symbiotique ne prenne le relais (Valentine *et al.*, 2018). Il est aussi nécessaire de signaler que les caractéristiques du sol peuvent jouer un rôle important pour un meilleur rendement et une meilleure productivité.

Notre site expérimental est limoneux et très calcaire avec 53.1% de  $\text{CaCO}_3$  total et un pH de 7.7. En effet, les sols calcaires sont définis par la présence du carbonate de calcium minéral ( $\text{CaCO}_3$  ou chaux). Le pH de ces sols est généralement supérieur à 7 et peut atteindre 8.5 (Ceyhan *et al.*, 2014). Lorsque ces sols contiennent du carbonate de sodium, le pH peut dépasser 9. Pourtant, ces types de sols peuvent être extrêmement productifs à usage agricole lorsqu'ils sont bien gérés (Ceyhan *et al.*, 2014).

## 4 Conclusion

On peut en déduire que les variétés présentant un écart important entre les parcelles fertilisées et non fertilisées auraient la capacité d'exprimer leur potentiel génétique sur des sols fertiles. Les variétés pour lesquelles il existe un petit écart de rendement indépendamment de la fertilisation seraient améliorées pour mieux produire, même dans des conditions de fertilité défavorables. L'obtention d'un meilleur rendement de haricot commun dépend principalement du choix de la variété. Les résultats ont indiqué que l'application d'engrais azoté a eu un impact négatif sur la longueur des racines, le nombre de nodules et de racines secondaires chez la plupart des variétés de haricot commun. Cependant, l'application d'engrais azoté a augmenté de manière significative la matière sèche aux stades de floraison et de fructification pour les trois variétés étudiées. Le nombre de gousses par plante et le rendement en graines ont été améliorés par l'application d'engrais azoté en fonction des variétés et des paramètres mesurés.

D'après nos résultats, le pourcentage d'amélioration par fertilisation azotée sur un paramètre ou un autre ne dépassait pas une moyenne de 20% par rapport au témoin. En effet, l'effet de la fertilisation est positif et semble améliorer l'indice H de rendement de 18% chez *Djedida* et de 20% à *Jalila* par rapport aux plantes non fertilisées. Ces taux pourraient être important pour une très grande superficie agricole; cependant, nous recommanderons des recherches sur les quantités optimales d'engrais azotés afin de réduire l'impact des engrais chimiques en excès sur l'environnement et la santé. Les variétés *Djedida* et *Jalila* ont donné le meilleur rendement et peuvent donc être recommandées aux agriculteurs. Cependant, la variété *Nelson* a montré sa capacité à mieux noduler dans les sols calcaires, exprimant le plus grand nombre de nodules par plante en absence d'engrais. Beaucoup plus de recherches sur la fixation de N<sub>2</sub> chez le haricot commun sont également nécessaires.

# CHAPITRE : VI

## Chapitre VI - Isolement des bactéries à effet PGPR à partir des nodules de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* var. *djedida*)

### 1 Objectif de l'étude

Les micro-organismes endophytes ou microbiotes sont capables de coloniser les espèces végétales sans causer de dommages apparents à la plante hôte (Petrini *et al.*, 1991; Puri *et al.*, 2017). Ces micro-organismes peuvent être transmis verticalement via les graines et le pollen ou horizontalement via le sol, la rhizosphère, les surfaces foliaires et les insectes (Frank *et al.*, 2017). Ces micro-organismes sont bénéfiques à l'intérieur des organes végétaux. Ils favorisent la croissance ainsi que la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Rodriguez *et al.*, 2009). Afin de maintenir une symbiose stable, les endophytes synthétisent divers métabolites secondaires naturels d'importance médicale, agronomique, industrielle ou biotechnologique, et en retour l'hôte leur offre un abri et une protection contre la compétition microbienne et les conditions environnementales extrêmes (Porrás-Alfaro et Bayman, 2011; Haroim *et al.*, 2015; Rustamova *et al.*, 2020; Suradkar *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2020; Njeru *et al.*, 2020).

Comme de nombreuses espèces végétales, le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) peut être colonisé par des micro-organismes endophytes, qui sont les champignons endomycorhiziens (AMF) et les rhizobiums (Jansa *et al.*, 2011; Nanjareddy *et al.*, 2017; Amin *et al.*, 2020; Massa *et al.*, 2020; da Silva *et al.*, 2020). Les premiers endophytes participent à l'absorption et à la translocation des nutriments, en particulier le phosphore (P), l'azote (N) et de nombreux micronutriments du sol (Smith et Read, 2010). De Novais *et al.* (2020) ont démontré que le mycélium extraradical (ERM) facilite la translocation bactérienne et les associations simultanées de plantes avec des champignons et des bactéries bénéfiques. Les seconds endophytes, considérées comme des diazotrophes, peuvent être considérées comme des bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) car ils peuvent solubiliser les minéraux comme le phosphore, synthétiser des phytohormones et produire des sidérophores (Adesemoye *et al.*, 2010; Collavino *et al.*, 2010; Massa *et al.*, 2020).

D'autre part, des endophytes bactériens qui cohabitent et colonisent des nodules au même temps que les rhizobiums nodulant *Phaseolus vulgaris* ont été recensées. Ce sont des bactéries du genre *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia* et *Pseudomonas* qui ont contribué de manière synergique à côté de *Rhizobium tropici* à promouvoir la croissance de *P. vulgaris* et à contrôler la maladie de la fonte de semis qui sont donc des bactéries à effet PGPR (Ferreira *et al.*, 2020). L'objectif de notre étude est d'isoler d'abord des bactéries à partir des nodules de *P. vulgaris*, de tester leurs habilités à noduler et/ou à promouvoir la croissance de *P. vulgaris* var.

*djedida* dans des conditions semi-contrôlées et de tester leurs pouvoirs qualitatifs de solubilisation de phosphate.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Matériel biologique

#### 2.2.1 Lieu et période de l'étude

Cette étude a été menée sur la nodulation de *Phaseolus vulgaris* var. *djedida* cultivée à Aïn Naga, une commune de la wilaya de Biskra en Algérie, où le premier prélèvement *in natura* des nodules s'est effectué en décembre 2017 et le second en novembre 2018 lors de l'essai au champ de l'effet du fertilisant azoté sur la nodulation de *P. vulgaris* var. *djedida*. L'étude a été réalisée au laboratoire du département d'écologie et d'environnement, Université de Batna 2 (Wilaya de Batna).

#### 2.2.2 Isolats bactériens

Les isolats ayant fait l'objet de notre étude proviennent des nodosités de deux variétés de haricot (*Djedida* et *Nelson*) prélevées *in natura* de la région de Aïn Naga (Wilaya de Biskra) (Figure 21). Chaque nodule est soigneusement lavé à l'eau courante afin d'éliminer le sol adhérent puis conservé dans du glycérol à 60% (Figure 22).



**Figure 21.** Racines de haricot (*Phaseolus vulgaris* L. var. *djedida*) avec des nodules dans la région de Aïn Naga (Biskra).



**Figure 22.** Echantillons de plantes ayant servi pour l'étude des rhizobies et leur conservation.  
(A) Plantes de haricot prélevées *in natura* de la région de Aïn Naga (Biskra).  
(B) Nodules de haricot conservés dans des tubes contenant du glycérol (60%).

### 2.2.3 Matériel végétal

Cette étude a été menée sur une variété de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L. var. *djedida*). Les graines de *P. vulgaris* var. *djedida* (longueur :  $12.9 \pm 0.63$  mm; largeur :  $6.46 \pm 0.51$  mm; épaisseur :  $5.69 \pm 0.42$  mm; moyenne  $\pm$  SD; n=50) ont été fournies par SARL AgroSeed (Date de récolte : 2016; conditionnement des semences : France; origine : USA; référence : DJ0512). Le poids de mille graines était de 273 g (Mansouri *et al.*, 2019). Les graines ont été traitées avec Thiram (un fongicide non systémique). La maturité des graines de cette variété est de 85 à 100 jours.

## 2.2 Méthodologie

### 2.2.1 Isolement des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont isolées à partir de 15 nodules de *P. vulgaris* var. *djedida* et de 30 nodules de *P. vulgaris* var. *Nelson* (prélevés également *in natura*). La raison qui a motivé la récolte de nodules d'une autre variété est l'abondance des nodules sur les racines de cette dernière (voir chapitre V). Le choix de la variété *djedida* s'explique par le fait que cette variété est la plus cultivée dans la région de Biskra et beaucoup plus commercialisée que la variété *Nelson*.

Chaque nodule est soigneusement lavé à l'eau courante afin d'éliminer toutes traces de glycérol. Ils sont ensuite désinfectés par trempage dans l'hypochlorite de sodium (10%) durant 5 min (Faghire *et al.*, 2011), puis rincés 10 fois à l'eau distillée stérile. Les nodules sont aseptiquement écrasés à l'aide d'une pince stérile (Figure 23) sur le milieu YMA solide contenant du rouge Congo (Annexe 1).

La plupart des rhizobia n'absorbent pas ou très peu le rouge Congo sur le milieu YMA contrairement aux espèces contaminantes (Sadowsky *et al.*, 1983, Somasegaran, 1985). Cela dit que ceux qui ont absorbé le rouge Congo sont conservés pour l'évaluation des activités PGPR.



**Figure 23.** Ecrasement des nodules sur le milieu YMA contenant du rouge Congo.

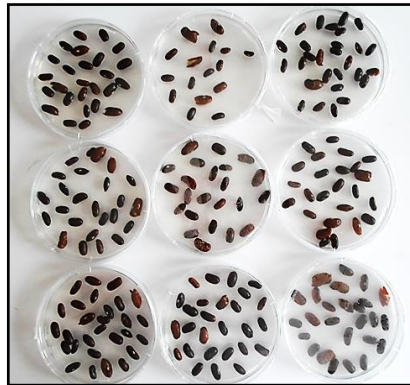


### 2.2.2 Test de nodulation et sélection des souches performantes

Le test de nodulation est un critère important dans la caractérisation des rhizobiums. Les isolats issus des nodosités de haricot ne peuvent être identifiés comme des rhizobia qu'après avoir prouvé leur capacité à former des nodosités sur leur plante hôte en conditions contrôlées (Graham *et al.*, 1991). Les étapes de ce test sont les suivantes :

#### 2.2.2.1 Désinfection et semis des graines *in vitro*

Les graines de *P. vulgaris* var. *djedida* sont désinfectées par trempage dans l'hypochlorite de sodium (5%) durant 1 min (Faghire *et al.*, 2011), puis rincées 10 fois à l'eau distillée stérile, afin d'éliminer toute trace d'hypochlorite de sodium. Ces graines sont ensuite déposées aseptiquement à germer sur de l'eau gélosée à 0.8%. Les boîtes ainsi préparées sont mises à l'obscurité et à température ambiante (Figure 24).



**Figure 24.** Graines de *Phaseolus vulgaris* L. var. *djedida* mises à germer dans des boîtes de Pétri contenant une eau gélosée 0.8%.

#### 2.2.2.2 Préparation de l'inoculum

Des colonies bactériennes bien isolées après plusieurs repiquages (3 maximum) sont mises en culture sur le milieu YMA liquide (Figure 25) à une température de 28 °C pendant 2 à 5 jours jusqu'à l'obtention d'une concentration de  $15 \times 10^8$  cellules.ml<sup>-1</sup> (Mac Farland n°5) (annexe 3).



**Figure 25.** Préparation de l'inoculum.

- (A) Isolat SN14 sur le milieu YEM solide après 3 jours d'incubation à 28°C.  
 (B) Repiquage de l'isolat SN14 sur le milieu YEM liquide.

### 2.2.2.3 Culture et inoculation des plantules *in vitro*

Après 4 jours de germination, l'ensemble des graines germées (Figure 26) dont la longueur des racicules ne dépassaient pas 2 cm, sont transférées dans des pots contenant 250 g de sable préalablement lavé et stérilisé (autoclavé 3 fois à intervalle de 24 h entre chaque stérilisation). Chaque pot a reçu 5 ml d'inoculum liquide en phase exponentielle (Diouf *et al.*, 2003; Lesueur *et al.*, 1994) contenant  $15 \times 10^8$  cellules.ml<sup>-1</sup> (Mac Farland n°5). Des pots témoins (non inoculés) sont également préparés. Les plants sont arrosés chaque deux jours avec une solution nutritive dépourvue d'azote (Rigaud et Puppo, 1975) (annexe 3). Les essais ont été conduits dans une chambre de culture (Température de  $25 \pm 2$  °C ; Humidité relative de 40-60%).



**Figure 26.** Graines de *Phaseolus vulgaris* var. *djedida* après 4 jours de germination à température ambiante et à l'obscurité.



**Figure 27.** Mise en culture et inoculation des plantules de *Phaseolus vulgaris* var. *djedida*.



### 2.2.3 Evaluation de la nodulation et des paramètres de croissance

Après 50 jours de culture, les plantes sont délicatement déterrées et différents paramètres sont étudiés : le nombre de nodule par plante, la longueur de la racine et de la tige principale, nombre de feuilles et de gousses par plant, le poids sec de la partie aérienne et celui de la partie racinaire ainsi que le poids sec des gousses et de la plante entière. Le poids sec est obtenu par un étuvage des racines et des parties aériennes (tiges et feuilles) à 70 °C pendant 48 h. Cette méthode permet de comparer l'efficacité des souches inoculées et non inoculées sur des plantes poussant sur un milieu dépourvu d'azote (Domenach et Wery, 1989).

### 2.2.4 Test de solubilisation du phosphore sur milieu solide (Test qualitatif)

Le phosphore joue un rôle important dans plusieurs activités physiologiques et biochimiques telles que la nodulation (Bawa, 2020), la photosynthèse, la transformation du sucre en amidon et d'autres processus biologiques chez les plantes (Plaxton et Tran, 2011). Le phosphore dans les sols est immobilisé en raison de la formation de complexes insolubles tels que les oxydes hydratés de fer et d'aluminium, le silicate d'aluminium cristallin et amorphe et le carbonate de calcium (Kuhad *et al.*, 2011).

Un certain nombre de micro-organismes du sol (bactéries et champignons) connus sous le nom de micro-organismes solubilisant le phosphate (PSM) sont capables de solubiliser les phosphates en sécrétant des acides organiques et des phosphatases qui transforment les phosphates insolubles en phosphate soluble qui peut être utilisé par les plantes (Glick *et al.*, 2020).

C'est ainsi que des cultures pures de bactéries isolées à partir des nodules de *P. vulgaris* var. *Djedida* et var. *Nelson* ont été ensemencées par touches sur milieu PVK (Pikovskaya, 1948) (annexe 4) solide contenant le  $(Ca_3PO_4)_2$  comme seule source de phosphate à raison d'une seule souche par boîte et 4 répétitions dans la même boîte de pétri. Les boîtes ont été incubées à 28 °C pendant 7 jours. Après incubation, le diamètre des halos ainsi que de la colonie bactérienne ont été mesurés. L'indice de solubilisation a été calculé par la formule suivante (Premono *et al.*, 1996):

$$IS = \frac{\text{Diamètre de l'halo de solubilisation (mm)} - \text{Diamètre de la colonie (mm)}}{\text{Diamètre de la colonie (mm)}} \times 100$$

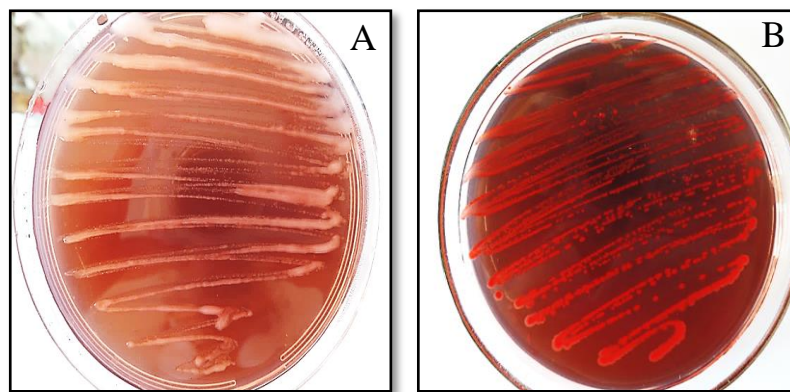
## 2.4 Analyses statistiques

Les résultats de chaque variable étudiée ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type ( $\pm$  SD). Toutes les données ont été soumises à une analyse de variance à un seul et à deux facteurs (ANOVA) et au test à comparaisons multiples Duncan ( $P < 0.05$ ) à l'aide du logiciel SAS (*Statistical Analysis System*) version 9.0 (2002). Les graphes ont été confectionnés avec le logiciel Excel 2016.

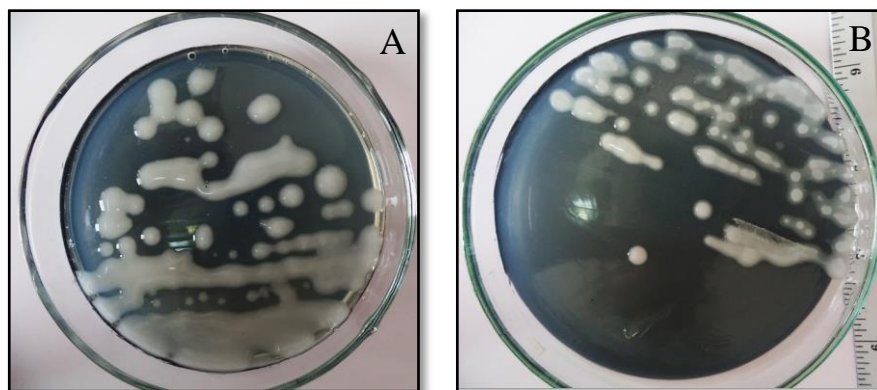
### 3 Résultats et discussion

#### 3.1 Résultat de l'absorption du rouge Congo

Le test de croissance des isolats sur milieu YMA gélosé additionné au rouge Congo indique que les souches sont pures car elles n'ont pas absorbé le colorant (Figure 28). Ce critère a été observé depuis longtemps chez la majorité des rhizobia (Jordan, 1984; Vincent, 1970). Des isolats à croissance rapide (2 à 5 jours) sur YMA contenant du rouge Congo (sans l'aptitude à absorber le rouge Congo, et présentant une couleur blanchâtre ou crémeuse) ont été obtenus à partir de nodules de *P. vulgaris* (L.) indiquant clairement qu'il s'agissait de rhizobiums (Kilambo, 2019).



**Figure 28.** Aspect des isolats sur milieu YMA contenant du rouge Congo. (A) Aspect de l'isolat SN10 qui n'absorbe pas le rouge Congo. (B) Aspect de l'isolat AN11 qui absorbe le rouge Congo.



**Figure 29.** Souches isolées à partir des nodules de *P. vulgaris* var. *djedida* sur milieu YEM solide sans le rouge Congo. (A) Souche SN10; (B) Souche AN11.

Cette inaptitude d'absorber le colorant est l'une des caractéristiques des bactéries nodulant le haricot commun *P. vulgaris* (Ouma *et al.*, 2018; Koskey *et al.*, 2018; Menge *et al.*, 2018). En plus de ces critères, ces mêmes souches ont une croissance rapide de 24 h sur le milieu YEM solide (sans le rouge Congo). Elles possèdent les mêmes caractéristiques macroscopiques des rhizobiums, qui sont des colonies blanches opaques marquées par une très grande viscosité (Figure 29).

L'isolement des rhizobiums à partir des nodules de *P. vulgaris* var. *djedida* et var. *Nelson* obtenus *in natura*, a permis l'obtention de 29 isolats qui n'ont pas absorbé le rouge Congo et de 27 isolats qui l'ont absorbé.

### 3.2 Test de nodulation et d'efficience

La figures 30 et 31 illustrent le développement des plantes de haricot commun variété *djedida* ainsi qu'un échantillon de nodules.



**Figure 30.** Plantes de *Phaseolus vulgaris* âgées de 2 semaines (à gauche) et de 4 semaines (à droite).



**Figure 31.** Nodules obtenus des racines de *P. vulgaris* L. var. *djedida* inoculé avec la souche SN33.

#### 3.2.1 Nombre de nodules

Pour le test de nodulation concernant les 29 souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo (après 50 jours d'inoculation), seul quatre souches SN1, SN14, SN15 et SN16 n'ont pas pu noduler. La souche SN33 a enregistré un nombre de nodules plus important que les autres souches avec une moyenne de 25.22 suivis dans l'ordre décroissant de la souche SN12>SN40>SN22>SD10>SN34>SN20>SN2>SN36>SN4>SN10>...>SN3 (Figure 32).

Concernant le test de nodulation pour les souches qui ont absorbé le rouge Congo, on constate que malgré leur absorbance du colorant; certaines souches ont pu nodulé *P. vulgaris*. Dans l'ordre décroissant selon la moyenne du nombre obtenu de nodule racinaire, ces souches sont :

AD13>A21H>AN16>AN27>A21F>AD7>AN30A>AD8>AN33>AN28>AD14>AN11>AS25B>AN19>AD5>AD1>AD9>AN49>AD11>AN37>AN25>AN31>AN50. À l'exception des souches : AD21, AD4, AN12, AS23 qui se sont révélées négatifs pour la nodulation (Figure 35).

D'après une comparaison entre les deux groupes de souches, le nombre de nodules le plus élevé a été obtenu avec les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo. Par ailleurs on constate la présence d'un faible nombre de nodules, décrit et expliqué par plusieurs auteurs (voir chapitre I) qui est due à la haute promiscuité chez *P. vulgaris* par des souches infectieux et non efficaces. D'autre part, Pampana *et al.* (2016) et Quides *et al.* (2017) ont indiqué que la biomasse nodulaire est proportionnelle à la capacité de fixation d'azote des rhizobiums et ceci dans de nombreuses symbioses.

### 3.2.2 Paramètres morpho-physiologiques

L'effet de l'inoculation avec les souches du premier groupe (souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo) a été significatif ( $P < 0.0001$ ) sur la **longueur de la racine** et non significatif sur la **longueur de la tige principale** ( $P > 0.05$ ) (Figure 33). En revanche, l'effet du deuxième groupe de souches (souches qui ont absorbé le rouge Congo) a été significatif sur ces deux paramètres morphologiques. Stajković *et al.* (2011) ont constaté que l'inoculation *P. vulgaris* (L.) avec *R. phaseoli* n'a eu aucun effet sur la longueur des racines.

En outre, chez l'arachide (*A. hypogea* L.), le traitement avec plusieurs souches rhizobium n'a pas réussi à augmenter la longueur des racines (Singh *et al.* 2011). Cependant, Capelesso *et al.* (2020) ont démontré que la co-inoculation de *Rhizobium tropici* et *Bradyrhizobium spp* a pu stimuler la croissance racinaire. Concernant la longueur de la tige principale, Capelesso *et al.* (2019) et Fallahi et Sharifi (2020) ont prouvé que l'inoculation de *P. vulgaris* avec respectivement *Rhizobium tropici* et *Rhizobium phaseoli* agit significativement sur la hauteur de celle-ci.

L'effet de l'inoculation par les deux groupes de souches obtenues n'a eu aucun effet significatif sur le **nombre de feuilles** chez les plantes *P. vulgaris* var. *djedida* âgées de 50 jours ( $P > 0.05$ ) (Figure 34 et Figure 37).

L'effet de l'inoculation avec les deux groupes d'inoculum obtenus a été significatif ( $P < 0.0001$ ) sur le **nombre de gousses**. En effet, un gain très considérable a été obtenu chez la souche SN2 avec 692% par rapport au témoin (Figure 34). Un gain aussi intéressant mais de seulement 87% a été obtenu avec la souche SN12.



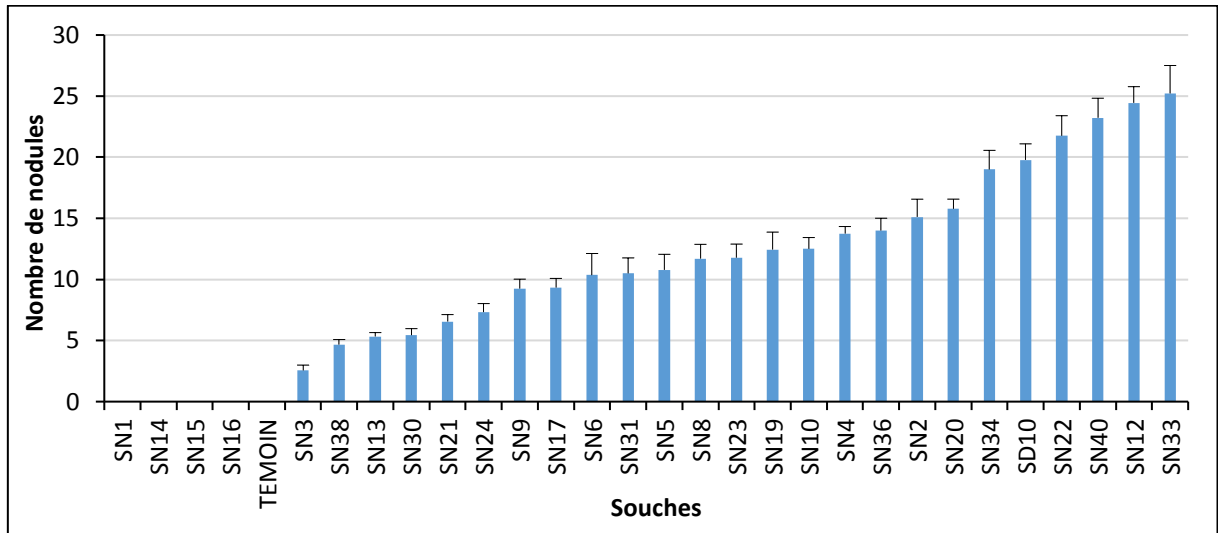


Figure 32. Nombre de nodules par plantes de *Phaseolus vulgaris* âgées de 50 jours et inoculées avec les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.

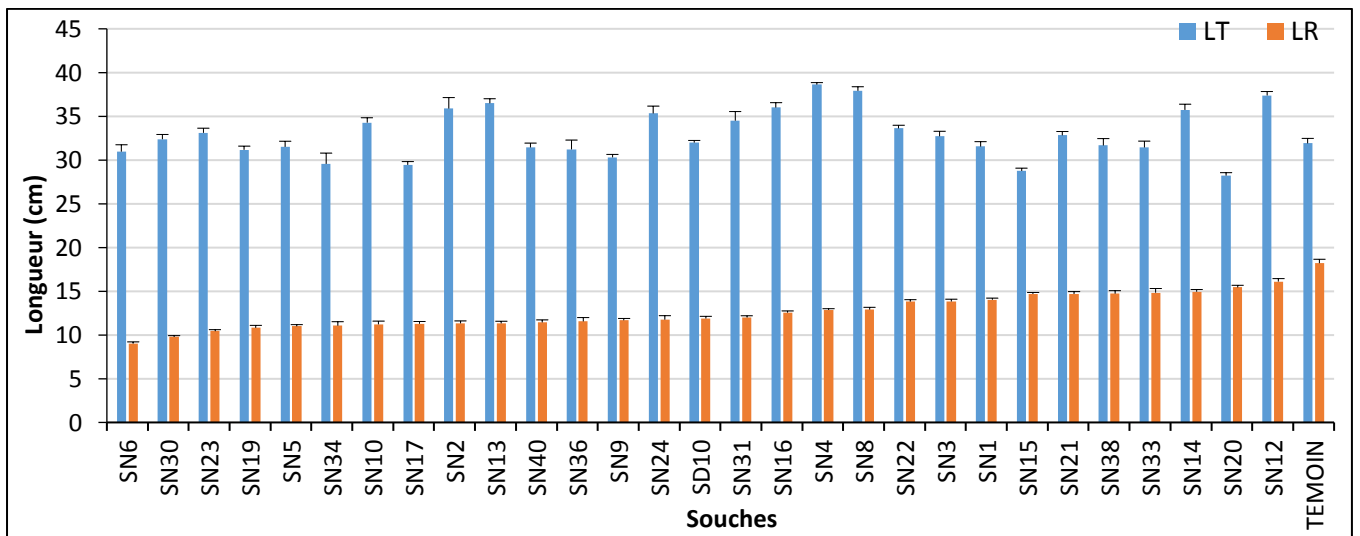


Figure 33. Longueurs (cm) de la racine et de la tige principale des plants de *P. vulgaris* âgées de 50 jours inoculées avec les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.

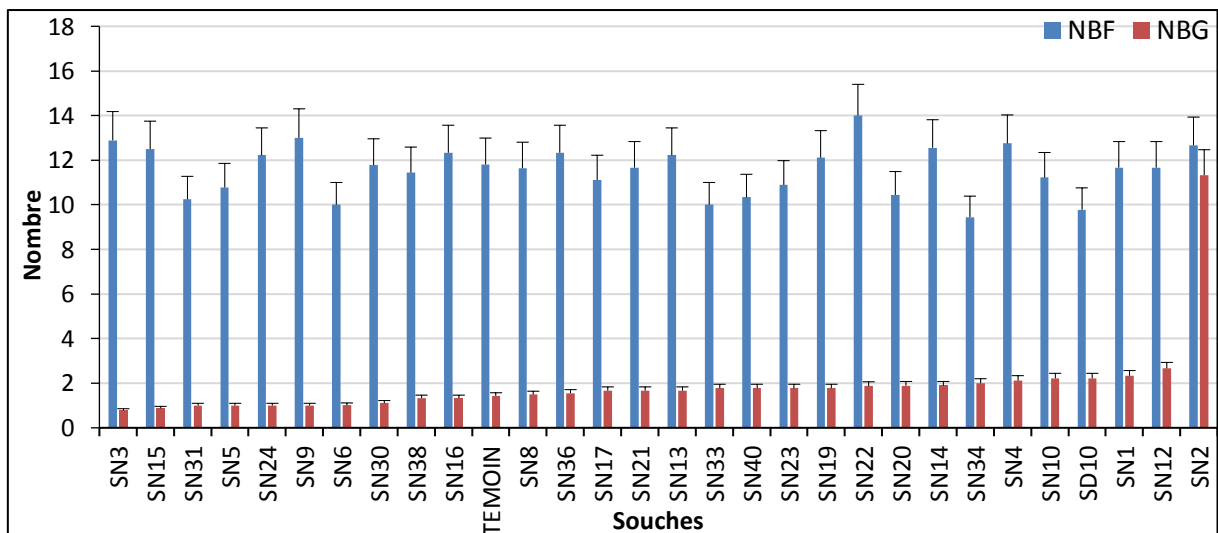
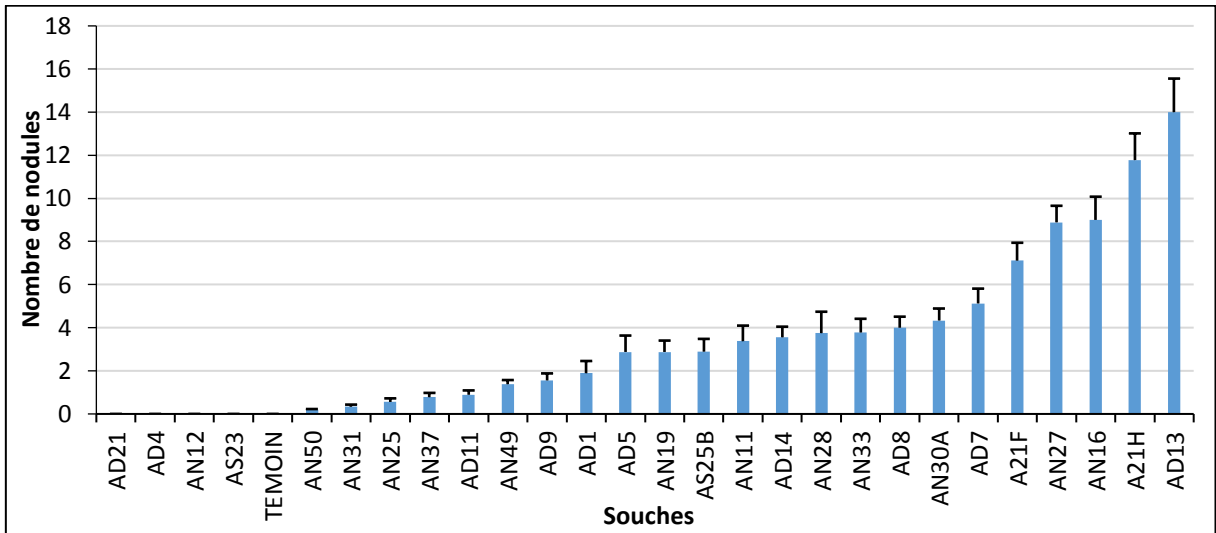
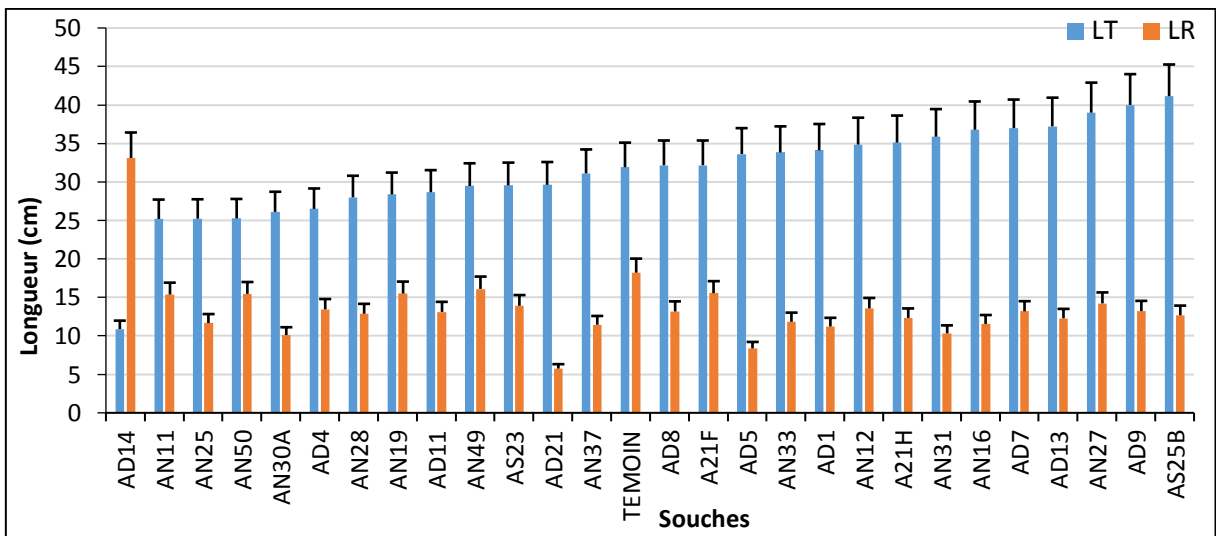


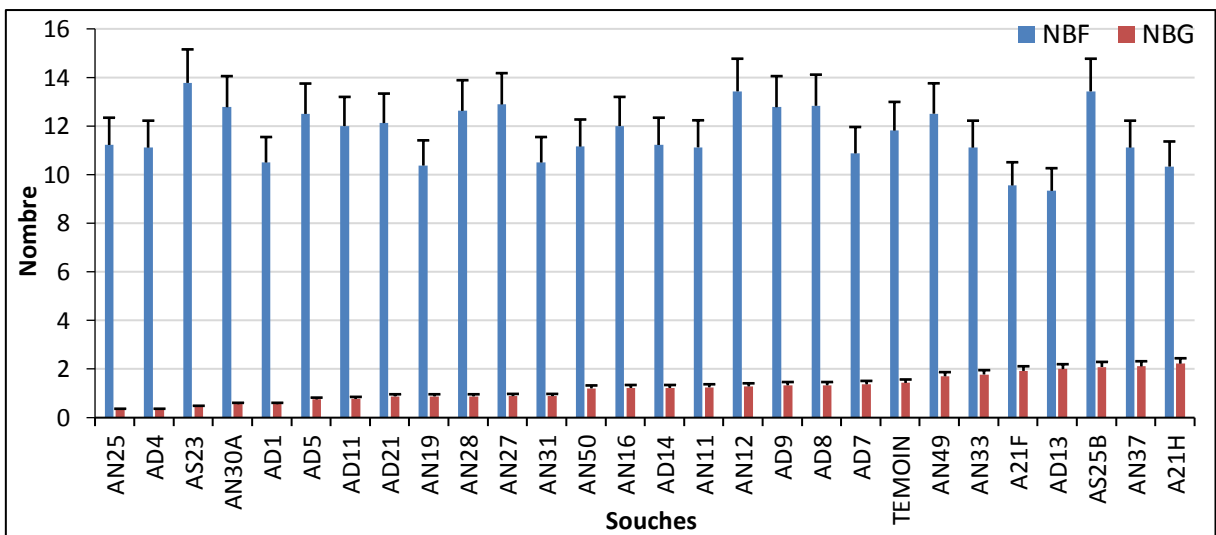
Figure 34. Nombre de feuilles et de gousses par plant de *P. vulgaris* âgées de 50 jours et inoculées avec les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.



**Figure 35.** Nombre de nodule par plantules de *Phaseolus vulgaris* âgées de 50 jours inoculées avec les souches qui ont absorbé le rouge Congo.



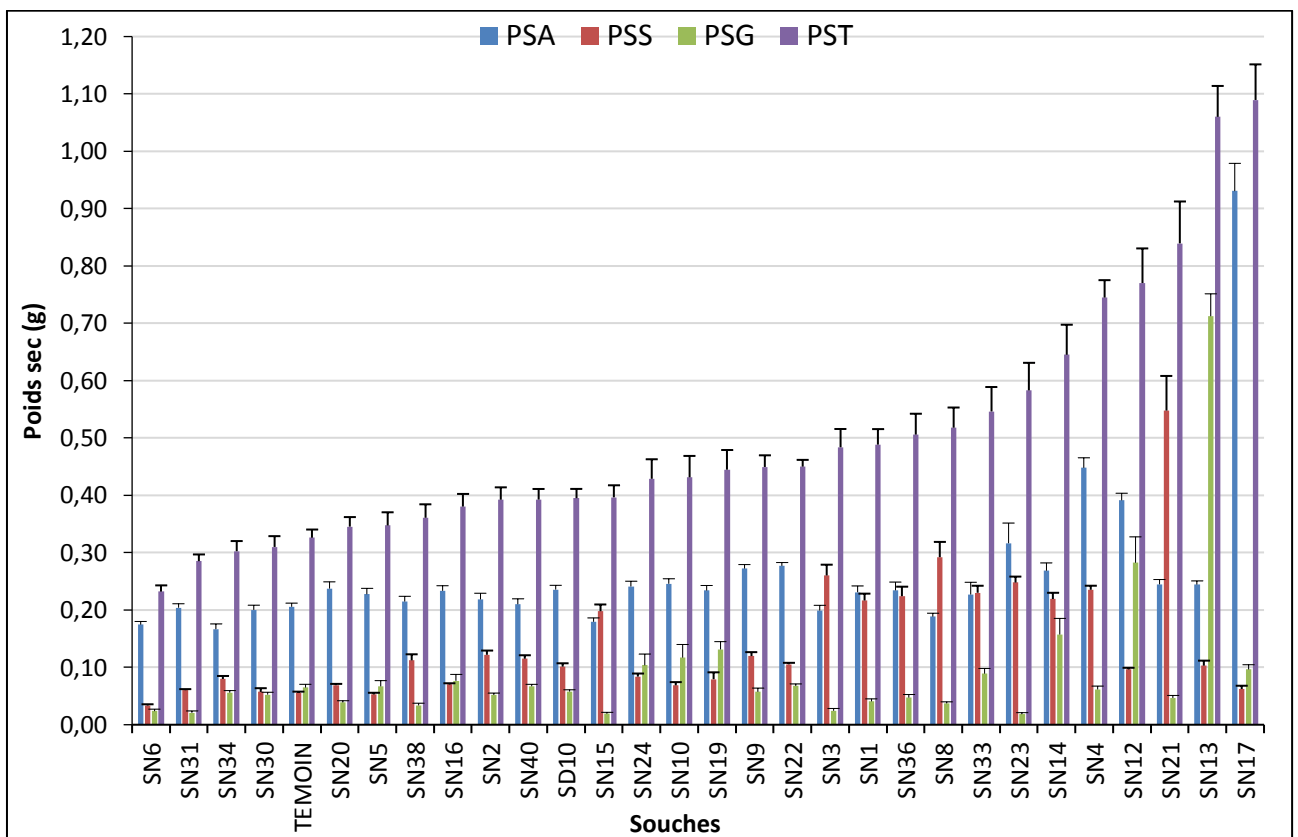
**Figure 36.** Longueur (cm) de la racine et de la tige principale des plants de *P. vulgaris* âgées de 50 jours inoculées avec les souches qui ont absorbé le rouge Congo.



**Figure 37.** Nombre de feuilles et de gousses par plant de *P. vulgaris* âgées de 50 jours et inoculées avec les souches qui ont absorbé le rouge Congo.

Le gain de production de gousses pour les autres souches qui ont nodulé les racines de *P. vulgaris* var. *djedida*, est dans un intervalle de 55% à 4% à l'exception des souches SN31, SN5, SN24, SN9, SN6, SN30 et SN38 qui n'ont pas eu d'effet sur le nombre de gousses par plante. Par contre, malgré que la souche SN1 n'a pu présenter de nodules; elle a pu enregistrer un gain de 63% (Figure 34). Récemment, Massa *et al.* (2020) et de Sousa *et al.* (2020) ont conclu que l'inoculation des plantes de *P. vulgaris* avec rhizobia affecterait positivement le rendement en grains (nombre, poids de gousses et de graines).

L'effet bénéfique de l'inoculation avec des rhizobiums sur le nombre de gousses a été également soutenu par Herliana *et al.* (2019) et Li *et al.* (2020), respectivement pour le soja (*Glycine max*) et la luzerne (*Medicago sativa*).



**Figure 38.** Poids sec des différentes parties des plants de *P. vulgaris* âgées de 50 jours et inocuées avec les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.

Un effet significatif ( $P < 0.0001$ ) de l'inoculum (pour les souches qui ont et qui n'ont pas absorbé le rouge congo) a été observé sur le **poids sec de la partie aérienne** chez *P. vulgaris*. On distingue chez les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo trois groupes, un premier groupe qui regroupe des souches qui ont nodulé mais sans effet améliorateur sur la biomasse aérienne (à savoir SN6, SN31, SN30, SN34, SN3 et SN8). Un deuxième groupe pour les souches qui n'ont pas nodulé avec un effet faible d'amélioration de 12%, 13% et 30%, respectivement pour la souche : SN1, SN16 et SN14. Un troisième et dernier groupe est celui



des souches qui ont nodulé et qui ont enregistré un pourcentage d'amélioration très considérable sur ce même paramètre allant jusqu'à 352% (SN17) et descendant à seulement de 2% pour la souche SN40 (Figure 38).

D'autre part, l'effet de l'inoculum sur le poids sec de la partie aérienne des plants de *P. vulgaris* avec les souches qui ont absorbé le rouge Congo, les souches non nodulantes AN12, AD21, AS23 et AD4 offrent un gain variant entre 395% (AS23) et 57% (AN12). Conjointement, le gain pour les souches qui ont nodulé est de 795% (AD11) et 57% (AN19).

D'après Viçosi *et al.* (2020), la nodulation n'influence pas les caractéristiques de la partie aérienne et le système racinaire de la plante, qui est justifiée par une absence de corrélation significative du nombre de nodules avec ces variables.

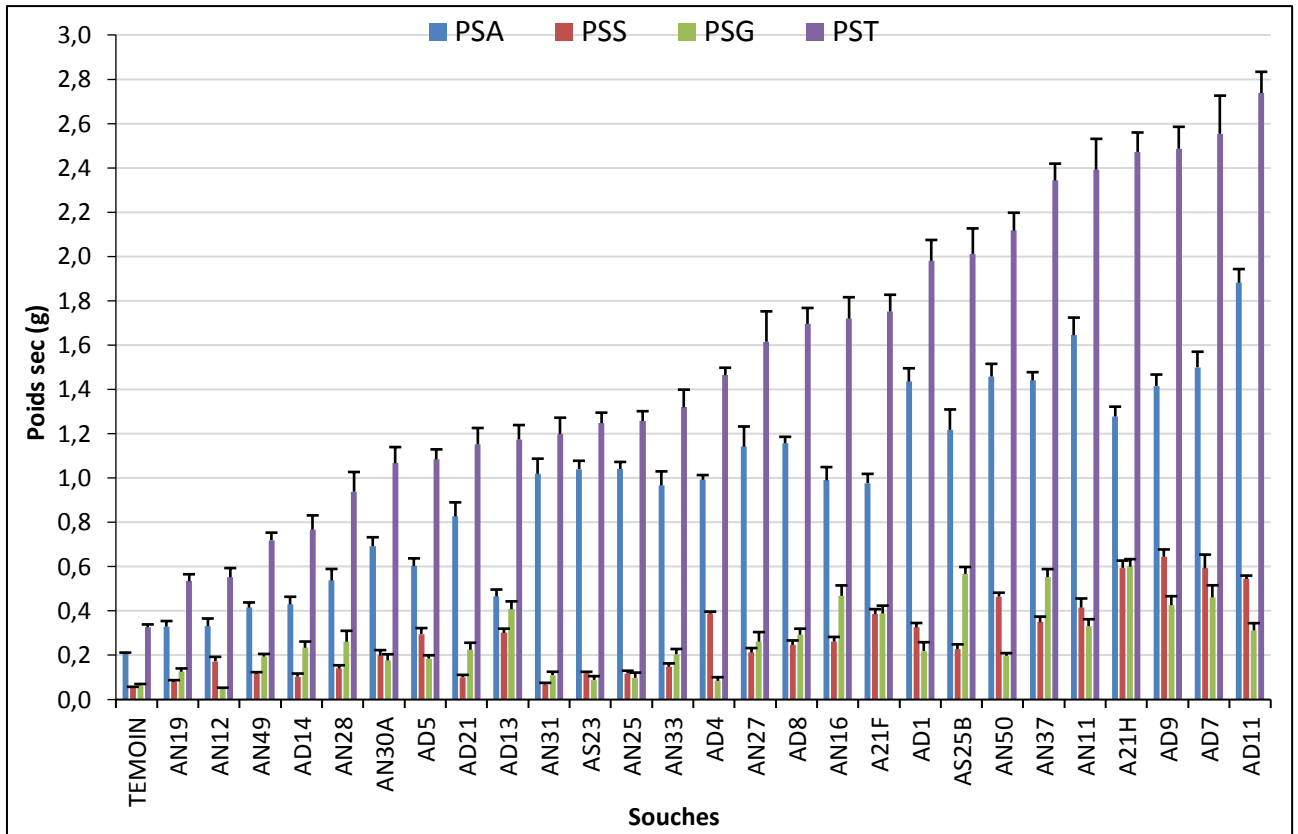
D'après la figure 38, un effet très améliorateur et significatif de la biomasse souterraine racinaire a été observé chez le groupe de souches qui a nodulé *P. vulgaris* à savoir. SN21, SN8, SN23, SN4, SN33 et SN36 avec les valeurs respectives de 817%, 383%, 317%, 300%, 283% et 267%. L'amélioration de cette biomasse pour le reste des souches varie entre 100% (SN2, SN40 et SN9) et 17% (SN20 et SN10) (Figure 38). D'autre part, les mêmes souches nodulantes (SN6, SN31 et SN30) qui n'ont pas eu un effet sur la biomasse aérienne, n'ont pas eu un effet sur la biomasse racinaire ; à l'exception de la souche SN34 qui a enregistré 33% de gain de biomasse sèche (Figure 38).

Les souches non nodulantes ont également marqué un gain de biomasse sèche racinaire, enregistrant une hausse de 267% (SN1 et SN14), 233% (SN15) et 17% (SN16) (Figure 38).

Chez le second groupe des souches qui ont absorbé le rouge Congo, l'inoculation apporte un effet significatif ( $P < 0.0001$ ) avec les souches nodulantes ou non nodulantes sur la biomasse souterraine de *P. vulgaris* var. *djedida*. D'après la figure 39, la souche AD9 a donné un gain très important allant jusqu'à 967% suivi des deux souches A21H et AD7 avec un gain de 883%, AD11 (800%), AN50 (667%) et ceci comparativement au témoin. Le gain le plus faible en biomasse souterraine sèche a été enregistré avec la souche AN31 avec seulement 17% (Figure 39).

D'après la figure 38 et 39, On constate que l'effet inoculum avec le groupe des bactéries absorbant le rouge Congo donne un effet améliorateur plus important que ceux qui ne l'ont pas absorbé. Selon une étude faite par Sofi *et al.* (2017), l'inoculation rhizobienne de *P. vulgaris* provoque une forte augmentation de la biomasse des parties aériennes suivie du volume et de la biomasse racinaires. L'effet bénéfique de l'inoculation sur ces mêmes paramètres a été signalé chez d'autres légumineuses comme le soja (Gebrehana et Dagnaw, 2020), le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) (Khaitov *et al.* 2020), les petits pois (*Pisum sativum*) (Ranjbar Sistani *et al.* 2020),

ou encore chez des légumineuses non alimentaires comme *Robinia pseudoacacia* (Sun *et al.*, 2020) et chez la légumineuse arborescente *Leucaena leucocephala* (da Silva *et al.*, 2018).



**Figure 39.** Poids sec des différentes parties des plants de *P. vulgaris* âgées de 50 jours et inoculées avec les souches qui ont absorbé le rouge Congo.

L'effet de l'inoculation **sur le poids sec des gousses** a été également significatif ( $P < 0.0001$ ) pour le groupe n'ayant pas absorber le colorant. En effet, une amélioration très considérable par rapport au témoin a été apporté par les souches nodulantes à savoir SN13, SN12, SN19, SN10 et SN5 dont le gain est respectivement de 1083%, 367%, 117%, 100 et 17% (Figure 38). Au même temps, d'autres souches n'ont apporté aucune amélioration pour ce même paramètre comme SN6, SN31, SN34, SN30, SN20, SN38, SN2, SN9, SN3, SN36, SN8, SN23, SN4 et SN21 (Figure 38). Pour les souches non nodulantes, seules les souches SN14 et SN16 ont été capables d'améliorer le poids sec des gousses avec 167% et 33%, respectivement.

D'après la figure 39 et les résultats de l'ANOVA, les souches ayant absorber le rouge Congo, qu'elles soient nodulantes ou pas, n'ont eu aucun effet significatif ( $P > 0.05$ ) sur la biomasse sèche des gousses. Récemment, Aserse *et al.* (2020) ont rapporté que l'inoculation du soja (*Glycine max*) et du haricot (*P. vulgaris*) avec des souches rhizobiennes sélectionnées a pu augmenter considérablement le poids sec des parties aériennes, la biomasse et le rendement en grains constamment plus élevés ou comparables par rapport à l'azote chimique.

Dans l'étude du dernier paramètre, la biomasse de la plante entière a été significativement ( $P < 0.0001$ ) influencé par les souches du premier groupe où la majorité des souches ont offert une amélioration significative allant de 230% (SN17) à 6% (SN20) (Figure 38). Pour le second groupe de souches, la biomasse sèche de la plante entière a été également influencé en enregistrant un gain de masse allant de 730% (AD11) à 61% (AN19) (Figure 39). On peut déduire de ces résultats que le gain le plus important est obtenu par le second groupe.

Les résultats de Fallahi et Sharifi (2020) indiquent que l'inoculation de *P. vulgaris* avec *Rhizobium phaseoli* a amélioré la croissance, la productivité et la qualité des plantes.

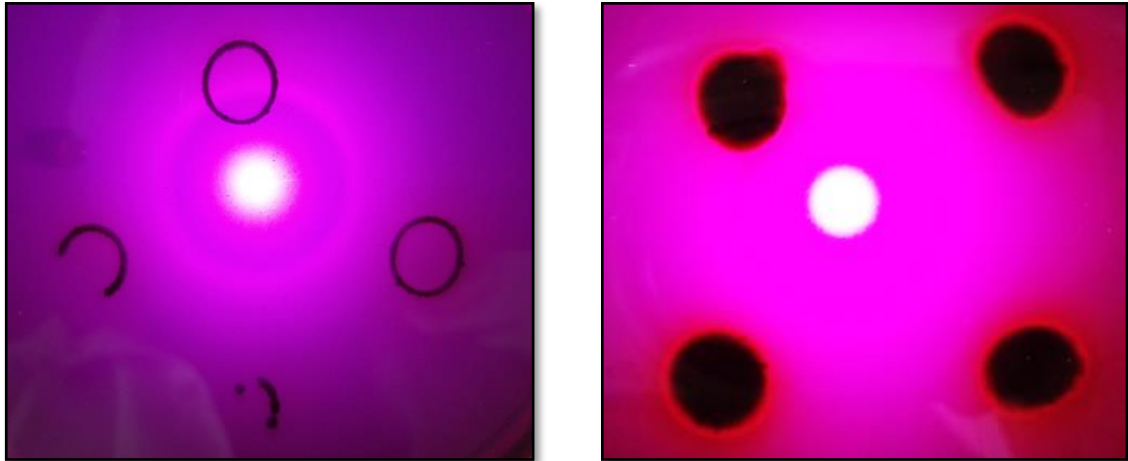
Concha et Doerner (2020) concluent que ces rapports montrent que les symbioses rhizobiums-légumineuses, tout en ayant généralement un impact positif, par exemple sur la masse racinaire, la longueur et/ou la surface, dépendent également de la symbiose spécifique (variété végétale et souche rhizobienne) ainsi que de l'environnement du sol.

Pour les paramètres étudiés précédemment, la discussion a concerné beaucoup plus les souches bactériennes qui ont pu noduler le haricot. Cependant, des effets aussi positifs sur la croissance aérienne et racinaire ont été obtenus par des souches non nodulantes. Ces dernières ont été décrites par plusieurs auteurs comme bactérie à effet PGPR. En effet, Egamberdieva (2011) a observé que *Pseudomonas extremorientalis* et *P. chlororaphis* ont pu améliorer la longueur des racines et/ou des pousses chez *P. vulgaris* par rapport aux plantes non traitées. De même, Bechtaoui *et al.* (2020) ont obtenu des souches qui possédaient plusieurs traits PGPR tels que la capacité de fixation de l'azote et qui ont été identifiées comme *Rahnella aquatilis* (PGP30) et *Pseudomonas brassicacearum* (PGP291).

### 3.3 Solubilisation du phosphore

La capacité des différentes bactéries isolées à partir de *P. vulgaris* var. *djedida* et *Nelson* à solubiliser le phosphate inorganique a été étudiée sur milieu PVK solide en calculant l'efficacité de cette solubilisation par mesure de différent diamètre des halos autour des colonies.

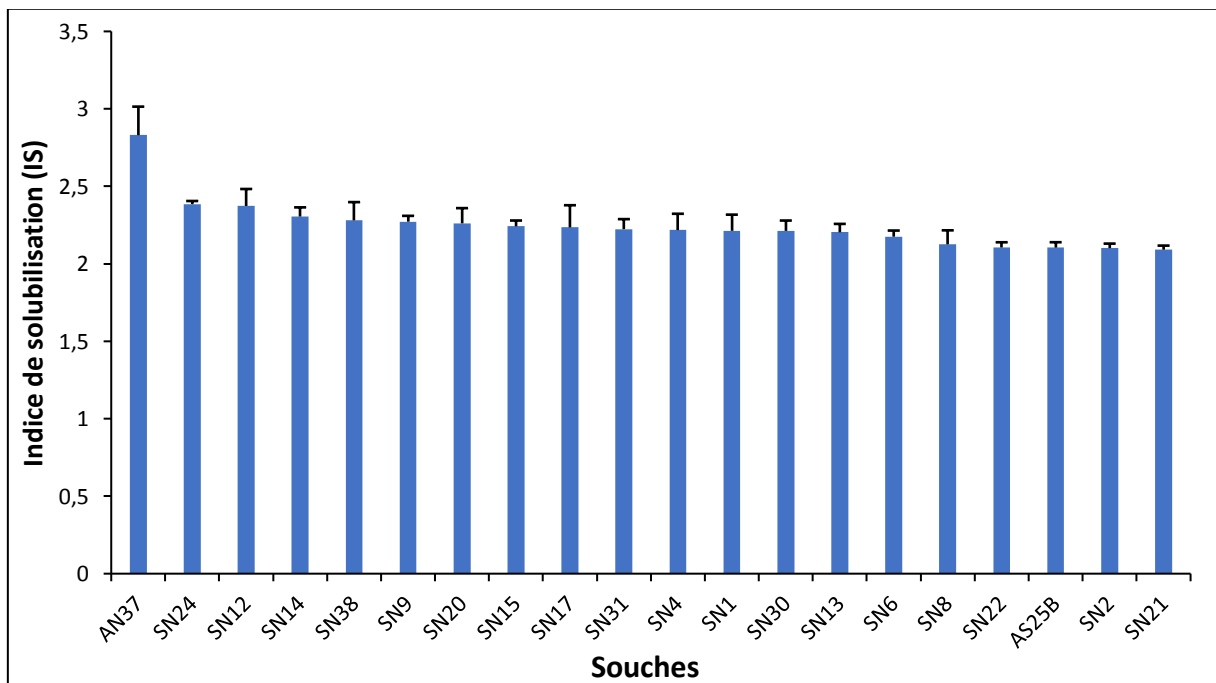
Différentes valeurs de l'efficacité de solubilisation du phosphate tricalcique ont été enregistrées sur le tableau 16 et le tableau 17. Ainsi, en utilisant le milieu PVK solide (Pikovskaya, 1948) additionnée de bleu de bromophénol (BBP) comme indicateur coloré de pH (Krishnaraj 1996), un virage de la couleur du violet au jaune indique une production importante des acides dans le milieu (Figure 41) et donc une solubilisation du phosphore (Johnston 1952 ; Das 1963 ; Sethi et Subba Rao 1968 ; Pareek et Gaur 1973 ; Kundu et Gaur 1981 ; Kapoor *et al.* 1989 ; Halder *et al.* 1990 ; Singal *et al.* 1991 ; Yadav et Dadarwal 1997).



**Figure 40.** Test qualitatif de solubilisation du phosphore sur milieu PVK solide.  
 (A) Souche AS23 avec absence de solubilisation du phosphore.  
 (B) Souche SN3 avec solubilisation du phosphore en créant un halo jaune.

Chez les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo, seules les souches SN1, SN14, SN15, SN38, SN13, SN21, SN24, SN9, SN17, SN6, SN31, SN8, SN4, SN2, SN20 et SN12, qui ont la capacité de solubiliser le phosphore (Tableau 16) avec une variation du diamètre de l'halo.

Chez les souches qui ont absorbé le rouge Congo, il y a seulement deux souches qui ont eu le pouvoir de solubiliser le phosphore qui sont : AN37 et AS25B (Tableau 17).



**Figure 41.** Indice de solubilisation (IS) du phosphore de toutes les souches isolées à partir des nodules de *P. vulgaris* (Djedida et Nelson).

Chez les deux groupes de bactéries, l'indice de solubilisation (IS) le plus important a été obtenu par la souche AN37 avec une valeur de 2.83 (Figure 41), tandis que l'IS des autres souches a oscillé entre 2.38 et 2.07 (Figure 41).

Les bactéries du sol qui ont été signalées comme solubilisant le phosphore (BSP) incluent, sans s'y limiter, les organismes des genres suivants : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Duganella*, *Pseudoduganella*, *Variovorax*, *Kushneria*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Bradyrhizobium*, *Salmonella*, *Sinomonas* et *Thiobacillus* (Vessey, 2003; Gray et Smith, 2005; Dimkpa *et al.*, 2009; Etesami et Adl, 2020).

Ainsi l'inoculation avec des bactérie solubilisant le phosphore comme *Bacillus megaterium* et *Bacillus cereus* peut augmenter la croissance des plantes de *P. vulgaris*, l'absorption de phosphate et les pigments photosynthétiques même sous des conditions de stress salin (Abdelmoteleb et Gonzalez-Mendoza, 2020). D'après Li *et al.* (2020) les BSP améliorent généralement l'absorption du phosphore disponible dans le sol et de la plante, et stimulent considérablement la fixation biologique de l'azote dans la rhizosphère, et que la co- inoculation des BSP avec rhizobium contribuera à l'amélioration de la nodulation, fixation de l'azote et la teneur en macronutriments du trèfle blanc (*Trifolium repens*) sous des conditions de carence en P (Matse *et al.*, 2020).

### 3.4 Résumé des résultats

Le tableau 16 et le tableau 17 ci-dessous résume le résultat de solubilisation du phosphore des souches qui ont absorbé et les souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo ainsi que le test de nodulation. A travers les deux tableaux, on constate que certaines souches sont solubilisatrices de phosphore mais non nodulantes comme les souches SN1, SN14 et SN15, Tandis que les souches SN16, AD21, AD4, AN12 et AS23 ne sont ni nodulantes ni solubilisatrices de phosphore (Tableau 16).

D'autres souches possèdent les deux facultés, celles de déclencher la nodulation et la solubilisation du phosphore comme les souches SN38, SN13, SN30, SN21, SN24, SN9, SN17, SN6, SN31, SN8, SN4, SN2, SN20, SN22, SN12, AN37 et AS25B (Tableau 16). Des souches avec ces mêmes facultés (nodulation + solubilisation P) ont été obtenu par Stephane *et al.* (2020) isolés à partir des nodules de *P. vulgaris*. Hamane *et al.* (2020) ont également isolé des souches aussi performantes à partir des nodules de la légumineuse herbacée *Hedysarum pallidum*.

En dernier, des souches nodulantes mais avec une activité négative de solubiliser le phosphore ont été identifiées telles que les souches SN3, SN5, SN23, SN19, SN10, SN36, SN34, SD10, SN40, SN33, AN50, AN31, AN25, AD11, AN49, AD9, AD1, AD5, AN19, AN11, AD14, AN28, AN33, AD8, AN30A, AD7, A21F, AN27, AN16, A21H et AD13 (Tableau 16, Tableau 17).

**Tableau 16.** Résumé du test de nodulation et de solubilisation du phosphore des souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo.

Souches qui n'ont pas absorbé le rouge Congo	Test de nodulation	Test de solubilisation du phosphore
SN1	-	+
SN14	-	+
SN15	-	+
SN16	-	-
SN3	+	-
SN38	+	+
SN13	+	+
SN30	+	+
SN21	+	+
SN24	+	+
SN9	+	+
SN17	+	+
SN6	+	+
SN31	+	+
SN5	+	-
SN8	+	+
SN23	+	-
SN19	+	-
SN10	+	-
SN4	+	+
SN36	+	-
SN2	+	+
SN20	+	+
SN34	+	-
SD10	+	-
SN22	+	+
SN40	+	-
SN12	+	+
SN33	+	-

**Tableau 17.** Résumé du test de nodulation et de solubilisation du phosphore des souches qui ont absorbé le rouge Congo.

Souches qui ont absorbé le rouge Congo	Test de nodulation	Test de Solubilisation du phosphore
AD21	-	-
AD4	-	-
AN12	-	-
AS23	-	-
AN50	+	-
AN31	+	-
AN25	+	-
AN37	+	+
AD11	+	-
AN49	+	-
AD9	+	-
AD1	+	-
AD5	+	-
AN19	+	-
AS25B	+	+
AN11	+	-
AD14	+	-
AN28	+	-
AN33	+	-
AD8	+	-
AN30A	+	-
AD7	+	-
A21F	+	-
AN27	+	-
AN16	+	-
A21H	+	-
AD13	+	-

## 4 Conclusion

En raison du coût élevé des engrais chimiques et des effets environnementaux négatifs, l'utilisation de rhizobiums et les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR) est une technique prometteuse pour assurer une agriculture durable. Notre objectif était de sélectionner des souches de rhizobium isolées à partir de nodules de plantes *P. vulgaris*. Au total, 56 bactéries ont été isolées (dont 27 étaient capables d'absorbé le rouge Congo et 29 qui n'ont pas absorbé) mais seulement 48 isolats qui ont pu induire une nodulation racinaire dont le nombre et l'effet est variable d'une souche à une autre sur la croissance de *P. vulgaris var. djedida*.

Parmi les souches les plus efficaces dans le groupe qui n'ont pas absorbées le rouge Congo, les trois souches sélectionnées sont : SN17, SN13, SN21 (en se basant uniquement sur le poids sec de la plante entière), avec un gain respectif de 230%, 221%,154% par rapport au témoin). Et ceci, même si elles ne marquent pas un nombre important de nodules racinaires (nombre égale respectivement à 9, 5 et 6 nodules/plante). Cependant, les souches SN12, SN33 et SN40 ont enregistré un gain respectif de 113%, 67% et 18%, avec un nombre de nodule respectif de 24, 25 et 23 nodules/plante. Du point de vue du rendement en gousse, les souches sélectionnées sont : SN13, SN12 et SN19, avec un nombre de nodule égale à 5, 24 et 12 nodules/plante.

Dans le second groupe, les trois souches élues selon le poids sec de la plante entière sont : AD11, AD7 et AD9 avec un gain respectif de 730%, 673% et 654% avec un nombre de nodules très réduit par rapport au premier groupe dont le nombre est égale à 0.89, 5.13, et 1.56, nodules/plante. Par contre, aucun effet significatif n'a été enregistré pour le poids sec des gousses.

L'évaluation pour l'activités PGP *in vitro* pour solubiliser le phosphate tricalcique (TCP), sur la base du diamètre des halos de solubilisation, un nombre de 20 souches se sont avérées capables de solubiliser le phosphate mais seulement 17 souches sont nodulantes. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour dévoiler la présence d'autres activités PGPR pour être utilisés comme biofertilisants efficaces pour une culture de haricot saine et productive.



CONCLUSION

**CONCLUSION**

GENERALE

**GENERALE**

## Conclusion générale et perspectives

Les légumineuses sont une entreprise rentable en raison de leur remarquable propriété de fixation de l'azote atmosphérique et de leur capacité à réduire les effets des maladies, des ravageurs et de l'infertilité des sols lorsqu'ils sont utilisés en rotation avec les cultures. Ce patrimoine est dû à leur relation symbiotique avec les rhizobactéries du sol fixateur d'azote. Ce pendant la relation entre les deux partenaires est soumise à des facteurs biotiques (pathogènes, les génotypes des plantes hôtes et les souches rhizobiennes,...) et abiotiques (températures, salinité, produits chimiques,..) qui peuvent entraver cette relation. Dans ce contexte la sélection des deux partenaires est inévitable afin de contrer les conditions de stress/environnements.

Donc le premier objectif était d'abord, la sélection de la légumineuse alimentaire et le second est l'isolement de bactérie à effet PGPR. A cette effet la sélection de l'espèce légumineuse alimentaire s'est basé sur la germination (l'étape cruciale et initiale) sous stress salin (eau de mer) de trois légumineuses alimentaires : le petit pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*) et le haricot commun (*Phaseolus vulgaris L.*).

L'étude portée sur l'irrigation avec l'eau de mer à différentes dilutions a montré que ce dernier affecte la germination et la croissance des plantules de *P. sativum*, *C. arietinum* et *P. vulgaris* à des concentrations de 10 et 30%. La diminution de la teneur en humidité commence à partir de 30% de la solution d'eau de mer par rapport au témoin chez les plantules de *P. sativum* et *C. arietinum* sauf pour *P. vulgaris*. Ainsi, à ces niveaux, les eaux souterraines côtières ne peuvent pas être aussi nocives pour l'établissement de ces espèces. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires pour évaluer l'effet de l'irrigation par l'eau salée sur le rendement, la production agricole ainsi que sur la nodulation de ces trois espèces de légumineuses. À partir des paramètres estimés de cette étude et une synthèse bibliographique très intéressante, nous avons validé le haricot commun *P. vulgaris* comme matériel végétal d'étude.

Dans la seconde expérimentation, nous avons étudiés l'effet de cinq sels (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub> et KCl) les plus dominants dans le sol sur la germination et l'émergence des plantules de *P. vulgaris* var. *djedida*. À travers cette étude, le stress salin a diminué la germination des graines et la longueur des plantules au début de la croissance. Comme les résultats l'ont démontré, les effets inhibiteurs des cinq types de sel étudiés dans la phase de germination du haricot commun diffèrent considérablement, en particulier dans le cas de NaCl, CaCl<sub>2</sub> et Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les effets inhibiteurs de ces sels sur le haricot commun étaient très forts, comparés à ceux du CaCO<sub>3</sub> et du KCl. Ces comportements différentiels des graines

de *P. vulgaris* var. *djedida* selon les types de sel sont probablement dues au fait que la même concentration de sel génère des potentiels osmotiques différents et l'effet osmotique peut avoir une plus grande influence sur la germination.

Ces résultats nous ont permis de connaître le comportement des semences avant de passer au champ et pour ne pas se vouer à l'échec car une plante devant un stress biotique ou abiotique comme le plus courant la salinité ne peut subvenir aux besoins d'une éventuelle symbiose (rhizobienne, mycorhizienne,...), car cette dernière nécessite beaucoup d'énergie.

Le passage au champ de *P. vulgaris* var. *djedida* a été de faire face aux facteurs qui pouvaient influencer ses relations mutualistes avec les microorganismes du sol. Parmi ces facteurs, les facteurs abiotiques : la température, la salinité, la présence de fertilisant chimique... et les facteurs biotiques tels que : les pucerons, les nématodes ou encore la compatibilité de la variété avec les souches autochtones. Le résultat de cette confrontation de *P. vulgaris* var. *djedida in vivo* dans un sol salin (teneur élevée en  $\text{CaCO}_3$ ), pauvre en matière organique mais suffisamment riche en phosphore assimilable et pour finir en présence et en absence de l'azote chimique, a révélé un dynamisme important de certains microorganismes associés à *P. vulgaris* L. var. *djedida*.

Lors de l'étude de l'effet de fertilisant chimique sur la nodulation et la mycorhization chez de *P. vulgaris* L. var. *djedida*, cette dernière a présenté une importante mycorhization. Effectivement, l'ajout de l'urée 46% ajouté avant la floraison a eu un effet significatif sur l'intensité arbusculaire (a%, A%) et sur la colonisation mycorhizienne (M%, m%) des racines malgré les contraintes environnementales. Ceci pourrait constituer un inoculum efficace pour les autres plantes contre certain facteurs biotiques et abiotiques.

Quant à l'enquête nodulaire, la variété *Djedida* n'a presque pas nodulé, ce qui a suscité plusieurs hypothèses incriminant le facteur biotique comme la variété. Cette hypothèse nous a conduit à un second essai *in vivo* afin de mieux comprendre si l'absence de cette nodosité n'est pas liée à la compatibilité/sélection variétale. Ce deuxième essai au champ a visé trois variétés de haricot les plus cultivées en Algérie à savoir *Nelson*, *Djedida* et *Jalila*. Dans ce même concept, nous avons également testés l'effet du fertilisant azoté chimique de (Urée granulée 46%) (ajout avant et après la floraison) sur la croissance et la nodulation de ces trois variétés. Les résultats obtenus concernant le rendement ont été un gain significatif ne dépassant pas une moyenne de 20% par rapport au témoin. La biomasse sèche des plantes a été également influencée aux stades de floraison et de fructification pour les trois variétés étudiées. Le nombre de nodule chez les plantes non fertilisées a été augmenté de 253%, 325% et 338%, respectivement chez *Nelson*, *Djedida* et *Jalila* par rapport aux valeurs enregistrées

chez les plantes fertilisées pour ces mêmes variétés. Cette expérimentation nous a permis de constater par rapport à la première expérimentation, que la variété *Djedida* a pu noduler et qu'il n'y avait pas un problème de compatibilité entre les souches rhizobiennes autochtones et la variété mais plus tôt dans la teneur en azote totale du sol. En effet, dans le premier essai, le sol en contenait 0.17% et le sol du second essai n'en contenait que 0.11%. La richesse du sol en azote est l'un des facteurs limitant la symbiose rhizobienne.

Dans le dernier chapitre qui visait l'étude des rhizobiums et les bactéries à effet PGPR associés et isolées à partir des nodules récoltés *in vivo* des racines de *P. vulgaris* var. *Djedida* et également la variété *Nelson*, a révélé que la variété *Djedida* est apte à noduler avec les rhizobiums isolés des nodules de la variété *Nelson* et que la nodulation nécessitait des conditions plus contrôlées.

En plus de la capacité de fixer l'azote atmosphérique, ces mêmes rhizobiums ont démontré des capacités très intéressantes celle de la solubilisation du phosphore. Cette aptitude représente une source de fertilisation naturel qui mérite d'être caractériser et exploiter pour une production d'inoculum à très grande échelle afin de limiter l'utilisation d'engrais chimiques qui sont non durable en raison des coûts élevés et des préoccupantes néfaste vis à vis de l'environnement surtout pour le réchauffement climatique, la pollution et la sécurité alimentaire.

A cet effet les perspectives de ce travail sont :

- Sélection des meilleures souches fixatrices d'azote sous conditions contrôlées et identification moléculaire de ces derniers.
- Identification de la meilleure combinaison entre les différents microorganismes symbiotiques (rhizobium-mycorhize-bactérie à effet PGPR) pour une meilleure nodulation et une meilleure tolérance aux facteurs abiotiques et biotiques qui peuvent perturber le rendement du haricot
- Révélation et étude des gènes de nodulation et de fixation pour des applications biotechnologiques (formulation d'inocula à haut potentiel).

REFERENCES  
REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

- Abd El-Rahman, A. F., Shaheen, H. A., Abd El-Aziz, R. M., & Ibrahim, D. S. (2019).** Influence of hydrogen cyanide-producing rhizobacteria in controlling the crown gall and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 41.
- Abdelmoteleb, A., & Gonzalez-Mendoza, D. (2020).** Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing *Bacillus spp.* from *Tamarix ramosissima* Rhizosphere and Their Effect on Growth of *Phaseolus vulgaris* Under Salinity Stress. *Geomicrobiology Journal*, 1-8.
- Adams, M. V., Coyne, D. P., Davis, J. H. C., Graham P. H., & Francis, C. A. (1985).** Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Summerfield RJ, Roberts EH ed. Grain legume crops. London, Collins. Pp. 433-476.
- Adda, A., Regagba, Z., Latigui, A. & Merah, O. (2014).** Effect of salt stress on  $\alpha$ -amylase activity, sugars mobilization and osmotic potential of *Phaseolus vulgaris* L. seeds var. 'Cocorose' and 'Djadida' during germination. *J. Biol. Sci.*, 14(5), 370-375.
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., & Kloepper, J. W. (2010).** Increased plant uptake of nitrogen from 15N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*, 46(1), 54-58.
- Adnane, B. A. R. G. A. Z. (2012).** Caractérisation agrophysiologique et biochimique de symbioses Haricot (*Phaseolus vulgaris*)-Rhizobia performantes pour la fixation symbiotique de l'azote sous déficit en phosphore.
- Afkhami, M. E., Almeida, B. K., Hernandez, D. J., Kiewewetter, K. N., & Revillini, D. P. (2020).** Tripartite mutualisms as models for understanding plant-microbial interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 28-36.
- Ahemad, M., & Khan, M. S. (2013).** Pesticides as antagonists of rhizobia and the legume-Rhizobium symbiosis: a paradigmatic and mechanistic outlook. *Biochem. Mole. Biol.*, 1, 63-75.
- Ait Allouache, K. (2020).** <http://www.elmoudjahid.com/fr/actualites/119179> accès le 25.03.2020.
- Akhter, J., Mahmood, K., Malik, K. A., Mardan, A., Ahmad, M., & Iqbal, M. M. (2004).** Effects of hydrogel amendment on water storage of sandy loam and loam soils and seedling growth of barley, wheat and chickpea. *Plant Soil Environ.*, 50(10), 463-469.
- Alkama N. (2010).** Adaptation de la symbiose rhizobienne chez le haricot à la déficience en phosphore: détermination de la réponse de la plante en terme d'échanges gazeux et de flux minéraux échangés avec la rhizosphère (Doctoral dissertation, Montpellier, SupAgro), France, 180 p.
- Alkama, N., Ounane, G., & Drevon, J. J. (2012).** Is genotypic variation of H<sup>+</sup> efflux under P deficiency linked with nodulated-root respiration of N<sub>2</sub>-Fixing common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.)?. *Journal of plant physiology*, 169(11), 1084-1089.
- Allen, D. J. (1996).** Ravageurs, maladies et carences nutritives du haricot commun en Afrique : Guide Pratique (Vol. 265). CIAT.
- Al-Quraan, N. A., Al-Sharbati, M., Dababneh, Y., & Al-Olabi, M. (2014).** Effect of temperature, salt and osmotic stresses on seed germination and chlorophyll contents in lentil (*Lens culinaris* Medik). *Acta horticulturae*, 1054, 47-54.
- Amarger, N., Macheret, V., & Laguerre, G. (1997).** *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 996-1006
- Amin, M. S., Metwally, H. G., Elshinawy, M. Z., & Abdallah, M. F. (2020).** Effect of seaweed extract and biofertilizer on organic production of common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, (Articles in Press).
- Anderson, A., Baldock, J.A., Rogers, S.L., Bellotti, W. & Gill, G. (2004).** Influence of chlorsulfuron on rhizobial growth, nodule formation, and nitrogen fixation with chickpea. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55(10), 1059-1070.
- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017).** Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 705.
- Argaw, A., Mekonnen, E., & Muleta, D. (2015).** Agronomic efficiency of N of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in some representative soils of Eastern Ethiopia. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1074790.
- Ariyaratna, R. A. I. S., Weerasena, S. L., & Beneragama, C. K. (2020).** Quality Deterioration of Commercial Bean (*Phaseolus vulgaris*) Seeds Stored under Contrasting Environmental

- Conditions in Sri Lanka. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 8(1), 33-44.
- Arora, N. K., Kang, S. C., & Maheshwari, D. K. (2001).** Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 673-677.
- Arslan H. 2013.** Application of multivariate statistical techniques in the assessment of groundwater quality in seawater intrusion area in Bafra Plain, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(3), 2439-2452.
- Arteaga, S., Yabor, L., Díez, M. J., Prohens, J., Boscaiu, M., & Vicente, O. (2020).** The Use of Proline in Screening for Tolerance to Drought and Salinity in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes. *Agronomy*, 10(6), 817.
- Aserse, A. A., Markos, D., Getachew, G., Yli-Halla, M., & Lindström, K. (2020).** Rhizobial inoculation improves drought tolerance, biomass and grain yields of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soybean (*Glycine max* L.) at Halaba and Boricha in Southern Ethiopia. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 66(4), 488-501.
- Aserse, A. A., Woyke, T., Kyripides, N. C., Whitman, W. B., & Lindström, K. (2017).** Draft genome sequence of type strain HBR26 T and description of *Rhizobium aethiopicum* sp. nov. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1), 14.
- Aubert, C. (2018).** Les engrais azotés, providence devenue poison. *Le Monde diplomatique*, (12), 18-18.
- Avadhanam, N. (2020).** Control of Iron Regulation and Uptake by the ExpR/Sin Quorum Sensing System in *Sinorhizobium meliloti* (Doctoral dissertation).
- Azcón, R., & Al-Atrash F. (1997).** Influence of arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilisation on growth, nodulation and N<sub>2</sub> fixation [15N] in *Medicago sativa* and four salinity levels, *Biol. Fert. Soils*, 24, 81–86.
- Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (1992).** Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process. Chapman and Hall, New York, 163-198.
- Azeez, H. H., Mansour, H. H., & Ahmad, S. T. (2020).** Effect of Using Chemical Fertilizers on Natural Radioactivity Levels in Agricultural Soil in the Iraqi Kurdistan Region. *Polish Journal of Environmental Studies*, 29(2).
- Bâ, A.M., Dalpé Y., & Guissou T. (1996).** Les Glomales d'*Acacia holosericea* et d'*Acacia mangium*. *Bois & Forêts des Tropiques*, 250, 5-18.
- Bååth, E., & Spokes, J. (1989).** The effect of added nitrogen and phosphorus on mycorrhizal growth response and infection in *Allium schoenoprasum*. *Canadian Journal of Botany*, 67(11), 3227-3232.
- Baez-Gonzalez, A. D., Fajardo-Díaz, R., Garcia-Romero, G., Osuna-Ceja, E., Kiniry, J. R., & Meki, M. N. (2020).** High Sowing Densities in Rainfed Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Mexican Semi-Arid Highlands under Future Climate Change. *Agronomy*, 10(3), 442.
- Bagayoko, M., Buerkert, A., Lung, G., Bationo, A., & Römheld, V. (2000).** Cereal/legume rotation effects on cereal growth in Sudano-Sahelian West Africa: soil mineral nitrogen, mycorrhizae and nematodes. *Plant and Soil*, 218(1-2), 103-116.
- Bago B., Azcón-Aguilar C., Goulet A., & Piché Y. (1998):** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *The New Phytologist*, 139(2), 375-388.
- Bailey, L.H. (1975).** Manual of Cultivated Plants, 15th ed., Macmillan Publishing Co., New York.
- Baptista, A., Pinho, O., Pinto, E., Casal, S., Mota, C., & Ferreira, I.M. (2017).** Characterization of protein and fat composition of seeds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and bambara groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verdc) from Mozambique. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2): 442-450.
- Barbosa, N., Portilla, E., Buendia, H. F., Raatz, B., Beebe, S., & Rao. I. (2018).** Genotypic differences in symbiotic nitrogen fixation ability and seed yield of climbing bean. *Plant and Soil* 428 (1–2):223–39.
- Barker, K. R., & Hussey, R. S. (1976).** Histopathology of nodular tissues of legumes infected with certain nematodes. *Phytopathology*, 66, 851–855.



- Basu, S., & Kumar, G. (2020).** Nitrogen Fixation in a Legume-Rhizobium Symbiosis: The Roots of a Success Story. In *Plant Microbe Symbiosis* (pp. 35-53). Springer, Cham.
- Bathellier, C., Badeck, F. W., Couzi, P., Harscoët, S., Mauve, C., & Ghashghaie, J. (2008).** Divergence in  $\delta^{13}\text{C}$  of dark respired  $\text{CO}_2$  and bulk organic matter occurs during the transition between heterotrophy and autotrophy in *Phaseolus vulgaris* plants. *New Phytologist*, 177(2), 406-418.
- Bawa, A. (2020).** Yield Response of Cowpea to Phosphorus Fertilizer Application. *Journal of Experimental Agriculture International*, 125-135.
- Bayuelo-Jiménez, J.S., Debouck, D.G., & Lynch, J.P. (2002).** Salinity tolerance of *Phaseolus* species during early vegetative growth. *Crop Sci.*, 42(6), 2184-2192.
- Bayuelo-Jiménez, J. S., Debouck, D. G., & Lynch, J. P. (2003).** Growth, gas exchange, water relations, and ion composition of *Phaseolus* species grown under saline conditions. *Field Crops Research*, 80(3), 207-222.
- Bechtaoui, N., Raklami, A., Benidire, L., Tahiri, A. I., Göttfert, M., & Oufdou, K. (2020).** Effects of PGPR co-inoculation on growth, phosphorus nutrition and phosphatase/phytase activities of faba bean under different phosphorus availability conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, 29(2), 1557-1565.
- Beebe, S., Rao, I., Blair, M., & Acosta, J. (2013).** Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in physiology*, 4, 35.
- Beltagi, M. S., Ismail, M. A., & Mohamed, F.H. (2006).** Induced salt tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by gamma irradiation. *Pak. J. Biol. Sci.*, 9(6), 1143-1148.
- Benezech, C., Berrabah, F., Jardinaud, M. F., Le Scornet, A., Milhes, M., Jiang, G., ... & Gourion, B. (2020).** *Medicago-Sinorhizobium-Ralstonia* Co-infection Reveals Legume Nodules as Pathogen Confined Infection Sites Developing Weak Defenses. *Current Biology*, 30(2), 351-358.
- Bernstein, L., & Hayward, H. E. (1958).** Physiology of salt tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 9(1): 25-46.
- Bevilaqua, G. A. P., & Antunes, I. F. (2015).** Chemical composition of whole grains in common beans landraces and breeding genotypes. *Holos*, 2, 81-91.
- Bewley, J. D., & Black, M. (1985).** Seeds. In: *Seeds, Germination, Structure, and Composition*, pp. 1-27. Springer, Boston, MA.
- Bewley, J. D. & Black, M. (2012).** Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: Vol. 2: Viability, dormancy, and environmental control. Springer Science & Business Media.
- Bezdicsek, D. F., Mulford, R. F., & Magee, B. H. (1974).** Influence of organic nitrogen on soil nitrogen, nodulation, nitrogen fixation, and yield of soybeans. *Soil Science Society of America Journal*, 38(2), 268-273.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Biswas, S., Banerjee, A., Acharyya, P., & Chakraborty, N. (2020).** Response of French Bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Arka Arjun) to Rhizobium Inoculation under Varied Levels of Nitrogen and Molybdenum. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(3), 2759-2767.
- Blair, M. W. (2013).** Mineral biofortification strategies for food staples: the example of common bean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(35), 8287-8294.
- Blair, M.W., Astudillo, C., Grusak, M.A., Graham, R., & Beebe, S.E. (2009).** Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding*, 23(2), 197-207.
- Bliss, F. A. (1993).** Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. *Plant and Soil*, 152(1), 71-79.
- Bokhorst, S., Kardol, P., Bellingham, P.J., Kooyman, R.M., Richardson, S.J., Schmidt, S., & Wardle, D.A. (2017).** Responses of communities of soil organisms and plants to soil aging at two contrasting long-term chronosequences. *Soil Biology and Biochemistry*, 106, 69-79.
- Bordeleau, L. M., & Danielle P. (1994).** Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, 161(1), 115-125.
- Borucki, W., & Sujkowska, M. (2008).** The effects of sodium chloride-salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(3), 293-301.

- Boscaiu, M., & Fita, A. (2020).** Physiological and Molecular Characterization of Crop Resistance to Abiotic Stresses. *Agronomy*, 10(9), 1308.
- Bothe, H., Turnau, K., & Regvar, M. (2010).** The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in protecting endangered plants and habitats. *Mycorrhiza*, 20(7), 445-457.
- Bouchenak, M., & Lamri-Senhadji, M. (2013).** Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *Journal of medicinal food*, 16(3), 185-198.
- Boudjenouia, A., Fleury, A., & Tacherift, A. (2006).** Le statut de l'espace agricole périurbain à Sétif (Algérie) : réserve foncière ou projet urbain ? *Cah. Etud. Rech. Fr /Agric.*, 15(2), 221-226.
- Bouzerzour, H., Abbas, K., & Benmahammed, A. (2003).** Les céréales, les légumineuses alimentaires, les plantes fourragères et pastorales. Recueil des Communications Atelier N°3 « Biodiversité Importante pour l'Agriculture » MATE-GEF/PNUD Projet ALG/97/G31.
- Bouزيد, S. & Rahmoune, C. (2012).** Enhancement of saline water for irrigation of *Phaseolus vulgaris* L. species in presence of molybdenum. *Procedia Eng.*, 33, 168-173.
- Bowen, G. D., & Rovira, A. D. (1999).** The rhizosphere and its management to improve plant growth. In *Advances in agronomy* (Vol. 66, pp. 1-102). Academic Press.
- Bradford, K. J. (1995).** Water relations in seed germination. *Seed Development and Germination*, 1(13), 351-396.
- Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., & Vanderleyden, J. (2003).** Beans (*Phaseolus spp.*)—model food legumes. *Plant and soil*, 252(1), 55-128.
- Brown, M. T. (2019).** Understanding the Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Transcriptome in Response to Salinity Stress. Doctoral dissertation, 94 p. Delaware State University.
- Bryant, R. H., Snow, V. O., Shorten, P. R., & Welten, B. G. (2020).** Can alternative forages substantially reduce N leaching? findings from a review and associated modelling. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 63(1), 3-28.
- Bulut, F., & Akinci, Ş. (2010).** The effect of salinity on growth and nutrient composition in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings. *Fresen. Environ. Bull.*, 19(12), 2901-2910.
- Bünemann, E. K., Schwenke, G. D., & Van Zwieten, L. (2006).** Impact of agricultural inputs on soil organisms—a review. *Soil Research*, 44(4), 379-406.
- Buruchara, R. A., Mukaruziga, C., & Ampofo, K. O. (2010).** Bean disease and pest identification and management. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), PABRA, Kampala, UG. viii, 67 p.. (Publications series no. 371).
- Canado, I. C., Doussinague, C., & Villena, E. (2003).** *Technicien en agriculture*. Ed. Cultural S. A. Madrid.
- Capelesso, D., da Costa, A. C. T., & Júnior, J. B. D. (2019).** Nitrogen Fertilization and Inoculation of Seeds with *Rhizobium tropici* on the Agronomic Performance of Common Beans. *Journal of Experimental Agriculture International*, 1-9.
- Carbas, B., Machado, N., Oppolzer, D., Ferreira, L., Queiroz, M., Brites, C., ... & Barros, A. I. (2020).** Nutrients, Antinutrients, Phenolic Composition, and Antioxidant Activity of Common Bean Cultivars and their Potential for Food Applications. *Antioxidants*, 9(2), 186.
- Carbas, B., Pathania, S., Castanho, A., Lourenço, D., Veiga, I. M., Patto, M. C. V., & Brites, C. (2018).** Elucidating potential utilization of Portuguese common bean varieties in rice based processed foods. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 1056-1064.
- Carranca, C. (2013).** Legumes: Properties and symbiosis. *Symbiosis: Evolution, Biology and Ecological Effects* (Eds Camisão, AH y Pedrosa, CC). Nova Science Publishers, New York, (pp. 67-94).
- Carvalho, M. S., Carias, C. M. D. O. M., Silva, M. A., da Silva Ferreira, M. F., de Souza, T. L. P. O., Posse, S. C. P., & Ferreira, A. (2020).** Genetic diversity and structure of landrace accessions, elite lineages and cultivars of common bean estimated with SSR and SNP markers. *Molecular Biology Reports*, 1-11.
- Cesar, A. I., Esther, M. G., Daniel, M., Ruben, L., Estibaliz, L., & Erena, G. Q. (2011).** Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress*, 5, 24-31.
- Ceyhan E., Kahraman A., Avci M.A., & Dalgic H. (2014):** Combining ability of bean genotypes estimated by line x tester analysis under highly-calcareous soils. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(2): 579-584.

- Chakraborty, A., Chakrabarti, K., Chakraborty, A., & Ghosh, S. (2011).** Effect of long-term fertilizers and manure application on microbial biomass and microbial activity of a tropical agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, 47(2), 227-233.
- Chambers, C.A., Smith, S.E., & Smith, F.A. (1980).** Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. *New Phytologist*, 85(1), 47-62.
- Chaux, C. L., & Foury, C. L. (1994).** Productions légumières Tome 3, 563 pp, TEC & DOC, Paris.
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009).** Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4), 551-560.
- Chen, H., & Jiang, J. G. (2010).** Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews*, 18, 309-319.
- Chen, W., Hou, Z., Wu, L., Liang, Y., & Wei, C. (2010).** Evaluating salinity distribution in soil irrigated with saline water in arid regions of northwest China. *Agricultural Water Management*, 97(12), 2001-2008.
- Chen, P. X., Zhang, H., Marcone, M. F., Pauls, K. P., Liu, R., Tang, Y., ... & Tsao, R. (2017).** Anti-inflammatory effects of phenolic-rich cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts and enhanced cellular antioxidant enzyme activities in Caco<sub>2</sub> cells. *Journal of Functional Foods*, 38, 675-685.
- Chen, Y., Gamliel, A., Stapleton, J. J., & Aviad, T. (1991).** Chemical, physical, and microbial changes. *Soil Solarization*, 103.
- Chen, Y., Zhang, H., Liu, R., Mats, L., Zhu, H., Pauls, K. P., ... & Tsao, R. (2019).** Antioxidant and anti-inflammatory polyphenols and peptides of common bean (*Phaseolus vulga* L.) milk and yogurt in Caco-2 and HT-29 cell models. *Journal of Functional Foods*, 53, 125-135.
- Cheng, A., Raai, M. N., Zain, N. A. M., Massawe, F., Singh, A., & Wan, W. A. A. Q. I. (2019).** In search of alternative proteins: unlocking the potential of underutilized tropical legumes. *Food Security*, 1-11.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J. K. (2005).** Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45(2), 437-448.
- Chmielewski, J. G. & Ruit, S. (2002).** Interrelationships Among Achene Weight, Orientation, and Germination in the Asters *Doellingeria umbellata* var. *Umbellata* var. *Symphyotrichum novae-angliae* and *S. puniceum* (Asteraceae). *Bartonia*, 15-26.
- Choze, R., Alcantara, G. B., Alves Filho, E. D. G., e Silva, L. M. A., Faria, J. C. & Lião, L. M. (2013).** Distinction between a transgenic and a conventional common bean genotype by 1H HR-MAS NMR. *Food chemistry*, 141(3), 2841-2847.
- Cokkizgin, A. (2012).** Salinity stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed germination. *Not. Bot. Horti Agrobi. Cluj-Napoca*, 40(1), 177-182.
- Collavino, M. M., Sansberro, P. A., Mroginski, L. A., & Aguilar, O. M. (2010).** Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils*, 46(7), 727-738.
- Côme, D. (1970).** Obstacles to germination. Masson et Cie. (Eds.), Paris, 162 p.
- Cominelli, E., Confalonieri, M., Carlessi, M., Cortinovis, G., Daminati, M. G., Porch, T. G., ... & Sparvoli, F. (2018).** Phytic acid transport in *Phaseolus vulgaris*: A new low phytic acid mutant in the PvMRP1 gene and study of the PvMRPs promoters in two different plant systems. *Plant Science*, 270, 1-12.
- Concha, C., & Doerner, P. (2020).** The impact of the rhizobia-legume symbiosis on host root system architecture. *Journal of Experimental Botany*, 71(13), 3902-3921.
- Cordeiro, A. B., Ribeiro, R. A., Helene, L. C. F., & Hungria, M. (2017).** *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N<sub>2</sub>-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(10), 3937-3945.
- Corre-Hellou, G., & Crozat, Y. (2005).** N<sub>2</sub> fixation and N supply in organic pea (*Pisum sativum* L.) cropping systems as affected by weeds and pea weevil (*Sitona lineatus* L.). *European Journal of Agronomy*, 22(4), 449-458.
- Cortignani, R., & Dono, G. (2020).** Greening and legume-supported crop rotations: An impacts assessment on Italian arable farms. *Science of The Total Environment*, 139464.

- Corwin, D. L.** Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas. *European Journal of Soil Science*, 1-21.
- Costa, J. P. G. D., Soares, P. L. M., Vidal, R. L., Nascimento, D. D. D., & Ferreira Junior, R.** (2019). Reaction of common bean genotypes to the reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 49.
- Costa, N.D.L., Moraes, A.D., Monteiro, A.L.G., Motta, A.C.V., Oliveira, R.A.D. & Rodrigues, A.N.A.** (2013). Forage productivity and morphogenesis of *Axonopus aureus* under different nitrogen fertilization rates. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(8): 541-548.
- CRAAQ (2003):** Guide de référence en fertilisation. 1<sup>ère</sup> édition. Chapitre 2. p. 20-29.
- Crews, T. E., & Peoples, M. B.** (2004). Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 102(3), 279-297.
- D'Odorico, P., Bhattachan, A., Davis, K. F., Ravi, S. & Runyan, C. W.** (2013). Global desertification: drivers and feedbacks. *Advances in Water Resources*, 51, 326-344.
- da Conceição Jesus, E., de Almeida Leite, R., do Amaral Bastos, R., da Silva Aragão, O. O., & Araújo, A. P.** (2018). Co-inoculation of *Bradyrhizobium* stimulates the symbiosis efficiency of *Rhizobium* with common bean. *Plant and Soil*, 425(1-2), 201-215.
- da Silva, K., Florentino, L. A., da Silva, K. B., De Brandt, E., Vandamme, P., & de Souza Moreira, F. M.** (2012). *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), 175-182.
- da Silva, L. L., Veloso, T. G., Manhães, J. H., da Silva, C. C., & de Queiroz, M. V.** (2020). The plant organs and rhizosphere determine the common bean mycobiome. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-8.
- da Silva, V. S. G., de Rosalia e Siva Santos, C. E., de Freitas, A. D. S., Stamford, N. P., da Silva, A. F., de Lyra, M. D. C. C. P., ... & da Silva Ferreira, J.** (2018). Symbiotic efficiency of native rhizobia in legume tree '*Leucaena leucocephala*' derived from several soil classes of Brazilian Northeast region. *Australian Journal of Crop Science*, 12(3), 478.
- Dall'Agnol, R. F., Ribeiro, R. A., Delamuta, J. R. M., Ormeno-Orrillo, E., Rogel, M. A., Andrade, D. S., Martínez-Romero, E., Hungria, M.** (2014). *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N<sub>2</sub>-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64,3222-3229.
- Dall'Agnol, R. F., Ribeiro, R. A., Ormeno-Orrillo, E., Rogel, M. A., Delamuta, J. R. M., Andrade, D. S., Martínez-Romero, E., Hungria, M.** (2013). *Rhizobium freirei* sp. nov.: a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 4167-4173.
- Dall'Agnol, R. F., Plotegher, F., Souza, R. C., Mendes, I. C., dos Reis Junior, F. B., Béna, G., ... & Hungria, M.** (2016). *Paraburkholderia nodosa* is the main N<sub>2</sub>-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian 'Cerradão'. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), fiw108.
- Dangeard, P. A.** (1926). Recherches sur les tubercles radicaux des Légumineuses. *Botaniste* 16:1-275
- Das, A. C.** (1963). Utilization of insoluble phosphates by soil fungi. *J. Indian Soc. Sci.*, 11, 203-207.
- Das, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K.** (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica*, 62(5), 425-435.
- Datta, B., & Chakrabarty, P. K.** (2014). Siderophore biosynthesis genes of *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietinum* L. *Biotech.*, 4(4), 391-401.
- David, S.** (1999). Beans in the Farming System and Domestic Economy of Uganda: A Tale of Two Parishes. Network on Bean Research in Africa, Occasional Publications Series, No. 28, CIAT, Kampala, Uganda.
- Day, D. A., Poole, P. S., Tyerman, S. D., & Rosendahl, L.** (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(1), 61-71.
- de Carvalho, R. H., da Conceição Jesus, E., Favero, V. O., Stralio, R., & Araújo, A. P.** (2020). The Co-inoculation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Increases the Early Nodulation and Development of Common Beans. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-5.
- de Faria, S. M., Diedhiou, A. G., De Lima, H. C., Ribeiro, R. D., Galiana, A., Castilho, A. F., & Henriques, J. C.** (2010). Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 3119-3127.



- De Miranda, J. C. C., & Harris, P. J. (1994).** Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 128(1), 103-108.
- de Novais, C. B., Sbrana, C., da Conceição Jesus, E., Rouws, L. F. M., Giovannetti, M., Avio, L., ... & de Faria, S. M. (2020).** Mycorrhizal networks facilitate the colonization of legume roots by a symbiotic nitrogen-fixing bacterium. *Mycorrhiza*, 1-8.
- De Sousa, M.A., de Oliveira, M.M., Damin, V., de Brito Ferreira, E. P. (2020).** Productivity and Economics of Inoculated Common Bean as Affected by Nitrogen Application at Different Phenological Phases. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11 p.
- Debouba, M., Gouia, H., Suzuki, A., & Ghorbel, M.H. (2006).** NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 163(12),1247-1258.
- Decourtye, A., Mader, E., & Desneux, N. (2010).** Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems. *Apidologie*, 41(3), 264-277.
- Delgado-Salinas, A., Bibler, R., & Lavin, M. (2006).** Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany*, 31(4), 779-791.
- Dellagi, A., Quillere, I., & Hirel, B. (2020).** Beneficial soil-borne bacteria and fungi: a promising way to improve plant nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany*, 71(15), 4469–4479.
- Deménach, A. M., & Wery, J. (1989).** Estimation de l'activité fixatrice d'azote : comparaison des méthodes. F. A. O. O., 1-4.
- Deroche, M. E. (1983).** Relations entre la photosynthèse et l'assimilation de l'azote. Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques, 130(1), 85-98.
- Derylo, M., & Skorupska, A. (1992).** Rhizobial siderophore as an iron source for clover. *Physiologia Plantarum*, 85(3), 549-553.
- Dhaliwal, S. K., Salaria, P., & Kaushik, P. (2020).** Revisiting and Enlisting Important QTLs Identified in Frech Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A Review. Preprints, 2020060016.
- Díaz-Ruiz, R. (2012).** The distribution of dry matter in bean seedlings in light and darkness conditions. *Applied Photosynthesis*, 335-352.
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009).** Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell & Environment*, 32(12), 1682-1694.
- Diouf, A., (1997).** Caractérisation et utilisation de souches de *Rhizobium* isolées du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.) dans la zone des Niayes au Sénégal. Université Cheikh Anta Diop de Dakar pp 96.
- Diouf, D., Forestier, S., Neyra, M., & Lesueur, D. (2003).** Optimisation of inoculation of *Leucaena leucocephala* and *Acacia mangium* with rhizobium under greenhouse conditions. *Annals of Forest Science*, 60(4), 379-384.
- Dita, M. A., Rispaill, N., Prats, E., Rubiales, D., & Singh, K. B. (2006).** Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica*, 147(1-2), 1-24.
- Dogra, R. C., & Dudeja, S. S. (1993).** Fertilizer N and nitrogen fixation in legume-Rhizobium symbiosis. *Annals of Biology*, 9,149-164.
- Donald C.M. (1962):** In search of yield. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Sciences*, 28, 171-178
- Dordas, C.A., Lithourgidis, A.S., Matsi, T. & Barbayiannis, N. (2008).** Application of liquid cattle manure and inorganic fertilizers affect dry matter, nitrogen accumulation, and partitioning in maize. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 80(3), 283-296.
- Drevon, J. J. (2017).** Efficacité d'utilisation du phosphore pour la fixation symbiotique de l'azote et phytases des nodules de légumineuses. *Innovations Agronomiques*, 60, 3-10.
- Drevon, J.J., Alkama, N., Bargaz, A., Rodiño, A.P., Sungthongwises, K. & Zaman-Allah, M. (2015).** The legume–rhizobia symbiosis. In Grain Legumes (pp. 267-290). Springer, New York.
- Drinkwater, L. E., Wagoner, P., & Sarrantonio, M. (1998).** Legume-based cropping systems have reduced carbon and nitrogen losses. *Nature*, 396(6708), 262-265.
- Duan, C. X., Zhu, Z. D., Ren, G. X., Wang, X. M., & Li, D. D. 2014.** Resistance of faba bean and pea germplasm to *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) and its relationship with quality components. *Journal of Economic Entomology*, 107(5):1992-1999.
- Duan, D., Liu, X., Khan, M. A., & Gul, B. (2004).** Effects of salt and water stress on the seed germination of *Chenopodium glaucum* L. seed. *Pak. J. Bot.*, 36(4):793-800.

- Duan, L., Dietrich, D., Ng, C. H., Chan, P.M.Y., Bhalerao, R., Bennett, M. J., & Dinneny, J. R. (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*, 25(1): 324-341.
- Dumka, D., Bednarz, C. W., & Maw, B. W. (2004). Delayed initiation of fruiting as a mechanism of improved drought avoidance in cotton. *Crop Science*, 44(2), 528-534.
- Duzan, H. M., Mabood, F., Souleimanov, A., & Smith, D. L. (2006). Nod Bj-V (C18: 1, MeFuc) production by *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110, 532C) at suboptimal growth temperatures. *Journal of Plant Physiology*, 163(1), 107-111.
- Eardly, B. D., Wang, F. S., Whittam, T. S., & Selander, R. K. (1995). Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 507-512.
- Edwards, T. J. (2007). Legumes of the World. *South Afr. J. Bot.*, 73, 272-273.
- Egamberdieva, D. (2011): Survival of *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 and *P. chlororaphis* TSAU13 in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under saline conditions. *Plant, Soil and Environment*, 57(3), 122-127.
- El Attar, I., Taha, K., El Bekkay, B., El Khadir, M., Alami, I. T., & Aurag, J. (2019). Screening of stress tolerant bacterial strains possessing interesting multi-plant growth promoting traits isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* (L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101225.
- El-Keblawy, A. 2004. Salinity effects on seed germination of the common desert range grass, *Panicum turgidum*. *Seed Science and Technology*, 32(3), 873-878.
- Erdinc, C., Durak, E. D., Ekincialp, A., ŞENSOY, S., & Demir, S. (2017). Variations in response of determinate common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes to arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41(1), 1-9.
- Ernest, R. A. T. (2019). Rôle des symbioses mycorhizienne et bactérienne : biodisponibilité du phosphore et développement des plants de haricot sur des sols ferrallitiques de Madagascar (Doctoral dissertation, Université d'Antananarivo).
- Etesami, H., & Adl, S. M. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their action mechanisms in availability of nutrients to plants. In *Phyto-Microbiome in Stress Regulation* (pp. 147-203). Springer, Singapore.
- Fageria, N. K., & Baligar, V. C. (1997). Response of common bean, upland rice, corn, wheat, and soybean to soil fertility of an Oxisol. *Journal of Plant Nutrition*, 20(10), 1279-1289.
- Fageria, N.K., & Baligar, V. C. (2003). Fertility management of tropical acid soils for sustainable crop production. In 'Handbook of soil acidity' (Z. Rengel, Ed.), pp., 359-385. Marcel Dekker, New York.
- Faghire, M. (2012). Rôle des microorganismes symbiotiques (cas des rhizobia) dans l'amélioration de la production agricole de *Phaseolus vulgaris* sous stress salin (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech).
- Faghire, M., Bargaz, A., Farissi, M., Palma, F., Mandri, B., Lluch, C., ... & Ghoulam, C. (2011). Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of *common bean* (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis*, 55(2), 69-75.
- Fagodiya, R. K., Kumar, A., Kumari, S., Medhi, K., & Shabnam, A. A. (2020). Role of Nitrogen and Its Agricultural Management in Changing Environment. In *Contaminants in Agriculture* (pp. 247-270). Springer, Cham.
- Fallahi, S., & Sharifi, P. (2020). Effect of Nitrogen Fixing Bacteria and Nitrogen Rate on Yield and Growth of *Common Bean*. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 68(3), 491-496.
- FAOSTAT (2019). FAOSTAT. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> [accessed April 24, 2019].
- Faramarzi, M., Abbaspour, K. C., Vaghefi, S. A., Farzaneh, M. R., Zehnder, A. J., Srinivasan, R., & Yang, H. (2013). Modeling impacts of climate change on freshwater availability in Africa. *Journal of Hydrology*, 480, 85-101.
- Farid, M., & Navabi, A. (2015). N<sub>2</sub> fixation ability of different dry bean genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 95(6), 1243-1257.

- Farissi, M., Bouizgaren, A., Faghire, M., Bargaz, A., & Ghoulam, C. (2011). Agro-physiological responses of Moroccan alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations to salt stress during germination and early seedling stages. *Seed Science and Technology*, 39(2), 389-401.
- Feller, C., Bleiholder, H., Buhr, L., Hack, H., Hess, M., Klose, R., Meier, U., Stauss, R., van den Boom, T., & Weber (1995). E. Phenological stages of development of vegetables: II. Fruit vegetables and legumes. *Plants Schedule*, 47, 217-232.
- Fenta, B. A., Beebe, S. E., & Kunert, K. J. (2020). Role of fixing nitrogen in common bean growth under water deficit conditions. *Food and Energy Security*, 9(1), e183.
- Fernández-Luqueño, F., Reyes-Varela, V., Martínez-Suárez, C., Salomón-Hernández, G., Yáñez-Meneses, J., Ceballos-Ramírez, J.M. & Dendooven, L. (2010). Effect of different nitrogen sources on plant characteristics and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioresource Technology*, 101(1), 396-403.
- Ferreira, L. D. V. M., De Carvalho, F., Andrade, J. F. C., Oliveira, D. P., De Medeiros, F. H. V., & Moreira, F. M. D. S. (2020). Co-inoculation of selected nodule endophytic rhizobacterial strains with *Rhizobium tropici* promotes plant growth and controls damping off in common bean. *Pedosphere*, 30(1), 98-108.
- Finch-Savage, W. E., & Bassel, G.W. (2015). Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *J. Exp. Bot.*, 67(3), 567-591.
- Fischer, J., Böhm, H., & Heß, J. (2020). Maize-bean intercropping yields in Northern Germany are comparable to those of pure silage maize. *European Journal of Agronomy*, 112, 125947.
- Fisher, L. S., Mays, P. A., Wylie, C. L. (2007). An overview of nitrogen critical loads for policy makers, stakeholders, and industries in the United States. *Water, Air, and Soil Pollution*, 179(1-4), 3-18.
- Flores-Felix, J. D., Carro, L., Velazquez, E., Valverde, A., Cerda-Castillo, E., García-Fraile, P., & Rivas, R. (2013). *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(3), 821-826.
- Flowers, T. J., & Yeo, A. R. (1986). Ion relations of plants under drought and salinity. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13, 75-91.
- Fog, K. (1988). The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biological Reviews*, 63(3), 433-462.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019). Rome Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, p. 40-41-42.
- Fox, J. E., Gulledge, J., Engelhaupt, E., Burow, M. E., & McLachlan, J. A. (2007). Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10282-10287.
- Frank, A. C., Saldierna Guzmán, J. P., & Shay, J. E. (2017). Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, 5(4), 70.
- Frank, A. C., Baijukya, F., Kantengwa, S., Reckling, M., Vanlauwe, B., & Giller, K. E. (2019). Poor farmers–poor yields: socio-economic, soil fertility and crop management indicators affecting climbing bean productivity in northern Rwanda. *Experimental Agriculture*, 55(S1), 14-34.
- Freytag, G. F., & Debouck, D. G. (2002). Taxonomy, Distribution, and Ecology of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionodeae) in North America, Mexico and Central America. Taxonomía, distribución y ecología del género *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionodeae) en Norteamérica, México y Centroamérica. SIDA, *Botanical Miscellany*.
- Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S., & Cliquet, J. B. (2010). Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(1), 57-66.
- Galford, G. L., Melillo J. M., Kicklighter, D. W., Cronin, T. W., Cerri, C. E. P., Mustard, J. F., & Cerri, C. C. (2010). Greenhouse gas emissions from alternative futures of deforestation and agricultural management in the southern Amazon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA107, 19649-19654.
- Galford, G. L., Melillo, J., Mustard, J. F., Cerri, C. E. P., & Cerri, C. C. (2010). The Amazon frontier of land-use change: croplands and consequences for greenhouse gas emissions. *Earth Interact.*, 14, 1-24.



- Galván, G. A., Parádi, I., Burger, K., Baar, J., Kuyper, T. W., Scholten, O. E., & Kik, C. (2009).** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in onion roots from organic and conventional farming systems in the Netherlands. *Mycorrhiza*, 19(5), 317-328.
- García-Garijo, A., Tejera, N. A., Lluch, C., & Palma, F. (2014).** Metabolic responses in root nodules of *Phaseolus vulgaris* and *Vicia sativa* exposed to the imazamox herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 111, 19-23.
- Garg, N., & Chandel, S. (2011).** Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. In *Sustainable Agriculture Volume 2* (pp. 907-930). Springer, Dordrecht.
- Gathumbi, S. M., Cadisch, G., & Giller, K. E. (2002).** 15N natural abundance as a tool for assessing N<sub>2</sub>-fixation of herbaceous, shrub and tree legumes in improved fallows. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(8), 1059-1071.
- Gathumbi, S. M., Ndufa, J. K., Giller, K. E., & Cadisch, G. (2002).** Do species mixtures increase above-and belowground resource capture in woody and herbaceous tropical legumes?. *Agronomy Journal*, 94(3), 518-526.
- Gaur, Y. D., & Sen, A. N. (1979).** Cross inoculation group specificity in *Cicer-rhizobium* symbiosis. *New Phytologist*, 83(3), 745-754.
- Gebhard, C. A., Büchi, L., Liebisch, F., Sinaj, S., Ramseier, H., & Charles, R. (2013).** Screening de légumineuses pour couverts végétaux : azote et adventices. *Recherche Agronomique Suisse*, 4(9), 384-393.
- Gebrehana, Z. G., & Dagnaw, L. A. (2020).** Response of soybean to Rhizobial inoculation and starter N fertilizer on Nitisols of Assosa and Begi areas, Western Ethiopia. *Environmental Systems Research*, 9(1), 1-11.
- George, T., & Singleton, P. W. (1992).** Nitrogen assimilation traits and dinitrogen fixation in soybean and common bean. *Agronomy Journal*, 84(6), 1020-1028.
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T.H. (1963).** Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological society*, 46(2), 235-244.
- Ghogdi, E., Borzouei, A., Jamali, S., & Pour, N. (2013).** Changes in root traits and some physiological characteristics of four wheat genotypes under salt stress. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(8), 838.
- Gichangi, A., Maobe, S. N., Karanja, D., Getabu, A., Macharia, C. N., Ogecha, J. O., ... & Kitonga, L. (2012).** Assessment of production and marketing of climbing beans by smallholder farmers in Nyanza region, Kenya. *World Journal of Agricultural Sciences*, 8(3), 293-302.
- Giller, K. E., Witter, E., & Mcgrath, S. P. (1998).** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10-11), 1389-1414.
- Giovannini, L., Palla, M., Agnolucci, M., Avio, L., Sbrana, C., Turrini, A., Giovannetti, M. (2020).** Arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota as plant biostimulants: research strategies for the selection of the best performing inocula. *Agronomy*, 10(1), 106.
- Giovannini, L., Sbrana, C., Avio, L., & Turrini, A. (2020).** Diversity of a phosphate transporter gene among species and isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 367(2), fnaa024.
- Giri, N., & Joshi, N. C. (2010).** Growth and yield response of chick pea (*Cicer arietinum*) to seed inoculation with *Rhizobium* sp. *Nature and Science*, 8(9), 232-236.
- Giusti, F., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., & Sagratini, G. (2017).** Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. *Food chemistry*, 221, 689-697.
- Glenn, E. P., Brown, J. J., & O'Leary, J. W. (1998).** Irrigating Crops with Seawater. *Scientific American*, pp. 76-81.
- Glick, B. R. (2020).** Resource acquisition. In *Beneficial plant-bacterial interactions* (pp. 91-138). Springer, Cham.
- Godoy, Androcioli, L., Mariani Zeffa, D., Soares Alves, D., Pires Tomaz, J., & Moda-Cirino, V. (2020).** Effect of Water Deficit on Morphoagronomic and Physiological Traits of Common Bean Genotypes with Contrasting Drought Tolerance. *Water*, 12(1), 217.

- Gomes, M. J., Lima, S. L., Alves, N. E., Assis, A., Moreira, M. E., Toledo, R. C., ... & Martino, H. S. (2020). Common bean protein hydrolysate modulates lipid metabolism and prevents endothelial dysfunction in BALB/c mice fed an atherogenic diet. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 30(1), 141-150.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *Biotech*, 5(4), 355-377.
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Samineni, S., & Kumar, C. S. (2016). Plant growth-promotion and biofortification of chickpea and pigeonpea through inoculation of biocontrol potential bacteria, isolated from organic soils. *Springer Plus*, 5(1), 1882.
- Gorovtsov, A. V., Minkina, T. M., Mandzhieva, S. S., Perelomov, L. V., Soja, G., Zamulina, I. V., ... & Yao, J. (2019). The mechanisms of biochar interactions with microorganisms in soil. *Environmental Geochemistry and Health*, 1-24.
- Gosling P., Hodge A., Goodlass G., & Bending G. D. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113(1-4), 17-35.
- Graham, P. H. (1981). Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. *Field Crops Research*, 4, 93-112.
- Graham, P. H. (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 475-484.
- Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnett, Y. M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., ... & Young, J. P. W. (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(4), 582-587.
- Graham, P. H. (1981). Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. *Field Crops Research*, 4, 93-112.
- Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412.
- Guinet, M., Nicolardot, B., Revellin, C., Durey, V., Carlsson, G. & Voisin, A. S. (2018). Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species. *Plant and Soil*, 432(1-2), 207-227.
- Gupta, R., Yadav, S. S., Verma, S. K., & Dubey, S. K. (2018). Siderophore production and biocontrol potential of rhizobium isolated from non-traditional leguminous crop in MP. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 6(2), 142-145.
- Hager, A. S., Mäkinen, O. E., & Arendt, E. K. (2014). Amylolytic activities and starch reserve mobilization during the germination of quinoa. *European Food Research and Technology*, 239(4), 621-627.
- Halder, A. K., Mishra, A. K., Bhattacharyya, P., & Chakrabartty, P. K. (1990). Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 36(2), 81-92.
- Hall, A. E. (2004). Comparative ecophysiology of cowpea, common bean and peanut. *Physiology and Biotechnology Integration for Plant Breeding*, 271-325.
- Hamane, S., Zerrouk, M. H., Lyemlahi, A. E., Aarab, S., Laglaoui, A., Bakkali, M., & Arakrak, A. (2020). Screening and Characterization of Phosphate-Solubilizing Rhizobia Isolated from *Hedysarum pallidum* in the Northeast of Morocco. In *Phyto-Microbiome in Stress Regulation* (pp. 113-124). Springer, Singapore.
- Hamd-Alla, W., Ahmed, N., & Hefzy, M. (2020). Enhance productivity and net economic return by intercropping sunflower (*Helianthus annuus* L.) with common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under drip irrigation. *European Journal of Biological Research*, 10(2), 57-73
- Hardarson, G., Bliss, F. A., Cigales-Rivero, M. R., Henson, R. A., Kipe-Nolt, J. A., Longeri, L., ... & Tsai, S. M. (1993). Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. In *Enhancement of Biological Nitrogen Fixation of Common Bean in Latin America* (pp. 59-70). Springer, Dordrecht.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary

- considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.
- He, X.H., Critchley, C., & Bledsoe, C. (2003).** Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(6), 531-567.
- Heath, K. D., Podowski, J. C., Heniff, S., Klinger, C. R., Burke, P. V., Weese, D. J., ... & Lau, J. A. (2020).** Light availability and rhizobium variation interactively mediate the outcomes of legume–rhizobium symbiosis. *American Journal of Botany*, 107(2), 229-238.
- Hénin S., Gras R., & Monnier G. (1969).** Le profil cultural : l'état physique du sol et ses conséquences agronomiques, Masson, Paris, 332 p.
- Henzell, E. E. (1988).** The role of biological nitrogen fixation research in solving problems in tropical agriculture. *Plant and Soil*, 108, 15-21.
- Herliana, O., Harjoso, T., Anwar, A. H. S., & Fauzi, A. (2019).** The Effect of *Rhizobium* and N Fertilizer on Growth and Yield of Black Soybean (*Glycine max* (L.) Merril). In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 255, No. 1, p. 012015). IOP Publishing.
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V., Requena, N., Amarger, N., ... & Sanjuan, J. (1999).** At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1), 87-97.
- Hirich, A., Jelloul, A., Choukr-Allah, R., & Jacobsen, S. E. (2014).** Saline water irrigation of quinoa and chickpea: seedling rate, stomatal conductance and yield responses. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(5), 378-389.
- Hirrel, M. C., & Gerdemann, J. W. (1980).** Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science Society of America Journal*, 44(3): 654-655.
- Hsiao, T. C., & Xu, L. K. (2000).** Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), 1595-1616.
- Hu, Y., & Schmidhalter, U. (2005).** Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 168(4), 541-549.
- Hungria, M., & Franco, A. A. (1993).** Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 149(1), 95-102.
- Hungria, M., & Vargas, M. A. (2000).** Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field crops research*, 65(2-3), 151-164.
- Hungria, M., & Franco, A. A. (1993).** Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 149(1), 95-102.
- Hungria, M., & Kaschuk, G. (2014).** Regulation of N<sub>2</sub> fixation and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. *Environmental and Experimental Botany*, 98, 32-39.
- Hungria, M., Franco, A. A., & Sprent, J. I. (1993).** New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 149(1), 103-109.
- Huo, Y., Tong, W., Wang, J., Wang, F., Bai, W., Wang, E., ... & Wei, G. (2019).** Rhizobium chutanense sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(7), 2049-2056.
- Hussain, S., Khaliq, A., Matloob, A., Wahid, M. A., & Afzal, I. (2013).** Germination and growth response of three wheat cultivars to NaCl salinity. *Soil and Environment*, 32(1), 36-43.
- Iantcheva, A., Mysore, K. S., & Ratet, P. (2013).** Transformation of leguminous plants to study symbiotic interactions. *International Journal of Developmental Biology*, 57(6-7-8), 577-586.
- Inostroza, L., Acuña, H. & Tapia, G. (2015).** Relationships between phenotypic variation in osmotic adjustment, water-use efficiency, and drought tolerance of seven cultivars of *Lotus corniculatus* L. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 75(1), 3-12.
- I. N. V. A. M. (2019).** International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Available at: <https://invam.wvu.edu> (accessed 20.12.2019).
- I. R. A. D. (2013).** Contribution de la recherche à l'amélioration de la production et la consommation des légumineuses alimentaires au Cameroun, C2D/Programme d'Appui à la Recherche Agronomique, Projet 6 : Légumineuses, 57p.

- Oliveira, T. F., Fernandes, R. H., Costa, R. L., & Lopes, E. A. (2015).** Formulation of bionematicides based on bacteria for the control of the lesion nematode in common bean. *Idesia*, 33(1), 147-150.
- Islam, M., Ali, S., & Hayat, R. (2009).** Effect of integrated application of phosphorus and sulphur on yield and micronutrient uptake by chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Agri. Biol.*, 1, 33-38.
- Jamil, M., Deog Bae, L., Kwang Yong, J., Ashraf, M., Sheong Chun, L., & Eui Shik, R. (2006).** Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. *J. Centr. Eur Agric.*, 7(2), 273-282.
- Jansa, J., Bationo, A., Frossard, E., & Rao, I. M. (2011).** Options for improving plant nutrition to increase common bean productivity in Africa. In *Fighting poverty in Sub-Saharan Africa: the multiple roles of legumes in integrated soil fertility management* (pp. 201-240). Springer, Dordrecht.
- Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K., & Barea, J. M. (2003).** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 37(1), 1-16.
- Jiao, Y. S., Liu, Y. H., Yan, H., Wang, E. T., Tian, C. F., Chen, W. X., ... & Chen, W. F. (2015).** Rhizobial diversity and nodulation characteristics of the extremely promiscuous legume *Sophora flavescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(12), 1338-1352.
- Jiao, Y. S., Yan, H., Ji, Z. J., Liu, Y. H., Sui, X. H., Wang, E. T., ... & Chen, W. F. (2015).** *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(2), 497-503.
- Jin, C. W., Ye, Y. Q., & Zheng, S. J. (2014).** An underground tale: contribution of microbial activity to plant iron acquisition via ecological processes. *Annals of Botany*, 113(1), 7-18.
- Jin, Z., Prasad, R., Shriver, J., & Zhuang, Q. (2017).** Crop model-and satellite imagery-based recommendation tool for variable rate N fertilizer application for the US Corn system. *Precision Agriculture*, 18(5), 779-800.
- Johnston, H. W. (1952).** The Solubilization of Phosphate: 1.-The Action of Various Organic Compounds on Dicalcium and Tricalcium Phosphates. EV Paul, Government Print.
- Jordan, D. C. (1984).** Family III Rhizobiaceae. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergeys manual of systematic bacteriology*, vol I. Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp 234-242
- Joshi, A. J., Mali, B. S., & Hinglajia, H. (2005).** Salt tolerance at germination and early growth of two forage grasses growing in marshy habitats. *Environ. Exp. Bot.*, 54(3), 267-274.
- Kakon, S. S., Bhuiya, M. S. U., Hossain, S. M. A., Naher, Q., & Bhuiyan, M. D. (2016).** Effect of nitrogen and phosphorus on growth and seed yield of French bean. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 41(4), 759-772.
- Kakraliya, S. K., Singh, U., Bohra, A., Choudhary, K. K., Kumar, S., Meena, R. S., & Jat, M. L. (2018).** Nitrogen and legumes: a meta-analysis. In *Legumes for Soil Health and Sustainable Management* (pp. 277-314). Springer, Singapore.
- Kan, L., Nie, S., Hu, J., Wang, S., Bai, Z., Wang, J., ... & Song, K. (2018).** Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. *Food Chemistry*, 260, 317-326.
- Kanouni, L., Larous, L., & Mezaache-Aichour, S. (2018).** Inhibitory effect of rhizobia isolated from several leguminous against phytopathogenic fungi. *Annual Research & Review in Biology*, 1-16.
- Kapoor, K. K., Mishra, M. M., & Kukreja, K. (1989).** Phosphate solubilization by soil microorganisms. *Indian Journal of Microbiology*, 29(2), 119-127.
- Karimzadeh Soureshjani, H., Nezami, A., Kafi, M., & Tadayon, M. (2020).** The Effect of Deficit Irrigation on Dry Matter Partitioning, Mobilization and Radiation Use Efficiency of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 51(3), 307-326.
- Kaur, H., Peel, A., Acosta, K., Gebril, S., Ortega, J. L., & Sengupta-Gopalan, C. (2019).** Comparison of alfalfa plants overexpressing glutamine synthetase with those overexpressing sucrose phosphate synthases demonstrates a signaling mechanism integrating carbon and nitrogen metabolism between the leaves and nodules. *Plant Direct*, 3(1), e00115.



- Kawaka, F., Dida, M., Opala, P., Ombori, O., Maingi, J., Amoding, A., & Muoma, J. (2018).** Effect of nitrogen sources on the yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. *Journal of Plant Nutrition*, 41(13), 1652-1661.
- Kayakez, M. M., Upite, J. T., Misonga, A. K., & Kimuni, L. N. (2017).** Réponse de huit variétés de haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) à la fertilisation minérale dans la région de Kolwezi, Lualaba (RD Congo). *Journal of Applied Biosciences*, 111(1), 10894-10904.
- Kaymakanova, M. (2009).** Effect of salinity on germination and seed physiology in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotechnol. Biotec. Eq.*, 23(sup.1): 326-329.
- Kebede, E. (2020).** Grain legumes production and productivity in Ethiopian smallholder agricultural system, contribution to livelihoods and the way forward. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1), 1722353.
- Khaitov, B., Karimov, A., Abdiev, A., Farrukh, J., & Park, K. (2020).** Beneficial effect of *Rhizobium* inoculation on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in saline soils. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26(1), 96-104.
- Khaitov, B., Vollmann, J., Yeong Pyon, J., & Park, K. W. (2020).** Improvement of Salt Tolerance and Growth in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Co-Inoculation with Native Rhizobial Strains. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22(1), 209-220.
- Khaled, L. B., Gómez, A., Ouarraqi, E., & Oihabi, A. (2003).** Réponses physiologiques et biochimiques du trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) à la double association Mycorhizes-Rhizobium sous une contrainte saline. *Agronomie*, EDP Sciences, 23 (7), 571-580.
- Khan, M. R., Ashraf, S., Rasool, F., Salati, K. M., Mohiddin, F. A., & Haque, Z. (2014).** Field performance of *Trichoderma* species against wilt disease complex of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri and *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(4):447-454.
- Khan, M. S. A., Karim, M. A., & Haque, M. M. (2015).** Genotypic differences in growth and ions accumulation in soybean under NaCl salinity and water stress conditions. *Bangladesh Agronomy Journal*, 17(1), 47-58.
- Khanam, M., Islam, M. S., Ali, M. H., Chowdhury, I. F., & Masum, S. M. (2016).** Performance of soybean under different levels of phosphorus and potassium. *Bangladesh Agronomy Journal*, 19(1), 99-108.
- Kheloufi, A., Chorfi, A., & Mansouri, L. M. (2016a).** The Mediterranean seawater: the impact on the germination and the seedlings emergence in three *Acacia* species. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 8(6), 238-249.
- Kheloufi A, Chorfi A and Mansouri LM. 2016b.** Comparative effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on seed germination of *Acacia saligna* L. and *Acacia decurrens* Willd. *International Journal of Biosciences*, 8, 1-13.
- Kheloufi, A. (2017).** Germination of seeds from two leguminous trees (*Acacia karroo* and *Gleditsia triacanthos*) following different pre-treatments. *Seed Science and Technology*, 45(1), 1-4.
- Kheloufi, A., Chorfi, A., & Mansouri, L. M. (2016b).** The Mediterranean seawater: the impact on the germination and the seedlings emergence in three *Acacia* species. *J. Bio. Env. Sci.*, 8(6), 238-249.
- Kheloufi, A., Chorfi, A. & Mansouri, L. M. (2017).** Germination kinetics in two *Acacia karroo* Hayne ecotypes under salinity conditions. *OALib. J.*, 4, 1-11.
- Kheloufi, A., Chorfi, A., Mansouri, L. M., & Benyamina, H. (2018).** Morpho-physiological characterization and photosynthetic pigment contents of *Acacia karroo* hayne seedlings under saline conditions. *Agricult. Forest.*, 64(2), 87-99.
- Kilambo, G. L. (2019).** Characterization and effectiveness of indigenous rhizobia nodulating common bean (*phaseolus vulgaris* L.) in Hai district, Northern Tanzania (Doctoral dissertation, NM-AIST).
- Kloepper, J. W., Scher, F. M., Laliberte, M., & Tipping, B. (1986).** Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In *Iron, Siderophores, and Plant Diseases* (pp. 155-164). Springer, Boston, MA.
- Knapp, B. A., Ros, M. & Insam, H. (2010).** Do composts affect the soil microbial community?. In *Microbes at work* (pp. 271-291). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Koffi, C. B. N. D., Koffi, M. H. A., Yah, M. N. G., & Atta, D. H. (2019).** Impact de l'application de trois pesticides dans le potentiel de colonisation du rhizobium sur deux accessions de Niébé en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(4), 2021-2028.
- Kohls, S. J., & Baker, D.D. (1989).** Effects of substrate nitrate concentration on symbiotic nodule formation in actinorhizal plants. *Plant and Soil*, 118(1-2), 171-179.
- Köpke, U., & Nemecek, T. (2010).** Ecological services of faba bean. *Field Crops Research*, 115(3), 217-233.
- Koskey, G., Avio, L., Lazzaro, M., Pellegrini, F., Sbrana, C., Turrini, A., & Bàrberi, P. (2020).** Smart use of microbial-rich vermicomposting to enhance tripartite plant-microbe-soil interactions. In EGU General Assembly Conference Abstracts (p. 3345).
- Koskey, G., Mburu, S. W., Kimiti, J. M., Ombori, O., Maingi, J. M., & Njeru, E. M. (2018).** Genetic characterization and diversity of *Rhizobium* isolated from root nodules of mid-altitude climbing bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Frontiers in Microbiology*, 9, 968.
- Kouadria, M., Sehari, M., Hassani, A., Koulali, F., & Zouablia, S. (2020).** Effet du stress salin sur le système foliaire d'une légumineuse vivrière (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivée dans un sol de bentonite. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 8(1).
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., ... & Saxena, A. K. (2020).** Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101487.
- Kouris-Blazos, A., & Belski, R. (2016).** Health benefits of legumes and pulses with a focus on Australian sweet lupins. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 25(1), 1.
- Koyro, H. W., Lieth, H., & Eisa, S. S. (2008).** Salt tolerance of *Chenopodium quinoa* Willd., grains of the Andes: Influence of salinity on biomass production, yield, composition of reserves in the seeds, water and solute relations. *Mangroves and Halophytes: Restoration and Utilisation*, 133-145. Springer, Dordrecht.
- Krishnaraj, P. U. (1996).** *Genetic Characterisation Of Mineral Phosphate Solubilization In Pseudomonas SP* (Doctoral dissertation, IARI, Division of Microbiology: New Delhi).
- Kroll, R. (2000).** Les cultures maraîchères, 219 pp, Maisonneuve et Larose, Paris.
- Kuhad, R. C., Singh, S., & Singh, A. (2011).** Phosphate-solubilizing microorganisms. In Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol (pp. 65-84). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kumar, S., Meena, R. S., Datta, R., Verma, S. K., Yadav, G. S., Pradhan, G., ... & Mashuk, H. A. (2020).** Legumes for Carbon and Nitrogen Cycling: An Organic Approach. In Carbon and Nitrogen Cycling in Soil (pp. 337-375). Springer, Singapore.
- Kumar, V., Jain, L., Jain, S. K., Chaturvedi, S., & Kaushal, P. (2020).** Bacterial endophytes of rice (*Oryza sativa* L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic activities. *South African Journal of Botany*, 1-14.
- Kundu, B. S., & Gaur, A. C. (1981).** Effect of single and composite cultures on rock phosphate solubilization. Note. *Journal of Research Haryana Agricultural University*, 11(4), 559-562.
- Kusvuran, S., Kiran, S., & Ellialtioglu, S. S. (2016).** Antioxidant enzyme activities and abiotic stress tolerance relationship in vegetable crops. Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives [Internet]. 1st ed. *Croatia: InTech*, 481-503.
- Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M.-R., & Amarger, N. (2003).** Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* for Nodulation of Host Legumes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 2276–2283.
- Lakdhary, H., (2009).** Les conséquences du changement climatique sur l'agriculture algérienne. Quelle stratégie d'adaptation face à la rareté de l'eau ? Cinquième colloque international : « Energie, changement climatique et développement durable ». Hammamet (Tunisie). 15-17 juin 2009.
- Larney, F. J., & Angers, D.A. (2012).** The role of organic amendments in soil reclamation: a review. *Canadian Journal of Soil Science*, 92(1), 19-38.
- Layzell, D. B., Pate, J. S., Atkins, C. A., & Canvin, D. T. (1981).** Partitioning of carbon and nitrogen and the nutrition of root and shoot apex in a nodulated legume. *Plant Physiology*, 67(1), 30-36.
- Lazali, M., Brahimi, S., Merabet, C., Latati, M., Benadis, C., Maougal, R. T., ... & Ounane, S. M. (2016).** Nodular diagnosis of contrasting recombinant inbred lines of *Phaseolus vulgaris* in multi-local field tests under Mediterranean climate. *European Journal of Soil Biology*, 73, 100-107.



- Lee, C., & Shim, S. H. (2020). Endophytic Fungi Inhabiting Medicinal Plants and Their Bioactive Secondary Metabolites. *Natural Product Sciences*, 26(1), 10-27.
- Hye-Ran, L., & Mee Lee, J. (2009). Anti-stress effects of kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 18(1), 25-30.
- Lemanceau, P., Maron, P.A., Mazurier, S., Mougél, C., Pivato, B., Plassart, P., Ranjard, L., Revellin, C., Tardy, V., & Wipf, D. (2015). Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 67-81.
- Lesueur, D., Yacouba, T., Galiana, A., & Mallet, B. (1994). Croissance et nodulation d'*Acacia mangium*. Effet de l'inoculation avec *Rhizobium* dans trois types de sol désinfectés de basse Côte d'Ivoire. *Bois et Forêts des Tropiques*, 241, 29-38.
- Li, J., Cooper, J. M., Li, Y., Yang, X., & Zhao, B. (2015). Soil microbial community structure and function are significantly affected by long-term organic and mineral fertilization regimes in the North China Plain. *Applied Soil Ecology*, 96, 75-87.
- Li, J., Zhang, S., Shi, S., Du, J., & Huo, P. (2020). Effect of Phosphate Solubilizing *Rhizobium* Strains on Alfalfa Seedlings Growth Under Nitrogen Free and Phosphorus Deficient Conditions. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 14(1), 133-137.
- Li, Y., Li, Q., Guan, G., & Chen, S. (2020). Phosphate solubilizing bacteria stimulate wheat rhizosphere and endosphere biological nitrogen fixation by improving phosphorus content. *Peer J.*, 8, e9062.
- Lie, T. A. (1971). Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. *Plant and Soil*, 35(1), 117-127.
- Liu, J, Liu, Q., & Yang, H. (2016). Assessing water scarcity by simultaneously considering environmental flow requirements, water quantity, and water quality. *Ecological Indicators*, 60, 434-441.
- Liu, H., Zhang, C., Yang, J., Yu, N., & Wang, E. (2018). Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(8), 632-648.
- Lobell, D. B. (2014). Climate change adaptation in crop production: Beware of illusions. *Global Food Security*, 3(2), 72-76.
- Long, X., Huang, Z., Zhang, Z., Li, Q., Zed, R., & Liu, Z. (2010). Seawater stress differentially affects germination, growth, photosynthesis, and ion concentration in genotypes of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(2), 223-231.
- López-López, A., Rogel, M. A., Ormeno-Orrillo, E., Martínez-Romero, J., & Martínez-Romero, E. (2010). *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(6), 322-327.
- López-López, A., Rogel-Hernández, M. A., Barois, I., Ceballos, A. I. O., Martínez, J., Ormeño-Orrillo, E., & Martínez-Romero, E. (2012). *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, *siratro*, *cowpea* and *Mimosa pudica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(9), 2264-2271.
- Lu, M., & Hedin, L. O. (2019). Global plant–symbiont organization and emergence of biogeochemical cycles resolved by evolution-based trait modelling. *Nature Ecology & Evolution*, 3(2), 239-250.
- Luan, H., Gao, W., Huang, S., Tang, J., Li, M., Zhang, H., ... & Masiliūnas, D. (2020). Substitution of manure for chemical fertilizer affects soil microbial community diversity, structure and function in greenhouse vegetable production systems. *PloS one*, 15(2), e0214041.
- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection aid in evolution for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.*, 2, 176-177.
- Mahmoudi, N., Dias, T., Mahdhi, M., Cruz, C., Mars, M., Caeiro, M. F. (2020). Does Arbuscular Mycorrhiza Determine Soil Microbial Functionality in Nutrient-Limited Mediterranean Arid Ecosystems?. *Diversity*, 12(6), 234.
- Mansouri, L. M., & Kheloufi, A. (2017). Effect of diluted seawater on seed germination and seedling growth of three leguminous crops (Pea, Chickpea and Common bean). *Agriculture and Forestry/Poljoprivreda i Sumarstvo*, 63(2),131-142.
- Mansouri L.M., Heleili N., Boukhatem Z.F., Kheloufi A. (2019): Seed germination and radicle establishment related to type and level of salt in common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Djedida*). *Cercetări Agronomice în Moldova/Agronomic Research in Moldavia*, 52(3), 262-277.

- Mansouri, L. M., Kheloufi, A., Belatreche, R., Heleili, N., & Boukhatem, Z. F. (2020).** Effect of nitrogen fertilizer on growth, flowering, fruiting and nodulation of three varieties of Common bean in the arid region of Aïn Naga (Biskra, Algeria). *Cercetări Agronomice în Moldova (Agronomic Research in Moldavia)*, 53(1),19-35.
- Mansouri, L. M., Heleili, N., Boukhatem, Z. F., & Kheloufi, A. (2019).** Seed germination and radicle establishment related to type and level of salt in common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Djedida*). *Cercet. Agron. în Moldova (Agronomical Research in Moldavia)*, 52(3), 262-277.
- Mansouri, L. M., & Kheloufi, A. (2017).** Effect of diluted seawater on seed germination and seedling growth of three leguminous crops (pea, chickpea and common bean). *Agricult. Forest.*, 63(2), 131-142.
- Maphosa, Y., & Jideani, V. A. (2017).** The role of legumes in human nutrition. *Functional Food-Improve Health through Adequate Food*, 1, 13.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A. A., Graham, P., Pardo, M. A. (1991).** Rhizobium tropici, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena sp.* trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 417-426
- Martinez-Romero, E. (2003).** Diversity of Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252(1), 11-23.
- Mary Berg, (2017).** Area Extension Livestock Environmental Management Specialist, Carrington Research Extension Center.
- Massa, N., Cesaro, P., Todeschini, V., Capraro, J., Scarafoni, A., Cantamessa, S., ... & Berta, G. (2020).** Selected autochthonous rhizobia, applied in combination with AM fungi, improve seed quality of common bean cultivated in reduced fertilization condition. *Applied Soil Ecology*, 148, 103507.
- Mathieu C. and Pieltain F. (2003):** Analyse chimique des sols - Méthodes choisies, Lavoisier, 387 p.
- Matse, D. T., Huang, C. H., Huang, Y. M., & Yen, M. Y. (2020).** Effects of coinoculation of *Rhizobium* with plant growth promoting rhizobacteria on the nitrogen fixation and nutrient uptake of *Trifolium repens* in low phosphorus soil. *Journal of Plant Nutrition*, 43(5), 739-752.
- Mbabazi, P. (2019).** Effects of Phosphorus and Nitrogen Fertilizers on the Growth and Yield of *Phaseolus vulgaris* on Degraded Soils in Uganda (Doctoral dissertation, Makerere University).
- Mbuthia, L. W., Acosta-Martínez, V., DeBruyn, J., Schaeffer, S., Tyler, D., Odoi, E., ... & Eash, N. (2015).** Long term tillage, cover crop, and fertilization effects on microbial community structure, activity: Implications for soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 24-34.
- Meena, R. S., Kumar, S., Datta, R., Lal, R., Vijayakumar, V., Brtnicky, M., ... & Pathan, S. I. (2020).** Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: A review. *Land*, 9(2), 34.
- Mena, E., Leiva-Mora, M., Jayawardana, E. K. D., García, L., Veitía, N., Bermúdez-Caraballoso, I., Collado, R., & Ortíz, R. C. (2015).** Effect of salt stress on seed germination and seedlings growth of *Phaseolus vulgaris* L. *Cult. Trop.*, 36(3), 71-74.
- Menge, E. M., Njeru, E. M., Koskey, G., & Maingi, J. (2018).** Rhizobial inoculation methods affect the nodulation and plant growth traits of host plant genotypes: A case study of Common bean *Phaseolus vulgaris* L. germplasm cultivated by smallholder farmers in Eastern Kenya. *Advances in Agricultural Science*, 6(3), 77-94.
- Messian, C. (1998).** Le potager tropical. 583 pp, CILF, Paris.
- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M., & Amarger, N. (2002).** Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(1), 77-84.
- Michiels, J., Dombrecht, B., Vermeiren, N., Xi, C., Luyten, E., & Vanderleyden, J. (1998).** *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26, 193-205
- Milberg, P., & Lamont, B. B. (1997).** Seed/cotyledon size and nutrient content play a major role in early performance of species on nutrient-poor soils. *New Phytol.*, 137(4), 665-672.
- Milognon, H. W., Missihoun, A. A., Agbo, R. I., Assogbadjo, A. E., & Agbangla, C. (2020).** Connaissances endogènes et contraintes biotiques de production des haricots cultivés du genre *Phaseolus* au Centre et Sud Bénin (Afrique de l'Ouest). *Journal of Applied Biosciences*, 145, 14938-14954.
- Minchin, F. R., & Witty, J. F. (2005).** Respiratory/carbon costs of symbiotic nitrogen fixation in legumes. In *Plant respiration* (pp. 195-205). Springer, Dordrecht.

- Miransari M. (2011):** Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances*, 29(6), 645-653.
- Mnasri, B., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. (2007).** Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(7), 1744-1750.
- Mnasri, B., Liu, T. Y., Saidi, S., Chen, W. F., Chen, W. X., Zhang, X. X., & Mhamdi, R. (2014).** *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(5), 1501-1506.
- Mnasri, B., Saïdi, S., Chihaoui, S. A., & Mhamdi, R. (2012).** *Sinorhizobium americanum* symbiovar *mediterraneanense* is a predominant symbiont that nodulates and fixes nitrogen with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a Northern Tunisian field. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(4), 263-269.
- Moghaddam, M., Babaei, K. & Saeedi Pooya, E. (2018).** Germination and growth response of flax (*Linum usitatissimum*) to salinity stress by different salt types and concentrations. *J. Plant Nutr.*, 41(5), 563-573.
- Mojica, L., de Mejia, E. G., Granados-Silvestre, M. Á., & Menjivar, M. (2017).** Evaluation of the hypoglycemic potential of a black bean hydrolyzed protein isolate and its pure peptides using in silico, in vitro and in vivo approaches. *Journal of Functional Foods*, 31, 274-286.
- Molina, J. C., Moda-Cirino, V., Júnior, N. D. S. F., de Faria, R. T., & Destro, D. (2001).** Response of common bean cultivars and lines to water stress. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1(4).
- Monti, M., Pellicanò, A., Santonoceto, C., Preiti, G., & Pristeri, A. (2016).** Yield components and nitrogen use in cereal-pea intercrops in Mediterranean environment. *Field Crops Research*, 196, 379-388.
- Mora, Y., Díaz, R., Vargaslagunas, C., Peralta, H., Guerrero, G., Aguilar, A., et al. (2014).** Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: phylogeny, physiology, and genome analysis. *Appl Environ Microbiol.*, 80, 5644-54.
- Moreno-Jiménez, M. R., Cervantes-Cardoza, V., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Estrella, I., García-Gasca, T. D. J., ... & Rocha-Guzmán, N. E. (2015).** Phenolic composition changes of processed common beans: their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells. *Food Research International*, 76, 79-85.
- Mouhsine, B., Prell, J., Filali-Maltouf, A., Priefer, U. B., & Aurag, J. (2007).** Diversity, phylogeny and distribution of bean rhizobia in salt-affected soils of North-West Morocco. *Symbiosis*, 43 (2), 83-96.
- Mousavi, S. A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., & Lindström, K. (2015).** Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.*, 38, 84-90
- Muleta, D. (2017).** Legume response to arbuscular Mycorrhizal fungi inoculation in Sustainable Agriculture. In *Microbes for Legume Improvement* (pp. 227-260). Springer, Cham.
- Munier-Jolain, N. G., Munier-Jolain, N. M., Roche, R., Ney, B. & Duthion, C. (1998).** Seed growth rate in grain legumes I. Effect of photoassimilate availability on seed growth rate. *J. Exp. Bot.*, 49(329).
- Munns, R., & Gilliham, M. (2015).** Salinity tolerance of crops-what is the cost?. *New Phytologist*, 208(3):668-673.
- Munns, R., Schachtman, D. P., & Condon, A. G. (1995).** The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 22(4), 561-569.
- Munns, R., & Termaat, A. (1986).** Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13(1): 143-160.
- Munns, R., & Tester, M. (2008).** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Munns, R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, 25(2), 239-250.
- Munns, R. (2005).** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R. (2011).** Plant adaptations to salt and water stress: differences and commonalities. *Adv. Bot. Res.*, 57, 1-32.

- Mustafakulova, F., & Qobilov, G. U.** Influence of salinity on growth, development and symbiotic properties of legumes, rhizobia symbiosis of alfalfa in vegetation experiments. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 7(3), 78-85.
- Muzangwa, L., Mnkeni, P. N. S., & Chiduzza, C. (2020).** The Use of Residue Retention and Inclusion of Legumes to Improve Soil Biological Activity in Maize-Based No-Till Systems of the Eastern Cape Province, South Africa. *Agricultural Research*, 9(1), 66-76.
- Mwenda, G. (2017).** Characterization of nitrogen-fixing bacteria from *Phaseolus vulgaris* L. in Kenya (Doctoral dissertation, Murdoch University).
- Mwenda, G. M., O'Hara, G. W., De Meyer, S. E., Howieson, J. G., & Terpolilli, J. J. (2018).** Genetic diversity and symbiotic effectiveness of *Phaseolus vulgaris*-nodulating rhizobia in Kenya. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4), 291-299.
- N'guessan, K. O. U. A. M. E., Jacob, K. N. D., Koutoua, A. Y. O. L. I. E., Blaise, Y. K., & Justin, Y. K. (2020).** Influence de l'association culturale sur la capacité de nodulation de trois espèces de légumineuses : Arachide, Niébé et Soja vert. *Journal of Applied Biosciences*, 145, 14930-14937.
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014).** The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2), 429-448.
- Naher, U. A., Choudhury, A. T., Biswas, J. C., Panhwar, Q. A., & Kennedy, I. R. (2020).** Prospects of using leguminous green manuring crop *Sesbania rostrata* for supplementing fertilizer nitrogen in rice production and control of environmental pollution. *Journal of Plant Nutrition*, 43(2), 285-296.
- Nandanwar, S., Yele, Y., Dixit, A., Goss-Souza, D., Singh, R., Shanware, A., & Kharbikar, L. (2020).** Effects of Pesticides, Temperature, Light, and Chemical Constituents of Soil on Nitrogen Fixation. In *Nitrogen Fixation*. IntechOpen.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M. K., Gómez, B. M., Blanco, L., & Lara, M. (2017).** Differentially expressed genes in mycorrhized and nodulated roots of common bean are associated with defense, cell wall architecture, N metabolism, and P metabolism. *PLoS one*, 12(8), e0182328.
- Nascente, A.S., Carvalho, M.D.C.S., Melo, L.C. & Rosa, P.H. (2017).** Nitrogen management effects on soil mineral nitrogen, plant nutrition and yield of super early cycle common bean genotypes. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 39(3), 369-378.
- Nassary, E. K., Baijukya, F., & Ndakidemi, P. A. (2020).** Assessing the Productivity of Common Bean in Intercrop with Maize across Agro-Ecological Zones of Smallholder Farms in the Northern Highlands of Tanzania. *Agriculture*, 10(4), 117.
- Nassary, E.K., Baijukya, F. & Ndakidemi, P.A. (2020).** Productivity of intercropping with maize and common bean over five cropping seasons on smallholder farms of Tanzania. *European Journal of Agronomy*, 113, 125964.
- Negrão, S., Schmöckel, S. M., & Tester, M. (2016).** Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119(1), 1-11.
- Nemecek, T., Hayer, F., Bonnin, E., Carrouée, B., Schneider, A., & Vivier, C. (2015).** Designing eco-efficient crop rotations using life cycle assessment of crop combinations. *European Journal of Agronomy*, 65, 40-51.
- Neuschwandtner, R., Ziegler, K., Krieger, S., Wagentristl, H. and Kaul, H. P. (2015).** Nitrogen yield and nitrogen fixation of winter faba beans. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 65(7), 658-666.
- Nichols, P. G. H., Malik, A. I., Stockdale, M., & Colmer, T. D. (2009).** Salt tolerance and avoidance mechanisms at germination of annual pasture legumes: importance for adaptation to saline environments. *Plant and Soil*, 315(1-2), 241.
- Nimac, A., Štajcer, I., Štavić, Z., Carović-Stanko, K., & Lazarević, B. (2020).** Effects of nitrogen deficiency on some physiological parameters and root traits of three Croatian common bean landraces. *sa55*, 70.
- Njeru, E. M., Muthini, M., Muindi, M. M., Ombori, O., Nchore, S. B., Runo, S., & Maingi, J. M. (2020).** Exploiting Arbuscular Mycorrhizal Fungi-Rhizobia-Legume Symbiosis to Increase Smallholder Farmers' Crop Production and Resilience Under a Changing Climate. In *Climate Impacts on Agricultural and Natural Resource Sustainability in Africa* (pp. 471-488). Springer, Cham.



- Nonogaki, H., Bassel, G. W., & Bewley, J. D. (2010). Germination-still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574-581.
- Núñez-Barrios, A. N., Ritchie, J., & Smucker, A. J. (1998). El efecto de sequía en el crecimiento, la fotosíntesis y la intercepción de luz en frijol común (Effect of drought on photosynthesis, growth, and light interception in dry beans). *Agron. Mesoam.*, 9(2), 1-8.
- Nyabyenda, P. (2005). Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique: généralités, légumineuses alimentaires, plantes à tubercules et racines céréales. Presses agronomiques de Gembloux.
- Ojiem, J. O., Vanlauwe, B., de Ridder, N., & Giller, K. E. (2007). Niche-based assessment of contributions of legumes to the nitrogen economy of Western Kenya smallholder farms. *Plant and Soil*, 292(1-2), 119-135.
- Omae, H., Kumar, A., & Shono, M. (2012). Adaptation to high temperature and water deficit in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during the reproductive period. *Journal of Botany*, 6 p.
- Orchard, T. (1977). Estimating the parameters of plant seedling emergence. *Seed Science and Technology*, 5, 61-69.
- Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L. G., Ollero, F. J., Nicolás, M. F., Pains Rodrigues, E., Shigeyoshi Nakatani, A., Silva Batista, J. S., Oliveira Chueire, L. M., Souza, R. C., Ribeiro Vasconcelos, A. T., Megías, M., Hungria, M., Martínez-Romero, E. (2012) Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genom.*, 13, 735.
- Oros-Ortega, I., Lara-Pérez, L. A., Casanova-Lugo, F., Díaz-Echeverría, V. F., Villanueva-López, G., Ramírez-Barajas, P. J., & Cetzal-Ix, W. (2020). Diversity and Importance of the Relationship Between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Nitrogen-Fixing Bacteria in Tropical Agroforestry Systems in Mexico. In *Plant Microbe Symbiosis* (pp. 21-34). Springer, Cham.
- Osdaghi, E., Alizadeh, A., Shams-Bakhsh, M., & Lak, M. R. (2009). Evaluation of common bean lines for their reaction to the common bacterial blight pathogen. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(3), 461-468.
- Osdaghi, E., Shams-Bakhsh, M., Alizadeh, A., Lak, M. R., & Maleki, H. H. (2011). Induction of resistance in common bean by *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli and decrease of common bacterial blight. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(1), 45-54.
- Osman, A. (2012). Sensitivity of some nitrogen fixers and the target pest *Fusarium oxysporum* to fungicide thiram. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(1), 25-29.
- Osorio Vega, N. W. (2007). A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 60(1), 3621-3643.
- Otieno, P., Muthomi, I., Chemining'wa, G., & Nderitu, J. (2009). Nodulation and Yield of Food Grain Legumes. *Journal of Biological Sciences*, 9(4), 326-332.
- Ouma, E. W., Asango, A. M., Maingi, J., & Njeru, E. M. (2016). Elucidating the potential of native rhizobial isolates to improve biological nitrogen fixation and growth of common bean and soybean in smallholder farming systems of Kenya. *International Journal of Agronomy*, 7 p.
- Pampana, S., Masoni, A., & Arduini, I. (2016). Grain legumes differ in nitrogen accumulation and remobilization during seed filling. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 66(2), 127-132.
- Pandey, A., Tripathi, P. H., Pandey, S. C., & Joshi, T. (2020). Multifaceted beneficial effects of plant growth promoting bacteria and rhizobium on legume production in hill agriculture. In *Recent Advancements in Microbial Diversity* (pp. 113-146). Academic Press.
- Panneerselvam, R., Muthukumarasamy, M., & Rajan, S. N. (1998). Amelioration of NaCl stress by triadimefon in soybean seedlings. *Biol. Plant.*, 41(1), 133-137.
- Panuccio, M. R., Jacobsen, S. E., Akhtar, S. S., & Muscolo, A. (2014). Effect of saline water on seed germination and early seedling growth of the halophyte quinoa. *AoB Plants*, 6, 1-18.
- Papakosta, D. K., & Gagianas, A. A. (1991). Nitrogen and dry matter accumulation, remobilization, and losses for Mediterranean wheat during grain filling. *Agronomy Journal*, 83(5), 864-870.
- Papastylianou, I. (2004). Effect of rotation system and N fertilizer on barley and vetch grown in various crop combinations and cycle lengths. *The Journal of Agricultural Science*, 142(1), 41-48.

- Pareek, R. P., & RP, P. (1973). Release of phosphate from tricalcium and rock phosphates by organic acids. *Curr. Sci.*, 42(8), 278-279.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4056-4075.
- Parniske, M. (2008). *Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses*. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775.
- Pastor-Bueis, R., Sánchez-Cañizares, C., James, E. K., & González-Andrés, F. (2019). Formulation of a Highly Effective Inoculant for Common Bean based on an Autochthonous Elite Strain of *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli*, and Genomic-based Insights into its Agronomic Performance. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2724.
- Patra, A.K., Abbadie, L., Clays, A., Degrange, V., Grayston, S., et al. (2006). Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environmental Microbiology*, 8, 1005-1016.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 17-42.
- Peng, G., Yuan, Q., Li, H., Zhang, W., & Tan, Z. (2008). *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(9), 2158-2163.
- Pérez-Montañó, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., & Cubo T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5), 325-336.
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* (pp. 179-197). Springer, New York, NY.
- Petrović, G., Jovičić, D., Nikolić, Z., Tamindžić, G., Ignjatov, M., Milošević, D., & Milošević, B. (2016). Comparative study of drought and salt stress effects on germination and seedling growth of pea. *Genetika*, 48(1), 373-381.
- Petry, N., Boy, E., Wirth, J. P., & Hurrell, R. F. (2015). The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron biofortification. *Nutrients*, 7(2), 1144-1173.
- Philips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedure for declaring and staining parasitic and VAM fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycol. Society*, 55, 158-161.
- Phillips, R. D. (1993). Starchy legumes in human nutrition, health and culture. *Plant Foods for Human Nutrition*, 44(3), 195-211.
- Piazza, G., Ercoli, L., Nuti, M., & Pellegrino, E. (2019). Interaction between conservation tillage and nitrogen fertilization shapes prokaryotic and fungal diversity at different soil depths: Evidence from a 23-Year field experiment in the Mediterranean area. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2047.
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
- Plassard, C., & Dell B. (2010). Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology*, 30(9), 1129-1139.
- Plaxton, W. C., & Tran, H. T. (2011). Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiology*, 156(3), 1006-1015.
- Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 291.
- Popović, V., Miladinović, J., Vidić, M., Ikanović, J., Đekić, V., Filipović, V., Kolarić, L. J., Jokanović, B. M., & Čobanović, L. (2015). Productive characteristics of soybean in agroecological conditions of Sremska Mitrovica, Serbia. *Agriculture and Forestry*, 61(1), 67-75.
- Popović, V., Vidić, M., Ikanović, J., Filipović, V., Đekić, V., Tabaković, M., & Veselić, J. (2016). Soybean oil yield as affected by the growing locality in agro-climatic divergent years. *Agriculture and Forestry*, 62(1), 217-225.
- Porcel, R., Aroca, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2012). Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 181-200.



- Porch, B., SJ, D., GD, J., & AS, K. DJ, & Dempewolf, H. (2013).** Use of Wild Relatives and Closely Related Species to Adapt Common Bean to climate Change. *Agronomy*, 3(2), 433-461.
- Porrás-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011).** Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 291-315.
- Postma, J.W., Olsson, P.A., & Falkengren-Grerup, U. (2007).** Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 400-408.
- Prasanth, S. S., Magesh, N. S., Jitheshlal, K. V., Chandrasekar, N., & Gangadhar, K. (2012).** Evaluation of groundwater quality and its suitability for drinking and agricultural use in the coastal stretch of Alappuzha District, Kerala, India. *Applied Water Science*, 2(3), 165-175.
- Premono, M. E., Moawad, A. M., & Vlek, P. L. G. (1996).** Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere (No. REP-12113. CIMMYT.).
- Pringle, E. G. (2016).** Integrating plant carbon dynamics with mutualism ecology. *New Phytologist*, 210(1), 71-75.
- Priya, T. R., & Manickavasagan, A. (2020).** Common Bean. In Pulses (pp. 77-97). Springer, Cham.
- Pujolà, M., Farreras, A., & Casañas, F. (2007).** Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 102(4), 1034-1041.
- Puppo, A., & Rigaud, J. (1975).** Indole-3-Acetic Acid (IAA) Oxidation by Leghemoglobin form Soybean. *Physiologia Plantarum*, 35(3), 181-185.
- Puri, A., Padda, K. P., & Chanway, C. P. (2017).** Plant growth promotion by endophytic bacteria in nonnative crop hosts. In Endophytes: Crop Productivity and Protection (pp. 11-45). Springer, Cham.
- Purseglove, J. W. (1968).** Tropical Crops: Dicotyledons, Longmans, Longmans, London.
- Quides, K. W., Stomackin, G. M., Lee, H. H., Chang, J. H., & Sachs, J. L. (2017).** Lotus japonicus alters in planta fitness of Mesorhizobium loti dependent on symbiotic nitrogen fixation. *PLoS One*, 12(9), e0185568.
- Rady, M. M., Mohamed, G. F., Abdalla, A. M., & Ahmed, Y. H. (2015).** Integrated application of salicylic acid and Moringa oleifera leaf extract alleviates the salt-induced adverse effects in common bean plants. *International Journal of Agricultural Technology*, 11(7), 1595-1614.
- Abhijit, R., Sharma, V., & Heitholt, J. (2020).** Dry Bean [*Phaseolus vulgaris* L.] Growth and Yield Response to Variable Irrigation in the Arid to Semi-Arid Climate. *Sustainability*, 12(9), 3851.
- Rainey, K. M., & Griffiths, P. D. (2005).** Differential response of common bean genotypes to high temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(1), 18-23.
- Ramaekers, L., Galeano, C. H., Garzon, N., Vanderleyden, J., & Blair, M. W. (2013).** Identifying quantitative trait loci for symbiotic nitrogen fixation capacity and related traits in common bean. *Molecular Breeding*, 31(1), 163-80.
- Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2008).** Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58(11), 2484-2490.
- Ramírez-Viga, T., Guadarrama, P., Castillo-Argüero, S., Estrada-Medina, H., García-Sánchez, R., Hernández-Cuevas, L., Sánchez-Gallén, I., & Ramos-Zapata, J. (2019).** Relationship between arbuscular mycorrhizal association and edaphic variables in mangroves of the coast of Yucatán, Mexico. *Wetlands*, 1-11.
- Ramos, M. L. G., Parsons, R., Sprent, J. I., & James, E. K. (2003).** Effect of water stress on nitrogen fixation and nodule structure of common bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(3), 339-347.
- Ranjbar Sistani, N., Kaul, H. P., Desalegn, G., & Wienkoop, S. (2017).** *Rhizobium* impacts on seed productivity, quality, and protection of *Pisum sativum* upon disease stress caused by *Didymella pinodes*: phenotypic, proteomic, and metabolomic traits. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1961.
- Rao, I. M., Miles, J. W., Beebe, S. E., & Horst, W. J. (2016).** Root adaptations to soils with low fertility and aluminium toxicity. *Annals of Botany*, 118(4), 593-605.

- Rashmi, I., Roy, T., Kartika, K. S., Pal, R., Coumar, V., Kala, S., & Shinoji, K. C. (2020). Organic and Inorganic Fertilizer Contaminants in Agriculture: Impact on Soil and Water Resources. In *Contaminants in Agriculture* (pp. 3-41). Springer, Cham.
- Ray, R. L., Griffin, R. W., Fares, A., Elhassan, A., Awal, R., Woldesenbet, S., & Risch, E. (2020). Soil CO<sub>2</sub> emission in response to organic amendments, temperature, and rainfall. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14.
- Recchia, G. H., Konzen, E. R., Cassieri, F., Caldas, D. G., & Tsai, S. M. (2018). Arbuscular mycorrhizal symbiosis leads to differential regulation of drought-responsive genes in tissue-specific root cells of common bean. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1339.
- Reckling, M., Bergkvist, G., Watson, C. A., Stoddard, F. L., & Bachinger, J. (2020). Re-designing organic grain legume cropping systems using systems agronomy. *European Journal of Agronomy*, 112, 125951.
- Rejili, M., Vadel, A.M., Guetet, A., Mahdhi, M., Lachiheb, B., Ferchichi, A., & Mars, M. (2010). Influence of temperature and salinity on the germination of *Lotus creticus* (L.) from the arid land of Tunisia. *Afr. J. Ecol.*, 48(2): 329-337.
- Remans, R., Ramaekers, L., Schelkens, S., Hernandez, G., Garcia, A., Reyes, J.L., Mendez, N., Toscano, V., Mulling, M., Galvez, L., & Vanderleyden, J. (2008). Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant and Soil*, 312(1-2), 25-37.
- Rémond, D., & Walrand, S. (2017). Les graines de légumineuses : caractéristiques nutritionnelles et effets sur la santé. *Innovations Agronomiques*, INRA, 60.
- Reverri, E. J., Randolph, J. M., Kappagoda, C. T., Park, E., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. M. (2017). Assessing beans as a source of intrinsic fiber on satiety in men and women with metabolic syndrome. *Appetite*, 118, 75-81.
- Reyes, J. O., Bendezú, S. G., & Joaquín A. H. (2016). Molybdenum and Cobalt Application in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with Two Fertilization Systems under No-Tillage. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, p.72.
- Ribeiro, R. A., Rogel, M. A., Lopez-Lopez, A., Ormeno-Orrillo, E., Barcellos, F. G., Martínez, J., Thompson, F. L., Martínez-Romero, E., Hungria, M. (2012). Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62, 1179-1184.
- Ribeiro, R. A., Martins, T. B., Ormeño-Orrillo, E., Delamuta, J. R. M., Rogel, M. A., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2015). *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N<sub>2</sub>-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(9), 3162-3169.
- Robertson, G. P., Bruulsema, T. W., Gehl, R. J., Kanter, D., Mauzerall, D. L., Rotz, C. A., & Williams, C. O. (2013). Nitrogen-climate interactions in US agriculture. *Biogeochemistry*, 114(1-3):41-70.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314-330.
- Román-Ponce, B., Zhang, Y. J., Vásquez-Murrieta, M. S., Sui, X. H., Chen, W. F., Padilla, J. C. A., ... & Wang, E. T. (2016). *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 398-406.
- Roy, S. J., Negrão, S., & Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 115-124.
- Ruffino, A. M. C., Rosa, M., Hilal, M., González, J. A., & Prado, F. E. (2010). The role of cotyledon metabolism in the establishment of quinoa (*Chenopodium quinoa*) seedlings growing under salinity. *Plant Soil*, 326(1-2), 213-224.
- Rustamova, N., Wubulikasimu, A., Mukhamedov, N., Gao, Y., Egamberdieva, D., & Yili, A. (2020). Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Vernonia anthelmintica*: Diversity and Characterization. *Current Microbiology*, 1-9.
- Sabagh, A. E., Hossain, A., Islam, M. S., Fahad, S., Ratnasekera, D., Meena, R. S., ... & Fatima, M. (2020). Nitrogen Fixation of Legumes Under the Family Fabaceae: Adverse Effect of Abiotic Stresses and Mitigation Strategies. In *The Plant Family Fabaceae* (pp. 75-111). Springer, Singapore.

- Saidi, S., Ramirez-Bahena, M.-H., Santillana, N., Zuniga, D., Alvarez-Martinez, E., Peix, A., Mhamdi, R., and Velazquez, E. (2014). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 242–247.
- Samago, T. Y., Anniye, E. W., & Dakora, F. D. (2018). Grain yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties is markedly increased by rhizobial inoculation and phosphorus application in Ethiopia. *Symbiosis*, 75(3), 245-255.
- Sánchez-Reinoso, A. D., Ligarreto-Moreno, G. A., & Restrepo-Díaz, H. (2020). Evaluation of drought indices to identify tolerant genotypes in common bean bush (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 19(1), 99-107.
- Sanyal, D., Osorno, J. M., & Chatterjee, A. (2020). Influence of Rhizobium inoculation on dry bean yield and symbiotic nitrogen fixation potential. *Journal of Plant Nutrition*, 43(6), 798-810.
- Sarabia, L., Solorio, F. J., Ramírez, L., Ayala, A., Aguilar, C., Ku, J., ... & Boddey, R. M. (2020). Improving the Nitrogen Cycling in Livestock Systems Through Silvopastoral Systems. In *Nutrient Dynamics for Sustainable Crop Production* (pp. 189-213). Springer, Singapore.
- Sarker, A., Hossain, M. I., & Kashem, M. A. (2014). Salinity (NaCl) tolerance of four vegetable crops during germination and early seedling growth. *Int. J. Latest Res. Sci. Technol.*, 3(1), 91-95.
- Schabes, F. I., & Sigstad, E. E. (2005). Calorimetric studies of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seed germination under saline stress conditions. *Thermochim. Acta*, 428(1-2), 71-75.
- Schenk, H. J. (2006). Root competition: beyond resource depletion. *Journal of Ecology*, 94(4), 725-739.
- Schmidt, T. M., Thomé, A. H. E., Sperotto, R. A., & Granada, C. E. (2019). Effect of rhizobia inoculation on the development of soil-borne pathogens infecting common bean plants. *European Journal of Plant Pathology*, 153(3), 687-694.
- Segovia, L., Young, J. P. W., & Martínez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 374-377.
- Senyolo, M. P., Long, T. B., Blok, V., & Omta, O. (2018). How the characteristics of innovations impact their adoption: An exploration of climate-smart agricultural innovations in South Africa. *Journal of Cleaner Production*, 172, 3825-3840.
- Seppänen, M. M., Alitalo, V., Bäckström, H. K., Mäkinen, K., Jokela, V., Falghera-Winseman, L. & Khazaei, H. (2018). Growth, freezing tolerance, and yield performance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars grown under controlled and field conditions in northern latitudes. *Canadian Journal of Plant Science*, 98(5), 1109-1118.
- Sethi, R. P., & Subba-Rao, N. S. (1968). Solubilization of tricalcium phosphate and calcium phytate by soil fungi. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 14(3), 329-331.
- Seyahjani, E. A., Yarnia, M., Farahvash, F., Benam, M. B. K., & Rahmani, H. A. (2020). Influence of *Rhizobium*, *Pseudomonas* and Mycorrhiza on Some Physiological Traits of Red Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under different irrigation conditions. *Legume Research-An International Journal*, 43(1), 81-86.
- Shamseldin, A., & Velázquez, E. (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(63), 63.
- Shamseldin, A., Moawad, H., Khalafallah, M., Fayez, M., & Monib, M. (2012). Pot and field assessment of the symbiotic performance of new identified *Rhizobium* strains nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Egypt under nitrogen and phosphorus fertilization. *Journal of Applied Sciences Research*, (August), 4001-4008.
- Shannon, M. C., & Grieve, C. M. (1998). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci. Hortic.*, 78(1-4), 5-38.
- Sharma, V., Bhattacharyya, S., Kumar, R., Kumar, A., Ibañez, F., Wang, J., Guo, B., Sudini, H. K., Gopalakrishnan, S., DasGupta, M., Varshney, R. K., Pandey, M. K. (2020). Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between *Bradyrhizobium* and ‘Crack-Entry’ Legume Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plants*, 9(2), 276.
- Sharma, M. P., Grover, M., Chourasiya, D., Bharti, A., Agnihotri, R., Maheshwari, H. S., ... & Natarajan, M. (2020). Deciphering the role of trehalose in tripartite symbiosis among rhizobia, arbuscular mycorrhizal fungi and legumes for enhancing abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2219.

- Sheikh, N. A., & Sanders, F. E. (1988).** Effect of temperature on germination mycorrhizal spores and VAM infection in roots. *Biologia*, 34, 337-350
- Shelef, O., Gross, A., & Rachmilevitch, S. (2012).** The use of *Bassia indica* for salt phytoremediation in constructed wetlands. *Water Research*, 46(13), 3967-3976.
- Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., & Huang Y. (2008).** Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18(6-7), 287-296.
- Shi, Z., Zhu, Y., Teng, C., Yao, Y., Ren, G., & Richel, A. (2020).** Anti-obesity effects of  $\alpha$ -amylase inhibitor enriched-extract from white common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) associated with the modulation of gut microbiota composition in high-fat diet-induced obese rats. *Food & Function*, 11(2), 1624-1634.
- Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015).** Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123-131.
- Sierra, J., & Tournebize, R. (2019).** Fixation symbiotique d'azote par les légumineuses en association. Résultats obtenus en Guadeloupe. 12 p. (hal-02373208).
- Silva, D. A. D., Pinto-Maglio, C. A. F., Oliveira, É. C. D., Reis, R. L. D. M. D., Carbonell, S. A. M., & Chiorato, A. F. (2020).** Influence of high temperature on the reproductive biology of dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia Agricola*, 77(3).
- Silveira, M. L., & Kohmann, M. M. (2020).** Maintaining soil fertility and health for sustainable pastures. In *Management Strategies for Sustainable Cattle Production in Southern Pastures* (pp. 35-58). Academic Press. Abstrait.
- Sinclair, T. R., & Vadez, V. (2012).** The future of grain legumes in cropping systems. *Crop and Pasture Science*, 63(6), 501-512.
- Sindhu, S., Dahiya, A., Gera, R., & Sindhu, S. S. (2020).** Mitigation of Abiotic Stress in Legume-Nodulating Rhizobia for Sustainable Crop Production. *Agricultural Research*, 1-16.
- Singal, R., Gupta, R., Kuhad, R. C., & Saxena, R. K. (1991).** Solubilization of inorganic phosphates by a basidiomycetous fungus *Cyathus*. *Indian Journal of Microbiology*, 31(4), 397-401.
- Singh S.P., 1992.** Common bean improvement in the tropics. *Plant Breed. Rev.*, 10, 199-269.
- Singh, G. P., Singh, P. L., & Panwar, A. S. (2011).** Response of groundnut (*Arachis hypogaea*) to biofertilizer, organic and inorganic sources of nutrient in North East India. *Legume Research- An International Journal*, 34(3), 196-201.
- Singh, S., & Schwartz, H. (2010).** Breeding common bean for resistance to insect pests and nematodes. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(2), 239-250.
- Singh, T. B., Ali, A., Prasad, M., Yadav, A., Shrivastav, P., Goyal, D., & Dantu, P. K. (2020).** Role of Organic Fertilizers in Improving Soil Fertility. In *Contaminants in Agriculture* (pp. 61-77). Springer, Cham.
- Smethurst, P. J. (2010).** Forest fertilization: trends in knowledge and practice compared to agriculture. *Plant and Soil*, 335(1-2), 83-100.
- Smil, V. (2002).** Nitrogen and food production: proteins for human diets. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), 126-131.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010).** Mycorrhizal symbiosis. Academic press.
- Smoliak, S., Ditterline, R. L., Scheetz, J. D., Holzworth, L. K., Sims, J. R., Wiesner, J. R., ... & Tibke, G. L. (1990).** Common bean. Montana State University, Animal and Range Sciences Extension Service, Forage extension program, Bozeman, USA.
- Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R. K., Roorkiwal, M., Pandey, M. K., Hu, J., Li, Y. H., Wang, L. X., Guo, Y., Qiu, L. J., Redden, R. J., & Varshney, R. K. (2015).** Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 43-104.
- Sofi, P. A., Saba, I., & Amin, Z. (2017).** Root architecture and rhizobial inoculation in relation to drought stress response in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Applied and Natural Science*, 9(1), 502-507.
- Sofkova S, Poryazov I, Kiryakov I (2010)** Breeding green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) for complex disease resistance. *Genetics and Breeding*, 38 (3), 77-88.



- Söğüt, M. A., Göze, F. G., Önal, T., Devran, Z., & Tonguc, M. (2014).** Screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars against root-lesion nematode species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(4), 455-461.
- Somasegaran, P., & Hoben H. J. (2012).** Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. *Springer Science & Business Media*.
- Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015).** Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401-419.
- Srinivasan, T. (2017).** Studies on antifungal activity of siderophores produced by rhizobium spp isolated from groundnut (*Arachis hypogaea*). *Journal of Agricultural Science and Food Research*, 8(4), 1-2.
- Stajkovic, O., Delic, D., Josic, D., Kuzmanovic, D., Rasulic, N., & Knezevic-Vukcevic, J. (2011).** Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(1), 5919-5926.
- Statista Research Department (2019).** Production de légumes secs en Algérie entre 2016 et 2017, par type de légumes. Pour la campagne agricole 2016/2017. <https://fr.statista.com/statistiques/990929/production-totale-de-legumes-secs-par-type-algerie/>
- Steiner, F., Ferreira, H. C. P., & Zuffo, A. M. (2019).** Can co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* increase common bean nodulation and grain yield?. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(1), 81-98.
- Stephane, Y. G. H., Laurette, N. N., Carnot, A. C., Claire, N. N. A. I., Albert, N., & Dieudonné, N. (2020).** Isolation and characterization of legume nodulating bacteria obtained from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodules. *gsj*, 8(5).
- Sun, Q., Liu, Y., Liu, H., & Dumroese, R. K. (2020).** Interaction of Biochar Type and Rhizobia Inoculation Increases the Growth and Biological Nitrogen Fixation of *Robinia pseudoacacia* Seedlings. *Forests*, 11(6), 711.
- Suradkar, K., & Hande, D. (2020).** Characterization of Bioactive Secondary Metabolites of Fungal Endophytes from Melghat Forest in Maharashtra, India. In *Bioactive Natural products in Drug Discovery* (pp. 599-607). Springer, Singapore.
- Swiader, J. M., Sipp, S. K., & Brown, R. E. (1994).** Pumpkin growth, flowering, and fruiting response to nitrogen and potassium sprinkler fertigation in sandy soil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(3), 414-419.
- Taffouo, V. D., Meguekam, L., Akoa, A., & Ourry, A. (2010).** Salt stress effects on germination, plant growth and accumulation of metabolites in five leguminous plants. *Nong Ye Ke Xue Yu Ji Shu*, 4(2), 27.
- Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L. A., Ennajah, A., Belkhodja, M., & Mulet, J. M. (2016).** Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defense systems in *Phaseolus vulgaris* L. *S. Afr. J. Bot.*, 105, 306-312.
- Tajini, F., Trabelsi, M., & Drevon, J. J. (2012).** Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 157-163.
- Talbi, C., Delgado, M. J., Girard, L., Ramirez-Trujillo, A., Caballero-Mellado, J., & Bedmar, E. J. (2010).** Burkholderia phymatum strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4587-4591.
- Tammam, A. A. (2003).** Response of *Vicia faba* plants to the interactive effect of sodium chloride salinity and salicylic acid treatment. *Acta Agron. Hung.*, 51(3), 239-248.
- Tan-Wilson, A. L., & Wilson, K. A. (2012).** Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 140-153.
- Tavakkoli, E., Rengasamy, P., & McDonald, G.K. (2010).** High concentrations of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. *J. Exp. Bot.*, 61(15), 4449-4459.
- Tawfik, M. M., El Lateef, E. A., Amany, A. B., & Hozayen, M. (2011).** Prospect of biofertilizer inoculation for increasing saline irrigation efficiency. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 7(2), 182-189.
- Taylor, B. N., Simms, E. L., & Komatsu, K. J. (2020).** Plus qu'un groupe fonctionnel : la diversité au sein du mutualisme légumineuse-rhizobium et sa relation avec la fonction de l'écosystème. *Diversité*, 12(2), 50.

- Tembo L., Namebo M., Chanda R., Kafwa K., & Munyinda K. (2019):** Genotypic Variation for Response to Phosphorus Fertilization in Common Bean Mutants. *Crops*, 4(1), 11-16.
- Thomas, R. B., Bashkin, M. A., & Richter, D. D. (2000).** Nitrogen inhibition of nodulation and N<sub>2</sub> fixation of a tropical N<sub>2</sub>-fixing tree (*Gliricidia sepium*) grown in elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *The New Phytologist*, 145(2), 233-243.
- Tian C. Y., Feng G., Li X. L., & Zhang F. S. (2004).** Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants. *Applied Soil Ecology*, 26(2), 143-148.
- Tobe, K., Li, X., & Omasa, K. (2002).** Effects of sodium, magnesium and calcium salts on seed germination and radicle survival of a halophyte, *Kalidium caspicum* (Chenopodiaceae). *Aust. J. Bot.*, 50(2), 163-169.
- Tobe, K., Li, X., & Omasa, K. (2004).** Effects of five different salts on seed germination and seedling growth of *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae). *Seed Sci. Res.*, 14(4), 345-353.
- Toews, R., & Wang, N. (2013).** Physicochemical and functional properties of protein concentrate from pulses. *Food Research International*, 52(2), 445-451.
- Tonelli, M. L., Figueredo, M. S., Rodríguez, J., Fabra, A., & Ibañez, F. (2020).** Induced systemic resistance-like responses elicited by rhizobia. *Plant and Soil*, 1-14.
- Trouvelot, A., Kough J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1986).** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae: proceedings of the 1st european symposium on mycorrhizae, Dijon, 1-5 July 1985* (pp. 217-221).
- Turuko, M., & Mohammed, A. (2014).** Effect of different phosphorus fertilizer rates on growth, dry matter yield and yield components of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World Journal of Agricultural Research*, 2(3), 88-92.
- Unkovich, M. J., & Pate, J. S. (2000).** An appraisal of recent field measurements of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by annual legumes. *Field Crops Research*, 65(2-3), 211-228.
- Vadez V., Rodier F., Payre H., Drevon J. J. (1996).** Nodule permeability to O<sub>2</sub> and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N<sub>2</sub> fixation to P deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)*, 34(6), 871-878.
- Vadez, V., Lasso, J. H., Beck, D. P., & 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(3), 231-242.
- Vakhaniya, N. A., Abashidze, N. D., Chokheli M. D., & Nutsubidze N. N. (1990).** Influence of nitrate and molybdate on nitrogen fixation and productivity of kidney beans. *Fiziologiya Rastenii*, 37(4), 636-641.
- Valentine, A. J., Benedito, V. A., & Kang, Y. (2018).** Legume nitrogen fixation and soil abiotic stress: from physiology to genomics and beyond. *Annual Plant Reviews online*, 207-248.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E., & Velazquez, E. (2006).** *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2631-2637
- Van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A., & Eardly, B. D. (1998).** *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(1), 13-22.
- Vasconcelos, M. W., Grusak, M. A., Pinto, E., Gomes, A., Ferreira, H., Balázs, B., ... & Williams, M. (2020).** The Biology of Legumes and Their Agronomic, Economic, and Social Impact. In *The Plant Family Fabaceae* (pp. 3-25). Springer, Singapore.
- Velázquez, E., Peix, A., Zurdo-Piñero, J. L., Palomo, J. L., Mateos, P. F., Rivas, R., ... & Martínez-Molina, E. (2005).** The coexistence of symbiosis and pathogenicity-determining genes in *Rhizobium rhizogenes* strains enables them to induce nodules and tumors or hairy roots in plants. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(12), 1325-1332.
- Ventura, Y., Eshel, A., Pasternak, D., & Sagi, M. (2015).** The development of halophyte-based agriculture: past and present. *Annals of Botany*, 115(3), 529-540.
- Ventura, Y., Wuddineh, W. A., Myrzabayeva, M., Alikulov, Z., Khozin-Goldberg, I., Shpigel, M., Samocha, T. M., & Sagi, M. (2011).** Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia* halophytes as leafy vegetable crops. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 189-196.



- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586.
- Vibhuti CS, Bargali K and Bargali SS. 2015. Seed germination and seedling growth parameters of rice (*Oryza sativa* L.) varieties as affected by salt and water stress. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 85(1), 102-108.
- Viçosi, K. A., Peixoto, N., & Pelá, A. (2020). Response of snap bean cultivars of determined growing to inoculation with *Rhizobium tropici*. *Agrarian*, 13(49), 352-361.
- Vieira, R. F., Cardoso, E. J. B. N., Vieira, C., & Cassini, S. T. A. (1998). Foliar application of molybdenum in common beans. I. Nitrogenase and reductase activities in a soil of high fertility. *Journal of Plant Nutrition*, 21(1), 169-180.
- Villela, A., Antunes, I., Bevilaqua, G., Eicholz, C., & Fonseca, C. (2015). Évaluation à la ferme de cultivars de haricots créoles (*Phaseolus vulgaris* L.) dans les régions productrices du Rio Grande do Sul / Brésil. In Embrapa Temperate Climate-Summary dans les actes du congrès (ALICE). Dans: *Colloque Des Ressources Génétiques Pour l'Amérique Latine Et Les Caraïbes, 10., 2015, Bento Gonçalves. Les ressources génétiques au 21<sup>e</sup> siècle : de Vavilov au Svalbard. Anais ... [sl]: Société Brésilienne des Ressources Génétiques, 2015.*
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 12(5), 440.
- Volpiano, C. G., Lisboa, B. B., Granada, C. E., São José, J. F. B., de Oliveira, A. M. R., Beneduzi, A., ... & Vargas, L. K. (2019). Rhizobia for biological control of plant diseases. In *Microbiome in plant health and disease* (pp. 315-336). Springer, Singapore.
- Wahab, A. A., & Abd-Alla, M. H. (1995). The role of potassium fertilizer in nodulation and nitrogen fixation of faba bean (*Vicia faba* L.) plants under drought stress. *Biology and Fertility of Soils*, 20(2), 147-150.
- Wahab, A. A., Zahran, H. H. & Abd-Alla, M. H. (1996). Root-hair infection and nodulation of four grain legumes as affected by the form and the application time of nitrogen fertilizer. *Folia Microbiologica*, 41(4), 303-308.
- Wang, F., Wang, E. T., Wu, L. J., Sui, X. H., Li Jr, Y., & Chen, W. X. (2011). *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(11), 2582-2588.
- Wang, Y., & Lu, Y. (2020). Evaluating the potential health and economic effects of nitrogen fertilizer application in grain production systems of China. *Journal of Cleaner Production*, 121635.
- Wang, Y., Yang, J., Jiang, S., Tian, Y., Sun, H., Wang, M., Guangdi, L., & Zhou, D. (2012). Comparison of inorganic solute accumulation in shoots, radicles and cotyledons of *Vicia cracca* during the seedling stage under NaCl stress. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 58(1), 24-31.
- WCD Tutiempo (2019). World Climate Data Tutiempo. Available at: <https://fr.tutiempo.net/climat/2019/ws-605250.html> (accessed 25.11.2018).
- Werner, A. D., Bakker, M., Post, V. E., Vandenbohede, A., Lu, C., Ataie-Ashtiani, B., Simmons, C. T., & Barry, D. A. (2013). Seawater intrusion processes, investigation and management: recent advances and future challenges. *Advances in Water Resources*, 51, 3-26.
- Wien, H. C. (2020). 4 Abiotic Stress Effects on Vegetable Crops. *The Physiology of Vegetable Crops*, 71.
- Wiersum, L. K. (1958). Density of root branching as affected by substrate and separate ions. *Acta Botanica Neerlandica*, 7(2), 174-190.
- Williams, C. M., King, J. R., Ross, S. M., Olson, M. A., Hoy, C. F., & Lopetinsky, K. J. (2014). Effects of three pulse crops on subsequent barley, canola, and wheat. *Agronomy Journal*, 106(2), 343-350.
- World Health Organization. (2020). Regional Overview of Food Security and Nutrition in the Near East and North Africa 2019: Rethinking food systems for healthy diets and improved nutrition. Food & Agriculture Org.
- Wortmann, C. S. (1998). Atlas of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production in Africa (No. 297). CIAT.
- Wortmann, C. S. (2006). "Phaseolus vulgaris L. (common bean): Prota 1: Cereals and pulses/Céréales et légumes secs". [http://database.prota.org/PROTAhtml/Phaseolus%20vulgaris%20\(common%20bean\)\\_En.htm](http://database.prota.org/PROTAhtml/Phaseolus%20vulgaris%20(common%20bean)_En.htm).

- Wortmann, C. S., Brink, M., & Belay, G. (2006).** *Phaseolus vulgaris* L. (common bean). Record from PROTA4U. Brink, M. & Belay, G. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands.
- Wu, G. Q., Liang, N., Feng, R. J., & Zhang, J. J. (2013).** Evaluation of salinity tolerance in seedlings of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars using proline, soluble sugars and cation accumulation criteria. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 2665-2674.
- Xiao, D., Tan, Y., Liu, X., Yang, R., Zhang, W., He, X., & Wang, K. (2019).** Effects of different legume species and densities on arbuscular mycorrhizal fungal communities in a karst grassland ecosystem. *Science of the Total Environment*, 678, 551-558.
- Xu, G., Wolf, S., & Kafkafi, U. (2001).** Interactive effect of nutrient concentration and container volume on flowering, fruiting, and nutrient uptake of sweet pepper. *Journal of Plant Nutrition*, 24(3), 479-501.
- Yadav, K. S., & Dadarwal, K. R. (1997).** Phosphate solubilization and mobilization through soil microorganisms. *Biotechnological Approaches in Soil Microorganisms for Sustainable Crop Production*, 293-308.
- Yadav, S., Modi, P., Dave, A., Vijapura, A., Patel, D., & Patel, M. (2020).** Effect of Abiotic Stress on Crops. *Sustainable Crop Production*, 3.
- Yadegari, M. (2014).** Inoculation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria. *Advances in Environmental Biology*, 419-425.
- Yamaguchi, T., & Blumwald, E. (2005).** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Sci.*, 10(12), 615-620.
- Yan, J., Yan, H., Liu, L. X., Chen, W. F., Zhang, X. X., Verástegui-Valdés, M. M., Wang, E. T., Han, X. Z. (2017).** *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. *Arch. Microbiol.*, 199, 97-104.
- Yang, R., Guo, Q., & Gu, Z. (2013).** GABA shunt and polyamine degradation pathway on  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation in germinating fava bean (*Vicia faba* L.) under hypoxia. *Food Chemistry*, 136(1), 152-159.
- Yang, Q. Q., Farha, A. K., Cheng, L. Z., Kim, G., Zhang, T., & Corke, H. (2020).** Phenolic content and in vitro antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are not directly related to anti-proliferative activity. *Food Bioscience*, 100662.
- Yang, Y., He, Q., Sun, H., Cao, X., Elfalleh, W., Wu, Z., ... & He, S. (2018).** PEGylation may reduce allergenicity and improve gelling properties of protein isolate from black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Bioscience*, 25, 83-90.
- Yin, J., Deng, C. B., Wang, X. F., Chen, G. L., Mihucz, V. G., Xu, G. P., & Deng, Q. C. (2019).** Effects of Long-Term Application of Vinasse on Physicochemical Properties, Heavy Metals Content and Microbial Diversity in Sugarcane Field Soil. *Sugar Tech.*, 21(1), and conventional (chemical) fertilization on soil quality and its seasonal variation. *International Journal of Zoology and Applied Biosciences*, 2(6), 348-355.
- Yu, K., Tichelaar, R., Liu, Y., Savant, N., Lagendijk, E., Van Kuijk, S., ... & Bakker, P. (2019).** Plant-beneficial *Pseudomonas* spp. suppress local root immune responses by gluconic acid-mediated lowering of environmental pH. *Current-Biology-D-19-00852*.
- Yusuf, A. A., Iwuafor, E. N., Abaidoo, R. C., Olufajo, O. O., & Sanginga, N. (2009).** Grain legume rotation benefits to maize in the northern Guinea savanna of Nigeria: fixed-nitrogen versus other rotation effects. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 84(2), 129-139.
- Zahrán H.H. (1999).** Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4), 968-989.
- Zandalinas, S. I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2018).** Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*, 162(1), 2-12.
- Zhang, H. S., Zhou, M. X., Zai, X. M., Zhao, F. G., & Qin, P. (2020).** Spatio-temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi and soil organic carbon in coastal saline soil of China. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
- Zhang, C., Liu, G., Xue, S., & Wang, G. (2016).** Soil bacterial community dynamics reflect changes in plant community and soil properties during the secondary succession of abandoned farmland in the Loess Plateau. *Soil Biology and Biochemistry*, 97, 40-49.

- Zhang, F., Hamel, C., Kianmehr, H., & Smith, D. L. (1995).** Root-zone temperature and soybean [*Glycine max.*(L.) Merr.] vesicular-arbuscular mycorrhizae: development and interactions with the nitrogen fixing symbiosis. *Environmental and Experimental Botany*, 35(3), 287-298.
- Zhang, H., Irving, L. J., McGill, C., Matthew, C., Zhou, D., & Kemp, P. (2010).** The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator. *Ann.Bot.*, 106(6): 1027-1035, DOI: 10.1093/aob/mcq204.
- Zhang, J., Singh, D., Guo, C., Shang, Y., & Peng, S. (2020).** Rhizobia at Extremes of Acidity, Alkalinity, Salinity, and Temperature. In *Microbial Versatility in Varied Environments* (pp. 51-65). Springer, Singapore
- Zhang, Y., Meenu, M., Yu, H., & Xu, B. (2020).** An Investigation on Phenolic and Antioxidant Capacity of Under-utilized Food Legumes Consumed in China. *Foods*, 9(4), 438.
- Zhang, Y., Xie, D., Ni, J., & Zeng, X. (2020).** Conservation tillage practices reduce nitrogen losses in the sloping upland of the Three Gorges Reservoir area: No-till is better than mulch-till. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 300, 107003.
- Zhao, J., Yang, Y., Zhang, K., Jeong, J., Zeng, Z., & Zang, H. (2020).** Does crop rotation yield more in China? A meta-analysis. *Field Crops Research*, 245, 107659.
- Zurdo-Piñeiro, J.L., García-Fraile, P., Rivas, R., Peix, A., León-Barrios, M., Willems, A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E., & Van Berkum, P. (2009).** Rhizobia from Lanzarote, the Canary Islands, that nodulate *Phaseolus vulgaris* have characteristics in common with *Sinorhizobium meliloti* isolates from main land Spain. *Appl Environ Microbiol* 75:2354–2359.

ANNEXE  
ANNEXE

## Annexe 1 - Composition de milieu de culture YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970).

Utilisé pour la culture courante des souches de BNL, sa composition en gramme par litre est la suivante :

Extrait de levure .....	1g	<b>Bergersen (1961)</b> CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O      0.53g KCl                              1g FeCl <sub>3</sub> 0.02g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O      4.5g MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O            1g H <sub>2</sub> O distillée            1000ml
Agar-Agar .....	15g	
Mannitol .....	10g	
Solution minérale de Bergersen 10 M.....	100ml	

H<sub>2</sub>O distillée.....qsp 1000ml  
 pH (6,9 -7)

Autoclavage 120°C pendant 20 minutes.

Composition de milieu YMA + Rouge Congo en g/l YMB 1000 ml :

Solution stock de rouge Congo 10 ml, Agar 18 g, pH 6.8 ; Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes. Après ajustement de pH, on ajoute 10 ml de rouge Congo (0.25g rouge Congo dans 100 ml d'eau distillée), puis on ajoute de l'agar.

## Annexe 2 - Mc Farland n° 5 (15 x 10<sup>8</sup> UFC/ml) (NCCLS, 2000)

BaCl<sub>2</sub> (1.175%)..... 0.5 ml  
 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>..... 9.5 ml

### Composition des standards de turbidité de Mac Farland

Standard de turbidité numéro	Dihydrate de chlorure de baryum (1,175 %), en ml	Acide sulfurique (1%), en ml	Densité approximative correspondante de bactéries/ml
0,5	0,5	99,5	1.10 <sup>8</sup>
1	0,1	9,9	3.10 <sup>8</sup>
2	0,2	9,8	6.10 <sup>8</sup>
3	0,3	9,7	9.10 <sup>8</sup>
4	0,4	9,6	12.10 <sup>8</sup>
5	<b>0,5</b>	<b>9,5</b>	<b>15.10<sup>8</sup></b>
6	0,6	9,4	18.10 <sup>8</sup>
7	0,7	9,3	21.10 <sup>8</sup>
8	0,8	9,2	24.10 <sup>8</sup>
9	0,9	9,1	27.10 <sup>8</sup>
10	1	9,0	30.10 <sup>8</sup>

### **Annexe 3 - Solution nutritive (Rigaud et Puppo,1975).**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.2 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0.2 g/l
KCl.....	0.2g/l
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	120 mg/l
Na <sub>2</sub> FeEDTA .....	25 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	4 mg/l
MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	2 mg/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O .....	2 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	3 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	18 mg/l
CoCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	0.120 mg/l

### **Annexe 4 - PVK (Pikovskaya) (Pikovskaya, 1948)**

Glucose.....	10g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .....	5g
KCl .....	0,2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,1g
Nacl .....	0,2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0,5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,02g
MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,002g
Agar.....	20g
pH: 7	



# PRODUCTION PRODUCTION SCIENTIFIQUE

1. **Mansouri L.M.**, Kheloufi A., Belatreche R., Abdou I., Boukhatem Z.F., Heleili N. (2020). Effects of nitrogen fertilization on Mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* L. Contemporary Agriculture, 69 (3-4): 61-72. (*accepted and will be published in December 2020*) <https://dx.doi.org/10.2478/contagri-2020-0009>
2. **Mansouri L.M.**, Kheloufi A., Belatreche R., Heleili N., Boukhatem Z.F. (2020). Effect of nitrogen fertilizer on growth, flowering, fruiting and nodulation of three varieties of Common bean in the arid region of Aïn Naga (Biskra, Algeria). Cercetări Agronomice în Moldova (Agronomic Research in Moldavia), 53(1):19-35. <https://doi.org/10.2478/cerce-2020-0004>
3. **Mansouri L.M.**, Heleili N., Boukhatem Z.F., Kheloufi A. (2019). Seed germination and radicle establishment related to type and level of salt in common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Djedida*). Cercetări Agronomice în Moldova (Agronomic Research in Moldavia), 52(3):262-277. <https://doi.org/10.2478/cerce-2019-0026>
4. **Mansouri L.M.**, Kheloufi A. (2017). Effect of diluted seawater on seed germination and seedling growth of three leguminous crops (Pea, Chickpea and Common bean). Poljoprivreda i Sumarstvo, 63(2):131-142. <https://doi.org/10.17707/agricultforest.63.2.11>



University of Novi Sad, Serbia  
Faculty of Agriculture

## Contemporary Agriculture

**Certificate of acceptance for the manuscript titled:**

**Effects of nitrogen fertilization on mycorrhizal infection, nodulation and growth of  
*Phaseolus vulgaris* L.**

**Authored by:**

**Lahouania Mounia Mansouri, Abdenour Kheloufi, Rabah Belatreche,  
Imene Abdou, Zineb Faiza Boukhatem, Heleili Nouzha**

**has been accepted for publication in *Contemporary Agriculture***

**Editor:**

**dr Branka Ljevnaić-Mašić**

**June 2020.**





Original scientific paper

UDC: 582.736.3  
DOI: 10.2478/contagri-2020-0009

## EFFECTS OF NITROGEN FERTILIZATION ON MYCORRHIZAL INFECTION, NODULATION AND GROWTH OF *PHASEOLUS VULGARIS* L.

LAHOUARIA MOUNIA MANSOURI<sup>1\*</sup>, ABDENOUR KHELOUFI<sup>1</sup>, RABAH BELATRECHE<sup>1</sup>,  
IMENE ABDOU<sup>2</sup>, ZINEB FAIZA BOUKHATEM<sup>3</sup>, HELEILI NOUZZA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>University of Batna 2, Department of Ecology and Environment, Batna 05078, Algeria

<sup>2</sup>University of Batna 1, Department of Chemistry, Batna 05000, Algeria

<sup>3</sup>University of Oran 1, Department of Biotechnology, Oran 31000, Algeria

<sup>4</sup>University of Batna 1, Department of Veterinary Sciences, Batna 05000, Algeria

Corresponding author: [l.mansouri@univ-batna2.dz](mailto:l.mansouri@univ-batna2.dz)

### SUMMARY

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) has been the subject of a number of studies and has been described by many authors as a legume with low nitrogen fixing potential compared to other legume species. The first objective of this study is to assess the development and growth of *P. vulgaris* L. var. Djedida and its yield at different developmental stages (vegetative, flowering and fruiting), in the presence and absence of nitrogen fertilizer (Urea 46) in an arid climate and in a soil containing high level of CaCO<sub>3</sub> and assimilable phosphorus. The second objective is to carry out a survey on nodulation, number of spores and mycorrhizal infection under these conditions. The results showed that the nitrogen fertilizer amendment is mainly significant ( $p < 0.0001$ ) for various morphological parameters. Indeed, great improvement was observed on the majority of the morphological parameters with considerable percentages. However, no significant effect was reported for the roots length. In addition, a negligible number of nodules were obtained in the plot without fertilization and no significant effect on the number of spores was recorded. Furthermore, the effect of fertilization on the arbuscular intensity (a%, A%) and on mycorrhizal colonization (M%, m%) of the roots was found to be significant. The soil in the arid region of Biskra showed significant mycorrhizogenic potential, although the conditions in this region were not very favorable for their development, which could constitute an effective biological resource to improve the tolerance of host plants to biotic and abiotic constraints.

**Key words:** common bean, urea, nodulation, endomycorrhizae, abiotic and biotic stress

### INTRODUCTION

Food legumes occupy an important place in the cropping systems of arid and semi-arid regions. According to Alkama (2010), cultivation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) can play an important role in agricultural systems in Algeria, although its production remains marginalized by high instability of yields due to water deficit and phosphorus deficiency, which characterize most of the Mediterranean regions. In addition to these constraints, it is estimated that around 5 to 30% of the regions producing common bean are affected by soil salinity (Egamberdieva, 2011; Mansouri & Kheloufi, 2017; Mansouri et al., 2019). Indeed, salinity can inhibit growth and reduce common bean yield due to ionic toxicity and imbalance, and reduced plant water potential (Kouadria et al., 2020). In order to alleviate these environmental conditions and increase yields, farmers use chemical fertilizers. However, the farmers lack the necessary knowledge of soil properties, so these actions affect the physico-chemical and microbiological properties of the soil in the long term (Yoganathan et al., 2017). This change in soil microorganism

diversity and density is reflected in a profound change in soil fertility (Piazza et al., 2019). Mycorrhizal fungi and nitrogen-fixing bacteria are among the microbiological indicators most sensitive to changes in availability of nutrients in the soil (Oros-Ortega et al., 2020). Indeed, these two components are strongly involved in the biogeochemical cycle and improvement of plant growth (Lu & Hedin, 2019). In addition, numerous research studies have shown that the development and productivity as well as the quality of common bean pods are strongly related to the symbiosis that the plant establishes with beneficial soil microorganisms including nitrogen-fixing bacteria and endomycorrhizal fungi with vesicles and arbuscular (Massa et al., 2020).

In this context, this paper will allow the comparison of the yields of *Phaseolus vulgaris* L. in two plots with or without nitrogen fertilization. It would determine if the symbiosis could first be expressed in the arid climate, and then if it has covered the nitrogen requirements of the plant. At the same time, this will help to assess the potential of vesicle and arbuscular mycorrhizal fungi during various stages of the common bean growth. Several hypotheses can arise regarding the yield of the fertilized plot. Lower yield in the unfertilized plot will indicate that the functioning of the symbiosis is limiting. These needs may however be low, if the plant yield is strongly related to a factor other than nitrogen nutrition. On the other hand, low yield in the fertilized plot will suggest that further amendments to the crop should be made immediately. The first objective of this paper aims to assess the development and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var *Djedida*) during its different phases of development (vegetative, flowering and fruiting), with and without nitrogen fertilizer in the arid climate of an Algerian arid region. The second objective is to carry out a survey on the nodulation, the number of spores, and mycorrhizal infection under these same conditions.

## MATERIAL AND METHODS

### Cultural site location

This study was carried out during the 2018 growing season on an agricultural land in Ain Naga, a city located in the arid region of Biskra (southeast of the capital Algiers) in Algeria. Precisely, this site is located at the latitude of 34°43'16.24" N and the longitude of 6°14'38.95" E for an altitude of 25 m. Biskra is located in an arid region according to the De Martonne aridity index. According to the climate data (1980-2018), the climate of Biskra is characterized by very hot and dry summers with an average temperature of 43.4 °C and an average relative humidity of 12%. Winters are very cold (average minimum temperature 4 °C and average maximum relative humidity 89%). Total annual precipitation is 160.6 mm with an average of 30 rainy days during the year (WCD Tutiempo, 2019). The meteorological conditions prevailing during the experimental period are shown in Table 1. According to this table, the amount of precipitation is low. The climatic conditions recorded during our study represent an advantage as heavy rains could disturb our experimental design, especially if the nitrogen fertilizer moved towards the plot aimed to represent the control (without fertilization).

Table 1. Climatic data during the experimental period at the arid region of Ain Naga (Biskra, Algeria)

Climatic parameters		Months (Year 2018)		
		September	October	November
Precipitations	Quantity (mm)	13.2	27.7	0.76
	Number of rainy days	1	8	1
Temperature (°C)	Maximum	35.9	27.1	21.6
	Average	30.4	22.1	16.7
	Minimum	25.1	17.4	12.1
Relative humidity (%)		42.8	54.4	56.3
Source: WCD Tutiempo, 2019				

The cultural site intended for this study had not been exploited for three years by any plant crops. This plot (6 × 8 m) was divided into two subplots intended for the two fertilization treatments. The results of the soil analysis (at 25-30 cm depth) before the experiment revealed pH of 7.7; 0.17% Nitrogen (N<sub>total</sub>); 182.8 mg/kg<sub>soil</sub> Phosphorus (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) and 1.22 meq/kg<sub>soil</sub> Potassium. The soil has a silty texture with an electrical conductivity of 2.58 ms/cm. This high electrical conductivity attributed to high soil salinity is due to high concentration of calcium ions (20.3 meq/100 g<sub>soil</sub>) compared to Mg<sup>+2</sup> (1.36 meq/100 g<sub>soil</sub>), K<sup>+</sup> (1.18 meq/100 g<sub>soil</sub>) and Na<sup>+</sup> (1.25 meq/100 g<sub>soil</sub>). The soil is classified as very calcareous with 53.1% of total CaCO<sub>3</sub>. These analyzes were carried out at the Laboratory of Physical and Chemical Analysis of Water and Soils (Limited Liability Company Echems Hydro-Construction, Batna, Algeria).



### Biological material

This study focused on one variety of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Djedida*). This variety is the most dominant on the agricultural market and the most cultivated in Algeria. Seeds (length:  $12.9 \pm 0.63$  mm; width:  $6.46 \pm 0.51$  mm; thickness:  $5.69 \pm 0.42$  mm; mean  $\pm$  SE; n = 50) were provided by SARL AgroSeed (Harvest date: 2016; seed conditioning: France; origin: USA; reference: DJ0512). The one-thousand-seed weight was 273 g (Mansouri et al., 2019). Seeds were treated with Thiram (a non-systemic fungicide). The seed maturity of this variety is 85-100 days.

### Fertilization

The nitrogen fertilizer was supplied in the form of granulated urea for the fertilized plots. It is nitrogen fertilizer (46% N) entirely in urea form. In the form of water-soluble granules, it provides a very rich nitrogen supply for crops with very good spreadability due to its homogeneous and regular particle size (1.8 mm of average diameter). In the soil, urea must first be hydrolyzed to ammonia to be fully usable for plants. Processing speed depends on soil temperature and humidity for hours or even days after spreading. Its use requires special attention because of the phenomenon of volatilization of ammonia in the atmosphere.

### Experimental design and treatments

The experiments were laid out in a randomized complete design and replicated five times for each treatment (equivalent to 5 lines, each line contained 150-160 seeds). The fertilizer formed the main plots, each measuring ( $4 \times 3$  m) with 0.5 m alley between the lines to minimize inter-plot interference. The plots were separated by two lines of the same species (Fig. 1). The fertilization factor involved two levels: fertilized (0.5 kg fertilizer/plot) and unfertilized (0 kg fertilizer/plot). The nitrogen fertilizer was added only one time before the flowering stage (50 days after sowing) by one week. Control plot did not receive any of the nitrogen source treatments.

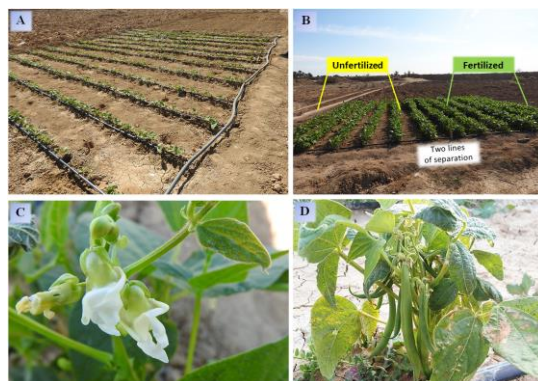


Figure 1. General overview: A - Model of drip irrigation, B - Fertilization design, C - Flowering phase, D - Fruiting phase

Land preparation was carried out manually at the end of August 2018 in two operations: plowing and harrowing. After preparing the soil, two seeds were placed in the furrows at the recommended spacing with a density of 800 seeds per line (150-160 seeds  $\times$  5 lines) (Fig. 1). During the whole experiment, the plants did not receive any herbicide, pesticide or insecticide treatment. Weeds were monitored and removed manually. It should be noted that no attack of biotic origin was reported during this study.

A model for drip irrigation system was used for several reasons: fertilizer and nutrient loss is minimized due to localized application and reduced leaching; water application efficiency is high if managed correctly and field leveling is not necessary. The frequency of irrigation during the whole experiment was every 3-4 days. The two plots (fertilized and unfertilized) were separated by two lines of the same plant species (Fig. 1).

### Determination of growth kinetics, yield components and nodulation

The growth kinetics concerned the three main life stages of the plants *viz.* vegetative, flowering and fruiting. The vegetative stage corresponded to the 2-4 leaf stage. At the completion of each growth period, plant dry biomass, shoot and root length and the number of secondary roots were assessed. The number of samples used was 20 plants  $\times$  2 plots  $\times$  2 treatments  $\times$  3 growth stages. Plants have been carefully dug up with a shovel on moist soil to avoid an abrupt uprooting. Shoots and roots were separated, washed several times with distilled water and oven-dried at 70 °C

for 48 h for dry weight determination. It should be noted that the plant dry biomass was weighed without the flowers at the flowering stage and without the pods at the fruiting stage.

Harvesting at the end of the fruiting phase was carried out 90 days after sowing when signs of maturity were observed (yellowing of the leaves and drying of the pods). Twenty plants were randomly selected from each plot. Soil was carefully washed from the roots. The nodules were picked from the roots and their numbers and dry weight was recorded for each plant. The number of pods and seeds per plant was also evaluated (numbers and dry weight). The fresh weight of pods per plant and the number of seeds per pods were also recorded. Harvest index (%), the ratio between dry weight of grains and the weight of total dry matter at maturity, was also calculated.

### Mycorrhizal infection

For each sample of the two blocks and at each stage of *P. vulgaris* growth (vegetative, flowering and fruiting and even before sowing), 100 g of a composite soil mixture was analyzed by the wet sieving technique described by Gerdemann & Nicolson (1963). The spores thus recuperated were mounted between a blade and coverslip and observed under an optical microscope (400X total magnification).

The rate of mycorrhizal colonization of *P. vulgaris* plants was estimated for the two treatments at different stages of its growth *viz.* the flowering and the fruiting stage. However, at the vegetative stage (2-4 leaf stage), the evaluation could not be carried out because there were only very few secondary roots.

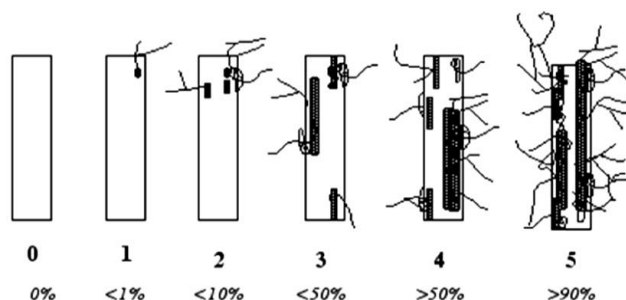


Figure 2. Notation of the degree of mycorrhization of the root fragments. Scale ranges from 0 (no mycorrhization) up to 5 (at least 90% of the fragment is mycorrhized) (Trouvelot et al., 1986)

In order to estimate the frequency of endomycorrhizal infection of the roots of *P. vulgaris* in the two blocks (with and without fertilization), the method described by Philips & Hayman (1970) was followed. At each site, samples of thin roots were provided from the root system of *P. vulgaris*. These roots were well washed and placed in a 10% potassium hydroxide solution (KOH) for 15 minutes at 90 °C. They were then thoroughly washed with distilled water. The roots were then stained in a solution of 0.1% trypan blue in lactophenol for 20 minutes. All the roots thus treated were cut into several fragments of about one centimeter in length. A number of 50 fragments randomly chosen were mounted between a blade and coverslip in lactophenol at the rate of 10 fragments per slide. The fragments were then observed under an optical microscope (400X total magnification) in a drop of glycerol for endomycorrhizal frequency estimation. This made it possible to annotate them according to a class scale and thus to estimate the degree of mycorrhizal colonization of each fragment by means of six classes noted from 0 to 5 (Fig. 2) and arbuscular richness by four classes noted (A0, A1, A2 and A3) (Fig. 3).

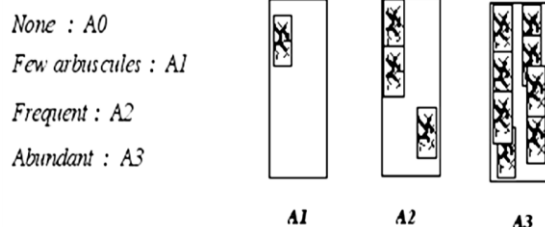


Figure 3. Notation of abundance of arbuscules in root fragments (Trouvelot et al., 1986)

A total of five parameters are calculated:

*Frequency of mycorrhization (F%)*: It represents the significance of the colonization of root system points.



$$F\% = \left( \frac{\text{number of mycorrhized fragments}}{\text{total number of fragments observed}} \right) \times 100$$

*Mycorrhization intensity (M%)*: Intensity of colonization of the root cortex (proportion of the colonized cortex estimated in relation to the entire root system and expressed in %), it reflects the importance of colonization of the root system.

$$M\% = \frac{(95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1)}{\text{total number of fragments observed}}$$

where  $n_5$  – the number of mycorrhized fragments noted in more than 95%;  $n_4$  – the number of mycorrhized fragments noted from 50 to 95%;  $n_3$  – the number of mycorrhized fragments noted from 30 to 50%;  $n_2$  – the number of mycorrhized fragments noted from 1 to 30%;  $n_1$  – the number of mycorrhized fragments noted in 1% of the cortex. This parameter reflects better the degree of mycorrhization (Fig. 2).

*Mycorrhizal intensity of mycorrhized fragments (m%)*: Arbuscular content of colonization in the mycorrhizal part of the root system (colonized proportion containing arbuscules).

$$m\% = M \times \left( \frac{\text{total number of fragments observed}}{\text{number of mycorrhized fragments}} \right) = \frac{M}{F} \times 100$$

*Arbuscular intensity of the mycorrhizal part (a%)*: Intensity of colonization developed in the mycorrhized part of the root system (proportion of the colonized cortex in the mycorrhized part of the root system expressed in %).

$$a\% = M \times \frac{(100m_{A3} + 50m_{A2} + 10m_{A1})}{100}$$

Where  $m_{A3}$ ,  $m_{A2}$ ,  $m_{A1}$  are % of  $m$  respectively affected by the notes  $A_3$ ,  $A_2$ ,  $A_1$ . With:

$$m_{A3} = M \times \left[ \frac{(95n_5A_3 + 70n_4A_3 + 30n_3A_3 + 5n_2A_3 + n_1A_3)}{\text{number of mycorrhized fragments}} \right] \times \frac{100}{m}$$

The same applies to  $m_{A2}$  and  $m_{A1}$ .

*Arbuscular intensity in the root system (A%)*: Arbuscular content of colonization in relation to the entire root system (proportion of the root system containing arbuscules, expressed in %).

$$A\% = a \times \left( \frac{M}{100} \right)$$

### Statistical analysis

The results for each variable were expressed as mean  $\pm$  standard deviation ( $\pm$ SD). All the data were subjected to one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ) using SAS (Statistical Analysis System) version 9.0 (2002) software.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Soil characteristics before the experiment

Granulometric analysis of the soil revealed that the soil was of fine silty structure. On the other hand, chemical analyses indicate that the soil is well supplied with organic matter (3.69%), moderately rich in nitrogen (0.17%) with a high C/N ratio (12.3%). According to Fog (1988), these values indicate reduced biological activity leading to slow decomposition of organic matter. According to soil standards established by Hénin et al. (1969), the analysis of total and active  $\text{CaCO}_3$  revealed a highly calcareous soil (53.1%). Some studies have shown that calcareous soil is useful for seed germination and growth of common bean (Ceyhan et al., 2014). Indeed, in our previous study by Mansouri et al. (2019), we found that the seeds of *P. vulgaris* var. *Djedida* were able to germinate under various concentrations and types of salt, especially under highly calcareous conditions. On the other hand,  $\text{CaCO}_3$  exerts a protective role

against phosphoric ions against their energy absorption by free iron when pH approaches neutrality. According to the analysis results, the soil is basic and allows  $\text{CaCO}_3$  to combine with phosphorus and thus be available to the plant.

The pH of the soil studied is slightly alkaline (7.8 pH). This pH is favorable for the growth of *P. vulgaris* because most common bean cultivars are sensitive to acid pH, so the optimal pH is between 6.1 and 7.6. This pH is also favorable to microbial activity, and among these microorganisms which are able to associate with common beans are rhizobia and arbuscular endomycorrhizae. The pH is one of the factors limiting symbiotic fixation (Hungria & Vargas, 2000). In rhizobia, the optimal pH for growth is between 6 and 7 (Somasegaran & Hoben, 2012). Soil pH is also one of the main factors that affect the density and germination of spores, the formation of hyphae, and the colonization rate of arbuscular mycorrhizae (Ramírez-Viga et al., 2019; Zhang et al., 2020). Moreover, arbuscular endomycorrhizae develop at different pH ranges and the optimum for the majority of species is between 6 and 7 (Postma et al., 2007; Bothe et al., 2010).

The soil intended for our test is very saline with an electrical conductivity equal to  $2.71 \text{ ms cm}^{-1}$  which can disturb any biological activity. According to the results of the CEC (cation-exchange capacity), the soil was moderately fertile with a value of  $24.3 \text{ meq}/100\text{g}_{\text{soil}}$ , while  $\text{P}_2\text{O}_5$  was  $182.84 \text{ mg kg}^{-1}$ , which indicated a high value according to CRAAQ (2003). This assimilable phosphate content was an advantage for plants to tolerate abiotic stress and in the establishment of the rhizobium-legume symbiosis (Bawa, 2020). For this purpose, Tembo et al. (2019) showed that the amount of nitrogen fixed per common bean is significantly limited by the deficiency in soil phosphorus. K content was equal to  $1.22 \text{ meq kg}^{-1}$  which was a high value. This element promotes nodulation only in the presence of sufficient quantities of phosphorus (Khanam et al., 2016).

### Effect of N fertilization on growth kinetics, yield components and nodulation

Before the treatment, the total dry weight of the plant at the two-leaf stage recorded 0.26 g. At this point, there is no significant difference between the two plots (Tab. 2). The absence of the amendment is to avoid predisposing young *P. vulgaris* plants to diseases such as fireblight and aphid attacks. At the flowering stage and after a week of applying nitrogen fertilization, the treatment effect was significant on the plant dry biomass ( $p < 0.0001$ ), shoot dry biomass ( $p = 0.0027$ ), root dry biomass ( $p < 0.0001$ ), shoot length ( $p < 0.0001$ ), root length ( $p = 0.0183$ ) and the number of secondary roots ( $p = 0.0002$ ). Indeed, N fertilization improved the total plant dry biomass by 60%, the shoot dry biomass by 65%, the root dry biomass by 34%, the shoot length by 37% and the root length by 16%, compared to the unfertilized plants (Tab. 2). However, there was total absence of nodosities on the roots of *P. vulgaris* plants at the two-leaf stage and at the flowering stage during sampling in both treatments. The positive effect of nitrogen fertilization leads to an increase in aerial biomass but it is accompanied by a decrease in nodular biomass (De Sousa et al., 2020).

Table 2. Effect of N fertilization and developmental stage on some growth parameters in *Phaseolus vulgaris* from the arid region of Ain Naga (Biskra, Algeria) (n=20)

Parameters	Developmental Stage					
	Vegetative		Flowering		Fruiting	
	Fertilized	Unfertilized	Fertilized	Unfertilized	Fertilized	Unfertilized
<b>Plant Dry Biomass (g)</b>	0.26 ±0.06 <sup>a</sup>	0.26 ±0.06 <sup>a</sup>	6.66 ±1.91 <sup>a</sup>	2.62 ±0.78 <sup>b</sup>	6.61 ±2.39 <sup>a</sup>	4.18 ±0.99 <sup>b</sup>
<b>Shoot Dry Biomass (g)</b>	0.19 ±0.05 <sup>a</sup>	0.19 ±0.05 <sup>a</sup>	6.47 ±1.42 <sup>a</sup>	2.28 ±0.73 <sup>b</sup>	6.22 ±2.28 <sup>a</sup>	3.89 ±0.96 <sup>b</sup>
<b>Root Dry Biomass (g)</b>	0.07 ±0.01 <sup>a</sup>	0.07 ±0.01 <sup>a</sup>	0.50 ±0.11 <sup>a</sup>	0.33 ±0.07 <sup>b</sup>	0.38 ±0.09 <sup>a</sup>	0.28 ±0.07 <sup>b</sup>
<b>Shoot Length (cm)</b>	--	--	41.5 ±3.33 <sup>a</sup>	26.3 ±2.51 <sup>b</sup>	35.7 ±5.57 <sup>a</sup>	29.9 ±5.51 <sup>b</sup>
<b>Root Length (cm)</b>	--	--	12.7 ±1.78 <sup>a</sup>	10.7 ±1.31 <sup>b</sup>	12.8 ±4.56 <sup>a</sup>	12.9 ±2.83 <sup>a</sup>
<b>Number of Secondary Roots</b>	--	--	7.00 ±0.64 <sup>b</sup>	8.30 ±1.26 <sup>a</sup>	7.15 ±0.67 <sup>b</sup>	8.45 ±1.14 <sup>a</sup>
<b>Number of pods</b>	--	--	--	--	13.2 ±3.43 <sup>a</sup>	9.35 ±2.18 <sup>b</sup>
<b>Pods Dry Weight (g)</b>	--	--	--	--	5.58 ±1.86 <sup>a</sup>	3.77 ±1.11 <sup>b</sup>
<b>Number of seeds per pod</b>	--	--	--	--	5.47 ±0.65 <sup>a</sup>	4.15 ±0.87 <sup>b</sup>
<b>Seeds Dry Weight (g)</b>	--	--	--	--	3.61 ±0.96 <sup>a</sup>	2.21 ±0.99 <sup>b</sup>
<b>Harvest index (%)</b>	--	--	--	--	52.9 ±12.6 <sup>a</sup>	51.1 ±12.2 <sup>a</sup>

For each growth stage, the same alphabet letters along the column indicate no significant difference (Duncan Multiple Range Test)

In the fruiting phase, the treatment effect was significant on the plant dry biomass ( $p = 0.0002$ ), shoot dry biomass ( $p = 0.0001$ ), root dry biomass ( $p = 0.0414$ ), shoot length ( $p = 0.0019$ ), the number of secondary roots ( $p < 0.0001$ ), the number of pods of per plant ( $p = 0.0002$ ), pods dry biomass ( $p = 0.0006$ ), seeds dry weight ( $p = 0.0072$ ) and the number of seed per pod ( $p < 0.0001$ ). Indeed, at this developmental stage, N fertilization improved the plant dry biomass by 37%, shoot dry biomass by 38%, root dry biomass by 26%, shoot length by 16%, the number of pods of

per plant by 29%, pods dry biomass by 33%, seeds dry weight by 39% and the number of seeds per pod by 15% (Tab. 2). On the other hand, N fertilization had no significant effect on the harvest index ( $p= 0.7776$ ) and also on root length ( $p= 0.9845$ ). According to Table 2, a significant effect ( $p < 0.0001$ ) of N fertilization was observed on the number of secondary roots at the flowering and fruiting stage. However, fertilization reduced this number by 16% at the flowering and fruiting stage compared to the control (Tab. 2). An increase in secondary roots in the plot without nitrogen fertilization can be explained by a hypothesis of amplification of the roots in exploration for mineral nitrogen. Figure 4 shows the effect of N fertilization on plant growth and density at the arid region of Aïn Naga (Biskra, Algeria).

Until the fruiting stage or even maturation, there were only a small number of nodules formed on the roots of *P. vulgaris* plants not having received the nitrogen fertilizer. According to Samago et al. (2018), nodulation measurements can assess the state of the symbiosis. A small number or total absence of nodules may be due either to a low population of rhizobia in the soil, or to inhibition of nodulation by unfavorable environmental factors such as salinity. It is in line with the results of the soil analysis, as the soil is very saline with  $2.71 \text{ ms cm}^{-1} \text{ EC}$ . This salinity inhibits establishment of the rhizobium-legume symbiosis during various stages of the process and in general the first stages of nodulation (Zahran, 1999). Indeed, the growth of soil rhizobia can be affected by saline stress by restricting root colonization, infection inhibition, nodule production and functioning (Sharma et al., 2020).



Figure 4. Plants of *P. vulgaris* var. *Djedida* showing the effect of N fertilization on plant growth and density in the arid region of Aïn Naga (Biskra, Algeria)

Two other hypotheses can explain the insignificant number of nodules on the common bean roots. The first is that of high temperatures as the region of Biskra is known for its high temperatures. In September 2018, during the common bean cultivation, the maximum recorded temperature was  $35.9 \text{ }^\circ\text{C}$  (Tab. 1). The nodulation capacity and the activity of the nitrogenase from *P. vulgaris* were inhibited at a temperature of  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  and above (Hungria & Franco, 1993). The second hypothesis is related to possible incompatibility of the native strains of rhizobia with the genotype of the variety used which is a non-local variety. On the other hand, the modern cultivars are selected on European soils and for their ability to establish a symbiosis with efficient strains.

Other observations at the three samplings carried out during the three stages of development of *P. vulgaris* are total absence of nematodes (on root part) and aphids (on the aerial part). The reason for mentioning these two phytopathogens is to expose the hypothesis of nematodes attack on common bean roots as this will affect the nitrogen-fixing symbiosis by inhibiting nodulation and limiting the fixation of atmospheric nitrogen. This nonexistence is perhaps due to the presence of endomycorrhizae which, according to several authors, could protect the plant against attack by pathogens or the effect of high temperatures or even the resistance of the cultivated variety.

We can conclude through this nodular survey that the growth of *P. vulgaris* var. *Djedida* requires more inorganic phosphorus than mineral nitrogen nutrition. This requirement appears particularly high in common bean, which in fact is more affected by phosphorus deficiency than other legumes species (Vadez et al., 1996).

### Effect of N fertilization on mycorrhizal infection

#### Spores number

Observation of the spores by wet sieving of the soil from the two blocks (with and without nitrogen) revealed the existence of morphotypes of important Glomeromycota spores. The spores observed are compared to specimens of

the collection INVAM (2019). Characteristic structures such as color, shape, presence of spore-producing bags and germination shields allow spores to be identified (Bâ et al., 1996). On the other hand, it is impossible for us to identify the spores on the basis of their morphology when their characteristic structures are absent (Bago et al., 1998). Indeed, in this study, some structural characteristic may have been lost during the spore extraction process and therefore it is difficult to assign a genus to a morphotype. This is how in our case differentiation of spores is based only on color. So we were able to distinguish spores of yellow, black, translucent white and brown color (Fig. 5).

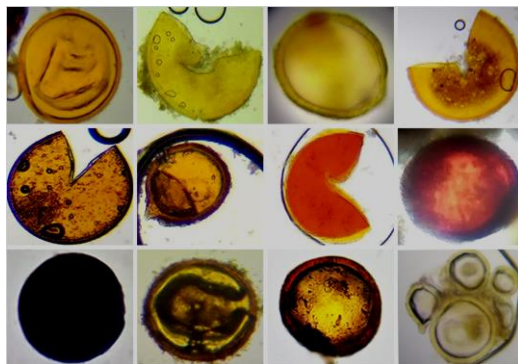


Figure 5. Microphotographs of Arbuscular Mycorrhizal Fungi spores isolated from rhizosphere soils of *P. vulgaris* var. *Djedida*

According to the two-way ANOVA, no significant effect ( $p > 0.05$ ) of N fertilization was indicated at the vegetative, flowering and fruiting stages and also before sowing (Fig. 6). However, a significant increase in the spore numbers was reported in the fruiting period (Fig. 6). Before sowing, the number of spores in the first plot (without fertilization) was 103 spores/100 g<sub>soil</sub>, while in the second plot (with fertilization) it was 110 spores/100 g<sub>soil</sub>. At this stage, the presence of spores is a form of survival during unfavorable conditions such as insufficient nutrients or drought.

In the second sample at the two-leaf stage, the number of spores increased by 18 spores in the unfertilized plot, while in the fertilized plot the number decreases by 17 spores (Fig. 6). In the flowering period and after adding the chemical fertilizer, the number of spores remained stable in the unfertilized plot compared to the first sampling. On the other hand, in the plot which received the treatment the number of spores increased by 40 spores compared to the first sampling. At the fruiting stage, the number of spores in the unfertilized plot was slightly higher than in the second plot, reaching an average of 175 spores/100 g<sub>soil</sub> (Fig. 6). Moreover, there was an increase in the number of spores between the flowering stage and the fruiting stage from 116 to 175 spores/100 g<sub>soil</sub> in the unfertilized plot and from 140 to 159 spores/100 g<sub>soil</sub> in the fertilized plot but the effect of fertilization was not significant ( $p = 0.7638$ ).

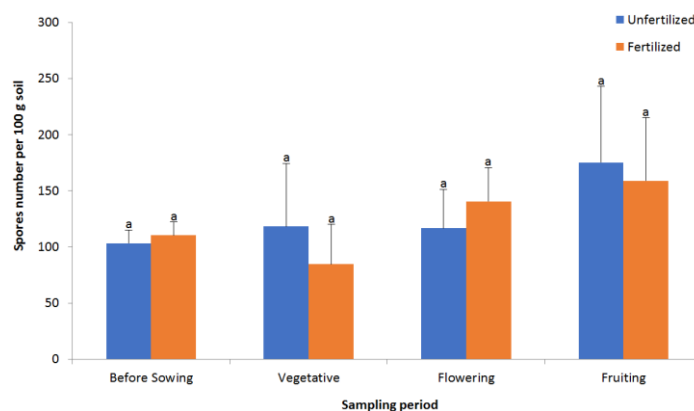


Figure 6. Effect of nitrogen fertilization (Urea 46) on the number of spores per 100 g of soil extracted from the common bean (*P. vulgaris* L. var. *Djedida*) rhizosphere at different growth periods (including before sowing). For each period, the same alphabet letters indicate no significant difference (Duncan Multiple Range Test)

The number of spores in the soil depends on several factors that interfere with the physicochemical, biochemical and microbiological properties of the soil (Mahmoudi et al., 2020). It is therefore difficult to demonstrate the effect of the chemical nitrogen fertilizer on the dynamics of endomycorrhizal spores in the soil. Furthermore, Fisher et al. (2007) showed that over-fertilization with nitrogenous elements negatively influences formation of endomycorrhizal fungi spores. Gosling et al. (2006) have shown that nitrogen fertilizer (easily soluble) would reduce the colonization and/or diversity of endomycorrhizal fungi.

### Mycorrhizal and arbuscular intensity

The study on the frequency of mycorrhization (F%) at the flowering and the fruiting stage remained high and stable with a rate of 100% in the two plots (with and without nitrogen fertilization) (Tab. 2). When coloring the roots of *P. vulgaris*, the presence of vesicles with spherical shape could be seen (Fig. 7C, 7D). In the presence of nitrogen fertilizer, the intensity of mycorrhizal colonization of the root cortex (M%) reached 53.2% at the flowering stage then it increased by only 2% giving a percentage of 55.8% at the fruiting stage (Tab. 2). However, in the absence of nitrogen fertilizer, M% reached 37.9% at the flowering stage, and then it increased up to 53.8% at the fruiting stage which is the same rate as the roots having received nitrogen fertilization. The effect of fertilization and the sampling period was clearly significant (Tab. 2).

The intensity of colonization developed in the mycorrhizal part of the root system (m%) in the plot with N fertilization reached 53.2% at the flowering stage and then 55.8% at the fruiting stage. However, in the plot without fertilization and at the flowering stage, it reached 37.9% then it also increased up to 53.7% at the fruiting stage (Tab. 2). It can be deduced that the rate of M% and m% were proportional. Several research studies reported that endomycorrhizae contributed to the absorption of mineral elements, including mineral nitrogen (Giovannini et al., 2020). Contribution of nitrogen fertilizer promotes the intensity of colonization of the root cortex at the flowering stage so the plants require a lot of energy, including nitrogen, which can explain the increase in this intensity.

Table 2. Frequency of mycorrhization (F%), Mycorrhization intensity (M%), Mycorrhizal intensity of mycorrhized fragments (m%), Arbuscular intensity of the mycorrhizal part (a%) and Arbuscular intensity in the root system (A%) in *P. vulgaris* var. *Djedida* treated with two levels of N fertilization (n=50)

Period	N Fertilization	Mycorrhizal intensity			Arbuscular intensity	
		F (%)	M (%)	m (%)	a (%)	A (%)
Flowering	Fertilized	100 <sup>a</sup>	53.2 ± 4.29 <sup>a</sup>	53.2 ± 4.29 <sup>a</sup>	22.1 ± 4.27 <sup>a</sup>	11.8 ± 2.83 <sup>a</sup>
	Unfertilized	100 <sup>a</sup>	37.9 ± 0.90 <sup>b</sup>	37.9 ± 0.90 <sup>b</sup>	10.9 ± 1.06 <sup>b</sup>	4.11 ± 0.36 <sup>b</sup>
Fruiting	Fertilized	100 <sup>a</sup>	55.8 ± 9.53 <sup>a</sup>	55.8 ± 9.53 <sup>a</sup>	18.3 ± 9.07 <sup>ba</sup>	10.7 ± 6.45 <sup>a</sup>
	Unfertilized	100 <sup>a</sup>	53.8 ± 5.84 <sup>a</sup>	53.7 ± 5.84 <sup>a</sup>	18.2 ± 6.33 <sup>ba</sup>	9.73 ± 3.33 <sup>ba</sup>
<i>Probability</i> (Period)		--	0.0098	0.0098	0.5615	0.2741
<i>Probability</i> (Fertilization)		--	0.0132	0.0132	0.0846	0.0468
<i>Probability</i> (Period × Fertilization)		--	0.0490	0.0490	0.0831	0.1087

The same alphabet letters along the column indicate no significant difference (Duncan Multiple Range Test)

In the fertilized plot, the intensity of colonization in the mycorrhizal part of the root system (a%) reached 22.1% at the flowering stage, and then it decreased at the fruiting stage up to 18.3%. On the other hand, in the unfertilized plot, (a%) reached 10.9% at the flowering stage and then increased up to 18.2% at the fruiting stage (Tab. 2). The arbuscular intensity of colonization in the entire root system (A%) of the fertilized plot reached 11.8% at the flowering stage, to decrease slightly to 10.7% at the fruiting stage. However, an increase in this same parameter was observed in the control plants with a value of 4.11% at the flowering stage and 9.73% at the fruiting stage. According to the results of ANOVA, the effect of fertilization on this parameter is not significant (Tab. 2).

At the fruiting stage, it was reported that there was no significant effect of nitrogen fertilization on *P. vulgaris* plants. However, all parameters related to mycorrhizal infection viz. F%, M%, m%, a% and A%, were improved by the supply of nitrogen fertilizer by 29%, 29%, 51% and 65%, respectively compared to the control plants. In the case of arbuscules, there is difference between the roots that have or have not received the fertilizer. The available nitrogen offers rapid mycorrhization but it decreases at the fruiting stage as the lifespan of the arbuscules is ephemeral; on the other hand, in the roots without fertilizer it starts with a low percentage but then it reaches the same percentage as in the roots having received the fertilizer (He et al., 2003).

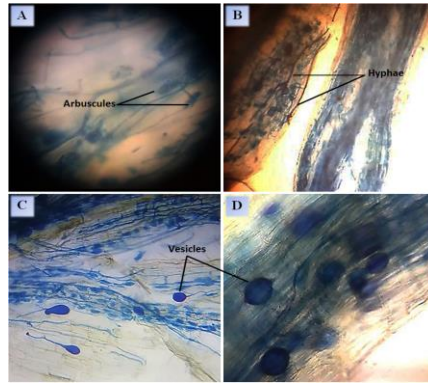


Figure 7. Microphotographs of arbuscular mycorrhizal fungi structures in root cortex *P. vulgaris* L. var. *Djedida*: A - Arbuscules, B - Hyphae (B), C-D - Vesicles

The role of arbuscules within the roots in the acquisition of nitrogen has been confirmed and several studies have shown the involvement of mycorrhizal fungi in mobilization of nutrients such as nitrogen and phosphorus from natural substrates (Plassard & Dell, 2010). Moreover, Miransari (2011) confirmed that the arid climate favored acquisition of nitrogen in a symbiotic way, where the hyphae of endomycorrhizae will take nitrogen in the form of ammonium (following the hydrolysis of urea to ammonium). It is then transformed into arginine and transported through the hyphae to the arbuscules where it is transmitted to the plant in the form of ammonium. It will be then taken up by the plant via ammonium transporters, specifically expressed during mycorrhization in arbuscules (Parniske, 2008). According to Bååth & Spokes (1989), the nitrogen source has no influence on the reaction to mycorrhizae. At low P levels in the soil, addition of N does not affect the rate of mycorrhizal colonization. Likewise, a high P content and a low N content have little influence. Furthermore, germination of spores and mycorrhizal infection of *P. vulgaris* could not be inhibited despite temperatures exceeding 35 °C in Biskra, whereas temperature is one of the factors which influence the germination of spores and the root colonization (Liu et al., 2004). Indeed, Sheikh & Sanders (1988) state that the temperature between 20 °C and 30 °C is an optimal temperature for germination of spores. On the other hand, it was observed that despite the high salinity of the soil, the common bean plants were mycorrhized, while Tian et al. (2004) and Sheng et al. (2008) reported that salinity suppresses or reduces formation of mycorrhizae. Hirrel & Gerdemann (1980) and Sheng et al. (2008) showed that salinity negatively affects the capacity for colonization, the germination of spores and the growth of hyphae of mycorrhizal fungi. In this study, there was a relationship between the high assimilable phosphorus contents and the presence of mycorrhizal infection, whereas De Miranda & Harris (1994) indicated that the germination of the spores of the mycorrhizal fungi is inhibited by high assimilable phosphorus content. According to Galván et al. (2009), there is often no relationship between the soil content of P and the number of spores.

## CONCLUSION

The soil in our experiment was a saline soil, with high contents of CaCO<sub>3</sub>, low levels of organic matter and high assimilable phosphorus contents. The investigation of *Phaseolus vulgaris* L. var. *Djedida* in the presence and absence of nitrogen fertilizer on this site revealed a minimal number of nodules or almost none, which leads to several hypotheses having repercussions on the biotic and abiotic factors constraining the establishment of symbiosis. The salinity will then represent the abiotic factor, while the biotic factor is the variety, which is a non-local variety which may be incompatible with the native strains of the arid region of Biskra. On the other hand, application of nitrogen fertilizer before flowering had a significant effect on different morphological growth variables in *P. vulgaris* at the flowering and fruiting stages except for the length of the root and the harvest index. According to these results, we can conclude that this variety gave a good yield with a low nitrogen content but in a soil rich in phosphorus. The soil in this area has shown significant mycorrhizogenic potential, although the conditions in this region are not very favorable for their development, which could constitute an effective biological resource to improve the tolerance of host plants to biotic and abiotic constraints. Furthermore, we recommend research on the optimal amounts of N fertilizers in order to decrease the impact of excess chemical fertilizers on the environment and health. Further research on N<sub>2</sub> fixation in common bean is also needed.



**Acknowledgements:** This work was realized within the framework of the project ‘Contribution to the study of the effects of biotic and abiotic conditions on the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial and mycorrhizal symbiosis’ and was supported by SARL Green Pharm South RC 07/00-0243692B18, Biskra (Algeria).

## REFERENCES

- Alkama N. (2010): Adaptation de la symbiose rhizobienne chez le haricot à la déficience en phosphore: détermination de la réponse de la plante en terme d'échanges gazeux et de flux minéraux échangés avec la rhizosphère. Doctoral dissertation, Montpellier, SupAgro, France, p. 180.
- Bâ A.M., Dalpé Y., Guissou T. (1996): Les Glomales d'*Acacia holosericea* et d'*Acacia mangium*. *Bois & Forêts des Tropiques*, 250: 5-18.
- Bååth E. & Spokes J. (1989): The effect of added nitrogen and phosphorus on mycorrhizal growth response and infection in *Allium schoenoprasum*. *Canadian Journal of Botany*, 67(11): 3227-3232.
- Bago B., Azcón-Aguilar C., Goulet A., Piché Y. (1998): Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *The New Phytologist*, 139(2): 375-388.
- Bawa A. (2020): Yield Response of Cowpea to Phosphorus Fertilizer Application. *Journal of Experimental Agriculture International*, 42(2): 125-135.
- Bothe H., Turnau K., Regvar M. (2010): The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in protecting endangered plants and habitats. *Mycorrhiza*, 20(7): 445-457.
- Ceyhan E., Kahraman A., Avci M.A., Dalgic H. (2014): Combining ability of bean genotypes estimated by line x tester analysis under highly-calcareous soils. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(2): 579-584.
- CRAAQ (2003): Guide de référence en fertilisation. 1<sup>ère</sup> édition. Chapitre 2. p. 20-29.
- De Miranda J.C.C. & Harris P.J. (1994): Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 128(1): 103-108.
- De Sousa M.A., de Oliveira M.M., Damin V., de Brito Ferreira E.P. (2020): Productivity and Economics of Inoculated Common Bean as Affected by Nitrogen Application at Different Phenological Phases. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00256-4>
- Egamberdieva D. (2011): Survival of *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 and *P. chlororaphis* TSAU13 in the rhizosphere of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under saline conditions. *Plant, Soil and Environment*, 57(3): 122-127.
- Fisher L.S., Mays P.A., Wylie C.L. (2007): An overview of nitrogen critical loads for policy makers, stakeholders, and industries in the United States. *Water, air, and soil pollution*, 179(1-4): 3-18.
- Fog K. (1988): The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biological Reviews*, 63(3): 433-462.
- Galván G.A., Parádi I., Burger K., Baar J., Kuyper T.W., Scholten O.E., Kik C. (2009): Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in onion roots from organic and conventional farming systems in the Netherlands. *Mycorrhiza*, 19(5): 317-328.
- Gerdemann J.W. & Nicolson T.H. (1963): Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological society*, 46(2): 235-244.
- Giovannini L., Palla M., Agnolucci M., Avio L., Sbrana C., Turrini A., Giovannetti M. (2020): Arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota as plant biostimulants: research strategies for the selection of the best performing inocula. *Agronomy*, 10(1): 106.
- Gosling P., Hodge A., Goodlass G., Bending G.D. (2006): Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113(1-4): 17-35.
- He X.H., Critchley C., Bledsoe C. (2003): Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Critical reviews in plant sciences*, 22(6): 531-567.
- Hénin S., Gras R., Monnier G. (1969): *Le profil cultural: l'état physique du sol et ses conséquences agronomiques*, Masson, Paris, p. 332.
- Hirrel M.C. & Gerdemann J.W. (1980): Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science Society of America Journal*, 44(3): 654-655.
- Hungria M. & Franco A.A. (1993): Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 149(1): 95-102.
- Hungria M. & Vargas M.A. (2000): Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field crops research*, 65(2-3): 151-164.
- INVAM (2019): International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Available at: <https://invam.wvu.edu> (accessed 20.12.2019).
- Khanam M., Islam M. S., Ali M. H., Chowdhury I. F., Masum S. M. (2016): Performance of soybean under different levels of phosphorus and potassium. *Bangladesh Agronomy Journal*, 19(1): 99-108.
- Kouadria M., Sehari M., Hassani A., Koulali F., Zouablia S. (2020): Effet du stress salin sur le système foliaire d'une légumineuse vivrière (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivée dans un sol de bentonite. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 8(1).
- Lu M. & Hedin L.O. (2019): Global plant-symbiont organization and emergence of biogeochemical cycles resolved by evolution-based trait modelling. *Nature Ecology & Evolution*, 3(2): 239-250.

- Liu A., Wang B., Hamel C. (2004): Arbuscular mycorrhiza colonization and development at suboptimal root zone temperature. *Mycorrhiza*, 14(2): 93-101.
- Mahmoudi N., Dias T., Mahdhi M., Cruz C., Mars M., Caeiro M. F. (2020): Does Arbuscular Mycorrhiza Determine Soil Microbial Functionality in Nutrient-Limited Mediterranean Arid Ecosystems? *Diversity*, 12(6): 234.
- Mansouri L.M. & Kheloufi A. (2017): Effect of diluted seawater on seed germination and seedling growth of three leguminous crops (Pea, Chickpea and Common bean). *Agriculture and Forestry/Poljoprivreda i šumarstvo*, 63(2):131-142.
- Mansouri L.M., Heleili N., Boukhatem Z.F., Kheloufi A. (2019): Seed germination and radicle establishment related to type and level of salt in common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Djedida*). *Cercetări Agronomice în Moldova/Agronomic Research in Moldavia*, 52(3):262-277.
- Massa N., Cesaro P., Todeschini V., Capraro J., Scarafoni A., Cantamessa S., Copetta A., Anastasia F., Gamalero E., Lingua G., Berta G., Bona E. (2020): Selected autochthonous rhizobia, applied in combination with AM fungi, improve seed quality of common bean cultivated in reduced fertilization condition. *Applied Soil Ecology*, 148: 103507.
- Miransari, M. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake. *Archives of Microbiology*, 193(2), 77-81.
- Oros-Ortega I., Lara-Pérez L.A., Casanova-Lugo F., Díaz-Echeverría V.F., Villanueva-López G., Ramírez-Barajas P.J., Cetzal-Ix W. (2020): Diversity and Importance of the Relationship Between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Nitrogen-Fixing Bacteria in Tropical Agroforestry Systems in Mexico. In: *Plant Microbe Symbiosis*, Springer, Cham., pp. 21-34.
- Parniske M. (2008): *Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses*. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10): 763-775.
- Philips J.M. & Hayman D.S. (1970): Improved procedure for declaring and staining parasitic and VAM fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55: 158-161.
- Piazza G., Ercoli L., Nuti M., Pellegrino E. (2019): Interaction between conservation tillage and nitrogen fertilization shapes prokaryotic and fungal diversity at different soil depths: Evidence from a 23-Year field experiment in the Mediterranean area. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2047.
- Plassard C. & Dell B. (2010): Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology*, 30(9): 1129-1139.
- Postma J.W., Olsson P.A., Falkengren-Grerup U. (2007): Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2): 400-408.
- Ramírez-Viga T., Guadarrama P., Castillo-Argüero S., Estrada-Medina H., García-Sánchez R., Hernández-Cuevas L., Sánchez-Gallén I., Ramos-Zapata, J. (2019): Relationship between arbuscular mycorrhizal association and edaphic variables in mangroves of the coast of Yucatán, Mexico. *Wetlands*, 20: 539–549.
- Samago T.Y., Anniye E.W., Dakora F.D. (2018): Grain yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties is markedly increased by rhizobial inoculation and phosphorus application in Ethiopia. *Symbiosis*, 75(3): 245-255.
- Sharma V., Bhattacharyya S., Kumar R., Kumar A., Ibañez F., Wang J., Guo B., Sudini H.K., Gopalakrishnan S., DasGupta M., Varshney R.K., Pandey M.K. (2020): Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between *Bradyrhizobium* and 'Crack-Entry' Legume Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plants*, 9(2): 276.
- Sheikh N.A. & Sanders F.E. (1988): Effect of temperature on germination mycorrhizal spores and VAM infection in roots. *Biologia* 34: 337-350
- Sheng M., Tang M., Chen H., Yang B., Zhang F., Huang Y. (2008): Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18(6-7): 287-296.
- Somasegaran P. & Hoben H.J. (2012): *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*. Springer Science & Business Media.
- Tian C.Y., Feng G., Li X.L., Zhang F.S. (2004): Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants. *Applied Soil Ecology*, 26(2): 143-148.
- Tembo L., Namebo M., Chanda R., Kafwa K., Munyinda K. (2019): Genotypic Variation for Response to Phosphorus Fertilization in Common Bean Mutants. *Crops*, 4(1): 11-16.
- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. (1986): Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae: proceedings of the 1<sup>st</sup> European symposium on mycorrhizae*, Dijon, 1-5 July 1985, pp. 217-221.
- Vadez V., Rodier F., Payre H., Drevon J.J. (1996): Nodule permeability to O<sub>2</sub> and nitrogenase-linked respiration in bean genotypes varying in the tolerance of N<sub>2</sub> fixation to P deficiency. *Plant physiology and biochemistry (Paris)*, 34(6): 871-878.
- WCD Tutiempo (2019): World Climate Data Tutiempo. Available at: <https://fr.tutiempo.net/climat/2019/ws-605250.html> (accessed 25.11.2018).
- Yoganathan K., Ganesh P., Tamizhazhagan V. (2017): Impact of organic and conventional (chemical) fertilization on soil quality and its seasonal variation. *International Journal of Zoology and Applied Biosciences*, 2(6): 348-355.
- Zahran H.H. (1999): Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(4): 968-989.
- Zhang H.S., Zhou M.X., Zai X.M., Zhao F.G., Qin P. (2020): Spatio-temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi and soil organic carbon in coastal saline soil of China. *Scientific Reports*, 10(1): 1-13.

Submitted: 27.3.2020.

Accepted: 18.6.2020.

## EFFECT OF NITROGEN FERTILIZER ON GROWTH, FLOWERING, FRUITING AND NODULATION OF THREE VARIETIES OF COMMON BEAN IN THE ARID REGION OF AÏN NAGA (BISKRA, ALGERIA)

L.M. MANSOURI<sup>1</sup>, A. KHELOUFI<sup>1\*</sup>, R. BELATRECHE<sup>1</sup>  
N. HELEILI<sup>2</sup>, Z.F. BOUKHATEM<sup>3</sup>

\*E-mail: abdenour.kheloufi@yahoo.fr

Received: Mar. 07, 2020. Revised: Mar. 27, 2020. Accepted: Apr. 10, 2020. Published online: June 5, 2020

**ABSTRACT.** Field experiments were conducted to investigate the response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to nitrogen fertilizer. The main factor included the fertilizer (Granular Urea 46% N), was made up of two levels: no fertilization (0 kg/plot: control) and fertilization (0.4 kg/plot), while the secondary factor was the variety (three varieties of common bean: *Djedida*, *Nelson* and *Jalila*). The experimental design was a randomized complete block design with split plot arrangement and replicated four times. The effect of fertilization was evaluated during two development stages (flowering and fruiting) for each variety and this on the total dry biomass, the length of the aerial and root parts, as well as on the number of secondary roots. On the other hand, the combined effect of fertilization and variety was studied on some yield

parameters per plant, such as the number of flowers, pods, seeds and the harvest index. In addition, the number of nodules at the end of seed maturation was evaluated. The results indicated that the nitrogen fertilizer application significantly reduced the root length, the number of nodules and secondary roots in most of the common bean varieties. However, fertilizer application significantly increased dry matter in both flowering and fruiting stages, for the three studied varieties. Pod number per plant and seed yield was increased by the application of N fertilizer, depending on varieties and the parameters being measured. *Djedida* and *Jalila* varieties gave the best yield and can therefore be recommended to farmers. According to our results, the percentage of improvement by N fertilization on one parameter or another does not exceed an average of 20%,

<sup>1</sup> Department of Ecology and Environment, University of Batna 2, Batna 05078, Algeria

<sup>2</sup> Department of Veterinary Sciences, University of Batna 1, Batna 05000, Algeria

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, University of Oran 1, 31000 Oran, Algeria

compared to the control. Indeed, the effect of fertilization is positive and seems to increase the harvest index by 18% in *Djedida* and by 20% in *Jalila*, compared to non-fertilized plants. Unfertilized plants of the variety *Nelson* showed the highest ability to nodulate.

**Keywords:** agriculture; dry matter; crops; Fabaceae; *Phaseolus vulgaris*; yield.

## INTRODUCTION

In order to obtain an optimal production yield in the current circumstances of climate change and land desertification, it is required to consider both soil fertility and the quality of the environment, by adopting suitable agricultural practices and techniques (Senyolo *et al.*, 2018). However, the lack of knowledge about the real needs of the soil, in terms of fertilization, often leads to over-fertilization or under-fertilization which is the source of the decline in production yield (Jin *et al.*, 2017). On the other hand, the long-term application of chemical fertilizers simultaneously affects the physico-chemical and microbiological properties of the soil (Knap *et al.*, 2010; Chakraborty *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2019). This second entity is often ignored in fertilization practices when it not only guarantees the sustainable maintenance of soil fertility, but also better productivity (Lemanceau *et al.*, 2015).

A change in the diversity and density of soil microorganisms reflects a deep change in soil fertility (Zhang *et al.*, 2016; Bokhorst *et al.*,

2017). Indeed, nitrogen-fixing bacteria, whether free or associated in symbiotic relationship with species of the *Fabaceae* family, are components which are strongly involved in the biogeochemical cycle and the improvement of plant growth (Carranca, 2013; Souza *et al.*, 2015). Generally, various types of organic, mineral or mixed amendments, as well as various cropping systems are practiced without prior consideration of the biological components of the soil (Larey and Angers, 2012). Hence, the importance of finding the right type of fertilization, as well as the interesting variety to guarantee optimal productivity, respectful of soil fertility and the functioning of this type of microbial communities (Smethurst, 2010).

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), with their numerous varieties, are among the most consumed legumes, because of their moderate amount of calories and their richness in other nutritive substances (Choze *et al.*, 2013; Baptista *et al.*, 2017). Common bean is a crop of the small farmer, commonly grown under conditions of low soil fertility and with minimal technical inputs (Graham, 1981). Several researches have shown that the development and the productivity, as well as the quality of the pods and the seeds of common bean are strongly dependent on soil fertility (Otieno *et al.*, 2009; Fernández-Luqueño *et al.*, 2010; Turuko *et al.*, 2014; Nassary *et al.*, 2020). However, some researches have indicated that common bean is a legume that nodulates slightly or with

## PERFORMANCE OF COMMON BEAN UNDER NITROGEN FERTILIZATION

difficulty, and therefore its cultivation requires a nitrogen fertilizer amendment (Fustec *et al.*, 2010; Osdaghi *et al.*, 2011; García-Garijo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2018). In the same context, Nascente *et al.* (2017) found that common bean varieties react differently to mineral/nitrogen fertilization. In our previous study by Mansouri *et al.* (2019), we found that the seeds of *P. vulgaris*, *Djedida* var. were able to germinate under various concentration and types of salt, especially under high calcareous condition.

The main objective was to describe the evolution of plants of three varieties of common bean (*Djedida*, *Nelson* and *Jalila*), by amount of fertilizer adopted and this during two main periods (flowering and fruiting) and on some morpho-physiological parameters related to yield in the arid region of Biskra (Algeria). A second objective was to assess the ability of nodulating in these three varieties.

## MATERIAL AND METHODS

### Cultural site location

This study was carried out during the 2019 growing season, in an agricultural exploitation at Aïn Naga, a city located in the arid region of Biskra (Southeast of the capital Algiers), in Algeria. Precisely, this site is located at the latitude of 34°43'12.37" N and the longitude of 6°14'32.98" E, for an elevation of 23 m. Biskra is located in the arid region, according to the De Martonne aridity index. According to climate data (1980-2019), the climate of Biskra is characterized by a very hot and dry

summer with an average temperature of 43.5°C and an average relative humidity of 12%. Winter is cold (average minimum temperature 4°C and average maximum relative humidity 89%). Rainfall is rare and does not exceed 30 days a year.

The meteorological data prevailing, during the experimental period, are shown in *Table 1*. According to this table, the amount of precipitation is almost zero. These data were confirmed and supported *in situ* by recording a zero number of precipitations. These meteorological conditions, recorded during our study represented an advantage because heavy rains could disturb our experimental design, especially if the nitrogen fertilizer moved towards plots aiming to represent control (without fertilization).

The cultural site intended for this study (15 × 30 m) has not been exploited for five years by any plant crops. The results of the soil analysis (at 25-30 cm depth), before the experiment, revealed a pH of 7.7; 0,119% Nitrogen (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); 182.8 mg/kg<sub>soil</sub> Phosphorus (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) and 1.22 meq/kg<sub>soil</sub> Potassium. The soil has a silty texture, with an electrical conductivity of 2.58 ms/cm. This high electrical conductivity interpreted by high soil salinity is due to the high concentration of calcium ions (20.3 meq/100 g<sub>soil</sub>), compared to 1.36 meq/100 g<sub>soil</sub> of Mg<sup>+2</sup>, 1.18 meq/100 g<sub>soil</sub> of K<sup>+</sup> and 1.25 meq/100 g<sub>soil</sub> of Na<sup>+</sup>. The soil has been classified as very calcareous with 53.1% of total CaCO<sub>3</sub>.

### Biological material

This study focused on three varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). These three varieties are the most dominant in the agriculture market and the most cultivated in the South of Algeria. The origin of these three varieties *viz.* *Djedida*, *Nelson* and

*Jalila* is *Griffaton Producteur Grainier* (France), distributed in Algeria by *SARL Agroseed*. The seeds of these three varieties were harvested in 2017 and only *Djedida* and *Nelson* have been treated with Thiram (a non-systemic fungicide).

We first evaluated the biometric characteristics of the seeds for each variety and the results are shown in

**Table 2.** According to the analysis of variance, there is a significant effect ( $p < 0.0001$ ) of the variety on the 1000-seed weight and on the seed size. According to Duncan Multiple Range Test, the classification, according to seed size, is as follows *Djedida* > *Jalila* > *Nelson* (Table 2, Fig. 1).

**Table 1 - Climatic data during the experimental period**

Climatic parameters		Months (Year 2019)		
		October	November	December
Precipitations	Quantity (mm)	0.51	8.38	2.28
	Number of rainy days	0	0	0
Temperature (°C)	Maximum	29.6	20.4	20.3
	Average	24.3	15.8	15
	Minimum	18.9	10.7	10
Relative humidity (%)		43	53.4	51.6

Source: World Climate Data: *Tutiempo* (<https://fr.tutiempo.net/climat/2019/ws-605250.html>)

**Table 2 – Seed characteristics of the three common bean used in the experience**

Varieties	1000-seed weight (g) (n=4)	Seed size (n=50)			Seed maturity (days)
		Seed length (mm)	Seed width (mm)	Seed thickness (mm)	
<i>Djedida</i>	283.6 ± 2.00 <sup>a</sup>	12.7 ± 0.73 <sup>a</sup>	6.19 ± 0.39 <sup>a</sup>	5.29 ± 0.44 <sup>a</sup>	85-100
<i>Nelson</i>	213.1 ± 0.73 <sup>c</sup>	11.4 ± 0.66 <sup>c</sup>	5.37 ± 0.37 <sup>c</sup>	4.68 ± 0.49 <sup>c</sup>	85-100
<i>Jalila</i>	231.7 ± 1.07 <sup>b</sup>	11.9 ± 0.80 <sup>b</sup>	5.76 ± 0.26 <sup>b</sup>	5.26 ± 0.25 <sup>b</sup>	85-100
F of Fisher	2817.5	36.4	70.1	75.6	-
Probability	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	-

The same alphabet letters along the column indicates no significance difference (Duncan Multiple Range Test)

### Fertilization

The nitrogen fertilizer was supplied in the form of 46% granulated urea, for the fertilized plots. It is a nitrogen fertilizer entirely in urea form. In the form of water-soluble granules, it

provides a very rich nitrogen supply for crops with very good spreadability, due to its homogeneous and regular particle size (1.8 mm of average diameter). In the soil, urea must first be hydrolyzed to ammonia, to be fully usable by the plant.



## PERFORMANCE OF COMMON BEAN UNDER NITROGEN FERTILIZATION

Processing speed depends on soil temperature and humidity, for hours or even days after spreading. Its use requires

special attention because of the phenomenon of volatilization of ammonia in the atmosphere.



Figure 1 - Seeds of the different varieties of *Phaseolus vulgaris* used in the experiment: (A) *Djedida*, (B) *Nelson* and (C) *Jalila*

### Experimental design and treatments

The experiments were laid out in a randomized complete block design with a split plot arrangement and replicated four times for each treatment (Fig. 2, Fig. 3). The fertilizer formed the main plots and the common bean varieties the subplots, each measuring (4 × 3 m) with a 0.7 m alley between the plots and blocks, to minimize inter-plot interference. The fertilization factor consisted of two levels: fertilized (0.4 kg fertilizer/plot) and unfertilized (0 kg fertilizer/plot). The nitrogen fertilizer was added twice: before the flowering stage (50 days after sowing) and before the fruiting stage (70 days after sowing) by one week. Control plots did not receive any of the nitrogen source treatments. The vegetative period (40 days from sowing) did not receive fertilization.

Land preparation was carried out manually at the beginning of September, in two operations: plowing and harrowing. After preparing the soil, two seeds were placed in the furrows at the recommended spacing of (30 × 20) cm with a density of 120 seeds per plot (30

seeds × 4 lines). During the whole experiment, the plants did not receive any herbicide, pesticide or insecticide treatment. Weeds were monitored and removed manually. It should be noted that no attack of biotic origin was reported during this study, except a 5% contamination by aphids, which colonized some plants in a single plot of the *Nelson* variety.

A model for drip irrigation system was used for the reasons that: fertilizer and nutrient loss is minimized, due to a localized application and reduced leaching, water application efficiency is high if managed correctly and field leveling is not necessary. The frequency of irrigation during the whole experiment was every 3-4 days.

### Determination of growth kinetics

For the three varieties of common bean, the growth kinetics concerned the three main life stages of the plants *viz.* vegetative, flowering and fruiting. At each complete achievement of the growth period, plant dry biomass, shoot and root length and the number of secondary roots

were assessed. The total number of samples used was of 240 (10 plants × 4 plots × 2 treatments × 3 growth stages). Plants have been carefully dug up with a shovel on moist soil to avoid an abrupt uprooting. The plants were oven-dried at 70°C, for 48 h, for dry weight determination. It should be noted that the plant dry biomass was weighed without the flowers at the flowering stage and without the pods at the fruiting stage.

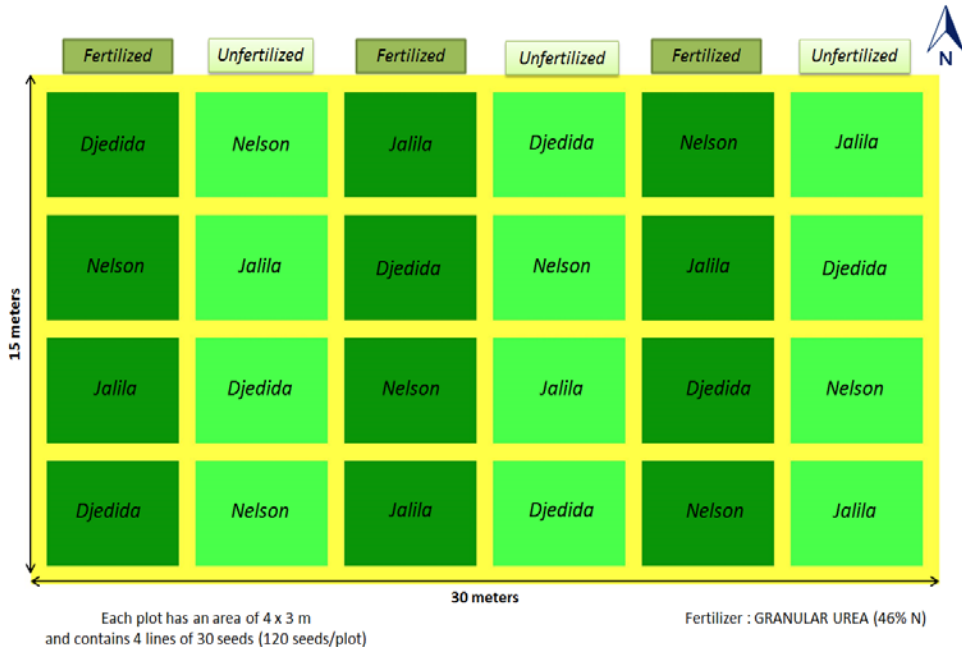
**Determination of some yield components**

The number of flowers per plant was determined in situ when a general flowering was reached in the three varieties and this at 60 days after sowing. Harvesting, at the end of the fruiting phase, was carried out 95 days after sowing, when signs of maturity were observed (yellowing of the leaves and

drying of the pods). Ten plants were randomly selected from each plot. Soil was carefully washed from the roots. The nodules were picked from the roots and their numbers recorded for each plant. The number of pods and seeds per plant was also evaluated. Donald (1962) defined Harvest index (%) as the ratio between dry weight of grains and the weight of total dry matter at maturity.

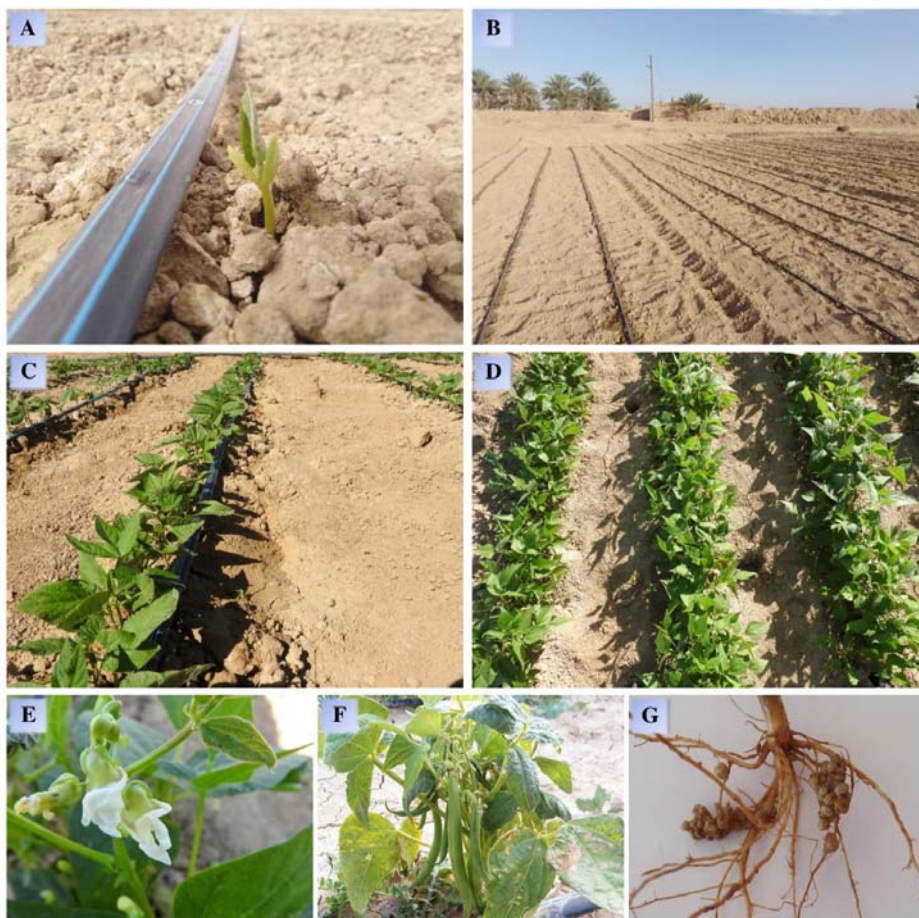
**Statistical analysis**

The results for each variable were expressed as mean ± standard deviation (±SD). All the data were subjected to one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan’s multiple range test ( $p < 0.05$ ) using SAS (Statistical Analysis System), version 9.0 (2002) software.



**Figure 2 - Experimental design and treatments:**  
**(3 varieties of *Phaseolus vulgaris* × 2 levels of fertilization × 4 replicates)**

## PERFORMANCE OF COMMON BEAN UNDER NITROGEN FERTILIZATION



**Figure 3 - General overview of the experimental set-up and the different stages of bean development in Ain Naga (Biskra, Algeria): (A) seedling emergence, (B) Model of Drip irrigation, (C) Vegetative phase, (D, E) Flowering phase, (F) Fruiting phase and (G) Nodules appearance**

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of N fertilization on developmental kinetics

According to *Table 3*, the effect of the factors (fertilization  $\times$  time  $\times$  variety) was significant on total dry biomass ( $p < 0.0001$ ), shoot length ( $p < 0.0001$ ), root length ( $p < 0.0001$ ),

and the number of secondary root ( $p = 0.0143$ ). On the other hand, a very marked increase in all the variables studied was observed over time (stages of development) and this in the three varieties. However, this increase differs from a treatment to another (*Table 3*). Furthermore, N fertilization has no relation with

phonological traits (Swiader *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2001; Dumka *et al.*, 2004). Indeed, the three varieties of

common bean, whether treated or not, started flowering and fruiting simultaneously.

**Table 3 - Effect of variety, growth stage and treatment on some growth parameters in *Phaseolus vulgaris* from the arid region of Ain Naga (Biskra, Algeria) (n=40)**

Varieties	Growth Stage	Fertilization	Plant dry biomass (g)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Secondary roots number
<i>Djedida</i>	VEG	Fertilized	2.52 ± 0.64 <sup>a</sup>	11.7 ± 0.29 <sup>a</sup>	8.11 ± 1.20 <sup>a</sup>	7.40 ± 0.93 <sup>a</sup>
		Unfertilized	2.52 ± 0.64 <sup>a</sup>	11.7 ± 0.29 <sup>a</sup>	8.11 ± 1.20 <sup>a</sup>	7.40 ± 0.93 <sup>a</sup>
	FLO	Fertilized	4.97 ± 0.12 <sup>a</sup>	18.9 ± 3.66 <sup>a</sup>	12.5 ± 1.60 <sup>b</sup>	6.85 ± 1.29 <sup>d</sup>
		Unfertilized	4.92 ± 0.12 <sup>a</sup>	19.5 ± 2.49 <sup>a</sup>	14.5 ± 2.63 <sup>a</sup>	8.35 ± 1.44 <sup>a</sup>
	FRU	Fertilized	5.68 ± 0.11 <sup>a</sup>	21.9 ± 2.48 <sup>a</sup>	13.2 ± 2.85 <sup>a</sup>	7.85 ± 1.96 <sup>b</sup>
		Unfertilized	4.75 ± 0.11 <sup>b</sup>	20.9 ± 2.87 <sup>a</sup>	13.6 ± 2.54 <sup>a</sup>	9.10 ± 2.31 <sup>a</sup>
<i>Nelson</i>	VEG	Fertilized	1.46 ± 0.12 <sup>a</sup>	17.2 ± 1.90 <sup>a</sup>	10.6 ± 2.09 <sup>a</sup>	6.70 ± 1.64 <sup>a</sup>
		Unfertilized	1.46 ± 0.12 <sup>a</sup>	17.2 ± 1.90 <sup>a</sup>	10.6 ± 2.09 <sup>a</sup>	6.70 ± 1.64 <sup>a</sup>
	FLO	Fertilized	5.13 ± 1.50 <sup>a</sup>	19.8 ± 1.57 <sup>a</sup>	12.1 ± 1.21 <sup>a</sup>	7.20 ± 2.23 <sup>a</sup>
		Unfertilized	3.29 ± 0.76 <sup>b</sup>	18.3 ± 3.54 <sup>b</sup>	12.6 ± 1.34 <sup>a</sup>	6.70 ± 2.64 <sup>a</sup>
	FRU	Fertilized	4.98 ± 1.07 <sup>a</sup>	22.6 ± 6.10 <sup>a</sup>	12.3 ± 1.63 <sup>b</sup>	7.40 ± 2.92 <sup>a</sup>
		Unfertilized	4.69 ± 1.22 <sup>a</sup>	20.5 ± 3.35 <sup>a</sup>	15.7 ± 4.52 <sup>a</sup>	7.65 ± 1.67 <sup>a</sup>
<i>Jalila</i>	VEG	Fertilized	1.55 ± 0.11 <sup>a</sup>	13.1 ± 1.97 <sup>a</sup>	10.3 ± 1.59 <sup>a</sup>	5.70 ± 1.81 <sup>a</sup>
		Unfertilized	1.55 ± 0.11 <sup>a</sup>	13.1 ± 1.97 <sup>a</sup>	10.3 ± 1.59 <sup>a</sup>	5.70 ± 1.81 <sup>a</sup>
	FLO	Fertilized	4.69 ± 1.60 <sup>a</sup>	18.9 ± 2.12 <sup>a</sup>	11.5 ± 1.47 <sup>b</sup>	6.60 ± 2.13 <sup>a</sup>
		Unfertilized	4.59 ± 1.14 <sup>a</sup>	17.3 ± 2.66 <sup>b</sup>	12.6 ± 1.69 <sup>a</sup>	6.20 ± 1.77 <sup>a</sup>
	FRU	Fertilized	5.55 ± 1.25 <sup>a</sup>	23.2 ± 4.87 <sup>a</sup>	12.0 ± 2.70 <sup>b</sup>	6.20 ± 1.68 <sup>b</sup>
		Unfertilized	4.40 ± 0.88 <sup>b</sup>	18.9 ± 3.67 <sup>b</sup>	13.7 ± 2.67 <sup>a</sup>	7.05 ± 1.61 <sup>a</sup>
<b>F of Fisher (VAR×GS×FERT)</b>			14.95	6.27	7.52	3.15
<b>Probability (VAR×GS×FERT)</b>			< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0143

For each growth stage, the same alphabet letters along the column indicates no significance difference (Duncan Multiple Range Test). VEG: vegetative; FLO: flowering; FRU: fruiting; VAR: variety; GS: growth stage; FERT: fertilization.

## PERFORMANCE OF COMMON BEAN UNDER NITROGEN FERTILIZATION

Dry matter accumulation into plant varied according to the N levels and the growing period. Nitrogen fertilization was able to increase the total dry biomass of plants at the fruiting stage of the *Djedida* and *Jalila* varieties by 16% and 20%, respectively, compared to the control (non-fertilized plants). However, the effect of fertilization on the *Nelson* variety was only significant at the flowering stage, recording an increase of 35%, compared to the control (*Table 3*). Dry matter production is directly related to N supply. When N supply is low, there is lower production of dry matter, especially in leaves, which affects the production of photo-assimilates and distribution of assimilates to the reproductive organs (Dordas *et al.*, 2008). One of the objectives of the present study was to determine how N application can affect dry matter accumulation in common bean, and we noted a significant effect on this characteristic. Dry matter accumulation can be affected by cultivar and prevailing growth conditions (Papakosta *et al.*, 1991; Seppänen *et al.*, 2018). N is one of the most important nutrients for plant growth; it affects dry matter accumulation and partitioning in many legume species (Guinet *et al.*, 2018).

For the shoot length, the effect of fertilization was much more expressed in the *Jalila* variety, at the flowering and fruiting stages, with an improvement of 8% and 18%, respectively. The effect of fertilization

was also observed in the *Nelson* variety, with an improvement of 8%, compared to the control, at the flowering stage, which is similar to that obtained by the *Jalila* variety. However, no effect of fertilization was observed in the *Djedida* variety (*Table 3*). These variations are related to differences in the genetic potential, growth habit and other intrinsic characteristics of each cultivar (Beebe *et al.*, 2013; Inostroza *et al.*, 2015).

For the roots, fertilization had a negative effect on growth in length in the three varieties studied, but at different stages of development. Indeed, the length growth of the roots at the flowering stage in the varieties *Djedida* and *Jalila* was delayed by 16% and 10%, respectively. At the fruiting stage, this same variable was delayed in *Nelson* and *Jalila* with 28% and 14%, respectively, compared to the non-fertilized plants (*Table 3*). Kohls and Baker (1989) reported that N fertilization reduces the number of secondary roots and root hairs and thus inhibits nodulation in actinorhizal plants. Using *P. sativum*, *V. faba*, *V. sinensis* and *P. vulgaris* as study materials, Wahab *et al.* (1996) found that nitrate-nitrogen suppresses root hair formation and also reduce secondary roots number and, thus reducing *Rhizobium* infection and the nodulation of root. Also, Costa *et al.* (2013) reported that root length and root surface area were increased, under intermediate N levels, and that root growth was reduced, under higher fertilization levels.

The effect of fertilization was also negative on the number of secondary roots. This was observed in the variety *Djedida*, at the flowering stage, with a decrease of 20%, and at the fruiting stage, with 16% decrease, compared to the control (*Table 3*). This effect has also been indicated in plants of the *Jalila* variety, but only at the fruiting stage, with a 14% reduction, compared to unfertilized plants. On the other hand, no effect of fertilization was observed in the variety *Nelson* on the number of secondary roots and this at the two development phases where nitrogen fertilization was applied (*Table 3*). Soil fertility and rhizosphere organisms have been shown significantly to alter root growth and architecture. Wiersum (1958) showed that high concentrations of nitrogen may stimulate root length and the number of primary roots, while phosphate deficiency can reduce both root length and the number of secondary and tertiary roots, without altering the number of primary roots (Bowen and Rovira, 1999).

### **Combined effect of varieties and fertilization on some yield parameters**

According to *Table 4*, the fertilizer-variety interaction significantly influences the number of flowers per plant ( $p < 0.0001$ ), the number of pods per plant ( $p < 0.0001$ ), the number of seeds per plant ( $p < 0.0001$ ), the number of nodules per plant ( $p < 0.0001$ ), seeds dry

weight ( $p < 0.0001$ ) and the Harvest index ( $p < 0.0001$ ).

Nitrogen fertilizer application before inflorescence initiation is well known to increase flower number. The highest number of flowers was recorded in the fertilized plants and this among all the varieties studied. The increase is about 30%, 50% and 16%, respectively, in the variety *Nelson*, *Jalila* and *Djedida*, compared to the control plants (*Table 4*).

Monti *et al.* (2016) indicated that low N availability causes reduction in leaf N, reduced number of flowers, low fruit set and yield.

The number of pods per plant was also influenced by fertilization in the three varieties. This variable was improved by 18%, 17% and 33%, respectively, in *Djedida*, *Nelson* and *Jalila*, compared to non-fertilized plants (*Table 4*). Blair *et al.* (2009) noted that common bean varieties behave very differently when compared to soil fertility. Indeed, they observed that there were varieties that expressed their genetic potential only on a fertile environment.

According to *Table 4*, the number of seeds per plant was improved by nitrogen fertilization in the *Nelson* and *Jalila* varieties, with percentages of 12% and 40%, respectively. However, the *Djedida* variety was not influenced by the fertilizer supply for this same variable by recording similar values of 32 seeds/plant and this in both fertilized and unfertilized plants. Seed yield has been observed to be one of the most stable morphological characteristics



## PERFORMANCE OF COMMON BEAN UNDER NITROGEN FERTILIZATION

of many plant species (Chmielewski and Ruit, 2002).

Moreover, the total dry weight of seeds was only affected by fertilization in the *Jalila* variety. Once more, the variety *Djedida* seems not to be affected by fertilization for this variable, recording an average of 4 g. This value is the highest compared to the other varieties with a ratio of 114% higher than the *Nelson* variety. For the Harvest index, only the varieties *Djedida* and *Jalila* seem to be affected by fertilization. The effect of fertilization is positive and seems

to increase the H index by 18% in *Djedida* and by 20% in *Jalila*, compared to non-fertilized plants (*Table 4*). No significant effect was observed in the *Nelson* variety, which records the lowest values with an average of 35% H index under both treatments (*Table 4*). This inter-varietal variation in common bean yield could be due to the genetic heritage of the different varieties used by favoring or disadvantaging one or the other variety used in the edaphoclimatic conditions of the environment.

**Table 4 - Combined effects of varieties and fertilization on the number of flowers, pods, seeds, nodules, seed weight and Harvest index per plant of *Phaseolus vulgaris* at flowering and fruiting stage (n=40)**

Varieties	Fertilization	Number per plant				Seeds dry weight (g)	HI (%) (per plant)
		Flowers	Pods	Seeds	Nodules		
<i>Djedida</i>	Fertilized	23.2 ±4.29 <sup>b</sup>	11.7 ±3.17 <sup>a</sup>	32.5 ±6.67 <sup>a</sup>	1.60 ±1.21 <sup>d</sup>	4.09 ±1.25 <sup>a</sup>	88.6 ±9.31 <sup>a</sup>
	Unfertilized	19.4 ±2.18 <sup>c</sup>	9.60 ±3.68 <sup>bc</sup>	32.5 ±12.6 <sup>a</sup>	6.80 ±2.01 <sup>b</sup>	4.16 ±1.08 <sup>a</sup>	72.8 ±9.43 <sup>b</sup>
<i>Nelson</i>	Fertilized	28.2 ±9.31 <sup>a</sup>	10.6 ±2.22 <sup>ab</sup>	15.7 ±4.05 <sup>b</sup>	3.80 ±2.72 <sup>c</sup>	1.91 ±1.02 <sup>c</sup>	36.8 ±12.1 <sup>d</sup>
	Unfertilized	19.7 ±7.61 <sup>c</sup>	8.80 ±1.68 <sup>c</sup>	13.8 ±4.04 <sup>b</sup>	13.4 ±4.51 <sup>a</sup>	1.54 ±0.47 <sup>c</sup>	33.1 ±6.04 <sup>d</sup>
<i>Jalila</i>	Fertilized	27.1 ±7.44 <sup>a</sup>	9.40 ±1.93 <sup>c</sup>	29.4 ±7.80 <sup>a</sup>	0.80 ±1.55 <sup>d</sup>	3.44 ±1.42 <sup>b</sup>	71.8 ±11.2 <sup>b</sup>
	Unfertilized	13.7 ±5.38 <sup>d</sup>	6.25 ±2.16 <sup>d</sup>	17.5 ±9.70 <sup>b</sup>	3.50 ±2.36 <sup>c</sup>	4.24 ±2.33 <sup>a</sup>	59.9 ±13.1 <sup>c</sup>
<b>F of Fisher (VAR×FERT)</b>		27.7	20.5	48.3	124.1	30.4	110.1
<b>Probability (VAR×FERT)</b>		< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

The same alphabet letters along the column indicates no significance difference (Duncan Multiple Range Test). VAR: variety; FERT: fertilization

This finding was also showed by Remans *et al.* (2008). Indeed, they not only found that, different genotypes could induce highly significant

differences in yield, but also, the yield of the same genotype was significantly influenced by the environment. This difference in yield

between fertilized and unfertilized plots can be explained by the fact that common bean productivity is greatly influenced by soil fertility (Fageria and Baligar, 1997; Fageria and Baligar, 2003; Jansa *et al.*, 2011).

The nitrogen nutrition of the common bean is accomplished by two complementary processes during the plant growth cycle: either by assimilation of mineral nitrogen from the soil, or by symbiotic fixation of atmospheric nitrogen through the formation of root nodules (Unkovich and Pate, 2000).

The number of nodules per plant is the variable most affected by fertilization. This number was higher in the non-fertilized plants and this in the three varieties of common bean studied.

The classification, according to the values obtained, is *Nelson* > *Djedida* > *Jalila*. This number was higher by 253%, 325% and 338%, respectively, in *Nelson*, *Djedida* and *Jalila*, compared to the values recorded in the fertilized plants for these same varieties (*Table 4*). Inhibitory effects of added nitrogen fertilizer to nodulation and nitrogen fixation have been reported for several legumes: *Glycine max* (Bezdicsek *et al.*, 1974); *Trifolium subterraneum* (Chambers *et al.*, 1980) *Vicia faba* (Wahab and Abd-Alla, 1995); *Gliricidia sepium* (Thomas *et al.*, 2000); *Cicer arietinum* (Anderson *et al.*, 2004) and *Phaseolus vulgaris* (Kawaka *et al.*, 2018). Kakraliya *et al.* (2018) observed that the application of N

fertilizer caused nodule degeneration on French beans.

In addition, Drevon *et al.* (2015) reported that high N levels inhibited early cell divisions in the cortex, which will inhibit nodulation.

According to Otieno *et al.* (2009), fertilizer application significantly reduced the number of nodules per plant in lablab (*Lablab purpureus*) and common bean, but had no significant effect on green gram and lima bean. Nitrogen nutrition of legumes is firstly ensured by the reduction of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> from the soil, before the symbiotic fixation takes over (Valentine *et al.*, 2018).

It should be shown that soil characteristics can play an important part for a best yield and productivity. As it was indicated for soil analysis, our experimental site is silty and very calcareous, with 53.1% of total CaCO<sub>3</sub>, with 7.7 pH. Indeed, calcareous soils are identified by the presence of the mineral calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub> or lime).

The pH of these soils is usually above 7 and may be as high as 8.5 (Ceyhan *et al.*, 2014). When these soils contain sodium carbonate, the pH may exceed 9. Yet these types of soils can be extremely productive for agricultural use when they are managed properly.

## CONCLUSION

We can deduce that the varieties showing a large gap between fertilized and unfertilized plots would have the capacity to express their

## PERFORMANCE OF COMMON BEAN UNDER NITROGEN FERTILIZATION

genetic potential on fertile soils. Varieties for which there is a small yield gap regardless of fertilization would be improved to produce better, even under unfavorable fertility conditions. Achieving a better yield of common bean first depended on the choice of variety. The *Djedida* and *Jalila* varieties gave the highest yield under nitrogen fertilization and this in the majority of the parameters studied. However, the *Nelson* variety has shown its ability to better nodulate in calcareous soil, expressing the highest number of nodules per plant without adding fertilizer. In addition, a highly significant difference in yield was noted between fertilized and unfertilized plots. According to our results, the percentage of improvement by N fertilization on one parameter or another does not exceed an average of 20%, compared to the control. This rate could be important for very large agricultural area; however, we will recommend researches on the optimal amounts of N fertilizers, in order to decrease the impact of excess chemical fertilizers on the environment and health. Much more research on N<sub>2</sub> fixation in common bean is also needed.

## REFERENCES

- Anderson, A., Baldock, J.A., Rogers, S.L., Bellotti, W. & Gill, G. (2004).** Influence of chlorsulfuron on rhizobial growth, nodule formation, and nitrogen fixation with chickpea. *Aust.J.Agric.Res.*, 55(10): 1059-1070, DOI: 10.1071/AR03057
- Baptista, A., Pinho, O., Pinto, E., Casal, S., Mota, C. & Ferreira, I.M. (2017).** Characterization of protein and fat composition of seeds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and bambara groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verdc) from Mozambique. *J. Food Meas. Charact.*, 11(2): 442-450, DOI: 10.1007/s11694-016-9412-2
- Beebe, S., Rao, I., Blair, M. & Acosta-Gallegos, J. (2013).** Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Frontiers in physiology*, 4: 35, DOI: 10.3389/fphys.2013.00035
- Bezdicsek, D.F., Mulford, R.F. & Magee, B.H. (1974).** Influence of organic nitrogen on soil nitrogen, nodulation, nitrogen fixation, and yield of soybeans. *Soil Sci.Soc.Am.J.*, 38(2): 268-273, DOI: 10.2136/sssaj1974.03615995003800020020x
- Blair, M.W., Astudillo, C., Grusak, M.A., Graham, R. & Beebe, S.E. (2009).** Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol. Breeding*, 23(2): 197-207, DOI: 10.1007/s11032-008-9225-z
- Bokhorst, S., Kardol, P., Bellingham, P.J., Kooyman, R.M., Richardson, S.J., Schmidt, S. & Wardle, D.A. (2017).** Responses of communities of soil organisms and plants to soil aging at two contrasting long-term chronosequences. *Soil Biol.Biochem.*, 106: 69-79, DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.12.014
- Bowen, G.D. & Rovira, A.D. (1999).** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv.Agron.*, 66: 1-102, DOI: 10.1016/S0065-2113(08)60425-3
- Carranca C. (2013).** Legumes: Properties and symbiosis. *Symbiosis: Evolution, Biology and Ecological Effects* (Eds. Camis o, AH y Pedroso, CC). *Nova Science Publishers*, New York, pp. 67-94.
- Ceyhan, E., Kahraman, A., Avci, M.A. & Dalgi , H. (2014).** Combining ability

- of bean genotypes estimated by line x tester analysis under highly-calcareous soils. *J. Anim. Plant Sci.*, 24(2): 579-584.
- Chakraborty, A., Chakrabarti, K., Chakraborty, A. & Ghosh, S. (2011).** Effect of long-term fertilizers and manure application on microbial biomass and microbial activity of a tropical agricultural soil. *Biol. Fert. Soils*, 47(2): 227-233, DOI: 10.1007/s00374-010-0509-1
- Chambers, C.A., Smith, S.E. & Smith, F.A. (1980).** Effects of ammonium and nitrate ions on mycorrhizal infection, nodulation and growth of *Trifolium subterraneum*. *New Phytol.*, 85(1): 47-62, DOI: 10.1111/j.1469-8137.1980.tb04447.x
- Chmielewski, J.G. & Ruit, S. (2002).** Interrelationships among achene weight, orientation, and germination in the asters *Doellingeria umbellata* var. *Umbellata* var. *Symphotrichum novae-angliae* and *S. puniceum* (Asteraceae). *Bartonia*, 61: 15-26.
- Choze, R., Alcantara, G.B., Alves Filho, E.D.G., e Silva, L.M.A., Faria, J.C. & Lião, L.M. (2013).** Distinction between a transgenic and a conventional common bean genotype by <sup>1</sup>H HR-MAS NMR. *Food Chem.*, 141(3): 2841-2847, DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.123
- Costa, N.L., Moraes, A., Monteiro, A.L.G., Motta, A.C.V., Oliveira, R.A. & Rodrigues, A.N.A. (2013).** Forage productivity and morphogenesis of *Axonopus aureus* under different nitrogen fertilization rates. *R. Bras. Zootec.*, 42(8): 541-548, DOI: 10.1590/S1516-35982013000800002
- Donald, C.M. (1962).** In search of yield. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.*, 28, 171-178.
- Dordas, C.A., Lithourgidis, A.S., Matsi, T. & Barbayiannis, N. (2008).** Application of liquid cattle manure and inorganic fertilizers affect dry matter, nitrogen accumulation, and partitioning in maize. *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, 80(3): 283-296, DOI: 10.1007/s10705-007-9143-1
- Drevon, J.J., Alkama, N., Bargaz, A., Rodiño, A.P., Sungthongwiset, K. & Zaman-Allah, M. (2015).** The legume-rhizobia symbiosis. In: Grain Legumes, pp. 267-290, Springer, New York.
- Dumka, D., Bednarz, C.W. & Maw, B.W. (2004).** Delayed initiation of fruiting as a mechanism of improved drought avoidance in cotton. *Crop Sci.*, 44(2): 528-534.
- Fageria, N.K. & Baligar, V.C. (1997).** Response of common bean, upland rice, corn, wheat, and soybean to soil fertility of an Oxisol. *J. Plant Nutr.*, 20(10): 1279-1289, DOI: 10.1080/01904169709365335
- Fageria, N.K. & Baligar, V.C. (2003).** Fertility management of tropical acid soils for sustainable crop production. In Handbook of soil acidity (Z. Rengel, Ed.), pp. 359-385. Marcel Dekker, New York.
- Fernández-Luqueño, F., Reyes-Varela, V., Martínez-Suárez, C., Salomón-Hernández, G., Yáñez-Meneses, J., Ceballos-Ramírez, J.M. & Dendooven, L. (2010).** Effect of different nitrogen sources on plant characteristics and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioresour. Technol.*, 101(1): 396-403, DOI: 10.1016/j.biortech.2009.07.058
- Fustec, J., Lesuffleur, F., Mahieu, S. & Cliquet, J.B. (2010).** Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 30(1): 57-66, DOI: 10.1051/agro/2009003
- García-Garijo, A., Tejera, N.A., Lluch, C. & Palma, F. (2014).** Metabolic responses in root nodules of *Phaseolus vulgaris* and *Vicia sativa* exposed to the imazamox herbicide. *Pestic. Biochem. Phys.*, 111: 19-23, DOI: 10.1016/j.pestbp.2014.04.005
- Graham, P.H. (1981).** Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a

## PERFORMANCE OF COMMON BEAN UNDER NITROGEN FERTILIZATION

- review. *Field Crops Res.*, 4: 93-112, DOI: 10.1016/0378-4290(81)90060-5
- Guinet, M., Nicolardot, B., Revellin, C., Durey, V., Carlsson, G. & Voisin, A.S. (2018).** Comparative effect of inorganic N on plant growth and N<sub>2</sub> fixation of ten legume crops: towards a better understanding of the differential response among species. *Plant Soil*, 432(1-2): 207-227, DOI: 10.1007/s11104-018-3788-1
- Inostroza, L., Acuña, H. & Tapia, G. (2015).** Relationships between phenotypic variation in osmotic adjustment, water-use efficiency, and drought tolerance of seven cultivars of *Lotus corniculatus* L. *Chil.J.Agr. Res.*, 75(1): 3-12, DOI: 10.4067/S0718-58392015000100001
- Jansa, J., Bationo, A., Frossard, E. & Rao, I.M. (2011).** Options for improving plant nutrition to increase common bean productivity in Africa. In: Fighting poverty in Sub-Saharan Africa: the multiple roles of legumes in integrated soil fertility management, pp. 201-240, *Springer*, Dordrecht.
- Jin, Z., Prasad, R., Shriver, J. & Zhuang, Q. (2017).** Crop model-and satellite imagery-based recommendation tool for variable rate N fertilizer application for the US Corn system. *Precis.Agric.*, 18(5): 779-800, DOI: 10.1007/s11119-016-9488-z
- Kakraliya, S.K., Singh, U., Bohra, A., Choudhary, K. K., Kumar, S., Meena, R.S. & Jat, M.L. (2018).** Nitrogen and legumes: a meta-analysis. In: Legumes for Soil Health and Sustainable Management, pp. 277-314, *Springer*, Singapore.
- Kawaka, F., Dida, M., Opala, P., Ombori, O., Maingi, J., Amoding, A. & Muoma, J. (2018).** Effect of nitrogen sources on the yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. *J. Plant Nutr.*, 41(13): 1652-1661, DOI: 10.1080/01904167.2018.1458870
- Knapp, B.A., Ros, M. & Insam, H. (2010).** Do composts affect the soil microbial community? In: Microbes at work, pp. 271-291, *Springer*, Berlin, Heidelberg.
- Kohls, S.J. & Baker, D.D. (1989).** Effects of substrate nitrate concentration on symbiotic nodule formation in actinorhizal plants. *Plant Soil*, 118(1-2): 171-179, DOI: 10.1007/BF02232804
- Larney, F.J. & Angers, D.A. (2012).** The role of organic amendments in soil reclamation: a review. *Canadian J. Soil Sci.*, 92(1): 19-38, DOI: 10.4141/cjss2010-064
- Lemanceau, P., Maron, P.A., Mazurier, S., Mougel, C., Pivato, B., Plassart, P., Ranjard, L., Revellin, C., Tardy, V. & Wipf, D. (2015).** Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology. *Agron.Sustain.Dev.*, 35(1): 67-81, DOI: 10.1007/s13593-014-0247-0
- Li, J., Cooper, J.M., Li, Y., Yang, X. & Zhao, B. (2015).** Soil microbial community structure and function are significantly affected by long-term organic and mineral fertilization regimes in the North China Plain. *Appl. Soil Ecol.*, 96: 75-87, DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.07.001
- Liu, H., Zhang, C., Yang, J., Yu, N. & Wang, E. (2018).** Hormone modulation of legume-rhizobial symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biol.*, 60(8): 632-648, DOI: 10.1111/jipb.12653
- Mansouri, L.M., Heleili, N., Boukhatem, Z.F. & Kheloufi, A. (2019).** Seed germination and radicle establishment related to type and level of salt in common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Djedida*). *Cercet. Agron. în Moldova (Agronomical Research in Moldavia)*, 52(3): 262-277, DOI: 10.2478/cerce-2019-0026
- Monti, M., Pellicanò, A., Santonoceto, C., Preiti, G. & Pristeri, A. (2016).** Yield components and nitrogen use in cereal-pea intercrops in

- Mediterranean environment. *Field Crops Res.*, 196: 379-388, DOI: 10.1016/j.fcr.2016.07.017
- Nascente, A.S., Carvalho, M.D.C.S., Melo, L.C. & Rosa, P.H. (2017).** Nitrogen management effects on soil mineral nitrogen, plant nutrition and yield of super early cycle common bean genotypes. *ActaSci.Agron.*, 39(3): 369-378, DOI: 10.4025/acta sciagron.v39i3.32781
- Nassary, E.K., Baijukya, F. & Ndakidemi, P.A. (2020).** Productivity of intercropping with maize and common bean over five cropping seasons on smallholder farms of Tanzania. *Eur.J.Agron.*, 113: 125964, DOI: 10.1016/j.eja.2019.12.5964
- Osdaghi, E., Shams-Bakhsh, M., Alizadeh, A., Lak, M.R. & Maleki, H.H. (2011).** Induction of resistance in common bean by *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and decrease of common bacterial blight. *Phytopathol.Mediterr.*, 50(1): 45-54.
- Otieno, P., Muthomi, J., Chemining'wa, G. & Nderitu, J. (2009).** Nodulation and yield of food grain legumes. *J.Biol.Sci.*, 9(4): 326-332.
- Papakosta, D.K. & Gagianas, A.A. (1991).** Nitrogen and dry matter accumulation, remobilization, and losses for Mediterranean wheat during grain filling. *Agron.*, 83(5): 864-870, DOI: 10.2134/agronj1991.00021962008300050018x
- Remans, R., Ramaekers, L., Schelkens, S., Hernandez, G., Garcia, A., Reyes, J.L., Mendez, N., Toscano, V., Mulling, M., Galvez, L. & Vanderleyden, J. (2008).** Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil*, 312(1-2): 25-37, DOI: 10.1007/s11104-008-9606-4
- Senyolo, M.P., Long, T.B., Blok, V. & Omta, O. (2018).** How the characteristics of innovations impact their adoption: An exploration of climate-smart agricultural innovations in South Africa. *J.Clean.Prod.*, 172: 3825-3840, DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.06.019
- Seppänen, M.M., Alitalo, V., Bäckström, H.K., Mäkinieniemi, K., Jokela, V., Falghera-Winseman, L. & Khazaei, H. (2018).** Growth, freezing tolerance, and yield performance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars grown under controlled and field conditions in northern latitudes. *Can.J. Plant Sci.*, 98(5): 1109-1118, DOI: 10.1139/CJPS-2017-0305
- Smethurst, P.J. (2010).** Forest fertilization: trends in knowledge and practice compared to agriculture. *Plant Soil*, 335(1-2): 83-100, DOI: 10.1007/s11104-010-0316-3
- Souza, R.D., Ambrosini, A. & Passaglia, L.M. (2015).** Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet.Mol.Biol.*, 38(4): 401-419, DOI: 10.1590/S1415-475738420150053
- Swiader, J.M., Sipp, S.K. & Brown, R.E. (1994).** Pumpkin growth, flowering, and fruiting response to nitrogen and potassium sprinkler fertigation in sandy soil. *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 119(3): 414-419, DOI: 10.21273/JASHS.119.3.414
- Thomas, R.B., Bashkin, M.A. & Richter, D.D. (2000).** Nitrogen inhibition of nodulation and N<sub>2</sub> fixation of a tropical N<sub>2</sub>-fixing tree (*Gliricidia sepium*) grown in elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *New Phytol.*, 145(2): 233-243, DOI: 10.1046/j.1469-8137.2000.00577.x
- Turuko, M. & Mohammed, A. (2014).** Effect of different phosphorus fertilizer rates on growth, dry matter yield and yield components of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J.Agric. Res.*, 2(3): 88-92, DOI: 10.12691/wjar-2-3-1
- Unkovich, M.J. & Pate, J.S. (2000).** An appraisal of recent field measurements of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by annual legumes. *Field*



## PERFORMANCE OF COMMON BEAN UNDER NITROGEN FERTILIZATION

- Crops Res.*, 65(2-3): 211-228, DOI: 10.1016/S0378-4290(99)00088-X
- Valentine, A.J., Benedito, V.A. & Kang, Y. (2018).** Legume nitrogen fixation and soil abiotic stress: from physiology to genomics and beyond. *Annual Plant Reviews online*, 207-248, DOI: 10.1002/9781119312994.apr0456
- Wahab, A.A. & Abd-Alla, M.H. (1995).** The role of potassium fertilizer in nodulation and nitrogen fixation of faba bean (*Vicia faba* L.) plants under drought stress. *Biol.Fert.Soils*, 20(2), 147-150.
- Wahab, A.A., Zahran, H.H. & Abd-Alla, M.H. (1996).** Root-hair infection and nodulation of four grain legumes as affected by the form and the application time of nitrogen fertilizer. *Folia Microbiol.*, 41(4): 303-308.
- Wiersum, L.K. (1958).** Density of root branching as affected by substrate and separate ions. *Acta Bot.Neerl.*, 7(2): 174-190.
- Xu, G., Wolf, S. & Kafkafi, U. (2001).** Interactive effect of nutrient concentration and container volume on flowering, fruiting, and nutrient uptake of sweet pepper. *J. Plant Nutr.*, 24(3): 479-501, DOI: 10.1081/PLN-100104974
- Yin, J., Deng, C.B., Wang, X.F., Chen, G.L., Mihucz, V.G., Xu, G.P. & Deng, Q.C. (2019).** Effects of long-term application of vinasse on physicochemical properties, heavy metals content and microbial diversity in sugarcane field soil. *Sugar Tech*, 21(1): 62-70.
- Zhang, C., Liu, G., Xue, S. & Wang, G. (2016).** Soil bacterial community dynamics reflect changes in plant community and soil properties during the secondary succession of abandoned farmland in the Loess Plateau. *Soil Biol.Biochem.*, 97: 40-49, DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.02.013.

## SEED GERMINATION AND RADICLE ESTABLISHMENT RELATED TO TYPE AND LEVEL OF SALT IN COMMON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS* L. VAR. *DJEDIDA*)

L.M. MANSOURI<sup>1</sup>, N. HELEILI<sup>2</sup>, Z.F. BOUKHATEM<sup>3</sup>, A. KHELOUFI<sup>1\*</sup>

\*E-mail: abdenour.kheloufi@yahoo.fr

Received: Oct. 25, 2019. Revised: Nov. 21, 2019. Accepted: Nov. 28, 2019. Published online: Dec. 20, 2019

**ABSTRACT.** Saline soils contain multiple types of salt, each of them may exert a different effect on seed germination and seedling growth. The aim of this study is to assess the effects of five types of salt on the seed germination and radicle establishment of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *Djedida*). The experiment was set out as a factorial experiment based on completely randomized design with four replications of ten seeds for the seed germination and twelve replicates for the seedling growth. We used five kinds of salts (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub> and KCl) with concentrations of 0, 100, 200 and 300 mM. Seeds were incubated in Petri dishes at 25°C, in the dark, for 10 days. The results of analysis of variance indicated that the effects of salt types and concentrations, and their interaction effect were significant in all measured traits ( $P < 0.01$ ). However, no significance effect was found on secondary roots number and

seedlings dry biomass with CaCO<sub>3</sub> treatment solution. According to the results, the inhibitory effects of the five salt types differed significantly. Indeed, germination of common bean seeds by various salts were in the order of NaCl > KCl > CaCO<sub>3</sub> > Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> > CaCl<sub>2</sub>. However, the taproot length, the number of secondary roots and the seedlings dry weight by various salts were in the order of CaCO<sub>3</sub> > KCl > NaCl > CaCl<sub>2</sub> > Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The effect of salt concentration was also obvious. The reduction in dry biomass of cotyledons is proportional to germination rates and to the development of seedlings in dry biomass and in size. Seeds of *P. vulgaris* var. *Djedida* were able to germinate under all concentrations of the various types of salt. The lowest final germination percentage (FGP) was obtained under 300 mM of all salts recording the following values: CaCO<sub>3</sub> - 60%, NaCl - 60%, KCl - 52.5%, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 50% and CaCl<sub>2</sub> - 27.5%. During

<sup>1</sup> Department of Ecology and Environment, University of Batna 2, Batna, Algeria

<sup>2</sup> Department of Veterinary Sciences, University of Batna 1, Batna, Algeria

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, University of Oran 1, Oran, Algeria

## GERMINATION BEHAVIOR OF COMMON BEAN ACROSS A RANGE OF SALINITIES

germination stage, the radicle emergence would be controlled by the environment osmolarity, while the later growth of the seedling would be limited by the reserve mobilization.

**Keywords:** agriculture; Fabaceae; local adaptation; osmotic stress; salt tolerance.

### INTRODUCTION

Food legumes play an important role in the cropping systems and in the diet of the population (Sinclair and Vadez, 2012). Among these legumes, bean or common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the oldest species and a major part of humanity's diet (Bevilaqua and Antunes, 2015). In addition to its interest as one of the major legumes providing energy, beans are also an important source of protein in developing countries (Blair, 2013).

In Algeria, the low yields are mainly due to the environment fluctuations recorded during the various seasons (Beebe *et al.*, 2013). Indeed, the Algerian climate is characterized by irregular rainfall over time and space, as well as a tendency towards more aridity and thus an increased impact of drought. These are considered as factors of a partial or total loss of production (Faramarzi *et al.*, 2013).

Abiotic stresses, such as drought, salinity, extreme temperatures, chemical toxicity and oxidative stress are serious threats to agriculture and result in a deterioration of the environment (Kusvuran *et al.*, 2016). Abiotic stress is the leading cause of

crop loss in the world, reducing average yields of most field crops (Lobell, 2014). Drought and salinity are becoming widespread in many areas and can result in serious salinization of more than 50% of all arable land by 2050 (Galford *et al.*, 2010). Abiotic stress results in a series of morphological, physiological, biochemical and molecular changes that affect plant growth and productivity (Zandalinas *et al.*, 2018). Overall, more than 800 million hectares of land are affected by salinity (Munns, 2005), at the world level.

Saline soils contain multiple types of soluble salt components, each of which has a different effect on the initial growth of plants (Bernstein, 1958; Munns and Termaat, 1986; Shannon and Grieve, 1998; Kheloufi *et al.*, 2016a), and the compositions of soluble salts in saline soils differ greatly among locations (Tobe *et al.*, 2002; Kheloufi *et al.*, 2017).

Although most of these reports are basing on experiments with NaCl, it has been hypothesized that the other salts have similar effects on cellular function, but to different degrees (Tobe *et al.*, 2004). More cations and anions associated with salinity are calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), sodium ( $\text{Na}^+$ ), chloride ( $\text{Cl}^-$ ), sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), and bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ). In some instances, potassium ( $\text{K}^+$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) may participate to salinity, and when pH is greater than 9,  $\text{CO}_3^{2-}$  becomes a problematic anion (Schabes and Sigstad, 2005). These effects of salts on the functions of the

cell membranes and the cell walls may affect the water potential of the cytosol and cellular extensibility, and thus, may affect seed germination and seedling growth (Kheloufi *et al.*, 2018).

Seed germination is the most important stage in a plant life cycle. Water, air, temperature and light are all essential for the seed germination process, starting from imbibition, activation and succeeding manifestation (Bradford, 1995; Bewley and Black, 2012; Finch-Savage and Bassel, 2015).

In glycophytes species, salinity can reduce the growth of plants or damage the plants through osmotic effect (it causes water deficit), toxic effects of ions and imbalance of the uptake of essential nutrients (Parihar *et al.*, 2015).

In the present study, we compared the effects of different types of salts on seed germination and seedling growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* var. *Djedida*). This variety is among the most cultivated bean varieties in Algeria. It has already been the subject of several studies evaluating its tolerance to NaCl (Bouزيد and Rahmoune, 2012; Adda *et al.*, 2014; Taïbi *et al.*, 2016) and even seawater (Mansouri and Kheloufi, 2017).

## MATERIAL AND METHODS

### Experimental design and treatments

This research project was performed in 2018, at the laboratory of the Department of Ecology and Environment, University of Batna 2, Algeria. Seeds of

*P. vulgaris* var. *Djedida* (length:  $12.9 \pm 0.63$  mm; width:  $6.46 \pm 0.51$  mm; thickness:  $5.69 \pm 0.42$  mm; mean  $\pm$  SE; n = 50) were provided by SARL AGROSEED (Harvest date: 2016; seed conditioning: France; origin: USA; reference: DJ0512). The one-thousand seed weight was 273 g.

To evaluate salt tolerance during germination, a total of four replicates of ten seeds were disinfected with 1% NaOCl, rinsed with distilled water and immediately sown on 0.8% (water agar) in 9 cm Petri dishes.

The water agar was prepared with various salts: NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub> and KCl, with concentrations of 0, 100, 200 and 300 mM. Seeds were incubated at 25°C, in the dark, for 10 days, because the seeds germinate favourably under these conditions (Mansouri and Kheloufi, 2017). Experiments was performed in a completely randomized block. Germination counts were done daily to evaluate the kinetics of germination. Seeds were considering germinating only when 2 mm radicles emerged (*Fig. 1*).

At the end of the germination period, the final germination percentage, the length of the taproot, the number of secondary roots, the dry weight of cotyledons and seedlings (without cotyledons) were recorded. The common bean root system is characterized by a taproot. Roots arising from it are called secondary roots, those formed from them is called tertiary roots. Adventitious roots were formed at the base of hypocotyl (Díaz-Ruiz, 2012). Cotyledons and seedlings were weighed separately after drying in an oven at 80°C for 48 hrs. Twelve replications were used for the growth traits, *viz.* three replicates from each Petri dish.

## GERMINATION BEHAVIOR OF COMMON BEAN ACROSS A RANGE OF SALINITIES

In the germination tests, final germination percentage (FGP) for each

salt types and levels were calculated by using the following formula:

$$FGP (\%) = \frac{\sum ni}{N} \times 100$$

where, *FGP* is final germination percentage, *ni* is the number of germinated seeds at final day of test, and *N* is the total number of incubated seeds per test (Côme, 1970).

### Statistical analysis

The experiments were conducted with four replicates of ten seeds ( $n=4*10$ ) for the trait seed germination and with 12 replicates ( $n=12$ ) for the morphological characteristics, and the results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). All the data were subjected to one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test ( $P < 0.05$ ) using SAS Version 9.0 (Statistical Analysis System) (2002) software.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results of analysis of variance indicated that the effects of salt types and concentrations, and their interaction effect were significant in all measured traits ( $P < 0.01$ ) (Table 1). Mean comparison of simple effects of different salt types and concentrations and their interaction are shown in Table 2.

The mean comparison results and the results of analysis of variance (Table 2) showed that among different salts, the lowest inhibitory effects on germination and the most measured traits was belonged to  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{KCl}$ , and the highest inhibitory was related to  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and  $\text{CaCl}_2$ .

On the other hand, it is important that effect of salt concentration was obvious. The highest inhibitory effect was related to 300 mM of all the salts (Table 2).

### Germination kinetics

According to our results, the common bean seeds were able to germinate in the absence and/or in the presence of a low/high salinity, they are tolerant in the presence of salts; but, this tolerance differs from a treatment solution to the other one, because the type of salt plays a determining role grafting for the seed germination (Kheloufi *et al.*, 2016b). The results represented on Fig. 2 indicate that under the saline conditions of the five kinds of salts ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{KCl}$ ), the kinetics of germination expresses three phases: a first phase of latency, expressed by the imbibition of seeds; a second exponential phase where one attends an acceleration of germination and finally a third phase characterized by a stationary stage indicating an interruption of germination. Finally, whatever the type of salt used, the germinative capacity of salt-stressed seeds is reduced and this for the three concentrations used.

Under saline conditions operated by 100 mM of all the type of salt, the dynamics of the germinative capacity

are slightly disturbed. The seeds expressed their sensitivity starting from the concentration of 200 mM by expressing a very reduced germination rate with a very slow exponential phase and which lasts much longer to be stabilized at the 10<sup>th</sup> day of the experiment. The concerned salts by this observation were only NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> and CaCO<sub>3</sub> (Fig. 2). According to Rejili *et al.* (2010), the osmotic effects are translated by the

inability of seeds to absorb sufficient amounts in water to return them to their critical threshold of moisture, necessary for the release of the process of germination; however, the toxic effects are bound to a cellular accumulation of salts, which cause disturbances of enzymes involved in the physiology of seed germination, prevent dormancy breaking of embryos and lead to a decrease in the capacity of germination.



Figure 1 - Experimental design

### Final germination percentage

According to Figure 3A, interpretation of interaction effect of salt types and concentrations on germination percentage showed that maximum germination was obtained under non-saline conditions (control treatment) (87.5%). The lowest FGP was obtained under 300 mM of all salts recording the following values: 60% (NaCl), 60% (CaCO<sub>3</sub>), 52.5% (KCl), 50% (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and 27.5% (CaCl<sub>2</sub>). This reduction in the FGP induced by an increase of salinity stress have been described by numerous authors for the same leguminous species (Beltagi *et al.*,

2006; Taffouo *et al.*, 2010; Cokkizgin, 2012; Mena *et al.*, 2015). Decrease in germination by increasing of salinity level was possibly due to reduced soluble osmotic potential, high toxic ions and seed nutrient imbalance (Hu and Schmidhalter, 2005). It is also assumed that in addition to toxic effects of certain ions, higher concentration of salt, reduces the water potential in the medium, which hinders water absorption by germinating seeds and thus reduces germination (Jamil *et al.*, 2006; Tavakkoli *et al.*, 2010).

Germination of common bean seeds by various salts were in the



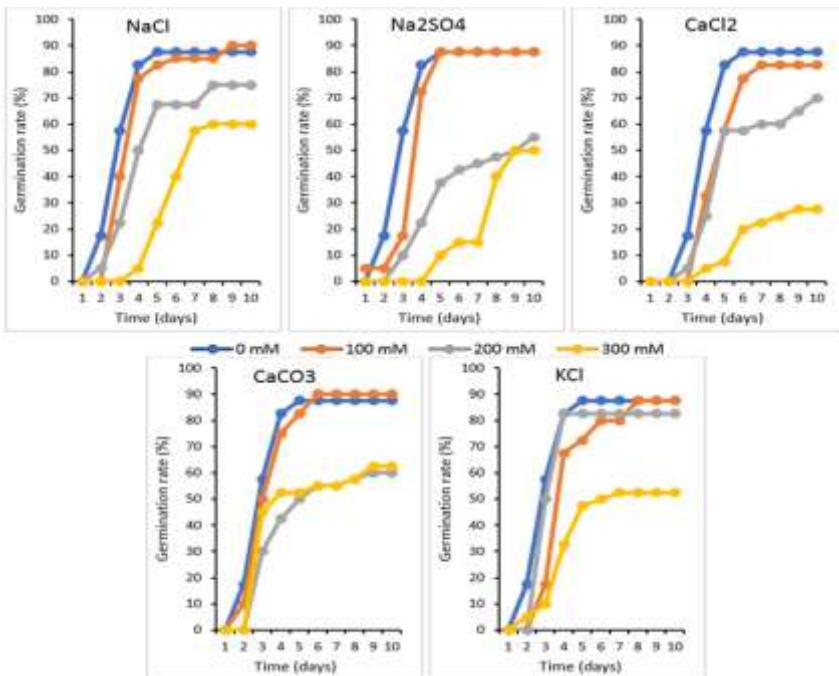
## GERMINATION BEHAVIOR OF COMMON BEAN ACROSS A RANGE OF SALINITIES

order of  $\text{NaCl} > \text{KCl} > \text{CaCO}_3 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{CaCl}_2$  (Table 2).

Kaymakanova (2009) also showed that the three studied cultivars of *P. vulgaris* were inhibited stronger by  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  than  $\text{NaCl}$  treatment. This can be attributed to the fact that different salts have different inhibitory effects on induction of germination suppression

by lowering the osmotic potential of the medium (Moghaddam *et al.*, 2018).

Most studies showed that the effect of salts on the germination is primarily osmotic and few researchers showed that it could be both ionic and osmotic (Duan *et al.*, 2004; Joshi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010).



**Figure 2 - Effect different type of treatment solution ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{KCl}$ ) at various concentrations of (0, 100, 200 and 300 mM) on the germination kinetics of *Phaseolus vulgaris* var. *Djedida* after 10 days of incubation in Petri dish**

### Length of the taproot

The root length are the most important parameters for salt stress, because roots are in direct contact with soil and absorb water from soil and supply it to the rest of the plant. For this reason, root length provides

an important trait in response to salt stress (Munns, 2011; Kheloufi *et al.*, 2018). The length of the taproot showed a highly significant difference among the interaction effect of various salts and different salinity concentrations (Fig. 3B).

By increasing of the salinity levels, the length of the taproot decreased. The highest root length was recorded in control treatment (6.97 cm) (Fig. 3B). The inhibitory effect of salts on root length have been found in our previous studies with three leguminous crops, viz. common bean, pea and chickpea (Mansouri and Kheloufi, 2017). The taproot length by various salts were in the order of  $\text{CaCO}_3 > \text{KCl} > \text{NaCl} >$

$\text{CaCl}_2 > \text{Na}_2\text{SO}_4$  (Table 2). Decrease in plant height and other growth parameters are the most distinct and obvious effects of salt stress, since inhibition of growth is probably the most general response of plants to stress (Munns and Tester, 2008). Bayuelo-Jimenes (2002) reported that salt-tolerant species (accessions) of *Phaseolus* maintained relatively high root growth even at 180 mM (nutrient solution) NaCl.

**Table 1 - Analysis of variance for the traits investigated for *Phaseolus vulgaris* var. *Djedida* in response to salinity stress using different type of treatment solution (NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  and KCl) at various concentrations of (0, 100, 200 and 300 mM)**

Parameters	Source of variables	Degree of freedom	F de Fisher	P
FGP	TRT	3	56,48	< 0,0001
	TYPE	4	3,43	0,0136
	TRT x TYPE	12	2,74	0,0051
LTR	TRT	3	383,59	< 0,0001
	TYPE	4	39,25	< 0,0001
	TRT x TYPE	12	15,64	< 0,0001
SECROOT	TRT	3	70,27	< 0,0001
	TYPE	4	25,48	< 0,0001
	TRT x TYPE	12	8,10	< 0,0001
COTYDW	TRT	3	157,81	< 0,0001
	TYPE	4	37,42	< 0,0001
	TRT x TYPE	12	7,30	< 0,0001
SLDW	TRT	3	165,92	< 0,0001
	TYPE	4	173,03	< 0,0001
	TRT x TYPE	12	23,19	< 0,0001

TRT - Salt concentration, FGP - Final germination percentage (n=4\*10), LTR - Length of the taproot (n=12), SECROOT - Number of secondary roots (n=12), COTYDW - Cotyledon dry weight (n=12), SLDW - Seedling dry weight (n=12)

### Number of secondary roots

Developing a robust root system is crucial to plant survival and competition for soil resources (Schenk, 2006). There was a significant difference between various salts and each salinity level on secondary roots. The results of

interaction effect showed that lateral roots were recorded mostly in control and 200 mM of  $\text{CaCO}_3$  and KCl (Fig. 3C).

On the other hand, *P. vulgaris* seeds preserved the ability to produce secondary roots by increasing concentration to 300 mM up to 12

only in  $\text{CaCO}_3$ . While, under the same level, the inhibitory effects of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$  and  $\text{KCl}$  were higher (Fig. 3C). According to the same figure, the highest value of secondary roots belonged to 100 mM  $\text{KCl}$ . High salinity produces in plant a physiological drought. According to this, common bean duplicated the number of secondary and tertiary roots with modified architecture in response to drought (Nuñez-Barrios *et al.*, 1998). No significance effect was found on secondary roots number under  $\text{CaCO}_3$  (Table 2).

A deep and extensive root system has been advocated to increase productivity of food legumes under drought and salinity conditions. Root length could be an important trait to assist *in vitro* selection of salinity resistant varieties of beans with an improved capacity to acquire water (Mena *et al.*, 2015).

Duan *et al.* (2013) found that primary and lateral roots have intrinsically different response programs to salinity, with lateral roots having a stronger suppression than primary roots after salt treatment. Under high salinity, the production of abscisic acid (ABA) is induced and it is necessary for suppression of lateral roots.

The ability of the root system to control entry of ions to the shoot has crucial importance to plant survival in the presence of salt (Chinnusamy, 2005). In addition, high salinity may inhibit seedling and root elongation by slowing down the water uptake by the plant (Munns, 2002).

### Cotyledons dry weight

During the germination process, the mobilization of seed reserves is initiated from the cotyledons to the embryonic axis (Bewley and Black, 1985). This process continues until the seedling stage, in which the primary sources are exhausted and the seedling becomes autotrophic to form leaves that carry out photosynthesis, which are the most important source of photosynthate of the plant (Munier-Jolain *et al.*, 1998). The embryonic axis consists of the plumule and radicle, which demands nutrients from the seed when germination begins, which are provided by the cotyledons (Bewley and Black, 1985). The cotyledons dry biomass by various salts were in the order of  $\text{CaCl}_2 > \text{NaCl} > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{KCl} > \text{CaCO}_3$  (Table 2).

The higher tolerance of cotyledon to salt stress may be an adaptive strategy of this species to survive with adverse environmental factors (Ruffino *et al.*, 2010). Studies carried out by Wang *et al.* (2012) also indicated that cotyledons of *Vicia cracca* were more tolerant to  $\text{NaCl}$  stress than shoots.

According to Bathellier *et al.* (2008), during imbibition of the seed of *P. vulgaris* plants, cotyledons mass decrease slowly but after three days it was found that accelerated markedly. Cotyledons reduced its dry weight because they are the only structures that provide nutrients to the seedling (Díaz-Ruiz, 2012).

According to Fig. 3D, the reduction in dry biomass of

cotyledons is proportional to germination rates and to the development of seedlings in dry biomass and in size. This establishes the relationships between growth of the shoot, root and provides nutrients from the cotyledons, which can be expressed by dry matter accumulation in the stem and root and to lose dry

matter of cotyledons (Milberg and Lamont, 1997; Koyro *et al.*, 2008). In the germination process, the cotyledons lose metabolic dry matter and conserved structural dry matter during the development of the seedling so that they become the only structures that die (Díaz-Ruiz, 2012).

**Table 2 - Analysis of variance for each treatment solution (NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub> and KCl) used to investigate the response of *Phaseolus vulgaris* var. *Djedida* to salinity stress**

Treatment solution	Parameters	Source of variables	Degree of freedom	F de Fisher	P
NaCl	FGP	TRT	3	9.31	0.0019
	LTR	TRT	3	101.33	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	15.32	< 0,0001
	COTYDW	TRT	3	50.00	< 0,0001
	SLDW	TRT	3	84.97	< 0,0001
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	FGP	TRT	3	18.86	< 0,0001
	LTR	TRT	3	290.04	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	36.15	< 0,0001
	COTYDW	TRT	3	50.14	< 0,0001
	SLDW	TRT	3	119.20	< 0,0001
CaCl <sub>2</sub>	FGP	TRT	3	17.62	0.0001
	LTR	TRT	3	141.49	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	33.54	< 0,0001
	COTYDW	TRT	3	36.50	< 0,0001
	SLDW	TRT	3	82.16	< 0,0001
CaCO <sub>3</sub>	FGP	TRT	3	6.97	0.0057
	LTR	TRT	3	12.03	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	1.15	0.3449
	COTYDW	TRT	3	4.54	0.0092
	SLDW	TRT	3	2.77	0.0578
KCl	FGP	TRT	3	15.11	0.0002
	LTR	TRT	3	129.21	< 0,0001
	SECROOT	TRT	3	23.18	< 0,0001
	COTYDW	TRT	3	77.80	< 0,0001
	SLDW	TRT	3	74.13	< 0,0001

TRT - Salt concentration, FGP - Final germination percentage (n=4\*10), LTR - Length of the taproot (n=12), SECROOT - Number of secondary roots (n=12), COTYDW - Cotyledon dry weight (n=12), SLDW - Seedling dry weight (n=12)

## GERMINATION BEHAVIOR OF COMMON BEAN ACROSS A RANGE OF SALINITIES

### Seedling dry weight

According to the Fig. 3E, the maximum seedling dry weight was related to 100 mM of  $\text{CaCO}_3$  (89.94 mg), while the minimum was recorded in 100 mM of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1.18 mg). Indeed, under a treatment solution of  $\text{CaCO}_3$ , the seedlings recorded the highest values under all the salinity levels and also compared to control. Then, the seedling dry biomass by various salts were in the order of  $\text{CaCO}_3 > \text{KCl} > \text{NaCl} > \text{CaCl}_2 > \text{Na}_2\text{SO}_4$ .

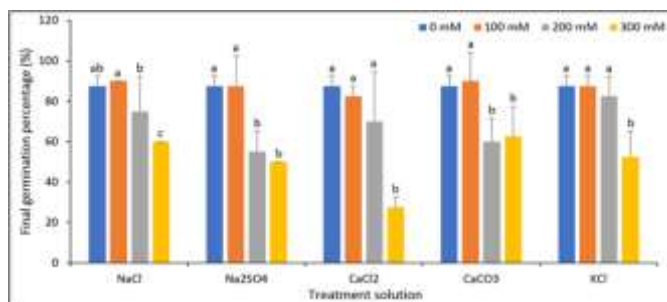
Generally, the decreases in seedling growth, due to the increase in the salt concentration, are caused by physicochemical effects or by osmotic-toxic salts, which exist in saline solutions (Sarker *et al.*, 2014). Reductions in the biomass of *P. vulgaris* under saline condition were indicative of severe growth limitations under 300 mM (Fig. 3E), except for  $\text{CaCO}_3$  treatment solution. Salinity had adverse effects not only on the biomass, but also on other morphological parameters.

In several legumes, such as faba bean (*Vicia faba*) (Tammam, 2003; Bulut and Akinci, 2010), soybean (*Glycine max*) (Panneerselvam *et al.*,

1998), and chickpea (*Cicer arietinum*) (Akhter *et al.*, 2004), salinity was reportedly found to reduce seedling dry biomass. The reduction in seedling development may be due to toxic effects of the salt used, as well as unbalanced nutrient uptake by the seedlings (Jamil *et al.*, 2006).

Bayuelo-Jiménez *et al.* (2002) indicate that the term ‘salt tolerance during seed germination’ is used only to refer to situations where the seed germinates rapidly under salt stress conditions. No distinction is made between osmotic and ionic effects of the salinity stress. Likewise, salt tolerance during early seedling growth is assessed on the absolute growth at a given salt concentration, as well as the percentage of growth under salt stress relative to growth under non-stress conditions. The same authors demonstrate that tolerance to salinity in *Phaseolus* species might also vary with developmental stages. Salt tolerance at germination and at the seedling stage appears to be controlled by more than one gene and is highly influenced by salt type and concentration (Yamaguchi and Blumwald, 2005; Munns, 2005).

(A)



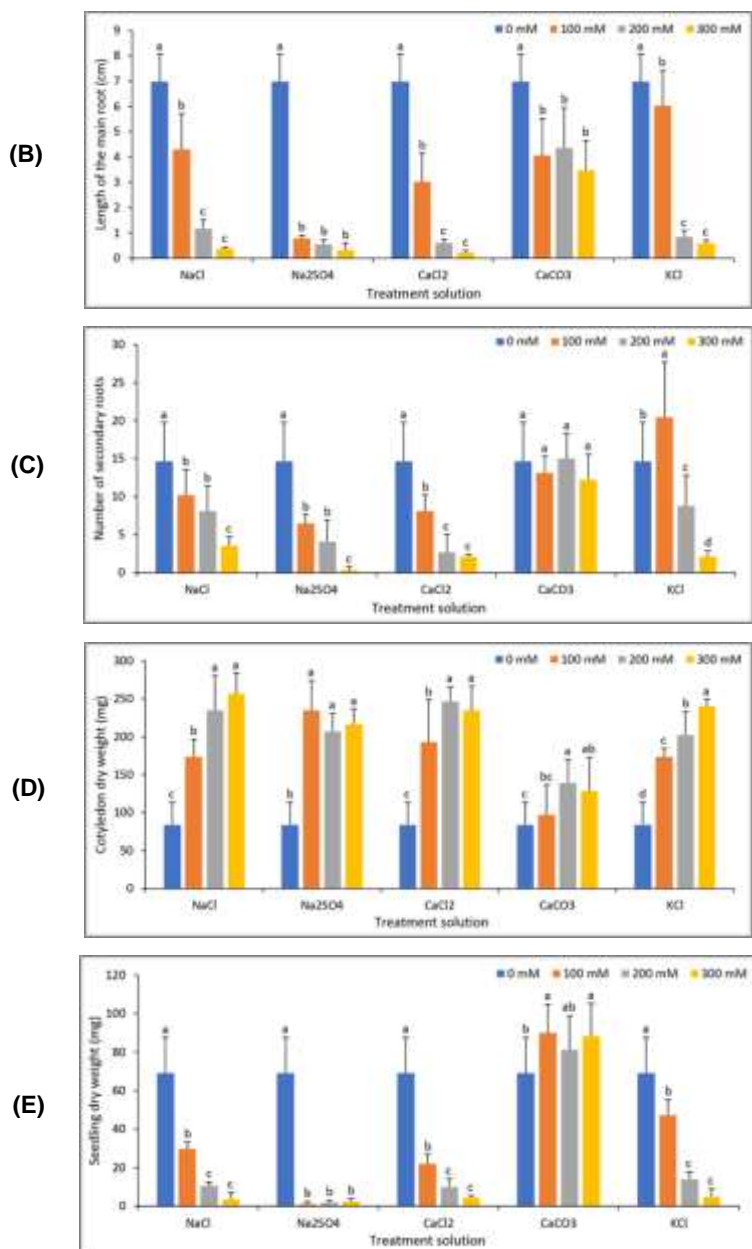


Figure 3 - Interaction effect of salt types and concentrations on: (A) Final germination percentage, (B) Length of the taproot, (C) Number of secondary roots, (D) Cotyledon dry weight and (E) Seedling dry weight in *Phaseolus vulgaris* var. *Djedida* after 10 days of incubation in Petri dish (For each treatment solution, means followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level).



## CONCLUSIONS

During germination stage, the radicle emergence would be controlled by the environment osmolarity, while the later growth of the seedling would be limited by the reserve mobilization. It can be concluded that salt stress decreased seed germination and seedling length at early growth stage. As the results demonstrated, the inhibitory effects of the five salt types studied in the germination phase of common bean differed substantially, especially in the case of NaCl, CaCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Inhibitory effects of these salts on common bean were very strong, compared to those of CaCO<sub>3</sub> and KCl. These differential behaviors of *P. vulgaris* var. *Djedida* seeds according to the salt types are presumably due to the fact that the same concentration of salt generates different osmotic potentials and the osmotic effect may have a greater influence on germination.

## REFERENCES

- Adda, A., Regagba, Z., Latigui, A. & Merah, O. (2014).** Effect of salt stress on  $\alpha$ -amylase activity, sugars mobilization and osmotic potential of *Phaseolus vulgaris* L. seeds var. 'Cocorose' and 'Djadida' during germination. *J.Biol.Sci.*, 14(5): 370-375, DOI: 10.3923/jbs.2014.370.375
- Akhter, J., Mahmood, K., Malik, K.A., Mardan, A., Ahmad, M. & Iqbal, M.M. (2004).** Effects of hydrogel amendment on water storage of sandy loam and loam soils and seedling growth of barley, wheat and chickpea. *Plant Soil Environ.*, 50(10): 463-469.
- Bathellier, C., Badeck, F.W., Couzi, P., Harscoët, S., Mauve, C. & Ghashghaie, J. (2008).** Divergence in  $\delta^{13}C$  of dark respired CO<sub>2</sub> and bulk organic matter occurs during the transition between heterotrophy and autotrophy in *Phaseolus vulgaris* plants. *New Phytologist*, 177(2): 406-418, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02246.x
- Bayuelo-Jiménes, J.S., Debouck, D.G. & Lynch, J.P. (2002).** Salinity tolerance of *Phaseolus* species during early vegetative growth. *Crop Sci.*, 42(6): 2184-2192, DOI: 10.2135/cropsci2002.2184
- Beebe, S., Rao, I., Blair, M. & Acosta-Gallegos, J. (2013).** Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Front.Physiol.*, 4: 1-20, DOI: 10.3389/fphys.2013.00035
- Beltagi, M.S., Ismail, M.A. & Mohamed, F.H. (2006).** Induced salt tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by gamma irradiation. *Pak.J.Biol.Sci.*, 9(6): 1143-1148, DOI: 10.3923/pjbs.2006.1143.1148
- Bernstein, L. & Hayward, H.E. (1958).** Physiology of salt tolerance. *Annu.Rev.Plant Physiol.*, 9(1): 25-46, DOI: 10.1146/annurev.pp.09.060158.000325
- Bevilaqua, G.A.P. & Antunes, I.F. (2015).** Chemical composition of whole grains in common beans landraces and breeding genotypes. *Holos*, (2): 81-91, DOI: 10.15628/holos.2015.1996
- Bewley, J.D. & Black, M. (1985).** Seeds. In: *Seeds, Germination, Structure, and Composition*, pp. 1-27. Springer, Boston, MA.
- Bewley, J.D. & Black, M. (2012).** Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination: Vol. 2: Viability, dormancy, and environmental control. Springer Science & Business Media.

- Blair, M.W. (2013).** Mineral biofortification strategies for food staples: the example of common bean. *J.Agric. Food Chem.*, 61(35): 8287-8294, DOI: 10.1021/jf400774y
- Bouزيد, S. & Rahmoune, C. (2012).** Enhancement of saline water for irrigation of *Phaseolus vulgaris* L. species in presence of molybdenum. *Procedia Eng.*, 33: 168-173, DOI: 10.1016/j.proeng.2012.01.1190
- Bradford, K.J. (1995).** Water relations in seed germination. *Seed Development and Germination*, 1(13): 351-396.
- Bulut, F. & Akinci, Ş. (2010).** The effect of salinity on growth and nutrient composition in broad bean (*Vicia faba* L.) seedlings. *Fresen. Environ. Bull.*, 19(12): 2901-2910.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. & Zhu, J.K. (2005).** Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.*, 45(2): 437-448, DOI: 10.2135/cropsci2005.0437
- Cokkizgin, A. (2012).** Salinity stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed germination. *Not.Bot.Horti Agrobi.* Cluj-Napoca, 40(1): 177-182. DOI: <https://doi.org/10.15835/nbha4017493>
- Côme, D. (1970).** Obstacles to germination. Masson et Cie. (Eds.), Paris, 162 p.
- Díaz-Ruiz, R. (2012).** The distribution of dry matter in bean seedlings in light and darkness conditions. *Applied Photosynthesis*, 335-352.
- Duan, D., Liu, X., Khan, M.A. & Gul, B. (2004).** Effects of salt and water stress on the seed germination of *Chenopodium glaucum* L. seed. *Pak.J.Bot.*, 36(4):793-800.
- Duan, L., Dietrich, D., Ng, C.H., Chan, P.M.Y., Bhalerao, R., Bennett, M.J. & Dinneny, J.R. (2013).** Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*, 25(1): 324-341, DOI: 10.1105/tpc.112.107227
- Faramarzi, M., Abbaspour, K.C., Vaghefi, S.A., Farzaneh, M.R., Zehnder, A.J., Srinivasan, R. & Yang, H. (2013).** Modeling impacts of climate change on freshwater availability in Africa. *J.Hydrol.*, 480: 85-101, DOI: 10.1016/j.jhydrol.2012.12.016
- Finch-Savage, W.E. & Bassel, G.W. (2015).** Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *J.Exp.Bot.*, 67(3): 567-591, DOI: 10.1093/jxb/erv490
- Galford, G.L., Melillo, J., Mustard, J.F., Cerri, C.E.P. & Cerri, C.C. (2010).** The Amazon frontier of land-use change: croplands and consequences for greenhouse gas emissions. *Earth Interact.*, 14: 1-24, DOI: 10.1175/2010EI327.1
- Hu, Y. & Schmidhalter, U. (2005).** Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 168(4): 541-549, DOI: 10.1002/jpln.200420516
- Jamil, M., Deog Bae, L., Kwang Yong, J., Ashraf, M., Sheong Chun, L. & Eui Shik, R. (2006).** Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. *J.Centr.Eur Agric.*, 7(2): 273-282.
- Joshi, A.J., Mali, B.S. & Hinglajia, H. (2005).** Salt tolerance at germination and early growth of two forage grasses growing in marshy habitats. *Environ.Exp.Bot.*, 54(3): 267-274, DOI: 10.1016/j.envexpbot.2004.09.005
- Kaymakanova, M. (2009).** Effect of salinity on germination and seed physiology in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotechnol.Biotec.Eq.*, 23(sup.1): 326-329, DOI: 10.1080/13102818.2009.10818430
- Kheloufi, A., Chorfi, A. & Mansouri, L.M. (2017).** Germination kinetics in two *Acacia karroo* hayne ecotypes under salinity conditions. *OALib.J.*, 4: 1-11, DOI: 10.4236/oalib.1103319

GERMINATION BEHAVIOR OF COMMON BEAN ACROSS A RANGE OF SALINITIES

- Kheloufi, A., Chorfi, A. & Mansouri, L.M. (2016a).** Comparative effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on seed germination of *Acacia saligna* L. and *Acacia decurrens* Willd. *Int.J.Biosci.*, 8(6): 1-13, DOI: 10.12692/ijb/8.6.1-13
- Kheloufi, A., Chorfi, A. & Mansouri, L.M. (2016b).** The Mediterranean seawater: the impact on the germination and the seedlings emergence in three *Acacia* species. *J.Bio.Env.Sci.*, 8(6): 238-249.
- Kheloufi, A., Chorfi, A., Mansouri, L.M. & Benyamina, H. (2018).** Morpho-physiological characterization and photosynthetic pigment contents of *Acacia karroo* hayne seedlings under saline conditions. *Agricult. Forest.*, 64(2): 87-99, DOI: 10.17707/AgricultForest.64.2.06
- Koyro, H.W., Lieth, H. & Eisa, S.S. (2008).** Salt tolerance of *Chenopodium quinoa* Willd., grains of the Andes: Influence of salinity on biomass production, yield, composition of reserves in the seeds, water and solute relations. *Mangroves and Halophytes: Restoration and Utilisation*, 133-145. Springer, Dordrecht.
- Kusvuran, S., Kiran, S. & Ellialtioglu, S.S. (2016).** Antioxidant enzyme activities and abiotic stress tolerance relationship in vegetable crops. Arun K. Shanker (Ed.), *Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives*. Publisher: Intech, Chitra Shanker, 481-506, DOI: 10.5772/62235
- Lobell, D.B. (2014).** Climate change adaptation in crop production: beware of illusions. *Glob. Food Sec.* 3(2): 72-76, DOI: 10.1016/j.gfs.2014.05.002
- Mansouri, L.M. & Kheloufi, A. (2017).** Effect of diluted seawater on seed germination and seedling growth of three leguminous crops (pea, chickpea and common bean). *Agricult.Forest.*, 63(2): 131-142, DOI: 10.17707/AgricultForest.63.2.11
- Mena, E., Leiva-Mora, M., Jayawardana, E.K.D., García, L., Veitia, N., Bermúdez-Caraballoso, I., Collado, R. & Ortíz, R.C. (2015).** Effect of salt stress on seed germination and seedlings growth of *Phaseolus vulgaris* L. *Cult.Trop.*, 36(3): 71-74.
- Milberg, P. & Lamont, B.B. (1997).** Seed/cotyledon size and nutrient content play a major role in early performance of species on nutrient-poor soils. *New Phytol.*, 137(4): 665-672, DOI: 10.1046/j.1469-8137.1997.00870.x
- Moghaddam, M., Babaei, K. & Saeedi Pooya, E. (2018).** Germination and growth response of flax (*Linum usitatissimum*) to salinity stress by different salt types and concentrations. *J. Plant Nutr.*, 41(5): 563-573, DOI: 10.1080/01904167.2017.1392573
- Munier-Jolain, N.G., Munier-Jolain, N.M., Roche, R., Ney, B. & Duthion, C. (1998).** Seed growth rate in grain legumes I. Effect of photoassimilate availability on seed growth rate. *J.Exp.Bot.* 49(329): 1963-1969, DOI: 10.1093/jxb/49.329.1963
- Munns, R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, 25(2): 239-250, DOI: 10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x
- Munns, R. (2005).** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.*, 167: 645-663, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x
- Munns, R. (2011).** Plant adaptations to salt and water stress: differences and commonalities. *Adv.Bot.Res.*, 57: 1-32, DOI: 10.1016/B978-0-12-387692-8.00001-1
- Munns, R. & Termaat, A. (1986).** Whole-plant responses to salinity. *Aust.J. Plant Physiol.*, 13(1): 143-160, DOI: 10.1071/PP9860143
- Munns, R. & Tester, M. (2008).** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu.Rev.Plant Biol.*, 59: 651-681,

- DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Nuñez-Barríos, A.N., Ritchie, J. & Smucker, A.J. (1998).** El efecto de sequía en el crecimiento, la fotosíntesis y la intercepción de luz en frijol común (Effect of drought on photosynthesis, growth, and light interception in dry beans). *Agron. Mesoam.*, 9(2): 1-8, DOI 10.15517/am.v9i2.19463
- Panneerselvam, R., Muthukumarasamy, M. & Rajan, S.N. (1998).** Amelioration of NaCl stress by triadimefon in soybean seedlings. *Biol.Plant.*, 41(1): 133-137.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V.P. & Prasad, S.M. (2015).** Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Envir. Sci.Pollut.Res.*, 22(6): 4056-4075, DOI: 10.1007/s11356-014-3739-1.
- Rejili, M., Vadel, A.M., Guetet, A., Mahdhi, M., Lachiheb, B., Ferchichi, A. & Mars, M. (2010).** Influence of temperature and salinity on the germination of *Lotus creticus* (L.) from the arid land of Tunisia. *Afr.J.Ecol.*, 48(2): 329-337, DOI: 10.1111/j.1365-2028.2009.01111.x
- Ruffino, A.M.C., Rosa, M., Hilal, M., González, J.A. & Prado, F.E. (2010).** The role of cotyledon metabolism in the establishment of quinoa (*Chenopodium quinoa*) seedlings growing under salinity. *Plant Soil*, 326(1-2): 213-224, DOI: 10.1007/s11104-009-9999-8
- Sarker, A., Hossain, M.I. & Kashem, M.A. (2014).** Salinity (NaCl) tolerance of four vegetable crops during germination and early seedling growth. *Int.J. Latest Res.Sci.Technol.*, 3(1): 91-95.
- Schabes, F.I. & Sigstad, E.E. (2005).** Calorimetric studies of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seed germination under saline stress conditions. *Thermochim. Acta*, 428(1-2): 71-75, DOI: 10.1016/j.tca.2004.09.027
- Schenk, H.J. (2006).** Root competition: beyond resource depletion. *J. Ecol.*, 94(4): 725-739, DOI: 10.1111/j.1365-2745.2006.01124.x
- Shannon, M.C. & Grieve, C.M. (1998).** Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci.Hortic.*, 78(1-4): 5-38, DOI: 10.1016/S0304-4238(98)00189-7
- Sinclair, T.R. & Vadez, V. (2012).** The future of grain legumes in cropping systems. *Crop Past.Sci.*, 63(6): 501-512, DOI: 10.1071/CP12128
- Taffouo, V. D., Meguekam, L., Akoa, A. & Ourry, A. (2010).** Salt stress effects on germination, plant growth and accumulation of metabolites in five leguminous plants. *Nong Ye Ke Xue Yu Ji Shu*, 4(2): 27.
- Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L.A., Ennajah, A., Belkhdja, M. & Mulet, J.M. (2016).** Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defense systems in *Phaseolus vulgaris* L. *S.Afr.J.Bot.*, 105: 306-312, DOI: 10.1016/j.sajb.2016.03.011
- Tammam, A.A. (2003).** Response of *Vicia faba* plants to the interactive effect of sodium chloride salinity and salicylic acid treatment. *Acta Agron.Hung.*, 51(3): 239-248, DOI: 10.1556/AAgr.51.2003.3.1
- Tavakkoli, E., Rengasamy, P. & McDonald, G.K. (2010).** High concentrations of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. *J.Exp.Bot.*, 61(15): 4449-4459, DOI: 10.1093/jxb/erq251
- Tobe, K., Li, X. & Omasa, K. (2002).** Effects of sodium, magnesium and calcium salts on seed germination and radicle survival of a halophyte, *Kalidium caspicum* (Chenopodiaceae). *Aust.J.Bot.*, 50(2): 163-169, DOI: 10.1071/BT01065
- Tobe, K., Li, X. & Omasa, K. (2004).** Effects of five different salts on seed

## GERMINATION BEHAVIOR OF COMMON BEAN ACROSS A RANGE OF SALINITIES

- germination and seedling growth of *Haloxylon ammodendron* (Chenopodiaceae). *Seed Sci. Res.*, 14(4): 345-353, DOI: 10.1079/SSR2004188
- Wang, Y., Yang, J., Jiang, S., Tian, Y., Sun, H., Wang, M., Guangdi, L. & Zhou, D. (2012).** Comparison of inorganic solute accumulation in shoots, radicles and cotyledons of *Vicia cracca* during the seedling stage under NaCl stress. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 58(1): 24-31, DOI: 10.1080/00380768.2011.647606
- Yamaguchi, T. & Blumwald, E. (2005).** Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Sci.*, 10(12): 615-620, DOI: 10.1016/j.tplants.2005.10.002
- Zandalinas, S.I., Mittler, R., Balfagón, D., Arbona, V. & Gómez-Cadenas, A. (2018).** Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiol. Plant.*, 162(1): 2-12, DOI: 10.1111/ppl.12540
- Zhang, H., Irving, L.J., McGill, C., Matthew, C., Zhou, D. & Kemp, P. (2010).** The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator. *Ann. Bot.*, 106(6): 1027-1035, DOI: 10.1093/aob/mcq204.

*Lahouaria Mounia MANSOURI, Abdenour KHELOUFI*<sup>1</sup>

## **EFFECT OF DILUTED SEAWATER ON SEED GERMINATION AND SEEDLING GROWTH OF THREE LEGUMINOUS CROPS (PEA, CHICKPEA AND COMMON BEAN)**

### **SUMMARY**

Seawater intrusion into fresh water aquifers is due to natural processes or human activities, and consequently salinization results not only from the ground but also from irrigation water. In an attempt to evaluate the effect of seawater irrigation on seedling growth and germination, seeds of three leguminous crops (*Pisum sativum*, *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*) were irrigated with Mediterranean seawater of different concentrations (0, 10, 30, 50 and 100%) for 8-day period. Various parameters such as germination kinetics, mean germination time, germination rate index, shoot and root length, fresh and dry weight and moisture content were analysed.

The results showed that these species were able to germinate at different salinity levels, except for 100% seawater which resulted in total inhibition of germination. Compared with control, seed germination in all species remained unaffected up to 30% of seawater treatments. Indeed, the final germination percentage was maintained between 90 and 100%. A solution of 50% seawater significantly reduced germination rate index and increased mean germination time. 10% of seawater increased shoot and root length in all species compared to the control. The saline conditions reduced the growth parameter such as fresh and dry shoot and root weights of the three-studied species. Shoot and root dry weight was stable by 10, 30 and 50% of seawater except for *P. vulgaris* seedlings. The decrease in moisture content begins from 30% of seawater solution compared to the control in *P. sativum* and *C. arietinum* seedlings. However, it was maintained stable for *P. vulgaris* compared to the control.

**Keywords:** Salt-tolerance, agriculture, moisture content, irrigation.

### **INTRODUCTION**

Salinity is one of the major abiotic factors that limits plant growth and productivity in many regions of the world due to increasing use of poor quality of water for irrigation and soil salinization (Chen and Jiang 2010; D'Odorico *et al.*, 2013; Shrivastava and Kumar, 2015). 20% of croplands in world contain high enough concentrations of salt to cause a salt stress for plants (Shelef *et al.*, 2012). Considerable reduction of the plant growth is generally due to salt stress, except

---

<sup>1</sup>Lahouaria Mounia Mansouri, Abdenour Kheloufi, (corresponding author: abdenour.kheloufi@yahoo.fr), Faculty of Natural and Life Sciences, Department of Ecology and Environment, University of Batna2, 05000 Batna, ALGERIA

Notes: The authors declare that they have no conflicts of interest. Authorship Form signed online.



that these reductions vary from a species to the other one. Salinity tolerance of some cultivated legumes varieties turns out thus crucial for the country's economy.

The legume crops have a very important part of several research in agronomy (Williams *et al.*, 2014; Popovic *et al.*, 2015; Popovic *et al.*, 2016), genetic (Smýkal *et al.*, 2015), entomology (Söğüt *et al.*, 2014; Duan *et al.*, 2014), phytopathology (Khan *et al.*, 2014) and physiology (Neugschwandtner *et al.*, 2015). Leguminous plants also maintain a very privileged relationship with the rhizosphere. Their agronomic interest results first of all from their ability to establish a mutualistic symbiosis with bacteria belonging to *Rhizobia* family for the utilization of atmospheric nitrogen as a nitrogen source (Giri and Joshi, 2010; Iantcheva *et al.*, 2013). It is estimated that approximately 40-60 million metric tons of atmospheric nitrogen is fixed by cultivated legume plants annually (Robertson *et al.*, 2013). Indeed, this symbiosis allows them to produce in abundance proteins even in the absence of nitrogenous fertilization (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). They play consequently a key role in the crop rotation (Nemecek *et al.*, 2015).

The salinization results not only from the ground but also from irrigation water. Indeed, in the arid and semi-arid lands, the agricultural production requires irrigation especially with the shortage of rain (Chen *et al.*, 2010). These water resources of irrigation come generally from groundwater and contain variable quantities of dissolved salts (Prasanth *et al.*, 2012). In the Mediterranean countries as Algeria, the legume crops are often cultivated near the coastal regions where we attend an increase of the salt stress. Therefore, a vast use of irrigation waters calls up to the intrusion of seawater. Seawater intrusion is the movement of seawater into fresh water aquifers due to natural processes or human activities. Indeed, seawater intrusion is caused by decreases in groundwater levels or by rises in seawater levels (Werner *et al.*, 2013). The use of poor quality water thus results in an increase of salinization level in the soil which can have negative effects on yield (Arslan, 2013). On the other hand, the available fresh water resources for agriculture declined regarding quantity and quality of both surface water and groundwater systems (Liu *et al.*, 2016). Therefore, the use of lower quality water for irrigation purposes is inevitable to maintain economically viable crops. According to the dilution levels tested on some plants, seawater has proved even an excellent natural fertilizer and can contain several minerals very useful for the plant growth (Glenn *et al.*, 1998; Tawfik *et al.*, 2011; Ventura *et al.*, 2015; Kheloufi *et al.*, 2016a).

The plant adaptation in salt environment is crucial at the seedling stage for best species establishment. The first stage of development is thus the most vulnerable in this salt constraint because the passage of this one will determine the evolution of the cultivated species. Indeed, the salinity can affect the seedling by creating osmotic potential which prevent the imbibition of water, or by exercising toxic effects on the viability of the embryo (Chaves *et al.*, 2009). The improvement of certain salt tolerant species is of a major importance. So, the

scientific research should concentrate on mechanisms implied in this salt tolerance. The aim of the present study was to investigate seed germination and seedling growth of three leguminous crops: "*Pisum sativum* (L.), *Cicer arietinum* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.)" to gradient salinity. For this purpose, seeds and seedlings were subjected to various levels of seawater solutions, and an analysis of the parameters related to germination, growth and moisture content was made.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental material and salt treatments

Factorial combinations of three species and five levels were salinity test treatments. Seeds of pea (*P. sativum* var. *Arvense*), chickpea (*C. arietinum* var. *Temouchent*) and bean (*P. vulgaris* var. *Djadida*) were kindly provided by the Technical Institute of Field Crops (ITGC), Sidi bel abbes (Algeria). Seawater was provided from coastal site of Oran (Algeria) (35°40'36.82"N; 1°1'30.54"O). Different seawater concentrations of 0, 10, 30, 50 and 100% were created using distilled water. Three replicates of 15 seeds each were used for each treatment. Germination experiments were carried out in plastic boxes (5 cm height, 15 cm length and 8 cm width) with two-layer wet filter paper (Whatman No. 1) moistened with 25 ml of the appropriate solution of seawater or distilled water for 0% (Control).

The germination rate was recorded every 2-day for 8 day-period. First of all, the seeds were surface sterilized with 5% of sodium hypochlorite for 5 minutes to avoid fungal invasion, followed by washing with distilled water. Seeds were incubated under continuous dark at 23°C ± 2°C (Celsius) in controlled temperature room. The papers were changed with the same treatment each 2 day to prevent salt accumulation. The seeds were moistened with the appropriate solutions of seawater and kept wet throughout the experiment. Seeds were considered as germinated when the radicle had protruded 2 mm through the seed coat (Côme, 1970).

### Germination parameters

In order to characterize salinity tolerance, several parameters were calculated:

*Germination kinetics*: for better apprehending the physiological significance of germination behaviour, the number of germinated seeds was counted every 2-days until the 8<sup>th</sup> day of the experiment.

*Final germination percentage* (FGP): this parameter constitutes the best identification means of salt concentration which presents the physiological limit of germination. It is expressed at the 8<sup>th</sup> day of the experiment by the following equation:

$$\text{FGP (\%)} = \frac{\text{Number of germinated seed}}{\text{Total Number of seed tested}} \times 100$$

*Germination rate index* (GRI): It reflects the percentage of germination on each day of the germination period (Maguire, 1962).

$$\text{GRI (\%)} = \frac{\sum \text{Number of Germinated Seeds}}{\text{Number of Days}}$$

*Mean germination time (MGT)*: It represents the meantime, a seed lot requires to initiate and end germination (Orchard, 1977).

$$\text{MGT (days)} = \frac{\sum n \times D}{\sum n}$$

n: number of seeds newly germinated at time D; D: days from the beginning of the germination test;  $\sum n$ : final germination.

### **Seedling growth parameters**

After 8-day period, shoot length was immediately measured by caliper. Roots and shoots were separated and blotted. Fresh weight (FW) was immediately determined and then samples were dried in an oven at 80°C for 48h to obtain dry weight. Moisture content (MC) was estimated using the following formula as described by Wu *et al.* (2013):

$$\text{MC (\% FW)} = \frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{FW}} \times 100$$

The average of a water content of the plant is a very used method at present, to estimate the hydric state of the plant in the condition of hydric stress.

### **Statistical analysis**

The experiment was made as a completely randomized design with 3 replicates of 15 seeds (n=3) for the germination parameters and with 15 replicates (n=15) for the seedlings growth parameters. The data were statistically treated by Fisher's analysis of variance (ANOVA). The Generalized Linear Model (GLM) was used in the kinetic of germination (Repeated Measures Analysis of Variance). Duncan's multiple range tests were performed to determine significant difference between means at a significance level of 5% using SAS software version 9.0 (SAS 2002).

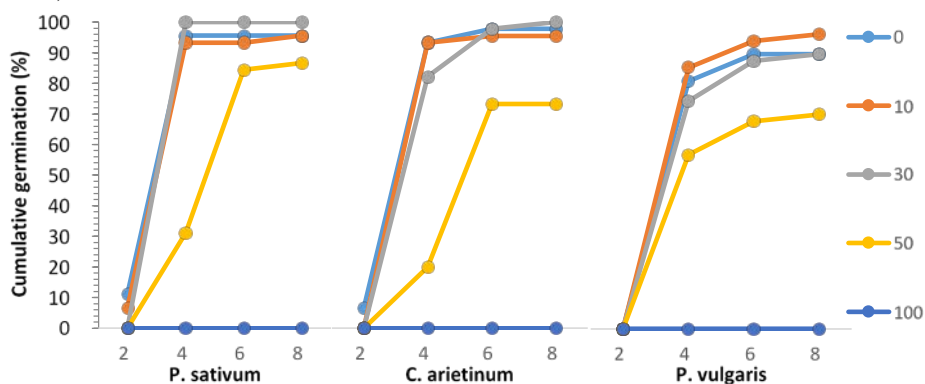
## **RESULTS AND DISCUSSION**

In this study, four concentrations (10, 30, 50 and 100 %) of seawater were used to irrigate three leguminous crops in order to evaluate the effect of seawater salinity in plant germination and growth.

### **Germination parameters**

The effect of salinity on germination kinetics is presented on Figure 1. First of all, using high concentration of seawater (100 %) resulted in total inhibition of germination. The effect of the external salinity on the seed germination may be partially osmotic or ion toxicity which can alter physiological processes such as enzyme activation (El-Keblawy, 2004; Chinnusamy *et al.*, 2005; Nichols *et al.*, 2009). This toxic effect can lead to metabolic processes changes in seedlings and at the extreme case in the death of embryo by ion accumulation (El-Keblawy, 2004). The osmotic or toxic effect can be verified by salinity recovery test (Kheloufi *et al.*, 2016b). A Two-way ANOVA indicated that germination kinetics of the three leguminous seeds was significantly affected by the factor species (F=3.73, p=0.0357), time (F=1839.52,

$P < 0.0001$ ), seawater concentration ( $F = 390.56$ ,  $P < 0.0001$ ) and by their correlation ( $F = 4.65$ ,  $P < 0.0001$ ). Compared with control, seed germination in the three-species remained unaffected up to 30 % of seawater treatments. Indeed, the final germination percentage was maintained between 90 and 100 %. A further increase in salinity (50 % of seawater) has inhibited a few rates of seed germination in all the studied species with (86.7 %) in the case of *P. sativum*, following by (73.3 %) and (71.1 %) for *C. arietinum* and *P. vulgaris*, respectively. The decrease of FGP follows the increase of external osmotic pressure, what allocates the water absorption by seeds and/or to an ion accumulation ( $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ) in the embryo (Debouba *et al.*, 2006; Ghogdi *et al.*, 2013).



**Figure 1.** Effects of various seawater concentrations (0 to 100%) on the germination kinetics of three leguminous crops (*P. sativum*, *C. arietinum* and *P. vulgaris*) seeds over an 8-day period.

Final germination percentage was higher in non-saline controls and higher in *P. sativum* and *C. arietinum* seeds than *P. vulgaris* seeds in all treatments. Under salinity treatment, the highest rate of germination (100%) was recorded in *P. sativum* and *C. arietinum* seeds at 30% of seawater and the highest rate of 97.78% was obtained at 10% of seawater in *P. vulgaris* seeds. In the three species, the germination was completely inhibited at 100% of seawater concentration. In non-saline control, highest germination was recorded at (3.77 days) in *P. sativum* following by MGT of (3.95 days) and (4.19 days) for *C. arietinum* and *P. vulgaris*, respectively (Table 1). The data presented on Figure 1 also showed marked differences in the timing of initiation and completion of germination. The MGT increased significantly ( $P < 0.0001$ ) by increasing the seawater concentration. Increase of salinity also delayed the germination at 50% of seawater where the highest rate was reached at the 6th day with reduced values in *C. arietinum* seeds and at the 8th day for the seeds of *P. sativum* and *P. vulgaris* (Figure 1). Delay in germination by increased salt concentration may be explained by the lower osmotic potential of the solution (Nonogaki *et al.*, 2010).

Compared with control, a solution of 50% seawater significantly reduced germination rate index (GRI) ( $p < 0.05$ ) and increased mean germination time

(MGT) (Tableau 1). It was shown that higher FGP, GRI, and lower MGT represent higher and faster seed germination (Panuccio *et al.*, 2014; Kheloufi, 2017).

The results also showed that the three-leguminous species were able to germinate at different salinity concentration. Our results indicated that high salinity remarkably inhibited seed germination and delayed germination time in all studied species. Similar results were recorded in other crops such as fava bean (*Vicia faba*) (Yang *et al.*, 2013), wheat (*Triticum aestivum*) (Hussain *et al.*, 2013), and lentil (*Lens culinaris*) (Al-Quraan *et al.*, 2014).

**Table 1.** Effects of different seawater (SW) concentrations on final germination percentage (FGP), mean germination time (MGT), germination rate index (GRI), shoot length (SL), shoot fresh weight (SFW), shoot dry weight (SDW), shoot moisture content (SMC), root length (RL), root fresh weight (RFW), root dry weight (RDW), root moisture content (RMC) in three leguminous species (SP) (*P. sativum*, *C. arietinum* and *P. vulgaris*) for 8 day-period.

SP	SW (%)	Germination			Seedling shoots growth				Seedling root growth			
		FGP (%)	MGT (day)	GRI (%)	SL (cm)	SFW (g)	SDW (g)	SMC (%)	RL (cm)	RFW (g)	RDW (g)	RMC (%)
<i>P. sativum</i>	0	95.6 <sup>a</sup>	3.77 <sup>b</sup>	57.3 <sup>a</sup>	4.75 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	0.14 <sup>c</sup>	50.8 <sup>a</sup>	5.12 <sup>b</sup>	0.41 <sup>a</sup>	0.15 <sup>c</sup>	62.7 <sup>a</sup>
	10	95.6 <sup>a</sup>	3.94 <sup>b</sup>	54.2 <sup>a</sup>	6.07 <sup>a</sup>	0.32 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	49.2 <sup>a</sup>	8.73 <sup>a</sup>	0.38 <sup>b</sup>	0.16 <sup>a</sup>	56.3 <sup>b</sup>
	30	100 <sup>a</sup>	4.00 <sup>b</sup>	54.2 <sup>a</sup>	3.84 <sup>c</sup>	0.23 <sup>c</sup>	0.16 <sup>a</sup>	29.5 <sup>b</sup>	3.66 <sup>c</sup>	0.24 <sup>c</sup>	0.15 <sup>b</sup>	37.8 <sup>c</sup>
	50	86.7 <sup>a</sup>	5.32 <sup>a</sup>	32.7 <sup>b</sup>	1.41 <sup>d</sup>	0.18 <sup>d</sup>	0.16 <sup>b</sup>	11.9 <sup>c</sup>	1.64 <sup>d</sup>	0.18 <sup>d</sup>	0.13 <sup>d</sup>	24.9 <sup>d</sup>
	100	0.00 <sup>b</sup>	-	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>d</sup>	-	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>
<i>C. arietinum</i>	0	97.8 <sup>a</sup>	3.95 <sup>b</sup>	55.2 <sup>a</sup>	5.30 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	73.2 <sup>a</sup>	8.17 <sup>a</sup>	0.41 <sup>a</sup>	0.10 <sup>b</sup>	73.9 <sup>a</sup>
	10	95.6 <sup>a</sup>	4.04 <sup>b</sup>	51.2 <sup>a</sup>	5.93 <sup>a</sup>	0.32 <sup>ab</sup>	0.10 <sup>a</sup>	66.6 <sup>b</sup>	6.81 <sup>b</sup>	0.43 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	73.7 <sup>a</sup>
	30	100 <sup>a</sup>	4.40 <sup>b</sup>	49.35 <sup>a</sup>	3.68 <sup>b</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.10 <sup>a</sup>	63.56 <sup>b</sup>	4.09 <sup>c</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	57.72 <sup>b</sup>
	50	73.3 <sup>b</sup>	5.45 <sup>a</sup>	26.4 <sup>b</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	-	0.58 <sup>d</sup>	0.14 <sup>c</sup>	0.09 <sup>c</sup>	33.0 <sup>c</sup>
	100	0.00 <sup>c</sup>	-	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	-	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	-
<i>P. vulgaris</i>	0	91.1 <sup>a</sup>	4.19 <sup>a</sup>	47.1 <sup>a</sup>	16.6 <sup>b</sup>	1.03 <sup>b</sup>	0.11 <sup>b</sup>	88.4 <sup>a</sup>	6.14 <sup>b</sup>	0.18 <sup>c</sup>	0.04 <sup>c</sup>	75.8 <sup>a</sup>
	10	97.8 <sup>a</sup>	4.28 <sup>a</sup>	49.8 <sup>a</sup>	20.4 <sup>a</sup>	1.66 <sup>a</sup>	0.17 <sup>a</sup>	89.8 <sup>a</sup>	8.29 <sup>a</sup>	0.28 <sup>b</sup>	0.09 <sup>a</sup>	77.2 <sup>a</sup>
	30	91.1 <sup>a</sup>	4.39 <sup>a</sup>	45.1 <sup>a</sup>	5.76 <sup>c</sup>	0.40 <sup>c</sup>	0.08 <sup>c</sup>	80.5 <sup>b</sup>	7.43 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	67.2 <sup>b</sup>
	50	71.1 <sup>b</sup>	4.44 <sup>a</sup>	34.8 <sup>b</sup>	0.51 <sup>d</sup>	0.08 <sup>d</sup>	0.03 <sup>d</sup>	66.8 <sup>c</sup>	1.60 <sup>c</sup>	0.08 <sup>d</sup>	0.03 <sup>d</sup>	70.1 <sup>b</sup>
	100	0.00 <sup>c</sup>	-	0.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>e</sup>	-	0.00 <sup>d</sup>	0.00 <sup>e</sup>	0.00 <sup>e</sup>	-

<sup>a,b,c,d,e</sup> Means followed by the same letters in the same column and within the same age are not significantly different ( $p < 0.05$ ). Values are the average of 3 replicates of 15 seeds for germination parameters and the average of 15 replicates for seedlings growth parameters.

Delayed germination in seed of all species compared to controls with the increase of seawater concentration is explained by the time required to the seed to set up mechanisms allowing to adjust their osmotic internal pressure (Farissi *et*

*al.*, 2011). The seed reserve mobilization depends on the activation of hydrolytic enzymes (Tan-Wilson and Wilson, 2012).

### Growth parameters

The Two-way ANOVA presented on Table 3 shows that species and treatment and their correlation (Treatment  $\times$  Species) significantly ( $P < 0.0001$ ) affect all seedling growth parameters. Table 1 showed that high lengths were recorded in seedlings treated with 10% of seawater. 10% of seawater increased shoot length in all species compared to the control. Indeed, shoots length of *P. vulgaris* increased from (16.6 cm) to (20.43 cm), those of *P. sativum* from (4.75 cm) to (6.07 cm) and finally shoots of *C. arietinum* increased from (5.30 cm) to (5.93 cm) (table 1). At the same diluted solution of seawater, the root lengths also increased but only in *P. sativum* and *P. vulgaris* seedlings with mean values of (8.73 cm) and (8.29 cm), respectively. The root length decreased significantly ( $P < 0.0001$ ) with the increase of salinity until reached its low development at 50% of seawater with mean values close to one cm in the three-leguminous species. Increase the concentration of seawater up to 30% made significant delay in development by decreasing lengths by half in *P. sativum* and *C. arietinum*, and by four-times in *P. vulgaris* seedlings. At 50% of seawater, no shoots appeared in *C. arietinum*. On the other hand, the seedlings of *P. sativum* and *P. vulgaris* recorded low lengths with (1.41 cm) and (0.51 cm), respectively.

**Table 2.** Analysis of variance testing the effect of time after sowing (Time), species (SP) (*P. sativum*, *C. arietinum* and *P. vulgaris*) and seawater treatments (TRT) on the variation of germination parameters (germination kinetics, final germination percentage 'FGP', mean germination time 'MGT', germination rate index 'GRI').

Parameters	Sources of variation	Df	F	P
Germination Kinetics	Species 'Sp'	2	3.73	0.0357
	Time after sowing 'Time'	3	1 839.52	<0.0001
	Seawater concentration 'TRT'	4	390.56	<0.0001
	Sp $\times$ Time	6	1.28	0.2745
	Sp $\times$ TRT	8	1.73	0.1320
	Time $\times$ TRT	12	142.22	<0.0001
	Sp $\times$ Time $\times$ TRT	24	4.65	<0.0001
FGP	TRT	4	316.28	<0.0001
	Sp	2	2.18	0.1306
	TRT $\times$ Sp	8	1.13	0.3723
MGT	TRT	4	46.64	<0.0001
	Sp	2	2.67	0.0899
	TRT $\times$ Sp	8	8.09	<0.0001
GRI	TRT	4	346.90	<0.0001
	Sp	2	5.69	0.0081
	TRT $\times$ Sp	8	2.75	0.0208



**Table 3.** Two-way ANOVA testing the effect of species (SP) (*P. sativum*, *C. arietinum* and *P. vulgaris*) and seawater treatment (TRT) on the variation of seedlings growth parameters (shoot length 'SL', shoot fresh weight 'SFW', shoot dry weight 'SDW', shoot moisture content 'SMC', root length 'RL', root fresh weight 'RFW', root dry weight 'RDW', root moisture content 'RMC').

Parameters		Sources of variation	Df	F	P
Shoot	SL	TRT	4	663.53	<0.0001
		Sp	2	491.59	<0.0001
		TRT × Sp	8	153.07	<0.0001
	SFW	TRT	4	359.81	<0.0001
		Sp	2	376.64	<0.0001
		TRT × Sp	8	134.96	<0.0001
	SDW	TRT	4	922.34	<0.0001
		Sp	2	604.30	<0.0001
		TRT × Sp	8	120.39	<0.0001
SMC	TRT	4	2 583.22	<0.0001	
	Sp	2	1 603.99	<0.0001	
	TRT × Sp	8	219.82	<0.0001	
Root	RL	TRT	4	344.01	<0.0001
		Sp	2	11.06	<0.0001
		TRT × Sp	8	17.20	<0.0001
	RFW	TRT	4	469.08	<0.0001
		Sp	2	48.96	<0.0001
		TRT × Sp	8	35.37	<0.0001
	RDW	TRT	4	6 416.88	<0.0001
		Sp	2	6 433.16	<0.0001
		TRT × Sp	8	514.27	<0.0001
RMC	TRT	4	230.30	<0.0001	
	Sp	2	372.09	<0.0001	
	TRT × Sp	8	60.48	<0.0001	

The saline conditions reduced the growth parameter such as fresh and dry shoot and root weights of the three-studied species as have been similarly reported by several authors (Long *et al.*, 2010; Ventura *et al.*, 2011; Vibhuti *et al.*, 2015; Petrović *et al.*, 2016). The reduction of the dry weights due to increased salinity may be a result of a combination of osmotic and specific ion effects (Khan *et al.*, 2015). One of the initial effects of salinity on plants is the reduction of growth rate (Munns *et al.*, 1995). These results are in agreement with the findings of Hirich *et al.* (2014) who reported a significant decline in shoot length at high salinity levels.

Data presented in Table 1 shows that shoot and root fresh weight was decreased with different seawater concentrations except for 10% seawater solution. In the three species, there was gradually decreased of fresh weight as compared to the control plants. Using high concentration of seawater (50%)

resulted in the highest value of decline in root than shoot. Moreover, data in Table 1 showed that shoot and root dry weight was constant by 10, 30 and 50% of diluted seawater except for *P. vulgaris* seedlings. Reduction in FW at high salinity might be due to poor absorption of water from the growth medium due to physiological drought (Munns and Gillham, 2015).

Table 1 also shows the effect of salt concentration on moisture content. The decrease in moisture content begins from 30% of seawater solution compared to the control in *P. sativum* and *C. arietinum* seedlings. However, seedlings water content of *P. vulgaris* was maintained stable compared to the control. Another related trait important to plant function is the ability to maintain water content in tissues at optimal levels in the face of environmental stress. Plants under stress often lose some water from their tissues, which can have rapid and large effects on cell expansion, cell division, stomatal opening, abscisic acid accumulation, etc. (Hsiao and Xu, 2000). Most of these effects become evident with no change in turgor pressure, although water potential can become more negative due to osmotic potential becoming more negative (Negrão *et al.*, 2016).

During germination stage, the radicle emergence would be controlled by the environment osmolarity, while the later growth of the seedling would be limited by the reserve mobilization and their transport towards the embryonic axis (Hager *et al.*, 2014). The study of the effects of various concentrations of seawater on the seed germination showed that neither the FGP, nor the MGT and GRI are affected by the salt to a concentration 30% of seawater. But, in higher concentrations, they become sensitive. Reduction in seedlings growth was also recorded in response to increasing salt stress. In glycophytes species, salinity can reduce the growth of plants or damage the plants through osmotic effect (it causes water deficit); toxic effects of ions; and imbalance of the uptake of essential nutrients (Roy *et al.*, 2014; Parihar *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONS

The use of seawater in agriculture can offers an alternative substitute to fresh water but with respected dilution to each plant species. Our study showed that irrigation with seawater did not affect germination and seedlings growth of *P. sativum*, *C. arietinum* and *P. vulgaris* at 10 and 30% concentrations. So, at these levels, coastal underground water cannot be so harmful for these species establishment. However, further experiments are needed to evaluate the effect of saline water irrigation on yield and crop production.

## REFERENCES

- Al-Quraan NA, Al-Sharbati M, Dababneh Y and Al-Olabi M. 2014. Effect of temperature, salt and osmotic stresses on seed germination and chlorophyll contents in lentil (*Lens culinaris* Medik). *Acta horticultrae*, 1054:47-54.
- Arslan H. 2013. Application of multivariate statistical techniques in the assessment of groundwater quality in seawater intrusion area in Bafra Plain, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(3):2439-2452.
- Chaves MM, Flexas J and Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4):551-560.

- Chen H and Jiang JG. 2010. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Reviews*, 18:309-319.
- Chen W, Hou Z, Wu L, Liang Y and Wei C. 2010. Evaluating salinity distribution in soil irrigated with saline water in arid regions of northwest China. *Agricultural water management*, 97(12):2001-2008.
- Chinnusamy V, Jagendorf A and Zhu JK. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45(2):437-448.
- Côme D. 1970. Obstacles to germination. *Monographies of Plant physiology*, 6.
- D'Odorico P, Bhattachan A, Davis KF, Ravi S and Runyan CW. 2013. Global desertification: drivers and feedbacks. *Advances in Water Resources*, 51:326-344.
- Debouba M, Gouia H, Suzuki A and Ghorbel MH. 2006. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings. *Journal of plant physiology*, 163(12):1247-1258.
- Duan CX, Zhu ZD, Ren GX, Wang XM and Li DD. 2014. Resistance of faba bean and pea germplasm to *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) and its relationship with quality components. *Journal of economic entomology*, 107(5):1992-1999.
- Glenn EP, Brown JJ and O'Leary JW. 1998. Irrigating Crops with Seawater. *Scientific American*, pp 76-81
- El-Keblawy A. 2004. Salinity effects on seed germination of the common desert range grass, *Panicum turgidum*. *Seed Science and Technology*, 32(3):873-878.
- Farissi M, Bouizgaren A, Faghire M, Bargaz A and Ghoulam C. 2011. Agro-physiological responses of Moroccan alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations to salt stress during germination and early seedling stages. *Seed Science and Technology*, 39(2):389-401.
- Ghogdi E, Borzouei A, Jamali S and Pour N. 2013. Changes in root traits and some physiological characteristics of four wheat genotypes under salt stress. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5(8):838.
- Giri N and Joshi NC. 2010. Growth and yield response of chick pea (*Cicer arietinum*) to seed inoculation with *Rhizobium* sp. *Nature and science*, 8(9):232-236.
- Hager AS, Mäkinen OE and Arendt EK. 2014. Amylolytic activities and starch reserve mobilization during the germination of quinoa. *European Food Research and Technology*, 239(4):621-627.
- Hirich A, Jelloul A, Choukr-Allah R and Jacobsen SE. 2014. Saline water irrigation of quinoa and chickpea: seedling rate, stomatal conductance and yield responses. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 200(5):378-389.
- Hsiao TC and Xu LK. 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany*, 51(350):1595-1616.
- Hussain S, Khaliq A, Matloob A, Wahid MA and Afzal I. 2013. Germination and growth response of three wheat cultivars to NaCl salinity. *Soil and Environment*, 32(1):36-43.
- Iantcheva A, Mysore KS and Ratet P. 2013. Transformation of leguminous plants to study symbiotic interactions. *International Journal of Developmental Biology*, 57(6-7-8):577-586.
- Khan MR, Ashraf S, Rasool F, Salati KM, Mohiddin FA and Haque Z. 2014. Field performance of *Trichoderma* species against wilt disease complex of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(4):447-454.
- Khan MSA, Karim MA and Haque MM. 2015. Genotypic differences in growth and ions accumulation in soybean under NaCl salinity and water stress conditions. *Bangladesh Agronomy Journal*, 17(1):47-58.
- Kheloufi A. 2017. Germination of seeds from two leguminous trees (*Acacia karroo* and *Gleditsia triacanthos*) following different pre-treatments. *Seed Science and Technology*, 45(1):1-4.

- Kheloufi A, Chorfi A and Mansouri LM. 2016a. The Mediterranean seawater: the impact on the germination and the seedlings emergence in three *Acacia* species. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 8(6):238-249.
- Kheloufi A, Chorfi A and Mansouri LM. 2016b. Comparative effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on seed germination of *Acacia saligna* L. and *Acacia decurrens* Willd. *International Journal of Biosciences*, 8:1-13.
- Liu J, Liu Q and Yang H. 2016. Assessing water scarcity by simultaneously considering environmental flow requirements, water quantity, and water quality. *Ecological Indicators*, 60:434-441.
- Long X, Huang Z, Zhang Z, Li Q, Zed R and Liu Z. 2010. Seawater stress differentially affects germination, growth, photosynthesis, and ion concentration in genotypes of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of plant growth regulation*, 29(2):223-231.
- Maguire JD. 1962. Speed of germination-aid in selection aid in evolution for seedling emergence and vigor. *Crop Sci*, 2:176-177.
- Munns R and Gilliam M. 2015. Salinity tolerance of crops-what is the cost?. *New Phytologist*, 208(3):668-673.
- Munns R, Schachtman DP and Condon AG. 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 22(4):561-569.
- Negrão S, Schmöckel SM and Tester M. 2016. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119(1):1-11.
- Nemecek T, Hayer F, Bonnin E, Carrouée B, Schneider A and Vivier C. 2015. Designing eco-efficient crop rotations using life cycle assessment of crop combinations. *European Journal of Agronomy*, 65:40-51.
- Neuschwandtner R, Ziegler K, Kriegner S, Wagentristl H and Kaul HP. 2015. Nitrogen yield and nitrogen fixation of winter faba beans. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B- Soil & Plant Science*, 65(7):658-666.
- Nichols PGH, Malik AI, Stockdale M and Colmer TD. 2009. Salt tolerance and avoidance mechanisms at germination of annual pasture legumes: importance for adaptation to saline environments. *Plant and Soil*, 315(1-2):241.
- Nonogaki H, Bassel GW and Bewley JD. 2010. Germination-still a mystery. *Plant Science*, 179(6):574-581.
- Orchard T. 1977. Estimating the parameters of plant seedling emergence. *Seed Science and Technology*, 5:61-69.
- Panuccio MR, Jacobsen SE, Akhtar SS and Muscolo A. 2014. Effect of saline water on seed germination and early seedling growth of the halophyte quinoa. *AoB Plants*, 6: 1-18.
- Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, and Prasad SM. 2015. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6):4056-4075.
- Pérez-Montaño F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, Del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena, FJ, Ollero and Cubo T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5):325-336.
- Petrović G, Jovičić D, Nikolić Z, Tamindžić G, Ignjatov M, Milošević D and Milošević B. 2016. Comparative study of drought and salt stress effects on germination and seedling growth of pea. *Genetika*, 48(1):373-381.
- Popović V, Miladinović J, Vidić M, Ikanović J, Đekić V, Filipović V, Kolarić LJ, Jokanović BM and Čobanović L. 2015. Productive characteristics of soybean in agroecological conditions of *Sremska Mitrovica*, Serbia. *Agriculture and Forestry*, 61(1):67-75.
- Popović V, Vidić M, Ikanović J, Filipović V, Đekić V, Tabaković M, Veselić J. 2016. Soybean oil yield as affected by the growing locality in agro-climatic divergent years. *Agriculture and Forestry*, 62(1):217-225.

- Prasanth SS, Magesh NS, Jitheshlal KV, Chandrasekar N and Gangadhar K. 2012. Evaluation of groundwater quality and its suitability for drinking and agricultural use in the coastal stretch of Alappuzha District, Kerala, India. *Applied Water Science*, 2(3):165-175.
- Robertson GP, Bruulsema TW, Gehl RJ, Kanter D, Mauzerall DL, Rotz CA and Williams CO. 2013. Nitrogen–climate interactions in US agriculture. *Biogeochemistry*, 114(1-3):41-70.
- Roy SJ, Negrão S and Tester M. 2014. Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26:115-124.
- Shelef O, Gross A and Rachmilevitch S. 2012. The use of *Bassia indica* for salt phytoremediation in constructed wetlands. *Water Research*, 46(13):3967-3976.
- Shrivastava P and Kumar R. 2015. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, 22(2):123-131.
- Smykal P, Coyne CJ, Ambrose MJ, Maxted N, Schaefer H, Blair MW, Berger J, Greene SL, Nelson MN, Besharat N, Vymyslický T, Toker C, Saxena RK, Roorkiwal M, Pandey MK, Hu J, Li YH, Wang LX, Guo Y, Qiu LJ, Redden RJ and Varshney RK. 2015. Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3):43-104.
- Söğüt MA, Göze FG, Önal T, Devran Z and Tonguc M. 2014. Screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars against root-lesion nematode species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(4):455-461.
- Tan-Wilson AL and Wilson KA. 2012. Mobilization of seed protein reserves. *Physiologia Plantarum*, 145(1):140-153.
- Tawfik MM, El Lateef EA, Amany AB and Hozayen M. 2011. Prospect of biofertilizer inoculation for increasing saline irrigation efficiency. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 7(2):182-189.
- Ventura Y, Eshel A, Pasternak D and Sagi M. 2015. The development of halophyte-based agriculture: past and present. *Annals of botany*, 115(3):529-540.
- Ventura Y, Wuddineh WA, Myrzabayeva M, Alikulov Z, Khozin-Goldberg I, Shpigel M, Samocha TM and Sagi M. 2011. Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia* halophytes as leafy vegetable crops. *Scientia Horticulturae*, 128(3):189-196.
- Vibhuti CS, Bargali K and Bargali SS. 2015. Seed germination and seedling growth parameters of rice (*Oryza sativa* L.) varieties as affected by salt and water stress. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 85(1):102-108.
- Werner AD, Bakker M, Post VE, Vandenbohede A, Lu C, Ataie-Ashtiani B, Simmons CT and Barry DA. 2013. Seawater intrusion processes, investigation and management: recent advances and future challenges. *Advances in Water Resources*, 51:3-26.
- Williams CM, King JR, Ross SM, Olson MA, Hoy CF and Lopetinsky KJ. 2014. Effects of three pulse crops on subsequent barley, canola, and wheat. *Agronomy Journal*, 106(2), 343-350.
- Wu GQ, Liang N, Feng RJ, Zhang JJ. 2013. Evaluation of salinity tolerance in seedlings of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars using proline, soluble sugars and cation accumulation criteria. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35:2665-2674.
- Yang R, Guo Q, and Gu Z. 2013. GABA shunt and polyamine degradation pathway on  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation in germinating fava bean (*Vicia faba* L.) under hypoxia. *Food Chemistry*, 136(1):152-159.