

AMADOU HAMADOUN BABANA

**MISE AU POINT D'UN INOCULANT BIOLOGIQUE POUR
LE BLÉ IRRIGUÉ DU MALI**

Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Sols et génie agroalimentaire
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

SEPTEMBRE 2003

© Amadou Hamadoun Babana, 2003

Résumé court

A cause du prix élevé des engrais importés au Mali, le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) constitue une source de phosphore, locale, peu coûteuse pour les paysans. Dans plusieurs zones, malgré ses bonnes caractéristiques physiques et chimiques, les plantes cultivées, particulièrement le blé, ont faiblement répondu à l'application du PNT. À cause du besoin croissant d'améliorer biologiquement l'absorption du P par le blé, nous présentons dans ce travail les résultats de l'utilisation de microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) dans un essai d'inoculation au champ. Dans la rhizosphère (Zone d'interactions intenses entre les racines et les microorganismes) et le rhizoplan (les microorganismes du rhizoplan ont ceux qui sont directement liés à la surface externe des racines) de trois cultivars de blé du Mali, 7 à 12% des microorganismes étaient capables de solubiliser le PNT. Six bactéries et deux champignons ont été sélectionnés, pour leur fort pouvoir de solubilisation du PNT en milieu liquide et sur milieu solide, et testés au champ à Koygour (Diré) en 2000-2001. Deux champignons *Aspergillus amovari* (C1), *Penicillium chrysogenum* (C13) et une bactérie *Pseudomonas* sp. (BR2) ont significativement amélioré la taille du blé (cv. Tétrà) après 6 semaines, ainsi que, le poids et le contenu en P de la matière sèche (paille et graines) après 90 jours de croissance. Des essais au champ ont été réalisés à Koygour (Diré) en 2001-2002. Les traitements d'inoculation incluent C1, C13, BR2, C1+BR2, C13+BR2 et un contrôle en présence et à l'absence de *Glomus intraradices* (Gi). Les traitements de phosphore incluent le PNT, le phosphate biammoniacal (DAP) et un contrôle non fertilisé. La colonisation des racines de blé par les mycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA) a été significativement améliorée avec *Glomus intraradices* quand la source de P utilisée est le PNT. La présence de BR2 améliore encore plus la colonisation des racines par les MVA. En général, les quantités de graines et paille récoltées ont été significativement améliorées après inoculation avec les microorganismes solubilisant le PNT et *Glomus intraradices*. La plus forte concentration de P dans les graines a été obtenue avec la co-inoculation avec C1+BR2 et Gi en présence de PNT, tandis que, les plantes inoculées avec BR2+Gi présentaient les plus fortes quantités de P dans la paille en présence du DAP.

Amadou H. BABANA

Hani Antoun, Ph.D.

M.P. Cescas, agr. et professeur
Département de SGA,
Université Laval

Étudiant gradué

Directeur de thèse

Co-Directeur de thèse

Résumé long

Au Mali, mis à part les rizières, la plupart des sols agricoles sont pauvres en phosphore et les paysans trop pauvres pour supporter les coûts de fertilisation. Aussi, pour résoudre ce problème, le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) a été utilisé, pendant un certain temps, comme engrais phosphaté. La faible solubilité du PNT dans certains sols a entraîné une baisse d'utilisation, malgré son faible coût.

La biotechnologie a pour but essentiel la mise au point d'inoculant composé de microorganismes sélectionnés afin de minimiser l'application de fertilisants chimiques et maximiser la croissance et la nutrition des plantes. La sélection des microorganismes composant l'inoculant biologique permet d'améliorer l'effet positif produit par chaque groupe de microorganismes améliorant ainsi la croissance des plantes dans les sols infertiles. Certaines bactéries rhizosphériques sont connues pour leur capacité à produire des substances favorisant la croissance des plantes plus particulièrement lorsqu'elles sont associées aux champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules. Le nombre et la répartition des microorganismes, varient d'un sol à l'autre et d'une rhizosphère à l'autre. Cependant, cette grande variabilité génétique entre les différentes espèces microbiennes explique la grande capacité des microorganismes à s'adapter à différents environnements d'où la nécessité de développer des combinaisons spécifiques hôte-espèces microbiennes avec une plus grande efficacité dans différentes conditions expérimentales.

Malgré l'importance de ces microorganismes dans la solubilisation des phosphates inorganiques, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée, au Mali, en vue d'évaluer l'incidence des populations de microorganismes rhizosphériques capables de dissoudre les phosphates inorganiques sur la mise en disponibilité du phosphore du PNT. Il est cependant envisageable que plusieurs microorganismes de la rhizosphère du blé soient capables d'améliorer la croissance du blé en solubilisant le PNT.

Aussi afin de combler cette lacune, nous nous sommes fixé comme objectif, la mise au point d'un inoculant biologique pour le blé irrigué du Mali.

Au cours de ce travail, nous avons isolé de la rhizosphère de trois cultivars de blé et de 4 types de sols du Mali, des microorganismes impliqués dans la solubilisation du phosphate

naturel de Tilemsi. Le nombre de microorganismes capables de mettre en solution le phosphore du phosphate naturel de Tilemsi (MSP), varie de $2,64$ à $6,89 \times 10^5$ Unité formant des colonies (ufc)/g de sol sec et, de $2,38$ à $3,5 \times 10^6$ ufc/g de sol rhizosphérique des différents cultivars de blé étudiés. Le pourcentage d'incidence des microorganismes solubilisant le phosphore était considérablement élevé dans le rhizoplan et la rhizosphère du blé, comparativement au sol non rhizosphérique, constituant ainsi une forte évidence que les cultivars de blé utilisés dans cet essai stimulent la croissance des MSP. Malgré que les champignons ne représentent qu'une faible proportion des MSP, de fortes corrélations positives ont été trouvées entre le nombre total de champignons, le nombre de champignons solubilisant le PNT et la quantité de P disponible dans les sols, suggérant que la solubilisation du PNT dans les sols est en grande partie l'œuvre des champignons. 58 bactéries et champignons solubilisant le PNT ont été isolés. Parmi ces isolats, nous avons retenu 6 bactéries et 2 champignons ayant un pouvoir de solubilisation élevé, tel qu'indiqué par la formation d'importants halos sur le milieu solide ne contenant que le PNT comme source de phosphore.

Nous avons, par la suite, procédé à la caractérisation des 8 microorganismes retenus en déterminant leur capacité à solubiliser le PNT sur milieux solides et liquides de pH variant entre 4 et 8 et contenant des concentrations de 3 à 8 g de PNT/l incubé à des températures variant entre 30 et 45°C. En plus, la capacité des isolats à produire des sidérophores, de l'acide indole acétique et de l'acide cyanhydrique a été évaluée. Deux des bactéries retenues, BR2 et B3 qui ne forment pas de halo autour de leurs colonies, solubilisent efficacement le PNT en milieu liquide. En présence d'une quantité de PNT supérieure à 2g/l, plus le pH initial du milieu de culture est faible, moins les bactéries sont efficaces à cause de la libération, à pH acide, d'éléments constitutifs du PNT qui inhibent la croissance bactérienne. Les champignons se sont montrés plus efficaces que les bactéries dans la solubilisation du phosphate naturel. Ils conservent cette capacité même après plusieurs repiquages successifs. Enfin, malgré qu'aucune bactérie n'ait pu produire de l'acide cyanhydrique, les Bactéries BR2, BR10 et B3 ont produit des sidérophores au cours de leur croissance sur milieu solide. L'identification des isolats retenus par les techniques de la biologie moléculaire (Analyse du 16S) a donné les résultats suivants : La bactérie BR2 correspond à *Pseudomonas* sp. ; B3 correspond à *curtobacterium* sp. ; B22 correspond à *Agrobacterium* sp ; B27 correspond à *Vibriospilendidus* sp. ; BR10 correspond à *Agrobacterium* sp. ; C1 est *Aspergillus amowari nakasawa* et C13 *Penicillium chrysogenum thom.*

Pour qu'une bactérie soit efficace, elle doit pouvoir coloniser efficacement la rhizosphère et favoriser la croissance des autres organismes utiles au bon développement des plantes. Aussi, nous avons effectué un test pour vérifier la capacité de la bactérie *Pseudomonas* sp. à coloniser la rhizosphère du blé. Les résultats obtenus ont montré que le taux d'inoculation des graines par la bactérie *Pseudomonas* sp. (BR2rif+) affecte significativement la colonisation de la rhizosphère du blé par la bactérie introduite. Dans cet essai, nous avons constaté qu'à partir d'une concentration bactérienne de $1,3 \times 10^5$ sur les graines de blé, plus le taux d'inoculation augmente, plus la densité bactérienne par gramme de sol rhizosphérique baisse. En absence de fertilisation phosphatée, l'inoculation avec BR2 seul, Gi seul ou les deux combinés n'a pas amélioré la population microbienne totale (bactéries + champignons). En plus, la présence de Gi a significativement baissé la population microbienne totale. Cependant, malgré la baisse de la population microbienne observée, l'inoculation avec Gi seul ou combiné à BR2, a significativement augmenté la population des microorganismes (Bactéries et champignons) solubilisant le phosphore. L'effet négatif de Gi sur la population bactérienne totale a été corrigé par l'application du phosphate naturel de Tilemsi, qui a entraîné une augmentation significative des microorganismes (bactéries et champignons) totaux et solubilisant le phosphore. Le traitement combinant BR2rif+ et Gi a donné la plus forte augmentation de la population microbienne totale et solubilisant le phosphore.

Dans le but de déterminer, au champ, La capacité des isolats à améliorer la germination, la croissance, la colonisation des racines par les mycorhizes indigènes du sol et la production de la variété de blé Tétr, nous avons établi à Koygour (Village du cercle de Diré au Mali), un dispositif expérimental en split plot en 2000-2001. Les résultats de cet essai ont montré que la bactérie BR2 et les champignons C1 et C13 améliorent significativement la colonisation des racines, la croissance et la production du blé. Ces 3 organismes ont été utilisés dans un second essai, au champ, en 2001-2002 toujours à Koygour (Diré), mais pas sur le même champ. Un dispositif en split split plot a été utilisé au cours de ce second essai. Nous avons constaté que, dans les parcelles non fertilisées et non inoculées, la colonisation des racines du blé par les champignons mycorhiziens, après 45 jours de croissance, était très faible. L'inoculation avec *Glomus intraradices* (Gi), en absence de tout traitement, n'a pas amélioré le taux de colonisation des racines du blé par les mycorhizes. La fertilisation avec le phosphate naturel de Tilemsi a augmenté le taux de colonisation des racines par les mycorhizes dans le traitement contrôle non inoculé, mais une augmentation plus substantielle a été observée chez les plantes inoculées avec Gi. Pour tous les traitements de fertilisation et d'inoculation avec les microorganismes solubilisant le phosphore, l'inoculation avec *Glomus intraradices*, a significativement augmenté la colonisation des racines du blé.

En général, en présence du phosphate biammoniacal (DAP), le pourcentage de racines colonisées aussi bien par les champignons mycorhiziens indigènes que ceux introduits était toujours inférieur à celui observé dans les parcelles fertilisées avec le PNT ou non fertilisées. Quelque soit la source de phosphore appliquée, l'inoculation avec la bactérie solubilisant le phosphore *Pseudomonas* sp. BR2 augmente significativement la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens indigènes ou introduites. Le plus fort pourcentage de colonisation a été obtenu avec le blé fertilisé avec le PNT et inoculé avec *Glomus intraradices* et la bactérie *Pseudomonas* sp. (BR2). La fertilisation phosphatée et l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) et *G. intraradices*, ont significativement influencé la taille du blé. Pour tous les traitements combinés, la taille des plantes de blé a significativement augmenté après inoculation avec Gi et fertilisation avec le PNT ou le DAP. Dans les parcelles non fertilisées, les plantes de blé les plus hautes ont été obtenues lorsque le blé est inoculé avec Gi et la bactérie *Pseudomonas* sp. (BR2) ou *Penicillium chrysogenum* (C13). La fertilisation et l'inoculation des graines affectent significativement la production du blé irrigué. Ainsi, en absence de tout traitement de fertilisation, nous avons constaté que, l'inoculation du blé avec le champignon mycorhizien *Glomus intraradices* a produit la plus basse quantité de graines de blé et concentration en P. cet effet non bénéfique est corrigé par l'application du phosphate naturel de Tilemsi (PNT) ou du phosphate biammoniacal (DAP) ou par l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) testés. En absence de traitement de fertilisation, l'inoculation avec la combinaison BR2 + C1 avec ou sans *G. intraradices*, a donné les meilleurs résultats quant à la production de graines et à la concentration en P. Cette combinaison de MSP est aussi la meilleure pour la production de graines dans les parcelles fertilisées avec le PNT. En plus de son potentiel de bactérie favorisant l'installation des mycorhizes, la bactérie *Pseudomonas* sp. (BR2), comme d'autres MSP utilisés dans cet essai, est probablement une rhizobactérie favorisant la croissance des plantes (RFCP). En tenant compte de tous les traitements de fertilisation et d'inoculation avec *G. intraradices*, l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le P (MSP) a significativement augmenté le contenu du blé en éléments minéraux, comparativement aux non inoculés. Cependant, en présence de PNT, l'inoculation avec les MSP et *G. intraradices* a occasionné une hausse du contenu en minéraux du blé avec une plus forte absorption de l'Al et du P. En plus, en présence de PNT, une forte corrélation positive entre la quantité d'Al absorbée et le contenu en P du blé a été observée.

Abstract

Because of the high price of imported P-fertilizers in Mali, the Tilemsi rock phosphate (TRP) is a cheaper locally available P source alternative for farmers. In many areas regardless of its good physical and chemical characteristics, crops and particularly wheat showed very slow response to TRP. With the broad aim of biologically improving P uptake by wheat, in this work we describe the use of TRP solubilizing microorganisms in field inoculation trials. In 3 different Malian wheat cultivars, 4 to 12% of the rhizosphere microorganisms were able to dissolve TRP. Six bacterial and two fungal isolates were selected for their high P-solubilizing activity in solid and liquid media, and were tested in a field in Koygour (Diré) in 2000-2001. Two fungal isolates *Aspergillus niger* (C1) and *Penicillium chrysogenum* (C13) and *Pseudomonas* sp. (BR2) significantly increased plant heights after 60 days, and the fresh and dry matter yields and P-uptake after 90 days of growth. Field assays were performed in Koygour (Diré) in 2001-2002. Inoculation treatments included C1, C13, BR2, C1+BR2, C13BR2, and a control in the presence or absence of the AM fungus *Glomus intraradices*. P treatments included Tilemsi rock phosphate (TRP), phosphate biammoniacal (DAP) and an unfertilized control. The colonization of wheat root with AM was significantly higher following inoculation with *G. intraradices*, and when TRP was the P source used. The presence of *Pseudomonas* strain (BR2) improved root colonization by the AM fungus. In general, straw and grain yield improved significantly following inoculation with AM and phosphate solubilizing microorganisms. The highest P concentration in wheat grain and straw was recorded in treatment including a combinaison of AM, BR2 and C1 in the presence of TRP.

Avant-Propos

Je ne remercierai jamais assez Madame Diallo Badji Sabane Touré et Madame Diallo Aminata Kontao pour l'amour, le soutien moral et matériel qu'elles m'ont apporté. Je remercie Madame Kaddiatou Kontao pour tout. Je remercie et encourage, également, Mlle Marie-Jovette Dumais et Mr. Druno Dumais pour m'avoir accueilli et surtout pour m'avoir considéré comme père sans jamais me manquer du respect. Enfin, je remercie mes enfants Kangaye Amadou Diallo, Gnilly Amadou Diallo, Ousmane Amadou Diallo et Boubakr Amadou Diallo.

Mes remerciements vont également à l'endroit du Programme Canadien de Bourses de la Francophonie et de l'Université Laval pour l'octroi de la bourse et l'accueil.

J'aimerais remercier le gouvernement de la République du Mali pour m'avoir accordé l'autorisation de m'absenter durant une longue période pour bénéficier de cette formation.

Je remercie du fond du cœur ma grande sœur Fatoumata Hamadoun Diallo et mon grand-frère Ibrahim Hamadoun Diallo pour leur soutien moral et leur encouragement sans faille tout au long de cette formation.

J'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à mon directeur de recherche, le Dr. Hani Antoun pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. J'aimerais particulièrement souligné ses qualités humaines, son savoir-faire, et son appui moral et financier et sa disponibilité.

J'aimerais remercier particulièrement mon co-directeur, le Dr. Michel Pierre CESCAS, pour ses conseils précieux sur la partie chimique de cette thèse. J'ai particulièrement apprécié son accueil d'une générosité exemplaire.

J'aimerais exprimer mes sincères remerciements au Dr. Antoine Karam Pour avoir accepté faire la prélecture de cette thèse. Je me souviendrai particulièrement de ses qualités humaines et de sa forte compétence.

Je remercie particulièrement Mrs Bakara Diallo, Ingénieur agronome en service au PACCEM (Diré) et Alpha Allaye paysan (Koygour) pour toute l'aide qu'il m'ont apporté lors des travaux aux champs.

J'aimerai aussi remercier tous les étudiants du laboratoire du Dr. Antoun, pour leur patience et leur sens de l'humour qui m'ont permis d'effectuer mes travaux dans une atmosphère sans pareil.

J'aimerai remercier tout le personnel enseignant de l'Université Laval pour leur aide et leur disponibilité.

Mes sincères remerciements vont à Madame Anne-Marie Marcotte de l'ambassade du Canada au Mali et au PACCEM, qui m'ont apporté toute l'aide et l'information dont j'avais besoin lors de mes passages au Mali pour les travaux de terrain.

Enfin, un grand merci à tous les ami (es) étudiant(es) qui m'ont soutenu pendant les moments difficiles et dont la patience et la disponibilité n'ont jamais fait défaut.

*A mon père feu Hamadoun Babana et ma mère
feue Kaddidia Amadou*

Table des matières

Résumé court.....	i
Résumé long.....	ii
Abstract.....	vi
Avant-propos.....	vii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiv
Introduction.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	4
1.1 Le phosphore dans le sol	5
1.2 Le phosphate naturel de Tilemsi (PNT).....	6
1.3 Solubilisation des phosphates inorganiques	7
1.4 Facteurs affectant la solubilisation des phosphates inorganiques	9
1.4.1 Facteurs liés à la source de phosphore	9
1.4.2 Facteurs liés aux pratiques de gestion du sol et des fertilisants	11
1.4.3 Effets des espèces de plantes	12
1.5 Isolement des microorganismes solubilisant le phosphore	12
1.6 Contribution des microorganismes solubilisant le P à la croissance des plantes ..	13
1.7 Interaction dans la mycorhizosphère	16
1.8 Structure de la thèse	17
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES	18
2.1 Matériels	19
2.1.1 Échantillons de sols du Mali	19
2.1.2 Phosphate naturel de Tilemsi.....	19
2.1.3 Cultivars de blé.....	20
2.2 Méthodes	20
2.2.1 Dénombrement et isolement des MSP	20
2.2.2 Caractérisation des MSP.....	22
2.2.3 Essai d'inoculation avec les MSP.....	26
2.2.4 Analyse des plantes et des données	31
Chapitre 3 : Résultats et discussions.....	33
3.1 Résultats.....	34

3.1.1	Isolement et caractérisation des microorganismes solubilisant le phosphore	34
3.1.2	Effets des MSP sur la croissance et la production du blé irrigué du Mali.....	57
3.1.3	Effets des MSP et <i>G. intraradices</i> sur la croissance et la production du blé .	71
3.1.4	Effet de <i>Pseudomonas</i> sp. (BR2) sur la microflore rhizosphérique.....	88
3.2	Discussion	103
	Références bibliographiques	111

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques caractéristiques des échantillons de sol utilisés pour l'isolement des microorganismes dissolvant le phosphate naturel de Tilemsi.....	35
Tableau 2 : Importance des microorganismes solubilisant le phosphate naturel de Tilemsi dans les échantillons de sol à l'étude.....	36
Tableau 3 : Analyse de la variance pour les microorganismes totaux et solubilisant le phosphore des différents sols.....	36
Tableau 4 : Populations de microorganismes totaux et solubilisant le phosphore dans les échantillons de sol à l'étude.	37
Tableau 5 : Importance des bactéries solubilisant le PNT dans la population microbienne et la population bactérienne totale des échantillons de sol à l'étude.....	38
Tableau 6 : Importance des bactéries solubilisant le PNT dans la population bactérienne totale des échantillons de sol à l'étude.....	38
Tableau 7 : Importance des champignons solubilisant le phosphore dans les sols étudiés.	39
Tableau 8 : Importance des champignons solubilisant le phosphate naturel de Tilemsi dans la microflore totale et dans la population totale de champignons des sols à étudier.	40
Tableau 9 : Importance des microorganismes solubilisant le PNT (MSP) dans la rhizosphère de différents cultivars de blé du Mali.	41
Tableau 10 : Analyses de la variation pour les microorganismes rhizosphériques totaux et solubilisant le phosphore.....	42
Tableau 11 : Microorganismes rhizosphériques solubilisant le phosphore (MSP).....	42
Tableau 12 : Incidence des microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) dans le rhizoplan, la rhizosphère et le sol non rhizosphérique de différents cultivars de blé du Mali ^a	43
Tableau 13 : Population de microorganismes solubilisant le phosphore dans la rhizosphère de différents cultivars de blé du Mali, et dans le sol non rhizosphérique*.....	44
Tableau 14 : Solubilisation du phosphate naturel de Tilemsi par les isolats retenus sur milieu solide*.....	45
Tableau 15 : Stabilité de BR2, C1 et C13 sur 10 générations telle que mesurée par leur croissance et leur production d'acide sur milieu solide NBRIP*.....	46
Tableau 16 : Résumé des analyses de variances pour l'acidité titrable, le pH et le P solubilisé par les isolats testés, après 14 jours d'incubation.....	47
Tableau 17 : Solubilisation du PNT, dans le milieu NBRIP liquide, par les isolats retenus*.....	48

Tableau 18 : Sélection des microorganismes capables de croître sous stress et.....	55
Tableau 19 : Production de sidérophores, d'acide cyanhydrique (HCN) ou d'acides indole acétique (A.I.A.) par les isolats retenus après 12 jours de croissance sur milieu solide.	56
Tableau 20 : Analyse de la variance pour la germination des graines inoculées par les MSP.	57
Tableau 21 : Influence de l'inoculation avec les MSP sur la germination des graines (exprimé en nombre de graines germées sur 10 graines) ^α	58
Tableau 22 : Résumé des analyses de variance pour les variables mesurées sur le blé.....	59
Tableau 23 : Effet de l'application du phosphate naturel de Tilemsi (PNT) et du phosphate biammoniacal (DAP) à 30 kg de P ha ⁻¹ sur la colonisation des racines, la taille et la production de paille et racines du blé.	60
Tableau 24 : Effet de la fertilisation et de l'inoculation avec les MSP sur la colonisation des racines du blé par les mycorhizes indigènes du sol après 45 jours de croissance.....	61
Tableau 25 : Effet des MSP sur la taille et le nombre de feuilles par plante de blé (cultivar Tétrà) après 30 et 60 jours de croissance.	63
Tableau 26 : Effets des MSP sur la production de matière sèche végétale de blé (paille et racines du cultivar Tétrà).	65
Tableau 27 : Résumé des analyses de variance sur les variables mesurées sur le blé (cv. Tétrà).	72
Tableau 28 : Effets de l'inoculation avec les MSP, sur la taille et la colonisation des racines de la variété de blé Tétrà.....	74
Tableau 29 : Effets de l'inoculation avec <i>Glomus intraradices</i> (Gi) sur la taille, la colonisation des racines par les mycorhizes, la production de graines et de paille et les concentrations en P du blé.	75
Tableau 30 : Effets de l'inoculation avec les MSP sur la production en graines et paille et les concentrations en P de la variété de blé Tétrà.	79
Tableau 31 : Effets de l'application du PNT et DAP sur la taille, la colonisation des racines par les mycorhizes, la production de graines et de paille et les concentrations en P du blé ^α	80
Tableau 32 : Analyse de la variance pour le taux de colonisation des racines du blé inoculé par <i>Pseudomonas</i> sp. BR2rif ⁺	88
Tableau 33 : Effet du taux d'inoculation de la bactérie <i>Pseudomonas</i> sp rif ⁺ sur la colonisation des racines par la bactérie après 30 jours de croissance.....	89
Tableau 34 : Compétitivité de <i>Pseudomonas</i> sp. BR2rif ⁺ dans le sol.....	90
Tableau 35 : Effet du taux d'inoculation de la bactérie <i>Pseudomonas</i> sp. rif ⁺ sur la colonisation des racines par la bactérie après 30 jours de croissance.....	90
Tableau 36 : Résumé des analyses de variance pour les différentes variables mesurées sur le blé.....	92

Tableau 37 : Effet de l'ajout du phosphate naturel de Tilemsi, sur la colonisation des racines du blé par <i>Pseudomonas sp.</i> et par les champignons mycorhiziens.	98
Tableau 38 : Effets de l'inoculation avec <i>Pseudomonas sp.</i> (BR2) et de l'application du PNT sur la colonisation des racines du blé.....	99
Tableau 39 : Effets de l'inoculation avec la bactérie <i>Pseudomonas sp.</i> résistante à la rifampicine (BR2rif ⁺) sur la production de paille et le	100

Liste des figures

Figure 1 : Relations entre le P assimilable, le pH et les champignons totaux des sols.....	40
Figure 2 : Quantité de P solubilisé par les bactéries en fonction de la durée d'incubation.....	49
Figure 3 : Quantité de P solubilisé par les champignons en fonction du temps.....	50
Figure 4 : Corrélation entre la production d'acide citrique et la solubilisation du P	51
Figure 5 : Évolution de la quantité de P en fonction de la production d'acide citrique et de la baisse du pH.....	52
Figure 6 : Corrélation entre le pH du milieu de culture et la solubilisation du phosphore.....	53
Figure 7 : Corrélation entre l'acidité titrable et la solubilisation du phosphore.	53
Figure 8 : Effets de l'application du PNT et du DAP, sur l'assimilation totale des minéraux .	67
Figure 9 : Effets de l'inoculation du blé avec les MSP, sur l'assimilation des minéraux.....	69
Figure 10 : Corrélation entre la taille du blé et la production en graines.....	77
Figure 11 : Effet de la fertilisation sur l'assimilation du Mg, Ca, Zn, Mn, K, P, Fe et Al	82
Figure 12 : Effet de l'inoculation du blé cultivé au champs, avec <i>G. intraradices</i> sur l'assimilation totale du Mg, Ca, Zn, Mn, K, P, Fe et Al.	84
Figure 13 : Corrélation entre l'accumulation d'Al dans la paille du blé et l'absorption du phosphore par le blé fertilisé avec le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) et inoculé avec <i>G. intraradices</i> et les MSP.....	86
Figure 14 : Effet du phosphate naturel de Tilemsi sur microorganismes rhizosphériques totaux.....	93
Figure 15 : Effet du phosphate naturel de Tilemsi sur microorganismes rhizosphériques solubilisant le phosphore.	94
Figure 16 : Effet de L'inoculation avec <i>Pseudomonas sp.</i> (BR2rif ⁺) et <i>Glomus intraradices</i> (Gi) sur le nombre de bactéries totales et solubilisant le phosphore.	95
Figure 17 : Effet de L'inoculation avec <i>Pseudomonas sp.</i> (BR2rif ⁺) et <i>Glomus intraradices</i> (Gi) sur les champignons rhizosphériques totaux et solubilisant le phosphore présentes dans la rhizosphère du blé après 6 semaines de croissance. Les valeurs (cfu/g de sol sec) représentent la moyenne de six répétitions.	97
Figure 18 : Relation entre le pourcentage de la longueur des racines colonisées par les champignons mycorrhiziens et l'absorption du phosphore par la variété de blé Tétr.....	101

Introduction

Au Mali, mis à part les rizières, la plupart des sols, en particulier ceux sous culture de blé, sont caractérisés par leur faible teneur en phosphore. Cette déficience en phosphore constitue un facteur limitant de la production du blé, principale culture de la région de Tombouctou, principalement de la zone de Diré, au Nord du Mali. Aussi, pour améliorer le rendement des cultures, les paysans utilisaient traditionnellement le superphosphate triple pour fertiliser les sols. Par ailleurs, les prix très élevés des engrais importés et la pression économique sur les paysans, ont nécessité la recherche d'engrais efficaces, moins coûteux et d'accès facile. D'où l'utilisation du phosphate naturel de Tilemsi (PNT) comme engrais phosphaté.

Le Mali produit des phosphates naturels dont le plus important est le phosphate naturel de Tilemsi. Le PNT est le seul phosphate naturel de l'Afrique de l'Ouest à avoir une solubilité dans l'acide formique supérieure à 55%, valeur retenue par la Commission Européenne pour l'emploi direct des phosphates en agriculture. Cependant, dans la pratique, il s'est montré peu efficace dans la plupart des sols, principalement ceux sous culture de blé. Malgré sa solubilité moyenne, il peut se passer, en fonction des sols, deux à trois années d'application annuelle avant d'observer un effet satisfaisant sur la production. En plus, pour avoir des effets correspondant à ceux des phosphates solubles, il faut utiliser 2 à 6 fois les quantités de phosphates naturels ([Cescas, 1972](#)). Cette situation a occasionné une baisse de la production de PNT et même une fermeture temporaire de l'usine, suivi du licenciement de plusieurs chefs de familles. Pour éviter que cette situation ne perdure, plusieurs stratégies et technologies sont actuellement mises en branle pour améliorer la solubilisation du PNT. Parmi toutes les stratégies développées, peu de place a été réservée à la collecte et à l'utilisation des microorganismes.

Les microorganismes du sol, principalement les champignons, peuvent solubiliser les phosphates naturels. En effet, il existe dans les sols et la rhizosphère des plantes, une microflore capable de dissoudre les différentes formes de phosphates insolubles. L'incidence de cette microflore, son importance et son activité peuvent être influencées par plusieurs facteurs édaphiques. Ainsi, la nature de la source de carbone et d'azote, utilisée par cette microflore influence directement la nature et la composition des acides organiques produits et par conséquent, l'importance de l'activité de dissolution. La présence de métaux lourds dans les phosphates et leurs interactions avec les autres éléments formant la roche, peuvent directement influencer l'activité des microorganismes dissolvant le phosphore, en affectant

négalement leur croissance. De même, la nature et la composition des exsudats racinaires (sucres, acides organiques et sidérophores) des plantes cultivées, jouent un rôle important dans la répartition et l'activité de la microflore rhizosphérique.

Malgré tout, le meilleur moyen d'améliorer la solubilisation des phosphates naturels, demeure l'utilisation des microorganismes rhizosphériques. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée, au Mali, en vue d'évaluer l'incidence des populations de microorganismes rhizosphériques capables de dissoudre les phosphates inorganiques sur la mise en disponibilité du phosphore du PNT au blé irrigué du Mali. Il est cependant envisageable que plusieurs microorganismes de la rhizosphère du blé soient capables d'améliorer la croissance du blé en solubilisant le PNT. Aussi afin de combler cette lacune, nous nous sommes fixé comme objectif, la mise au point d'un inoculant biologique pour le blé irrigué du Mali.

Hypothèses

- 1- Les microorganismes, isolés de la rhizosphère du blé du Mali, peuvent solubiliser efficacement le phosphate naturel de Tilemsi.
- 2- Les microorganismes, pouvant coloniser la rhizosphère du blé et dissoudre le PNT, peuvent améliorer la nutrition phosphatée et le rendement du blé du Mali.

Objectif général :

L'objectif à long terme de ce projet de recherche est de développer un inoculant biologique pour le blé cultivé au Mali, qui lui permettra de combler rapidement ses besoins en phosphore à partir du phosphate naturel de Tilemsi.

Pour atteindre cet objectif, quelques étapes doivent être réalisées. Chacune de ces étapes vise un certain nombre d'objectifs spécifiques.

Première étape :

Cette étape vise à isoler de la rhizosphère du blé, des microorganismes pouvant solubiliser efficacement le PNT.

Le premier objectif consiste à isoler et à cultiver les microorganismes de la rhizosphère du blé, impliqués dans la dissolution du phosphate naturel de Tilemsi.

Le deuxième objectif consiste à sélectionner (ceci présume la viabilité), en laboratoire, des bactéries isolées de la rhizosphère du blé cultivé au Mali montrant une grande activité de dissolution du phosphate naturel de Tilemsi.

Deuxième étape :

Cette étape vise à déterminer l'impact de l'inoculation des graines de blé, avec les microorganismes sélectionnés, sur la croissance et le rendement des cultures.

L'objectif visé par cette étape est de déterminer, aux champs, l'effet de l'inoculation des graines de blé, sur la nutrition et le rendement du blé du Mali.

Afin de mieux de mieux comprendre ce qui a été fait dans le domaine, le premier chapitre de cette thèse expose l'état des connaissances et le bilan des techniques utilisées ou qui pourraient être utilisées pour, non seulement, isoler et caractériser les microorganismes solubilisant le P, mais aussi, formuler un inoculant biologique efficace contenant un ou plusieurs de ces organismes.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le phosphore dans le sol

Le phosphore joue un rôle essentiel dans le transfert d'énergie nécessaire à la croissance et l'amélioration de la productivité des plantes. C'est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Dans les sols, son contenu varie de 200 à 5000 ppm soit 0,02 à 0,5% pour une moyenne de 600 ppm ([Lindsay, 1979](#)). Le phosphore constitue le 2^e élément en importance pour la nutrition végétale. Cependant, la majorité des sols cultivables en sont pauvres. Pour améliorer la production des plantes, on apporte le P sous forme d'engrais soluble. Cependant, l'enrichissement en P du sol suite à des applications de fertilisants dépend des caractéristiques chimiques et de la nature pédologique du sol. En effet, la plus grande partie du phosphore ajouté sous forme soluble est soit adsorbé par le calcium présent sur le complexe d'échange, soit précipité par les formes libres de fer ou d'aluminium qui se retrouvent en quantités importantes dans les sols 0,2 à 0,7 % soit plusieurs tonnes par hectares ([Giroux, 2002](#)).

La capacité des sols à fixer le phosphore, est influencée par leurs contenus en aluminium libre, ce qui explique les différentes réactions, des engrais phosphatés appliqués qui deviennent moins disponibles aux plantes ([Camara et al., 1987](#)). Ces réactions varient selon la nature et le contenu en oxydes d'aluminium, le plus de fixation sous forme d'Al-P étant observé dans les sols acides, faisant apparaître des niveaux d'application, du phosphore, variables pour enrichir les sols ([Vezina et al., 2000](#); [Zhang et al., 1995](#)). La teneur initiale d'un sol en P est un autre facteur très important à considérer lors de la fertilisation. En effet, plus la teneur en P d'un sol est élevée, plus la dose de P nécessaire au maintien de la fertilité est élevée ([Webb et al., 1992](#)). En plus, les cultures ne prélevant pas toutes les mêmes quantités de P, l'évolution de la teneur en P des sols va aussi dépendre des systèmes culturaux.

Selon Tisdale et al. (1985), les phosphates précipités par le fer et l'aluminium sont transformés en minéraux très stables: strengite et variscite, tandis qu'avec le calcium, les phosphates vont évoluer, au cours du temps, vers des formes de plus en plus stables pour donner les phosphates octocalciques puis les phosphates di ou tricalciques et les apatites (hydroxyapatite et fluoroapatite). Ce phénomène appelé rétroversion des phosphates est à l'origine de dépôts importants de phosphates naturels de plus en plus exploités et utilisés comme fertilisant. Cependant, la mise en disponibilité du P des phosphates naturels dépend de plusieurs facteurs dont la réactivité de la roche.

En effet, les réactions et les transformations biologiques des phosphates naturels dans les sols sont très complexes. Afin de mieux cerner les phénomènes mis en cause dans ce

travail, les sujets qui seront abordés dans les différents chapitres, tel le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) et ses caractéristiques, la dissolution du PNT, les microorganismes dissolvant le PNT, et l'utilisation d'inoculant biologique, seront introduits dans cette partie.

1.2 Le phosphate naturel de Tilemsi (PNT)

Les phosphates de la vallée du Tilemsi sont connus depuis les années 1930, mais ces phosphates n'ont pas été exploités pour plusieurs raisons, dont les différences d'appréciations sur leur qualité ([SONAREM, 1988](#)).

En 1968-1969, la société Klokner a fait l'étude d'un traitement classique du phosphate naturel de Tilemsi et ses conclusions furent défavorables, principalement à cause des oxydes de fer et d'aluminium contenus dans le phosphate ([SONAREM, 1988](#)).

Cependant, la SONAREM a continué à produire entre 1960 et 1970 des petites quantités de phosphate naturel broyé pour des besoins de tests agronomiques. Suites aux résultats encourageants enregistrés, la production du phosphate naturel de Tilemsi (PNT) a été entreprise dès 1976. Le gisement en exploitation est celui de Tamaguilelt, plateau résiduel situé dans la vallée du Tilemsi dans le nord du Mali, à quelques 120 km de Bourem ([Pieri et al., 1980](#)). Ses coordonnées géographiques sont 0°15' de longitude Est et 17°38' de latitude nord.

Les sables phosphatés se rencontrent dans les formations sédimentaires d'âge éocène moyen. Ils se présentent en deux couches : une couche à faciès fin argileux, de couleur jaune et une couche à faciès grossier, de couleur gris noir. L'épaisseur maximum des deux couches est de 2,5 mètres. Le minéral principal des sables est constitué par l'apatite. La teneur moyenne des couches exploitées est de l'ordre de 30% de P_2O_5 . Les réserves sont estimées entre 20 millions de tonnes dont 2 à 5 millions, situés sur les bordures du plateau, sont exploitables à ciel ouvert.

L'usine du mali produisait 3 000 tonnes de PNT/an sur une capacité d'environ 36 000 tonnes /an. Le PNT est riche en phosphore (25 à 30%), en calcium (42%) et contient également 8.1% d'oxydes de fer et d'aluminium ([Jenny, 1973](#)). La teneur en phosphore (P) du PNT, varie en fonction de la composition granulométrique. [Truong et al. \(1978\)](#) suite à leurs travaux visant à caractériser et à classer les phosphates naturels tricalciques d'Afrique de l'ouest, ont annoncé que le PNT présentait des caractéristiques chimiques et minéralogiques qui le classe théoriquement parmi les meilleurs phosphates naturels de l'Afrique.

En effet, Le PNT est le seul à avoir une solubilité dans l'acide formique supérieure à la limite de 55%, retenue par la Commission Européenne pour l'emploi direct des phosphates en agriculture. Cependant, dans la pratique, il s'est révélé moins efficace dans beaucoup de sols agricoles du Mali, principalement dans les sols sous culture de blé irrigué, principale culture sèche de la région de Tombouctou au nord du Mali. La difficulté qu'ont les paysans à épandre le PNT (à cause du vent et de l'état poudreux du PNT moulu) et son manque d'efficacité dans certains sols ont provoqué une sous utilisation du PNT comme engrais, entraînant ainsi une chute de sa production et même, une fermeture temporaire de l'usine de production.

1.3 Solubilisation des phosphates inorganiques

Dans les sols agricoles, la dissolution des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des microorganismes du sol ([Tardieux-Roche, 1966a](#) et [1966b](#); [Richardson, 2001](#)). En effet, on trouve dans les sols un nombre important de microorganismes du sol, incluant des bactéries, des champignons et des algues ([Berthelin et al., 1991](#); [Goldstein, 1986](#); [Kim et al., 1997](#); [Oehl et al., 2001](#); [Sundara et al., 2002](#)). Bien que ces microorganismes soient généralement liés à la surface des particules de sol, c'est surtout au niveau de la rhizosphère que leur activité est la plus élevée ([Andrade et al., 1998](#); [Kluepfel, 1993](#); [Marschner et al., 1997](#)). En effet, au niveau de la rhizosphère, les exudats racinaires, tels que les acides organiques, constituent d'excellentes sources d'éléments nutritifs pouvant supporter la croissance des microorganismes, ce qui explique leur densité plus forte au niveau du sol rhizosphérique que dans le sol non rhizosphérique ([Hinsinger, 2001](#); [Singh et Amberger, 1998](#)). Cependant, il faut noter que la population et la distribution des microorganismes solubilisant le phosphore au sein de la microflore totale, varient d'un à l'autre ([Chabot, et al., 1993](#); [Zoysa, et al., 1998](#)). Le nombre de bactéries et de champignons dissolvant les phosphates varie de 0.5%-0.1% ([Kucey, 1989](#)) à 26%-39% ([Sperber, 1958](#)) de la microflore totale, et il existe une grande corrélation entre le nombre de champignons totaux et solubilisant les phosphates et la teneur en phosphate total du sol. Les champignons solubilisent plus efficacement les phosphates que les bactéries, en plus, une grande partie des champignons conservent cette propriété tandis que la majorité des bactéries la perdent après plusieurs repiquages successifs ([Kucey et al, 1989](#)).

Plusieurs chercheurs ont associé la solubilisation des phosphates à une baisse du pH du milieu ([Hedley et al., 1990](#); [Hinsinger, 2001](#)). En effet, certaines souches bactériennes chimioautotrophes tirent leur énergie de croissance de l'oxydation de certains éléments chimiques avec production d'acides ([Pelmont, 1993](#); [Swaby et Fedel, 1973](#)).

C'est ainsi les souches thiooxydantes sont capables de produire de l'acide sulfurique par oxydation du soufre élémentaire et de certains sulfures présents dans les sols ([Germida et Jansen, 1993](#); [Wainwright et al., 1984](#)). De même, le genre *Nitrosomonas* peut produire de l'acide nitrique par oxydation de l'ammonium présent dans les sols ([Reyes et al., 1999b](#)). Les acides ainsi produits vont faire baisser le pH du milieu et ainsi dissoudre les phosphates naturels, réalisant en quelque sorte une fabrication biologique du superphosphate ([Narsian et Patel, 2000](#)). La quantité d'acide produite par l'oxydation microbiologique et la baisse de pH varient en fonction du genre et de l'espèce microbienne considérée. Ainsi, [Martinez-Cruz et al. \(1990\)](#), ont indiqué l'existence de trois niveaux de pH pour une même souche d'*Aspergillus niger*. Chaque niveau correspond à la dissolution d'un phosphate inorganique. Ainsi, nous avons une dissolution du phosphate de fer à un pH inférieur à 2,1 suivi du phosphate d'aluminium à pH 3 et enfin le phosphate de calcium est dissout à pH 4.8. De plus, une autre méthode de dissolution par acidification faisant suite à une extrusion d'ions H^+ lors de l'assimilation de l'ammonium a été décrite ([Bolan et al., 1997](#)).

Les travaux de [Illmer et Schinner \(1992\)](#) ont montré que la dissolution des phosphates naturels n'est pas absolument liée à une baisse de pH. En effet, certains microorganismes libèrent dans leurs milieux des acides organiques capables d'extraire le phosphore dit 'assimilable' en séquestrant les cations métalliques intervenant dans l'adsorption du phosphore ([Milagres et al., 1999](#); [Sayer et al., 1995](#); [Vasquez et al., 2000](#)) et en libérant le phosphore lié aux argiles et aux oxydes de fer et d'aluminium ([Violante et al., 1996](#)). [Goldstein \(1986\)](#), a montré que l'acidification de l'espace péri plasmique par oxydation directe du glucose en acide gluconique, est le processus majeur utilisé par les bactéries Gram négatives pendant la dissolution des phosphates minéraux. Le pouvoir chélateur d'un acide organique donné par rapport à un métal donné, varie avec le pH. Par exemple [Cline et al. \(1982\)](#) ont montré que l'acide citrique chélate préférentiellement le fer à pH 6,0 alors qu'à un pH au-dessus de 6,0, apparaît une compétition entre le calcium et le fer. De même, l'acidification artificielle du milieu de culture par ajout d'acide minéral industriel, a provoqué une dissolution inférieure à celle obtenue en utilisant les microorganismes, ce qui suggère que les acides organiques sont plus efficaces dans la dissolution des phosphates inorganiques que les acides minéraux et permettent par conséquent une meilleure nutrition phosphatée des plantes à partir des phosphates inorganiques. Les acides organiques produits au niveau de la rhizosphère, le sont essentiellement par les microorganismes rhizosphériques et les racines de certaines plantes. Ainsi, tous les facteurs agissant sur les microorganismes rhizosphériques occasionnent des variations de la solubilisation des phosphates inorganiques.

1.4 Facteurs affectant la solubilisation des phosphates inorganiques

Pour que le phosphate naturel puisse servir de source de phosphore et optimiser la croissance des plantes, il faut que ses conditions d'utilisation en application directe, ou sous forme acidulée, favorisent sa dissolution ([Bationo et al., 1998](#); [Toro et al., 1998](#)). Ces conditions sont celles qui stimulent l'activité microbienne ([Germida et Jansen, 1993](#)). Elles relèvent à la fois du sol et des facteurs extérieurs au sol et sont de trois ordres: physiques, chimiques et biologique ([Morel, 1996](#)).

1.4.1 Facteurs liés à la source de phosphore

La solubilité de la roche phosphatée est la propriété donnant le plus d'information sur son efficacité agronomique. Elle dépend en grande partie de la composition chimique et minéralogique de la roche considérée. [Chien \(1977\)](#) suite à des travaux sur la solubilité des roches phosphatées a annoncé que, de façon générale, la solubilité croît avec l'augmentation des structures de substitutions du carbonate pour le phosphore dans la structure de la roche phosphatée. Par la suite, plusieurs travaux ont montré que la solubilité des roches phosphatées corrèle bien avec la réponse des cultures. Ainsi, [Engelstad et al. \(1974\)](#) ont rapporté une variation du rendement du riz flottant en fonction de la solubilité de la roche phosphatée dans l'acide citrique. De même, [Truong et al. \(1978\)](#) comparant des phosphates de solubilité différentes provenant d'Anecho au Togo, de Kodjari au Burkina Faso, de Tahoua au Niger, du Tilemsi au Mali et de Matam au Sénégal; ont trouvé que seuls les phosphates de Tahoua et de Tilemsi sont souhaitables pour une application directe. Ces deux phosphates ont une solubilité dans l'acide citrique variant de 3.2 à 5% (la solubilité moyenne).

1.4.1.1 Facteurs Physiques

La texture et la structure du sol agissent sur l'activité microbienne soit directement, soit indirectement. Ainsi, dans un sol sableux suffisamment humide, nous avons une propagation rapide de l'activité microbienne. Tandis que dans un sol argileux, l'argile forme avec les substances organiques des complexes organo-minéraux dans lesquels ces substances deviennent moins accessibles aux microorganismes entraînant un ralentissement de l'activité microbienne dans ces sols ([Morel, 1996](#)). De même, la qualité structurale du sol oriente la nature et l'intensité de la vie microbienne ([Morel, 1996](#)). En plus, l'activité microbienne est étroitement corrélée à la quantité d'eau présente dans le

sol ([Bationo et Mokwunye, 1991](#); [Ssali et Gupta, 1990](#)). Cette activité croît avec la teneur en eau, avec un maximum se situant au voisinage de 60%, les bactéries étant plus sensibles aux variations de l'humidité du sol que les champignons ([Morel, 1996](#)). En plus, pour chaque espèce microbienne existe un seuil de température au-dessous duquel son activité est nulle. Ainsi, la plupart des bactéries et actinomycètes ont un optimum d'activité entre 25 et 40°C, tandis que pour les champignons l'optimum se situe aux environs de 26°C. Eu égard à ce qui précède, nous pouvons dire que les facteurs physiques occupent une place importante dans l'intensité de développement des microorganismes du sol. Cependant, [Morel \(1996\)](#), a montré que l'activité microbienne d'une saison donnée est principalement orientée par la combinaison humidité et température du sol.

1.4.1.2 Facteurs Chimiques

Chaque espèce microbienne a des limites propres de pH entre lesquelles elle est active. Un pH du sol et principalement de la rhizosphère relativement faible favorise l'activité des microorganismes dissolvant les phosphates inorganiques ([Hedley, 1990](#)). Ainsi, [Engelstad et al. \(1974\)](#), ont montré, suite à une expérience aux champs, que le pH du sol a un faible effet sur la réponse du riz au superphosphate triple; cependant, l'efficacité des phosphates naturels dépend du pH. Au pH 4.6 le riz flottant répond bien à l'application du phosphate naturel, le degré de réponse dépend de la réactivité de la roche phosphatée. A pH 8.0, cependant, tous les phosphates naturels sont inefficaces et n'améliorent pas la production du riz plus que le contrôle. Le contenu en calcium du sol joue un rôle important dans la dissolution des phosphates inorganiques.

[Doumbia et al. \(1993\)](#) ainsi que [Toro et al. \(1998\)](#) ont montré que la stimulation de l'activité de ces microorganismes entraîne une diminution du calcium échangeables du sol et favorise la dissolution des phosphates naturels. De même [Kanabo et Gilkes \(1988\)](#), ont indiqué que dans les sols sablonneux à CEC faible, ne fournissant pas de réservoir d'accumulation pour le calcium libéré, il y a ralentissement de la solubilisation des phosphates naturels avec pour conséquence baisse de la production agricole. En plus du contenu en calcium, l'état d'aération du sol a été reconnu comme facteur important de la dissolution des phosphates inorganiques. La nature de la flore microbienne dépend de

l'état d'aération du sol qui détermine le pouvoir d'oxydoréduction de la portion de sol considérée. Ainsi, selon [Morel \(1996\)](#), un sol bien aéré favorise l'activité des microorganismes aérobies qui tirent leur énergie de l'oxydation des substances organiques mortes avec comme accepteur d'électrons l'oxygène. En plus, les microorganismes du sol requièrent pour leur croissance un ensemble d'éléments chimiques, classés en macroéléments (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg) et en micro-éléments (Cu, Zn, Mn, Mo, V...). Ainsi, la déficience d'un ou de plusieurs de ces éléments peut inhiber la dissolution des phosphates naturels en agissant négativement sur l'activité des microorganismes ([Morel, 1996](#)). De même, la méthode de placement et le temps d'application du phosphate, ainsi que, le chaulage des sols acides affectent énormément la dissolution des phosphates naturels ([N'Diaye et al., 1991](#); [Zawartka et al., 1999](#)).

1.4.2 Facteurs liés aux pratiques de gestion du sol et des fertilisants

Le mode de placement, le temps d'application des phosphates naturels, ainsi que le chaulage des sols, peuvent agir sur l'efficacité relative des engrais naturels. [Chien et al. \(1990\)](#), dans une étude faite en serre, ont trouvé que la réponse du riz flottant à l'application du superphosphate triple n'était pas influencée par la méthode de placement. Cependant, selon [Chien et Menon \(1995\)](#), l'efficacité de la roche phosphatée de la Caroline du Nord est fortement influencée par la méthode de placement. De même, des travaux similaires effectués au Mali ont montré que le phosphate naturel de Tilemsi est plus efficace appliqué en bande qu'incorporer en profondeur.

Le chaulage est une pratique très souvent utilisée pour augmenter le pH des sols et baisser la toxicité de l'aluminium. Il permet par son action, de rehausser le niveau de production des cultures. Cependant, [Hammond et al. \(1986\)](#), ont montré qu'à cause de la libération de calcium lors de la solubilisation des phosphates naturels, les sols contenant une grande quantité de calcium peuvent diminuer la vitesse de dissolution de ces phosphates. Au contraire, [Khasawneh et Doll \(1978\)](#), comparant les effets du CaCO_3 et du SrCO_3 sur l'efficacité agronomique du phosphate naturel de la Caroline du Nord ont trouvé que le SrCO_3 diminue le rendement des cultures plus que le CaCO_3 au même pH après chaulage. Ceci indique que le niveau de chaulage doit être choisis avec prudence afin d'éviter son effet négatif sur la dissolution de la roche phosphatée dans les sols acides.

1.4.3 Effets des espèces de plantes

L'utilisation des phosphates naturels dépend des espèces et plus particulièrement des cultivars utilisés. [Flash et al. \(1987\)](#) ont montré que les plantes de sorgho mobilisent plus efficacement les phosphates naturels que les plantes de maïs. [Chien et Menon \(1995\)](#), étudiant l'effet de différentes plantes sur la solubilisation des phosphates inorganiques, ont découvert que certaines plantes favorisent la solubilisation des phosphates naturels par une forte absorption du calcium. Kpombekou et Tabatabaï (1994), ont montré que les acides organiques à faibles poids moléculaire peuvent accroître la concentration du phosphore dans le sol par des mécanismes de complexion et d'échange. Selon [Bationo et al. \(1998\)](#), les plantes peuvent stimuler la dissolution des phosphates à travers une acidification de la rhizosphère. [Chien et al. \(1990\)](#) quant à eux, ont montré que l'efficacité agronomique des phosphates naturels est plus élevée chez les plantes pérennes que chez les plantes à cycle végétatif relativement court comparativement au phosphate super triple. Certaines plantes libèrent dans la rhizosphère des acides organiques capables de mobiliser le P des sources pauvres ([Richardson, 2001](#)).

La source de carbone et d'azote et le rapport Carbone/Azote (C/N) peuvent, dans certaines conditions, altérer la dissolution des phosphates naturels ([Asea et al., 1988](#); [Cunningham et Kuiack, 1992](#)). Selon [Boiffin et Sebillotte \(1977\)](#), l'incorporation dans le sol de résidus à rapport C/N très élevé peut entraîner des carences phosphatées chez les plantes en agissant sur la croissance des microorganismes du sol qui constituent la clé de l'amélioration de l'efficacité des phosphates naturels. Ainsi, le rôle de plus en plus important joué par les microorganismes dans l'agriculture, a entraîné leurs isolement dans plusieurs régions du globe ([Johri et al., 1999](#); [Nautiyal, 1999](#)).

1.5 Isolement des microorganismes solubilisant le phosphore

Les microorganismes de la rhizosphère sont régulièrement isolés par épuisement sur gélose, avec comme milieu de base le milieu PVK ([Pivovskaya, 1948](#)). Dans le but d'isoler des microorganismes dissolvant les phosphates inorganiques, plusieurs sources de phosphore ont été utilisées. Ainsi, le test d'efficacité relative des isolats permet de sélectionner les microorganismes les plus efficaces. Ce test consiste à sélectionner des microorganismes capables de produire des zones claires autour des colonies. Ces zones claires sont dues à la production d'acides organiques dans le milieu entourant les colonies en question ([Asea et al., 1988](#); [Halvorson et al., 1990](#)). Ainsi, plusieurs bactéries et champignons isolés, ont montré la capacité de solubiliser les phosphates naturels

([Johri et al., 1999](#); [Illmer et al., 1994](#)). Parmi les genres les plus souvent isolés se retrouvent l'*Aspergillus*, *Penicillium* ([Fenice et al., 2000](#); [Martinez-Cruz et al., 1990](#); [Reddy et al., 2002](#)), *Pseudomonas* ([Chabot et al., 1993](#); [Illmer et Schinner, 1992](#)), *Bacillus*, *Streptomyces* et *Rhizobium* ([Arora et Gaur, 1978](#); [Banick et Dey, 1983](#); [Halder et Chakrabarty, 1993](#)). Malgré l'obtention de bons résultats par cette méthode, d'autres chercheurs ont montré que, plusieurs microorganismes incapables de produire des zones claires autour de leurs colonies, peuvent solubiliser les phosphates inorganiques en milieu liquide ([Gupta et al., 1994](#); [Nautiyal, 1999](#)). La composition des milieux de culture a ainsi été mise en cause. Ainsi, il est devenu nécessaire, non seulement, de distinguer les éléments qui sont essentiels à la solubilisation des phosphates de ceux qui ne le sont pas, mais aussi, de déterminer à quelles concentrations de ces éléments, la solubilisation est maximale. Suite à de telles investigations, [Nautiyal \(1999\)](#) a observé que le glucose et le $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sont des composantes essentielles du milieu de culture, alors que l'extrait de levure et le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ne le sont pas. En effet, il a montré que l'augmentation de la concentration de l'extrait de levure à un niveau supérieur à 0.5g/l, entraîne une diminution de la solubilisation des phosphates, tandis que, la vitesse de solubilisation croît avec l'augmentation de la concentration du glucose dans le milieu. Il a aussi montré que la solubilisation des phosphates est plus importante lorsqu'on utilise le sulfate d'ammonium à une concentration de 0.1g/l au lieu de 0.5g/l. Tandis qu'une augmentation de la concentration du sulfate de magnésium (MgSO_4) de 0.1g/l à 0.25g/l augmente la solubilisation des phosphates. Suite à ces différentes observations, [Nautiyal \(1999\)](#), a mis au point un milieu de culture très efficace pour étudier la solubilisation des phosphates naturels. Ce milieu est connu sous le nom de National Botanical Research Institutes's growth medium (NBRIP). L'efficacité du milieu NBRIP, en ce qui concerne l'isolement et l'étude de la solubilisation des phosphates par les microorganismes de la rhizosphère, a été confirmée par [Johri et al. \(1999\)](#). L'analyse des résultats des travaux effectués sur ce sujet, montrent que les champignons constituent l'essentiel des microorganismes dissolvant les phosphates naturels dans les sols ([Narsian et al., 2000](#); [Leggett et al., 2001](#)). Cependant, certaines bactéries du sol peuvent aussi solubiliser les phosphates inorganiques. Ainsi, en vue d'augmenter la production des cultures ont plusieurs essais d'inoculation ont eu lieu en serre ou aux champs.

1.6 Contribution des microorganismes solubilisant le P à la croissance des plantes

Les travaux de plusieurs chercheurs ont montré que, les microorganismes dissolvant le phosphore et améliorant la croissance des plantes constituent deux groupes, ceux qui

vivent à l'état libre non loin des racines et souvent même sur la racine sans y être liés et ceux qui vivent en symbiose avec les plantes ([Gerretsen, 1948](#); [Frommel et al., 1991](#); [Leggett et al., 2001](#)). Les microorganismes symbiotiques ont été largement étudiés et utilisés pour augmenter la production de plusieurs cultures ([Frey-Klett et al., 1999](#); [Chabot, 1996](#); [Toro, 1996](#))

En effet, plusieurs expériences réalisées en serres et aux champs, ont montré une forte croissance et une augmentation intéressante de la production des plantes inoculées avec les microorganismes solubilisant le phosphore. Ainsi, [Kucey et Leggett \(1989\)](#) ont réussi à augmenter de façon significative le rendement et l'absorption du phosphore du blé en l'inoculant avec *Penicillium bilaji*. De même, [Domey et Lippman \(1989\)](#) en inoculant le blé cultivé en serre avec des bactéries solubilisant le phosphore, ont augmenté de 8% le rendement de la partie aérienne et de 17 à 57% l'assimilation du phosphore. [Chabot \(1993\)](#), suite à une expérience aux champs avec ses isolats d'*Enterobacter* et *Pseudomonas* a obtenu, après 60 jours de croissance, des augmentations significatives (7 à 9%) de l'élongation des plants de maïs. Cependant, seul un isolat d'*Enterobacter* a pu provoquer une augmentation de la matière fraîche foliaire (23%) du maïs après 108 jours de croissance. Ces résultats ont été confirmés par [Wang et al. \(1995\)](#) qui en plus a montré que la biomasse sèche et l'absorption d'éléments nutritifs deviennent plus importantes dans un sol sablonneux. De plus, l'inoculation du blé avec différentes combinaisons de bactéries avec en présence de phosphates naturels, a stimulé l'activité de la nitrogénase et favorisé la fixation de l'azote atmosphérique et la solubilisation des phosphates naturels ([El-Demerdash, 1992](#); [Rojas et al., 2001](#); [Saleh et al., 1998](#); [El-Sawy et al., 1998](#)). Cependant, [Toro et al. \(1996\)](#), en introduisant des graines de haricot inoculées avec des bactéries solubilisant les phosphates de calcium, de fer et d'aluminium plus des bactéries minéralisant les phytates dans un sol contenant *Glomus mosseae* n'a pu obtenir aucun effet général. En plus, aucun effet n'a été obtenu avec les bactéries minéralisant les phytates seuls dans les conditions de l'expérience. Tout ceci indique une compatibilité fonctionnelle spécifique entre les composantes biotiques intégrées dans le système.

Les champignons mycorhiziens constituent une composante importante des microorganismes du sol ([Kim et al., 1997](#); [Zhu et al. 2001](#); [Schreiner et al. 1997](#)). Ils peuvent infecter les racines de certaines plantes et former des nodules ou mycorhizes ([Mohammad et al., 1998](#); [Ruotsalainen et al., 2002](#)). Ces mycorhizes favorisent l'absorption des éléments nutritifs tels que le phosphore. Cette stimulation de l'absorption du phosphore des plantes hôtes se fait par plusieurs mécanismes dont : l'exploration physique du sol qui diminue la distance de diffusion des ions phosphates et augmente la surface d'absorption de ces ions, la solubilisation du phosphate minéral par les ectomycorhizes, le stockage du phosphore absorbé, le transfert du phosphore aux

racines et, l'utilisation du phosphore dans la plante ([Bolan, 1991](#) ; [Gulden et Vessey, 2000](#) ; [Vessey et Heisinger, 2001](#)). Vu le prix élevé de l'inoculant mycorhizien et la prédominance des mycorhizes indigènes sur les mycorhizes introduites, l'utilisation des mycorhizes indigènes est un facteur important pour l'amélioration de la croissance et de l'absorption du phosphore par les plantes ([Arihara et Karashawa, 2000](#)).

En plus de la nutrition minérale, les mycorhizes stimulent la croissance et la productivité des plantes hôtes ([Chen et al., 2002](#); [Hodge, 2000](#) ; [Villegas et Fortin, 2001](#); [Omar, 1998](#) ;[Vassilera et Azcon, 1998](#)). Ainsi, en étudiant l'effet de cinq champignons mycorhiziens sur la croissance de 10 cultivars de blé sous l'influence de trois régimes de nutrition phosphatée, [Hetrick et al. \(1996\)](#), ont montré l'existence d'une forte corrélation positive entre la biomasse et le pourcentage de colonisation des racines chez les cultivars qui répondent bien à la mycorhization et une corrélation négative entre la biomasse et le pourcentage de colonisation chez les cultivars qui répondent négativement ou pas du tout à la mycorhization. Ils ont aussi indiqué que l'ajout de P n'a pas influencé cette relation. [Vosatka et Gryndler \(1999\)](#), en inoculation la patate avec les champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules (MVA) ont provoqué une forte stimulation de sa vitesse de croissance par l'apport de phosphore.

Les mycorhizes colonisent les racines de plusieurs plantes. Cependant, vu qu'elles ont besoin des racines de ces plantes pour compléter leur cycle de vie, la culture de plantes capables d'être mycorhizées, favorise leur prolifération, tandis que, la culture des plantes dont les racines ne sont pas colonisées par les mycorhizes, entraîne une baisse de la colonisation racinaire, d'où l'importance de l'ordre de succession des plantes cultivées sur le taux de mycorhization. Au cours d'expériences aux champs, effectuées deux années consécutives, la croissance et la production du maïs ont été significativement influencées par la culture précédente. En effet, il a été constaté que le maïs produit plus après la patate qu'après la canne à sucre ([Arihara et Karashawa, 2000](#)). La colonisation des plantes dépend également de plusieurs facteurs comme la quantité de phosphore et d'azote du sol ([Chabot et al., 1998](#); [Ruan et al., 2000](#); [Ruotsalainen et al., 2002](#)), le mode de gestion des cultures ([Alvey et al., 2001](#); [Arihara et Karashawa, 2000](#); [Grünzweig et al., 1999](#)) ou la plante cultivée ([Hetrick et al., 1996](#)). Selon [Aikio et al. \(2002\)](#), les plantes mycorhizées apparaissent plus sensibles aux variations dans la concentration en élément nutritifs du sol que les plantes non mycorhizées. [Jansa et al. \(2002\)](#), étudiant l'effet du labour sur la diversité et la structure des champignons mycorhiziens ont découvert que, le labour a un effet significatif sur la sporulation de certaines espèces et que les ceux d'autres genres que *Glomus*, apparaissent en plus grand nombre dans les sols non labourés. Ils ont aussi trouvé que la structure des communautés de champignons mycorhiziens dans les sols est significativement affectée par le labour.

1.7 Interaction dans la mycorrhizosphère

Plusieurs publications ont rapporté des interactions entre les microorganismes solubilisant le phosphore et les mycorhizes ([Singh et Kapoor, 1999](#); [Vonderwell et Eneback, 2000](#)). En effet, les microorganismes de la rhizosphère sécrètent des composés capables d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire ([Perroto et al., 1994](#), [Wyss et al., 1992](#)). Ces composés, délassent la membrane cellulaire des racines et augmente la production d'exsudats stimulant, ainsi, la croissance et la pénétration du hyphe dans la racine ([Bécard et al., 1992](#)).

Les microorganismes rhizosphériques, appelés rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RFPCP), sont capables de produire des substances phytohormonales, tels que les sidérophores et l'acide indole acétique ([Nair et al., 1991](#); [Siquiera et al., 1991](#)) ayant des actions antagoniques contre les délétères et les champignons phytopathogènes et stimulant la résistance des mycorhizes aux maladies ([Ehteshmul-haque et Ghaffar, 1993](#); [Yao et al., 2002](#)). Cette propriété est d'un intérêt particulier dans la rhizosphère ([Beauchamp, 1992](#)). En plus, des substances phytohormonales, certains microorganismes rhizosphériques produisent des vitamines comme la thiamine, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique et autres, qui stimulent la croissance des plantes et des mycorhizes ([Dommergues et al., 1999](#)).

En dépit de quelques interactions négatives, observées en cas de déficience nutritive, les microorganismes dissolvant le P et les champignons mycorhiziens coexistent dans la rhizosphère des plantes développant à ce niveau des interactions ayant une signification particulière dans la productivité des cultures. Les mycorhizes en s'établissant, induisent la sécrétion d'exsudats racinaires qui peuvent affecter la croissance et l'activité des microorganismes du sol ([Altomare et al., 1999](#); [Singh et Kapoor, 1999](#)). Ainsi, utilisant trois variétés de champignons mycorhiziens (*Glomus etunicatum*, *Glomus mosseae* et *Glomus gigaspora*), [Schreiner et al. \(1997\)](#) ont observé des différences importantes entre les groupes de bactéries Gram+ et Gram- en fonction du champignon qui colonise les racines du soya (*Glycine max* L.). La plus forte production de hyphes externe a été observé avec *Glomus mosseae*, tandis qu'aucune différence significative n'a été observée avec les deux autres. *G. etunicum* a provoqué une stimulation des bactéries Gram+ et a, aussi, mieux amélioré la présence des Gram- que *G. mosseae*. En plus, à cause de leur connections avec les plantes, les mycorhizes peuvent servir de médiateurs dans les relations entre une plante et les microorganismes de la surface racinaire de la plante voisine ([Dommergues et al., 1999](#)).

1.8 Structure de la thèse

Nous avons présenté au chapitre 1, les travaux et les techniques utilisés pour la mise au point d'un inoculant biologique. Ce chapitre montre que la sélection des microorganismes composant l'inoculant biologique et le développement de combinaisons spécifiques hôte espèces microbiennes avec une plus grande efficacité dans différentes conditions expérimentales permet d'améliorer l'effet positif produit par chaque groupe de microorganismes et améliorant ainsi la croissance des plantes dans les sols infertiles.

Nous présentons au chapitre 2, tous les matériels et toutes méthodes utilisés pour, non seulement isoler, caractériser et sélectionner les microorganismes qui solubilisent le plus le phosphate naturel de Tilemsi (MSP), mais aussi, étudier au champ, l'effet de ces MSP sur la croissance et la production du blé.

Le chapitre 3 présente et discute les résultats d'isolement des MSP et de caractérisation des MSP au laboratoire. Ce chapitre étudie également l'impact de l'inoculation avec les MSP, sur la colonisation des racines du blé par les champignons mycorhiziens indigènes et introduites, la croissance et la production du blé irrigué du Mali.

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels

2.1.1 Échantillons de sols du Mali

Les échantillons de sols que nous avons utilisé dans ce projet, ont été collectés en été 2000. Certains, à partir de sites situés sur les champs cultivés de l'action blé de Dire, dans la région de Tombouctou au Nord du Mali. D'autres, à partir de sites adjacents à la mine de phosphate, au nord-est de Bourem, dans la vallée du Tilemsi, au Nord du Mali. Des échantillons composites de sols, ont été prélevés sur plusieurs parcelles de ces sites à des profondeurs variant de 5 à 10 cm. Les échantillons recueillis dans des récipients stériles, ont été séchés à l'air et passés au tamis à mailles 5 mm pour éliminer les cailloux et les gros débris de matière organique, puis sur tamis à mailles 2 mm. Chaque échantillon de sol de 2 mm ainsi obtenus a été divisé en deux parties. Une première moitié pour l'analyse chimique du sol et l'autre moitié pour les tests d'isolement. Le phosphore extractible, le potassium (K), le calcium (Ca) et le magnésium (Mg) ont été déterminés selon une méthode modifiée de Mehlich 3 ([Mehlich, 1984](#)). L'extraction de ces éléments a été faite en plaçant 2.3 cm³ de sol dans des boîtes d'extraction en plastiques, contenant 100 ml de la solution extractive Mehlich 3, composée de 0.2N CH₃COOH, 0.25N NH₄NO₃, 0.015N NH₄F, 0.013 HNO₃ et 0.01M EDTA. Le phosphore dans les extraits, a été mesuré par la méthode colorimétrique de [Tandon et al \(1968\)](#). Le K a été mesuré par émission en flamme, tandis que, le Ca, Mg, le Mn, le Zn et le Cu ont été mesurés par absorption atomique. Le pH des sols a été déterminé dans une solution de CaCl₂ 0,01M La détermination de la matière organique a été faite selon la méthode de Walkley et Black ([McKeague, 1978](#)). La distribution des particules de sol a été mesurée par la méthode de l'hydromètre de Bouyoucos ([McKeague, 1978](#)).

2.1.2 Phosphate naturel de Tilemsi

Le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) est un carbonate apatité dont les dépôts sont localisés dans la vallée de Tilemsi à côté de In-Tassit. Il renferme 23 à 32% de P₂O₅ et sa solubilité dans le citrate neutre d'ammonium est de 4,2% ([Bationo et al., 1997](#)). La composition de la poudre fine de PNT déterminée au laboratoire de foresterie (Université Laval) est de (en mg/g) : P, 150; Ca, 328,9; Al, 19,6, F, 29. Le phosphore extractible du PNT déterminé selon la méthode standard décrite dans le [journal officiel de la communauté Européenne \(1977\)](#).

Le P du PNT a été extrait en plaçant un échantillon de 0,400g de PNT dans des tubes a centrifugation en polypropyrène de 50 ml contenant 40 ml de d'acide formique 2% (20 g/l) ou d'acide citrique 2%. Les tubes ainsi traités ont été agités pendant 30 minutes, centrifugés à 8000 g pendant 10 minutes et leur contenu filtré avec un papier watmann No 41. 3 répétions ont été mises sur place pour chaque extraction. Le P extrait a été mesuré par la methode jaune du vanado molybdate ([Tandon et al., 1968](#)). Le P extrait par cette méthode était de 16,2 mg/g dans l'acide citrique 2% et 73,4 mg/g dans l'acide formique 2%.

2.1.3 Cultivars de blé

Trois cultivars de blé (*Triticum aestivum*) ont été utilisés au cours de cette étude. Il s'agit des cultivars suivants :

- Le tétra cycle communément appelé Tétrà (Mali) avec un cycle de 90 à 100 jours. Il est peu exigeant en eau, adapté aux zones irriguées et produit 2 à 3t/ha avec possibilité de double récolte.
- Alkama Béri originaire du Maroc, a un cycle de 90-100 jours, il est sensible à la photopériode et produit 3 à 4t/ha.
- Hindi Tosson originaire de l'Égypte avec un cycle de 120 jours. Il est sensible à la photopériode et produit 3 à 4t/ha.

Tous ces échantillons proviennent de la collection de l'Institut d'économie rurale (IER) à Bamako au Mali.

2.2 Méthodes

2.2.1 Dénombrement et isolement des MSP

2.2.1.1 Dénombrement des MSP

Cette expérience a été effectuée selon la méthode décrite par [Scher et al. \(1984\)](#). Nous avons, tout d'abord rempli des tubes à essais (25 X 200 mm) jusqu'à une hauteur de 6 cm avec des échantillons de sols stérilisés. Ensuite, nous avons ajouté à chaque tube 5 ml d'eau distillée pour que le sol soit à la capacité au champ et avons recouvert le sol stérile avec 2 cm d'échantillon de sol non stérilisé. Deux graines de blé provenant du Mali, désinfectées en surface (trempées dans l'alcool 70% pendant 1minute, puis placées dans l'eau de javel pendant 15 minutes et enfin rincées à l'eau à 10 reprises), ont été

semées dans chaque tube et recouvertes d'un autre 2 cm de sol non stérilisé provenant du Mali. Les tubes ont été scellés avec du papier parafilm et incubés dans une chambre de croissance (30°C, 4000 lux) pendant 4 semaines sans ajout d'eau. Pour isoler les microorganismes de la rhizosphère, tout le sol se trouvant sur les racines a été gentiment mélangé pour récolter le sol rhizosphérique. Les racines ont été ensuite lavées pendant 2 minutes avec de l'eau de robinet pour récolter toutes les particules de sol coller aux racines. Ensuite, les racines ont été ensuite lavées par une solution saline stérile à 0,85% (poids/volume), pour isoler les microorganismes du rhizoplan. Un échantillon de 1 ml de chaque solution obtenue a été dilué de 10^{-1} à 10^{-8} . Le reste de la solution a été filtrée et le sol rhizosphérique recueilli a été séché à 70°C pendant une nuit et pesé par la suite

Afin de dénombrer les microorganismes des sols à l'étude et d'en isoler les MSP, nous avons incubé des milieux de cultures liquides NBRIP contenant 2 g des différents sols à 28°C pendant 7 jours. Le dénombrement des microorganismes totaux (du sol rhizosphérique, du rhizoplan et des échantillons de sol étudiés), a été effectué sur milieu TSA 0,1 X (Tryptic soy broth de Difco : 3g/l avec 2% de gélose). Pour dénombrer les microorganismes dissolvant le PNT, nous avons effectué des dilutions en séries en ajoutant 1ml de la suspension de sol rhizosphérique ou des sols à l'étude dans 9 ml de tampon phosphate (pH 7.0). Une aliquote de 0.1 ml de chaque dilution, a été étalé sur le National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium (NBRIP) (Nautiyal, 1999), contenant par litre d'eau distillée les éléments suivants : glucose, 10g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25g; KCl, 0.2g et $(NH_4)_2SO_4$, 0.1; agar, 15 g; pH ajusté à 7.0. Comme seule source de phosphore, nous avons ajouté au milieu de culture 5g/l de PNT. Avant d'ajouter le PNT, nous l'avons lavé avec la solution Mehlich 3 pour éliminer le phosphore disponible. Le PNT ainsi lavé a été stérilisé avant d'être ajouté au milieu de culture qui est également stérile. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dilution. L'énumération des colonies bactériennes (bactéries + actinomycètes) a été effectuée après 2 à 3 jours, sur milieu NBRIP auquel nous avons ajouté de la cycloheximide à 50 µg/ml, pour inhiber la croissance des champignons. Les champignons ont été énumérés après 4 à 7 jours, toujours sur milieu NBRIP contenant de la streptomycine à 150 µg /ml stérilisée par filtration et du rose 50 µg /ml.

2.2.1.2 Isolement des MSP

Les géloses ayant servi à l'énumération, ont été utilisées pour isoler les microorganismes impliqués dans la solubilisation du PNT. Les colonies entourées de zones claires (halo de solubilisation), ont été prélevées et purifiées par épuisement sur milieux gélosés. Cette technique consiste à prélever à chaque fois une colonie et à la repiquer sur milieu gélosé, avec toujours le PNT comme seule source de phosphore, jusqu'à l'obtention de colonies pures.

2.2.2 Caractérisation des microorganismes solubilisant le phosphore

2.2.2.1 Solubilisation du phosphore

Vu que, la capacité d'un isolat à solubiliser le phosphore après plusieurs repiquage est un critère fondamental dans la sélection des microorganismes à utiliser comme inoculant, et qu'en plus, des organismes ne produisant pas d'halo de solubilisation sur milieu solide peuvent solubiliser efficacement le phosphore en milieu liquide, nous avons effectué deux tests un en milieu solide et un en milieu liquide.

2.2.2.1.1 Test de solubilisation sur milieu solide

La capacité des bactéries isolées à dissoudre le PNT a été testée selon la méthode décrite par [Nautiyal \(1999\)](#). Les microorganismes isolés, ont été étalés sur milieux solides contenant le PNT comme seule source de phosphore. Avant d'ajouter le PNT, nous l'avons lavé avec une solution de Mehlich 3 ([Mehlich, 1984](#)) pour le débarrasser de tout son phosphore soluble. Après 14 jours d'incubation à 30°C, nous avons mesuré le diamètre total (diamètre du halo + diamètre de la colonie) pour chaque colonie, en plus le diamètre de chaque colonie a été mesuré. Le diamètre du halo de solubilisation, pour chacun des isolats, a été déterminé en soustrayant le diamètre de la colonie de celui diamètre total (Halo+colonie). Au début, nous avons testé 10 colonies bactériennes par boîte de pétri, tandis que les champignons, ont été testés à 4 par boîte de pétri et incubés à 30°C pendant 2 semaines. Ce premier test a été suivi d'un second effectué avec les isolats sélectionnés à partir du premier test, mais cette fois, chaque isolat a été testé sur une boîte. Les isolats les plus performants ont été sélectionnés et testés pour leur capacité à conserver le pouvoir de solubilisation du phosphore, sur milieu solide, après 10 générations.

2.2.2.1.2 Test de solubilisation en liquide

Ce test a été effectué en deux temps. Dans un premier temps, chaque isolat (provenant de cultures jeunes sur milieu NBRIP) a été utilisé pour inoculer des Erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu NBRIP avec le PNT comme seule source de phosphore. Les milieux inoculés ont été placés sur un incubateur agitateur à 30°C, pendant 2 semaines. Ensuite, les milieux de culture ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes. Le phosphore dans le milieu de culture a été déterminé par la méthode de [Tandon et al. \(1968\)](#). Les isolats ayant solubilisé le plus de phosphore au cours de ce test et se retrouvant parmi les isolats sélectionnés au cours du test sur milieu solide ont été utilisés dans le second test en milieu liquide. Ce second test a été effectué selon la méthode de Whitelaw (2000). Dans ce test, le PNT a été stérilisé séparément avant d'être placé, à raison de 1g/l, dans des Erlenmeyers de 250 ml, contenant 50 ml de milieu NBRIP. 1 ml de suspension de la culture pure a été utilisé pour inoculer les milieux de cultures. Trois répétitions ont été faites pour chaque isolat. Les milieux autoclavés et non inoculés, ont servi de contrôles. Les milieux inoculés et les contrôles, ont été incubés sous agitation permanente à 30°C sur un incubateur agitateur à 180 rpm. Après deux semaines, le contenu de chaque Erlenmeyer a été centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes et le surnageant décanté. Le phosphore soluble du surnageant a été déterminé par la méthode colorimétrique de [Tandon et al. \(1968\)](#). La quantité de P solubilisé a été déterminée en soustrayant la quantité de P soluble du témoin de la quantité de P soluble contenu dans le surnageant des milieux inoculés avec les isolats. L'acidité titrable a été déterminée par titration volumétrique avec du NaOH 0,1N. Le pH des filtrats a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre. Le poids sec du mycélium des champignons a été déterminé après séchage à 70°C pendant une nuit, tandis que, les protéines bactériennes totales ont été déterminées par la méthode de [Lowry et al. \(1951\)](#) après hydrolyse totale des cellules bactériennes avec du NaOH 1.0 N pendant 60 minutes à 100°C. Les acides organiques ont été déterminés par la méthode de [Baziramakenga et al. \(1995\)](#). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions.

2.2.2.1.3 Solubilisation du PNT par les isolats sous stress

La capacité des isolats à solubiliser le PNT dans des conditions stressantes a été vérifiée en faisant varier le pH initial du milieu de culture de 5 à 7, la quantité de PNT dans le milieu de 2 à 8 g/l, et la température d'incubation de 30 à 45°C. Trois répétitions ont été faites pour chaque isolat. Les milieux inoculés ont été incubés sur un incubateur agitateur à 180 rotations par minutes. Les bouchons des Erlenmeyers ont été placés de

manière à permettre les échanges gazeux tout en minimisant les possibilités de contamination. Après 15 jours d'incubation, 5 ml de milieu de culture sont prélevés aseptiquement de chaque flacon. Les échantillons prélevés ont été ensuite centrifugé (10 000 rpm par minute pendant 5 minutes) et le surnageant décanté et filtré. Le P soluble du filtrat a été mesuré selon la méthode colorimétrique de [Tandon et al.\(1968\)](#). Le P solubilisé a été déterminée en soustrayant la quantité de P soluble du témoin, de la quantité de P soluble contenu dans le surnageant des milieux inoculés avec les isolats.

2.2.2.2 Production de substance favorisant la croissance des plantes

2.2.2.2.1 Production de Sidérophores

La production de sidérophores par les isolats, a été testée en milieu pauvre en fer. Le milieu utilisé est le milieu Chrome Azurol S (CAS) ([Schwyn et Neilands 1997](#)), modifié par [Milagres et al. \(1999\)](#). Le milieu modifié se prépare en mélangeant 2,7 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 10 ml de HCl 10 mM avec 65,5 mg de CAS dissout auparavant dans 50 ml d'eau bi distillée. Ce mélange, de couleur violette foncée, est ajouté très lentement avec agitation constante, à 72,8 mg de HDTMA (Hexamethylammonium bromide) dissous dans 40 ml d'eau bi distillée. La solution bleu foncée obtenue a été autoclavée à 121°C pendant 15 minutes. Un autre mélange est préparé en dissolvant 30,24 g de Pipes et 15 g d'agar dans 750 ml d'eau. Le pH de cette solution est ajusté au pKa du Pipes en ajoutant 12 g d'hydroxyde de sodium 50% (w/w). Pour faire croître les isolats, des boîtes de pétri (10 cm de diamètre) ont été préparées en versant 30 ml du milieu approprié. Après solidification, le milieu de culture a été coupé au milieu, la moitié enlevée a été remplacée par 15 ml d'Agar bleu CAS. La moitié contenant le milieu de culture, a été inoculée avec une aliquote de milieu de culture contenant la souche appropriée. L'inoculum a été placé aussi loin possible de l'intersection entre les deux milieux. Les boîtes de pétri ont été incubées à la 28°C et à l'obscurité pendant 3 semaines. La réaction avec le bleu CAS a été déterminée en mesurant la distance sur laquelle on observe un changement de couleur, sur l'agar bleu CAS, à partir de l'intersection entre les deux milieux.

2.2.2.2.2 Production d'acide cyahydrique (HCN)

La capacité des isolats pré sélectionnés à produire l'acide cyanhydrique a été vérifiée selon la méthode de [Bakker et Schippers \(1987\)](#). Ainsi, chaque isolat a été inoculé, à l'aide d'une anse, sur une boîte de pétri contenant le milieu composé de : 3 g de bouillon

tryptic soy broth (TSB, Difco), 20 g de gélose et 4,4 g de glycine par litre d'eau distillée. Ce milieu a été autoclavé à 121°C pendant 20 minutes et refroidit au bain-marie jusqu'à 50°C. Un papier filtre de 9 cm de diamètre, est déposé dans le couvercle de chaque pétri en position inverse. Ce papier est par la suite imprégné d'une solution de couleur orangée contenant 0,5% d'acide picrique et 20% de carbonate de calcium. Les boîtes de pétri sont scellées avec du papier parafilm et incubées à 28°C. Les boîtes sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les pétris dont le papier filtre a changé de couleur de l'orange au brun, indiquant la synthèse de HCN.

2.2.2.2.3 Production d'acide indole acétique (AIA)

Le milieu solide de Luria-Bertani enrichi avec du tryptophane a été utilisé (LBT, [Bric et al., \(1991\)](#)), pour identifier les souches productrices de AIA ou des substances apparentées. Ce milieu contient 10 g de tryptone (Difco), 5g d'extrait de levure, 5 g de NaCl, 1,02 g de L-tryptophane et 20 g de gélose, le tout dissout dans 1 litre d'eau distillée et stérilisé à 121°C pendant 20 minutes et refroidit au bain-marie à 50°C. Le milieu ainsi préparé est coulé dans des boîtes de pétri de 9 cm. Une membrane de nitrocellulose est déposée directement sur le milieu LBT. Les pétris ont été inoculés en déposant les isolats sur une même membrane à l'aide d'une anse à inoculer. Les pétris inoculés, ont été incubés en position inversée à 28°C, le temps nécessaire pour que les colonies atteignent un diamètre de 2 mm. Un papier Watmann No.2 de 9 cm, imprégné de 2,5 ml de solution de Salkowski composé de 2% de FeCl₃ (0,5 M) dans une solution de 35% d'acide perchlorique. La membrane de nitrocellulose dont les colonies montrent une bonne croissance, est déposée sur le papier filtre imprégné du réactif de Salkowski. Les bactéries qui synthétisent de l'AIA sont identifiées par la formation d'un halo rouge caractéristique qui cerne la colonie.

2.2.2.3 Test d'antagonisme entre les isolats

Ce test est effectué pour vérifier l'existence d'une éventuelle action inhibitrice d'un des isolats envers un ou plusieurs autres des isolats. Le milieu solide NBY (Nutrient broth yeast extract) utilisé pour ce test contient : 8g de bouillon nutritif (nutrient broth, Difco), 2g d'extrait de levure (Difco), 10 g de glucose, 2g de K₂HPO₄, 0,5 de KH₂PO₄, 0,2 g de MgSO₄.7H₂O et 20 g d'agar. Le pH de ce milieu est ajusté à 7.0.

2.2.2.3.1 Bactéries vs champignons

À l'aide d'une anse, les six bactéries ont été inoculées de manière équidistante du centre de chaque boîte de pétri. Une rondelle de 8 mm, provenant de la périphérie d'une colonie active de chacun des deux champignons, est placée au centre de chaque boîte. Chaque boîte de pétri est scellée avec une bande de papier parafilm. Nous avons fait un témoin inoculé pour chaque isolat (le témoin est inoculé uniquement par l'isolat à tester). Trois répétitions ont été faites pour chaque champignon. Les boîtes, ainsi traitées, ont été incubées à 28°C. Les résultats sont notés lorsque la croissance des isolats dans les boîtes des témoins, dépasse les points d'inoculations des autres isolats.

2.2.2.3.2 Bactéries vs bactéries

Pour tester l'antagonisme bactérie vs bactérie, nous avons préparé un milieu TSA 10%, qui a été repartit entre différentes fioles et stérilisé à 121°C pendant 15 minutes puis refroidit au bain marie à 50°C. Les bactéries ont été cultivées dans des milieux de culture TSB. Un millilitre de chacun de ses milieux de croissance, contenant les isolats, a été ajouté à 100 ml de TSA 10% avant d'être coulé dans des boîtes de pétri. Les différents milieux solides ont été inoculés massivement sur tout le diamètre de la boîte de pétri par les autres bactéries (Chaque bactérie a été testée par les cinq autres). L'absence de croissance de part et d'autre de la ligne d'inoculation indique un antagonisme entre les deux isolats bactériens. Trois répétitions et un témoin, ont été fait pour chaque isolat.

2.2.3 Essai d'inoculation des microorganismes solubilisant le P.

2.2.3.1 Inoculation des graines

2.2.3.1.1 Préparation des inoculum

Les inoculum bactériens ont été produits selon la méthode décrite par [Chabot et al. \(1993\)](#). Les 6 bactéries sélectionnées, ont été cultivées dans des fioles Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu NBRIP, sur agitateur rotatif (New Brunswick) à 100 rpm par minute à 28°C pendant 48 heures. Les cellules bactériennes ont été ensuite concentrées par centrifugation à 5000g pendant 15 minutes, lavées à trois reprises dans une solution de tampon phosphate, et suspendues dans 500 ml d'eau de robinet stérile

afin d'obtenir une concentration bactérienne de 10^{12} unités formant des colonies (ufc) par millilitre qui a été diluée pour obtenir une concentration finale de 10^6 ufc/ml.

Les champignons C1 et C13 ont été cultivés sur milieux NBRIP + PNT pendant 3 jours (C1) et 5 jours (C13). Les spores (+hyphes) ont été recueillis en versant 5 ml de milieu de culture liquide NBRIP stérile dans les différentes boîtes de pétri contenant les champignons et en les mettant en solution à l'aide d'un râteau en verre. Le mélange de spores + hyphes contenu dans les différentes solutions a été broyé dans un mélangeur culinaire. La suspension ainsi obtenue a été lavée et le mélange (spores + hyphes) suspendu dans une solution saline stérile. 1 ml de chaque solution (Spores + hyphes dans la saline de chaque champignon) a été utilisé pour faire une dilution en série de 10^{-1} à 10^{-8} . 100 μ l de chaque dilution ont été étalés sur milieu solide pour déterminer le nombre d'unités formant des colonies par dilution. Après inoculation des graines, nous avons pris 3 graines au hasard pour déterminer le nombre d'unités formant des colonies de champignons par graine.

2.2.3.1.2 *Inoculation des graines :*

2.2.3.1.2.1 Inoculation des MSP

Avant inoculation, les graines ont été stérilisées en les plaçant dans de l'alcool éthylique 70% pendant 2 min, ensuite dans de l'eau de javel pendant 15 minutes et enfin elles ont été lavées à 10 reprises par de l'eau stérile avant d'être séchées sous hotte laminaire. Nous avons inoculé les graines de blé stérilisées en trempant 200g de graines dans 100 ml de solution bactérienne ou de champignon pendant 4 heures à 28°C. Les graines inoculées ont été placées dans des sacs en plastique stériles contenant 20 ml de solution stérile de méthylcellulose 1% (poids/volume), et mélangées avec 10g de poudre de talc. Les graines ont été roulées dans ce mélange jusqu'à la formation d'une couche uniforme de talc sur les graines. Les graines ainsi traitées ont été séchées à l'air sous une hotte pendant une nuit.

2.2.3.1.2.2 Inoculation de *G. intraradices*

Nous avons inoculé les graines avec Gi en mettant directement 7 ml de la suspension contenant 1400 spores sur les 2 graines semées (700 spores/graine). Pour cela, à chaque fois qu'on doit semer des graines a inoculées par Gi, nous préparons des poquets de 2 cm

de profondeur et 10 cm de large dans lesquels nous plaçons 2 graines + 7 ml de la suspension de spores.

2.2.3.1.3 Effet de l'inoculation sur la germination des graines

Six bactéries (BR2, BR8, BR10, B3, B22 et B27) et deux champignons (C1 et C13), sélectionnés à cause de leur fort pouvoir de solubilisation du phosphate naturel de Tilemsi (PNT) ont été utilisés pour inoculer les graines de blé. Pour chaque isolat, 10 graines inoculées ont été semées sur le site d'expérimentation à 2 centimètres de profondeur et en 10 répétitions. Le traitement contrôle est constitué de graines de blé stérilisées et traitées comme les autres graines mais non inoculées. L'émergence des plantes de blé a été déterminée 5, 10, 15 et 20 jours après la semence.

2.2.3.2 Essai 1 : Effet des isolats sur la croissance, l'absorption du P et la production du blé

L'expérience au champ a été menée au cours de l'année 2000-2001 à Koygour (Diré), qui correspond au sol S3 très pauvre en phosphore. Les caractéristiques du sol du site d'expérimentation sont présentées dans le tableau 2.1. Le dispositif expérimental utilisé au cours de cet essai est un Split plot avec trois parcelles principales et neuf sous parcelles en quatre répétitions. Les traitements incluent le phosphate biammoniacal (DAP) à 30 kg de P par ha, le phosphate naturel de Tilemsi à 30 kg de P par ha et un témoin (sans source de phosphore) en parcelles principales et les microorganismes solubilisant le phosphore (BR2, BR8, BR10, B3, B22, B27, C1 C13) et un témoin en sous parcelle. La quantité d'azote que contient le DAP a été déterminée et ajoutée aux parcelles fertilisées avec le PNT et aux parcelles témoins. Le PNT et le DAP ont été ajoutés avant de semer les graines de blé. Au champ, nous avons utilisé des parcelles de 31 m de longueur et 8 m de largeur. Chaque parcelle principale est divisée en neuf sous parcelles de 2,5 m de longueur et 2m de largeur, distant de 1m. Chaque sous parcelle contient 4 rangées, sous forme de buttes espacées de 50 cm. Sur chaque rangée, 2 graines de blé ont été semées tous les 20 cm. Les deux rangées du centre ont reçu les graines enrobées de microorganismes alors que les deux rangées extérieures ont été semées avec du blé non inoculé. Le blé a été semé le 4 décembre 2001. Avant semis, les graines de blé ont été désinfectées en surface et enrobées d'une solution de 1% de méthyle cellulose contenant les cellules lavées de l'inoculum. Les plants de blé ont été démariés 2 semaines après le semis pour garder 1 plante tous les 20 cm. La fertilisation azotée a été faite en

trois étapes, 50 kg N/ha sous forme d'urée en début de tallage et de montaison et 40kg N/ha en début d'épiaison.

Le potassium a été ajouté sous forme de KCl à la dose de 80 kg/ha avant de semer. Le désherbage a été fait selon la méthode traditionnelle qui consiste à effectuer trois sarclages. Du début à la fin de l'expérience, nous avons effectué 10 irrigations à raison de 500m³/ha par irrigation. Après 30 jours de croissance, les tailles (Taille1) de trois plantes de blé, choisies aléatoirement sur les deux rangées du centre de chaque sous parcelle, ont été mesurées. Après 45 jours de croissance, les racines de 2 plantes choisies aléatoirement sur les rangées du centre de chaque sous parcelle ont été délicatement excavées des 30 premiers cm du sol et lavées. Des échantillons ont été aléatoirement prélevés des racines lavées pour la détermination du taux de colonisation des racines du blé par les champignons mycorhiziens. Les tailles et le nombre de feuilles des mêmes plantes ont été déterminés après 60 jours de croissance (taille 2) et toutes les plantes ont été fauchées, séchées et leurs poids déterminés.

2.2.3.3 Essai 2 : Effet des MSP et de *G. intraradices* sur la croissance et la production du blé

Les parcelles expérimentales ont été mises au point au cours de l'année agricole 2001-2002 à Koygour (Diré). Le loam limono-argileux utilisé a un pH de 6,7 et contient 0.17% de matière organique. Les éléments assimilables (kg/ha) déterminés par la méthode de Mehlich 3 ([Mehlich, 1984](#)) sont les suivants : P, 6.25 ; K, 240 ; Ca, 803.53 ; Mg, 217.01 ; Fe, 42,68 ; et Al, 254.55. Le dispositif expérimental utilisé au cours de cet essai est un split split plot. Les parcelles principales sont fertilisées avec le PNT ou le phosphate biammoniacal (DAP) appliqué à 30 kg P/ha et un contrôle non fertilisé, arrangés en blocs complets aléatoires. Le supplément d'azote, apporté aux parcelles fertilisées avec le DAP, a été calculé et ajouté à tous les autres traitements. Les sous parcelles ont été inoculées ou non avec le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*. Les sous sous parcelles incluent les traitements avec les microorganismes solubilisant le PNT (MSP) : *Pseudomonas* sp. (BR2), *Aspergillus amowari nakazawa* (C1), *Penicillium chrysogenum thom* (C13), BR2+C1, BR2+C13, et un contrôle non inoculé. Au champ, nous avons utilisé des parcelles principales (Fertilisation avec PNT ou DAP) de 15 m de longueur et 5 m de largeur. Chaque parcelle est divisée en deux sous parcelles (Inoculation ou non avec Gi) de 15 m de longueur et 2m de largeur distant de 1m. Chaque sous parcelle a été divisé en six sous sous parcelles de 2 m de large et 2m de long séparées par 60 cm et contenant 4 rangées espacées de 50 cm. Sur chaque rang 2 graines de blé ont été semées tous les 20 cm. Les deux rangées du centre reçoivent les graines enrobées de microorganismes alors que les deux rangées extérieures ont été semées avec du blé non

inoculé. Pour tous les traitements nous avons 4 répétitions. Avant semis, les graines de blé ont été désinfectées en surface et enrobées d'une solution de 1% de méthyle cellulose contenant les cellules lavées de l'inoculum, tel que décrit par [Chabot et al. \(1993\)](#). Le blé a été semé le 20 novembre 2001. Les plants de blé ont été démariés 2 semaines après le semis pour garder 1 pied tous les 20 cm. L'azote a été ajouté sous forme d'urée comme suit : deux applications de 50 kg N/ha au début du tallage et en début de montaison, et une dernière application de 40 kg N/ha en début d'épiaison. Les stades de croissance ont été déterminés à partir du graphique de [Large \(1954\)](#). Toutes les parcelles ont reçu 80 kg K/ha sous forme de KCl. Le désherbage a été fait selon la méthode traditionnelle qui consiste à effectuer trois sarclages. Du début à la fin de l'expérience, nous avons effectué 10 irrigations (à raison d'à peu près 500m³ d'eau/ha par irrigation).

Après 30 jours de croissance, les tailles (Taille1) de trois plantes de blé, choisies aléatoirement sur les deux rangées du centre de chaque sous parcelle, ont été mesurées. Les tailles et le nombre de feuilles des mêmes plantes ont été déterminés après 60 jours de croissance (taille 2). Après 45 jours de croissance, les racines de 2 plantes choisies aléatoirement sur les rangées du centre de chaque sous parcelle ont été délicatement excavées des 30 premiers cm du sol et lavées. Des échantillons ont été aléatoirement prélevés des racines lavées pour la détermination du taux de colonisation des racines du blé par les champignons mycorhiziens. A maturité (Après 88 jours de croissance), toutes les plantes ont été fauchées, séchées et leur poids déterminé.

2.2.3.4 Essai 3 : Effet de la bactérie *Pseudomonas sp.* (BR2) sur le nombre, la composition des microorganismes rhizosphériques et la colonisation des racines.

*2.2.3.4.1 Isolement et inoculation de *Pseudomonas sp.*, résistant à la rifampicine (BR2rif⁺)*

La bactérie solubilisant le phosphore *Pseudomonas sp.* (BR2) a été isolée de la rhizosphère du blé du Mali. Des souches de *Pseudomonas sp.* qui résistent spontanément à la Rifampicine (BR2rif⁺) ont été isolées sur milieu TSA solide contenant 100 µg de rifampicine (provenant de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)/ml en étalant 100µl de milieu de culture vieille de 24heures, contenant la bactérie *Pseudomonas sp.*. La solution de rifampicine a été préparée en dissolvant 0,20 g de rifampicine dans 10 ml d'alcool 70%. Avant d'ajouter la solution de rifampicine au milieu de culture, elle a été stérilisée par filtration. Des milieux solides contenant des concentrations de rifampicine variant entre 50 et 200 µg/ml ont été préparées et inoculés pour l'isolement. Nous avons utilisé cette technique car selon [Kluepfel \(1993\)](#) elle est simple, rapide, sensitive, non

coûteuse et a été utilisée avec succès avec plusieurs échantillons venant d'environnements variés. Les bactéries, BR2rif⁺, montrant des croissances et une activité de solubilisation comparables aux souches mères, sur milieu solide et en milieu liquide NBRIP avec le PNT comme source de P, contenant 100 µg de rifampicine et maintenant cette résistance à la rifampicine après plusieurs sous cultures ont été utilisées dans cette expérience. L'inoculation des graines de blé a été faite comme décrite à la section 2.2.3.1.2

2.2.3.4.2 Colonisation des racines de blé par *Pseudomonas sp.* BR2rif⁺

Des graines, traitées avec des concentrations de BR2rif⁺ allant de $1,2 \times 10^3$ à $2,4 \times 10^8$ cfu/graine, ont été semées dans un sol non stérile ou dans un sol autoclavé (1 heure à 121°C pendant 2 jours consécutifs) dans un essai en tubes sable-sol ([Scher et al., 1984](#)). Le sable, les graines et les tubes ont été stérilisés dans l'essai en sol stérile. Les tubes ont été incubés à 30°C pendant 30 jours et les densités de BR2rif⁺ ont été déterminées sur milieux solides contenant de la rifampicine à 100µg/ml.

2.2.3.4.3 Répartition des microorganismes rhizosphériques et colonisation des racines de blé par les champignons mycorhiziens

L'expérience a été faite selon la méthode standard en tubes ([Scher et al., 1984](#)) avec deux blocs constitués des traitements de fertilisation : fertilisé (+ PNT) et non fertilisé (Sol uniquement = contrôle) et quatre traitements d'inoculations : *Pseudomonas sp.* rif⁺ (BR2rif⁺), *Glomus intraradices* (Gi), BR2rif⁺ + Gi et un contrôle non inoculé. Nous avons effectué six répétitions pour chaque traitement. Les blocs combinés aux traitements ont donné 12 unités expérimentales dans lesquelles les traitements ont été aléatoirement répartis.

2.2.4 Analyse des plantes et des données

2.2.4.1 Colonisation des racines par les champignons mycorhiziens

La colonisation des racines par les mycorhizes indigènes et introduites a été estimée par observation microscopique de segments de racines de 1cm de long, colorés selon la méthode de ([Vierheilig et al., 1998](#)). Les racines ont été coupées en segments de 1 cm de long, qu'on a fait bouillir dans du KOH à 10% pendant 3 minutes et rincés à plusieurs reprises avec l'eau du robinet. Les segments ainsi éclaircis ont été bouillis pendant 3

minutes dans une solution ancre-vinaigre à 5%, préparé avec du vinaigre pur (contenant 5% d'acide acétique). Les racines ont été décolorées par rinçage pendant 20 mn dans l'eau du robinet acidifié par ajout de quelques gouttes de vinaigre. 10 segments, sélectionnés aléatoirement par traitement, ont été placés les uns parallèlement aux autres, sur une lame de microscope et le pourcentage de segments colonisés par les mycorhizes déterminé au microscope à $\times 100$ (Bierman et Linderman, 1981). Une section de segment est considérée comme infectée lorsque des hyphes, des vésicules ou des arbuscules sont observés.

2.2.4.2 Analyse des tissus végétaux

Les contenus en phosphore des matières sèches végétales (paille et graines) du blé ont été déterminés, après digestion des tissus végétaux avec 5 ml d' HClO_4 et 5 ml de HNO_3 , par colorimétrie selon la méthode du vanado-molybdate ([Tandon et al., 1968](#)), tandis que les autres éléments minéraux ont été déterminés par spectrophotomètre d'absorption atomique ([Gaines et Mitchell, 1979](#)).

2.2.4.3 Analyses statistiques des données

L'homogénéité des variances a été testée pour toutes les variables en utilisant le test de Bartlett ([Steel and Torrie, 1980](#)). Les traitements avec des moyennes non homogènes ont subi une transformation avant analyse. Ainsi, les populations de microorganismes (Nombre d'unité de microorganismes formant des colonies) des sols et de la rhizosphère ont subi une transformation logarithmique $\log(\text{ufc})$, parce que nous avons observé que l'écart type augmente proportionnellement à la moyenne. Les valeurs exprimant le pourcentage de la longueur des racines colonisée ont subi une transformation racine carrée, parce que ces données suivent la distribution de Poisson. Les valeurs nulles ont été utilisées dans les analyses ([Kloepper et Beauchamp, 1992](#)), parce qu'aucune bactérie *Pseudomonas* sp. résistante (BR2rif⁺) à la rifampicine n'a été détectée chez les plantes non inoculées. Les populations de BR2rif⁺ $\log(\text{ufc}+1)$ ont été présentée pour donner une tendance, puisque les variations entre les traitements étaient très larges pour valider le test de Bartlett. Les effets des traitements (microorganismes et sources de phosphore) ont été comparés par analyse de la variance. Le logiciel [SAS](#) (Statistical Analysis System Institute, inc., 1985) avec le programme GLM (General Linear Model) a été utilisé pour augmenter la précision des procédures de l'ANOVA. Chaque fois que le F calculé était significatif, le test de la plus petite différence significative (LSD) protégé de Fisher, a été utilisé pour comparer les moyennes pour cette expérience.

3

Chapitre 3 : Résultats et discussions

3.1 Résultats

3.1.1 Isolement et caractérisation des microorganismes solubilisant le phosphore

3.1.1.1 Dénombrement et isolement des microorganismes totaux et solubilisant le PNT

Les MSP du sol et de la rhizosphère du blé ont été isolés à partir de quatre types de sols et de cultivars de blé provenant du Mali. Les caractéristiques physico-chimiques des sols utilisés sont présentées dans le Tableau 1. Le test de Bartlett a été utilisé pour vérifier l'homogénéité de la variance des résultats obtenus. Ce test s'étant révélé significatif, nous avons procédé à la transformation logarithmique des données avant d'effectuer l'analyse de la variance sur les données transformées.

Tableau 1 : Quelques caractéristiques des échantillons de sol utilisés pour l'isolement des microorganismes dissolvant le phosphate naturel de Tilemsi.

Sol n°	Endroit	Texture	pH	Matière organique (%)	Éléments assimilables (kg/ha)					
					P	K	Ca	Mg	Fe	Al
S	Tilemsi	loam sablo-argileux	5,84	0,16	991,2	108,19	6673,85	527,74	159,48	0
S1	Tilemsi	loam sablo-argileux	5,89	0,1	918,3	114,9	4250,4	561,12	152,54	0
S2	Tilemsi	loam sableux	5,91	0,08	922,2	93,18	4148,92	502,21	153,44	0
S3	Koygour	loam limono-argileux	6,37	0,17	6,27	240	803,53	217,01	42,68	254,55

3.1.1.1.1 Microorganismes totaux et solubilisant le phosphore des sols étudiés

Les microorganismes (bactéries + champignons) solubilisant le PNT, ont été trouvés dans tous les sols utilisés de cet essai Tableau 2.

Tableau 2 : Importance des microorganismes solubilisant le phosphate naturel de Tilemsi dans les échantillons de sol à l'étude.

Échantillon no	microflore totale (ufc.g ⁻¹ x10 ⁶)	MSP** (ufc.g ⁻¹ x10 ⁵)	% de la microflore totale
S	4,31	6,89	15,98
S1	3,55	2,64	7,44
S2	4,40	3,84	8,73
S3	1,94	5,90	30,50

Note : La microflore totale est la somme des ufc comptées sur les milieux TSA 0,1× (bactéries) et RBM (Champignons). Les MSP ont été dénombrés sur milieux NBRIP avec PNT comme seule source de phosphore. Les résultats correspondent aux moyennes de trois répétitions

* ufc.g⁻¹, unités formant des colonies par gramme de sol sec.

** Microorganismes solubilisant le phosphate naturel de Tilemsi.

L'analyse de la variance effectuée sur les valeurs transformées des différentes variables a donné les résultats présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Analyse de la variance pour les microorganismes totaux et solubilisant le phosphore des différents sols.

Sources de variation	Moyenne des carrés						
	dl	Microorganismes	MSP	Bactéries	BSP	Champignons	CSP
Sols	2	0,08*	0,06**	0,09*	0,06*	2,4***	0,7***
Répétitions	2	0,0005	0,04	0,04	0,004	0,006	0,009*
Erreur	4	0,009	0,05	0,006	0,005	0,007	0

MSP : microorganismes solubilisant le phosphore

BSP : Bactéries solubilisant le phosphore

CSP : Champignons solubilisant le phosphore

* ** *** Significatifs aux seuils de 0,05, 0,01 et 0,00 respectivement

Ces résultats indiquent qu'il y a une différence globale dans le contenu en microorganismes totaux (MT) et solubilisant le P (MSP) des différents sols (Tableau 3). Le test du LSD protégé de Fisher nous a permis de diviser les sols en deux groupes homogènes quant à leur contenu en microorganismes solubilisant le phosphore (Tableau 4). Les sols du même groupe ne diffèrent pas entre eux, mais leur contenu en MSP diffère de celui des sols des autres groupes. En accord avec les résultats ci-haut mentionnés, nous pouvons déduire que les sols S, S1 et S2 semblent avoir les mêmes populations microbiennes (en quantité), mais contiennent moins de microorganismes solubilisant le phosphore que le sol S3. Nous pouvons déduire de ces observations que le contenu en microorganismes solubilant le P d'un sol ne dépend pas toujours de son contenu en microorganismes totaux.

Tableau 4 : Populations de microorganismes totaux et solubilant le phosphore dans les échantillons de sol à l'étude.

Échantillon no	microflore totale Log(ufc ^α)/g de sol	MSP ^β Log(ufc)/g de sol
S	6,62 a	5,83 a
S1	6,55 a	5,41 c
S2	6,64 a	5,58 b
S3	6,28 b	5,76 a
Test de F	*	**

^α Unités formant des colonies par gramme de sol sec.

^β Microorganismes solubilant le phosphore

* ** Significatifs aux seuils de probabilité de 0.05 et 0.01 respectivement

3.1.1.1.2 Bactéries et champignons totaux et solubilant le phosphore des sols étudiés

Le Tableau 5, donne la composition quantitative des populations bactériennes totales et solubilant le phosphore des différents sols à l'étude.

Tableau 5 : Importance des bactéries solubilisant le PNT dans la population microbienne et la population bactérienne totale des échantillons de sol à l'étude.

Échantillon no	Bactéries totales (ufc.g ⁻¹ x10 ⁶)	BSP (ufc.g ⁻¹ x10 ⁵)	% de la population bactérienne totale
S	3,9	6,86	17,6
S1	3,46	2,6	7,52
S2	4,22	3,77	8,93
S3	1,93	5,84	30,26

Ufc : Unité formant des colonies.

BSP : Bactéries solubilisant le phosphore

L'analyse de la variance a montré des différences significatives quand au contenu des sols en bactéries totales et solubilisant le P (Tableau 2). Le test du LSD protégé de Fisher nous a permis d'affiner cette conclusion. En accord avec les résultats de ce test, nous avons divisé les sols en trois groupes homogènes quant au contenu en bactéries solubilisant le P (Tableau 6). Ainsi, malgré que les sols n'ont pas la quantité totale de bactéries, ils diffèrent significativement du sol S3 quant à leur contenu en bactéries solubilisant le P (BSP). Le sol S3 une fois de plus a le plus fort nombre de BSP et ce, malgré qu'il ait le plus bas nombre de bactéries totales. Dans le sol S3 on retrouve le plus de matière organique (Tableau 1) pouvant supporter la croissance des BSP, ce qui peut expliquer le fait que c'est dans ce sol qu'on retrouve le plus de BSP.

Tableau 6 : Importance des bactéries solubilisant le PNT dans la population bactérienne totale des échantillons de sol à l'étude.

Échantillon	Populations bactériennes totales Log(ufc)/g de sol	Populations de BSP ^a Log(ufc)/g de sol
S	6,51a	5,58 b
S1	6,53 a	5,41 c
S2	6,63 a	5,57 b
S3	6,26 b	5,76 a
Test de F	*	**

^a Bactéries solubilisant le phosphate naturel de Tilemsi.

** Significatifs aux seuils de probabilité de 0.00, selon le test de fisher.

Les populations de champignons totaux et solubilisant le phosphore sont consignées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Importance des champignons solubilisant le phosphore dans les sols étudiés.

Échantillons de sol	Champignons totaux (ufc.g ⁻¹ x10 ⁵)	CSP* (ufc.g ⁻¹ x10 ³)	% des champignons totaux
S	4,14	33,3	7,8
S1	0,93	4,17	4,48
S2	1,77	6,67	3,77
S3	0,37	0,57	1,54

CSP : Champignons solubilisant le phosphate naturel de Tilemsi

L'analyse de la variance a montré des différences significatives quand au contenu des sols en champignons totaux et solubilisant le P (Tableau 2). Le test du LSD protégé de Fisher a permis de confirmer que les quatre sols sont totalement différents quant à leurs contenus en champignons totaux et solubilisant le phosphore (Tableau 8). Cependant, contrairement aux observations précédentes, le sol S3 contient la plus basse population de champignons totaux et solubilisant le phosphore.

Le sol S3 contient plus de BSP que de CSP, mais, c'est dans ce sol qu'on retrouve la plus faible quantité de P assimilable, montrant, ainsi, l'importance des champignons dans la solubilisation du PNT. En plus, une corrélation positive significative ($r = 0,79$ ***) a été observée entre le nombre de champignons solubilisant le PNT et le niveau de P assimilable dans les sols et, entre le nombre total de champignons et le niveau de P assimilable ($r = 0,69$ ***). De même, après transformation logarithmique des données, nous avons observé de fortes corrélations positives entre les CSP ($r = 0,92$ ***) et les champignons totaux ($r = 0,83$ ***) avec les valeurs du P assimilable, indiquant que dans ces sols les champignons sont plus efficaces dans la solubilisation du PNT que les bactéries. En effet la figure 1, montre que plus il y a de champignons, plus le pH du sol est bas et plus il y a de P solubilisé.

Tableau 8 : Importance des champignons solubilisant le phosphate naturel de Tilemsi dans la microflore totale et dans la population totale de champignons des sols à étudier.

Échantillon no	Champignons totaux Log(ufc)/g de sol	CSP ^a Log(ufc)/g de sol
S	5,61 a	5,61 a
S1	4,94 c	4,94 c
S2	5,25 b	5,25 b
S3	3,55 d	3,55 d
Test F	***	***

^a Champignons solubilisant le phosphate naturel de Tilemsi.

*** Significatif au seuil de probabilité de 0.00

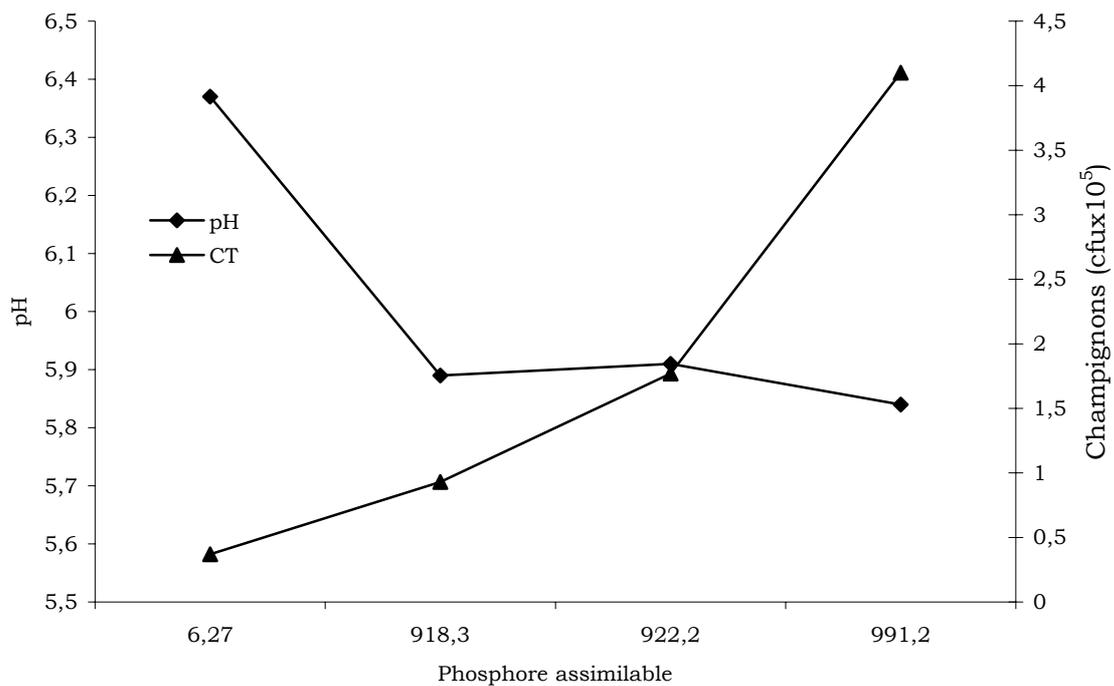


Figure 1 : Relations entre le phosphore assimilable, le pH et les champignons totaux des sols.

3.1.1.2 Microorganismes totaux et solubilisant le P de la rhizosphère du blé

Les résultats de l'isolement des microorganismes, consignés dans le tableau 9, indiquent des variations dans les populations de microorganismes solubilisant le phosphore, allant de $2,38 \times 10^6$ ufc pour Hindi tosson à $3,50 \times 10^6$ ufc/gramme de sol rhizosphérique pour Alkama béri (tableau 9).

Tableau 9 : Importance des microorganismes solubilisant le PNT (MSP) dans la rhizosphère de différents cultivars de blé du Mali.

Variétés de blé	Microflore totale	MSP	% microflore totale
	(ufc.g ⁻¹ x10 ⁶)	(ufc.g ⁻¹ x10 ⁶)	
Alkama béri	29,95	3,499	11,68
Hindi tosson	32,03	2,384	7,44
Tétra	36,07	3,397	9,42

MSP : Microorganismes solubilisant le phosphore

L'analyse de la variance des données transformées a montré que les trois cultivars de blé contiennent selon toute vraisemblance des quantités différentes de microorganismes solubilisant le phosphore, mais qu'ils ne diffèrent pas significativement quant à leur contenu en microorganismes totaux. Cependant, en tenant compte de la zone d'isolement (rhizosphère, rhizoplan et sol non rhizosphérique), Les différents cultivars apparaissent différents quant aux populations de microorganismes totaux et solubilisant le phosphore (Tableau 10).

Tableau 10 : Analyses de la variation pour les microorganismes rhizosphériques totaux et solubilisant le phosphore

Sources de variation	dl	Microorganismes totaux	Microorganismes solubilisant le phosphore
Cultivars	2	0,01 ns	0,3 **
Répétitions	2	0,02 ns	0,02 ns
Erreur 1	4	0,03	0,01
Zone	2	15,8 ***	16,7 ***
Zone*cultivars	4	0,04 ns	0,2 ***
Erreur 2	12	0,04	0,02

Zone : lieu d'isolement (rhizosphère, rhizoplan ou sol non rhizosphérique)

Le test du LSD protégé de Fisher a été utilisé pour affiner les conclusions de cette analyse. Ce test a permis de répartir les cultivars en deux groupes en se référant au contenu en microorganismes rhizosphériques solubilisant le phosphore (Tableau 11). La plus forte population de microorganismes rhizosphériques solubilisant le P a été trouvée dans la rhizosphère de tétra, tandis que, les populations de MSP des deux autres cultivars ne diffèrent pas significativement (Tableau 11).

Tableau 11 : Microorganismes rhizosphériques solubilisant le phosphore (MSP)

Variétés de blé	Microflore totale log(ufc)/système racinaire	MSP log(ufc)/système racinaire
Alkama béri	16,6 a	14,2 b
Hindi tosson	16,5 a	13,7 b
Tétra	16,4 a	14,2 a
Test de F	ns	***

Note : La microflore totale est la somme des ufc comptées sur les milieux TSA 0,1× (bactéries) et RBM (Champignons). Les MSP ont été dénombrés sur milieux NBRIP avec PNT comme seule source de P. Les résultats correspondent aux moyennes de trois répétitions.

ns : Non significatif au seuil de 0,05

*** Significatif au seuil de probabilité de 0,00, selon le test de Fisher.

La comparaison des données dans le tableau 12 prévoit un avenir intéressant pour Tétrà et Alkama béri avec un pourcentage d'incidence pour les MSP supérieur à celui dans le sol non rhizosphérique. Tétrà et Alkama béri semblent exercer un effet stimulateur sur les MSP au niveau du rhizoplan et de la rhizosphère. Hindi tosson, quand à lui semble avoir un effet moins prononcé sur les MSP au niveau de la rhizosphère. L'incidence des BSP et celui des CSP dans la rhizosphère des cultivars de blé étudiés, présenté dans le tableau 2.6, montre une grande différence entre les cultivars testés. Au niveau de la rhizosphère, Alkama béri a le plus fort pourcentage de BSP (12,01% des bactéries totales), tandis que, Tétrà a le plus fort pourcentage de CSP (40% par rapport au champignons totaux). Cependant, malgré la différence observée entre eux, les trois cultivars de blé de cette étude ont montré un effet stimulateur des MSP au niveau du rhizoplan, comparativement au sol non rhizosphérique et à la rhizosphère.

Tableau 12 : Incidence des microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) dans le rhizoplan, la rhizosphère et le sol non rhizosphérique de différents cultivars de blé du Mali ^a.

Variétés de blé	Rhizoplan	Rhizosphère	Sol non rhizosphérique
Alkama béri	41,67	11,68	4,5
Hindi tosson	6,9	7,44	6,4
Tétrà	18,59	9,42	6,61

^a Pourcentages calculés à partir des données non transformées.

Malgré le fait que les pourcentages d'incidence des MSP dans la rhizosphère de tétra et de Alkama béri soient différents, la population de MSP dans la rhizosphère d'alkama béri $3,49 \times 10^6$ ufc.g⁻¹ de sol rhizosphérique est presque égale en valeur absolue à celle de tétra $3,40 \times 10^6$ ufc.g⁻¹ de sol rhizosphérique (Tableau 13). La population de MSP dans la rhizosphère de toutes les variétés de blé testées étaient supérieures à celle du sol non rhizosphérique.

Tableau 13 : Population de microorganismes solubilisant le phosphore dans la rhizosphère de différents cultivars de blé du Mali, et dans le sol non rhizosphérique*.

Variétés de blé	Sol rhizosphérique	Sol non rhizosphérique
Alkama béri	3,49 ± 1,3	0,12 ± 0,05
Hindi tosson	2,38 ± 0,2	0,13 ± 0,04
Tétra	3,37 ± 1	0,16 ± 0,03

* Millions par gramme de sol rhizosphérique sec.

3.1.1.3 Caractérisation des isolats

3.1.1.3.1 Solubilisation du phosphore sur milieu solide

A partir des milieux d'isolement, 44 bactéries et 18 champignons ont été retenus en premier pour leur grande activité de solubilisation du PNT. Après plusieurs repiquages sur milieu solide (tableau 14) et liquide contenant le PNT comme seule source de phosphore, nous avons retenus les microorganismes les plus performants. Ainsi, le nombre de microorganismes solubilisant efficacement le PNT a été réduit à 6 bactéries et 2 champignons.

Selon les données du Tableau 14, les champignons semblent être plus efficaces que les bactéries dans la solubilisation du PNT. Le champignon, C1 avec un halo de solubilisation de 17 mm, semble solubiliser plus efficacement le PNT comparé aux autres isolats testés. La bactérie B27 avec un halo de 5 mm, a été la plus efficace des bactéries sur milieu solide, tandis qu'aucun halo n'a été observé autour des bactéries BR2 et B3 qui, auparavant, avaient été isolées sur cette base.

Tableau 14 : Solubilisation du phosphate naturel de Tilemsi par les isolats retenus sur milieu solide*.

Isolats	Agar (diamètre du halo (mm))	Diamètre colonie (mm)**
Bactéries		
BR2	Néant	3,1
BR8	3	5,94
BR10	4	5,99
B3	Néant	3,8
B22	2	3,82
B27	5	6,92
Champignons		
C1	17	42,15
C13	12	22,32

* Les valeurs sont les moyennes de trois répétitions.

** Diamètre des colonies incluant le halo de solubilisation.

La conservation du pouvoir de solubilisation du phosphore, par un isolat, est un critère essentiel dont il faut tenir compte en choisissant un organisme à utiliser comme inoculant. Ainsi, Nous avons inoculé les isolats retenus sur milieux solides NBRIP contenant de l'alizarine rouge comme indicateur de la production d'acide. Nous avons effectué 20 répétitions pour chaque isolat et à chaque génération, nous avons vérifié la croissance et la production d'acide sur 10 générations pour chaque isolat. La bactéries BR2 (en milieu liquide) et les champignons C1 et C13 (sur milieu solide) ont été très stables dans la production d'acide sur les 10 générations comme nous pouvons le constaté dans le Tableau 15. La bactérie BR2, vue qu'elle ne produit pas de halo sur milieu solide avec le PNT, a été en plus testée en milieu liquide et elle s'est montrée très stable, en ce qui a trait à son pouvoir de solubilisation du P après 10 inoculations successives.

Tableau 15 : Stabilité de BR2, C1 et C13 sur 10 générations telle que mesurée par leur croissance et leur production d'acide sur milieu solide NBRIP*.

Diamètre		Repiquages									
Isolats	(mm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BR2	Colonie	3,31	3,33	3,32	3,31	3,32	3,31	3,31	3,31	3,31	3,31
	Halo**	3,32	3,32	3,31	3,32	3,32	3,31	3,32	3,31	3,31	3,31
C1	Colonie	25,06	25	25,05	25,06	25,05	25,04	25,04	25,04	25,03	25,04
	Halo	42,24	42,24	42,25	42,23	42,24	42,19	42,25	42,24	42,22	42,25
C13	Colonie	10,13	10,13	10,12	10,12	10,13	10,12	10,11	10,11	10,12	10,12
	Halo	22,12	22,13	22,24	22,14	22,33	22,34	22,23	22,31	22,33	22,32

* Chaque valeur représente la moyenne de 20 répétitions.

** Halo incluant la colonie

Solubilisation du PNT en milieu liquide

L'analyse de la variance (Tableau 16), montre qu'il y a une différence d'efficacité entre les isolats quant à leur capacité à solubiliser le P, à baisser du pH du milieu de culture et à produire des acides organiques.

Tableau 16 : Résumé des analyses de variances pour l'acidité titrable, le pH et le P solubilisé par les isolats testés, après 14 jours d'incubation.

Sources de variation	Moyennes des carrées			
	dl	P solubilisé	pH du milieu	Acidité titrable
Répétitions	2	0,00004 ns	0,0007 ns	0,0001 ns
Isolats	7	3,19 ***	2,7 ***	1,5 ***
Erreur	14	0,004	0,009	0,004

ns : Non significatif au seuil de probabilité de 0.05

***** Significatif au seuil de probabilité de 0.00

La quantité de P solubilisé par les isolats, les changements dans le pH, l'acidité titrable du milieu de culture, la concentration en protéines bactériennes et le poids sec du mycélium des champignons, sont présentés dans le Tableau 17. Ces données indiquent que malgré qu'aucun halo de solubilisation n'ait été observé autour des colonies de BR2 et de B3 sur milieu solide, ces deux bactéries ont pu solubiliser le PNT en milieu liquide. BR2 a même solubilisé plus de phosphore que toutes les autres bactéries.

Tableau 17 : Solubilisation du PNT, dans le milieu NBRIP liquide, par les isolats retenus*.

Isolats	Log (P solubilisé ^α)	pH ^β	Acidité titrable (meq/50 ml)	Concentration en protéines (μg/ml)
Bactéries				
BR2	4,5 c	4,2 e	2,08 d	88 ± 2
BR8	3,3 e	4,97 c	2,19 c	60 ± 1,7
BR10	3,5 d	4,67 d	2,08 d	66 ± 3
B3	3,0 f	5,24 b	1,32 f	53 ± 2
B22	3,4 d	4,59 d	1,76 e	62 ± 2,7
B27	2,9 f	5,62 a	1,4 f	47 ± 2,7
Champignons				Poids sec mycélium (mg/50ml)
C1	5,7 a	2,62 f	3,53 a	272 ± 2,6
C13	5,2 b	3,64 g	2,58 b	209 ± 1
Test de F	***	***	***	

^α Quantité de P solubilisé après 14 jours d'incubations. Les valeurs originales ont subies une transformation logarithmique et chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions

^β pH du milieu de culture après 14 jours de croissance.

*** Significatif au seuil de 0.00. .

Dans la même colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 0.05, selon le test de Fisher.

La quantité maximale de P solubilisé et le temps nécessaire pour solubiliser le maximum de P, varient en fonction des isolats. Les quantités de P solubilisé par les bactéries varient entre 19 à 90 mg P/ml. Mis à part la bactérie BR2, toutes les autres bactéries atteignent leur efficacité maximale après 7 jours d'incubation (figure 2). La bactérie BR2 qui apparaît la plus efficace solubilise 90 mg P/ml en 15 jours. Le champignon C1 a solubilisé la plus grande quantité de P (296 mg P/ml \pm 2,6) en seulement 5 jours, il est suivi de C13 (174 mg P/ml \pm 1) en 7 jours (figure 3).

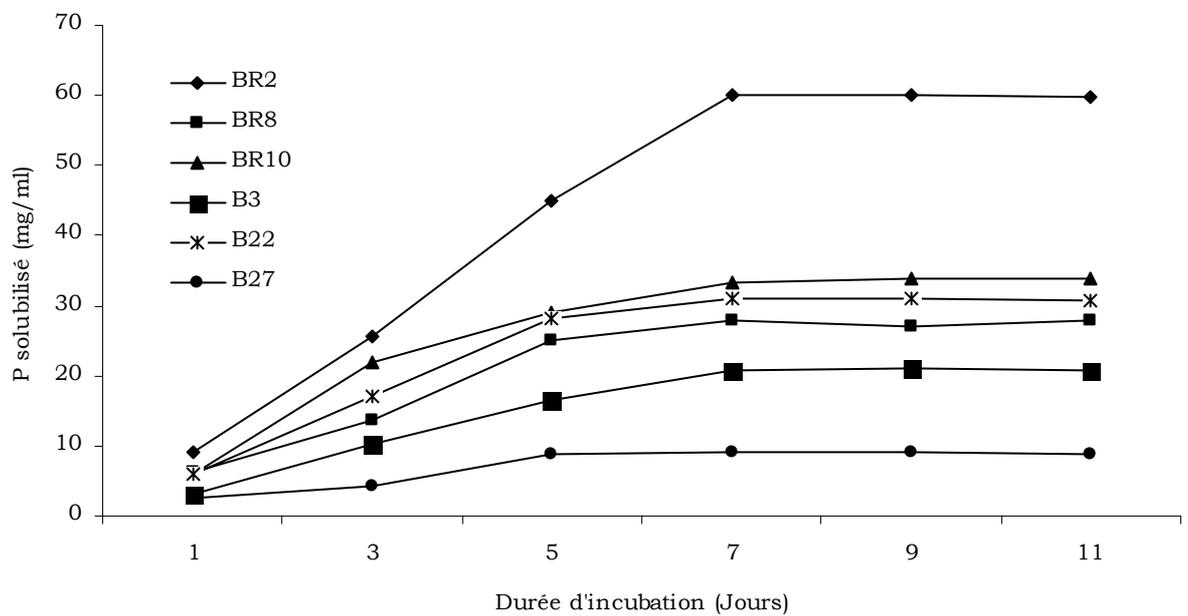


Figure 2 : Quantité de phosphore solubilisé par les bactéries en fonction de la durée d'incubation

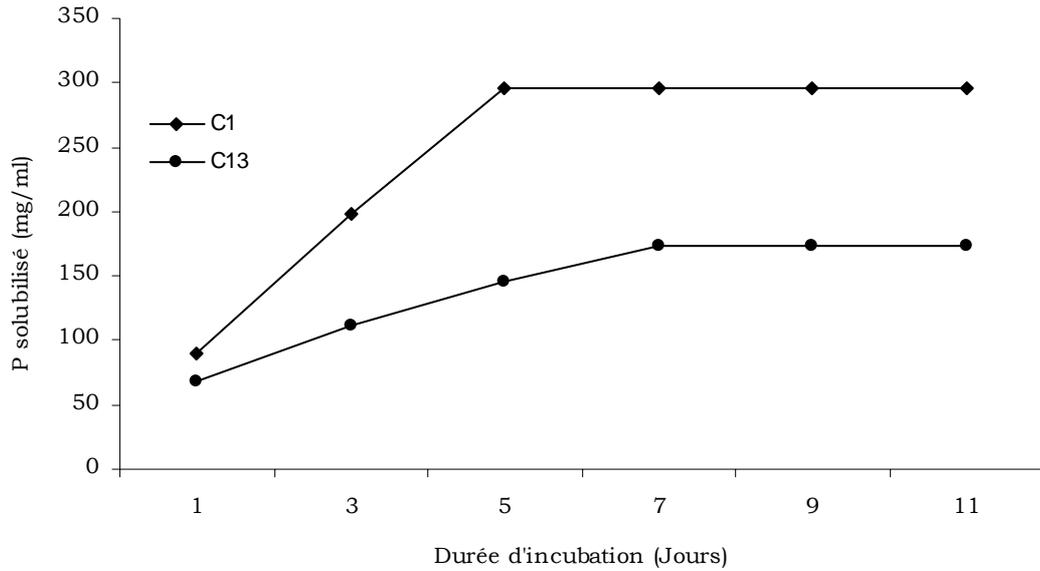


Figure 3 : Quantité de phosphore solubilisé par les champignons en fonction de la durée d'incubation

La solubilisation du PNT est généralement accompagnée d'une croissance importante de l'isolat présent (tableau 17) dans le milieu et d'une production d'un ou d'un mélange de plusieurs acides organiques dont les qualités et les quantités varient selon l'isolat présent. Cependant, l'acide gluconique, l'acide oxalique et l'acide citrique sont produits par la majorité des isolats. L'acide citrique et l'acide gluconique, les plus performant dans la solubilisation du PNT, sont produits en plus grande quantité par les isolats C1, C13 et BR2. Une corrélation positive significative ($r = 0,9^{***}$) a été observée entre la production d'acide citrique et la quantité de P solubilisé dans les milieux de culture (Figure 4).

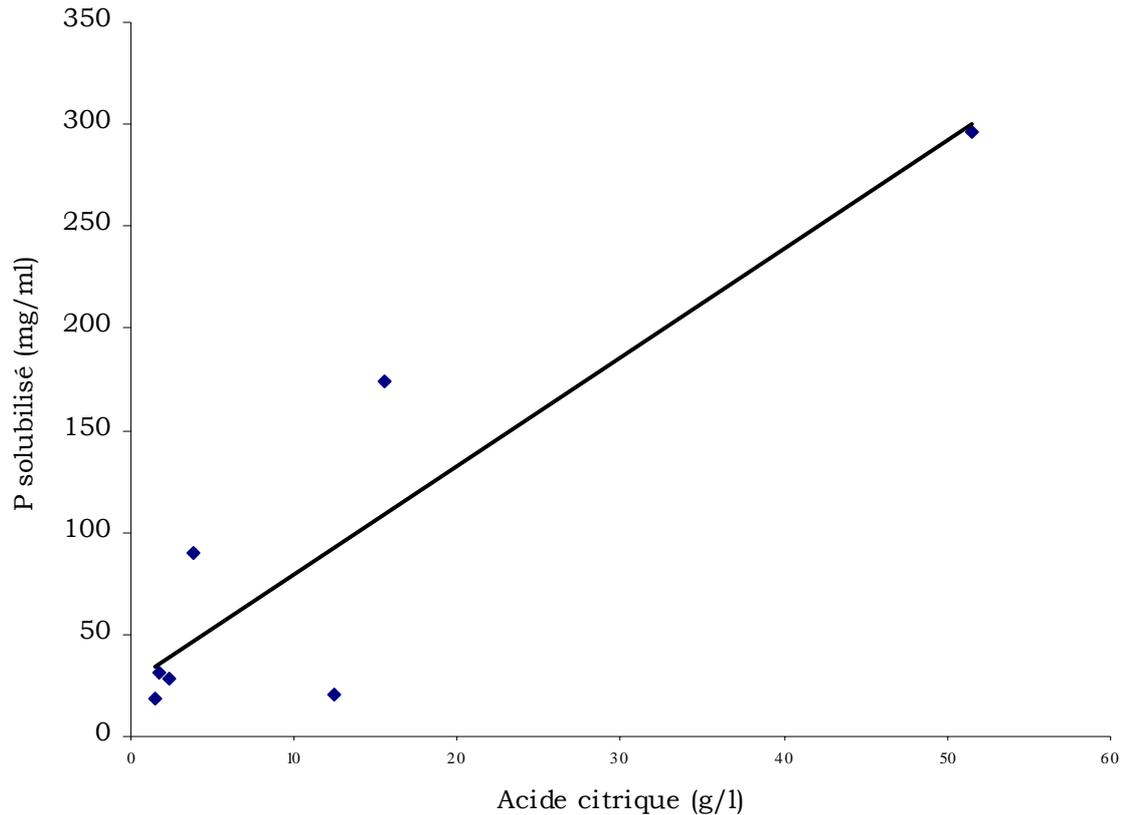


Figure 4 : Relation entre la production d'acide citrique et la solubilisation du P du phosphate naturel de Tilemsi.

La Figure 5, montre les relations entre la quantité d'acide citrique produite, la baisse du pH et la solubilisation du P du PNT. Il apparaît que plus il y a production d'acide citrique, plus le pH du milieu baisse et plus il y a de P en solution dans le milieu. En plus, la bactérie BR2 et les champignons C1 et C13 qui ont produit les plus fortes quantités d'acide citrique ont aussi solubilisé le plus de P. Dans cette expérience, nous avons observé la production d'acide gluconique, mais en quantité moins importante que l'acide citrique.

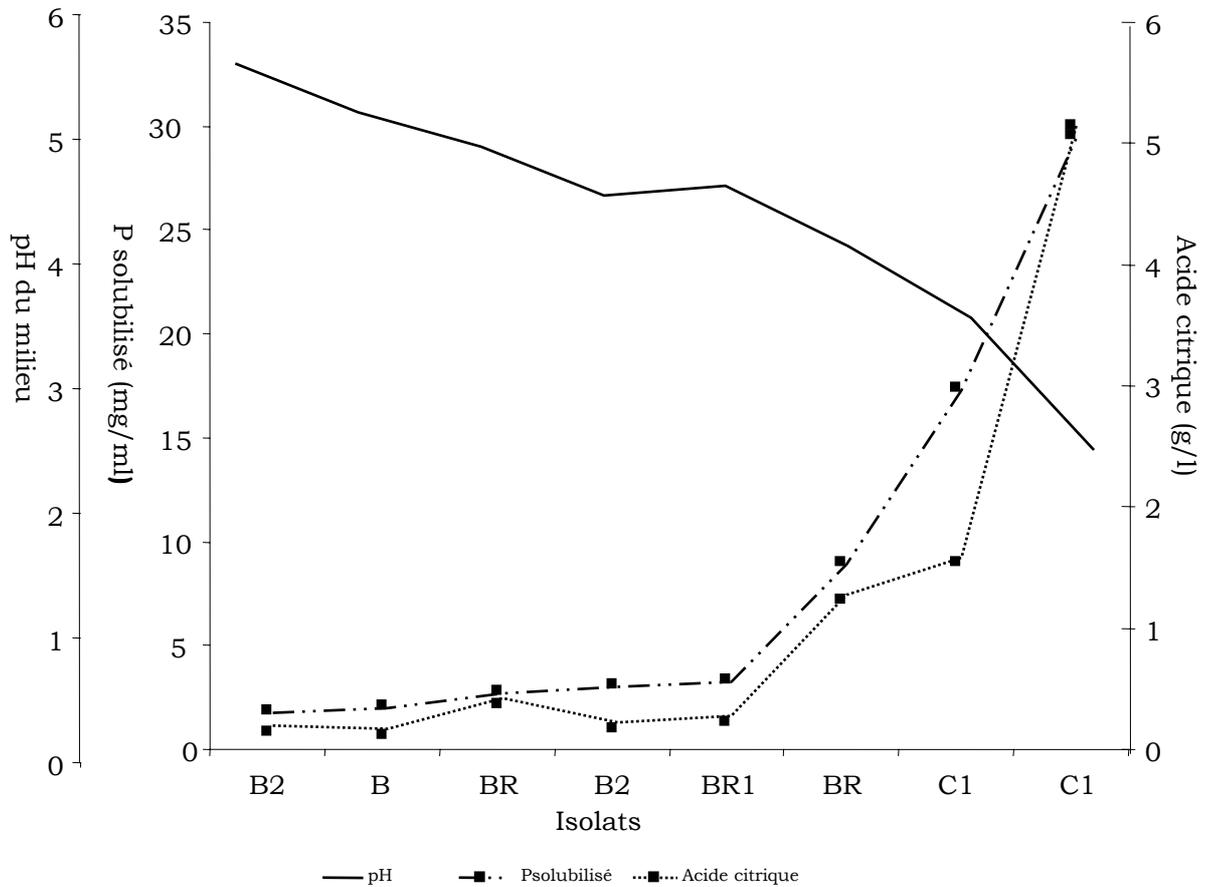


Figure 5 : Évolution de la quantité de P en fonction de la production d'acide citrique et de la baisse du pH.

La croissance, en milieu liquide, des isolats retenus est toujours accompagnée d'une baisse de pH du milieu et d'une hausse de l'acidité titrable. Le pH du milieu dans lequel croît le champignon C1 a baissé jusqu'à 2,55 qui est le pH le plus bas observé dans cet essai. Des études de corrélation, effectuées entre le pH, l'acidité titrable et la quantité de P solubilisé par les isolats ont montré, d'une part, une relation négative significative ($r = -0,76$ ***) entre le P solubilisé et le pH du milieu et, d'autre part, une relation positive significative ($r = 0,97$ ***) entre le P solubilisé et l'acidité titrable (Figure 6 et Figure 7).

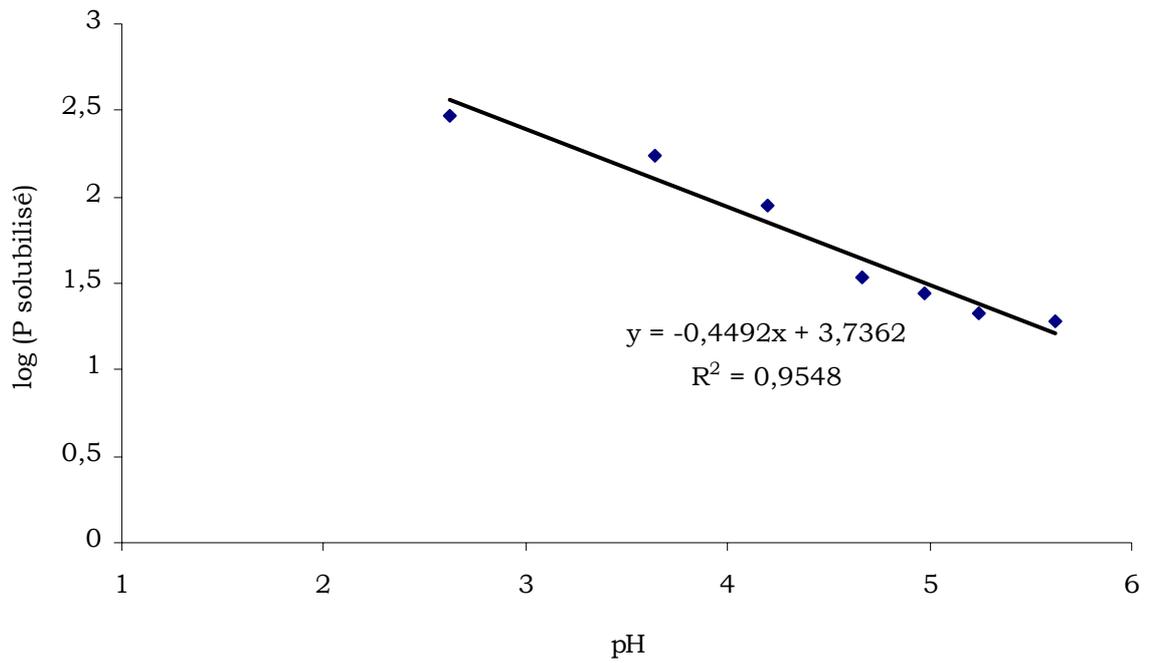


Figure 6 : Corrélation entre le pH du milieu de culture et la solubilisation du phosphore

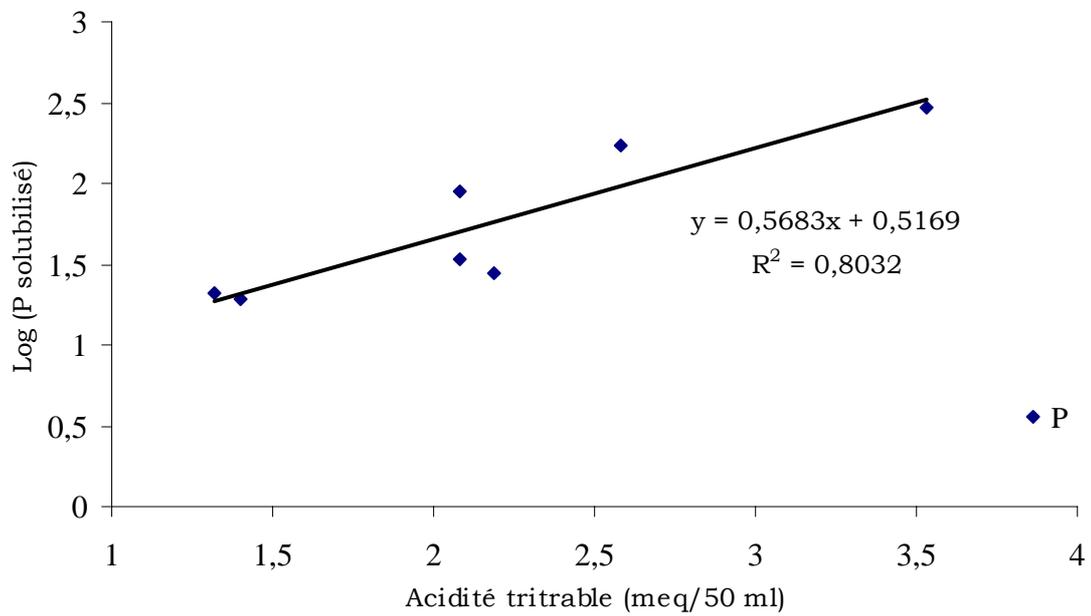


Figure 7 : Corrélation entre l'acidité titrable et la solubilisation du phosphore.

En milieu liquide, la corrélation entre le pH et la quantité de P solubilisé avait déjà été rapportée par [Kucey et al. \(1983\)](#). Pour les champignons, tel que *Aspergillus*, le pH 4 a été longtemps reconnu comme pH optimum pour solubiliser les phosphates inorganiques. Dans cette étude, le pH a baissé jusqu'à des limites variant entre 2,6 et 5,4 selon les isolats alors que le pH initial de tous les milieux de culture était de 6,8. La croissance de plusieurs bactéries et champignons s'accompagnent d'une baisse du pH du milieu de culture. Dans cette étude, nous avons constaté une relation évidente entre la baisse du pH et la solubilisation du P, entre la production d'acides et l'acidité titrable et entre l'augmentation de l'acidité titrable et la solubilisation du P. Ces relations significatives font ressortir le rôle important des acides dans la solubilisation des phosphates naturels.

Afin de déterminer l'effet de la concentration de PNT dans le milieu, du pH et de la température d'incubation sur la capacité des isolats à solubiliser le PNT, nous avons fait croître les isolats sur milieux solides NBRIP de pH 5,6 et 7, préparés à partir de milieux liquides contenant 2, 4 et 8g de PNT/l. Les différents milieux inoculés par les isolats, ont été incubés à 30, 37 et 45°C pendant 15 jours. Les données issues de cette expérience sont présentées dans le Tableau 18.

L'analyse de ces données montre que la croissance et la capacité des isolats à solubiliser le PNT dépendent en grande partie du pH initial du milieu de culture et de l'isolat en présence. À pH initial 7, les bactéries solubilisent efficacement le PNT, plus le pH initial est bas, moins sont efficaces les bactéries testées. Les champignons quant à eux, bien que très peu sensibles aux variations de pH solubilisent plus efficacement le PNT quand on les fait croître dans un milieu de pH initial 6. L'interaction entre la concentration de PNT et le pH constitue également un élément important dans l'activité des isolats testés. Ainsi, une concentration de PNT de 4g/l donne un très bon résultat avec les isolats à pH 7, les champignons étant plus efficaces que les bactéries. Plus on augmente la concentration de PNT dans le milieu, plus il y a de P solubilisé par les isolats (Tableau 14). Cependant, à une concentration de PNT supérieure à 2 g/l, plus le pH est bas, moins il y a de P solubilisé par les bactéries.

Comme le pH et la concentration de PNT, la température d'incubation apparaît comme un facteur agissant sur la capacité des isolats à solubiliser efficacement le PNT. Les bactéries B22 et B27 se sont montrés efficaces à 30 et 37°C, tandis que, les autres bactéries le sont seulement à 30°C. A 45°C, nous n'avons observé aucun halo de solubilisation chez les bactéries qui ont néanmoins pu croître dans la majorité des cas.

Les champignons, isolés du sol provenant du site d'extraction du PNT avec un pH acide (pH 5,89) et une température pouvant dépasser 45°C en été et une très forte concentration en PNT, se sont montrés plus efficaces que les bactéries à toutes les températures d'incubation. Ces champignons semblent généralement bien adaptés à l'environnement d'où ils ont été isolés, chaud, acide avec une forte concentration de PNT. Les bactéries ont montré des capacités différentes dans la solubilisation du PNT sous conditions stressantes. Cependant, les champignons, quant à eux, semblent posséder un potentiel génétique leur permettant de solubiliser le PNT quelle que soit la concentration de phosphate naturel et dans des conditions de température et de pH stressantes.

Tableau 18 : Sélection des microorganismes capables de croître sous stress et de solubiliser efficacement le phosphate naturel de Tilemsi.

Isolats	Température oC	PNT	Halo de solubilisation en mm								
			pH5			pH6			pH7		
			2g	4g	8g	2g	4g	8g	2g	4g	8g
BR2	30		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	37		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	45		0	0	0	0	0	0	0	0	0
BR8	30		1	0	0	3	2	1	3	4	4
	37		0	0	0	1	1	0	3	0	0
	45		0	0	0	0	0	0	0	0	0
BR10	30		2	1	0	4	3	1	4	5	4
	37		0	0	0	0	0	0	1	0	0
	45		0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3	30		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	37		0	0	0	0	0	0	0	0	0
	45		0	0	0	0	0	0	0	0	0
B22	30		2	1	0	2	2	2	2	3	3
	37		1	0	0	2	1	1	1	2	2
	45		0	0	0	0	0	0	0	0	0
B27	30		3	1	0	5	5	4	5	5	5
	37		1	1	0	3	2	1	3	2	2
	45		0	0	0	1	1	0	1	1	0
C1	30		16	16	15	17	17	17	15	16	16
	37		15	14	14	17	16	15	15	15	16
	45		14	14	13	14	13	13	12	13	14
C13	30		12	12	12	13	13	11	10	12	12
	37		11	11	10	12	11	11	10	9	10
	45		9	8	8	10	9	10	8	9	9

*Chaque valeur (diamètre des halos de solubilisation en mm), représente la moyenne de trois répétitions

3.1.1.3.2 Production de substances favorisant la croissance des plantes et antagonisme

Parmi les microorganismes évalués, seules les bactéries BR2 et BR10 croient sur milieu solide CAS en produisant des halos de couleur orange très foncée. Ce qui veut dire que, ces bactéries produisent des sidérophores en grande quantité (Tableau 19). La bactérie B3, aussi, produit des sidérophores mais en quantité plus faible que BR2 et BR10. Plusieurs chercheurs ont rapporté la production de sidérophores par certaines bactéries rhizosphériques appelées rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RFCP) ([Beauchamp, 1992](#)). Les sidérophores sont des substances qui favorisent la croissance des plantes en inhibant les organismes phytopathogènes ou délétères. En plus de la production de sidérophores, les bactéries BR2, B22, BR10 et B3 produisent de l'acide indole acétique (A.I.A.). Au cours de ces tests, aucune bactérie n'a pu produire de l'acide cyanhydrique. De même aucun cas d'antagonisme n'a été observé entre les isolats testés.

Tableau 19 : Production de sidérophores, d'acide cyanhydrique (HCN) ou d'acides indole acétique (A.I.A.) par les isolats retenus après 12 jours de croissance sur milieu solide.

Isolats	Sidérophores	Acide indole acétique	Acide cyanhydrique	Antagonisme
BR2	6 mm	++	-	-
BR8	-	-	-	-
BR10	5mm	+	-	-
B3	3mm	+	-	-
B22	-	++	-	-
B27	-	-	-	-
C1	-	-	-	-
C13	-	-	-	-

++ Production modéré de la substance considérée

+ Faible production de la substance considérée

- Aucune production de la substance

3.1.2 Effets de l'inoculation avec les MSP sur la croissance et la production du blé irrigué du Mali

3.1.2.1 Germination des graines

L'inoculation des graines par les microorganismes solubilisant le P a significativement affectée leur germination qui varie énormément en fonction du temps écoulé depuis le semis (Tableau 20).

Tableau 20 : Analyse de la variance pour la germination des graines inoculées par les MSP.

Sources de variations	Moyenne des carrées	
	Degré de liberté	Nombre de graines germées
Isolats	8	118,8 ***
répétitions	9	0,1 ns
Isolats*répétitions	72	0,2
Temps ^α	3	170,7 ***
Isolats*temps	24	1,45 ***
Répétitions*isolats*temps	243	0,2

*** significatif au seuil de probabilité de 0,00

ns : Non significatif au seuil de 0.05

^α Nombre de jours passés avant la vérification de la germination

En effet, seule la bactérie BR2 a été la seule, des neuf isolats testés à avoir stimulé la germination des graines pendant les 5 premiers jours (Tableau 21).

Les meilleurs taux de germination ont été obtenus avec les plantes inoculées avec les bactéries BR2 BR10 et B3. Après seulement 5 jours de croissance, l'isolat B27 semble ralentir l'émergence du blé, tandis qu'avec C1 et C13 on observe la même situation après 10 et 15 jours (il faut noter que cette expérience est indépendante de la grande expérience, mais a lieu en même temps et sur le même site dans les mêmes conditions de fertilisation).

Tableau 21 : Influence de l'inoculation avec les MSP sur la germination des graines (exprimé en nombre de graines germées sur 10 graines) ^a.

Isolats	Nombre de jours après semis			
	5	10	15	20
Contrôle	3,8 b	6,2 b	6,5 c	6,6 c
BR2	5,2 a	8,7 a	8,7 a	9 a
BR8	1,8 e	3,5 d	4,8 e	5,2 e
BR10	3,7 b	6,3 b	7 b	8,2 b
B3	3,3 c	6,3 b	6,5 c	8 b
B22	2,2 d	3,5 d	3,8 f	4 f
B27	0 f	1,8 e	2,8 g	3,2 g
C1	3,3 c	5,3 c	6,2 c	6,2 d
C13	3,8 b	5,3 c	5,8 d	6,2 d
Test de F	**	***	***	***

** ,*** Significatifs au seuil de probabilité de 0,01 et 0.00

ns : Non significatif au seuil de 0.05

Dans une même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes.

^a Moyenne de 10 répétitions

3.1.2.2 Colonisation des racines du blé par les mycorhizes indigènes

La fertilisation phosphatée et l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) ont significativement affecté la colonisation des racines de la variété de blé Tétrà par les mycorhizes indigènes (Tableau 22). Toutes les interactions entre les sources de phosphores et les MSP étaient significatives ($p < 0.0001$). Ce qui indique par exemple, que les sources de phosphore affectent différemment la colonisation des racines par les mycorhizes indigènes, ce en fonction du microorganisme.

Tableau 22 : Résumé des analyses de variance pour les variables mesurées sur le blé.

Moyennes des carrées							
Sources de variation	df	% colonisation	Taille 1 ^a	Taille 2 ^b	Feuilles	Matière sèche paille	Matière sèche racines
Parcelles principales (P)	2	381.3 ***	824.4 ***	1855.5 ***	1 ns	3.4 ***	0.2 ***
Répétitions	3	1.6NS	387.6 ***	4.1 ns	16.3 ***	0.8 *	0.003 ns
Erreur parcelles principales	6	3.4	118.9	71.5	2.7	0.08	0.002
Sous parcelles (isolats)	8	391.7 ***	16.4 *	364.5 ***	1 ns	0.7 **	0.03 ***
P x isolats	16	131.4 ***	22.4 ***	57.5 ^c	0.7 ns	0.1 ns	0.01 ***
Erreur sous parcelles	72	2.1	6.8	31.5	0.6	0.2	0.002

Variables mesurées : colonisation des racines, taille, nombre de feuille et production de matière sèche végétale (paille et racines) de la variété de blé Tètra inoculée avec les microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) et fertilisé avec le PNT et le DAP.

*, **, *** Significatifs au seuil de probabilité de 0.05, 0.01 et 0.00.

ns : Non significatif au seuil de 0.05

taille du blé après 30 jours de croissance.

^c Taille du blé après 60 jours de croissance.

Dans les parcelles non fertilisées et non inoculées, seulement 2,6% de la longueur totale des racines ont été colonisés par les mycorhizes indigènes, 45 jours après semis (Tableau 23). La fertilisation avec le PNT a amélioré de 5% la colonisation des racines du blé comparé au témoin non fertilisé, tandis que, l'application de DAP a occasionné une baisse du taux de colonisation des racines du blé de 1,2% suggérant ainsi que la pauvreté du sol en phosphore serait, au moins en partie, cause de la faiblesse de la colonisation des racines par les mycorhizes indigènes.

Tableau 23 : Effet de l'application du phosphate naturel de Tilemsi (PNT) et du phosphate biammoniacal (DAP) à 30 kg de P ha⁻¹ sur la colonisation des racines, la taille et la production de paille et racines du blé.

	Contrôle	PNT	DAP	Test de F
% colonisation	2,6 b	7,6 a	1,4 c	***
Taille1 (cm)*	37,17 c	40,2 b	44,73 a	***
Taille2 (cm)	67,30 b	79,43 a	80,03 a	***
Feuilles	6,03 a	6,25 a	6,4 a	ns
Matière sèche paille	2,19 c	2,59 b	2,80 a	***
Matière sèche racines	0,26 c	0,39 a	0,33 b	***

*** Significatif au seuil de probabilité de 0,00.

ns : non significatif au seuil de 0,05.

Dans la même ligne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 0,05.

Une autre cause de la faiblesse de la colonisation des racines pourrait être le nombre de spores viables de mycorhize dans les sols. En effet, les perturbations des sols dues à des pratiques telles que le labour, les rotations des cultures et la forte érosion auxquels sont soumis les sols tropicaux, entraînent une forte diminution du nombre de progagules et de spores viables de mycorhizes indigènes des sols et réduit, par conséquent, le taux d'infection des racines du blé par les MVA ([Diop et al., 1994](#) ; [Gavito et Miller, 1998](#)). Une réduction de l'incidence des mycorhizes dans les sols en jachère a été aussi reportée ([Vivekanandan et Fixen, 1991](#) ; [Arihara et Karazawa, 2000](#)).

Dans le sol non fertilisé, l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le P (MSP) a significativement amélioré le taux de colonisation (Tableau 24). L'inoculation avec les MSP a augmenté de 3,9% le taux de colonisation des racines en présence de PNT comparativement aux plantes non fertilisées, suggérant ainsi, une solubilisation du PNT par les MSP avec pour conséquences la hausse de la concentration du P du sol à des niveaux l'amélioration de la croissance et du taux d'infection des racines (Tableau 24). En présence de DAP, l'inoculation avec les MSP n'a pas eu d'effet significatif sur la colonisation des racines, ce qui est en accord avec l'observation générale selon laquelle le taux de colonisation des racines par les champignons MVA est plus élevé aux faibles doses de phosphore disponibles ([Khaliq et Sanders, 2000](#) ; [Zhu et al., 2001](#)).

Tableau 24 : Effet de la fertilisation et de l'inoculation avec les MSP sur la colonisation des racines du blé par les mycorhizes indigènes du sol après 45 jours de croissance.

Isolats	Source de phosphore		
	Contrôle	PNT	DAP
Contrôle	4,5 b	3,50 d	3,50 a
BR2	9,8 a	33,5 a	5 a
BR8	0 c	0,5 e	1,5 bc
BR10	7,5 a	21,8 b	1,8 b
B3	2,3 bc	0 e	0,8 bc
B22	0 c	8,8 c	0 c
B27	0 c	0 e	0 c
C1	0 c	0 e	0 c
C13	0 c	0 e	0 c
Test de F	***	***	***

Dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de probabilité de 0.05, selon le test de fisher.

L'amélioration de la colonisation des racines observée avec le PNT est l'œuvre des bactéries solubilisant le P (BSP). En effet, les bactéries BR2, BR10 et B3 sont les seules, parmi les isolats testés, à avoir significativement stimulé la colonisation des racines du blé (Tableau 24). Les bactéries BR2, BR10 et B3 produisent des sidérophores, en plus la bactérie BR2 produit de l'acide indole acétique, ce qui peut aussi expliquer l'effet positif de ces bactéries sur la colonisation des racines du blé. Les champignons C1 et C13 qui solubilisent plus efficacement le PNT mettent en disponibilité plus de P dans le sol et peuvent par la même occasion, défavoriser la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens (Tableau 24). Le plus fort pourcentage de colonisation des racines par les mycorhizes indigènes a été obtenu avec la bactérie BR2 (33,5%) en présence de PNT.

3.1.2.3 Croissance du blé

Après 30 jours de croissance, les apports de PNT et de DAP ont significativement augmenté la taille du blé comparativement aux témoins non fertilisés (Tableau 25). Cependant, le blé fertilisé avec le DAP est de 4 cm plus haut que celui fertilisé avec le PNT, attestant de la pauvreté du sol (S3) en phosphore et la possibilité d'une faible disponibilité du phosphore du PNT. Toujours après 30 jours de croissance, l'inoculation avec les MSP en présence de PNT n'a pas amélioré la taille du blé, suggérant ainsi qu'en présence d'une faible source de phosphore, l'inoculation avec les MSP favorise le développement des racines au dépens des parties aériennes. Après 60 jours de croissance, en absence de MSP, l'application de DAP a significativement améliorée la croissance en hauteur du blé (Tableau 25). L'inoculation avec les MSP, a stimulé l'élongation du blé en présence de PNT. En effet les MSP ont occasionné, en présence de PNT, des élongations de la taille du blé de 6 à 25 cm. La bactérie BR2, après application de PNT, a augmenté la taille du blé de 25 cm comparé au témoin fertilisé et non inoculé.

Tableau 25 : Effet des MSP sur la taille et le nombre de feuilles par plante de blé (cultivar Tétrà) après 30 et 60 jours de croissance.

Isolats	Sources de phosphore								
	Contrôle			PNT			DAP		
	Taille1*	Taille2**	Feuilles***	Taille1	Taille2	Feuilles	Taille1	Taille2	Feuilles
Contrôle	39,33 a	65,03 a	5,75 a	40,03 a	67,8 d	6 a	44,48 b	75,09 cd	6,25 a
BR2	34,12 a	71,24 a	6,25 a	40,91 a	94,58 a	6,5 a	49,26 a	90,42 a	6,25 a
BR8	35,12 a	67,73 a	5,75 a	40,92 a	73,42 cd	6,25 a	43,02 b	79,47 cd	6,5 a
BR10	34,86 a	67,43 a	5,75 a	37,95 a	79,9 bc	6 a	49,26 a	78,17 cd	6,25 a
B3	33,54 a	65,59 a	6,25 a	40,71 a	73,9 cd	5 a	48,28 a	75,66 cd	6,25 a
B22	34,15 a	64,52 a	5,75 a	40,11 a	76,66 bc	6 a	41,95 b	74,49 d	6,5 a
B27	36,28 a	66,02 a	6,75 a	40,68 a	74,28 cd	6,5 a	42,6 b	76,01 cd	6,25 a
C1	34,7 a	68,16 a	6,25 a	38,45 a	92,15 a	7,25 a	40,81 b	88,75 ab	7 a
C13	34,4 a	70,08 a	5,75 a	41,13 a	82,13 b	6,75 a	43,02 b	82,25 bc	6,5 a
LSD (0,05)	ns	ns	ns	ns	***	ns	**	***	ns

* Taille après 30 jours de croissance

** taille après 60 jours de croissance

*** Nombre de feuilles par plante

,* Significatifs aux seuils de probabilité de 0.01 et 0.00 respectivement ns : non significatif au seuil de 0.05.

Les moyennes portant les mêmes lettres dans la même colonne ne sont pas significativement différentes au seuil de 0.05, selon le test de Fisher.

La stimulation de la croissance du blé, observées après 60 jours, indique que l'effet négatif de l'inoculation avec les MSP sur la taille du blé après les 30 premières jours de croissance, ne s'est pas traduit par une baisse de rendement. L'application du PNT ou du DAP n'a occasionné aucune amélioration significative du nombre de feuilles par plante (Tableau 23). Après fertilisation avec le PNT, l'inoculation avec les MSP n'a provoqué aucune augmentation significative du nombre de feuilles par plante comparativement aux témoins fertilisés et non inoculés (Tableau 25).

3.1.2.4 Production de matière sèche végétale

L'application de PNT et de DAP ainsi que l'inoculation avec les MSP ont eu un effet significatif sur la production en matière sèche (paille et racines) du blé. L'interaction entre les sources de phosphore et les MSP est significative pour les racines et non significative pour la production de paille (Tableau 22). La quantité de matière sèche (paille et racines) produite ainsi que les valeurs des rapports racines/paille pour les différents traitements sont présentés dans le Tableau 26. Les plus petites différences significatives (LSD 0.05) entre les résultats dus aux effets de l'inoculation avec les différents microorganismes pour chaque source de phosphore appliquée y sont également indiquées.

Tableau 26 : Effets des MSP sur la production de matière sèche végétale de blé (paille et racines du cultivar Tétrà).

Isolats	Paille (t/ha) ^α			Racine (t/ha) ^β			Rapport R/P ^γ		
	Contrôle	PNT	DAP	Contrôle	PNT	DAP	Contrôle	PNT	DAP
Contrôle	1,94 a	1,97 b	2,14 a	0,26 a	0,25 g	0,26 a	0,13	0,13	0,12
BR2	2,27 a	2,98 a	3,09 a	0,25 a	0,57 a	0,39 a	0,11	0,19	0,13
BR8	2,10 a	2,84 a	2,97 a	0,29 a	0,39 de	0,33a	0,14	0,14	0,11
BR10	2,19 a	2,71 a	2,78 a	0,22 a	0,43 c	0,34 a	0,1	0,16	0,12
B3	2,29 a	2,45 ab	2,67 a	0,25 a	0,51 b	0,34 a	0,11	0,21	0,13
B22	2,20 a	2,48 ab	2,66 a	0,27 a	0,32 f	0,31 a	0,12	0,13	0,12
B27	2,10 a	2,14 b	2,92 a	0,25 a	0,26 g	0,32 a	0,12	0,12	0,11
C1	2,41 a	2,84 a	3,01 a	0,27 a	0,40 cd	0,32 a	0,11	0,14	0,11
C13	2,14 a	2,77 a	2,94 a	0,24 a	0,36 e	0,31 a	0,11	0,13	0,11
Test de F	ns	ns	ns	ns	***	ns			

^α Poids sec de la paille de blé

^β Poids sec des racines de blé

^γ Rapport entre le poids sec des racines et le poids sec de la paille de blé.

*, *** Significatifs aux seuils de probabilité de 0.05 et 0.00 respectivement

ns : non significatif au seuil de 0.05.

Les moyennes portant les mêmes lettres dans la même colonne ne sont pas significativement différentes au seuil de 0.05, selon le test de Fisher.

Une augmentation significative de la production de matière sèche (paille et racines) a été obtenue avec le blé fertilisé par le PNT ou le DAP (Tableau 23). La plus forte production de paille ($2,80 \text{ t.ha}^{-1}$) a été observée avec le DAP, tandis que, nous avons obtenu la plus forte production de racines ($0,39 \text{ t.ha}^{-1}$) avec le PNT. Ces résultats confirment la pauvreté du sol d'essai en phosphore. Les plantes inoculées avec les MSP, sans source de phosphore, ont vu leur production de paille et de racines augmentée par rapport au témoin non fertilisé et non inoculé (Tableau 26). En général, l'inoculation avec les MSP, après fertilisation a significativement augmenté la production de la paille du blé comparé aux témoins fertilisés et non inoculés. Ainsi, nous avons obtenu une hausse de la production de paille de 681 kg.ha^{-1} après inoculation avec les MSP en présence du PNT et de 740 kg.ha^{-1} en présence du DAP (Tableau 26).

De même, l'inoculation du blé avec les MSP a permis d'augmenter le contenu total en phosphore de la paille de blé. L'amélioration de l'absorption du P et de la production de matière sèche du blé inoculé par rapport aux contrôles fertilisés au PNT et non inoculés suggère une mise en disponibilité, aux plantes, du phosphore du PNT ([Gain et Gaur, 1990](#); [Singh et Amberger, 1998](#)). Cependant, cet effet semble ne pas être directement lié à la solubilisation du PNT car la majorité des bactéries qui ont donné les meilleurs résultats au cours du test de solubilisation n'ont pas pu améliorer significativement la croissance des plantes. Les valeurs des rapports racines/paille des plantes inoculées avec les bactéries en présence de PNT sont plus élevées que ceux des plantes non inoculées (contrôles) à cause du développement plus important des racines de ces plantes. Les bactéries BR2, BR8, BR10 et B3 produisent des sidérophores, la présence de ces substances peut expliquer partiellement la stimulation de la croissance des racines du blé observée, ce qui est en accord avec les résultats de [Chabot et al. \(1993\)](#).

3.1.2.5 Concentration en minéraux

Les concentrations des minéraux ont plus augmenté chez les plantes fertilisées avec DAP comparativement à celles fertilisées avec le PNT (Figure 8). Chez les plantes fertilisées avec le PNT, mis à part le Zn, le Mn et le K qui ont sensiblement augmenté, les concentrations des autres minéraux dans le blé ont baissé.

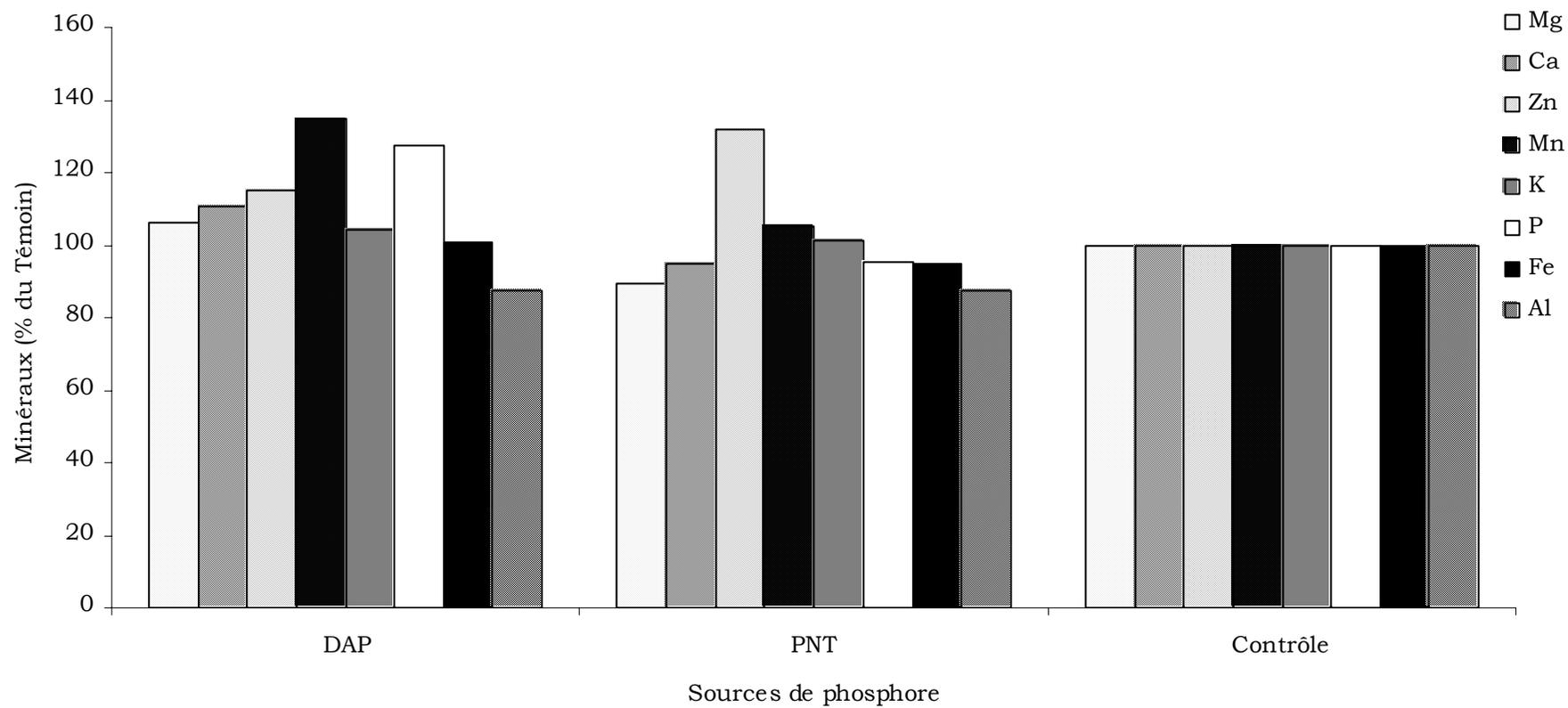


Figure 8 : Effets de l'application du PNT et du DAP, sur l'assimilation totale des minéraux par le blé.

Tous les microorganismes ont provoqués une hausse de la concentration en éléments minéraux du blé. Cependant, c'est dans les plantes inoculées avec les bactéries BR2 et BR8 et les champignons C1 et C13 qu'on a trouvé les plus fortes concentrations de minéraux (Figure 9). L'inoculation avec les isolats BR2, BR8, BR10, B22, C1 et C13, a augmenté la concentration en phosphore des plantes de 5 à 44% par rapport au témoin non inoculé. En plus du phosphore, l'inoculation a provoqué une hausse de la concentration dans les tissus foliaires du K (1 à 19 %), Ca (10 à 48 %), Mg (9 à 36 %), Zn (3 à 16 %), Fe (14 à 28 %), Al (27 à 64 %) et Mn (34 %). Ces résultats sont en accord avec ceux de [Chabot et al. \(1993\)](#) qui, dans un essai au champ avec le maïs, ont observé que l'inoculation avec des souches bactériennes semblent augmenter la concentration de la partie foliaire du maïs en K, Ca, Mg, Fe, Mn et Zn. Néanmoins, dans cet essai, seules les bactéries BR2, BR8 et B3 ont provoqué une hausse de la concentration en Zn du blé. De même, seule la bactérie B3 a occasionné une hausse du Mn dans le blé comparé aux plantes témoins non inoculées (Figure 9). Au contraire, les plus basses concentrations de Fe et d'Al ont été trouvées chez les plantes inoculées avec les bactéries B3, B22 et B27.

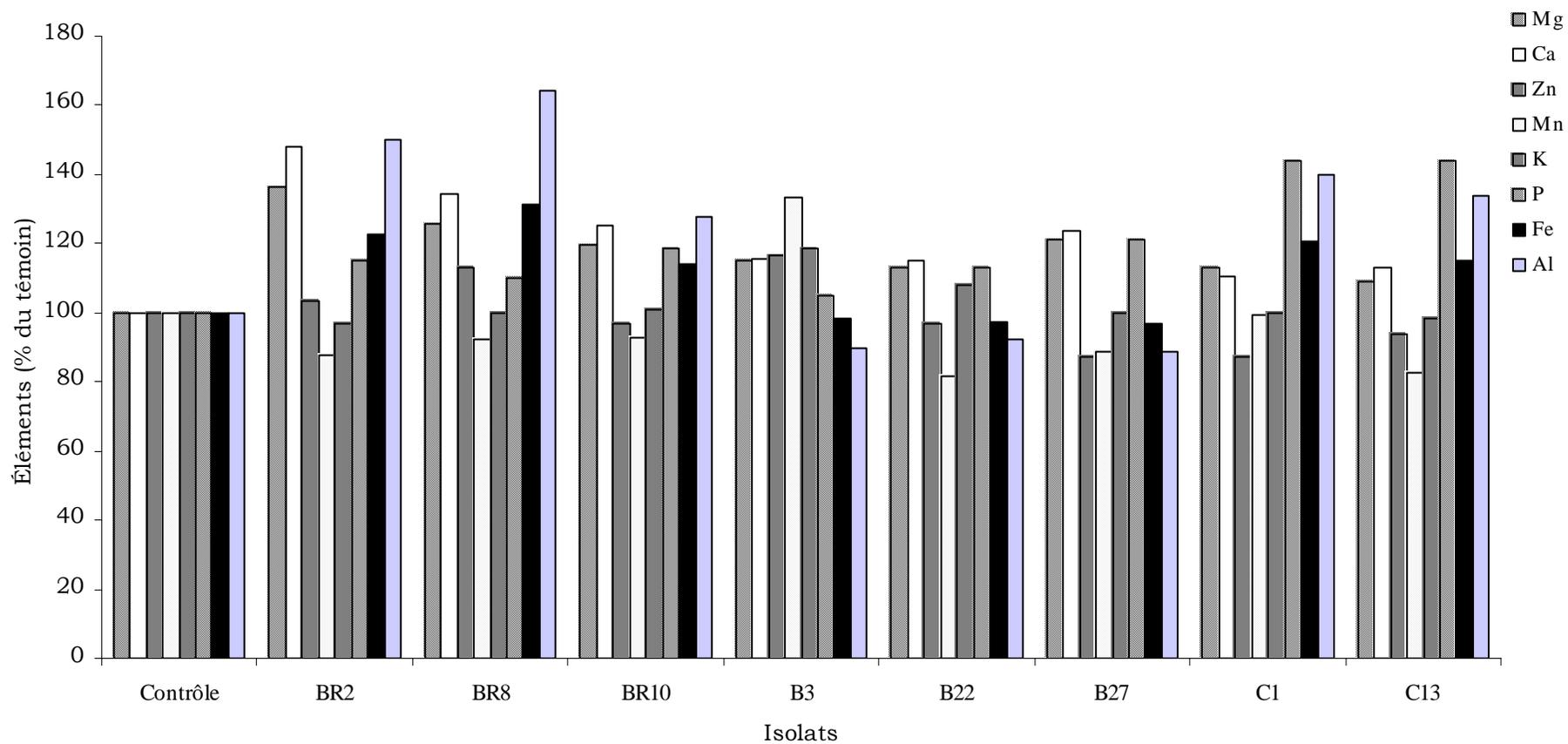


Figure 9 : Effets de l'inoculation du blé avec les microorganismes solubilisant le P, sur l'assimilation totale des minéraux.

Les résultats de cet essai indiquent que les organismes évalués peuvent améliorer la germination, la croissance et la production du blé au champ, en mettant en solution le phosphore du phosphate naturel de Tilemsi (PNT). Cependant, vu que la stimulation de la germination et de la colonisation des racines du blé n'a été observée qu'en présence des bactéries et que les champignons solubilisent plus le phosphore que les bactéries, nous pensons que les stimulations observées ne sont pas uniquement dues à la solubilisation du phosphore, mais aussi à la production de substances de croissance, qui en favorisant la colonisation des racines par les mycorhizes indigènes, améliorent la nutrition des plantes. Plusieurs travaux restent à faire avant de formuler un inoculant biologique pour le blé. Ainsi, dans l'essai suivant nous donnerons les résultats, au champ, des effets de l'inoculation avec les trois organismes ayant donné les meilleurs résultats (BR2, C1 et C13) seuls ou en combinaison champignon bactérie avec ou sans mycorhize commerciale, sur la croissance, la production de graines et de paille, l'absorption du phosphore et la colonisation des racines du cultivar de blé Tétrà.

3.1.3 Effets de l'inoculation avec les MSP et *G. intraradices* sur la colonisation des racines, la croissance et la production du blé irrigué du Mali

3.1.3.1 Colonisation des racines du blé par les mycorhizes

La fertilisation phosphatée et l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) et *Glomus intraradices* (Gi) ont significativement affecté la colonisation des racines de la variété de blé Tétrà par les mycorhizes indigènes (Tableau 27). Toutes les interactions entre les sources de phosphores, les MSP et l'inoculation avec *G. intraradices* étaient significatives ($p < 0.001$). Ce qui indique par exemple, que les sources de phosphore affectent différemment la colonisation des racines par les mycorhizes indigènes, ce en fonction du microorganisme utilisé ou de l'inoculation ou non de *G. intraradices*.

Tableau 27 : Résumé des analyses de variance sur les variables mesurées sur le blé (cv. Tétrà).

Sources des variations	Moyennes des carées						
	dl	% colonisation	Taille des plantes	Production de graines	Contenu en P des graines	Production de paille	Contenu en P de la paille
Parcelles principales P	2	2132.4 ***	448.1 ***	2.8 ***	2.6 ***	3.9 ***	2.0 ***
blocs	3	5.7 ns ^a	95.3 **	0.005 ns	0.03 ns	0.006 ns	0.01ns
Erreur des parcelles principales	6	2.04	25.2	0.0003	0.03	0.0004	0.01
Sous parcelles Gi	1	996.2 ***	3145.3 ***	8.5 ***	0.1 *	10.3 ***	1.5 ***
P x Gi	2	674.4 ***	1.36 ns	0.05 **	0.3 ***	0.03 **	0.04 ns
Erreur des sous parcelles	9	1.6	27.6	0.001	0.03	0.0003	0.01
Sous sous parcelles MSP	5	2291.1 ***	1143.6 ***	0.9 ***	0.5 ***	1.9 ***	0.2 ***
P x MSP	10	418.2 ***	100.3 ***	0.1 ***	0.06 *	0.1 ***	0.03 *
Gi x MSP	5	31.9 ***	150.5 ***	0.4 ***	0.03 ns	0.3 ***	0.006 ns
P x Gi x MSP	10	93.8 ***	96.8 ***	0,06 ***	0.07 *	0.03 ***	0.007 ns
Erreur des sous sous parcelles	90	3.54	18.9	0.007	0.03	0.005	0.01

Variables mesurées : colonisation des racines par les mycorhizes, taille des plantes, production de graines et de paille et concentrations en phosphore du cultivar de blé Tétrà inoculé avec les microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) en présence ou non de *G. intraradices* (Gi) et fertilisé avec le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) ou le phosphate biammoniacal (DAP).

*, **, *** Significatif à $P < 0.05$, $P < 0.01$ et $P < 0.001$, respectivement.

^a ns: statistiquement non significatif.

Dans les parcelles non fertilisées et non inoculées, seulement 5,5% de la longueur des racines ont été colonisés par les mycorhizes indigènes, 45 jours après semis (Tableau 28). L'inoculation avec *G. intraradices* en absence de traitement de fertilisation ou d'inoculation avec les MSP n'améliore pas significativement les 5,5% de colonisation racinaire précédemment observée (Tableau 28).

Tableau 28 : Effets de l'inoculation avec les MSP, sur la taille et la colonisation des racines de la variété de blé Têtra.

Traitements d'inoculation	%colonisation des racines par les mycorhizes			Taille des plantes (cm)		
	Contrôle	PNT	DAP	Contrôle	PNT	DAP
Non inoculé	5.5 c	8.0 d	6.5 b	69.0 c	73.8 d	75.0 d
BR2	43.5 a	37.8 a	11.3 a	83.8 b	99.5 a	89.3 bc
C1	7.3 c	11.5 bc	6.0 b	86.3 ab	95.0 b	92.8 b
C13	9.0 c	10.3 cd	6.8 b	82.0 b	86.0 c	84.3 c
BR2 + C1	26.0 b	14.0 b	9.5 a	91.5 a	87.8 c	100.5 a
BR2 + C13	24.3 b	13.0 b	10.8 a	85.3 b	86.0 c	85.8 c
Gi	5.5 d	25.5 d	8.8 c	79.0 d	85.0 e	89.3 c
Gi + BR2	38.5 a	62.3 a	14.3 a	97.3 ab	106.0 a	115.0 a
Gi + C1	11.0 c	12.5 e	10.0 c	90.8 c	98.0 c	90.8 bc
Gi + C13	11.0 c	12.0 e	9.0 c	102.3 a	93.3 d	94.0 bc
Gi + BR2 + C1	24.0 b	34.5 b	12.5 ab	93.0 bc	100.3 bc	102.0 b
Gi + BR2 + C13	22.3 b	29.8 c	10.8 bc	89.0 c	102.8 ab	93.8 bc

Blé inoculé avec Pseudomonas sp. (BR2), Aspergillus awamori (C1) et Penicillium seul ou en combinaison bactérie champignon avec ou sans Glomus intraradices (Gi) et fertilisé avec le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) ou le phosphate biammoniacal (DAP)

Pour chaque traitement de champignon mycorhizien (inoculé avec Gi ou non) dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test du lsd protégé de Fisher ($P < 0.05$).

L'addition de PNT augmente le taux de colonisation des racines qui passe de 5,5 à 8% dans le traitement contrôle non inoculé, mais une augmentation plus substantielle de 5,5 à 25,5% a été observée chez les plantes inoculées avec Gi (Tableau 28). Pour tous les traitements de fertilisation et de MSP, l'inoculation avec Gi augmente significativement la colonisation des racines du blé (Tableau 29). En général, en présence de phosphate biammoniacal (DAP), le pourcentage de racines colonisées aussi bien par les champignons mycorhiziens indigènes que ceux introduits était toujours inférieur à celui observé dans les parcelles fertilisées avec le PNT ou non fertilisées (Tableau 28 et Tableau 31). Quelque soit la source de phosphore appliquée, l'inoculation avec la bactérie solubilisant le phosphore *Pseudomonas* sp. BR2 augmente significativement la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens indigènes ou introduites. Le plus fort pourcentage de colonisation (62%) a été obtenu avec le blé fertilisé avec le PNT et inoculé avec Gi et BR2 (Tableau 28).

Tableau 29 : Effets de l'inoculation avec *Glomus intraradices* (Gi) sur la taille, la colonisation des racines par les mycorhizes, la production de graines et de paille et les concentrations en P du blé.

	- Gi ^a	+ Gi
% colonisation par les mycorhizes	14.5 b	19.7 a
Taille des plantes (cm)	86.3 b	95.6 a
Production de Graines (t/ha)	2.18 b	2.67 a
Contenu en P des graines (mg/g de matière sèche)	2.30 b	2.36 a
Production de paille (t/ha)	2.45 b	2.99 a
Contenu en P de la paille (mg/g de matière sèche)	1.16 b	1.36 a

^a Les valeurs représentent la moyenne pour tous les traitements de fertilisation. Dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test du lsd protégé de Fisher ($P < 0.05$).

3.1.3.2 Taille des plantes

Après 60 jours de croissance, la fertilisation phosphatée et l'inoculation avec les MSP et *G. intraradices* influence significativement la taille des plantes de blé. A l'exception de l'interaction source de phosphore x Gi, toutes les autres interactions entre les sources de P et l'inoculation avec les MSP et Gi étaient hautement significatives (Tableau 27). Pour tous les traitements combinés, l'inoculation avec Gi et la fertilisation avec le PNT ou le DAP ont significativement augmenté la taille des plantes (Tableau 29 et Tableau 31). Dans les parcelles non fertilisées, les plantes de blé les plus hautes ont été obtenues lorsque le blé est inoculé avec Gi et la bactérie *Pseudomonas sp.* (BR2) ou *Penicillium crysogenum* C13 (Tableau 28). Ces différences, bien que transitoires affectent significativement la récolte finale en graines. Dans cette étude, la taille des plantes est significativement corrélée avec la production en paille ($r = 0,70^{**}$, $p < 0,01$) et en graines ($r = 0,70^{**}$) du cultivars de blé Tétrà (Figure 10).

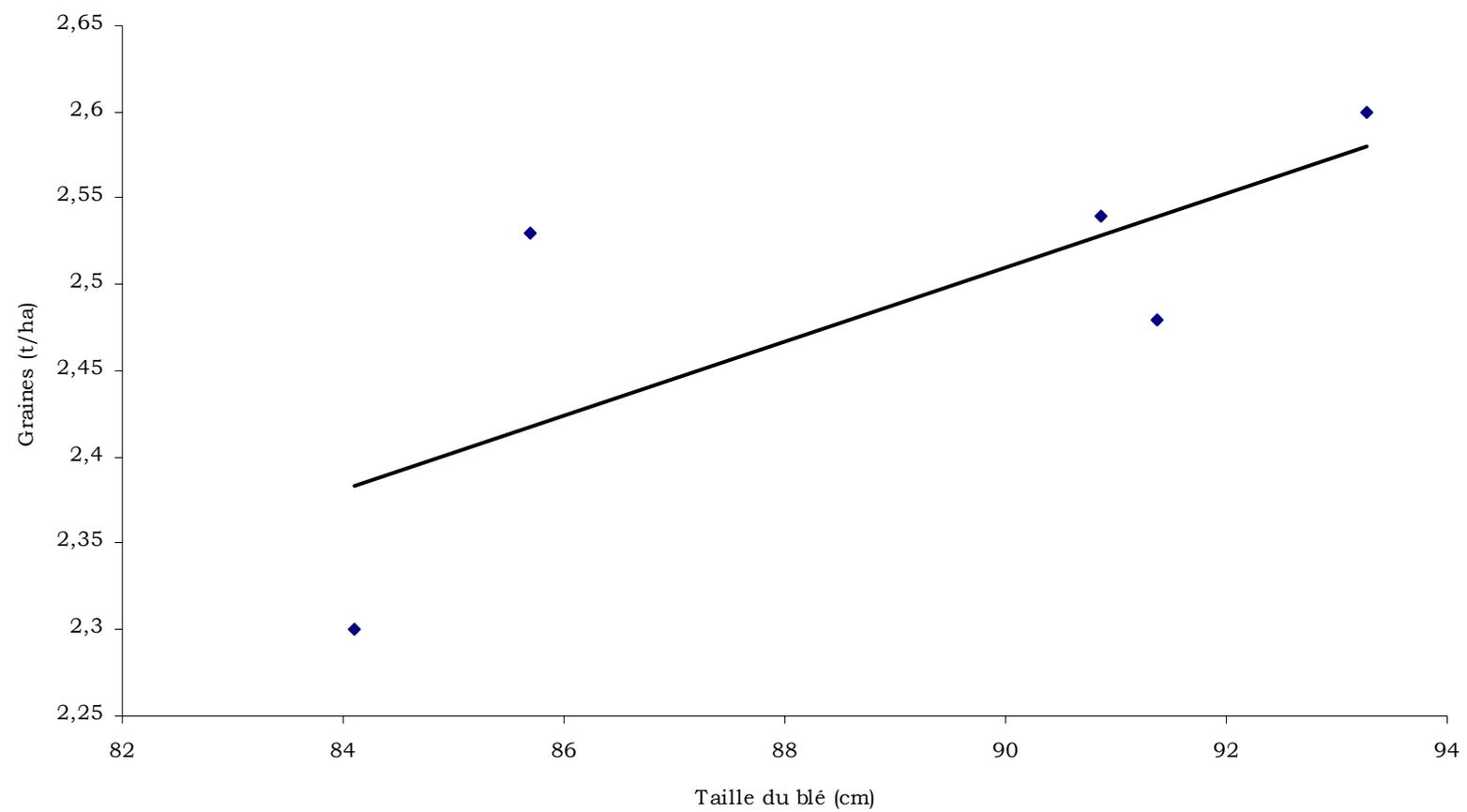


Figure 10 : Relation entre la taille du blé et la production en graines

3.1.3.3 Production de graines, de paille et concentrations en phosphore et minéraux

La production de graines et de paille et leurs concentrations en phosphore sont significativement affectées par la fertilisation phosphatée, l'inoculation avec les PSM et Gi (Tableau 27). L'interaction avec les trois traitements est significative pour la production de graines et de paille. Pour la concentration en P des graines, L'interaction Gi x MSP n'est pas significative. De même, toutes les interactions impliquant Gi ne sont pas significatives pour la concentration en P de la paille de blé (Tableau 27). Pour tous les traitements composés, l'inoculation avec Gi augmente significativement la production en graines et paille du blé et leurs concentrations en phosphore (Tableau 30).

Tableau 30 : Effets de l'inoculation avec les MSP sur la production en graines et paille et les concentrations en P de la variété de blé Tétra.

Traitements d'inoculation	Production de graines (t/ha)			Contenu en P des graines (mg/g de matière sèche)			Production de paille (t/ha)			Contenu en P de la paille (mg/g de matière sèche)		
	Contrôle	PNT	DAP	Contrôle	PNT	DAP	Contrôle	PNT	DAP	Contrôle	PNT	DAP
Non inoculé	1,94 d	2,14 c	2,23 a	1,96 d	1,99 e	2,09 c	2,10 e	2,08 f	2,25 b	0,89 e	1,09 b	1,19 d
BR2	2,04 b	2,35 ab	2,39 a	2,01 c	2,37 b	2,32 ab	2,28 b	2,60 b	2,94 a	1,02 bc	1,12 b	1,54 b
C1	2,00 bc	2,28 b	2,17 a	1,99 cd	2,22 d	2,28 ab	2,33 a	2,37 e	2,76 a	0,97 d	1,03 c	1,38 c
C13	1,55 e	2,32 ab	2,17 a	1,97 d	2,19 d	2,23 b	1,89 f	2,50 d	2,72 a	0,99 cd	1,02 c	1,18 d
BR2 + C1	2,12 a	2,38 a	2,40 a	2,17 a	2,48 a	2,35 a	2,15 d	2,55 c	2,79 a	1,08 a	1,16 a	1,61 a
BR2 + C13	1,98 cd	2,39 a	2,36 a	2,11 b	2,31 c	2,30 ab	2,23 c	2,72 a	2,87 a	1,05 ab	1,09 b	1,51 b
Gi	1,51 e	2,14 e	2,58 c	1,86 d	1,20 e	2,35 b	2,07 d	2,10 d	2,46 d	1,09 e	1,30 b	1,43 a
Gi + BR2	2,62 b	2,94 bc	2,90 a	2,18 b	2,57 b	2,53 a	2,93 a	3,22 a	3,57 a	1,12 d	1,37 b	1,65 a
Gi + C1	2,60 bc	2,86 d	2,98 a	2,20 b	2,51 c	2,52 a	2,95 a	2,99 c	3,59 a	1,15 cd	1,29 b	1,45 a
Gi + C13	2,12 d	2,90 cd	2,72 b	2,14 c	2,48 c	2,49 a	2,53 c	3,12 b	3,17 c	1,16 c	1,28 b	1,48 a
Gi + BR2 + C1	2,7 a	3,04 a	2,95 a	2,28 a	2,69 a	2,51 a	2,82 b	3,20 a	3,46 b	1,28 a	1,47 a	1,71 a
Gi + BR2 + C13	2,56 c	2,96 b	2,93 a	2,15 c	2,37 d	2,51 a	2,96 a	3,09 b	3,49 b	1,22 b	1,37 b	1,68 a

Le blé a été inoculé avec *Pseudomonas* sp. (BR2), *Aspergillus awamori* (C1) et *Penicillium* seul ou en combinaison bactérie champignon avec ou sans *Glomus intraradices* (Gi) et fertilisé avec le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) ou le phosphate biammoniacal (DAP).

Pour chaque traitement de champignon mycorhizien (inoculé avec Gi ou non) dans chaque colonne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test du lsd protégé de Fisher ($P < 0,05$),

La fertilisation avec le DAP augmente ces quatre paramètres mesurés comparativement aux contrôles non fertilisés (Tableau 31). Exception faite de la production de graines, le DAP est toujours supérieur au PNT. La production de paille et la concentration en P des plantes de blé des parcelles contrôles ne sont pas significativement différentes de celles obtenues après fertilisation avec le PNT (Tableau 31).

Tableau 31 : Effets de l'application du PNT et DAP sur la taille, la colonisation des racines par les mycorhizes, la production de graines et de paille et les concentrations en P du blé^a.

	Contrôle	TPR	DAP
% colonisation par les mycorhizes	19,0 b	22,6 a	9,7 c
Taille des plantes (cm)	87,4 b	92,8 a	92,7 a
Production de Graines (t/ha)	2,14 b	2,55 a	2,57 a
Contenu en P des graines (mg/g de matière sèche)	2,08 c	2,36 b	2,55 a
Production de paille (t/ha)	2,44 b	2,71 b	3,00 a
Contenu en P de la paille (mg/g de matière sèche)	1,08 b	1,21 b	1,48 a

^a Les valeurs représentent la moyenne de tous les traitements d'inoculations.

Dans chaque ligne les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test du lsd protégé de Fisher ($P < 0.05$).

En absence de tout traitement de fertilisation, l'inoculation du blé avec le champignon mycorhizien Gi a produit la plus basse production de graines de blé et concentration en P (Tableau 30). En moyenne, l'inoculation avec Gi a causé une augmentation de la production de graines (0,49 t/ha) et de paille (0,54 t/ha) pour tous les traitements de fertilisation et d'inoculation avec les PSM (Tableau 29). Après inoculation avec les microorganismes solubilisant le PNT, la production de graines obtenue avec le PNT était comparable à celle du DAP. En considérant tous les traitements de Gi et de MSP, l'addition de 30 kg de P/ha sous forme de fertilisation avec le PNT ou le DAP augmente de 0,42 t/ha la production de graines par rapport au contrôle non fertilisé (Tableau 30). La production de graines de blé est toujours améliorée par l'inoculation avec les MSP dans les parcelles contrôles et celles fertilisées par le PNT. A l'absence de Gi, l'inoculation avec les MSP et la fertilisation avec le DAP, n'a occasionné aucune amélioration de la production de graines (Tableau 30). En général la production de graines et de paille du blé inoculé avec *Aspergillus amowari* C1 ou *Penicillium chrysogenum* C13 étaient toujours plus fortes lorsque les plantes étaient inoculées avec Gi comparativement aux contrôles non inoculés (tableau 24).

En absence de fertilisation phosphatée, la plus forte production de graines a été obtenue avec le traitement composé BR2 + C1 avec ou sans Gi (Tableau 30). L'application du phosphate biammoniacal (DAP) n'a augmenté que d'à peu près 5% la quantité des différents minéraux absorbés par le blé comparativement aux plantes témoins non fertilisées (Figure 11). Contrairement au DAP, le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) a, mis à part le K, entraîné une hausse du contenu du blé en Mg, Ca, Zn, Mn et Fe respectivement de 13, 17, 20, 26 et 20% par rapport aux témoins non fertilisés. En plus, le contenu du blé fertilisé avec le PNT a augmenté de 216 % comparé aux témoins non fertilisés.

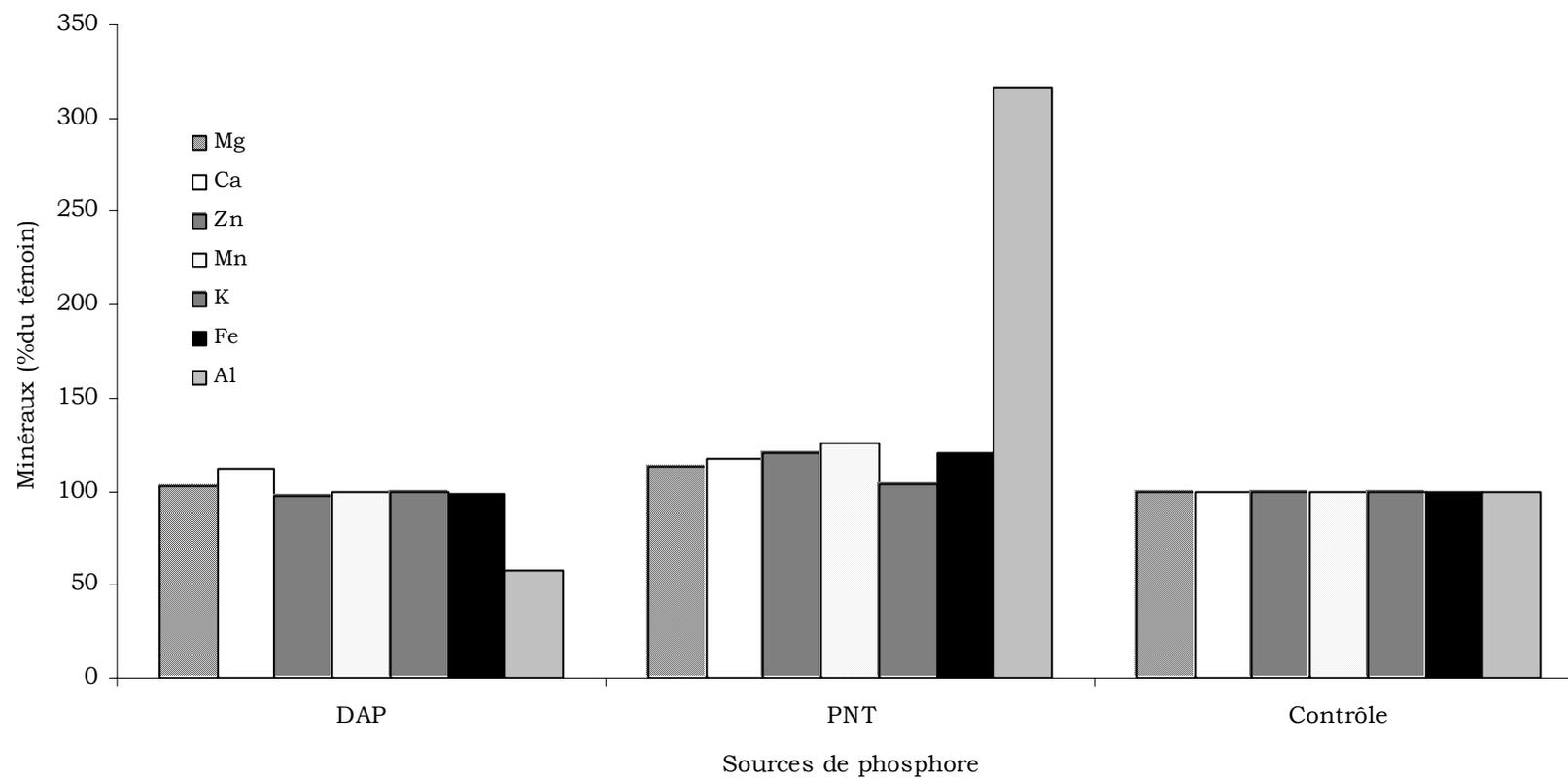


Figure 11 : Effet de la fertilisation sur l'assimilation totale du Mg, Ca, Zn, Mn, K, P, Fe et Al par le blé.

Mis à part le contenu en K du blé qui n'a pas varié par rapport à celui des témoins non inoculés, l'inoculation avec *G. intraradices* a provoqué une augmentation d'à peu près 5 % du contenu en minéraux du blé comparativement aux témoins non inoculés (Figure 12). L'Al est l'élément le plus absorbé en présence de *G. intraradices* (15 % de plus que chez les témoins non inoculés).

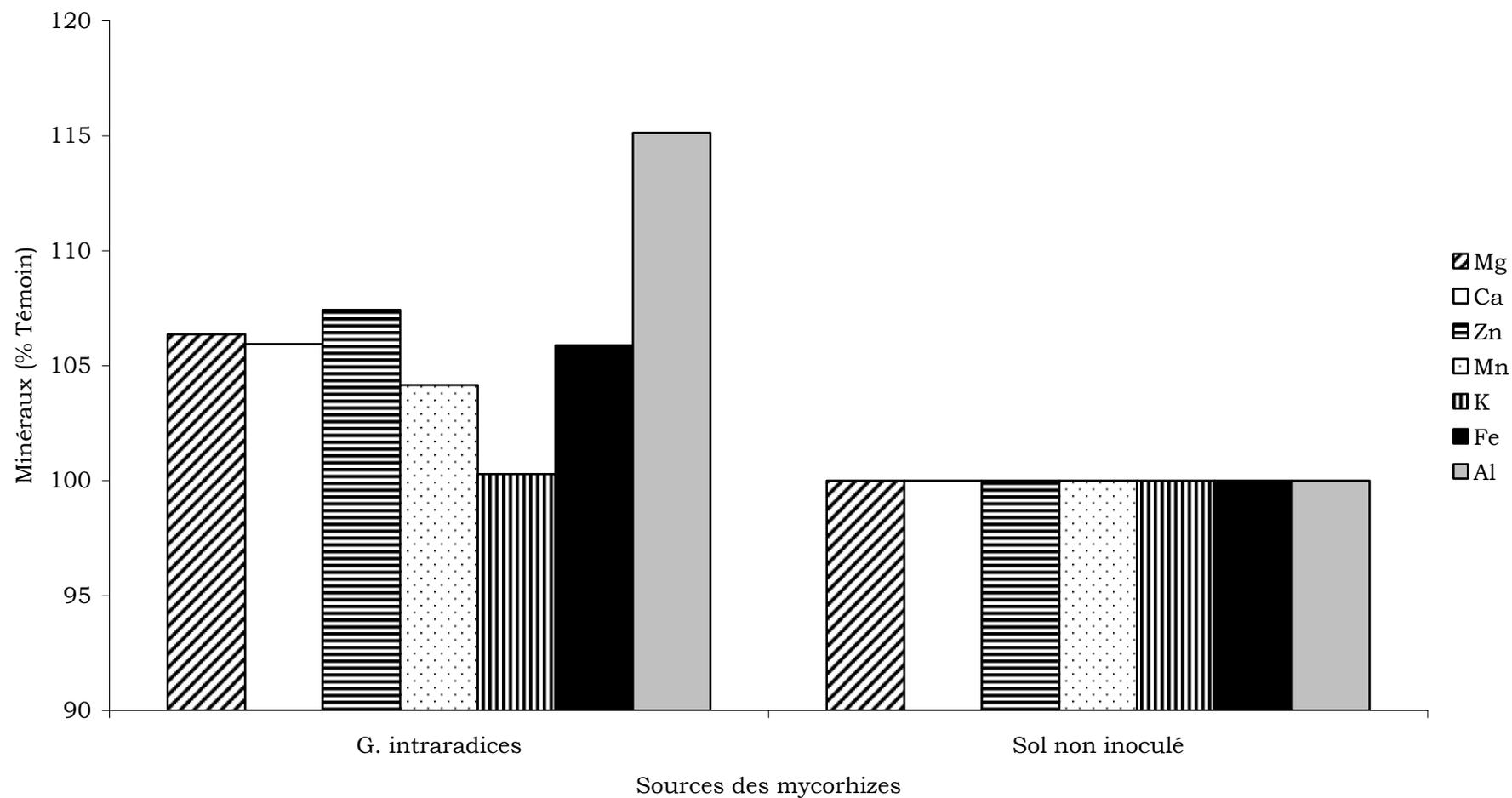


Figure 12 : Effet de l'inoculation du blé cultivé au champs, avec *G. intraradices* sur l'assimilation totale du Mg, Ca, Zn, Mn, K, P, Fe et Al.

En tenant compte de tous les traitements de fertilisation et d'inoculation mycorhizienne, l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le P (MSP) augmenté de 8 à 54 % le contenu du blé en éléments minéraux du blé comparé aux témoins non fertilisés et non inoculés. Cependant, il est à noter que l'absorption des minéraux par le blé varie en fonction de l'interaction source de phosphore x mycorhise x MSP. Ainsi, en présence de PNT, l'inoculation avec les MSP et *G. intraradices* a occasionné une hausse du contenu en minéraux du blé avec une plus forte absorption de l'Al et du P. La Figure 12, montre que l'accumulation de l'aluminium dans les feuilles de blé tend à augmenter le contenu total en P du blé. Le blé (cv. Tétrà) a montré une forte capacité d'accumulation de l'aluminium en présence de la bactérie BR2 et de Gi, ce qui fait de lui un candidat potentiel pour détoxifier les sols contaminés par cet élément.

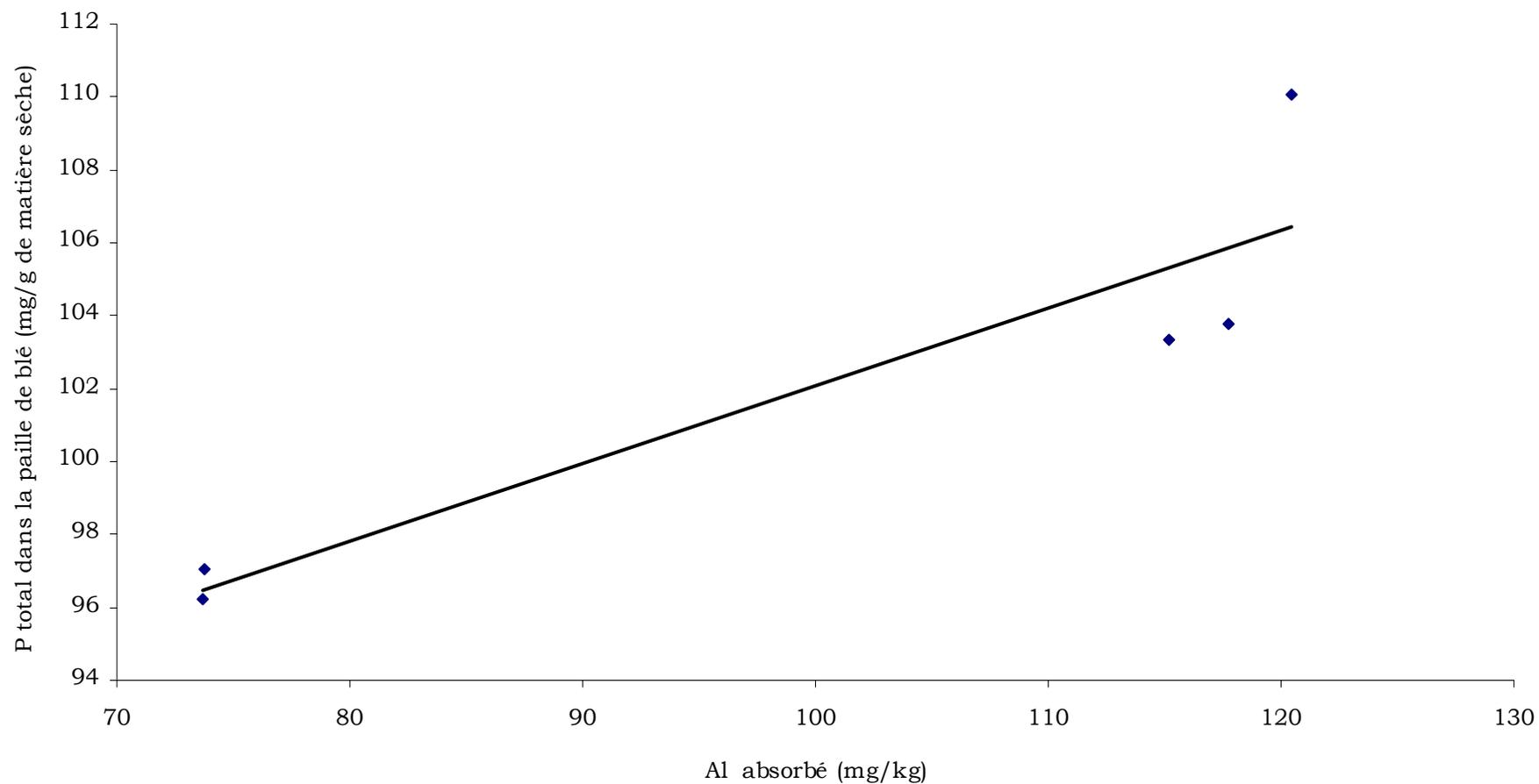


Figure 13 : Relation entre l'accumulation d'Al dans la paille du blé et l'absorption du phosphore par le blé fertilisé avec le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) et inoculé avec *G. intraradices* et les MSP.

Cette étude montre qu'il est possible sous conditions de culture au champ au Mali d'obtenir des productions de graines de blé comparables à celles obtenues avec le DAP, en utilisant le phosphate naturel de Tilemsi (PNT) produit localement combiné aux MSP et aux champignons mycorhiziens.

La rhizobactérie *Pseudomonas* sp. améliore significativement la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens, la croissance et la production du blé. Cependant, son efficacité dépend de son pouvoir à coloniser efficacement les racines. Aussi, nous présentons dans la section suivante, les résultats de l'essai d'inoculation du blé avec une souche de *Pseudonymes* sp. résistante à la rifampicine (BR2rif⁺) visant à vérifier la compétitivité de BR2rif⁺.

3.1.4 Effet de l'inoculation avec *Pseudomonas* sp. (BR2) sur la répartition des microorganismes rhizosphériques et la colonisation des racines.

3.1.4.1 Colonisation des racines du blé par *Pseudomonas* sp. BR2rif⁺

La bactérie *Pseudomonas* sp. BR2 résistante à la Rifampicine (BR2rif⁺) issue de la culture de la bactérie *Pseudomonas* sp., isolée de la rhizosphère du blé du Mali, a été utilisée pour vérifier la capacité de la bactérie *Pseudomonas* sp à coloniser les racines du blé dans un essai en tube, effectué selon la méthode de [Scher et al. \(1984\)](#). Le taux d'inoculation de BR2rif⁺ varie entre $1,2 \times 10^3$ et $2,4 \times 10^8$ ufc/graine (Tableau 33). Le test de Bartlett a indiqué une hétérogénéité de la variance des données. Aussi, avant d'effectuer l'analyse de la variance, nous avons procédé à la transformation logarithmique ((log(ufc+1)) des données. L'analyse de la variance effectuée pour le taux de colonisation (Tableau 32) a montré que le taux d'inoculation des graines par la bactérie *Pseudomonas* sp (BR2rif⁺) affecte significativement la colonisation de la rhizosphère du blé par la bactérie introduite. L'interaction, entre le taux d'inoculation des graines et le type de sol, était très significative. Ce qui indique, qu'en fonction du type de sol, le taux d'inoculation des graines, affecte différemment la colonisation des racines du blé par la bactérie (Tableau 33).

Tableau 32 : Analyse de la variance pour le taux de colonisation des racines du blé inoculé par *Pseudomonas* sp. BR2rif⁺

Sources de variations	Moyenne des carrées	
	dl	Nombre de graines germées
Sols	1	0,003 ns
répétitions	5	0,06 **
Sols*répétitions	5	0,001
Taux d'inoculation	6	8,6 ***
Sols*taux d'inoculation	6	0,2 ***
Répétitions*sols*taux d'inoculation	60	0,003

* *** significatifs aux seuils de 0.05 et 0.00

Le test du LSD protégé de Fisher a permis de constater que la bactérie est très efficace dans les deux sols si elle est inoculée au taux de $1,3 \times 10^5$ ufc/graine (Tableau 33). Aucune bactérie BR2rif⁺ n'a été détectée chez les plantes non inoculées dans les deux types de sol. De même, dans le sol non autoclavé, la bactérie *Pseudomonas sp. Rif⁺* n'a pas été détectée lorsque les graines étaient inoculées au taux de $1,3 \times 10^3$. Cependant, BR2rif⁺ a été détectée dans le sol autoclavé à tous les taux d'inoculation, suggérant ainsi une faible compétitivité de cette bactérie si elle est inoculée à un taux inférieur ou égal à $1,3 \times 10^3$. Malgré tout, aucune différence significativement n'a été observée quand au comportement des deux types de sol (autoclavé ou non) sur la capacité de BR2rif⁺ à s'installer dans la rhizosphère du blé (Tableau 34).

Tableau 33 : Effet du taux d'inoculation de la bactérie *Pseudomonas sp rif⁺* sur la colonisation des racines par la bactérie après 30 jours de croissance.

<i>Pseudomonas sp</i> résistant à la rifampicine		
Inoculation (ufc/graine)	sol non autoclavé Log(ufc+1)/g de sol rhizosphérique	Sol autoclavé Log(ufc+1)/g de sol rhizosphérique
Non inoculé	0,0 f	0,0 f
$1,2 \times 10^3$	0,0 f	0,4 e
$1,5 \times 10^4$	0,6 e	0,8 d
$1,3 \times 10^5$	3,3 a	3,2 a
$3,6 \times 10^6$	3,1 b	1,9b
$1,3 \times 10^7$	1,6 c	1,1 c
$2,4 \times 10^8$	1,6d	1,1 c
Test F	***	***

* Les valeurs représentent la moyenne de cinq répétitions.

^a Bactérie non détectée

*** Significatif au seuil de 0.00

Tableau 34 : Compétitivité de *Pseudomonas* sp. BR2rif⁺ dans le sol

Types se sol	log(ufc/g de sol rhizosphérique)
Non autoclavé	1,1 a
Autoclavé	1,08 a
Test de F	ns

ns : Non significatif au seuil de 0,05

Dans la même colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 0,05

Après 30 jours de croissance, les densités de BR2rif⁺ dans la rhizosphère du blé variaient de $2,7 \times 10^4$ à $1,8 \times 10^6$ cfu/gramme de sol rhizosphérique. En considérant qu'on a une bonne colonisation à chaque fois les valeurs obtenues sont $\geq 6 \times 10^3$ cfu/gramme de sol, BR2rif⁺ inoculé à des taux allant de 10^4 à 10^8 cfu/graine, s'est avéré bon colonisateur de la rhizosphère du blé (Tableau 35)

Tableau 35 : Effet du taux d'inoculation de la bactérie *Pseudomonas* sp. rif⁺ sur la colonisation des racines par la bactérie après 30 jours de croissance.

<i>Pseudomonas</i> sp. résistante à la rifampicine		
Inoculation (cfu/graine)	sol non autoclavé	Sol autoclavé
	ufc/g de sol rhizosphérique	ufc/g de sol rhizosphérique
$1,2 \times 10^3$	nd	$1,5 \times 10^4$
$1,5 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$
$1,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
$3,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$8,9 \times 10^5$
$1,3 \times 10^7$	$3,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
$2,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$

*Les valeurs représentent la moyenne de six répétitions.

nd : Non détecté

Cependant nous avons constaté qu'à partir de $1,3 \times 10^5$, plus le taux d'inoculation augmente, plus la densité bactérienne par gramme de sol rhizosphérique baisse.

3.1.4.2 Effet de *Pseudomonas sp.* (BR2) sur la population microbienne totale et solubilisant le phosphore

L'analyse de la variance effectuée sur les valeurs transformées des différentes variables mesurées sur le blé, a montré que les sources de phosphore affectent significativement toutes les variables mesurées, mis à part le contenu en phosphore de la paille de blé (Tableau 36). De même, les traitements affectent significativement les différentes variables mesurées sur le blé. Aussi, toutes les interactions sources de phosphore et traitements étaient significatives, indiquant que les effets des traitements variaient en fonction de la source de phosphore (Tableau 36).

Tableau 36 : Résumé des analyses de variance pour les différentes variables mesurées sur le blé inoculé avec *Pseudomonas* sp. rif^r et fertilisé avec le phosphate naturel de Tilemsi.

Sources de variations	Moyenne des carrées								
	dl	Bactéries	Champignons	BSP	CSP	BR2rif+	% colonisation	paille	P paille
Sources de P	1	1 ***	0,09 *	3,5 ***	2 ***	0,1**	24,5 **	0,7 ***	0,0003 ns
Répétitions	5	0,007 ns	0,04 ns	0,02 *	0,01*	0,02 ns	1,2 ns	0,04 ns	0,002 ns
Erreur 1	5	0,006	0,02	0	0,06	0,007	4	0,04	0,002
Traitements	3	0,3 ***	0,03 ***	2,2 ***	1,05 ***	155,2 ***	42,9 ***	2,3 ***	0,05 ***
Sources de P*traitements	3	0,6 ***	0,1 ***	0,9 ***	0,6 ***	0,05 *	1,9 *	0,1 **	0,03*
Erreur 2	30	0,01	0,02	0,01	0,005	0,02	2,7	0,03	0,009

* ** *** significatifs aux seuils de 0,05; 0,01 et 0,00

L'application de PNT a entraîné une augmentation significative de population bactérienne totale et solubilisant le phosphore comparativement au témoin non fertilisé (Figure 14). De même, les champignons totaux et solubilisant le phosphore ont significativement augmenté après application du phosphate naturel de Tilemsi (Figure 15).

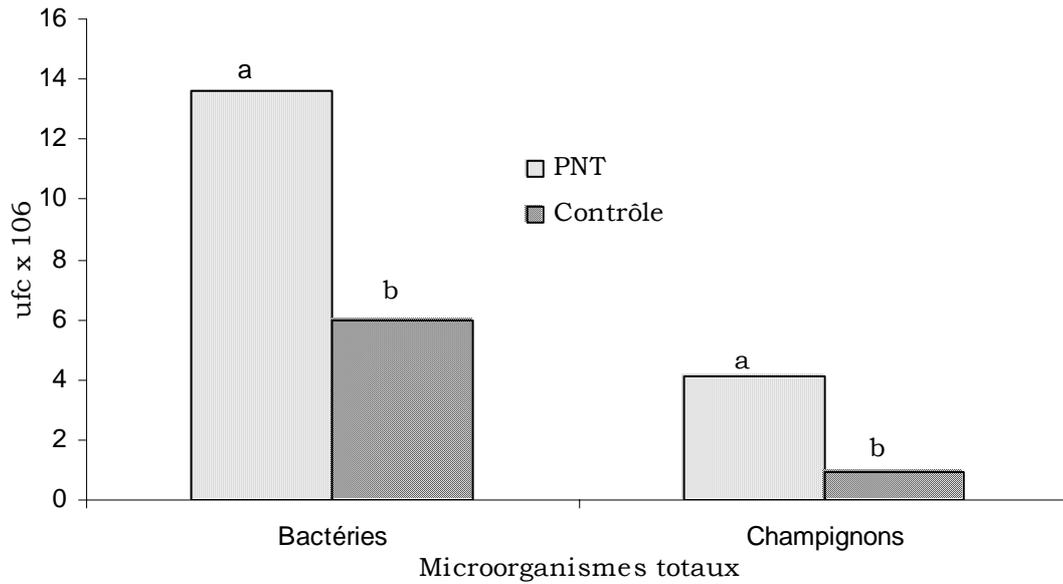


Figure 14 : Effet du phosphate naturel de Tilemsi sur microorganismes rhizosphériques totaux

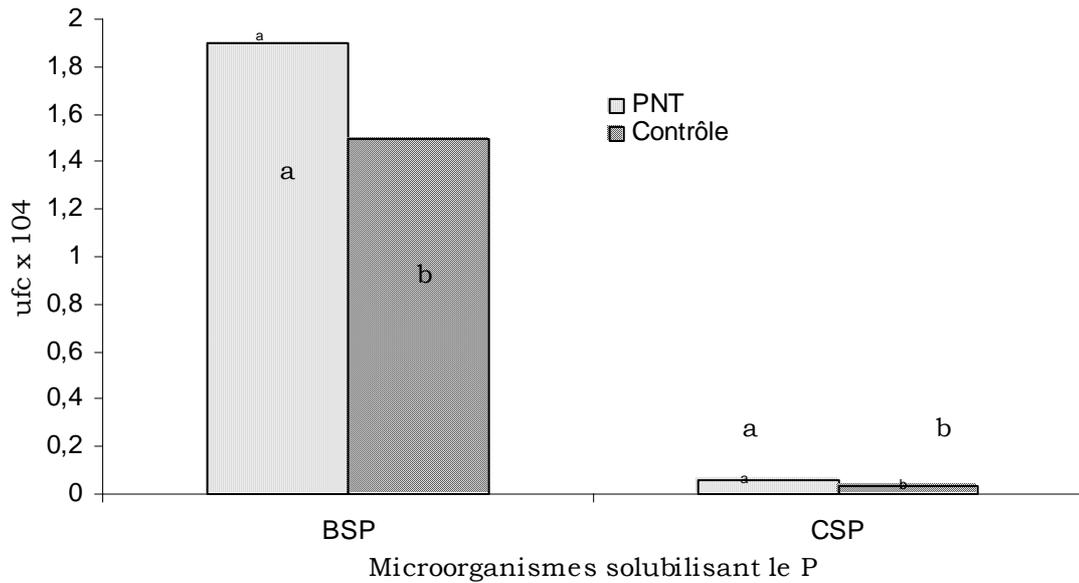


Figure 15 : Effet du phosphate naturel de Tilemsi sur microorganismes rhizosphériques solubilisant le phosphore.

En absence de fertilisation phosphatée, l'inoculation avec *Pseudomonas sp.* (BR2) seul ou combiné à Gi, n'a occasionné aucune augmentation significative de la population bactérienne totale, mais a provoqué une hausse significative des microorganismes solubilisant le phosphore, comparativement au témoin non inoculé (Figure 16). La population bactérienne totale a significativement baissé en présence de Gi. Après application du phosphate naturel de Tilemsi, l'inoculation avec BR2rif^r, seul ou combiné à Gi, a entraîné une hausse significative de la population bactérienne totale et solubilisant le phosphore. Le traitement combinant BR2rif^r et Gi a donné la plus forte augmentation de la population bactérienne solubilisant le phosphore (Figure 16).

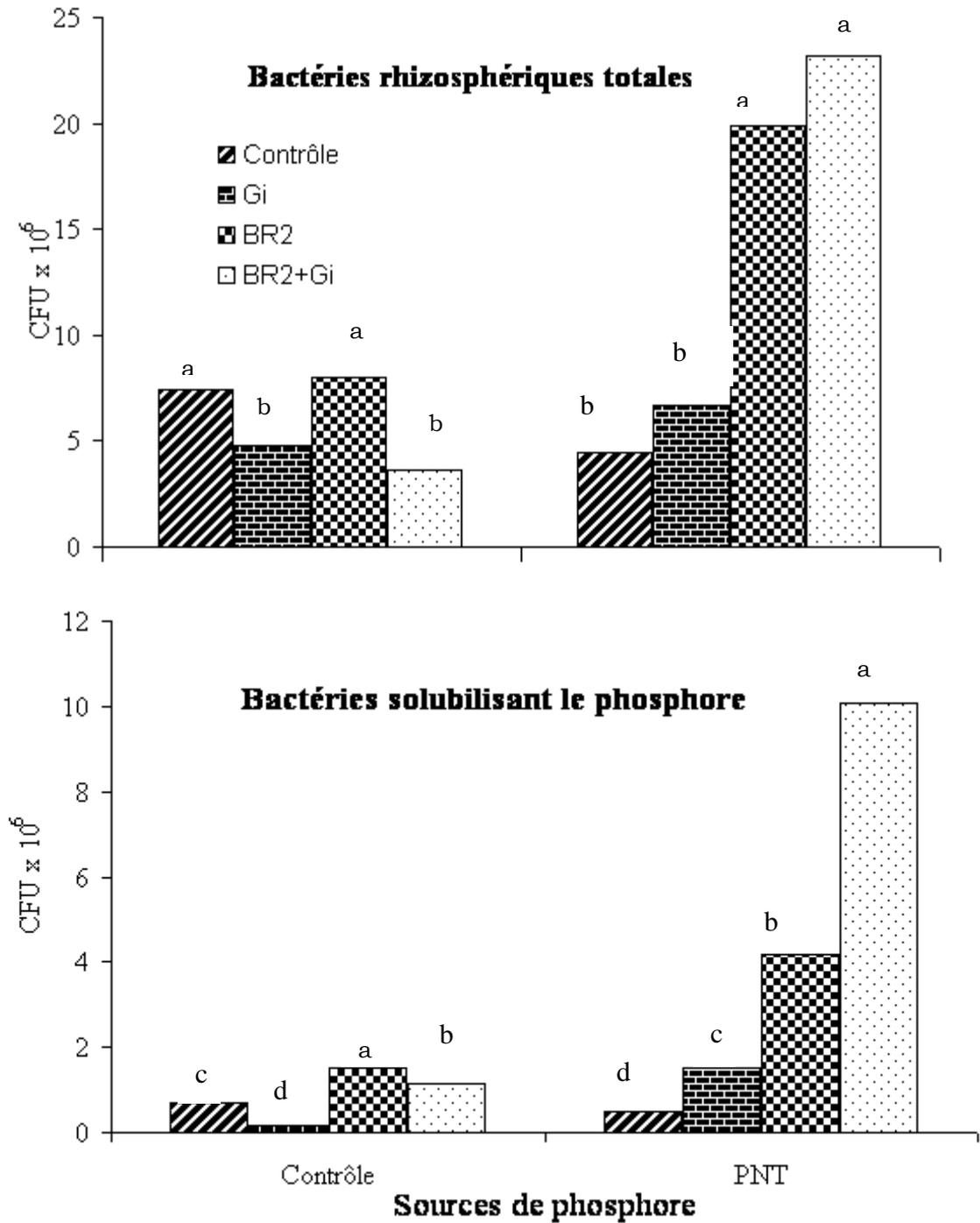


Figure 16 : Effet de l'inoculation avec *Pseudomonas sp.* (BR2 rif^r) et *Glomus intraradices* (Gi) sur le nombre de bactéries totales et solubilisant le phosphore.

Dans le sol non fertilisé, l'inoculation avec BR2rif⁺ n'a occasionné aucune augmentation significative des champignons totaux, mais a provoqué une hausse de la population des champignons solubilisant le phosphore (Figure 17). Inoculé seul, *Glomus intraradices* (Gi), n'a pas eu d'effet significatif sur les champignons totaux, mais, a provoqué une augmentation significative des champignons solubilisant le phosphore (Figure 17). Cependant, malgré la baisse significative des champignons rhizosphériques totaux qu'elle occasionne, l'inoculation avec BR2 en présence de Gi a significativement augmentée le nombre de champignons solubilisant le phosphore. Aucun effet significatif des traitements d'inoculation sur la population totale des champignons, n'a été observé après application de PNT (Figure 17). Cependant, la plus forte augmentation des champignons solubilisant le phosphore a été observée après application du PNT et inoculation avec BR2rif⁺ + Gi, confirmant l'effet positif de la symbiose mycorhizienne sur les microorganismes solubilisant le phosphore.

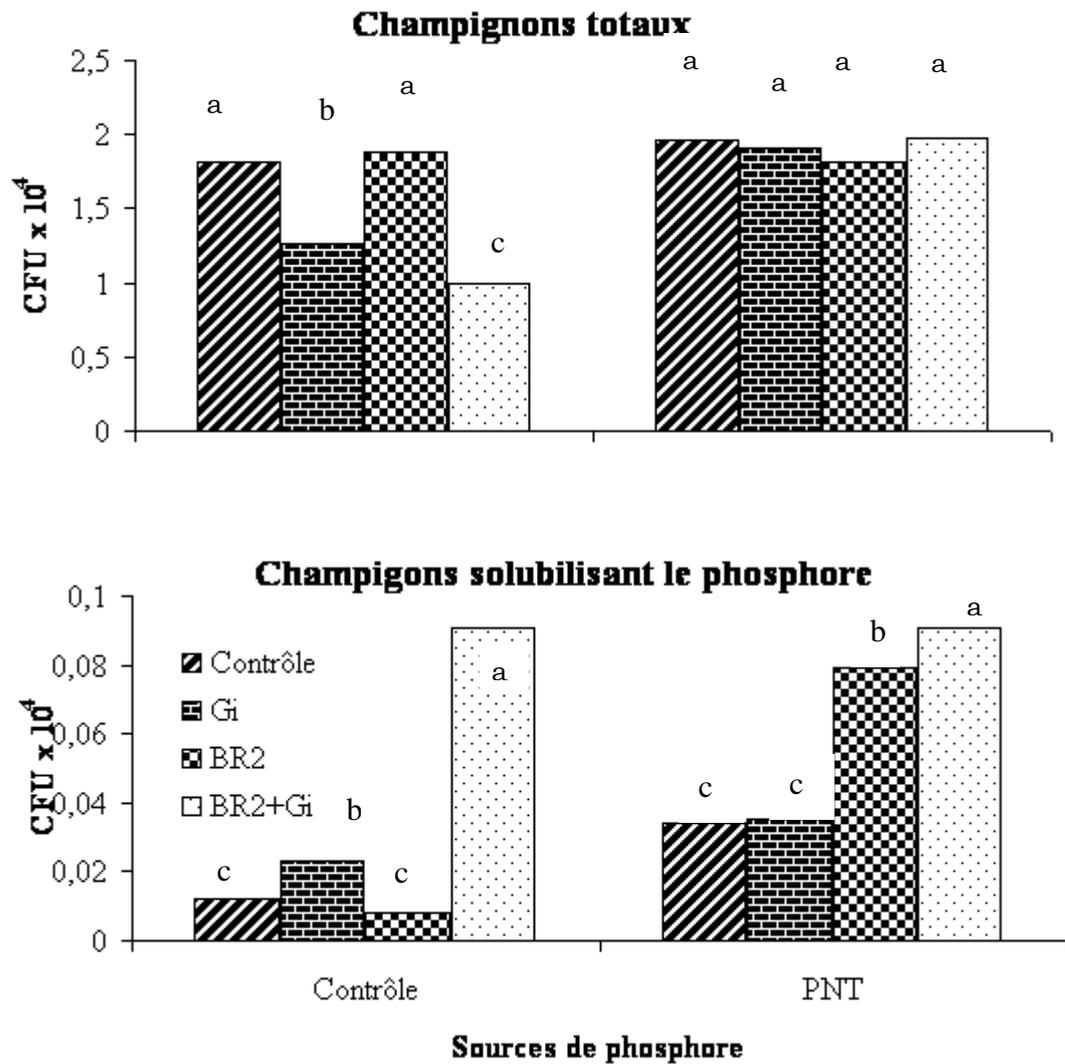


Figure 17 : Effet de L'inoculation avec *Pseudomonas sp.* (BR2rif⁺) et *Glomus intraradices* (Gi) sur les champignons rhizosphériques totaux et solubilisant le phosphore présentes dans la rhizosphère du blé après 6 semaines de croissance. Les valeurs (cfu/g de sol sec) représentent la moyenne de six répétitions.

3.1.4.3 Colonisation des racines du blé par les mycorhizes indigènes et *Glomus intraradices* (Gi).

En absence de fertilisation, les mycorhizes indigènes colonisent seulement 6,75% de la longueur des racines du blé. Après 30 jours de croissance, ce très faible taux de colonisation a été significativement amélioré par l'application du PNT (Tableau 37).

Tableau 37 : Effet de l'ajout du phosphate naturel de Tilemsi, sur la colonisation des racines du blé par *Pseudomonas sp.* et par les champignons mycorhiziens.

Sources de P	Racine		Ppaille (mg/g de	
	BR2rif ⁺	(%colonisation)	Paille (mg/tube)	MS)
PNT	3,2 a	5,6 a	2,0 a	0,3 a
Contrôle	3,1 b	4,1 b	1,8 b	0,3 a

BR2rif⁺ : Bactérie *Pseudomonas sp.* résistante à la rifampicine.

(%colonisation) : Valeurs du pourcentage de colonisation des racines par les mycorhizes ayant subies une transformation racine carrée.

Ppaille : P total de la paille de blé.

MS : Matière sèche végétale.

Généralement l'inoculation avec *Pseudomonas sp.* a permis d'augmenter le pourcentage de racines colonisées (Tableau 38). Après application de PNT, l'inoculation avec *Pseudomonas sp. rif⁺* a significativement augmenté le pourcentage de colonisation des racines du blé par les champignons mycorhiziens, comparativement au sol fertilisé et non inoculé. Le potentiel de mycorhisation naturel du sol d'expérience est très faible, cependant, l'inoculation avec *Pseudomonas sp.* dans le sol contrôle non fertilisé ou le sol fertilisé avec le PNT a provoqué une amélioration significative de la colonisation des racines. Dans les sols inoculés avec *Glomus intraradices*, l'inoculation avec *Pseudomonas sp.*, n'a pas amélioré la colonisation des racines, comparativement à l'inoculation avec BR2 seul (Tableau 38). Cependant, l'inoculation avec la bactérie *Pseudomonas sp* (BR2) + *Glomus intraradices* en présence de PNT a donné le plus fort taux de colonisation des racines de blé par les mycorhizes qui est de 67,25%, soit une augmentation de 52% par rapport au témoin fertilisé et non inoculé.

Tableau 38 : Effets de l'inoculation avec *Pseudomonas sp.* (BR2) et de l'application du PNT sur la colonisation des racines du blé.

Traitements	Sources de phosphore	
	Contrôle	PNT
	Racine (% de colonisation)	Racine (% colonisation)
Contrôle	2,6 b	3,8 c
<i>Glomus intraradices</i>	2,5 b	4,0bc
BR2rif ^a	5,7 a	6,3 ab
BR2rif ^a + <i>Glomus intraradices</i>	5,6 a	8,1 a

^a Chaque valeur représente la moyenne de six répétitions

Dans la même colonne, les différences significatives observées entre les traitements selon le test du LSD à $p \leq 0,05$ sont indiquées par des lettres différentes.

3.1.4.4 Effet de *Pseudomonas sp.* sur la production de matière sèche et le contenu en phosphore du cultivar de blé Tétrà.

La comparaison des données présentées dans le Tableau 39, montre les relations entre l'établissement de *Pseudomonas sp.* dans la rhizosphère et la réponse du blé. L'analyse de ces données montre que l'inoculation avec *Pseudomonas sp.* sans application de PNT provoque une augmentation de 0,700g/tube et de 0,11mg de P/tube, respectivement de la biomasse et du contenu total en P du blé comparé au témoin non inoculé. Des augmentations plus importantes de la biomasse et du contenu total en P du blé ont été observées après inoculation avec *Pseudomonas sp.* et application de PNT. [Sundara et al. \(2002\)](#), étudiant l'influence des bactéries solubilisant le phosphore (BSP) sur le contenu en phosphore soluble du sol, ont montré que l'influence des BSP est plus importante lorsque la fertilisation phosphatée est, en partie, constituée de roche phosphatée. L'inoculation avec *G. intraradices* et *Pseudomonas sp.* en présence de PNT a été le traitement ayant le plus amélioré la biomasse et le contenu total en phosphore de la paille de blé.

Tableau 39 : Effets de l'inoculation avec la bactérie *Pseudomonas* sp. résistante à la rifampicine (BR2rif⁺) sur la production de paille et le contenu en phosphore total de la variété de blé Tétrà, après 6 semaines de croissance^a.

Traitements	Sources de phosphore					
	Contrôle			PNT		
	BR2rif ⁺ Log(ufc+1)	Paille (mg/tube)	P paille (mg/g MS)	BR2rif ⁺ Log(ufc+1)	Paille (mg/tube)	P paille (mg/g MS)
Contrôle	0,00 b	1,33d	0,21 b	0 b	1,42 c	0,26 c
<i>G. intraradices</i>	0,00 b	1,51 c	0,25 b	0 b	1,93 b	0,24 d
BR2rif ⁺	6,11 a	2,03 b	0,32 a	6,26 a	2,00 b	0,32 b
BR2rif ⁺ + <i>G. intraradices</i>	6,13 a	2,16 a	0,38 a	6,40 a	2,65 a	0,37 a

^a Les valeurs de la réponse pour chaque variable représentent la moyenne de six répétitions.

Dans la même colonne, les différences significatives observées entre les traitements selon le test du LSD à $p \leq 0,05$ sont indiquées par des lettres différentes.

MS : Matière sèche.

Ufc : Unité formant des colonies

L'amélioration de l'absorption du phosphore par le blé semble être due à l'amélioration de la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens. En effet l'analyse de la Figure 18, montre que les augmentations du taux de colonisation des racines par les champignons mycorhiziens comptent pour une part importante dans l'amélioration du contenu total en phosphore de la paille de blé déterminé après 30 jours de croissance.

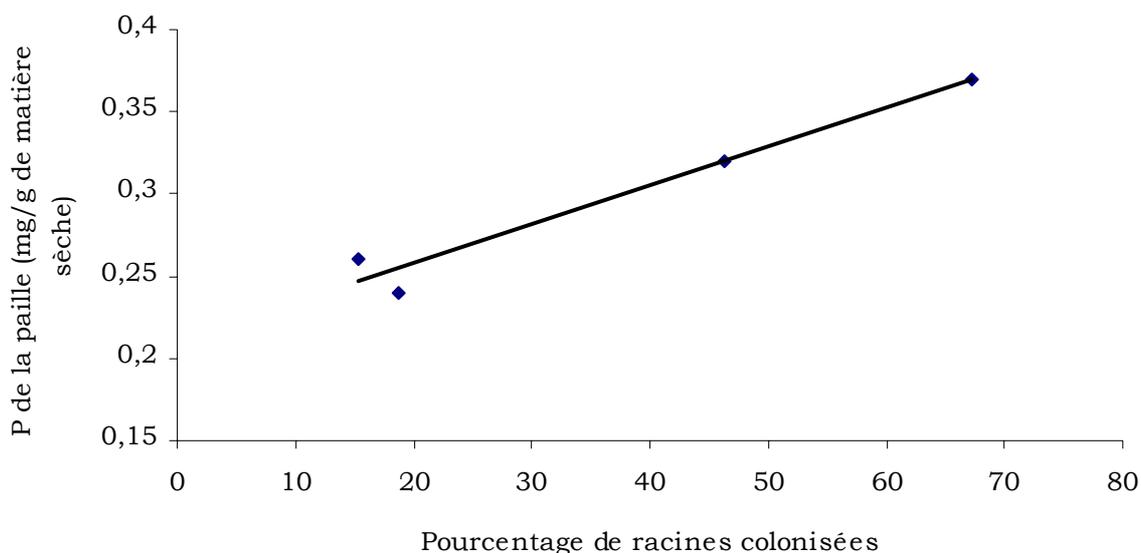


Figure 18 : Relation entre le pourcentage de la longueur des racines colonisées par les champignons mycorhiziens et l'absorption du phosphore par la variété de blé Tétrà

En absence de fertilisation phosphatée, la colonisation des racines du blé par *G. intraradices*, n'a occasionné aucune amélioration significative de la population de *Pseudomonas sp.* rhizosphériques, comparativement aux témoins inoculés avec la bactérie en absence du champignon mycorhizien. Cependant, [Villegas et al. \(1996\)](#), ont montré que *G. intraradices* peut fortement augmenter, localement, le pH du milieu créant ainsi une importante différence entre le compartiment contenant uniquement le mycélium extra radial de *G. intraradices* (pH supérieur à 9).

La bactérie *Pseudomonas sp.* a stimulé l'absorption du phosphore et la production de la biomasse du blé, aussi bien, dans les parcelles fertilisées, que, dans les parcelles non fertilisées, suggérant ainsi que cette rhizobactérie agit probablement en mettant le phosphore du sol ou du PNT à la disposition des plantes ou en produisant des acides aminés, des vitamines ou des hormones qui favorisent la croissance des plantes en

luttant contre certaines maladies fongiques ou en facilitant l'absorption du P. Les rapports de plusieurs chercheurs ont montré que les interactions observées entre bactéries et champignons, associés à la rhizosphère des plantes, améliorent fortement la mise en disponibilité du phosphore en contribuant grandement à son recyclage biogéochimique. Ainsi, [Toro et al. \(1997\)](#), étudiant l'effet interactif des bactéries solubilisant le phosphore et les mycorhizes à vésicules et arbuscules sur l'utilisation des sources de P faiblement bio disponibles (endogènes ou ajoutées sous forme de roche phosphatée), ont montré que plus de 75% du phosphore obtenu après bi inoculation des plantes dérivent de la roche phosphatée appliquée.

3.2 Discussions

Les microorganismes solubilisant le phosphore ont été trouvés dans tous les sols de cette étude, mais leur nombre varie d'un sol à l'autre. Les populations bactériennes de tous les sols étaient supérieures à celle du sol S3, malgré tout c'est dans ce sol qu'on retrouve le plus de bactéries solubilisant le phosphore, indiquant que la quantité de bactéries solubilisant le phosphore (BSP), ne dépend pas toujours de l'importance de la microflore totale. L'importance des bactéries solubilisant le P dans le sol S3 par rapport aux autres sols peut s'expliquer par le fait que, c'est dans ce sol qu'on retrouve le plus de matière organique pouvant supporter la croissance de ces bactéries. En plus, le pH très bas des autres sols, peut défavoriser la croissance des bactéries solubilisant le phosphore. Néanmoins, l'incidence des bactéries solubilisant le phosphore dans la microflore totale de tous les sols, était toujours supérieure à celle des champignons solubilisant le phosphore. Cependant, malgré la faiblesse du pourcentage de champignons solubilisant le phosphore (CSP) par rapport à la microflore totale, la quantité de phosphore assimilable des sols, varie plus en fonction du nombre de CSP, ce qui peut s'expliquer, en partie, par la plus grande biomasse produite par les champignons comparés aux bactérie. Les précédents rapports de plusieurs chercheurs ont montré que les champignons sont plus efficaces dans la solubilisation des phosphates naturels que les bactéries ([Kucey, 1983](#)). Les populations de MSP dans la rhizosphère (Zone d'interactions intenses entre les racines et les microorganismes) de tous les cultivars de blé testés étaient supérieures à celle du sol non rhizosphérique (sol qui se trouve en dehors de la zone d'interactions intenses entre les racines et les microorganismes), indiquant que les 3 cultivars de blé utilisés dans cet essai semblent stimuler les populations de microorganismes rhizosphériques solubilisant le phosphore (MSP). Ces résultats sont accord avec ceux de plusieurs chercheurs qui ont montré que les racines des plantes stimulent préférentiellement les microorganismes solubilisant le phosphore et que l'intensité de la stimulation est fonction de la plante cultivée et des conditions du milieu ([Asea et al., 1988](#); [Cunningham et Kuick, 1992](#)).

Aucun halo de solubilisation n'a été détecté autour des colonies de BR2 et de B3 au cours du test de solubilisation effectué sur milieu solide malgré que, ces bactéries aient été isolées sur cette base. Ce qui peut s'expliquer par la faible diffusion dans le milieu solide, des acides produits par ces bactéries au cours de leurs croissances. Cependant, malgré l'absence de l'halo de solubilisation autour des colonies de BR2 et B3, ces deux bactéries ont pu solubiliser le phosphore en milieu liquide. BR2 a même solubilisé plus de phosphore que toutes les autres bactéries, suggérant qu'il serait préférable, avant de sélectionner les microorganismes à utiliser comme inoculant de mesurer en plus du halo

de solubilisation sur milieu solide, la quantité de P solubilisé en milieu liquide. Ces résultats appuient ceux de [Nautiyal \(1999\)](#) et de [Johri et al. \(1999\)](#), qui indiquent que le critère d'isolement des MSP sur la base de la formation du halo de solubilisation sur milieu solide, n'est pas un critère infallible. Au cours de cette expérience, tous les isolats testés produisent un ou des mélanges d'acides organiques à faible poids moléculaire. Cependant, les isolats qui produisent plus d'acide citrique ont plus solubilisé le phosphore du phosphate naturel de Tilemsi que les autres, suggérant que cet acide est le plus efficace dans la solubilisation du PNT. Ces résultats sont en accord avec ceux de [Reyes et al. \(1999a et 2001\)](#), indiquant que la solubilisation de différentes sources de phosphore par *Penicillium rugulosum* et sa souche mutante Mps⁺⁺, est principalement due à la production d'acides organiques à faible poids moléculaire. Ils ont aussi indiqué que l'acide citrique semblait être le principal acide en cause. De même, [Fenice et al. \(2000\)](#) ont observé la production, en grande quantité, d'acide gluconique et la solubilisation des phosphates inorganiques par *Penicillium variable* P16 encapsulé.

L'inoculation des graines de blé par les microorganismes solubilisant le P, a significativement affectée la germination du blé. En effet, la plupart des bactéries ont stimulé la germination des graines. En plus, nous avons observé que, toutes les bactéries qui ont stimulé la germination du blé, dans cet essai, produisent en grande quantité des sidérophores ou de l'acide indole acétique. [Dommergues et al. \(1999\)](#), ont rapporté que certains microorganismes de la rhizosphère produisent des vitamines comme la thiamine, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique et autres, qui stimulent la germination et la croissance des plantes. Il serait donc possible que la stimulation de la germination observée avec ces bactéries, soit due à la production de ces substances ou à l'augmentation de la concentration de P du sol par ces organismes. Cependant, [Rodriguez et al. \(1998\)](#), ont montré que la déficience en phosphore augmente, non seulement, le temps de germination, mais aussi, le temps séparant l'émergence des premières feuilles et le tallage. Ce qui peut expliquer le temps de latence observé avec la majorité de nos isolats.

Dans les parcelles non fertilisées et non inoculées, la colonisation des racines du blé par les champignons mycorhiziens, après 45 jours de croissance, était très faible. Dans les écosystèmes semi-arides, la perturbation des sols (pâturage, érosion) entraîne une perte des propagules de mycorhize et une importante diminution des spores de mycorhize viables ([Diop et al., 1994](#), [McGee, 1989](#)). L'inoculation avec *Glomus intraradices* (Gi), en absence de tout traitement, n'a pas amélioré le taux de colonisation des racines du blé par les mycorhizes. Dans une expérience en pot, [Singh et Kapoor \(1999\)](#) ont obtenu une augmentation significative de la colonisation des racines de blé avec le champignon mycorhizien *Glomus* sp. 88, appliqué sous forme de mélange fragments de racines

mycorhizées de sorgho (*Pennisetum thyphoides*) et de sol. Cette procédure d'inoculation apporte probablement quelques substances nutritives non présentes dans la suspension pure de spores utilisée dans cet essai. La fertilisation avec le phosphate naturel de Tilemsi a augmenté le taux de colonisation des racines par les mycorhizes dans le traitement contrôle non inoculé, mais une augmentation plus substantielle a été observée chez les plantes inoculées avec Gi. Pour tous les traitements de fertilisation et d'inoculation avec les microorganismes solubilisant le phosphore, l'inoculation avec *Glomus intraradices*, a significativement augmenté la colonisation des racines du blé. En général, en présence de phosphate biammoniacal (DAP), le pourcentage de racines colonisées aussi bien par les champignons mycorhiziens indigènes que ceux introduits était toujours inférieur à celui observé dans les parcelles fertilisées avec le PNT ou non fertilisées. Nos résultats sont en accord avec les observations faites par [Graham et Abbott \(2000\)](#) indiquant que l'application d'une source de phosphore avec une grande quantité de phosphore soluble réduit le pourcentage des racines colonisées de plantes de blé de 42 jours. En plus, [Ruotsalainen et al. \(2002\)](#), étudiant la saisonnalité de la colonisation des racines des herbes qui croient en milieu pauvre, ont rapporté l'existence d'une corrélation positive significative entre la colonisation des racines et la concentration en P du sol. De même, des réductions considérables du pourcentage de colonisation des racines en fonction de la fertilisation phosphatée dans tous les systèmes culturaux avaient été rapportés ([Zhu et Smith, 2001](#) ; [Zhu et al., 2001](#)). Nos résultats sont, aussi, en accord avec les trouvailles de [Barea et al. \(1980\)](#) indiquant que les roches phosphatées ne réduisent pas le niveau d'infection par les champignons mycorhiziens. Quelque soit la source de phosphore appliquée, l'inoculation avec la bactérie solubilisant le phosphore *Pseudomonas* sp. BR2 augmente significativement la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens indigènes ou introduites. Le plus fort pourcentage de colonisation a été obtenu avec le blé fertilisé avec le PNT et inoculé avec *Glomus intraradices* et la bactérie *Pseudomonas* sp. (BR2). Ces résultats suggèrent que BR2 est une rhizobactérie qui favorise l'installation des mycorhizes. Des interactions synergiques entre bactéries et champignons mycorhiziens comme celle là sont bien documentées dans la littérature ([Barea et al. 2002](#)).

La fertilisation phosphatée et l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) et *G. intraradices*, ont significativement influencé la taille du blé. Pour tous les traitements combinés, la taille des plantes de blé a significativement augmenté après inoculation avec Gi et fertilisation avec le PNT ou le DAP. Dans les parcelles non fertilisées, les plantes de blé les plus hautes ont été obtenues lorsque le blé est inoculé avec Gi et la bactérie *Pseudomonas* sp. (BR2) ou *Penicillium chrysogenum* (C13). [Germida et Walley \(1996\)](#) ont observé que le poids sec des feuilles du blé de printemps cultivé au champ et inoculé avec les bactéries favorisant la croissance des plantes (BFCP), augmente ou diminue significativement en fonction des dates de récolte, de la location et

du genre de bactérie utilisée. Ces différences, bien que transitoires affectent significativement la récolte finale en graines.

En absence de tout traitement de fertilisation, l'inoculation du blé avec le champignon mycorhizien *Glomus intraradices* a produit la plus basse production de graines de blé et concentration en P. Dans les sols faibles en phosphore, l'inoculation avec des champignons mycorhiziens réduit la croissance du blé ([Graham et Abbott, 2000](#)). Dans notre étude, cet effet non bénéfique est corrigé par l'application du phosphate naturel de Tilsit (PNT) ou du phosphate ammoniacal (DAP) ou par l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le phosphore (MSP) testés. L'interaction positive observée entre le champignon mycorhizien *G. intraradices* et les MSP pour la production de paille est comparable à celui observé avec le blé cultivé au champ en Egypte, fertilisé avec le phosphate naturel et inoculé avec *Glomus constrictum* et deux champignons solubilisant le phosphore *Aspergillus niger* et *Penicillium citinum* ([Omar, 1998](#)). Les poils absorbants des racines peuvent augmenter de façon substantielle le contact racine sol, et jouer un rôle déterminant dans l'acquisition du P. [Gahoonia et al. \(1997\)](#) a trouvé que le nombre, la longueur et la surface occupée par les poils absorbants varient fortement d'un cultivar à l'autre. [Gulden et vessey \(2000\)](#) ont aussi observé que l'inoculation du pois (*Pisum sativum*, L) cultivé au champ avec *Penicillium bilaii* a eu pour résultat une augmentation de 22% de la proportion de racines contenant des poils absorbants et une augmentation de 33% de la moyenne de la longueur des poils absorbants des plants de blé. Dans le futur, des travaux doivent être réalisés dans le but de déterminer les effets de l'inoculation avec les MSP et les champignons mycorhiziens sur le développement des poils absorbants chez différents cultivars de blé. En absence de traitement de fertilisation, l'inoculation avec la combinaison BR2 + C1 avec ou sans *G. intraradices*, a donné les meilleurs résultats quant à la production de graines et à la concentration en P. Cette combinaison de MSP est aussi la meilleure pour la production de graines dans les parcelles fertilisées avec le PNT. En plus de son potentiel de bactérie favorisant l'installation des mycorhizes, la bactérie *Pseudomonas* sp. (BR2), comme d'autres MSP utilisés dans cet essai, est probablement une rhizobactérie favorisant la croissance des plantes (RFCP). Comme les plus fortes concentrations de P dans les graines ont été observées avec Gi + BR2 + Ci dans les parcelles non fertilisées ou fertilisées avec le PNT, la solubilisation du phosphore est probablement le mécanisme le plus important impliqué dans l'amélioration observée au niveau de la croissance. En effet, une augmentation significative de la solubilisation du phosphore a été observée après inoculation des racines de carottes transformées avec une bactérie solubilisant le P *Pseudomonas aeruginosa* et le champignon mycorhizien Gi ([Villegas et fortin 2001](#)). Différentes espèces de *Pseudomonas* ont stimulé la croissance du mycélium de spores de *Glomus mosseae* en germination dans un essai de colonisation des racines de tomate ([Barea et al., 1998](#)). D'autres études doivent être conduites pour évaluer la performance

de la combinaison Gi + BR2 + C1 dans différents types de sols et avec différents cultivars de blé. En effet, certains inoculant de rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (RFCP), peuvent différemment influencer les associations entre le blé et les champignons mycorhiziens aux champs ([Germida et Walley, 1996](#)). Le genre et l'espèce de champignons mycorhiziens impliqués ([Graham et Abbott, 2000](#)), le cultivar de blé ([Zhu et al., 2001](#)), et le contenu en P des graines ([Zhu et Smith, 2001](#)) constituent des facteurs additionnels qui peuvent significativement influencer cette symbiose. En tenant compte de tous les traitements de fertilisation et d'inoculation avec *G. intraradices*, l'inoculation avec les microorganismes solubilisant le P (MSP) a significativement augmenté le contenu du blé en éléments minéraux, comparativement aux non inoculés. Cependant, en présence de PNT, l'inoculation avec les MSP et *G. intraradices* a occasionné une hausse du contenu en minéraux du blé avec une plus forte absorption de l'Al et du P. En plus, en présence de PNT, une forte corrélation positive entre la quantité d'Al absorbée et le contenu en P du blé a été observée. Selon [Kochian et Jones \(1997\)](#), La toxicité de l'Al constitue un des facteurs les plus limitant de la production agricole dans le monde et est caractérisé par une inhibition de l'élongation et même de la division cellulaire. Ainsi, la stimulation de l'absorption de l'Al par les MSP constitue un élément très important car le sol de l'essai et le phosphate naturel de Tilemsi, contiennent des quantités importantes de cet élément pouvant empêcher l'absorption du phosphore en agissant sur le développement normal des racines. Aussi, en favorisant l'absorption de l'Al, les MSP offrent aux plantes un mécanisme de résistance à l'Al qui est toxique pour la plupart des plantes à une concentration $\geq 5 \mu\text{M}$. Plusieurs chercheurs ont montré que l'excrétion d'acides organiques est le mécanisme essentiel de résistance utilisé par les plantes exposées à l'Al ([Delhaise et al., 1993](#) ; [Pellet et al., 1995](#)). Les racines du blé exposées à des doses toxiques d'Al (spécialement sous forme Al^{3-}), sécrètent du malate dans l'apoplaste et la solution externe. Le malate sécrété forme rapidement des complexes avec l'Al dans l'apoplaste et dans la solution du sol, rendant ainsi l'Al non toxique et les racines 5 à 20 fois plus résistantes ([Delhaise et al., 1993](#)). Dans cet essai, ce mécanisme semble être en cause. En effet, dans les parcelles non fertilisées ou fertilisées avec le DAP, qui n'apportent pas des quantités supplémentaires d'Al au sol, la concentration d'Al dans les plantes de blé est très faible.

Pour qu'une bactérie soit efficace, elle doit pouvoir coloniser efficacement la rhizosphère. Aussi, nous avons effectué un test pour vérifier la capacité de la bactérie *Pseudomonas* sp. à coloniser la rhizosphère du blé. Les résultats obtenus ont montré que le taux d'inoculation des graines par la bactérie *Pseudomonas* sp. (BR2rif+) affecte significativement la colonisation de la rhizosphère du blé. Une interaction très significative a été observée entre le taux d'inoculation des graines et le type de sol (autoclavé ou non). Ce qui indique, qu'en fonction du type de sol, le taux d'inoculation des graines affecte différemment la colonisation des racines du blé par la bactérie. Dans

cet essai, nous avons constaté qu'à partir d'une concentration bactérienne de $1,3 \times 10^5$ sur les graines de blé, plus le taux d'inoculation augmente, plus la densité bactérienne par gramme de sol rhizosphérique baisse, suggérant qu'à partir de cette densité initiale sur les graines, la bactérie n'arrive pas à coloniser efficacement la rhizosphère du blé. Ce manque d'efficacité, peut s'expliquer par le fait que la bactérie n'arrive pas à bien se multiplier à partir de cette concentration, cela, à cause du manque d'éléments nutritifs ou de la présence dans la rhizosphère de substances défavorisant sa croissance. Les bactéries qui colonisent la rhizosphère directement après l'émergence de la plante, ont plus de chance de continuer à coloniser la coloniser durant toute la période de culture. En effet, La multiplication rapide des bactéries est nécessaire pour qu'elles puissent coloniser efficacement la rhizosphère directement après l'émergence des plantes. En plus, Les travaux de plusieurs chercheurs ont montré que la qualité et la quantité des éléments nutritifs déversés dans la rhizosphère peuvent sélectivement favoriser la croissance et la multiplication de certaines rhizobactéries ([Atkinson et al., 1975](#); [Miller et al., 1989](#)). La méthode de détection utilisée pour détecter la bactérie, peut aussi expliquer le fait que BR2 soit faiblement détecté dans la rhizosphère du blé à certains taux d'inoculation. En effet, le volume utilisé pour détecter la bactérie, dans la méthode de dilution étalé, peut dans certain cas être un facteur limitant du compte bactérien ([Klopper et Beauchamp, 1992](#)). Malgré tout, ce résultat ne concorde pas avec celui de [Scher et al. \(1984\)](#), qui n'ont obtenu aucune corrélation entre la densité de la population bactérienne des graines (entre 10^4 - 10^9 cfu/graine) et la densité de la population bactérienne rhizosphérique.

En absence de fertilisation phosphatée, l'inoculation avec BR2 seul, Gi seul ou les deux combinés n'a pas amélioré la population microbienne totale (bactéries + champignons). En plus, la présence de Gi a significativement baissé la population microbienne totale suggérant ainsi, une compétition entre les microorganismes rhizosphériques pour le peu d'éléments nutritifs présents dans le sol. La capacité des microorganismes indigènes et introduits à coloniser la rhizosphère des plantes, dépend de leur capacité à utiliser différents substrats du sol. Malgré la baisse de la population microbienne observée, l'inoculation avec Gi seul ou combiné à BR2, a significativement augmenté la population des microorganismes (Bactéries et champignons) solubilisant le phosphore, probablement parce que *Glomus intraradices* apporte des substances nutritives à la bactérie BR2 qui à son tour met le P du sol à sa disponibilité, malgré que ce dernier puisse probablement solubiliser le P. L'effet négatif de Gi sur la population bactérienne totale a été corrigé par l'application du phosphate naturel de Tilemsi,

qui a entraîné une augmentation significative des microorganismes (bactéries et champignons) totaux et solubilisant le phosphore. Ce résultat est en accord avec ceux

généralement obtenus faisant état d'une fluctuation de la population de champignons du sol après fertilisation ([Sarathchandra et al., 1993](#)). Cependant, au cours d'une expérience en serre, [Lima et al. \(1996\)](#) n'ont observé aucune variation de la population des champignons due à l'application de fertilisants. Le traitement combinant BR2rif⁺ et Gi a donné la plus forte augmentation de la population microbienne totale et solubilisant le phosphore. [Puppi et al. \(1994\)](#) ont indiqué que les microorganismes du sol stimulent la formation de symbioses mycorhiziennes et agissent sur les fonctions de celles-ci, tandis que, [Jeffries et Barea \(1994\)](#), annonçaient que la symbiose mycorhizienne peut contribuer à la mise en disponibilité d'éléments nutritifs pour les microorganismes de la rhizosphère. La bactérie *Pseudomonas* sp. en s'installant dans la rhizosphère du blé favorise la colonisation des racines du blé par les champignons mycorhiziens. Les taux de colonisation des racines du blé par les mycorhizes, étaient plus élevés après co-inoculation avec BR2 + Gi en présence ou non du phosphate naturel de Tilemsi. Ces résultats sont en accord avec ceux de [Prathibha et al. \(1995\)](#) qui ont observé que le nombre de spores et le pourcentage de colonisation des racines, étaient plus élevés chez les plantes inoculées avec *G. fasciculatum* + *Azospirillum* que chez celles, non inoculées, et ce, en présence ou non d'une source de phosphore. De même, [Toro et al. \(1997\)](#) ont pu augmenter de façon significative, le taux de colonisation des racines avec *G. intraradices* par l'addition de roche phosphatée et l'inoculation avec *B. subtilis*.

Conclusion

Ce travail montre que les microorganismes solubilisant le phosphore ne représentent qu'une faible proportion de la microflore totale des sols et de la rhizosphère des cultivars de blé étudiés. Cependant, les cultivars de blé Alkama béri et Tétrà semble stimuler les MSP au niveau de la rhizosphère et encore plus au niveau du rhizoplan. Les champignons qui ne représentent qu'une très faible proportion de la microflore totale solubilisent plus efficacement le P que les bactéries. Ainsi, de fortes relations ont été trouvées entre le nombre total de champignons, le nombre de champignons solubilisant le P et la quantité de P soluble des sols étudiés. Suite aux tests de solubilisation au laboratoire, six bactéries et 2 champignons solubilisant efficacement le P sur milieu solide et en milieu liquide ont été sélectionnés et caractérisés. Parmi les bactéries testées, BR2, BR10, B3 et B22 produisent des sidérophores et de l'acide indole acétique, tandis qu'aucune d'entre elle n'a produit de l'acide cyanhydrique.

Les expériences, aux champs, effectués au Mali ont montré que les organismes évalués améliorent la germination, la croissance et la production du blé en solubilisation le P du phosphate naturel de Tilemsi. Cependant vu que la stimulation de la germination n'a été observée que chez les bactéries sécrétant les phytohormones qui favorisent la colonisation des racines par les champignons mycorhiziens et améliorent la nutrition minérale et la croissance des plantes, nous pouvons dire que la stimulation de la croissance observée n'est pas due au seul fait de solubilisation du P. Afin d'affiner les conclusions de cet essai, nous avons évalué, au champ, l'effet de l'inoculation au champ avec les trois organismes qui ont donné les meilleurs résultats (C1, C13 et BR2) seul ou en combinaison champignon bactérie avec ou sans inoculation de champignon mycorhizien, sur la croissance, la production de graine et de paille, l'absorption du P et la mycorhization des racines par les champignons mycorhiziens.

Les résultats de cette expérience ont montré qu'il serait possible d'obtenir aux champs, au Mali, de bonnes récoltes de blé comparables à celles obtenues avec les fertilisants industriels. A défaut des engrais importés très coûteux et peu accessibles aux paysans à faibles revenus, le PNT avec un bon traitement d'inoculation représente une solution intéressante, aussi efficace que les fertilisants chimiques, pour la fertilisation du blé. Il est économiquement rentable d'utiliser le PNT traité avec un inoculant biologique pour la fertilisation du blé. Cependant, plusieurs autres essais dans plusieurs autres régions agricoles du Mali sont nécessaires pour tester l'efficacité de cet inoculant en présence de différentes communautés microbiennes du sol. Comme l'effet synergique entre les champignons filamenteux et les champignons VA est plus prononcé en présence de matière organique, la formulation d'inoculant devrait faire l'objet d'investigations futures.

Références bibliographiques

Aikio, S., Ruotsalainen, A. L. (2002). The modelled growth of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants under constant versus variable soil nutrient concentration. *Mycorrhiza*. 12: 257-261.

Altmore, C., Norvell, W. A., Björkman, T., Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphate and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (7): 2926-2933.

Alvey, S., Bagayoko, M., Neumann, G., Buerkert, A. (2001). Cereal/legume rotations affect chemical properties and biological activities in two west African soil. *Plant and soil*. 231: 35-54.

Andrade, G., Linderman, R. G., Bethlenfalvay, G. J. (1998). Bacterial association with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant and soil*. 202: 79-87.

Arihara, J., Karasawa, T. (2000). Effect of crops on arbuscular mycorrhizal formation and growth of succeeding Maize. *Soil Sci. Plant Nutr*. 46 (1): 43-51.

Arora, D., Gaur, A.C. (1978). Periodic microbial solubilization of ^{32}P labelled hydroxyapatite. *Indian J. Microbiol*. 18: 193 - 194.

Asea, P. E. A., Kucey, R.M.N., Stewart, J.W.B. (1988). Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil. Biol. Biochem*. 20: 459-464.

Atkinson, T. G., Neal, J. L., Larson, R. I. (1975). Genetic control of the rhizosphere microflora of wheat. In *Biology and control of soil-borne plant pathogens*. Edited by Bruehl. American phytopathological Society, St. Paul, Minn. Pp. 116-122.

Bakker, A. W., Schippers, B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* 19 (4): 451-457.

Banik, S., Dey, B. K. (1983). Alluvial soil microorganisms capable of utilising insoluble aluminium phosphate as a sole source of phosphorus. *Zbl. Mikrobiol.* 138: 437 - 442.

Barea, J. M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O'Gara F and Azcón-Aguilar, C. (1998). Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2304-2307.

Barea, J. M., Azcón, R. and Azcón-Aguilar, C. (2002). Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 343-351.

Barea J M, Escudero J L and Azcón-Aguilar C 1980 Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate-fixing soils as affected by P-fertilizers. *Plant and Soil* 54, 283-296.

Bationo, A., Ayuk, E., Ballo, D. and Koné, M. (1997). Agronomic and economic evaluation of Tilemsi phosphate rock in different agroecological zones of Mali. *Nutrient Cycling Agrosyst.* 48, 179-189.

Bationo, A., Mokwunye, A. U. (1991). Alleviating soil fertility constraints constraints to increased crop production in west Africa : the experience in the Sahel. *Fertilizer Research.* 29 (1) : 95 -115.

Bationo, A., Kaola, S, Ayuk. E. (1998). Fertlity of soil for cereal production in the sahelo-soudanian zone and evaluation of natural phosphates. *Cahiers Agricultures.* 7 (5): 365-371.

Baziramakenga, R., Simmard, R. R., Leroux, G. D. (1995). Determiration of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biol. Biochem.* 27 (3) : 349 – 356.

Beauchamp, C. J. (1992). Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *PHYTOPROTECTON.* 74: 19-27.

Bécard, G., Douds, D. D., Pfeffer, P. E. (1992). Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 821 – 825.

Berthelin, J., Leyval, C., Laheurte, F., De Giudici, P. (1991). Some considerations on the relations between phosphate solubilizing rhizobacteria and their effect on seedlings and plants growth related to phosphorus mobilization. Dans *plant growth-promoting rhizobacteria progress and prospects.* Éditeurs : Keel, C., Koller, B., Défago, G. IOBC-WPRS Bulletin. XIV (8): 359 - 538.

Bierman, B. Linderman, R. G. (1981). Quantifying vesicular arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. *New Phytol.* 87 : 63 - 67

Boiffin, J., Sebillotte, M. (1977). *Le phosphore et son emploi dans l'exploitation agricole.* Institut National d'Agronomie Ed. Paris.

Bolan, N. S. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil.* 134: 189-207.

Bolan, N. S., Elliott, J., Gregg, P.E.H., Weil, S. (1997). Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. *Biology and fertility of soils.* 24(2): 169-174.

Bric, J. M., Bostock, R. M., Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indolacetic production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 : 535 – 538.

Camara, I., Cescas, M.P., Karam, A., et Parent, L.E. (1987). Chimie du phosphore dans quelques sols de rizière de l'Afrique de l'ouest. *Naturaliste Canadien,* 114 : 141-149.

Cescas, M. P. (1972). Valeur agronomique comparative de phosphates naturels d'origine diverses. Rapport de recherches. Contribution numéro 150. Faculté des sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval, 58 pages. Compte rendu du congrès mondial des hyperphosphatiers, La Bretèche, France.

Chabot, R., Antoun, H. and Cescas, M., P. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Plant and Soil 184, 311-321.

Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M. P. (1993). Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. Can. J. Micribiol. 39: 941 - 947.

Chabot, R., Beauchamp, C. J., Kloepper, J. W. Antoun, H. (1998). Effect of phosphorus on root colonozation and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Soil Biol. Biochem. 30 (12): 1615-1618.

Chen, C. R., Condrón, L. M., Davis, M. R., Sherlock, R. R. (2002). Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial regrass (*Lolium perenne* L.) and radiate pine (*Pinus radiata* D. Don.). Soil biology and biochemistry. 34: 487 - 499.

Chien , S. H., Sale, P. W. G., Hammond, L. L. (1990). Comparison of the effectiveness of phosphorus fertilizer products. In: Proc. Symposium on phosphorus requirements for sustainable agriculture in Asia and Oceania: pp. 143 - 156. International Rice Reasearch Institute, Manila, Phillipines.

Chien, S. H. (1977). Thermodynamic considerations on the solubility of phosphate rocks. Soil Sci. 123: 117 - 121.

Chien, S. H., Menon, R.G. (1995). Agronomic evaluation of modified phosphate rock products. *Fer. Res.* 41: 197-209.

Cline, G. R., Powell, P. E., Szanizlo, P. J., Reid, C. P. P. (1982). Comparison of the abilities of hydroxyamic, synthetic, and other natural organic acids to chelate iron and other ions in nutrient solution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 1158-1164.

Cunningham, J. E., Kuick, C. (1992). Production of citric and oxalic acid and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium Bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1451-1458.

Daljeet, S., Singh, R., S., Kuldip, S., Singh, d., Sing, K. (2002). Study on the effect of *Glomus aggregatum* and phosphorus amendments on the colonization and spore population in chickpea. *Legume research.* 25 (2): 142-144.

Delhaize, E., Ryan, P., R., Randall, P., J. (1993). Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum*, L.) 2. Aluminium stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103 : 695 - 702.

Diop, T., Gueye, M., Dreyfus, B., Plenchette, C., Strullu D. G. (1994). Indigenous arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Acacia albida* Del. in different areas of Senegal. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3433-3436.

Domey, S., Lippmann, G. (1989). Stimulation of plant growth by phosphate solubilizing bacteria. Dans *Interrelationships between microorganisms and plants in soil*. Éditeurs : V. Vancura et F. Kunc. *Dev. Soil. Sci.* 18 : 457 – 461.

Dommergues, Y., Duhoux, E., Diem, H. G. (1999). Etablissement et fonctionnement des symbioses rhizobiennes. Dans les Editions espaces 34, les arbres fixateurs d'azote : caractéristiques fondamentaux et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux avec référence particulière aux zones subhumides et arides, pp. 1-31.

Doumbia, M. D., Hoosner, L.R., Onken, A.B. (1993). Variable sorghum growth in acid soils of subhumid West Africa. *Arid soil research and rehabilitation*. 7 (4): 335-346.

Ehteshamul-haque, S., Ghaffar, A. (1993). Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra and mungbean. *J. Phytopathol.* 138 : 157 – 163.

El-Demerdash, M. E., Abdel Hafez, A.E., Mostafa, M., Ishac, Y.Z. (1992). Response of wheat plants to inoculation with rhizobia and associative diazotrophs in the presence of rock-phosphate as a fertilizer. *Annals of Agricultural Science Cairo*. 37(2): 379-388.

El-Sawy, M. S., E.A, El-Borollosy, M.A., Nokhal, T.H., Frenrik, I., Sharaf, M.S. (1998). Effectiveness of dual inoculation with diazotrophs and vesicular arbuscular mycorrhizae on the growth and khellin content of *Ammi visnaga*. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*. 6 (2): 357-371.

Engelstad, O. P., Jugsujinda, A., De Datta, S. K. (1974). Response by flotted rice to phosphate rocks varying in citrate solubility. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 38: 524 - 529.

Fenice, M., Selbman, L., Federici, F., Vassilev, N. (2000). Application Encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. *Bioresource Technology*. 73: 157-162.

Flash, E. N., Quak, W., Van Diest, A. (1987). A comparison of the rock phosphate-mobilizing capacities of various crop species. *Trop. Agric.* 64: 347 - 352.

Frey-Klett, P., Churin, J., Pierrat, J., Garbaye, J. (1999). Dose effect in the dual inoculation of ectomycorrhizal fungus and mycorrhiza helper bacterium in two forest nurseries. *Soil Biol. Biochem.* 31: 1555 - 1562.

Frommel, M. I., Nowak, J., Lazarovits, G. (1991). Growth enhancement and development modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96: 928 - 936.

Gahoonia, T., S, Care, D. and Nielsen, N., E. (1997). Root hairs and phosphorus acquisition of wheat and barley cultivars. *Plant and Soil* 191:181-188.

Gain, S., Gaur, A. C. (1990). Shelf life of phosphate-solubilizing inoculants as influenced by type of carrier, high temperature, and low moisture. *Can. J. Microbiol.* 36: 846-849.

Gaines, P. T., Mitchell, A. G. (1979). *Chemical methods for Soil and Plant Analysis*. University of Georgia, Coastal Plain Station, Tifton, USA, 105p.

Gavito, M. E., Miller, M. H. (1998). Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant and Soil* 198 : 185 - 192.

Germida, J. J. and Walley, F. L. (1996). Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. *Biol. Fert. Soils* 23,113-120.

Germida, J. J. Jansen, H. H. (1993). Factors affecting the oxidation of elemental sulfur in soils. *Fer. Res.* 35: 101-114.

Gerretsen, F.C. (1948). The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant and Soil.* 1: 51-81.

Giroux, M., Cantin, J., Rivest, M., Tremblay, G. (2002). L'évolution des teneurs en phosphore dans les sols selon leur fertilité, leur richesse en phosphore et les types de sol. Colloque sur le phosphore : une gestion éclairée. Drummonville, 6 Novembre 2002.

Goldstein, A. H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphate: historical perspective and future prospects. *Am. J. Altern. Agric.* 1: 51 - 57.

Graham, J., H. and Abbott, L., K. (2000). Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 220, 207-218.

Grünzweig, J. M., K., J., Ben-Tal, Y., Rabinowitch, H.D. (1999). The role of mineral nutrients increased growth response of tomato plants in solarised soil. *Plant and Soil.* 206: 21-27.

Gulden, R. H., Vessey, J. K. (2000). *Penicillium bilaii* inoculation increases root-hair production in field pea. *Can. J. Plant Sci.* 80: 801-804.

Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R. C., Saxena, R. K. (1994). A modified plate essay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40: 255 - 260.

Halder, A. K., Chakrabartty, P. K. (1993). Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38: 325 - 330.

Halvorson, H. O., Keynan, A., Komberg, H. L. (1990). Utilisation of calcium phosphate for microbial growth at alkaline pH. *Soil Biol. Biochem.* 22: 887 - 890.

Hammond, L. L., Chien, S. H., Mokuwunye, A. U. (1986). Agronomic value of unacidulated and partially acidulated phosphate rocks indigenous to the tropics. *Adv. Agron.* 40: 89-140.

Hedley, M. J., Hussin, A, Bolan, N. S. (1990). New approaches to phosphorus fertilisation. Phosphorus requirements for sustainable agricultura in Asia and Oceania. Proceedings of a symposium, 6-10 March 1989.: pp. 125-142.

Hetrick, B. A. D., Wilson, G. W. T., Todd, T. C. (1996). Mycorrhizal response in wheat cultivars : relationship to phosphorus. *Can. J. Bot.* 74: 19-25.

Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. *Plant and soil.* 237: 173-195.

Hodge, A. (2000). Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 91-96.

Illmer, P., Barbato, A., Schinner, F. (1994). Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 27 (3): 265-270.

Illmer, P., Schinner, F. (1992). Solubilisation of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 24: 389-395.

Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I. R. Frossard, E. (2002). Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza*. 12: 225-234.

Jeffries, P., Barea, J. M. (1994). Biogeochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil system, p. 101-115. In S. Gianinazzi and H. schüepp (ed.). *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Jenny, F. (1973). Expérimentation agronomique sur les phosphates naturels de Tilemsi (Mali) en conditions de culture sèche. *Agronomie Tropicale*. 28: 1070-1078.

Johri, J. K., Surange, S., Nautiyal, C.S. (1999). Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*. 39: 89 - 93.

Kanabo, I. A. K., Gilkes, R. J. (1988). The effect of soil texture on the dissolution of North Carolina phosphate rock. *J. Soil Sci.* 39: 191 - 198.

Khaliq, A., Sanders, F. E. (2000). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation on the yield and phosphorus uptake of field-grown barley. *Soil Biol. Biochem.* 32 : 1691 – 1696.

Khasawneh, F. E., Doll, E. C. (1978). The use of phosphate rock for direct application to soils. *Adv. Agron.* 30: 159 - 206.

Kim, K. Y., Jordan, D., Krishnan, H. B. (1997). *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilise hydroxyapatite. *FEMS Microbiology letters.* 153: 273-277.

Kloepper, J. W., Beauchamp, C. J. (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38 : 1219 – 1232.

Cluepfel, D. E. (1993). The behaviour and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 441 - 472.

Kochian, L., V., Jones, D., L. (1997). Aluminium toxicity and resistance in plants. *In* Research issues in Aluminium Toxicity. Eds. R. A. Yokel et M.S Golub. Taylor and Francis Publishers, Bristol. PA.

Kpombekou-A, K., Tabatabaï, M. A. (1994). Metal content of phosphate rocks. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*

Kucey, R. M. N. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and Virgin Alberta soils. *Can. J. Soil Sci.* 63: 671 - 678.

Kucey, R. M. N., Jansen, H. H., Leggett, M. E. (1989). Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agron.* 42: 199-223

Large, E., C. (1954). Growth stages in cereals : illustration of the Feekes scale. *Plant Pathol.* 3,128-129.

Leggett, M. E., Gleddie, S. C., Holloway, G. (2001). Phosphate solubilizing microorganisms and their use. In *plant nutrition acquisition : New perspectives* (Eds N. Ae, J. Arihara, K. Okada, and A. Srinivasan), pp.299-318, Springer-Verlag, Tokyo.

Lima, J. A., Nahas, E., Gomes, A. C. (1996). Microbial populations and activities in sewage sludge and phosphate fertilizer-amended soil. *Appl. Soil. Ecol.* 4: 75-82.

Lindsay, W. L. (1979). *Chemical Equilibria in Soils*. John Wiley and Sons, N. Y.

Loper, J. E., Buyer, J. S. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbes Interaction.* 4 (1): 5-13.

Lowry, O. H. (1951). Rosebrought, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265 – 275.

Marschner, P., Crowley, D. E., Sattelmacher, B. (1997). Root colonization and iron nutritional status of a *Pseudomonas fluorescens* in different plant species. *Plant and soil*. 196: 311-316.

Martinez-Cruz, A., Aleman, I., Ferran, J., Martinez, V. (1990). Phosphate dissolving microorganisms in the Cuban red ferralitic and reddish brown fersialitic soils. *Agrokemia es Talajtan*. 39: 3-4.

McGee, P. (1989). Variations in propagules number of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a semi-arid soil. *Mycol. Res.* 92,28-33.

McKeague, J. A. E. (1978). *Manual of soil sampling and methods of analysis*. Canadian Soil Survey Committee, Canadian Society of Soil Science, Ottawa, 223p.

Mehlich, A. (1984). Mehlich 3 soil test extractant: a modification of Mehlich 2 extractant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 15: 1409-1416

Milagres, A. M. F., Machuca, A., Napoleao, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*. 37: 1-6.

Miller, H.,J., Henken, G., van Veen, J. A. (1989). Variation and composition of bacterial composition in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. *Can, J. Microbiol.* 35 : 656-660.

Mohammad, M. J., Pan, W. L., Kennedy, A. C. (1998). Seasonal mycorrhizal colonization of winter wheat and its effect on wheat growth under dryland field conditions. *Mycorrhiza*. 8: 139-144.

Morel, R. (1996). *Les sols cultivés*. 2e edition Lavoisier, Paris.

Nair, M. G., Safir, G. R. Siquiera, J.O. (1991). Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*trifolium ripens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:434-439

Narsian, V., Patel, H. H. (2000). *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32: 559-565.

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265 - 270.

N'Diaye, M. K., Traoré, A., Doumbia, Y, Traoré, A. (1991). Increasing the efficiency of soluble phosphorus fertilizers in irrigated rice in Mali. *Institut Mondial du Phosphate (IMPHOS): Casablaca, Morocco*, pp.10.

Oehl, F., Oberson, A., Fliessbach, M. P. A., Frossard, H. R. E. (2001). Kinetics of microbial phosphorus uptake in cultivated soils. *Biol. Fertil. Soils.* 34: 31-41.

Official journal of the European Communities, (1977) : No L213/7 and L213/63.

Omar, S. (1998). The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 211-218.

Pellet, D. M., Grunes, D. L., Kochian, L. V. (1995). Organic acid exudation as an aluminium-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.) *Plant* 196 : 788 – 795.

Pelmont, J. (1993). *Bactéries et environnement*. Presse Universitaire de Grenoble: 899 pages.

Perotto, S., Brewin, N. J., Bonfante, P. (1994). Colonisation of pea roots by the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* and *Rhizobium* bacteria: immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant cell surface components. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 91-98

Pieri, C. (1980). Industrie des engrais phosphates et développement de la fertilisation en Afrique. *Agronomie tropicale*. 43 (4): 261-277.

Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphates in soil in connection with the vital activities of some microbial species. *Mikrobiologia*. 17: 362 - 370.

Prathibha, C. K., Alagawadi, A. R., Sreenivasa, M. N. (1995). Establishment of inoculated organisms in rhizosphere and their influence on nutrient uptake and yield of cotton. Karnataka Journal of Agricultural Science. 8(1): 22-27.

Puppi, G., Azcón, R., Höfflich, G. (1994). Management of positive interactions of of arbuscular mycorrhizal fungi with essential groups of soil microorganisms. P. 201-215.

Reddy, M. S., Kumar, S., Kabita, K., Reddy, M. S. (2002). Biosolubilization of poorly soluble rock phosphate By *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. 84: 187-189.

Reyes, I., Baziramakenga, R., Bernier, L and Antoun, H. (2001) Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. Soil Biol. Biochem.33,1741-1747.

Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R. Tanguay, P., Antoun, H. (1999). Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. FEMS Microbiol. Ecol. 28: 291-295.

Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R., Antoun, H. (1999b). Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. FEMS Microbiol. Ecol. 28: 281-290.

Richardson, A., E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Aust. J. Plant Physiol. 28,897-906.

Rodriguez, H. and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17, 319-339.

Rodriguez, D., Pomar, M. C., Goudriaan, J. (1998). Leaf primordia initiation, leaf emergence and tillering in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under low-phosphorus conditions. *Plant and Soil.* 202 : 149 – 157.

Rojas, A., Holguin, G., Glick, B. R. (2001). Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology.* 35: 181-187.

Ruan, J., Zhang, F., Wong, M. H. (2000). Effect of nitrogen form and phosphorus source on the growth, nutrient uptake and soil rhizosphere property of *Camellia sinensis* L. *Plant and Soil.* 223: 63-71.

Ruotsalainen, A. L., Väre, H. Vestberg, M. (2002). Seasonality of root fungal colonization in low-alpine herbs. *Mycorrhiza.* 12: 29-36.

Saleh, E. A., Nokhal, T. H., El-Borollosy, M. A., Frenrik, I., Sharaf, M. S., El-Sawy, M. (1998). Effectiveness of dual inoculation with diazotrophs and vesicular arbuscular mycorrhizae on growth and medicinal compounds of *datura stramonium*. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences.* 6 (2): 343-355.

Sarathchandra, S. U., Lee, A., Perrott, K. W., Rajan, S. S. S., Olivier, E. H. A. (1993). Effect of phosphate fertilizer application on microorganismes in pastoral soil. *Aust. J. Soil. Res.* 31 : 299-309.

SAS, Institute Inc. 1990 SAS procedure guide version 6 edition, SAS Institute Inc, Car, NC 705 p.

Sayer, J. A., Raggett, S. L., Daad, G. M. (1995). Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: development in mutagenesis. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32: 354-364.

Scher, F. M., Ziegler, J. S., Klopper, J. W. (1984). A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria On maize. *Can. J. Microbiol.* 30: 151 - 157.

Schreiner, R. P., Mihara, K. L., McDaniel, H., Bethelenfalvay, G. J. (1997). Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant Soil.* 188: 199-209.

Schwyn, B., Neilands, B. J. (1987). Universal Chemical Assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry.* 160: 47-56.

Singh, S. and Kapoor, K., K. (1999). inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol. Fertil. Soils* 28, 139-144.

Singh, C. P., Amberger, A. (1998). Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. *Biorource Technology.* 68: 13-16.

Singh, S, Kapoor, K. K. (1999). Inoculation with phosphate-solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biol. Fertil. Soils*. 28: 139-144.

Singh, S., Kapoor, K. K. (1999). Inoculation with phosphate solubilising microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biology and fertility of soils*. 28 (2): 139-144.

Siquiera, J.O., Safir, G. R., Nair, M. G. (1991). Stimulation of vesicular arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytol*. 118 : 87 - 93

SONAREM (Société Nationale de Recherche Minière). 1988. Le phosphate de Tilemsi : Quelques informations sur sa production industrielle et son utilisation en agriculture. Rapport projet phosphates 28 p.

Sperber, J. I. (1958). Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Austr. J. Agric. Res.* 9: 782-788.

Ssali, H., Gupta, S. C. (1990). Effects of nitrogen and phosphate fertilizers on sorghum grain yield. Proceedings of the Sixth regional workshop on sorghum and millets for southern Africa: Bulawayo, Zimbabwe, 18-22 September, pp. 255-258.

Steel, R., G., D. Torrie, J., H. (1980). Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. MacGraw-Hill Book Co., New York.

Sundara, B., Natarajan, V., Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*. 77: 43-49.

Swaby, R. J., Fedel, F. (1973). Microbial production of sulphate and sulphide in some Australian soils. *Soil Biol. Biochem.* 5: 773-781.

Sylvia D M and Chelleni D O 2001 Interactions among root-inhabiting fungi and their implications for biological control of root pathogens. *Adv. Agron.* 73, 1-33.

Tandon, H. L. S., Cescas, M. P. and Tyner, E. H. (1968). An acid-free vanadate-molybdate reagent for the determination of total phosphorus in soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 32: 48-51.

Tardieux-Roche, A. (1966a) Contribution à l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. *Ann. Agron.* 17 (4) : 403-471.

Tardieux-Roche, A. (1966b) Contribution à l'étude des interactions entre phosphates naturels et microflore du sol. *Ann. Agron.* 17 (5) : 479-528.

Tisdale, S. L., Nelson, W. L., Beaton, J. D. (1985). Soil and fertilizer phosphorus. Dans *soil fertility and fertilizers*, 4e ed. Chapitre 8:189-248

Toro, M., Azcon, R, Barea, J. M. (1998). The use of isotopique dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate solubilising rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *medicago sativa*. *Biology and Fertility of Soils*. 138: (2): 265-273.

Toro, M., Azcon, R., Barea, J.M. (1997). Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (32P) and nutrient cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* 4408-4412.

Toro, M., Azcon, R., Herrera, R. (1996). Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *Pueraria phaseoloïdes* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. *Biology and Fertility of Soils.* 21(1-2): 23-29.

Truong, B., Pichot, J., Beunard, P. (1978). Caractérisation et comparaison des phosphates naturels tricalciques d'Afrique de l'Ouest en vue de leur utilisation directe en agriculture. *Agron. Trop.* 33: 136.

Vassileva, N., Vassilev, N., Azcon, R. (1998). Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further application in a soil-plant system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14 : 281 - 284

Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez-Cortes, A., Bashan, Y. (2000). Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils.* 30: 460-468.

Vessey, J. K., Heisinger, K. G. (2001). Effect of *Penicillium bilaii* inoculation and phosphorus fertilisation on root and shoot parameters of field-grown pea. *Can. J. Plant Sci.* 81: 361-366.

Vezina, L., Carrier, D., Giroux, M., Rompré, M. (2000). Proposition de regroupement des sols du Québec selon leur capacité de fixation du phosphore en relation avec leur caractéristiques pédologiques. *Agrosol*. 11 (1): 15-39.

Vierheilig, H., Goughlan, A. P., Wyss, U., Piché, Y. (1998). Ink and vinegar, a simple technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 5004-5007.

Villegas, J., Fortin, J., A. (2001). Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing NH_4^+ as nitrogen source. *Can. J. Bot.* 79: 865-870.

Violante, A., Rao, M. A., De Chiara, A., Gianfreda, L. (1996). Sorption of phosphate and oxalate by synthetic aluminium hydroxysulphate complex. *Eur. J. Soil Sci.* 47 : 241 – 247.

Vivekanandan, M., Fixen, P. E. (1991). Cropping systems effects on mycorrhizal colonization, early growth, and phosphorus uptake of corn. *Soil Sci. Am. J.* 55: 136-140.

Vonderwell, J. D., Eneback, S. A. (2000). Differential effects on rhizobacterial strain and dose on the ectomycorrhizal colonization of *loblolly pine* seedlings. *Forest Science.* 46 (3) 437 – 441.

Vosatka, M., Gryndler, M. (1999). Treatment of culture fractions from *Pseudomonas Putida* modifies the development of *Glomus fistulosum* mycorrhiza and the response of potato and maize plants to inoculation. *Appl. Soil Ecol.* 11 : 245 – 251.

Wainwright, M. (1984). Sulfur oxidation in soils. *Adv. Agron.* 37: 349-396.

Wang, J. L., Luo, Z. C., Loeppert, R. H. (1995). Nutrient status of rhizosphere and phosphorus response of radish. *Journal of Plant nutrition* 18 (3) : 385 – 399.

Webb, J. R., Malarino, A. P., Blakmer, A. M. (1992). Effect of residual and annually applied phosphorus on soil test values and yield of corn and soybean. *J. Proc. Agric.* 5 (1): 148-152.

Whitelaw, M. A. (2000). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv. Agron.* 69: 99-151.

Wyss, P., Mellor, R. B., Wiemken, A. (1990). Vesicular-arbuscular mycorrhizas of wild-type soybean and nonnodulating mutants with *Glomus mosseae* contain symbiosis-specific polypeptides (mycorrhizins), immunologically cross-reactive with nodulins. *Planta* 182: 22 - 26

Yao, M. K., Tweddell, R. J., Désilets, H. (2002). Effect of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated potato plantlets and on the extent of disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Mycorrhiza*. 12: 235-242.

Zawartka, L., Huszca-Ciolkowska, G., Szumska, E. (1999). Effects of poly- and orthophosphates of some macro-and micro-nutrient elements in soil material of varied pH. II. Phosphorus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30 (5-6): 645-653.

Zhang, T. Q., MacKenzie, A. F., Liang, B. C. (1995). Long-term changes in Mehlich-3 extractable P and K in a sandy clay loam soil under continuous corn (*Zea mays* L.). *Can. J. Soil Sci.* 75: 361-367.

Zhu, Y.-G., Smith, S. E. (2001). Seed phosphorus (P) content affects growth, and P uptake of wheat plants and their association with arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Plant and Soil.* 231: 105-112.

Zhu, Y.-G., Smith, S. E., Barritt, A. R., Smith, F. A. (2001). Phosphorus (P) efficiencies and mycorrhizal responsiveness of old and modern wheat cultivars. *Plant and Soil.* 237: 249-255.

Zoysa, A. K. N., Loganathan, P, Hedley, M. J. (1998). Phosphate rock dissolution and transformation in the rhizosphere of tea (*Camellia sinensis* L.) compared with other plant species. *European Journal of Soil Science*. 49 (3): 477-486.

4 Annexes

4.1 Le Mali

La République du Mali est située dans l'hémisphère Nord du continent africain, entre les 10° et 20° de latitude Nord, au carrefour des routes méridiennes allant du désert à la forêt et du grand axe Ouest-Est Sénégal-Niger. Le Mali couvre une superficie de 1 241 300 Km², soit 1/25 de la superficie totale de l'Afrique et n'a pas de façade maritime. Le Mali est limité : Au Nord et au Nord-Est par l'Algérie, au sud par la Côte d'Ivoire et la Guinée, à l'Ouest par le Sénégal et la Mauritanie, à l'est par le Niger, au sud par le Burkina Faso.



Le climat se caractérise par, une saison sèche dont la durée diminue du Nord au Sud de mars à juin. Une saison humide de juin à septembre et une intersaison caractérisée par sa fraîcheur d'octobre à février. L'amplitude thermique varie de 23°C au mois de janvier à 33°C en mai. Elle dépasse rarement 27°C dans le Delta intérieur.

Le Mali est arrosé par deux grands fleuves : le fleuve Niger sur 1700 km et le fleuve Sénégal. En plus de ces fleuves plusieurs lacs arrosent le pays en plusieurs endroits.

Le Mali est divisée en huit régions qui sont : Kayes, Koulikoro, Sikasso, Ségou, Mopti, Tombouctou, Gao et Kidal. A ces six régions s'ajoute le district de Bamako. Les régions de Tombouctou, Gao et Kidal sont situées dans le désert avec de fortes températures, une pluviométrie faible ou inexistante et des sols sablonneux pauvres en éléments nutritifs.

L'économie du Mali est principalement basée sur l'agriculture et l'élevage. Au Mali la culture des céréales occupe 86% de la population économiquement active. Les principales céréales cultivées sont : le mil, le riz, le blé, le maïs le sorgho et la canne à sucre. Cependant, Le blé occupant une place importante dans l'économie du Mali, n'a lieu que dans les régions du nord du Mali. Jadis, la production en blé de ces régions suffisait à faire tourner à plein régime les grands moulins. Actuellement, presque toute la production est utilisée pour la consommation directe de la population.