

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
Ecole doctorale : Sciences de la Vie de la Santé et de l'Environnement
Faculté des Sciences et Techniques

Année : 2016

N° d'ordre : 239



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Présenté par:

M^{lle} Fatoumata FALL

Impact de *Sporobolus robustus* Kunth sur la microflore symbiotique et l'établissement de légumineuses à usages multiples dans des sols salés du Delta du Sine - Saloum au Sénégal

Soutenue le 26 août 2016 devant le jury composé de :

<u>Président :</u>	Mme. Mame Ourèye SY	Professeur Titulaire (UCAD)
<u>Rapporteurs :</u>	M. Saliou NDIAYE	Maître de Conférences (UT/ENSA)
	M. Laurent LAPLAZE	Directeur de Recherches (IRD)
	M. Aboubacry KANE	Maître de Conférences (UCAD)
<u>Examineurs :</u>	M. Malaïny DIATTA	Maître de Recherche (ISRA)
	M. Ibrahima NDOYE	Professeur Titulaire (UCAD)
<u>Directeur de Recherche :</u>	M. Diégane DIOUF	Maître de Conférences (UCAD)
<u>Co-directeur de Recherche :</u>	M. Amadou Mustapha BÂ	Professeur Titulaire (UA)

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
Ecole doctorale : Sciences de la Vie de la Santé et de l'Environnement
Faculté des Sciences et Techniques

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Nom et prénom de la Candidate : M^{lle} Fatoumata FALL

Titre de la thèse. Impact de *Sporobolus robustus* Kunth sur la microflore symbiotique et l'établissement de légumineuses à usages multiples dans des sols salés du Delta du Sine - Saloum au Sénégal

Résumé :

Sporobolus robustus Kunth est une graminée halophyte pérenne utilisée comme fourrage d'appoint pour le bétail. Dans le Delta du Sine- Saloum où la salinité est la contrainte majeure de la végétation ligneuse, *S. robustus* forme des touffes à l'intérieur desquelles émergent souvent de jeunes *Vachellia seyal* Del. (Syn. *Acacia seyal* Del.) et *Prosopis juliflora* (Swartz) DC, deux légumineuses d'intérêts écologiques. La graminée halophyte pourrait créer un microenvironnement tellurique favorisant la germination et l'établissement de *P. juliflora* et d'*A. seyal* dans les sols salés selon deux mécanismes non exclusifs : (i) diminution de la salinité des sols par accumulation de sels, et (ii) stimulation de la microflore symbiotique adaptée au sel. Par ailleurs, *S. robustus* pourrait partager avec les légumineuses une microflore rhizobienne et mycorhizienne, adaptée à la salinité et potentiellement bénéfique aux légumineuses. L'objectif principal de ce travail de thèse est d'évaluer l'effet plante nurse de *S. robustus* pour l'établissement de *V. seyal* et *P. juliflora* en milieu salé.

Une expérimentation réalisée en serre a montré que *S. robustus* améliore la germination d'*A. seyal*, la survie de *P. juliflora* et le taux de mycorhization des deux légumineuses en condition de stress salin. Cela pourrait être dû à la capacité de *S. robustus* à diminuer la salinité des sols par accumulation de Na. La graminée a également stimulé le potentiel mycorhizogène et maintenu le potentiel rhizobien des sols rhizosphériques des deux légumineuses.

La diversité génétique des rhizobia de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* a été déterminée par le séquençage Sanger. Les résultats ont montré que les communautés de rhizobia sont partagées par *S. robustus* et *P. juliflora*. Les rhizobia, identifiés comme des *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* et *Burkholderia*, ont été structurés par la salinité et la saison. Ils se sont révélés efficaces sur de jeunes plants de *P. juliflora* et *A. seyal*.

Le séquençage Illumina Miseq du 18S a révélé des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) communes à *S. robustus* et *P. juliflora*. Les CMA ont été identifiés à 20 genres, en majorité des Glomeraceae, dont 8 (*Glomus*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Uncinula*, *Redeckera*, *Acaulospora*, *Paraglomus* et *Ambispora*) ont été structurés par la salinité. Toutefois, *S. robustus* s'est révélée modérément dépendante de CMA issus de la collection du LCM.

Nos résultats suggèrent que *S. robustus* diminue la salinité des sols et héberge dans sa rhizosphère des rhizobia et CMA potentiellement bénéfiques aux deux légumineuses. *S. robustus* serait une plante facilitatrice de la germination et de l'établissement des deux légumineuses dans des sols salés au Sénégal.

Mots clés. Salinité, champignons mycorhiziens à arbuscules, rhizobium, proline, sodium, séquençage Illumina, séquençage Sanger, plante facilitatrice, *Sporobolus robustus*, *Prosopis juliflora*, *Acacia seyal*.

Thesis title. The impact of *Sporobolus robustus* Kunth on symbiotic microflora and establishment of multipurpose legumes on salt affected soils of from the Sine - Saloum Delta in Senegal

Abstract:

Sporobolus robustus Kunth is a halophytic perennial grass and provides fodder for livestock. In the Sine and Saloum Delta where the salinity is the major constraint of woody vegetation, two multipurpose leguminous trees *Vachellia seyal* Del. (Syn. *Acacia seyal* Del.) and *Prosopis juliflora* (Swartz) DC seedlings grow often in tussocks of grass. *S. robustus* may create a microenvironment more conducive to legumes establishment through two non-exclusive mechanisms: (i) the decrease of soil salinity by accumulating salts, (ii) the stimulation of the symbiotic microflora adapted to salt. In thus, *S. robustus* could share with *P. juliflora* and *A. seyal* a salt adapted rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) communities which would be beneficial to regenerating legumes seedlings. The aim of this study was to evaluate the *S. robustus* nurse plant effect on *V. seyal* and *P. juliflora* establishment in saline soil.

A experiment was done in controlled conditions to assess the effect of *S. robustus* in the regeneration processes of the tree species *A. seyal* and *P. juliflora* in salt stress condition.

The results showed that *S. robustus* improved the germination of *A. seyal*, the survival of *P. juliflora* and the mycorrhizal colonization of both legumes. This could be due to the ability of *S. robustus* to reduce soil salinity by Na accumulation. The grass also stimulated the mycorrhizal potential and maintained rhizobial potential of rhizospheric soils of both legumes.

The rhizobia genetic diversity was determined by Sanger sequencing. Our results showed that some rhizosphere microbial communities belonging to rhizobia were shared by *S. robustus* and *P. juliflora*. The rhizobia identified to *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* and *Burkholderia*, were structured by the salinity and the season. They were efficient on growth of *P. juliflora* and *A. seyal* seedlings.

We used Illumina Miseq of the 18S rRNA gene to assess AMF diversity in *S. robustus* and *P. juliflora* roots. The results showed that the AMF were clustered into 20 genera, mostly belonging to Glomeraceae, and 8 of them (*Glomus*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Incertae-sedis*, *Redeckera*, *Acaulospora*, *Paraglomus* and *Ambispora*) were structured by salinity. Nevertheless, *S. robustus* was moderately dependent on AMF from the collection of LCM.

Our results suggest that *S. robustus* reduces soil salinity and hosts in its rhizosphere rhizobia and AMF that are potentially beneficial to both legumes. *S. robustus* would be a nurse plant for germination and establishment of both legumes in salted soils from Senegal.

Keywords. Salinity, arbuscular mycorrhizal fungi, rhizobia, proline, sodium, Illumina sequencing, Sanger sequencing, nurse plant, *Sporobolus robustus*, *Prosopis juliflora*, *Acacia seyal*.

DEDICACES

A la mémoire de mon cher papa Boubacar FALL

Qu'Allah l'accueille dans son paradis

A la mémoire de Fatou Kiné Mbaye

Qu'Allah lui ouvre les portes de sa maison

A ma chère maman Astou TRAORE

A mes frères et sœurs

A mes tantes et oncles

A mes amis

A toute la famille FALL et TRAORE

Ce travail est le vôtre!!!

REMERCIEMENTS

Au terme de ce parcours passionnant mais escarpé, il m'est particulièrement agréable de remercier les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidé et accompagné dans la réalisation de ce travail.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'Ecole doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de L'Environnement (ED. SEV), dans la formation doctorale Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes. J'adresse ainsi mes sincères remerciements aux Professeurs **Ibrahima Ndoye** et **El Hadj Samba Ndao Sylla**, respectivement ancien et nouveau Responsable de la Formation doctorale et à l'ensemble du comité pédagogique de ladite formation pour m'avoir autorisée à m'inscrire à cette formation doctorale.

Je remercie le chef de département de Biologie Végétale **Prof. Mame Samba Mbaye** pour avoir accepté mon inscription. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Les mots ne seront certainement pas assez forts pour exprimer ma gratitude et ma reconnaissance envers mes Directeurs de Thèse **Dr. Diégane Diouf** et **Prof. Amadou Bâ**. Vous m'avez initiée à la recherche en m'apprenant à mieux connaître et à respecter le végétal. Votre rigueur pour le travail scientifique m'a toujours émerveillée. Nos discussions m'ont permise d'entretenir vis-à-vis de toute chose un esprit critique.

Je tiens à remercier également **Dr. Dioumacor Fall** pour son soutien à tout point de vue.

Je remercie **Dr. Hervé Sanguin** d'avoir accepté d'encadrer la partie moléculaire des CMA. Merci pour ta disponibilité, ton soutien et tes nombreux conseils.

J'exprime toute ma reconnaissance au **Dr. Christine Le Roux** pour m'avoir assistée et aidée dans la partie rhizobium. Merci beaucoup pour tes qualités humaines et tes marques de soutien et d'encouragement à mon endroit.

J'exprime toute ma reconnaissance au **Dr. Aboubacry Kane** pour sa disponibilité, ses qualités humaines, ses conseils fructueux et sa contribution à ce travail et pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je remercie infiniment les membres du jury. Je veux dire toute ma reconnaissance au **Professeur Mame Ourèye Sy** qui a bien accepté de le présider, au **Dr. Laurent Laplaze** et au **Dr. Saliou Ndiaye** d'avoir bien voulu être rapporteur de ce travail, au **Professeur Ibrahima Ndoye** et au **Dr. Malainy Diatta** d'avoir bien voulu être examinateur de ce travail.

J'exprime ma reconnaissance et mes remerciements au directeur du LCM, **Dr. Saliou Fall**.
Merci pour vos conseils et votre disponibilité.

Je tiens à remercier le **Dr Abdala G. Diédhiou** pour sa disponibilité, ses qualités de pédagogue enthousiaste et ses nombreux conseils toujours utiles et pertinents.

Je remercie les chercheurs du LCM : **Dr Tania Wade, Dr. Mansour Thiao, Dr. Ramatoulaye Mbaye, Dr. Adama Diouf, Dr. Laurent Laplaze, Dr. Sergio Svistoonoff, Dr. Mikael Lucas**, pour les conseils et les discussions fertiles.

J'ai une pensée toute particulière à mes aînés du LCM, **Dr. Abdoulaye Soumara, Dr. Niokhor Bakhom, Dr. Amadou Dieng, Dr. Ibou Diop, Dr. Nathalie Diagne, Dr. Godar Séné, Dr. Fatou Ndoye, Dr. Seynabou Séné, Dr. Fatou Diouf, Dr. Issa Diédhiou**,

Je remercie le personnel du LCM : **Cheikh, Mathieu, Francis (DSK), Maimouna, Tata Marie Claire, Alima, Mme Ly, Paul, François, Ousseynou Gueye**.

Que mes camarades du LCM qui m'ont rendu d'innombrables petits services et qui m'ont apporté de la bonne humeur au quotidien trouvent ici l'expression de ma meilleure sympathie. Je veux nommer **Michaëla, Mariama, Aïda, Babacar, Nogaye, Pape, Christine Ouattara, Adama, Awa Faye et Diallo, Marie Thérèse, Arlette, Ousseynou, Ndèye Séni, Marie Mboutasse, Diariatou, Kara, Auxence, Abdoulaye, Diallo, Mohamed (Mali)**

Je remercie le chef du CNRF/ISRA **Dr. Diaminatou Sanogo** ainsi que tout son personnel pour leur disponibilité.

Je remercie **Dr. Ousmane Diagne, M. Ibrahima Thomas et Dr. Ali Ndiaye** de l'ISRA pour leur disponibilité, et leurs nombreux conseils.

Mes remerciements vont également à l'endroit de **Dr. Komi Assigbetse** et au personnel technique du LEMSAT pour leur disponibilité et leurs encouragements. Mention spéciale à **Mariama Guèye** pour m'avoir encadrée et assistée dans la manip DGGE.

Un grand merci au **Dr. Oumar Sadio** pour son aide dans les analyses statistiques des données. Je remercie également **M. Saliou Guèye**, chauffeur à l'UCAD.

J'adresse mes remerciements au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Sénégal pour son appui à travers le First et le PAPES, à l'ISRA-WAAPP pour la bourse d'allocataire, au projet USAID-ERA et au WFS pour avoir financé 2 années de bourse nationale, au service de coopération et d'action culturelle (SCAC) de l'Ambassade de France

au Sénégal pour avoir financé ma mobilité au LSTM, au LMI-Lapse pour avoir financé une partie de mes travaux de thèse.

Je remercie les Professeurs **Michel Lebrun** et **Robin Duponnois**, respectivement ancien et nouveau Directeur du LSTM, qui ont accepté de m'accueillir dans leur laboratoire.

Merci à tout le personnel du LSTM pour leur soutien pendant les séjours passés à leur côté. Merci à **Naima, Joël, Pierre, Estelle, Clémence**. Merci à tous les chercheurs **Frédéric** pour son aide dans les analyses de données illumina, **Yves Prin** pour m'avoir aidée à prendre de belles photos de spores de CMA, **Antoine Galiana** pour sa disponibilité et ses conseils, **Valérie** pour ses qualités humaines. Merci à mes amies **Cindy, Souhir, Fatima Zahra, Isabelle** et **Rébecca** pour leur sympathie, mention spéciale à **Sheena** pour sa gentillesse et son affection à mon égard.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACP.....	Analyse en composantes principales
ADNr.....	Acide désoxyriboNucléique ribosomal
ANOVA	Analysis Of Variance
BLAST.....	Basic Local Alignment Search Tool
CIRAD.....	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
Cm.....	Centimètre
CNRF.....	Centre Nationales de Recherches Forestières
° C	Degré Celsius
dNTP	désoxynucléotide-triphosphate
FAO.....	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g.....	Gramme
h.....	Heure
ha.....	Hectare
IGS.....	Intergenic Spacer (Espace Intergenique)
INP.....	Institut National de Pédologie
IRD.....	Institut de Recherche pour le Développement
ISRA	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
LADA.....	Land Degradation Assesment
Lapse.....	Laboratoire Mixte International Adaptation des Plantes et Microorganismes Associés aux Stress Environnementaux
LSTM.....	Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
MLSA.....	Multi locus sequences analysis
mg	Miligramme
min.....	Minute
mM.....	Millimolaire
mS	Millisiemens
NCBI.....	National Center for Biotechnology Information
OTU.....	Unités taxonomiques opérationnelles
PCR.....	Réaction de Polymérisation en Chaîne
pH.....	Potentiel Hydrogène
RAPD.....	Random amplified polymorphic DNA
RFLP.....	Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction
s.....	Seconde
UA.....	Université des Antilles
UCAD.....	Université Cheikh Anta Diop
µl.....	Microlitre
YMA.....	Yeast Extract Mannitol Agar

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Norme de salinité des sols	34
Tableau 2. Quelques caractéristiques physico-chimiques du sol de Niam Diarokh prélevé en juin 2013.....	50
Tableau 3. Dilutions de sols pour les MPN.....	53
Tableau 4. Taux de survie des plantes de <i>P. juliflora</i> et <i>A. seyal</i> , après 4 mois de croissance en serre, en présence (+) ou non (-) de <i>S. robustus</i>	55
Tableau 5. Taux de mycorhization de <i>P. juliflora</i> et d' <i>A. seyal</i> et nombre de spores des sols sous légumineuses, après 4 mois de croissance en serre, en présence (+) ou non (-) de <i>S. robustus</i>	57
Tableau 6. Estimation du nombre le plus probable de propagules (MPN) des sols sous <i>P. juliflora</i> et <i>A. seyal</i> , après 4 mois de croissance en serre, en présence (+) ou en absence (-) de <i>S. robustus</i>	58
Tableau 7. Corrélation entre les paramètres mesurés.....	70
Tableau 8. Amorces et programmes PCR utilisés pour le gène 16S et les gènes de ménage. 80	
Tableau 9. Composition physique des sols sous <i>S. robustus</i> , <i>P. juliflora</i> et hors du couvert végétal le long du gradient de salinité en saison sèche.	85
Tableau 10. Quelques caractéristiques chimiques des sols de la rhizosphère de <i>S. robustus</i> et <i>P. juliflora</i> et hors du couvert végétal selon la salinité et la saison.	86
Tableau 11. Impact des quatre facteurs (salinité, plante piège, saison et sol) sur le nombre le plus probable (MPN) de rhizobia des sols de la rhizosphère de <i>S. robustus</i> et <i>P. juliflora</i> et hors du couvert végétal.	87
Tableau 12. Profil ITS de l'espace intergénique 16S-23S de l'ADNr des isolats de rhizobia.	88
Tableau 13. Abondance et diversité α des rhizobia de la rhizosphère de <i>S. robustus</i> , <i>P. juliflora</i> et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité, en saisons sèche et humide.....	94
Tableau 14. Diversité β des rhizobia de la rhizosphère de <i>S. robustus</i> , <i>P. juliflora</i> et en hors couvert végétal des 4 niveaux de salinité en saison sèche.	95
Tableau 15. Diversité β des rhizobia de la rhizosphère de <i>S. robustus</i> , <i>P. juliflora</i> et en hors couvert végétal des 4 niveaux de salinité en saison humide.	95
Tableau 16. Résistance intrinsèque des souches de rhizobia à différents antibiotiques.	104
Tableau 17. Paramètres de nodulation, de croissance et de fixation d'azote mesurés sur les plants d' <i>A. seyal</i> et de <i>P. juliflora</i> en inoculation croisée.	106

Tableau 18. Paramètres de nodulation, de croissance et de fixation d'azote mesurés sur les plants d' <i>A. seyal</i> et de <i>P. juliflora</i> en inoculation croisée, sous stress salin.	108
Tableau 19. Quelques caractéristiques chimiques des sols de la rhizosphère de <i>S. robustus</i> et <i>P. juliflora</i> selon la salinité et la saison.....	121
Tableau 20. Impact des trois facteurs (salinité, saison et plante) sur le nombre le plus probable de propagules (MPN) des sols de la rhizosphère de <i>S. robustus</i> et <i>P. juliflora</i>	122
Tableau 21. Impact des trois facteurs (salinité, saison et plante) sur le nombre de spores et la mycorhization de <i>P. juliflora</i> et <i>S. robustus</i>	123
Tableau 22. Impact des trois facteurs (salinité, saison et plante) et de leurs interactions sur la structure des communautés de CMA de <i>Prosopis</i> et <i>Sporobolus</i>	127
Tableau 23. Impact de la salinité sur la structure des huit genres de CMA de <i>Prosopis</i> et <i>Sporobolus</i>	128
Tableau 24. Comparaison de la structure des huit genres de CMA (a) par paire de niveaux de salinité, (b), entre saisons sèche et humide à chaque niveau de salinité (c) entre <i>P. juliflora</i> et <i>S. robustus</i> à chaque niveau de salinité.	129
Tableau 25. Les OTU indicatrices des niveaux de salinité.	133
Tableau 26. Les OTU indicatrices de <i>S. robustus</i> et <i>P. juliflora</i>	135
Tableau 27. Les OTU indicatrices des saisons sèche et humide.....	136
Tableau 28. Corrélacion entre l'abondance relative des communautés des huit genres de CMA et des caractéristiques chimiques des sols.....	138
Tableau 29. Impact de la salinité, de la saison, du type de plante et de l'interaction des trois facteurs sur l'alpha-diversité des communautés de <i>Glomeromycota</i> de <i>P. juliflora</i> et <i>S. robustus</i>	139
Tableau 30. Effet de l'inoculation sur la croissance et la mycorhization de <i>S. robustus</i> et <i>L. fusca</i> après 4 mois de culture en serre.	151
Tableau 31. Dépendance mycorhizienne de <i>S. robustus</i> et <i>L. fusca</i> après 4 mois de culture en serre.	152
Tableau 32. Effet de l'inoculation sur les teneurs en éléments minéraux des parties aériennes de <i>S. robustus</i> et <i>L. fusca</i> après 4 mois de culture en serre.	152
Tableau 33. Corrélacion entre les paramètres mesurés chez <i>S. robustus</i>	153
Tableau 34. Corrélacion entre les paramètres mesurés chez <i>L. fusca</i>	153

LISTE DES FIGURES

Figure 1. La rhizosphère.....	6
Figure 2. Représentation de la diversité des interactions entre les racines des plantes et les microorganismes du sol.....	6
Figure 3. Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse (Oldroyd et al., 2011).	15
Figure 4. Hyphes des champignons ectomycorhiziens (en bleu) et des champignons mycorhiziens à arbuscules (en rose).....	19
Figure 5. Cycle de développement des CMA.....	22
Figure 6. Phylogénie des <i>Glomeromycota</i>	24
Figure 7. Les différentes étapes du Séquençage par la méthode Illumina	28
Figure 8. Carte du Sénégal avec une localisation des régions affectées par le sel (en rouge). 32	
Figure 9. Touffe de <i>Sporolus robustus</i> Kunth (a) <i>Prosopis juliflora</i> émergeant d'une touffe de <i>Sporobolus robustus</i> (b).	43
Figure 10. Peuplement adulte de <i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC dans la région naturelle du Sine Saloum.....	45
Figure 11. Arbre adulte de <i>Acacia seyal</i> Del.....	47
Figure 12. Cinétique et taux final (12 jours) de germination (%) des graines de <i>P. juliflora</i> et <i>A. seyal</i> en présence (+) ou non (-) de <i>S. robustus</i>	55
Figure 13. Poids sec aérien (a), poids sec racinaire (b) et poids sec total (c) des plants de <i>P. juliflora</i> et d' <i>A. seyal</i> , après 4 mois de culture en serre, en présence (+) ou en absence (-) de <i>S. robustus</i>	56
Figure 14. Salinité (‰) des sols sous <i>P. juliflora</i> et <i>A. seyal</i> , après 4 mois de croissance en serre, en présence (+) ou en absence (-) de <i>S. robustus</i>	58
Figure 15. Effet de la concentration en NaCl sur le poids sec aérien (a), racinaire (b), total (c) et l'indice de tolérance au sel (d) de <i>S. robustus</i> à 50, 100 et 150 jours de traitement..	66
Figure 16. Effet de la concentration en NaCl sur les teneurs en proline (a), chlorophylle a (b), chlorophylle b (c) et chlorophylle totale (d) de <i>S. robustus</i> à 50, 100 et 150 jours de traitement.....	67
Figure 17. Effet de la concentration en NaCl sur les teneurs en Na et K et sur le ratio K/Na des parties aériennes et racinaires de <i>S. robustus</i> à 150 jours.	69
Figure 18. Gradient de salinité du site d'étude de Niam-Diarokh en saisons sèche et humide.	77
Figure 19. Représentation graphique de l'analyse en composantes principales (ACP) des effets combinés des caractéristiques chimiques des échantillons de sols prélevés sous <i>S.</i>	

<i>robustus</i> , <i>P. juliflora</i> et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité et des souches de rhizobia isolées dans ces sols en saison sèche.....	89
Figure 20. Représentation graphique de l'analyse en composantes principales (ACP) des effets combinés des caractéristiques chimiques des échantillons de sols prélevés sous <i>S. robustus</i> , <i>P. juliflora</i> et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité et des souches de rhizobia isolées dans ces sols en saison humide.....	90
Figure 21. Fréquences des souches de rhizobia isolées dans la rhizosphère de <i>P. juliflora</i> , <i>S. robustus</i> et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité en saison sèche.	92
Figure 22. Fréquences des souches de rhizobia isolées dans la rhizosphère de <i>P. juliflora</i> , <i>S. robustus</i> et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité en saison humide.	93
Figure 23. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes ITS des souches de rhizobia (en gras) isolées dans la rhizosphère de <i>P. juliflora</i> , <i>S. robustus</i> et hors du couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank.....	96
Figure 24. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes ARNr 16S des souches de rhizobia (en gras) isolées dans la rhizosphère de <i>P. juliflora</i> , <i>S. robustus</i> et hors du couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank....	98
Figure 25. Phylogénie bayésienne de l'alignement de 4 gènes (<i>atpD-recA-gyrB-glnA</i>) des souches de rhizobia (en gras) isolées de la rhizosphère de <i>P. juliflora</i> , <i>S. robustus</i> et hors du couvert végétal et celles de souches types appartenant aux genres <i>Mesorhizobium</i> , <i>Ensifer</i> et <i>Rhizobium</i>	99
Figure 26. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes <i>nodA</i> des souches de rhizobia (en gras) isolées dans la rhizosphère de <i>P. juliflora</i> , <i>S. robustus</i> et hors du couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank..	100
Figure 27. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes <i>nodC</i> des souches de rhizobia (en gras) isolées dans la rhizosphère de <i>P. juliflora</i> , <i>S. robustus</i> et hors du couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank..	101
Figure 28. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes <i>nifH</i> des souches de rhizobia (en gras) isolées dans la rhizosphère de <i>P. juliflora</i> , <i>S. robustus</i> et hors du couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank..	102
Figure 29. Tolérance des souches de rhizobia à différentes concentrations de NaCl.	104
Figure 30. Morphologie (a) et structure de la paroi (b) des spores de <i>Gigaspora</i> sp.....	124
Figure 31. Morphologie (a) et structure de la paroi (b) de spores de <i>Scutellospora</i> sp.....	124
Figure 32. Structure de la paroi des spores de <i>Glomus</i> sp (a) et de <i>Acaulospora</i> sp (b).....	125
Figure 33. Distribution des OTU dans les différentes familles de CMA.	126
Figure 34. Distribution des OTU dans les différents genres de CMA.	126
Figure 35. Abondance relative des huit genres de CMA de <i>P. juliflora</i> et <i>S. robustus</i> en fonction de la salinité.	128

Figure 36. Structure des communautés de CMA partagées entre <i>S. robustus</i> et <i>P. juliflora</i> à chaque niveau de salinité en saisons sèche et humide.....	131
Figure 37. Richesse (Chao) des communautés de CMA en fonction de la salinité et de la saison.....	140
Figure 38. Diversité et Equitabilité des communautés de CMA en fonction de la salinité : (a) diversité de Shannon, (b) taux de recouvrement (%), (c) Equitabilité (Shannon-dépendant).	140

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	i
ABSTRACT.....	ii
DEDICACES.....	iii
RMERCIEMENTS.....	iv
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
INTRODUCTION GENERALE.....	1
Chapitre 1. Revue bibliographique.....	5
1.1. La rhizosphère et sa communauté microbienne.....	5
1.2. La symbiose fixatrice d'azote légumineuse-rhizobium.....	7
1.2.1. Généralités sur la fixation biologique de l'azote	7
1.2.2. Les légumineuses	8
1.2.3. Les rhizobia.....	9
1.2.4. Mécanisme de la nodulation	13
1.2.5. Autorégulation de la nodulation par la légumineuse	16
1.2.6. Fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote.....	16
1.2.7. Méthodes de mesure de la fixation d'azote.....	17
1.2.8. Facteurs affectant la fixation biologique de l'azote	17
1.3. La symbiose mycorhizienne	18
1.3.1. Généralités sur les symbioses mycorhiziennes	18
1.3.2. Généralités chez les CMA.	20
1.3.3. Intérêts de la symbiose MA	29
1.4. Généralités sur la salinité.....	31
1.4.1. Les causes de la salinité	32
1.4.2. Seuils de salinisation.....	33
1.4.3. Les différents types de stress liés au sel.....	34

1.4.4. Effet de la salinité sur la germination des graines	35
1.4.5. Effet de la salinité sur la croissance des plantes	35
1.4.6. Les mécanismes d'adaptation des plantes au stress salin	36
1.4.7. Mécanismes physiologiques de tolérance au stress salin chez la symbiose fixatrice d'azote rhizobium-légumineuse.....	39
1.4.8. Mécanismes physiologiques de tolérance au stress salin chez la symbiose mycorhizienne à arbuscules	39
1.5. Notion de plantes « facilitatrices » (ou plantes « nurses »).....	40
1.6. Présentation des espèces végétales étudiées.....	41
1.6.1. <i>Sporobolus robustus</i> Kunth.....	41
1.6.2. <i>Prosopis juliflora</i> (SW) DC., 1825	43
1.6.3. <i>Vachellia seyal</i> (Delile) P.J.H. Hurter (syn. <i>Acacia seyal</i> Delile).	45
Chapitre 2. Impact de <i>Sporobolus robustus</i> Kunth sur la germination, la croissance et la mycorhization de <i>Prosopis juliflora</i> (SW) DC et <i>Acacia seyal</i> (Del.) en condition de stress salin	48
2.1. INTRODUCTION	48
2.2. MATERIEL ET METHODES	49
2.2.1. Présentation de la zone d'étude.....	49
2.2.2. Délimitation des parcelles.....	49
2.2.3. Substrat de culture.....	49
2.2.4. Matériel végétal et condition de culture.....	50
2.2.5. Dispositif expérimental	51
2.2.6. Germination des graines de <i>P. juliflora</i> et <i>A. seyal</i> en présence de <i>S. robustus</i>	51
2.2.7. Croissance et mycorhization de <i>P. juliflora</i> et <i>A. seyal</i> en présence de <i>S. robustus</i>	51
2.2.8. Analyses statistiques	54
2.3. RESULTATS.....	54
2.3.1. Effet de <i>S. robustus</i> sur la germination des graines de <i>P. juliflora</i> et <i>A. seyal</i>	54
2.3.2. Effet de <i>S. robustus</i> sur la survie et la croissance des plants de <i>P. juliflora</i> et <i>A.</i> <i>seyal</i>	55

2.3.3. Effet de <i>S. robustus</i> sur la mycorhization des plants de <i>P. juliflora</i> et d' <i>A. seyal</i> et le nombre de spores des sols sous légumineuses	57
2.3.4. Effet de <i>S. robustus</i> sur le potentiel mycorhizogène et la salinité des sols sous <i>P. juliflora</i> et <i>A. seyal</i>	57
2.4. DISCUSSION.....	59
2.5. CONCLUSION	60
Chapitre 3. Réponses morphologique et physiologique de <i>Sporobolus robustus</i> Kunth à la salinité	61
3.1. INTRODUCTION	61
3.2. MATERIEL ET METHODES	62
3.2.1. Substrat de culture.....	62
3.2.2. Matériel végétal et conditions de cultures	62
3.2.3. Dispositif expérimental et traitement salin	63
3.2.4. Récolte et analyse des paramètres.....	63
3.3. RESULTATS.....	64
3.3.1. Effet de la concentration en NaCl sur la production de biomasse	64
3.3.2. Les indicateurs de la tolérance à la salinité.....	64
3.4. DISCUSSION.....	71
3.5. CONCLUSION	73
Chapitre 4. Diversité des rhizobia associés à la rhizosphère de <i>Sporobolus robustus</i> Kunth et <i>Prosopis juliflora</i> (SW) DC le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide	74
4.1. INTRODUCTION	74
4.2. MATERIEL ET METHODES	76
4.2.1. Echantillonnage de sols.....	76
4.2.2. Estimation du potentiel infectieux rhizobien des sols.....	77
4.2.3. Piégeage des rhizobia.....	77
4.2.4. Isolement des rhizobia	78
4.2.5. Diversité génétique des rhizobia	78
4.2.6. Diversité symbiotique des rhizobia.....	81

4.2.7. Diversité phénotypique des rhizobia.....	82
4.2.8. Test d'infectivité et d'effectivité des rhizobia en condition de stress salin	82
4.2.9. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène des rhizobia (ARA).....	83
4.2.10. Analyses statistiques	83
4.3. RESULTATS.....	84
4.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols	84
4.3.2. Potentiel infectieux rhizobien des sols.....	86
4.3.3. Diversité génétique des rhizobia	87
4.3.4. Diversité symbiotique des rhizobia.....	99
4.3.5. Diversité phénotypique des rhizobia.....	103
4.3.6. Infectivité et effectivité des isolats de rhizobia et la fixation d'azote des plants d' <i>A. seyal</i> et de <i>P. juliflora</i>	104
4.3.7. Impact du stress salin sur l'infectivité et l'effectivité des isolats de rhizobia et sur la fixation d'azote des plants d' <i>A. seyal</i> et de <i>P. juliflora</i>	107
4.4. DISCUSSION.....	109
4.5. CONCLUSION	114
Chapitre 5. Diversité et structure génétique des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) de <i>Sporobolus robustus</i> Kunth et <i>Prosopis juliflora</i> (SW) DC le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide	115
5.1. INTRODUCTION	115
5.2. MATERIEL ET METHODES.....	116
5.2.1. Echantillonnage de sols et racines.....	116
5.2.2. Potentiel mycorhizogène du sol et mycorhization de <i>S. robustus</i> et <i>P. juliflora</i> ..	117
5.2.3. Diversité génétique des CMA des racines de <i>P. juliflora</i> et <i>S. robustus</i>	117
5.2.4. Analyses statistiques	119
5.3. RESULTATS.....	120
5.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols	120
5.3.2. Potentiel infectieux mycorhizogène des sols	122

5.3.3. Nombre et diversité morphologique des spores de CMA.....	122
5.3.4. Mycorhization de <i>S. robustus</i> et <i>P. juliflora</i>	125
5.3.5. Diversité génétique des CMA de <i>S. robustus</i> et <i>P. juliflora</i>	125
5.4. DISCUSSION.....	141
5.5. CONCLUSION	145
Chapitre 6. Effet de l'inoculation avec des champignons mycorhiziens à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale de <i>Sporobolus robustus</i> Kunth et <i>Leptochloa fusca</i> (L.) Stapf en condition contrôlée.....	146
6.1. INTRODUCTION	146
6.2. MATERIEL ET METHODES	147
6.2.1. Matériel végétal et substrat de culture	147
6.2.2. Matériel fongique et inoculation	147
6.2.3. Détermination de l'intensité de mycorhization des plants de <i>L. fusca</i> et <i>S. robustus</i>	148
6.2.4. Détermination des paramètres de croissance des plants de <i>L. fusca</i> et <i>S. robustus</i>	148
6.2.5. Détermination de la teneur en éléments minéraux des parties aériennes des plants de <i>L. fusca</i> et <i>S. robustus</i>	148
6.2.6. Analyses statistiques	149
6.3. RESULTATS.....	149
6.3.1. Effet de l'inoculation sur la colonisation racinaire de <i>S. robustus</i> et <i>L. fusca</i>	149
6.3.2. Effet de l'inoculation sur la croissance de <i>S. robustus</i> et <i>L. fusca</i>	149
6.3.3. Effet de l'inoculation sur les teneurs en éléments minéraux des parties aériennes de <i>S. robustus</i> et <i>L. fusca</i>	152
6.3.4. Corrélation entre les paramètres mesurés	153
6.4. DISCUSSION.....	154
6.5. CONCLUSION	157
7. DISCUSSION GENERALE	158
7.1. <i>S. robustus</i> , une plante facilitatrice de germination et vectrice de propagation des CMA en condition de stress salin	158

7.2. <i>S. robustus</i> , une plante accumulatrice de Na	159
7.3. Des communautés de rhizobia de la rhizosphère de <i>P. juliflora</i> et <i>S. robustus</i> abondantes et diversifiées en zone salée.....	160
7.4. Des communautés de CMA de <i>P. juliflora</i> et <i>S. robustus</i> structurées par la salinité ..	162
7.5. Des souches de CMA efficaces sur <i>S. robustus</i> et <i>L. fusca</i>	164
8. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	167
9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169
10. ANNEXES	195
9.1. Communications	195
9.2. Article 1.	196
9.3. Article 2.	197
9.4. Gamme étalon pour dosage de la proline.....	201

INTRODUCTION GENERALE

La salinisation est le processus par lequel les sels s'accumulent dans le sol. Plus de 6% des terres dans le monde sont affectées par le sel, ce qui représente plus de 800 millions d'hectares de terres (FAO, 2008 ; Sangeeta et al., 2011 ; Bahrani et HaghJoo, 2012). Depuis le début du XXe siècle, la superficie des terres agricoles touchées par la salinité ne cesse d'augmenter et la perte de terres arables dans les 40 prochaines années est estimée à 40% (Levigneron et al., 1995 ; Wang et al., 2003; Porcel et al., 2012). En Afrique, la salinisation touche 40 millions d'hectares de terre dont 15 millions directement liés aux facteurs anthropiques (Geetanjali et Neera, 2008). Au Sénégal, la dégradation des sols par salinisation affecte plus de 1700000 hectares de terre (LADA, 2009). Les parties du pays les plus touchées par ce fléau sont les régions naturelles du fleuve, de la Casamance, de Fatick et de Kaolack. La salinisation des terres dans le Sine et Saloum, liée pour l'essentiel à l'intrusion d'eau de mer du fleuve Saloum provoque une dégradation des propriétés biologiques, chimiques et physiques des sols (Boivin et Le Brusq, 1985 ; Qadir et Schubert, 2002). Les conséquences de cette dégradation des propriétés des sols sont la diminution de leur fertilité qui entraîne la réduction des rendements des cultures, et parfois la disparition du couvert végétal naturel et des terres arables remplacés par d'immenses étendues de zones salées (ou Tannes) (Boivin et Job, 1988). L'utilisation de plantes tolérantes au sel est souvent recommandée comme une approche de gestion intégrée des terres salées (Öztürk et al., 2006; Qadir et Oster, 2002; Singh 2009). Les plantes tolérantes au sel (halophytes) sont naturellement adaptées aux environnements salés grâce aux stratégies d'adaptation physiologique, biochimique et moléculaire qu'elles développent. La capacité de ces plantes à croître dans ces zones salées serait en partie liée à leur aptitude à s'associer avec des bactéries fixatrices d'azote et/ou à des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) (Diouf et al., 2007; Manga et al., 2007) présents naturellement dans leur rhizosphère. En effet, ces associations symbiotiques constituent de puissants facteurs d'adaptation des plantes aux conditions environnementales défavorables telles que la salinité (Zahran, 1999).

La symbiose entre les légumineuses et les rhizobia est la principale source d'azote dans les écosystèmes naturels (Rai et al., 2000). Elle permet aux légumineuses d'améliorer leur nutrition azotée et l'azote du sol (Zahran, 1999 ; Lindstrom et al., 2010). Au cours de la symbiose mycorhizienne à arbuscules, la plante fournit du carbone au champignon qui, en retour, améliore la nutrition hydrominérale de la plante. Ceci se traduit souvent chez les plantes mycorhizées par une meilleure capacité à tolérer la salinité que les plantes non

mycorhizées (Girlanda et al., 2007 ; Smith and Read, 2008 ; Ruíz-Lozano et al., 2011; Dodd et Ruíz-Lozano, 2012; Mbadi et al., 2015).

Sur les sols salés quasiment dénudés (tannes) du Delta du Sine et du Saloum se développe une espèce de graminée halophyte *Sporobolus robustus* Kunth. Cette graminée, qui constitue un important fourrage d'appoint pour le bétail en saison sèche, forme des touffes dans lesquelles se développent des peuplements de deux essences agroforestières hautement fixatrices d'azote (Diagne et Baker, 1994; Ndoye et al., 1995) et à usages multiples : *Vachelia seyal* Del. (Syn. *Acacia seyal* Del.) et *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. La graminée halophyte pourrait créer un microenvironnement tellurique favorisant la germination et l'établissement de *P. juliflora* et *A. seyal* dans les sols salés selon deux mécanismes non exclusifs : (i) diminution de la salinité des sols par accumulation de sels, (ii) stimulation de la microflore symbiotique adaptée. En effet, de nombreuses graminées mycotrophes, peuvent croître et améliorer le potentiel infectieux mycorhizien des sols dans les écosystèmes arides et semi-arides (Diagne et al., 2006 ; Duponnois et al., 2001 ; Ouahmane et al., 2006 ; Guadarrama et al., 2008 ; Bainard et al., 2011). Par ailleurs, *S. robustus* pourrait partager avec les légumineuses une microflore symbiotique, en particulier rhizobienne et microbienne, adaptée à la salinité et potentiellement bénéfique aux légumineuses. Les graminées hébergent aussi dans leur rhizosphère d'importantes communautés de bactéries fixatrices d'azote libres ou symbiotiques utiles au développement des légumineuses (Dommergues et al., 1999). On peut les qualifier de plantes facilitatrices ou « plantes nurses » dans la mesure où elles stimulent la microflore bactérienne et mycorhizienne et protègent les jeunes plants contre des stress abiotiques (Manaut et al., 2015). Les plantes nurses sont des espèces qui, par leurs caractéristiques intrinsèques (exemple : tolérance à la salinité), colonisent des milieux très dégradés (Azcon-Aguilar et al., 2003). Ces auteurs ont montré que les plantes nurses améliorent l'installation, la survie et le développement d'autres plantes en matérialisant des microhabitats favorables à la germination et à la croissance juvénile des essences forestières. Ainsi, *S. robustus* serait susceptible d'agir en tant que plante nurse pour améliorer la croissance de *A. seyal* et de *P. juliflora* en milieu salé.

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'évaluer l'effet plante nurse de *S. robustus* pour l'établissement de *A. seyal* et *P. juliflora* en milieu salé. Il s'articule autour de cinq objectifs spécifiques qui visent à déterminer:

1. l'impact de *S. robustus* sur la germination et l'établissement de *P. juliflora* et *A. seyal* en condition de stress salin ;
2. les stratégies d'adaptation morphologique et physiologique de *S. robustus* à la salinité ;
3. la diversité des communautés de rhizobia de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* en relation avec la salinité et la saison ;
4. la diversité des communautés de CMA de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* en relation avec la salinité et la saison ;
5. la dépendance mycorhizienne de *S. robustus* et *L. fusca*.

Ce travail de thèse est organisé en cinq chapitres qui répondent aux différents objectifs spécifiques énumérés ci-dessus.

Le **chapitre 1** est une revue bibliographique présentant un état de l'art sur la diversité, l'établissement et l'adaptation des symbioses fixatrices d'azote légumineuse-rhizobium et mycorhiziennes à arbuscules en situation de stress salin.

Le **chapitre 2** porte sur l'étude de l'impact de *S. robustus* sur la germination et l'établissement de *P. juliflora* et *Acacia seyal* en condition de stress salin.

Le **chapitre 3** porte sur l'étude des réponses morphologique et physiologique de *S. robustus* à la salinité. Ce chapitre fait l'objet d'un article en révision dans la revue « Arid Land Research and Management »

Dans le **chapitre 4**, nous cherchons à déterminer les diversités génotypique, phénotypique et symbiotique des communautés de rhizobia de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide.

Le **chapitre 5** est consacré à l'étude de la diversité et la structure génétiques des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide.

Le **chapitre 6** porte sur l'étude de l'effet de l'inoculation avec des CMA de la collection du LCM sur la croissance et la nutrition minérale de *S. robustus* et *L. fusca* en condition contrôlée en serre. Ce chapitre a fait l'objet d'un article publié dans la revue « African Journal of Biotechnology »

Enfin, les principaux résultats sont discutés et des perspectives ont été dégagées. Les résumés des articles scientifiques publiés ou en révision et des posters présentés à dans des congrès nationaux ou internationaux sont en annexe.

Chapitre 1

Revue bibliographique

1.1. La rhizosphère et sa communauté microbienne

Le système racinaire d'une plante est la partie souterraine lui servant à l'ancrage au sol, à l'absorption de l'eau et des minéraux, au stockage de ses réserves et à sa propagation ou dispersion. Le système racinaire a également comme rôle la synthèse de composés impliqués dans la régulation de sa croissance et celle des organismes qui l'entourent (Bertin et al., 2003). Les racines ne peuvent être étudiées et comprises dans toute leur complexité sans considérer également leur environnement immédiat. C'est Lorenz Hiltner qui utilisa le premier en 1904, le terme de rhizosphère, provenant du grec « rhiza » signifiant racine et « sphere/sphaera » signifiant cercle d'influence. La rhizosphère représente donc le champ d'influence du système racinaire, et comprend l'ensemble des racines ainsi que la zone de sol proche influencée par les racines. La rhizosphère comprend trois parties : la rhizosphère *sensu stricto*, le rhizoplan et la rhizosphère interne (Figure 1). La rhizosphère *sensu stricto* est constituée du sol entourant la racine, dans lequel diffusent les exsudats et se décomposent les lysats racinaires. Le rhizoplan représente la surface des racines et le mucigel tandis que la rhizosphère interne est constituée du cortex racinaire colonisé par de nombreux microorganismes qui forment un grand réservoir de diversité biologique. Cependant, il y a plus de microorganismes en nombre et espèces dans la rhizosphère *sensu stricto* que dans les deux autres régions de la rhizosphère (Badri et al., 2009). L'ensemble des micro-organismes de la rhizosphère représente le microbiote rhizosphérique (Chapelle et al., 2015).

Les caractéristiques biologiques et physico-chimiques de la rhizosphère dépendent en grande partie de la nature des composés exsudés par la plante dans un processus appelé rhizodéposition. La quantité et la composition de ces composés sont fortement influencées par les facteurs suivants : l'espèce végétale, le stade de développement de la plante et sa nutrition, le type de sol, les conditions de l'environnement telles que la température, le potentiel hydrique du sol et l'intensité de la lumière. Grâce à la rhizodéposition, de nombreuses molécules solubles, insolubles ou gazeuses sont disponibles au niveau des racines. Toute une myriade de composés carbonés issus de la photosynthèse, des ions inorganiques, de l'eau et des protons s'accumulent dans la rhizosphère (Bertin et al., 2003). Les composés carbonés

exsudés par la plante sont fortement majoritaires et peuvent représenter entre 5 et 20% des photosynthétats produits par celle-ci.

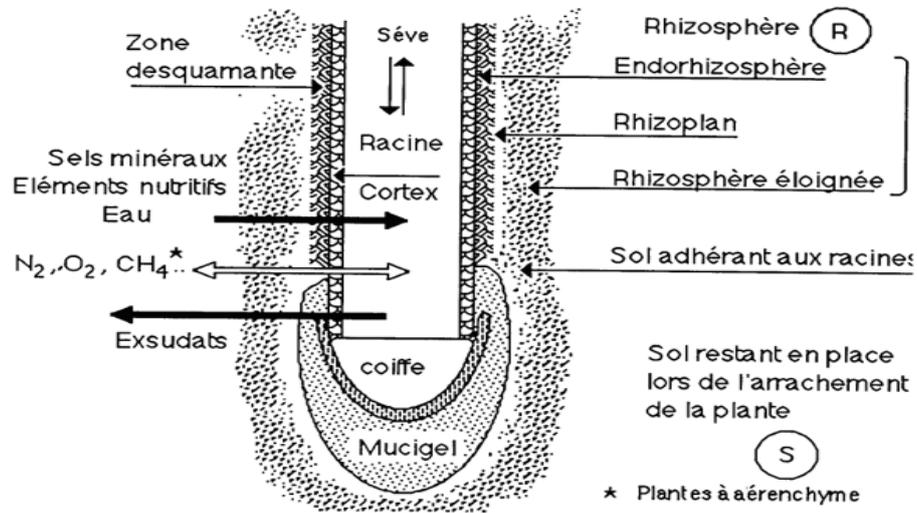


Figure 1. La rhizosphère.

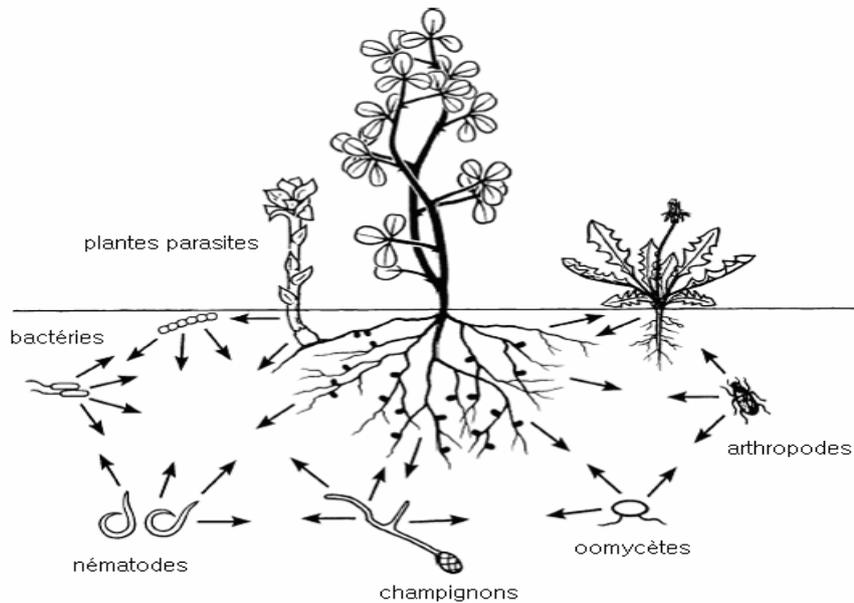


Figure 2. Représentation de la diversité des interactions entre les racines des plantes et les microorganismes du sol.

La diversité des molécules chimiques impliquées dans les mécanismes de signalisation entre la plante hôte et les autres organismes de la rhizosphère est indiquée par des flèches. La reconnaissance de ces signaux amènera à la mise en place d'une association parasitique ou mutualiste. D'après Hirsch et al., 2003.

Les exsudats racinaires sont une source d'énergie et de signaux qui vont déterminer la diversité, la densité et l'activité des organismes présents dans la rhizosphère. Il a été en effet observé une grande variabilité des communautés microbiennes dans la rhizosphère selon les espèces de plantes. Les microorganismes du sol vont établir des relations directes ou indirectes avec celles-ci (Figure 2). Dans la plupart des cas, les relations entre une plante hôte et un microorganisme du sol sont précédées par la reconnaissance des partenaires des signaux chimiques (Hirsch et al., 2003). Dans le cas des microorganismes symbiotiques, les légumineuses sont connues pour exsuder des flavonoïdes qui attirent les rhizobia. Dans le cas des mycorhizes, la plante exsude également des flavonoïdes qui stimulent la ramification des hyphes du champignon. Ces relations plante-microorganisme sont mutuellement bénéfiques aux deux partenaires. La symbiose végétale la plus ancienne et la plus répandue dans la nature est la symbiose mycorhizienne à arbuscules. La symbiose végétale la plus connue associe les plantes de la famille des Fabaceae et des bactéries fixatrices d'azote encore appelées rhizobia au sens large.

1.2. La symbiose fixatrice d'azote légumineuse-rhizobium

1.2.1. Généralités sur la fixation biologique de l'azote

Constituant des acides aminés et nucléiques, l'azote (N) est un élément essentiel pour toutes formes de vie. L'atmosphère terrestre est composée majoritairement d'azote sous forme gazeuse ou moléculaire (N_2). Au niveau du sol, les plantes ne peuvent assimiler cet élément que sous forme de nitrate (NO_3^-) et d'ammonium (NH_4^+) par absorption racinaire. L'azote assimilable ne représente cependant que 0,001% de l'azote total de la biosphère (Newton, 1998). Certaines plantes se sont affranchies de ce déficit en azote assimilable en établissant des relations symbiotiques avec des bactéries diazotrophes qui possèdent le complexe enzymatique de la nitrogénase, responsable de la réduction de l'azote moléculaire. Ainsi, les plantes actinorhiziennes établissent une symbiose fixatrice d'azote avec les actinomycètes du genre *Frankia*. Les plantes de la famille des légumineuses sont associées avec des bactéries du sol regroupées sous le terme de rhizobia. La fixation biologique de l'azote contribue approximativement à 16% de l'apport total d'azote dans les terres cultivées (Ollivier et al., 2011), réduisant ainsi l'apport d'engrais azotés dont environ 50% de la quantité épandue est perdue par lessivage (Graham et Vance, 2000).

Bien qu'il existe plusieurs symbioses fixatrices d'azote, la symbiose entre les légumineuses et les rhizobia est la plus étudiée.

1.2.2. Les légumineuses

1.2.2.1. Intérêt des légumineuses

Les légumineuses ou Fabaceae représentent la troisième plus grande famille chez les plantes supérieures après les Orchidaceae et les Asteraceae, avec plus de 720 genres et 20000 espèces comptant des espèces herbacées et des arbres (Cronk et al., 2006). Sur la superficie récoltée et de la production totale, cette famille est considérée comme le deuxième groupe de cultures vivrières et fourragères le plus important dans le monde après les céréales. Les légumineuses produisent des protéines en abondance (leurs grains contiennent 3 fois plus de protéines que ceux des céréales), sans fertilisation azotée. Les légumineuses à graines contribuent pour 33% aux besoins azotés de l'alimentation humaine, avec par ordre d'importance le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le pois d'Angole (*Cajanus cajan*), le pois à vache (*Vigna unguiculata*) et la lentille (*Lens culinaris*) (Graham et Vance, 2003). Plus d'un tiers de l'huile végétale consommée pour l'alimentation humaine est fournie par les légumineuses avec en tête le soja et l'arachide. Les légumineuses entrent donc dans l'alimentation humaine mais sont aussi indispensables à la production animale en termes d'aliments et de fourrage. Les légumineuses représentent pour les populations un apport en bois et fourrage (*Acacia*, *Dalbergia*, *Pterocarpus*, etc.). Du fait de cette capacité à établir une symbiose fixatrice d'azote, les légumineuses font partie des plantes pionnières qui permettent la fertilisation des sols. On estime à environ 60 millions de tonnes par an l'azote fixé par les légumineuses cultivées, presque autant que la quantité d'engrais azoté épandue dans la même période (Smil, 1999 ; Graham et Van, 2003). Les légumineuses sont également capables de former des associations symbiotiques avec des rhizobia et des champignons mycorhiziens à arbuscules.

1.2.2.2. La phylogénie des Légumineuses

Les légumineuses appartiennent à la famille des Leguminosae (ou Fabaceae), à l'ordre des Fabales. La famille des Fabaceae se subdivisent en 3 sous-familles de tailles très inégales (Polhill et al., 1981): les Caesalpinioideae, les Mimosoideae et les Papilionoideae.

Les Caesalpinioideae forment un groupe très divers de 2 300 espèces réparties en 171 genres et 4 tribus (Lewis et al., 2005). Cette sous-famille rassemble principalement des arbres et arbustes retrouvés en régions tropicales et subtropicales. Parmi les espèces de Caesalpinioideae, seulement 23% ont été décrites comme étant capables de former des

nodosités. Elles sont essentiellement retrouvées parmi les Caesalpinieae et des Cassieae (De Faria et al., 1989).

Les Mimosoideae (environ 77 genres réparties entre 3000 espèces) sont présentes principalement dans les forêts tropicales et subtropicales avec notamment les genres *Acacia* et *Albizia* (Young et al., 2003). Selon Dommergues et al. (1999), 90 % des espèces examinées chez les *Mimosacées* sont capables de former des nodosités.

Les Papilionoideae constituent la plus grande sous-famille des *Fabaceae* avec 478 genres et environ 13 800 espèces dont 97% parmi les espèces testées forment des nodosités (De Faria et al., 1989). Les membres de cette sous-famille sont principalement des plantes agricoles et des herbacées des régions tropicales et tempérées (De Faria et al., 1989).

1.2.3. Les rhizobia

1.2.3.1. Généralités sur les rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatifs, aérobie, non sporulantes. Ils se présentent sous deux formes :

La forme végétative : les bactéries sont mobiles par un seul flagelle polaire ou par deux à six flagelles (Somasegaran et Hoben, 1994). Pour les rhizobia à croissance rapide, les cellules sont mobiles par 2-6 flagelles. Celles à croissance lente sont mobiles par un seul flagelle polaire ou un flagelle subpolaire (Somasegaran et Hoben, 1994).

La forme bactéroïde : à l'intérieur des nodosités, les rhizobia se transforment en bactéroïdes de forme branchée, sphérique ou en massue (Perry et al., 2004).

Les rhizobia peuvent assimiler un large éventail de source de carbone et d'azote dans la rhizosphère (Fuhrer et al., 2005). Les rhizobia à croissance rapide ont une croissance meilleure en présence de glucose, de mannitol ou de saccharose. La majorité des souches à croissance lente préfère le pentose. (Somasegaran et Hoben, 1994).

Le trait fonctionnel le plus important des rhizobia est leur capacité à induire des nodosités, sur racines qu'ils colonisent (Batut et al., 2004) et parfois sur les tiges (Dommergues et al., 1999), dans lesquelles ils fixent de l'azote au bénéfice de la légumineuse.

1.2.3.2. Diversité taxonomique des rhizobia

La première bactérie nodulant une légumineuse a été isolée en 1888 par Beijerinck. Elle a été initialement nommée *Bacillus radicola*, puis renommée *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Plus tard, la taxonomie des rhizobia a été fortement influencée par la plante hôte qu'ils

sont capables de noduler (Fred et al., 1932). Dans la classification initiale des bactéries (Bergey et al., 1923), la capacité de nodulation a été le critère principal dans la classification des rhizobia. Plus tard, deux groupes de rhizobia ont été distingués sur la base de leur vitesse de croissance (Jordan, 1982) : le genre *Rhizobium* à croissance rapide, et le genre *Bradyrhizobium* à croissance lente.

Actuellement, le groupe fonctionnel des rhizobiums comprend 98 espèces réparties au sein de 13 genres d'alpha (ou α) protéobactéries et beta (ou β) protéobactéries (Weir, 2016).

Toutes les α -protéobactéries appartiennent à l'ordre des Rhizobiales, tandis que les β -protéobactéries appartiennent à l'ordre des Burkholderiales. Les α protéobactéries sont constituées des genres *Rhizobium*, *Ensifer* (anciennement *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Devosia*, *Shinella* et *Aminobacter* (Franck, 1889 ; Jordan, 1982 ; Sy et al., 2001 ; Young, 2003 ; Maynaud et al., 2012). Les β -protéobactéries sont composées de : *Burkholderia* (Chen et al., 2007) et *Cupriavidus* (anciennement *Ralstonia*) (Vandamme et Coenye, 2004). D'autres études auraient également identifié la présence de protéobactéries du groupe γ dans les nodules des légumineuses (Huang et al., 2012).

Cette classification des rhizobiums est loin d'être définitive, elle s'affine sans cesse et s'enrichit d'année en année de nouvelles espèces et nouveaux genres de bactéries grâce à l'apparition de nouveaux outils de taxonomie moléculaire et une exploration plus large de la diversité dans des zones à forte biodiversité.

1.2.3.3. Techniques utilisées en taxonomie bactérienne

1.2.3.3.1. Les gènes ribosomiques

Les gènes ribosomiques ont été utilisés comme marqueurs moléculaires dans l'étude phylogénétique de différents organismes en raison de leur universalité, leur abondance, leur taille convenable aux analyses comparatives (Ludwig et Schleifer, 1999). Les ADNr contiennent des régions de séquence hautement conservée très utiles pour la désignation des amorces (Hillis et Dixon, 1991) et d'autres régions de séquence suffisamment variable pour servir comme un excellent moyen taxonomique (Grimont et Grimont, 1986). Il existe trois types de l'ADN ribosomique : le 5S, le 16S et le 23S (Jensen et Straus, 1993). L'ADNr 5S est très peu utilisé vu sa petite taille d'environ 120 nucléotides, contrairement à l'ADNr 16S codant pour la petite sous unité ribosomique (SSU : *small subunit*) d'environ 1500 pb et l'ADNr 23S codant pour la grande sous unité ribosomique (LSU : *Large subunit*) d'environ

2500 à 3000 pb (Gürtler et Stanisich, 1996). L'espace intergénique entre le 16S et le 23S est transcriptionnel d'où la désignation ITS (Intergenic Transcribed Spacer) (Normand et al., 1996).

L'analyse de l'ADNr 16S est devenue, depuis le début des années 1990, la technique la plus utilisée pour l'identification, la classification et la phylogénie des bactéries et des autres organismes vivants (Olsen et al., 1994). L'ADNr 16S est qualifié d'horloge moléculaire idéale à l'étude des relations phylogénétiques pour trois raisons principales : (i) il est ubiquitaire chez les bactéries, (ii) sa faible taille (environ 1500 pb) permet un séquençage rapide, (iii) la présence de domaines conservés variables le long de sa séquence permet l'estimation des relations phylogénétiques entre des organismes très proches ou d'une diversité élevée (Schleifer, 2009). Ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" pour l'amplification in vitro par PCR et le séquençage (Weisburg et al., 1991). Toutefois, la technique présente un inconvénient incontournable qui est la détection de plusieurs copies divergentes d'ADNr 16S (Amann et al., 2000). Ce serait lié à des transferts latéraux ou des recombinaisons de gènes ADNr 16S entiers donnant naissance respectivement à la présence de plusieurs copies et de séquences chimériques (Wang et Zhang, 2000). Egalement, sa forte conservation dans certains genres ne permet parfois une identification nette entre certaines espèces.

Outre le gène codant l'ARNr 16S, l'espace intergénique (ITS) localisé entre les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'ARNr 23S a été également utilisé pour étudier la diversité et la structure des rhizobia nodulant *A. seyal* (Diouf et al., 2007). Cette région présente un polymorphisme de taille très important permettant de différencier des espèces.

1.2.3.3.2. Les gènes de ménage

L'approche MLSA consiste à étudier de multiples gènes concaténés qui sont ensuite utilisés pour obtenir une phylogénie robuste, reflétant de façon significative l'histoire évolutive des bactéries étudiées (Kämpfer et Glaeser, 2012). Plusieurs études ont confirmé que le séquençage d'un ou de plusieurs gènes de ménage (MLSA pour *MultiLocus Sequence Analysis*) peut être utilisé pour analyser plus finement le degré de parenté entre des groupes de bactéries et définir de nouvelles espèces bactériennes (Vinuesa et al., 2005). Les gènes à choisir doivent obéir à certaines conditions :

- Ils doivent être ubiquistes et présentés des orthologues chez les organismes étudiés ;

- Ils ne doivent pas avoir de paralogues, c'est à dire être présent dans le génome qu'en une seule copie ;
- La taille de leurs séquences doit être suffisamment longue (>900bp) ;
- Ils doivent comporter au moins de domaines hautement conservés ;
- Ils ne doivent pas être soumis ni à des transferts horizontaux récents (HGT) ni à des événements de recombinaison ;
- Ils doivent être suffisamment éloignés entre eux et répartis le long du chromosome.

Les gènes de ménage, qui sont des gènes assurant les fonctions indispensables à la vie de tous types de cellules, sont ainsi de bons candidats comme marqueurs alternatifs à l'ADNr 16S (Gaunt et al., 2001). En effet, l'analyse MLSA basée sur des marqueurs phylogénétiques alternatifs tels que les gènes de ménage *dnaK*, *dnaJ*, *atpD*, *recA* et *glnA* a été nécessaire pour la définition d'espèce au sein du genre *Mesorhizobium* (Gaunt et al., 2001; Alexandre et al., 2008). Le gène *recA* code pour la protéine RecA qui entre en jeu dans le processus de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (Gaunt et al., 2001). Les gènes *atp* sont inclus dans la catégorie des gènes de ménage et leur présence dans le génome bactérien est considérée comme essentielle pour la production de l'énergie et la survie des micro-organismes (Ventura et al., 2004). Le gène *atpD* code pour la sous-unité β de l'ATP synthase.

1.2.3.3.3. Gènes de nodulation

La génétique moléculaire combinée à l'étude du comportement symbiotique de souches mutantes de bactéries ont conduit à l'identification des gènes de nodulation (*nod*, *nol* et *noe*). Les gènes de nodulation sont impliqués dans la biosynthèse de lipochitoooligosaccharides (facteurs Nod), qui agissent comme molécules signal et induisent la formation des nodosités (Masson-Boivin et al., 2009). Les gènes *nod* peuvent être fonctionnellement divisés en trois classes : les gènes régulateurs, les gènes *nod* communs et les gènes spécifiques (Wais et al., 2002).

Les gènes *nod* communs (gènes *nodABC*), ont été les premiers à être caractérisés et séquencés. Ces gènes très conservés sont présents chez les différentes espèces de rhizobia, à l'exception de certains *Bradyrhizobium* (Miche et al., 2010). Ils sont responsables de la synthèse du squelette des facteurs Nod. Ils sont interchangeables entre espèces de *Rhizobium*, *Azorhizobium* et *Bradyrhizobium* sans modifier le spectre d'hôtes (Wais et al., 2002). Toutefois, une mutation de l'un de ces gènes entraîne une perte de toutes les propriétés symbiotiques (Denarié et al., 1996).

Contrairement aux gènes *nod* communs, les gènes spécifiques ne sont pas présents chez tous les rhizobia. Ces gènes sont responsables des substitutions qui s'opèrent sur le squelette de base des facteurs Nod. Chaque souche possédant son propre cortège de gènes *nod* spécifiques qui permettent la production d'un cocktail de facteurs Nod (Wais et al., 2002).

Les gènes régulateurs de transcription *nodD* codent pour les protéines NodD (Long, 2001). L'expression des gènes *nod* communs et spécifiques est sous le contrôle de gènes *nodD* (Broughton et al., 2000). Ces derniers sont impliqués dans les étapes précoces de la symbiose (Perret et al., 2000). La reconnaissance entre une protéine NodD et un flavonoïde donné détermine un premier niveau de spécificité dans l'interaction symbiotique (Schultze et al., 1994). Toutefois, cette spécificité n'est pas stricte, une même souche de *Rhizobium* peut posséder plusieurs copies de gène *nodD*, présentant ainsi des spécificités différentes (Schlaman et al., 1992).

1.2.3.3.4. Gènes de fixation de l'azote

Les gènes *nif* existent chez plusieurs bactéries dont les rhizobia (Young et Haukka, 1996). Ces gènes codent pour la nitrogénase réductase. Les gènes *nifHDK* sont les gènes de structure du complexe nitrogénase. La plupart des autres gènes jouent un rôle dans la synthèse et la maturation des groupements prosthétiques. La phylogénie des gènes *nifH* a été rapportée comme étant en parfait accord avec celle qui dérive de l'analyse du gène de l'ADNr 16S (Dobert et al., 1994), en dépit de quelques exceptions (Eardly et al., 1992). Plus tard, Haukka et al. (1998) ont comparé plusieurs séquences et ont conclu que la phylogénie résultant du gène *nifH* est différente de celle de l'ADNr 16S mais plutôt similaire à celle du gène *nodA*. Ce dernier résultat est plus logique du fait que les gènes *nif* et *nod* sont étroitement liés et sont tous les deux localisés chez beaucoup d'espèces de rhizobia sur des éléments transmissibles tels que les plasmides ou sur des transposons c'est le cas chez *Mesorhizobium loti* (Sullivan et Ronson, 1998). Par ailleurs, les séquences des gènes *nodC* et *nifH* sont étroitement apparentées chez les souches nodulant les mêmes espèces de légumineuses (Diouf et al., 2010).

1.2.4. Mécanisme de la nodulation

Le processus de nodulation est très complexe, régulé à chaque étape par un échange de signaux nécessaires à l'interaction entre les deux espèces. La constitution d'un nodule

fonctionnel peut être divisée en trois étapes : l'infection, l'organogénèse, et la fixation de l'azote.

1.2.4.1. Mode d'infection

L'étape préalable à l'infection s'initie par un dialogue moléculaire entre le rhizobia et la plante hôte (Limpens et Bisseling, 2003). Les composés phénoliques (ex. Flavonoïdes) libérés par les racines de la plante constituent le premier signal moléculaire ; ils sont reconnus spécifiquement par des protéines régulatrices bactériennes, les protéines NodD. L'activation de ces protéines conduit à l'expression coordonnée des gènes de la nodulation (gènes *nod*, *noe* et *nol* collectivement appelés gènes *nod*). Les produits des gènes *nod* sont impliqués dans la biosynthèse de lipochito-oligosaccharides (LCO) appelés facteurs Nod (Rodriguez-Navarro et al., 2007), qui sont ensuite reconnus par des récepteurs spécifiques de la plante (Kouchi et al., 2010). Les *Bradyrhizobium* photosynthétiques associés à *Aeschynomene* constituent cependant une exception car ces bactéries ne possèdent pas de gènes de nodulation et ne produisent pas de Facteur Nod (Masson-Boivin et al., 2009).

Le mode d'infection le plus étudié et le plus courant est l'infection à travers des poils absorbants, observée chez des légumineuses tempérées (exemples : *Medicago*, *Trifolium*) et certaines légumineuses tropicales et subtropicales (exemples : *Lotus*, *Phaseolus*, *Glycine*) (Gage, 2004). En réponse aux facteurs Nod produits par la bactérie, les poils absorbants subissent des courbures caractéristiques dites « en crosse de berger » (Oldroyd et al., 2011) (Figure 3). Une croissance apicale inverse se met alors en place, formant un passage long et étroit appelé le cordon d'infection, dans lequel les bactéries se divisent. Le cordon progresse vers le site définitif de libération des bactéries : le primordium nodulaire qui devient ensuite le lobe nodulaire.

Il existe un mécanisme d'infection intercellulaire où la pénétration des bactéries se fait au niveau des blessures physiques causées par l'éclatement de l'épiderme « *crack entry* » lors de l'apparition des jeunes racines latérales ou des racines adventives. Ce mode d'infection alternatif a été décrit chez les légumineuses subtropicales, comme *Arachis hypogaea* (Chandler, 1978) et *Aeschynomene* (Alazard et Duhoux, 1990) où aucun cordon d'infection n'est observé. Les rhizobia envahissent les cellules corticales à travers les parois cellulaires structurellement modifiées. Chez *Sesbania rostrata* (Ndoye et al., 1994) et *Neptunia* (Subba-Rao et al., 1995), l'infection entraîne la formation de poches d'infection intercellulaire.

Un troisième mode d'infection a été décrit chez *Mimosa scabrella* (Sprent, 1989). Les rhizobia pénètrent directement à la jonction de deux cellules épidermiques intactes (infection intercellulaire) par la dissolution de la lamelle moyenne des parois radiales (Gonzalez-Sama et al., 2004) et envahissent les cellules hôtes (de Faria et al., 1988).

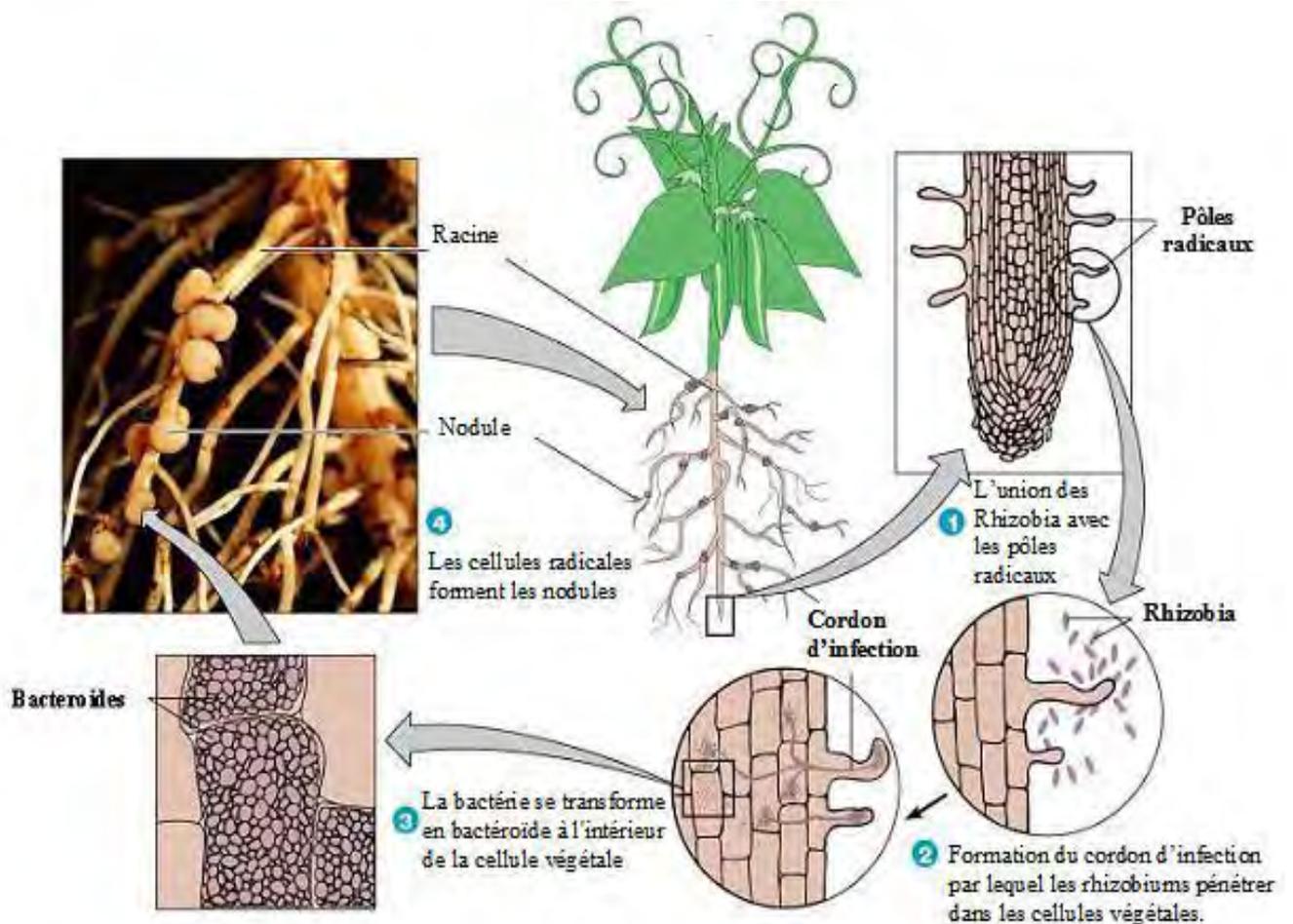


Figure 3. Différentes étapes de l'établissement de la symbiose rhizobia-légumineuse (Oldroyd et al., 2011).

1.2.4.2. Structure et développement du nodule

Parallèlement à la progression de l'infection, l'organogenèse nodulaire se met en place. Les cellules végétales du cortex et du péricycle entrent en division et forme un primordium nodulaire, lieu de libération des bactéries, et qui se différencie ensuite en nodosité mature (Trevaskis et al., 2002). A l'intérieur de la nodosité, la bactérie se différencie en bactéroïdes, forme sous laquelle elle est capable de réduire l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium (NH_4^+) (Wang et al., 2012). Le complexe formé par les bactéroïdes, qui sont entourées par la membrane spécialisée de la plante, est appelé symbiosome (Oldroyd et Downie, 2004).

Chez les légumineuses deux types de nodules peuvent être distingués : déterminés et indéterminés suivant le site d'initiation des divisions cellulaires du cortex et la persistance ou non du méristème (Hirsch, 1992). Les nodules déterminés sont issus de l'auxèse des cellules du méristème apical qui cesse son activité à maturation de la nodosité. La zone centrale est globalement constituée d'une zone de fixation d'azote c'est à dire de cellules au même stade de différenciation, plus ou moins infectées et d'une zone de sénescence (Ferguson et al., 2010). Les nodules indéterminés sont formés à partir du cortex interne et ont un méristème apical persistant qui produit en continue de nouvelles cellules, ce qui se traduit par des nodules de forme allongée et organisés en zones histologiquement différentes (Schumpp et Deakin, 2010).

1.2.5. Autorégulation de la nodulation par la légumineuse

La nodulation est le résultat d'un dialogue utilisant des signaux moléculaires entre le microsymbionte et la plante hôte. La symbiose est contrôlée par un processus d'autorégulation qui commande le nombre de nodules et la fixation de l'azote par une signalisation à distance (Caetano-Anolles et al., 1991). Après inoculation, les nodules sont formés dans les régions spécifiques de la racine. Quand le système racinaire se développe, d'autres régions pouvant être infectées et les nodosités sont continuellement formées. Mais une fois que les nodules sont fonctionnels, la nodulation est inhibée dans les autres parties jeunes. Dans ce cas les plantes contrôlent le nombre de nodules en maintenant un certain équilibre: bénéfice (fixation d'azote) / coût (ressources de carbone) (Stacey et al., 2006). Cette autorégulation est réalisée par des signaux moléculaires émis par la partie racinaire ainsi que par des phytohormones (ex: ABA) produits au niveau des tiges (Oka-Kira et Kawaguchi, 2006).

1.2.6. Fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote

La réduction biologique de l'azote atmosphérique (N_2) en ammonium (NH_3) fournit environ 65% de l'azote disponible dans la biosphère. La majeure partie de cet ammonium provient de la symbiose légumineuse-rhizobium (Newton, 2000).

La fixation d'azote par les légumineuses se déroule dans les nodosités, catalysée par le complexe enzymatique de la nitrogénase (Kaminski et al., 1998). Le fonctionnement de la fixation d'azote nécessite la contribution des deux partenaires. La plante fournit aux nodosités des photosynthétats acheminés sous forme de saccharose à travers le phloème. En échange, le bactéroïde fournit la machinerie génétique pour la synthèse de la nitrogénase responsable de

la fixation de l'azote. Très sensible à l'oxygène, la nitrogénase est protégée chez les légumineuses par une protéine végétale, la légghémoglobine qui se lie à l'oxygène et permet ainsi de réguler la diffusion de l'oxygène aux bactéroïdes (Ott et al., 2005).

1.2.7. Méthodes de mesure de la fixation d'azote

La mesure directe par dilution isotopique est la première méthode pour mesurer la fixation d'azote. C'est une mesure à partir d'un enrichissement isotopique en azote ^{15}N (Burriss et Wilson, 1957). L'organisme fixateur d'azote est exposé à du $^{15}\text{N}_2$. L'azote qu'il fixe et qu'il utilise ensuite est marqué isotopiquement. Une digestion est ensuite effectuée par la méthode de Kjeldahl et l'azote isotopique qui en ressort est analysé par spectrométrie de masse (Burriss et Wilson, 1957). Cette méthode est lourde et nécessite beaucoup de manipulation. C'est une méthode destructive.

La méthode de mesure indirecte par réduction de l'acétylène (C_2H_2) (ARA, de l'anglais *Acetylene Reduction Assay*) a été développée par Hardy et al. (1968). C'est actuellement la méthode la plus utilisée et comparativement à la méthode de dilution isotopique, elle est rapide, simple et non destructive. C'est une méthode robuste qui permet d'évaluer et de comparer l'activité des nitrogénases.

1.2.8. Facteurs affectant la fixation biologique de l'azote

La symbiose entre les légumineuses et les rhizobia est sensible aux contraintes biotiques (ex. maladies, ravageurs), ainsi qu'aux contraintes abiotiques du sol (Kumar et al., 2003). On estime que 90% des terres arables sont soumises aux stress abiotiques (Dita et al., 2006). Parmi ces contraintes abiotiques nous pouvons citer les fortes teneurs en NO_3^- , NH_4^+ du sol, la sécheresse, et la salinité. Les fortes teneurs en azote minéral du sol (NO_3^- , NH_4^+) inhibent la nodulation et la fixation d'azote.

La sécheresse est l'une des contraintes majeures de la production végétale (Sharma et Lavanya, 2002). La sécheresse affectent la nodulation, la fixation de l'azote et la diversité génétique des rhizobia (Graham, 1992 ; Mnasri et al., 2007).

La salinité affectent négativement les interactions entre les rhizobia et les légumineuses en limitant la nodulation et fixation d'azote à cause de la toxicité des ions Na^+ et Cl^- , du déséquilibre ioniques, et de la réduction du potentiel hydrique de la plante (Zahran, 1999 ; Jansa et al., 2011).

1.3. La symbiose mycorhizienne

1.3.1. Généralités sur les symbioses mycorhiziennes

La mycorhize (du grec «mukês» pour champignon et «rhiza» pour racine) est l'association symbiotique s'établissant entre les plantes et les champignons du sol appartenant au règne fongique. Ce terme « mycorhize » fut créé, à l'origine, par le phytopathologiste allemand Frank en 1885. Dans cette relation, le champignon peut consommer jusqu'à 20% des produits de la photosynthèse (Bago et al., 2003). En contrepartie, il fournit à la plante hôte, des sels minéraux mais également de l'eau, ce qui se traduit souvent chez les plantes mycorhizées par une meilleure compétitivité et capacité à tolérer les stress environnementaux que les plantes non mycorhizées (Girlanda et al., 2007 ; Smith et Read, 2008).

Environ 80% des plantes sont mycorhizées, la non mycorhization étant l'exception. Seules quelques plantes ne forment pas de mycorhizes : les Chenopodiacées, les Caryophyllacées, les Brassicacées, les Urticacées, les Joncacées et quelques Cypéracées (Smith et Read, 1997). Il existe sept types de symbioses mycorhiziennes (mycorhizes à arbuscules, mycorhizes arbutoïdes, mycorhizes à pelotons des Orchidacées, mycorhizes monotropoïdes, mycorhizes éricoïdes, ectomycorhizes et ectendomycorhizes), dont les plus importantes et les plus répandues sont les mycorhizes à arbuscules (MA) et les ectomycorhizes (Smith et Read, 2008 ; Fortin et al., 2008).

Les ectomycorhizes sont datées d'environ 250 millions d'années. Ce type de mycorhize est rencontré majoritairement dans les régions boréales et tempérées et rarement dans les régions tropicales (Smith et Read, 2008 ; Bâ et al., 2012). Le mycélium du champignon forme un manchon autour de la racine appelé manteau fongique d'où partent des hyphes extramatricielles explorant un grand volume de sol (Figure 4). Les hyphes du manteau fongique pénètrent également entre les cellules du cortex racinaire sans jamais traverser la paroi pour former une interface symbiotique appelée réseau de Hartig, lieu d'échanges entre les deux partenaires (Nehls, 2008). Cette symbiose implique 3 à 5% des familles de plantes vasculaires ligneuses pour l'essentiel et environ 25000 espèces de champignons appartenant aux basidiomycètes ou aux ascomycètes (Fortin et al., 2008 ; Bâ et al., 2011).

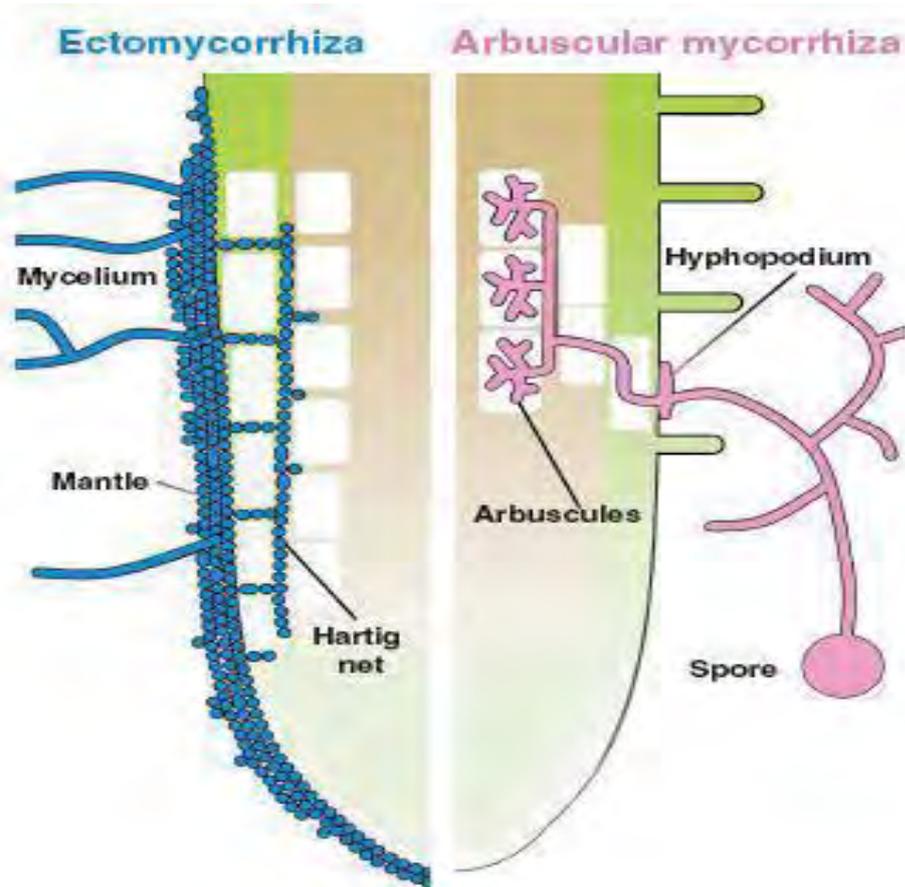


Figure 4. Hyphes des champignons ectomycorhiziens (en bleu) et des champignons mycorhiziens à arbuscules (en rose) (Bonfante et Genre, 2010).

Les champignons ectomycorhiziens se développent tout autour de la racine jusqu'à l'extrémité de l'apex où se prolonge le manteau fongique et d'où partent des hyphes extracellulaires. La colonisation des hyphes s'effectue aussi entre les cellules du cortex racinaire pour former le réseau de Hartig.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules ne colonisent pas l'extrémité de l'apex racinaire. A partir de l'hyphopodium, les hyphes pénètrent les racines pour former des arbuscules et développent à l'extérieur un réseau et des spores

Les MA comptent environ 250 espèces décrites sur la base de la morphologie des spores (Bonfante et Genre, 2010). Cette symbiose concerne environ 86% des plantes terrestres (Smith et Read, 2008 ; Brundrett, 2009). Il s'agit de la plupart des angiospermes, des gymnospermes, des bryophytes et des ptéridophytes. Ce large spectre d'hôte végétal pourrait être inhérent au caractère ancestral de la symbiose (Parniske, 2000). En effet l'emploi d'outils de biologie moléculaire et des données fossiles ont permis de situer l'origine de ces endosymbiontes à environ 450 millions d'années avant notre ère, soit en même temps que l'apparition des premières plantes terrestres (Simon et al., 1993; Redecker et al., 2000). Cela suggère que les plantes vasculaires et les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

aient co-évolué, et que ces derniers aient permis aux plantes de coloniser le milieu terrestre (Schwarzott et al., 2001).

1.3.2. Généralités chez les CMA.

1.3.2.1. Génétique des CMA

Les CMA sont des biotrophes obligatoires. Ils ne sont pas cultivables et dépendent entièrement de l'hôte végétal pour leur nutrition carbonée et pour accomplir leur cycle de développement.

Les CMA sont des organismes multinucléés. Leur reproduction est de type asexué et se réalise de façon clonale. Les hyphes et les spores peuvent contenir, selon les espèces, de plusieurs centaines à plusieurs milliers de noyaux. Un polymorphisme génétique important a été détecté dans ces spores polynucléées grâce à l'analyse des gènes qui codent pour l'ARNr. Des interprétations différentes, encore en discussion, ont été avancées sur la ploïdie et la caryotie des CMA. Les CMA pourraient être homocaryotes (noyaux identiques) et plutôt polyploïde, ou être homocaryotes et haploïdes, ou encore hétérocaryotes (noyaux différents) et haploïdes (Pawlowska et Taylor, 2004). L'existence de fusions (ou anastomoses) entre hyphes extraradiculaires entre isolats de champignons génétiquement très proches conduisent à des échanges de noyaux et de cytoplasme, compliquant encore plus la structure génétique des CMA (Sanders et Croll, 2010). Des anastomoses entre hyphes d'isolats de la même espèce ont été mises en évidence notamment chez *Rhizophagus irregularis* et *Funneliformis mosseae*.

1.3.2.2. Cycle de développement des CMA

Les différentes étapes de la colonisation des racines par les CMA sont illustrées sur la figure 5 (Balestrini et Lanfranco, 2006). La mise en place de la symbiose MA se déroule en trois phases :

- une phase a-symbiotique ;

Les spores de champignon MA sont généralement produites dans le sol à partir du mycélium extra-racinaire. Les spores germent spontanément en puisant dans ses réserves (lipides) puis forment des hyphes germinatifs. En absence de la plante hôte, la croissance du tube germinatif ralentit et de nouvelles spores peuvent apparaître et germer.

- une phase pré-symbiotique ;

Avant même le premier contact, un échange de signaux diffusibles se déroule entre les deux partenaires. La plante sécrète des exsudats, les strigolactones, perçus par le champignon. Ces

exsudats induisent la ramification des hyphes (« branching factor ») et stimulent l'activité métabolique du champignon (Bécard et al., 2004 ; Besserer et al., 2006).

- une phase symbiotique ;

Au contact de la racine, les hyphes se renflent à la surface de l'épiderme pour former un hyphopode (appressorim). Dans la cellule épidermique située sous l'hyphopode, se met en place un appareil de pré-pénétration (APP) grâce auquel le champignon pénètre dans le cortex interne où sont mis en place les arbuscules, lieu d'échanges entre la plante et le champignon. Les arbuscules ne sont pas des structures permanentes, leur développement se fait de manière asynchrone et la durée de vie d'un arbuscule est contrôlée par la cellule végétale selon des mécanismes mal connus (Walter et al., 2007). Certaines espèces de CMA forment aussi vésicules impliquées dans le stockage de lipides. Toutes les espèces de CMA développent des réseaux d'hyphes extra-racinaires dont les fonctions sont multiples : prélèvement des nutriments dans les microporosités du sol, formation de nouvelles mycorhizes avec les racines de plantes voisines (infections secondaires), et production de nouvelles spores (Paszkowski, 2006; Requena et al., 2006).

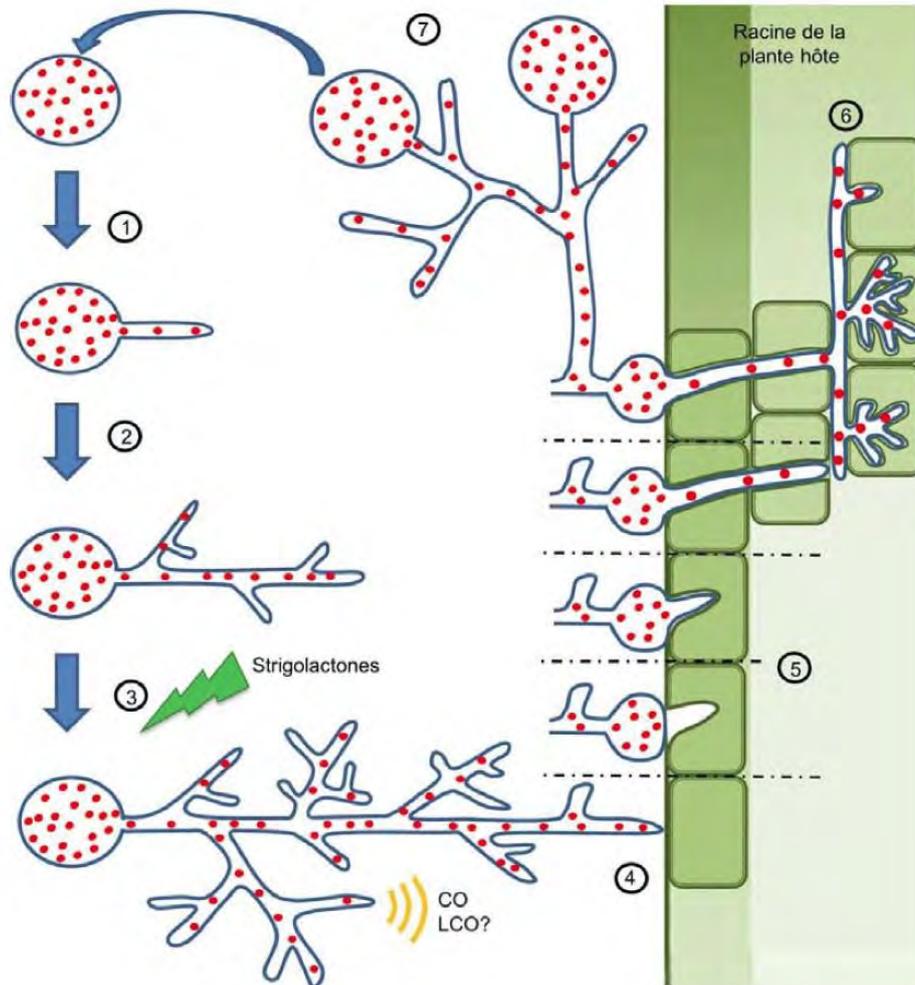


Figure 5. Cycle de développement des CMA. Phases a-symbiotiques 1 et 2 ; phases pré-symbiotiques 3 et 4 ; phases symbiotiques 5, 6 et 7. (Malbreil, 2014).

1.3.2.3. La classification des Glomérormycètes

La taxonomie des champignons MA a d'abord été basée sur la morphologie des spores en particulier la structure de leurs parois (Morton et Benny, 1990). A cette époque, les CMA appartenaient à l'ordre des Glomales au sein de la classe des Zygomycètes. Ils comprenaient deux sous ordres (Glominées et Gigasporinées), 3 familles (Glomacées, Acaulosporacées, et les Gigasporacées), 6 genres (*Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* et *Scutellospora*) et environ 200 espèces. Cette classification morphologique des spores présentent des limites: caractères morphologiques peu stables, peu de variations entre les espèces différentes, sporulation non corrélée avec la colonisation racinaire, diversité non représentative des communautés fongiques actives des racines.

L'analyse moléculaire, basée sur l'amplification de régions ribosomiques (ex. 18S) de l'ADN par PCR, et alliée aux critères morphologiques, ont permis de mieux définir les espèces voire les taxons moléculaires. L'étude des relations phylogénétiques entre les CMA basée sur les séquences codant l'ARNr 18S a abouti à leur regroupement en un seul phylum, appelé *Glomeromycota* (Schüßler et al., 2001). A ce jour, ce phylum se compose de 4 ordres (Diversisporales, Glomerales, Archeosporales, Paraglomerales), 11 familles, 26 genres et environ 250 espèces (Redecker et al., 2013) (Figure 6).

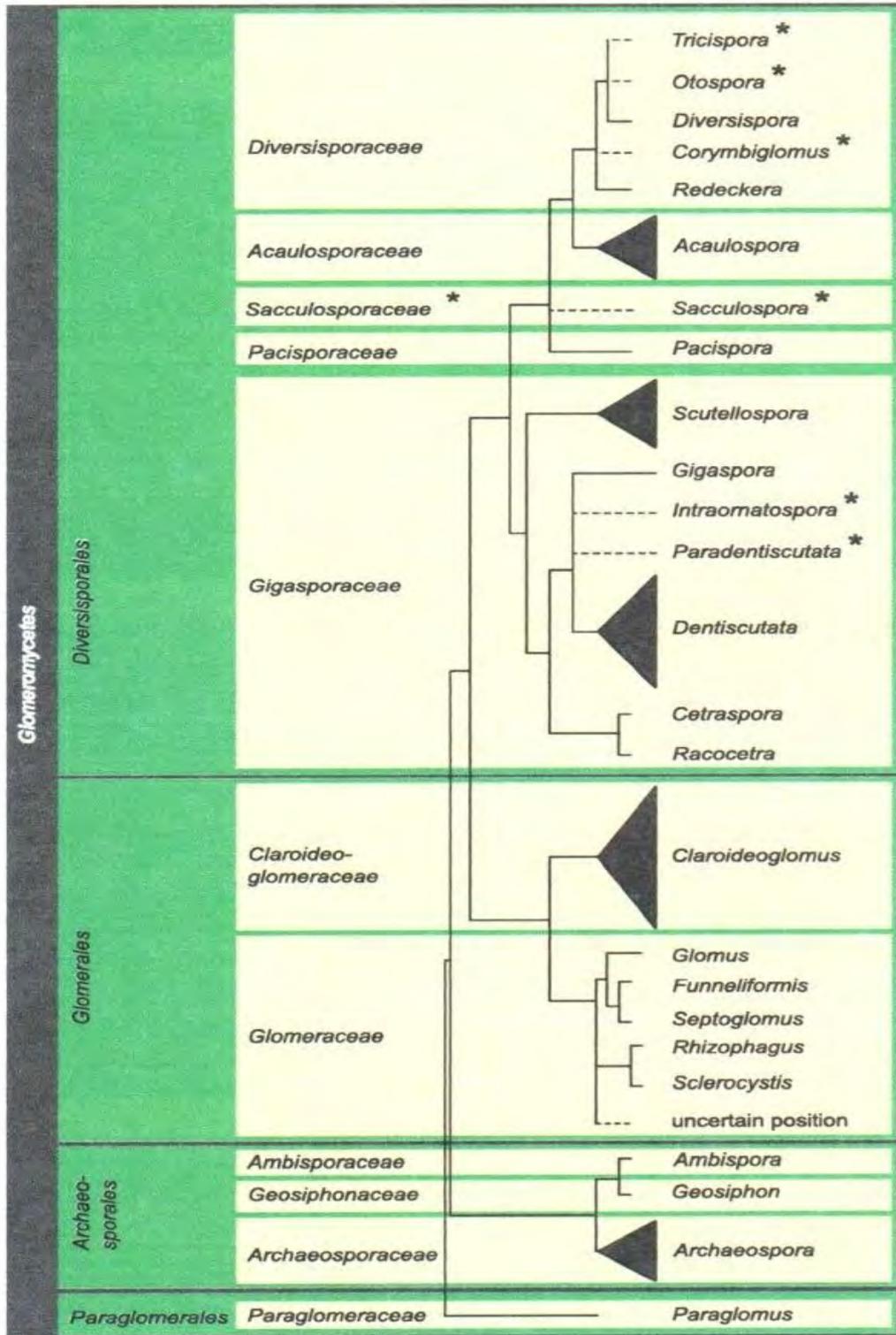


Figure 6. Phylogénie des *Glomeromycota*.

Les traits pointillés indiquent une position phylogénétique incertaine. Les astérisques soulignent les genres pour lesquels il manque des données mais qui n'ont pas été remaniés. Le nombre d'espèces décrites par genre ainsi que les auteurs ayant décrit ces genres pour la première fois sont indiqués à droite (Redecker et al., 2013).

1.3.2.4. Etude de la diversité génétique des CMA

1.3.2.4.1. Marqueurs génétiques

Il existe plusieurs gènes susceptibles d'être utilisés comme marqueurs génétiques pour déterminer la diversité des CMA à l'échelle interspécifique ou intraspécifique. A chaque marqueur génétique correspond différentes amorces possibles. Sur un même échantillon, la diversité des CMA peut changer selon les marqueurs et les amorces utilisés (Kohout et al. 2014 ; Thiery et al. 2016). Le choix des marqueurs et des amorces est donc important pour distinguer les espèces de CMA très proches et amplifier l'intégralité des espèces de CMA dans des échantillons de racine. A l'échelle interspécifique, les gènes marqueurs correspondent à une région de l'ADNr codant les différents ARNr. L'approche couramment utilisée dans les études de diversité des CMA, consiste à amplifier par PCR une région de l'ADNr à l'aide d'amorces nucléotidiques universelles ou spécifiques (White et al., 1990). L'opéron ribosomal nucléaire des gènes codant les ARNr est répété en tandem et comprend la petite sous-unité (SSU) avec un ARNr (18S) et la grande sous-unité (LSU) avec trois ARNr (5S, 28S et 5,8S) qui sont des régions conservées, séparées par des espaceurs transcrits (ITS, très variables d'une espèce à l'autre mais rarement au sein d'une même espèce) (Hart et al., 2015 ; Bruns et al., 1991). Helgason et al. (1998) ont développé les amorces AM1-NS31 spécifiques aux CMA ciblant la SSU. Malheureusement, ces amorces n'amplifient pas toutes les espèces de CMA. L'amplification partielle de la LSU a été possible avec les amorces LR1-NDL22 (vanTuinen et al., 1998) de même que celle de l'ITS avec les amorces NS5, ITS1 et ITS4 (White et al. (1990). Il est aussi possible d'utiliser plusieurs couples d'amorces ciblant chacun des taxons spécifiques de CMA (Redecker et al. 2000). Une approche par PCR nichée a été développée pour amplifier l'ensemble des Glomeromycota (Krüger et al. 2009). La partie amplifiée comprenait une partie du SSU, l'ITS et une partie du LSU soit environ 1500 pb. Une base de données de référence de ce marqueur est disponible. Cependant, la taille de l'amplicon n'est pas compatible avec la méthode de pyroséquençage. Lee et al. (2008) ont développé des amorces AML1 et AML2, spécifiques aux CMA et ciblant la SSU. Ces amorces reconnaissent tous les CMA publiés en 2008, sauf *Archaeospora trappei* (Lee et al., 2008). Cependant, la SSU n'est pas assez résolutive chez certains groupes de CMA comme les Diversisporaceae et Gigasporaceae. La séquence ITS seule présente une trop forte hétérogénéité au sein d'une même espèce et la LSU présente une résolution intermédiaire entre la SSU et l'ITS (Van Tuinen et al., 1998 ; Redecker et Raab, 2006). Ainsi, aucun

marqueur génétique ne constitue un code barre génétique satisfaisant pour tous les groupes de *Glomeromycota* (Öpik et al., 2014). Cependant, un consensus se dégage sur le choix de la SSU comme marqueur génétique pour comparer les communautés de CMA dans les écosystèmes au moins pour trois raisons: (i) l'existence d'amorces spécifiques, (ii) la taille de l'amplicon est adaptée au séquençage haut débit, (iii) la base de données en séquences est plus exhaustive que celles de la LSU et de l'ITS (Hart et al., 2015).

La variabilité des CMA au niveau populationnel a fait l'objet de beaucoup moins d'études en raison du faible nombre de marqueurs disponibles à l'échelle intraspécifique. Grâce à la méthode DGGE utilisant des amorces amplifiant le 18S, des isolats de différentes espèces de *Gigaspora* ont été distingués (de Souza et al., 2004). Pour étudier la structure génétique de *R. irregularis*, le gène nucléaire de la mitochondrie codant la grande sous-unité ribosomale (*mtLSU*) a été utilisé pour distinguer des haplotypes au niveau intraspécifique et leur répartition a été étudiée *in situ* (Börstler et al., 2010).

1.3.2.4.2. Méthodes de séquençage haut débit : la technologie Illumina

Les produits PCR ont souvent été séquencés par la méthode de Sanger (Sanger et al., 1977). Cette méthode de séquençage nécessite un clonage préalable des produits PCR dans la mesure où plusieurs espèces et isolats d'une même espèce y sont présents. Cette méthode reste coûteuse et limitée pour de nombreux échantillons à analyser en même temps. L'automatisation du séquençage a abouti au développement du pyroséquençage (méthode de séquençage à haut débit) qui présente l'avantage de réaliser le clonage automatiquement et de traiter de nombreux échantillons en même temps.

La technique Illumina ou séquençage à l'aide de terminateurs réversibles est l'une des trois technologies de séquençage (Pyroséquençage et Séquençage par ligation) à haut débit apparue en 2007. Elle comprend 3 étapes. La première consiste en la préparation et l'amplification des molécules d'ADN à analyser. La seconde permet l'incorporation des bases complémentaires du brin à séquencer. Et la dernière étape comprend la lecture de la séquence proprement dite.

Tout commence par la fragmentation aléatoire des ADN génomiques, puis des adaptateurs sont liés à chaque extrémité des fragments. Ces fragments sont ensuite attachés aléatoirement à la surface d'un support solide appelé « flow cell » (Figure 7a et b). C'est sur cette cellule que les matrices seront multipliées par un système d'amplification en pont (Figure 7c-f). La réaction de séquençage est alors réalisée directement sur le support où l'ADN a été amplifié. Elle se déroule position après position en ajoutant un mélange contenant toutes les bases

associées chacune à un fluorophore différent (Figure 7g). L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation. Une lecture laser permet alors de détecter simultanément toutes les positions incorporées. Le clivage des fluorophores permet ensuite l'incorporation de la base suivante. La lecture est effectuée ainsi cycle après cycle (Figure 7h et i). Cette méthode permet l'acquisition en parallèle de plus de 3 milliards de séquences de 100 bases de long. Chaque position étant lue l'une après l'autre, les erreurs principales de cette technologie sont des erreurs de substitution d'une base par une autre.

Le champ d'application de ces nouvelles méthodes de séquençage est très vaste. Ces outils permettent de couvrir plusieurs technologies comme les puces à ADN, le séquençage classique de Sanger ou la PCR quantitative à haut débit. Le séquençage à haut débit peut permettre de séquencer un génome inconnu, de re-séquencer un génome connu, d'étudier la variabilité génétique, le polymorphisme de nucléotides simples (SNP) et le transcriptome (RNAseq,...).

Cependant, il faut noter que ces technologies nouvelles présentent des limites qui ne rendent pas toujours leurs applications faciles. Ces technologies sont encore jeunes et les biais techniques ne sont pour le moment qu'au début de leur caractérisation. Elles génèrent des quantités très importantes de données dont la gestion n'est pas totalement maîtrisée. Le traitement des résultats obtenus posent également des soucis. Les questions de normalisation ne sont pas tranchées, et les modèles statistiques à appliquer aux données ne sont toujours pas déterminés sans ambiguïté.

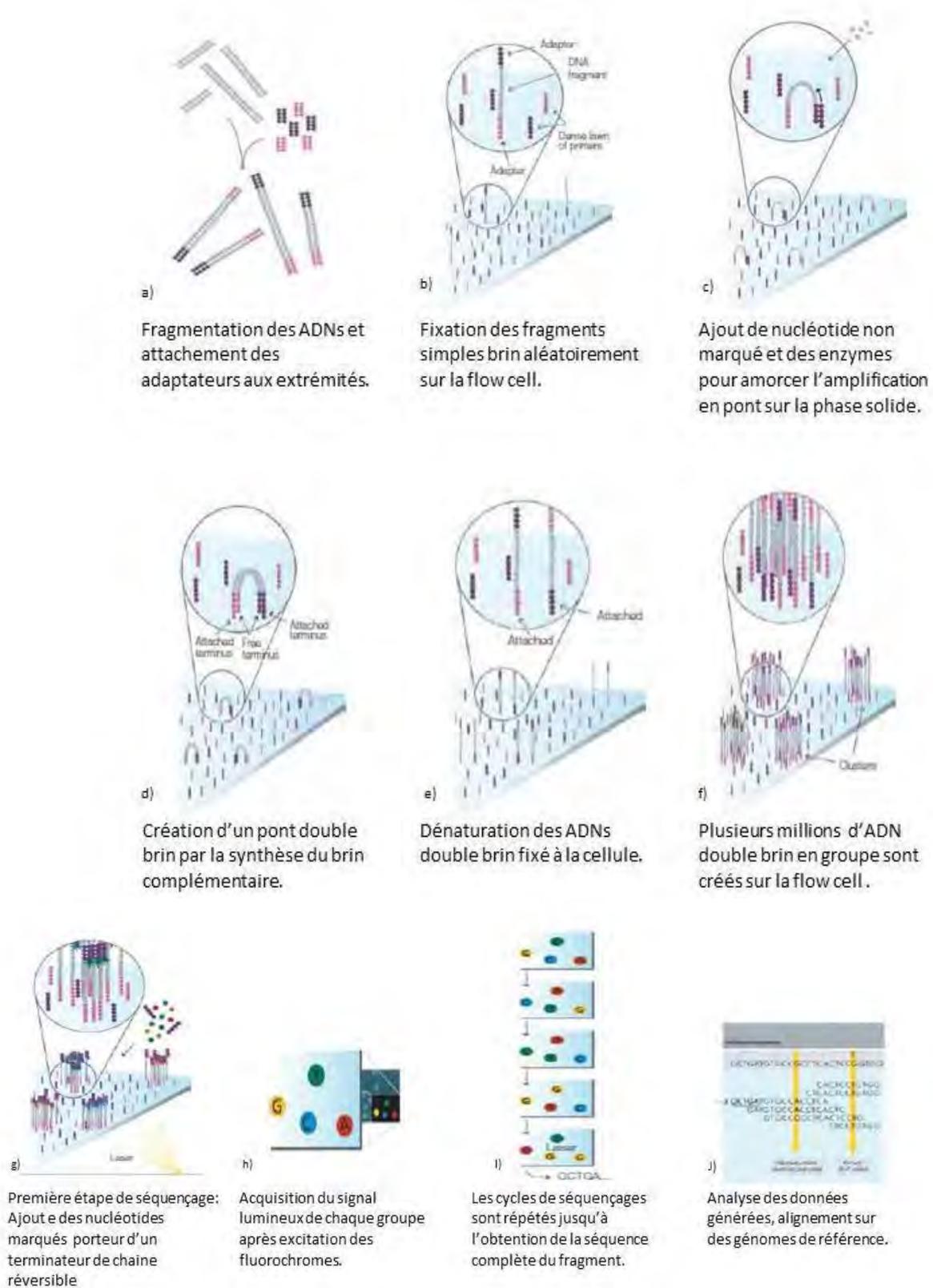


Figure 7. Les différentes étapes du Séquençage par la méthode Illumina (Liais, 2014).

1.3.3. Intérêts de la symbiose MA

La symbiose MA est présente dans tous les écosystèmes terrestres naturels ou cultivés (Smith et Read, 2008). Elle joue un rôle important dans la nutrition des plantes notamment dans les sols tropicaux pauvres en P assimilable. La plante fournit environ 20% de ses photosynthétats au champignon (Harrison, 2005). En retour, le champignon prélève des nutriments du sol (ex. P, N) au bénéfice de la plante grâce au volume de sol exploré par le réseau mycorhizien. Les échanges nutritionnels ont lieu dans l'arbuscule plus précisément dans l'apoplasme mixte partagé par les deux partenaires. A cela, il faut ajouter que les plantes mycorrhizées tolèrent mieux les stress biotique (ex. pathogènes) et abiotique (ex. salinité) que les plantes non mycorrhizées. (Liu et al., 2007).

1.3.3.1. Acquisition du phosphore

Le principal avantage de la symbiose MA pour les plantes est une meilleure nutrition en phosphore inorganique (Pi) ou orthophosphate présent dans le sol (Smith et Read, 2008 ; Parniske, 2008). Cette forme de P est à des concentrations très faibles dans la solution du sol. De ce fait, il se crée une zone d'épuisement en P autour de la racine. Pour y faire face, les mycorhizes ont l'avantage d'absorber le P au-delà de la zone d'épuisement grâce au réseau mycorhizien. Les plantes mycorrhizées reçoivent du phosphate de la part du champignon et cela se traduit le plus souvent par une augmentation de la biomasse par rapport à des plantes non colonisées. L'effet est d'autant plus net que les plantes sont en condition de carence phosphatée. L'absorption du P est réalisée par un transporteur de phosphate à haute affinité, de type PHO84, localisé sur la membrane plasmique des hyphes extra-racinaires (Benedetto et al., 2005). Le phosphate est ensuite converti en polyphosphate dans la vacuole des hyphes extra-racinaires. Le polyphosphate est transféré par voie symplasmique jusque dans la vacuole des hyphes arbusculaires (Ezawa et al., 2004). Le polyphosphate est hydrolysé et exporté sous forme de phosphate inorganique dans l'apoplasme mixte puis vers la plante grâce à un transporteur de P végétal PT4 spécifique de la symbiose (Javot et al., 2007).

1.3.3.2. Acquisition de l'azote

Grâce à l'apport en carbone par la plante, le champignon pourra étendre son réseau mycélien extra-racinaire et avoir l'énergie nécessaire pour absorber l'azote du sol sous forme de NH_4^+ et NO_3^- et le convertir en acides aminés. Johansen et al. (1996) ont montré que *R. irregularis* est capable d'absorber et d'assimiler l'ion ammonium (NH_4^+) pour synthétiser de l'arginine

via le cycle GS/GOGAT. L'arginine est ensuite transférée par voie symplasmique jusque dans la vacuole des hyphes arbusculaires (Guether et al., 2009). Il est ensuite hydrolysé par une arginase pour donner de l'urée et de l'ornithine. L'urée est transformée par une uréase en NH_4^+ qui est transféré vers la plante *via* des transporteurs membranaires (Jin, 2009).

1.3.3.3. Le transfert de carbone

Le transfert de carbone depuis la plante vers le champignon a été mis en évidence pour la première fois par Ho et Trappe (1973) qui ont montré que du ^{14}C s'accumule dans des spores de champignons cultivés avec des plantes exposées au $^{14}\text{CO}_2$. La part de photosynthétats transférée au champignon est non négligeable puisqu'elle peut atteindre jusqu'à 20 % du carbone de la photosynthèse, soit environ 5 milliards de tonnes de carbone par an (Bago et al., 2000). Bien que le champignon soit entièrement dépendant de son hôte pour accomplir son cycle de vie, il garde un certain avantage au cours de la symbiose puisqu'il ajuste le transfert de nutriments, azote et phosphate, par rapport à la quantité de carbone allouée par la plante (Fellbaum et al., 2012).

1.3.3.4. Acquisition de l'eau

Outre son apport nutritionnel, la symbiose confère à la plante hôte une plus grande résistance au stress hydrique (Smith et Read, 2008). Cette protection est possible grâce à un vaste réseau d'hyphes extraracinaires capables d'explorer un grand volume de sol, rendant ainsi les plantes colonisées plus tolérantes au stress hydrique (Augé, 2004). Dans des sols à faible potentiel hydrique, les hyphes sont capables d'abaisser suffisamment leur potentiel osmotique pour s'alimenter en eau au bénéfice de la plante (Augé et al., 2008).

1.3.3.5. Résistance aux pathogènes

La symbiose MA confère aussi une meilleure résistance des plantes aux agents pathogènes. Plusieurs études ont montré chez les plantes mycorhizées une diminution des dommages causés par certains microorganismes fongiques et bactériens pathogènes ainsi que par des nématodes (de La Peña et al., 2006). Liu et al. (2007) ont montré que la colonisation des plantes par les CMA s'accompagnait d'une induction locale et systémique de l'expression des gènes de défense. Ces données, corrélées à la mise en évidence de l'induction de la synthèse d'acide jasmonique lors de la mycorhization (Hause et al., 2002) étayent l'hypothèse d'une élucidation de la résistance systémique (SAR) par les champignons MA.

1.4. Généralités sur la salinisation

La salinisation représente le processus par lequel les sels s'accumulent dans le sol. Depuis le début du XXe siècle, la superficie des terres agricoles touchées par la salinité ne cesse d'augmenter (Levigneron et al., 1995). La salinisation affecte plus de 6% des terres dans le monde sont affectées par le sel, ce qui représente plus de 800 millions d'hectares de terres (Sangeeta et al., 2011 ; Bahrani et HaghJoo, 2012). Ce problème est une menace pour l'équilibre alimentaire (Kinet et al., 1998) et touche plus particulièrement les zones arides et semi arides des régions tropicales et méditerranéennes (Sangeeta et al., 2011 ; Bahrani et HaghJoo, 2012). En Afrique, près de 40 millions ha sont affectés par la salinisation, soit près de 2% de la surface totale (Geetanjali et Neera, 2008).

Au Sénégal, la dégradation des sols par salinisation affecte plus de 1700000 hectares de terre (LADA, 2009). Les parties du pays les plus touchées par ce fléau sont : la région du fleuve, le Sine-Saloum et la Casamance. Pour endiguer la baisse des ressources en sol, des actions de restauration et de valorisation sylvo-pastorales des terres dégradées par la salinisation ont été menées par des ONG (ex. Green Sénégal), les services des eaux et forêts et la recherche forestière (DRPF/ISRA) dans les régions de Kaolack et Fatick depuis les années 1960. Ces actions de recherche ont contribué ainsi à améliorer les stratégies de récupération et de valorisation de ces terres en associant la lutte mécanique à la lutte biologique. Les actions mécaniques de lutte ont consisté à construire des digues anti-sel et à renforcer le réseau d'endiguement existant. Pour faciliter la récupération des terres et leur mise en valeur agricole, la réalisation de ces digues était accompagnée de technologies mises au point par la recherche. Il s'agit des cultures en billons, l'utilisation de variétés hâtives de riz et de vanes à crémaillère pour réguler la circulation de l'eau. Ces importants acquis sont le fruit des recherches de l'ISRA en collaboration avec d'autres institutions tels que l'IRD (ex. ORSTOM), le CIRAD, l'UCAD etc. Quant aux actions biologiques, elles ont surtout porté sur l'usage d'essences halophiles pour le reboisement en particulier des tannes du Sine-Saloum. Il convient de signaler à cet égard les tests probants menés par la recherche forestière pour la récupération des terres salées par l'utilisation d'espèces comme *Tamarix* sp, et *Melaleuca* sp..., ainsi qu'à travers l'immersion puis le drainage des sols. Enfin, l'utilisation du phosphogypse a été diffusé, notamment par la SENCHIM, pour combattre le sel particulièrement au niveau des cultures irriguées (Anonyme, 1998). Le sel (150 000 tonnes/an de sel produit) fait aussi l'objet d'un commerce florissant etc.

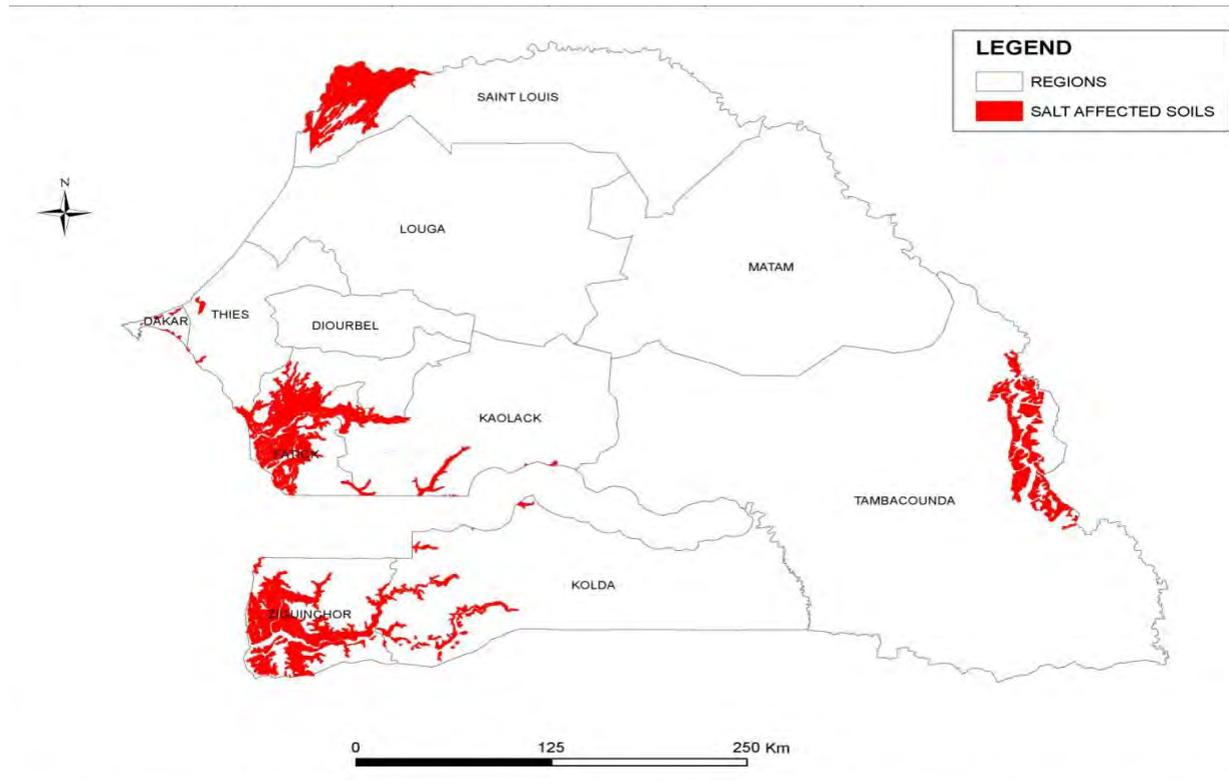


Figure 8. Carte du Sénégal avec une localisation des régions affectées par le sel (en rouge).

(Source : INP, 2008).

1.4.1. Les causes de la salinisation

Le phénomène de salinisation des sols peut avoir deux origines : une salinisation naturelle et une salinisation anthropique (Maillard, 2001).

1.4.1.1. La salinisation naturelle

Près de 80 % des terres salinisées ont une origine naturelle (FAO et IPTRID, 2006), on qualifie alors la salinisation de «primaire». La salinisation primaire se produit naturellement là où la roche mère du sol est riche en sels solubles. Dans les régions arides et semi-arides, où les précipitations sont insuffisantes pour lessiver les sels solubles du sol et où le drainage est restreint, des sols salins vont se former avec des concentrations élevées de sels). Selon Sadio (1991), la salinisation des terres au Sénégal résulte essentiellement des différentes phases climatiques qui se sont succédées au quaternaire et qui ont provoqué l’envahissement du continent par les eaux marines. A cela s’ajoute, l’effet des changements climatiques, notamment le déficit pluviométrique des années 1970 et l’élévation du niveau marin, qui ont en outre contribué à accentuer les effets de la salinité en aval des quatre principaux bassins

versants du territoire Sénégalais à savoir : le Sénégal, le Sine, le Saloum et la Casamance (Sadio, 1991).

1.4.1.2. La salinisation anthropique

Près de 20% des terres salinisées ont une origine anthropique (FAO et IPTRID, 2006). Cette forme de salinisation est qualifiée de «salinisation secondaire». L'irrigation est la principale cause anthropique de la salinisation des sols (Anonyme, 2006). Dans la plupart des situations, le développement de l'irrigation a provoqué salinisation, des sols. Si les situations apparaissent très diverses en raison des caractéristiques du milieu naturel, des pratiques agricoles ou de la gestion de l'eau, ces dégradations ne sont pas inéluctables et apparaissent pour l'essentiel comme la résultante de mode de gestion inappropriée des ressources en sol et en eau. L'irrigation altère le bilan hydrique du sol en générant un apport d'eau supplémentaire; cet apport est toujours associé à un apport de sels. En effet, même une eau douce de la meilleure qualité contient des sels dissous et, si la quantité de sels apportée par cette eau peut sembler négligeable, les quantités d'eau apportées au fil du temps entraînent un dépôt cumulé de sels dans les sols qui peut s'avérer considérable (Marlet, 2005).

1.4.2. Seuils de salinisation

La salinité d'un sol se mesure par la conductivité électrique (CEe) d'un extrait de pâte saturée. La conductance est inversement proportionnelle à la résistance électrique (ohms) et la mesure brute est donnée en mhos. Suivant le système international, la mesure doit être présentée en dS m^{-1} ($1 \text{ mmhos cm}^{-1} = 1 \text{ dS m}^{-1}$). La quantité de sels dans le sol que les plantes peuvent supporter sans grand dommage pour leur croissance varie avec les familles, les genres et les espèces, mais aussi les variétés considérées. C'est pourquoi il n'est pas possible de définir dans l'absolu, le seuil de salinité à partir duquel les cultures subissent un stress salin. La norme de salinité des sols mise en place par Le Brusq et Loyer (1982) a été adaptée aux sols sénégalais par Daffé et Sadio (1988). Selon ces auteurs, un sol est considéré comme salé quand sa conductivité électrique devient supérieure à 4 mmhos.cm^{-1} (Tableau 1).

Tableau 1. Norme de salinité des sols

Conductivité électrique (CEe)	Appréciation
CEe < 4 mS/cm	Sol non salé
4 < CEe < 15 mS/cm	Sol salé
15 < CEe < 35 mS/cm	Sol très salé
CEe > 35 mS/cm	Sol sursalé

La norme de salinité des sols mise en place par Le Brusq et Loyer (1982) a été adaptée aux sols sénégalais par (Daffé et Sadio, 1988).

1.4.3. Les différents types de stress liés au sel

Le terme de stress a été inventé par Hans Selye en 1935. Ce dernier a défini le stress comme une « réponse non spécifique de l'organisme à toute sollicitation ». D'origine anglaise, le mot « stress » était employé en mécanique et en physique et voulait dire « force, poids, tension, charge ou effort ». La transposition au monde biologique a été proposée par Levitt qui le définit comme étant tout facteur environnemental susceptible de déclencher chez les plantes des modifications chimiques ou physiques dommageables. Ces modifications représentent la contrainte qui peut être plastique ou élastique (Levitt, 1972 d'après Gravot, 2007). La salinité provoque un double stress hydrique (stress osmotique) et ionique.

1.4.3.1. Stress hydrique

L'eau est une ressource indispensable pour les végétaux. Sa présence est une condition incontournable pour que toute plante puisse se développer et assurer ses fonctions physiologiques vitales. Une forte concentration saline dans le sol est tout d'abord perçue par la plante comme une forte diminution de la disponibilité en eau. Les plantes doivent alors, assurer un ajustement osmotique, afin que le potentiel hydrique cellulaire reste inférieur à celui du sol. Lorsque l'ajustement osmotique n'est pas suffisant, l'eau a tendance à quitter les cellules, ce qui provoque un déficit hydrique qui correspond à un état de sécheresse physiologique (Slama, 2004).

1.4.3.2. Stress ionique

La toxicité ionique survient lorsque l'accumulation de Na^+ et Cl^- dans les tissus perturbe l'activité métabolique. Les ions Cl^- peuvent être absorbés par les racines et s'accumuler dans les feuilles. La toxicité au Cl^- se traduit par une dégradation de la chlorophylle et l'apparition

de chlorose à la périphérie des feuilles. Les symptômes de toxicité typiques aux ions Na^+ sont des brûlures de feuilles, le dessèchement et la mort des tissus sur les bords externes des feuilles, contrairement aux symptômes causés par des ions Cl^- qui apparaissent normalement à l'extrême pointe des feuilles.

1.4.3.3. Stress nutritionnel

L'un des effets de la salinité réside dans le déséquilibre nutritif qui s'installe suite à une perturbation du transport des solutés. L'accumulation excessive ou en proportion anormale des ions Na^+ et Cl^- dans les tissus provoque une altération de la nutrition minérale des plantes (Levigneron et al., 1995 in Haouala et al., 2007). La présence excessive de ces ions sodique et chlorure limite l'absorption et le transport des ions K^+ , Ca^{2+} et ferreux, du phosphate, du zinc et du manganèse indispensable pour la croissance des plantes (Maillard, 2001).

1.4.4. Effet de la salinité sur la germination des graines

La germination des graines est le premier stade physiologique affecté par la salinité (Boulghalagh et al., 2006). La capacité d'une graine à développer un embryon viable dépend des conditions du milieu de germination et en particulier de sa teneur en sel ; une salinité excessive réduit la vitesse de germination ainsi que la faculté germinative (Slama, 2004). L'effet négatif de la salinité sur la germination a été rapporté chez plusieurs espèces, même chez des plantes halophytes (Rahmoune et al., 2008). La salinité intervient vraisemblablement par deux effets, l'un osmotique et l'autre toxique. L'effet toxique résulte de l'envahissement de l'embryon par les ions Cl^- et Na^+ . En effet, l'accumulation de ces ions toxiques provoque des perturbations enzymatiques et métaboliques bloquant la levée de dormance des embryons (Debez et al., 2001) et conduisant à une diminution de leur capacité germinative (Mâalem et Rahmoune, 2010). Des travaux effectués sur des halophytes ont montré que l'effet inhibiteur du NaCl sur la germination serait essentiellement de nature osmotique, le sel empêchant l'imbibition de la graine (Debez et al., 2001). Or, il existe un seuil critique d'hydratation nécessaire à la germination (Bliss et al., 1986).

1.4.5. Effet de la salinité sur la croissance des plantes

Les effets de la salinité sur la croissance des plantes varient en fonction de la concentration du sel, de l'espèce végétale, de la variété, de l'organe de la plante, ainsi que de son stade végétatif (Levigneron et al., 1995). Les effets de la salinité se manifestent principalement par

une diminution de la croissance des plantes (Bouaouina et al., 2000). En effet, les sels accumulés dans le sol peuvent limiter ou arrêter complètement la croissance du végétal, suite à une élévation de la pression osmotique du milieu et/ou à l'effet toxique spécifique des éléments (Arbaoui et al., 1999). La salinité diminue la croissance des plantes en modifiant l'équilibre hydrique et ionique des tissus (Ouerghi et al., 1998). Par ailleurs, la salinité affecte la photosynthèse et l'assimilation de carbone par la réduction de l'indice foliaire et la fermeture des stomates. Il s'est avéré que les feuilles sont les tissus les plus sensibles de la plante à une salinité excessive, par contre la croissance des racines s'en trouve faiblement affectée (Benmahioul et al., 2009). La saturation en sel de l'espace intercellulaire des parties aériennes entraîne des nécroses et apoptoses. La réduction de la croissance racinaire, en conditions de stress salin a été expliquée par l'inhibition des divisions cellulaires dans le méristème apical, par la réduction de l'alimentation de la plante en éléments minéraux majeurs, particulièrement K^+ et Ca^{2+} (Cramer, 2003), ou encore, par la réduction de l'extensibilité des parois cellulaires (Bressan et al., 1990).

1.4.6. Les mécanismes d'adaptation des plantes au stress salin

L'adaptation se définit comme la capacité d'une plante à croître et à donner des rendements satisfaisants dans des zones sujettes à des stress de périodicités connues. La notion d'adaptation est liée à celles de résistance et de tolérance aux stress. Toutes les plantes ne sont pas égales face au stress salin, suivant leur production de biomasse en présence de sel. Le terme halophyte (du grec « halo » : sel et « phyt(o) » : plante) définit un organisme qui vit, croît et se reproduit naturellement dans un milieu salin alors qu'un glycophyte ne peut croître en milieu salin. La grande majorité des stress salins est provoquée par des sels de Na, particulièrement le NaCl. De ce fait, les termes halophytes et glycophytes font essentiellement référence aux stress provoqués par un excès de Na^+ (plus exactement, on devrait parler de plantes natrophyles ou natrophobes). Une plante halophyte est capable de survivre et de boucler son cycle de vie à des teneurs en NaCl autour de 200 mM et parfois plus (Flowers et Colmer, 2008). Par contre, une plante halophyte facultative se développera normalement dans des conditions non stressantes. À l'inverse, une plante glycophyte obligatoire ne se développera jamais en présence d'un excès de sels (Levitt, 1980).

Quatre grandes catégories de plantes ont été différenciées suivant leur comportement en présence de sel.

(1) Halophytes vraies dont la production de biomasse est stimulée par la présence de sel (ex. *Atriplex* sp., *Salicornia* sp., *Sueda* sp). Parmi ces halophytes, on distingue les régulateurs et les accumulateurs de sels. Les régulateurs de sels qui excrètent le sel par des glandes foliaires spécialisées. Les accumulateurs de sels stockent les ions en excès dans la vacuole tout en maintenant la turgescence du cytoplasme et/ou dans les vieilles feuilles pour préserver les jeunes feuilles.

(2) Halophytes facultatives présentent une légère augmentation de biomasse à des teneurs faibles en sels (ex. *Plantago maritima*, *Aster tripolium*)

(3) Non-halophytes résistantes supportent de faibles concentrations en sel (*Hordeum* sp).

(4) Glycophytes ou halophobes: sensibles à la présence de sels (ex. *Phaseolus vulgaris*)

En réponse au stress salin, la plante développe trois mécanismes de tolérance au sel.

- Un premier mécanisme, lié au stress ionique, qualifié «d'exclusion», limite le passage des sels dans les racines et/ou ré-excrète les sels des feuilles vers les racines grâce à des transporteurs protéiques membranaires.
- Un deuxième mécanisme, lié au stress ionique, qualifié «d'inclusion», consiste en une séquestration des sels dans le cytosol des tiges ou dans la vacuole des feuilles grâce à des transporteurs protéiques membranaires (Flowers et Colmer, 2008 ; Cheeseman, 2014)
- Un troisième mécanisme, lié au stress osmotique, consiste en l'ajustement osmotique par accumulation d'ions (ex. K^+ , Na^+ , Cl^-) et d'osmorégulateurs (ex. proline).

1.4.6.1. Exclusion des ions

L'exclusion des ions toxiques (Na^+ et Cl^-) de la cellule *via* un mécanisme d'efflux, est un important facteur de la tolérance au sel (Khan et Marshall, 1981). Le maintien d'une faible concentration de Na^+ dans les feuilles peut être dû à un mécanisme d'exclusion qui provoque une accumulation de Na^+ dans les racines, évitant une translocation excessive aux tiges. Chez les glycophytes, l'exclusion d'ions est la seule stratégie de tolérance au sel (Gorham et al., 1985).

1.4.6.2. Inclusion et compartimentation des ions

La compartimentation des ions entre les organes (racines/parties aériennes), les tissus (épiderme/mésophylle), ou encore entre les compartiments cellulaires (vacuole/cytoplasme) est l'un des mécanismes d'adaptation à la contrainte saline (Ouerghi et al., 1998). L'inclusion

et la compartimentation vacuolaire des ions nocifs présente le double avantage de préserver le cytoplasme, lieu de la plupart des processus métaboliques, de la toxicité des ions Na^+ et Cl^- d'une part, et de réaliser l'ajustement osmotique, d'autre part (Kohl, 1997). La plante absorbe les sels qui parviennent aux feuilles, au même titre que l'eau, par le mouvement ascendant de la sève brute dans les vaisseaux. Le contrôle du transfert des ions à travers des membranes implique un transport actif, consommateur d'énergie, qui utilise différents transporteurs à la surface des membranes cellulaires (Orcutt et Nilsen, 2000). Il est alors admis que la performance de stocker le sel dans les parties aériennes est déterminante dans le niveau de tolérance au sel des espèces.

1.4.6.3. Ajustement osmotique

L'ajustement osmotique est une stratégie d'adaptation des plantes au stress salin (Cheeseman, 2014). Il permet le maintien de l'alimentation hydrique et la pression de turgescence (Niu et al., 1995). Ce processus se fait en modifiant les concentrations des solutés compatibles dans les tissus de façon à maintenir une concentration ionique plus élevée (hypertonique) dans le protoplasme que dans le milieu extérieur (Hasegawa et al., 2000). Ces solutés compatibles ont une fonction osmoprotectrice et/ou osmorégulatrice. On trouve parmi eux des éléments minéraux (tel que le K^+), des composés organiques tels que les sucres solubles (fructose, glucose, tréhalose, raffinose) et certains amino-acides (proline, glycine bêtaïne, β -alanine, bêtaïne, proline). Parmi les acides aminés pouvant être accumulés, la proline représente l'une des manifestations les plus remarquables des stress hydriques et osmotiques. Son rôle d'osmoticum a été rapporté par de nombreux auteurs (Ruiz-Lozano et al., 2012).

L'accumulation de la proline, induite par les stress, peut être le résultat de trois processus complémentaires: stimulation de sa synthèse, inhibition de son oxydation et/ou altération de la biosynthèse des protéines. Les sucres peuvent aussi servir de composés solubles compatibles pour l'ajustement osmotique, comme de nombreuses autres molécules tels que les polyols (ex. glycérol, mannitol) et les éléments minéraux comme le K^+ . Le K^+ , outre son importance sur l'ouverture des stomates, est un osmorégulateur dont le ratio K^+/Na^+ témoigne de la tolérance des plantes au stress salin. En effet, un ratio K^+/Na^+ adéquat supérieur à 1 est un bon indicateur de tolérance pour sélectionner des plantes adaptées au stress salin (Siva et al., 2015).

1.4.7. Mécanismes physiologiques de tolérance au stress salin chez la symbiose fixatrice d'azote rhizobium-légumineuse

Le stress salin peut affecter la symbiose légumineuse-rhizobia en inhibant le processus d'infection, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles (Zahran, 1999 ; Cesar et al., 2011). Les rhizobia ont une gamme de tolérance au sel beaucoup plus élevée que celle de sa plante hôte (Zahran, 2001).

L'impact positif de l'association symbiotique avec des rhizobia sur l'adaptation des légumineuses aux stress environnementaux tel que la salinité a largement été décrit. Plusieurs études ont montré que la nodulation et la fixation d'azote, de même que la croissance et la survie des légumineuses en condition de stress salin sont fortement améliorées lorsqu'elles sont inoculées avec des souches de rhizobia efficaces et tolérantes au sel (Diouf et al., 2005). L'amélioration de la tolérance à la salinité chez les légumineuses est accompagnée par une augmentation des niveaux de proline, une diminution des pertes d'électrolytes et par le maintien de la teneur en eau des feuilles (Bano et Fatima, 2009).

La tolérance au sel des rhizobia est très variable et dépend probablement, dans une grande mesure, de l'efficacité de leurs mécanismes d'osmorégulation (Brhada et Le Rudulier, 1995). Plusieurs espèces de bactéries s'adaptent aux conditions salines par l'accumulation intracellulaire d'osmolytes (Zahran et al., 1997). L'accumulation des osmolytes contrecarre l'effet de déshydratation, mais n'interfère pas avec le métabolisme bactérien (Smith et al., 1994). Le tréhalose (disaccharide) joue également un rôle dans l'osmorégulation (Hoelzle et Streeter, 1990). Certains micro-organismes produisent des hormones végétales, tels que l'acide indole acétique et l'acide gibbéréllique, qui induisent une croissance plus importante des racines et conduit à l'absorption accrue de nutriments (Egamberdieva et Kucharova, 2009). Chez la majorité des Rhizobiacées, comme *E. meliloti*, la glycine bétaine est une molécule osmoprotectrice majeure, dont l'accumulation est fortement stimulée lors d'un stress osmotique (Boscari et al., 2004).

1.4.8. Mécanismes physiologiques de tolérance au stress salin chez la symbiose mycorhizienne à arbuscules

La salinité peut réduire le taux de colonisation racinaire et rendre critique la réussite de la mycorhization (Juniper et Abbott, 2006; Giri et al., 2007; Sheng et al., 2008).

Toutefois, la symbiose MA confère à la plante hôte une forte tolérance à la salinité (Al-Karaki et al., 2001; Dodd et Ruiz-Lozano, 2012). Des études ont montré qu'en conditions salines, la

mycorhization favorise la croissance de certaines espèces végétales telles que les acacias, la tomate et la laitue (Ruiz-Lozano et Azcon, 1996 ; Al-Karaki et al., 2001; Diouf et al., 2005). Cet accroissement de la tolérance au stress salin des plantes mycorhizées est attribué, en général, à une meilleure nutrition hydrominérale des plantes. Le mycélium extra-racinaire des CMA permet une augmentation substantielle de la capacité d'absorption des sels minéraux notamment le phosphate, l'azote, le cuivre, le fer et le zinc et de l'eau disponibles dans les sols (Al-Karaki, 2000).

Les CMA peuvent réduire la concentration en Na^+ du sol. En effet, les travaux de Allen et Cunningham (1983) ont montré que les racines mycorhizées de *Distichlis spicata* accumulent plus de Na^+ que les racines non mycorhizées, ce qui se traduit par une diminution d'environ 75 % de la teneur en Na^+ du substrat de culture. Ces auteurs ont aussi montré une diminution de Na^+ via leur excrétion par des glandes foliaires et une augmentation concomitante de K^+ d'où un rapport K^+/Na^+ élevé qui témoigne de la capacité de la plante à tolérer le sel.

Lors d'un stress salin, les CMA augmentent de manière considérable le taux de sucre solubles dans les racines (Sheng et al., 2011; Talaat et Shawky, 2011). En effet, les CMA stimulent le taux de photosynthèse afin de répondre à leur exigence en carbone.

1.5. Notion de plantes « facilitatrices » (ou plantes « nurses »)

Dans le domaine de l'écologie et plus précisément des interactions biologiques et interactions durables, on parle de « facilitation » pour décrire les situations où la présence d'une espèce améliore l'installation, la vie ou la survie d'autres espèces, sans que la relation de dépendance ou d'interdépendance soit aussi forte que dans le cas des symbioses (Padilla et Pugnaire, 2006).

Dans les zones arides où les propriétés physico-chimiques et biologiques des sols sont fréquemment altérées, le développement des plants peut être facilité par la présence d'espèces pionnières encore appelées plantes facilitatrices ou plantes nurses (Bruno et al., 2003 ; Padilla et Pugnaire, 2006). Les plantes « nurses » sont des espèces qui, par leurs caractéristiques intrinsèques (exemple : tolérance à la salinité), colonisent des milieux très dégradés (Azcon-Aguilar et al., 2003). Elles améliorent les conditions environnementales (température, lumière, humidité du sol, fertilité du sol, etc.), permettant ainsi l'installation d'espèces végétales moins tolérantes aux stress d'origine abiotique (Bruno et al., 2003 ; Padilla et Pugnaire, 2006). De plus, les plantes « nurses », grâce à leur forte mycotrophie, peuvent croître et améliorer le potentiel infectieux mycorhizien des sols dans les écosystèmes arides et

semi-arides. En effet, des travaux ont rapporté que les plantes nurses hautement mycotrophes sont efficaces dans la multiplication des propagules dans les horizons superficiels des sols tropicaux (Duponnois et al., 2003 ; Ouahmane et al., 2006 ; Bainard et al., 2011). Une amélioration du potentiel mycorhizogène du sol a été rapportée dans des plantations d'arbres du Sénégal (Ingleby et al., 1997 ; Diagne et al., 2006) et attribuée à la flore herbacée sous-jacente plutôt qu'à la contribution de l'arbre même. Ce rôle important des herbacées dans le potentiel symbiotique des sols forestiers est faiblement documenté en ce qui concerne les rhizobia. Néanmoins, en milieu tropical, il est connu que les herbacées tapissant les sous-bois constituent des plantes hôtes potentielles pour les rhizobia (Yates et al., 2004 ; Garau et al., 2009 ; Gueye et al., 2009). Ces plantes peuvent donc constituer un réservoir de conservation et de dissémination de ces bactéries (Kahindi et al.,).

1.6. Présentation des espèces végétales étudiées

1.6.1. *Sporobolus robustus* Kunth.

1.6.1.1. Systématique

Sporobolus robustus est synonyme (Révis. gramin. 2:425, t. 126. 1831) de *Agrostis abyssinica* Ehrenb. & Hemprich ex Trin., *Agrostis barbata* var. *senegalensis* Pers., *Sporobolus assakae* Caball., *Sporobolus insulanus* Parl., *Sporobolus insularis* Parl. ex Hook., *Sporobolus littoralis* var. *elongatus* T. Durand & Schinz., *Sporobolus senegalensis* (Pers.) Chiov., *Vilfa insularis* (Parl.) Steud., *Vilfa robusta* (Kunth) Trin. Les caractères botaniques de *S. robustus* lui confèrent la systématique suivante :

Règne : *Plantae*

Classe : *Liliopsida*

Ordre : Poales

Famille : *Poaceae*

Genre : *Sporobolus*

Espèce : *robustus*

1.6.1.2. Caractéristiques botaniques

S. robustus est une herbe pérenne, glaucescente, rhizomateuse, du bord des marigots ou des tannes en grosses touffes émettant de longs stolons, atteignant 200 cm de hauteur (Figure 9). Les chaumes sont vigoureux, de 2-3 mm de diamètre durs, arrondis, simples ou ramifiés. Les

gaines sont glabres, plus ou moins comprimées, à une marge et gorge longuement ciliées. La ligule est réduite à une ligne de poils courts. Les feuilles peuvent mesurer jusqu'à 60 cm de long et 7 mm de large. Les inflorescences en panicules linéaires-lancéolées, pouvant atteindre 28 cm de long et 10-14 mm de large. Les épillets sont uniflores, long de 2-2,2 mm environ. Les glumes sont subégales, lancéolées, membraneuses. La fleur à lemme membraneuse, de 2-2,2 mm de long, lancéolée, 1-nervée. Le caryopse oblong, de 1 mm de long, est comprimé latéralement.

1.6.1.3. Ecologie

S. robustus est une plante halophyte répandue dans toute l'Afrique tropicale, au Cap-vert, Maroc, en Arabie saoudite. C'est une espèce récoltée sur des sols argileux soumis à des inondations temporaires, elle se développe mieux dans de l'eau légèrement saumâtre (van der Zon, 1992). Au Sénégal, *S. robustus* se développe sur des sols ferrugineux et des sols halomorphes salés ou «tannes». L'espèce se développe là où les précipitations moyennes annuelles sont comprises entre 500 et 600 mm avec des températures moyennes de 20 à 35°C. *S. robustus* est une composante de la flore herbacée de *Prosopis juliflora* et *Acacia seyal* dans le Sine Saloum.

1.6.1.4. Utilisation

S. robustus constitue un fourrage d'appoint pour le bétail. En Mauritanie, l'espèce est exploitée artisanalement par les populations locales. En effet, les tiges de *S. robustus* servent à la confection de nattes. *S. robustus* est capable d'établir des associations symbiotiques efficaces avec des CMA. *S. robustus* serait une plante « nurse » pour l'établissement d'*A. seyal* et *P. juliflora*

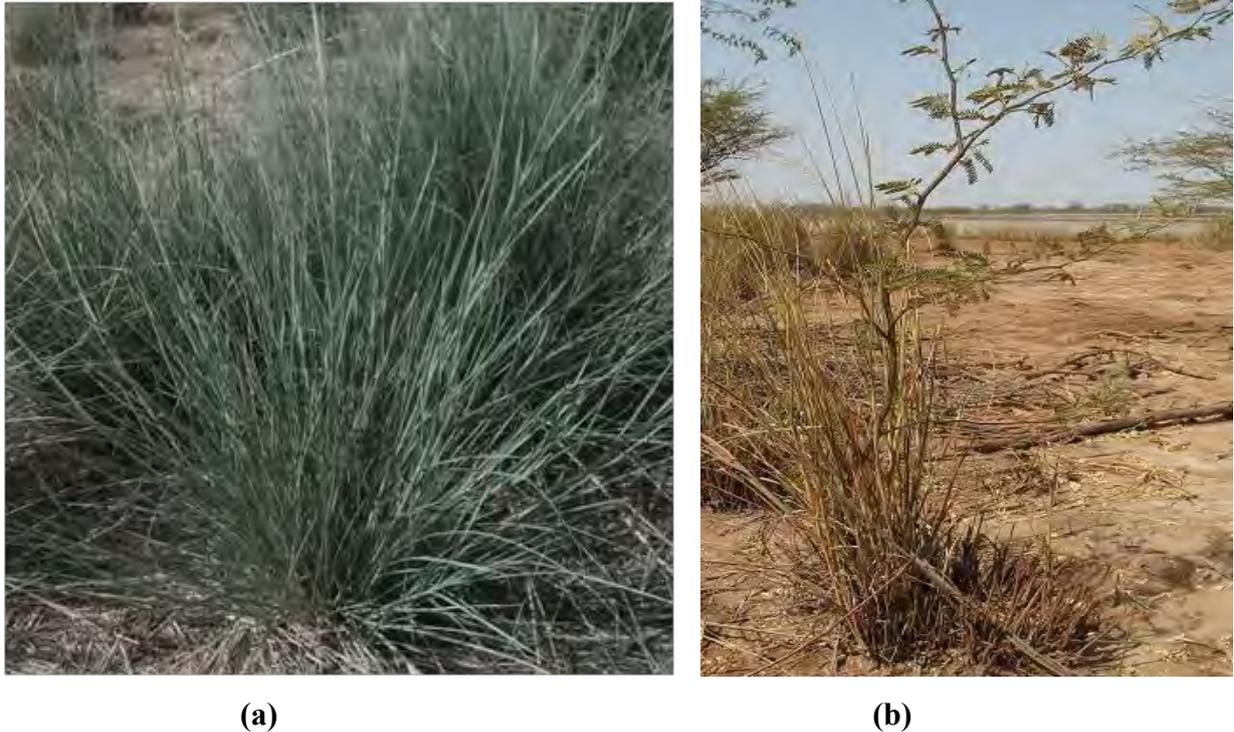


Figure 9. Touffe de *Sporobolus robustus* Kunth (a) *Prosopis juliflora* émergeant d'une touffe de *Sporobolus robustus* (b).

1.6.2. *Prosopis juliflora* (SW) DC., 1825

1.6.2.1. Systématique

L'espèce *Prosopis juliflora* compte trois variétés : *juliflora* ; *inermis* et *horrida* (Marcelo, 1990). Les caractères botaniques du *P. juliflora* lui confèrent la systématique suivante :

Règne : *Plantae*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Mimosaceae*

Genre : *Prosopis*

Espèce : *juliflora* (Sw.) DC

1.6.2.2. Caractéristiques botanique

P. juliflora est une espèce à croissance rapide, atteignant une hauteur de 12 m de haut et 1 m de diamètre (Figure 10). Les rameaux sont pourvus de feuilles bipennées avec des folioles longues de 8 à 12 mm, larges de 2 à 3 mm et d'épines droites, souvent jumelées à la base du pétiole, dont l'épaisseur et la longueur semblent liées à l'aridité de la station. Le tronc est

crevassé et rugueux. Le houppier est dense, couvert d'un feuillage léger, légèrement bleuté, qui subsiste en toute saison même dans les contrées très sèches. Bien que dur, le bois est assez cassant. Le fruit est une gousse indéhiscente, jaune à maturité, longue de 10 à 20 cm atténuée aux extrémités, cloisonnée entre les graines qui contiennent une pulpe fraîche riche en matières amylacées. Le bois est à pores diffus et constitue 18% du volume total du tronc.

1.6.2.3. Ecologie

Le genre *Prosopis* compte 44 espèces représentées en Asie occidentale, en Afrique, dans les régions arides et semi-arides d'Amérique, du Sud-Ouest des Etats-Unis au Chili et en Argentine (Marcelo, 1990).

P. juliflora convient bien aux climats sahéliens et sahélo-soudanien. En effet, cette espèce se développe là où les précipitations moyennes annuelles sont comprises entre 150 et 750 mm. Elle pousse bien sur les sols sablonneux et rocheux. Cet arbre développe un système racinaire profond (jusqu'à 35 m) lui permettant de chercher l'eau en profondeur.

Deux espèces de *Prosopis* sont utilisées au Sénégal : le *P. africana* qui est natif et localisé dans la partie sud du Sénégal, et le *P. juliflora* introduite depuis l'Amérique centrale (Diagne, 1996). *P. juliflora* est la plus importante et la plus connue au Sénégal. Elle a été introduite au Sénégal par un gouverneur français, Baron Roger, en 1822 pour des pratiques agricoles dans la région du Walo au nord ouest du Sénégal (Sidibé, communication personnelle). Les plus vieux peuplements de *P. juliflora* sont dans cette région, à Richard-Toll et dans le delta du fleuve Sénégal. Originnaire de l'Amérique centrale, l'espèce est devenue subspontanée en utilisant l'eau et les animaux pour la dispersion de ses graines (Diagne, 1996).



Figure 10. Peuplement adulte de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC dans la région naturelle du Sine Saloum.

1.6.2.4. Utilisation

Les usages de *P. juliflora* sont extrêmement nombreux et diversifiés. Felker (1981) note en particulier son rôle essentiel dans la lutte contre l'érosion, l'amélioration de sols (grâce à sa capacité de fixer l'azote atmosphérique), comme producteur de bois de service et de bois combustible. Elle est également utilisée pour l'alimentation du bétail. Les jeunes feuilles et les gousses, riches en unités fourragères, sont consommées par le bétail. Les fruits sont appréciés par les ovins et les caprins. En médecine locale, l'écorce macérée est utilisée comme antiseptique pour le traitement des ulcères. *P. juliflora* est capable d'établir des associations symbiotiques efficaces avec des bactéries fixatrices d'azote et des CMA.

1.6.3. *Vachellia seyal* (Delile) P.J.H. Hurter (syn. *Acacia seyal* Delile).

1.6.3.1. Systématique

Une récente étude de phylogénie moléculaire du genre *Acacia* au sens large (sl) et des parents proches répartis en Afrique a permis, en utilisant les données de séquence des marqueurs chloroplastiques matK / trnK, trnL-trnF et psbA-trnH, de formaliser la ségrégation des espèces africaines par rapport aux espèces australiennes dans deux nouveaux genres : *Vachellia* (anciennement le sous-genre *Acacia*) et *Senegalia* (anciennement le sous-genre *Aculeiferum*) (Kyalangalilwa et al., 2013). Toutefois, dans le cadre de notre étude nous allons

retenir le terme *Acacia* (sl) pour désigner les acacias appartenant à la sous famille des *Mimosoideae* et qui constituent le genre majoritaire de cette sous-famille avec plus de 1200 espèces existant sur tous les continents (Sprent, 1995).

A. seyal compte deux variétés : *seyal* et *fistula*. Les caractères botaniques de *A. seyal* lui confèrent la systématique suivante :

Règne : *Plantae*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : Fabales

Famille : *Leguminosae*

Genre : *Acacia*

Espèce : *seyal*

1.6.3.2. Caractéristiques botaniques

A. seyal est une légumineuse ligneuse pérenne de 10 à 12 m de hauteur et 35 à 60 cm de diamètre à maturité avec des branches peu ramifiées, horizontales et ascendantes (Figure 11). La plante porte de grandes épines droites localisées sur les branches et de petites épines recourbées situées à l'extrémité des branches. Les jeunes rameaux à poils clairsemés ou glabres présentent de nombreuses glandes sessiles rougeâtres. Les feuilles sont alternes, bipennées de 3 à 10 cm de long et 1 à 15 mm de large, généralement avec 4-8 paires de pinnules et 10 à 20 paires de foliolules par pinnule. Elles présentent souvent une glande sur le pétiole et entre la première paire de pennes. Ses fleurs globuleuses de couleur jaune brillant de 10 à 13 mm de diamètre. Ses gousses de 7 à 20 cm de long et 0,5 à 0,9 cm de diamètre sont déhiscentes, falciformes, rétrécies entre les graines. Elles contiennent 6 à 9 graines brun clair à maturité, elliptiques, comprimées, de 7 à 9 mm de long et 4,5 à 5 mm de large.

1.6.3.3. Ecologie

A. seyal est une espèce caractéristique des régions semi-arides. Elle est originaire de la zone sahélienne du Sénégal au Soudan. On la retrouve également en Egypte, en Afrique orientale et australe, de la Somalie au Mozambique et en Namibie (NAS, 1980). Au Sénégal, *A. seyal* pousse naturellement sur des sols salés et non salés particulièrement dans le Bassin arachidier dans la région naturelle du Sine Saloum. Son optimum écologique se situe sur les sols alluviaux à texture moyenne à fine entre les isohyètes de 500 à 700 mm (Mallet et al., 2002). Elle prospère également dans les prairies boisées et surtout sur les sols noirs argileux ou

argilo-siliceux, saisonnièrement inondés. Cette espèce tolère un pH compris entre 6 et 8, la salinité et les inondations périodiques.



Figure 11. Arbre adulte de *Acacia seyal* Del.

1.6.3.4. Utilisation

A. seyal est une importante source d'énergie en milieu rural à la fois comme bois de chauffe et de charbon de bois. *A. seyal* est une plante mellifère. Le feuillage et les gousses d'*A. seyal* sont un excellent fourrage, recherché des ovins, des bovins, des caprins et de nombreux animaux sauvages (Le Houerou, 1980). *A. seyal* est une espèce productrice de gomme arabique (gomme friable) et hautement fixatrice d'azote (Ndoye et al., 1995). Elle est capable d'établir une association avec des bactéries fixatrices d'azote et des CMA pour former des symbioses qui jouent un rôle très important dans la nutrition hydrominérale de la plante, la résistance à certains stress environnementaux et la production de gomme.

Chapitre 2 **Impact de *Sporobolus robustus* Kunth sur la germination, la croissance et la mycorhization de *Prosopis juliflora* (SW) DC et *Acacia seyal* (Del.) en condition de stress salin**

2.1. INTRODUCTION

La salinité est un facteur limitant la germination et la croissance des plantes surtout dans les régions aride et semi-aride (Guma et al., 2010; Wei et al., 2008 ; Yadav et al., 2011). La germination de la graine est une étape critique dans le cycle de développement de la plante (Grime et Campbell, 1991). En effet, elle conditionne l'enracinement de la plantule et probablement son développement ultérieur (Tremblin et Binet, 1984). Les plantules sont très vulnérables à ce stade de leur cycle de vie. L'accumulation de sels dans le milieu entraîne une augmentation de la pression osmotique et une baisse concomitante du potentiel hydrique du sol. La salinité ralentit ainsi l'imbibition de la graine, qui est la première étape de la germination et inhibe la croissance des plantes (Kosova et al., 2013 ; Ungar, 1982).

S. robustus est une plante halophyte naturellement associée à des CMA. Cette graminée pourrait favoriser la germination, la croissance et la mycorhization des légumineuses moins tolérantes au sel par une diminution de la salinité des sols et/ou par une stimulation du potentiel infectieux mycorhizogène des sols. Les CMA, grâce à leur réseau dense de filaments mycéliens, améliorent la structure physique du sol en maintenant les agrégats (Rillig, 2004 ; Andrade et al., 1995, 1998; Bethlenfalvay et al., 1999; Requena et al., 2001). Or, la stabilité des agrégats est une propriété cruciale affectant la durabilité du sol, la production agricole, l'activité biologique, le stockage de carbone et de l'eau. En outre, les CMA améliorent la nutrition hydrominérale de la plante, ce qui se traduit chez les plantes mycorhizées par une meilleure croissance et tolérance à la salinité (Dodd et Ruíz-Lozano, 2012; Mbadi et al., 2015).

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer en condition de stress salin, l'effet de *S. robustus* sur (i) la germination, la croissance et la survie de *P. juliflora* et d'*A. seyal* (ii) mycorhization de *P. juliflora* et d'*A. seyal* et (iii) le potentiel infectieux mycorhizogène et la salinité des sols.

2.2. MATERIEL ET METHODES

2.2.1. Présentation de la zone d'étude

La zone d'étude est localisée dans le bassin arachidier, qui correspond à la zone agricole où domine la culture arachidière. Elle couvre en particulier la région administrative de Fatick. La population est constituée en majorité des ethnies Sérères et Wolofs, avec une densité de 30 habitants/km² (FAO/CSE, 2003). La pluviométrie moyenne est comprise entre 500 et 800 mm par an. Par ailleurs, l'essentiel de la production agricole nationale provient de cette zone de cultures sous pluie. La zone est caractérisée par la forte extension du front agricole au détriment des réserves sylvo-pastorales. Les rares formations ligneuses qui subsistent dans le bassin arachidier sont localisées dans des aires protégées ou sur des sols incultes. Cette végétation naturelle est constituée d'un mélange d'espèces à nette dominance de combrétacées et de mimosacées, regroupées en pseudo-steppes, savanes arbustives et arborées de quelques îlots de savane boisée. Avec la remontée de la langue salée, la salinisation des terres se développe aux abords des cours d'eau permanents (bras de mer du Sine et du Saloum). La zone est également marquée par l'appauvrissement continu des sols et la salinisation des terres de sa frange côtière. Ces sols sont de types ferrugineux tropicaux lessivés avec une texture sableuse. Ils ont peu évolué, gravillonnaire sur cuirasse latéritique. Dans cette zone, les températures maximales avoisinent 38°C en fin de saison sèche (Mai-Juin).

2.2.2. Délimitation des parcelles

Le site d'étude de Niam-Diarokh (16°46' W et 14°17' N) est situé dans le Département de Foundiougne (Région de Fatick). Le choix de ce site se justifie par les résultats antérieurs révélant la présence d'une flore microbienne symbiotique dans ces sols (Diouf et al. 2007 ; Manga et al. 2007). Sur ce site, une parcelle principale de 40 m x 25 m a été délimitée selon un transect Ouest-Est suivant un gradient de salinité décroissant. En raison de l'hétérogénéité apparente du site, la parcelle principale a été subdivisée en quatre (04) parcelles élémentaires de 10 m x 25 m. Chaque parcelle élémentaire représente un niveau de salinité.

2.2.3. Substrat de culture

Le substrat utilisé dans cette étude est constitué de sols échantillonnés dans le site de Niam Diarokh. Les sols ont été prélevés en saison sèche (juin 2013) dans la rhizosphère de trois

individus de *S. robustus* dans trois parcelles délimitées le long d'un gradient de salinité. Le gradient de salinité était compris en moyenne entre 14,40 et 39,77‰ de salinité correspondant respectivement à une conductivité électrique de 21,28 mS/cm et 58,60 mS/cm (Tableau 2). Les sols ont été prélevés à l'horizon 0-20 cm. Un échantillon composite de sols a été réalisé pour chaque niveau de salinité. Le substrat de culture a été préalablement tamisé (2 mm) puis les caractéristiques physico-chimiques (Tableau 2) ont été déterminées au Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA), ISO 9001-2000, Dakar, US IMAGO, IRD, www.lama.ird.sn.

Tableau 2. Quelques caractéristiques physico-chimiques du sol de Niam Diarokh prélevé en juin 2013.

Composants	Salinité (‰)		
	14,40	34,89	39,77
Caractéristiques physiques (%)			
Argile	17,80	24,80	27,02
Limons fin	5,90	5,30	12,98
Limons gros	24,90	24,60	16,60
Sable fin	49,40	42,90	38,51
Sable grossier	0,40	0,30	0,43
Caractéristiques chimiques			
pH (H ₂ O)	6,7	7,6	8,0
Conductivité électrique (mS/cm)	21,28	52,96	58,60
C total (%)	1,31	1,24	1,47
N assimilable (mg/kg)	0,56	1,35	2,62
P assimilable (mg/kg)	6	9	16

2.2.4. Matériel végétal et condition de culture

Le matériel végétal est constitué de graines de *P. juliflora* et *A. seyal* et de touffes de *S. robustus* prélevées dans le site de Niam Diarokh. Les touffes de *S. robustus* prélevées dans les 3 niveaux de salinité ont été repiquées dans des pots (4 tiges de même taille/pot) en plastique de 16 cm de hauteur et 17cm de diamètre. Pour chaque niveau de salinité, 36 pots ont été préparés. Les pots ont été remplis jusqu'au 4/5 de leur volume avec les sols prélevés. La culture des plants de *S. robustus* a été menée sous serre au Centre de Recherches ISRA/IRD de Bel-Air (17°30'W et 14°44'N), dans des conditions d'éclairement naturel (14h), de température ambiante (35°C jour, 27°C nuit) et d'humidité relative de 75%. Les jeunes plants

ont été régulièrement arrosés avec de l'eau de robinet jusqu'à la saturation pendant 5 mois pour obtenir des touffes.

2.2.5. Dispositif expérimental

Les plants de *P. juliflora* et d'*A. seyal* ont été disposés dans un bloc complètement randomisé avec 3 facteurs : le facteur salinité à trois niveaux (14,40, 34,89 et 39,77‰), le facteur plante à deux niveaux (*P. juliflora* et *A. seyal*) et le facteur *S. robustus* à deux niveaux (présence/absence). Notons que sur les trois niveaux de salinité (14,40, 34,89 et 39,77‰), seuls les plants de *S. robustus* repiqués dans le traitement 14,40‰ ont pu repousser. Par conséquent, cette étude a été menée uniquement sur les sols ayant une salinité de 14,40‰. La combinaison de deux facteurs (2 x 2) a représenté les 4 traitements à comparer. Chaque traitement a été répété neuf fois.

2.2.6. Germination des graines de *P. juliflora* et *A. seyal* en présence de *S. robustus*

Les graines de *P. juliflora* et *A. seyal* ont été scarifiées avec de l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄, 96%) respectivement 15 min et 30 min (Diagne et al., 1988 ; Diouf et al., 2007). Elles ont été abondamment rincées à l'eau distillée avant d'être semées dans les touffes de *S. robustus* maintenues en pots pendant 5 mois, à raison de 10 graines par pot et par espèce de légumineuse. La germination a été repérée par la sortie de la radicule hors des téguments de la graine toutes les 24 h sur une durée maximale de 12 jours. L'essai a pris fin lorsqu'après trois comptages successifs aucune germination n'a été enregistrée. Au cours de cet essai, la cinétique et le taux final de germination des graines de *P. juliflora* et *A. seyal* ont été évalués.

2.2.7. Croissance et mycorhization de *P. juliflora* et *A. seyal* en présence de *S. robustus*

Les graines de *P. juliflora* et *A. seyal* ont été scarifiées avec de l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄, 96%) puis mises à germer pendant 48 h à l'obscurité dans de l'eau gélosée (0,9 % ; p/v). Les graines pré-germées ont été repiquées individuellement à proximité des touffes poussant dans les pots des différents traitements. Les plants de *P. juliflora* et *A. seyal* ont été maintenus en serre pendant 4 mois. Les paramètres mesurés ont concerné le taux de survie, les paramètres de croissance et de mycorhization (intensité et la fréquence) des légumineuses. La densité des spores, le potentiel infectieux mycorhizogène et la conductivité électrique des sols des différents traitements ont été déterminés à la fin de l'expérimentation.

Le taux de survie des plants des deux légumineuses (nombre de plants vivants/ nombre total de plants x 100), a été déterminé après 4 mois de croissance. Les parties aérienne et racinaire des plants ont ensuite été séparées et les poids secs déterminés après séchage à 60 °C pendant 72 heures.

2.2.7.1. Evaluation du taux de mycorhization

2.2.7.1.1. Coloration des racines

Les racines ont été rincées à l'eau de robinet, mises dans des tubes à essai contenant une solution de KOH (10%) et l'ensemble a été porté à ébullition dans un bain marie à 90 °C pendant 1 h. Après un rinçage à l'eau de robinet, les racines ont été trempées dans une solution de bleu de Trypan (0,05%) et les tubes placés au bain marie à 90 °C pendant 30 min. Les racines ont été rincées pour éliminer l'excès de colorant et conservées dans de l'eau à 4°C.

2.2.7.1.2. Observation et évaluation du taux de mycorhization

Cent fragments de racines d'environ 1 cm chacun, préalablement colorées au bleu de Trypan, ont été observés au microscope optique pour déterminer l'intensité de mycorhization comme décrite par Trouvelot et al. (1986).

2.2.7.2. Densité des spores de CMA

2.2.7.2.1. Extraction des spores

L'extraction de spores a été effectuée selon la méthode du tamisage humide décrite par Gerdemann et Nicolson (1963). Un échantillon de cent grammes de chaque sol a été mélangé avec un excès d'eau de robinet dans un bécher. Ce mélange eau-sol a été agité quelques min puis laissé décanter pendant quelques secondes. Le surnageant contenant les spores a été filtré à travers un jeu de tamis de mailles décroissantes (500 µm, 200 µm, 100 µm, 50 µm). Afin de récupérer le maximum de spores le tamisage humide a été répété trois fois. Les débris organiques et les spores retenues dans les tamis de 200 µm, 100 µm et 50 µm ont été récupérés dans des tubes de centrifugation (tubes corex de 25 ml) remplis à moitié. Pour compléter le tube, une solution de saccharose 60% (v/v) a été injectée au fond du tube à l'aide d'une pipette. Les débris organiques et les spores ont été séparés par une centrifugation à 3000 tours par min pendant trois min et à 4°C. Les spores se placent à l'interface de la phase

aqueuse et de la phase sucrée tandis que les débris organiques restent en surface. Les spores ont été récupérées à l'aide d'une pipette et placées dans le tamis de 50 µm. Un dernier rinçage à l'eau a permis d'éliminer le saccharose et de récupérer les spores du tamis dans une boîte de Pétri.

2.2.7.2.2. Dénombrement des spores

Pour chaque tube de centrifugation, la suspension sporale a été mise dans une boîte de Pétri dont la surface est quadrillée pour faciliter le comptage des spores. Les spores ont été dénombrées sous une loupe binoculaire puis conservées à 4°C dans des tubes Eppendorf contenant du glycérol 60% (v/v).

2.2.7.3. Potentiel infectieux mycorhizogène

La mesure du potentiel infectieux mycorhizogène d'un sol consiste en une évaluation du nombre de propagules mycorhiziennes par 100 g de ce sol.

Le potentiel infectieux mycorhizogène a été estimé par la méthode MPN (« Most Probable Number ») décrite par Sieverding (1991). *S. robustus* a été utilisé comme plante piège pour cette étude. La méthode MPN consiste en des dilutions de sol (de 4 en 4) avec le même sol stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 1h. Le Tableau 3 présente les dilutions effectuées.

Tableau 3. Dilutions de sols pour les MPN.

Dilutions	Quantité de sol naturelle (g)	Quantité de sol stérile (g)
1	100	0
1/4	25	75
1/16	6,25	93,75
1/64	1,56	98,44
1/256	0,39	99,61
1/1024	0,1	99,9

Les graines de *S. robustus* utilisées pour la culture ont été désinfectées à l'eau de javel (5%, p/v) pendant 2 min puis rincées avec de l'eau distillée stérile avant d'être semées sur du sol stérile. Deux semaines après germination, les jeunes plants ont été repiqués dans les pots contenant les différentes dilutions de sols puis transférés en serre où ils ont été arrosés à la capacité au champ pendant 6 semaines. Au terme des 6 semaines de culture, les plants de *S. robustus* ont été récoltés et les racines bien rincées ont été colorées suivant la méthode de Phillips et Hayman (1970). La détermination du MPN a été faite à partir des résultats (plant

mycorhizé ou non) obtenus pour les 5 répétitions de chaque dilution de sol. Le MPN est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Log MPN} = (x \log a) - K$$

x est la moyenne des plantes mycorhizées soit le total pour toutes les dilutions divisé par 5 (nombre de répétitions) ; a est le facteur de dilution soit 4 dans le cas présent ; y = s – x et y est requis pour trouver le nombre K ; s est le nombre de dilutions soit ici 6 ; la valeur de K est donnée dans la table de Fisher et Yates (1948 ; 1970) (Annexe 1).

L'écart type correspondant est obtenu selon la formule :

$$\log \text{MPN } s,i = \log 213,98 \pm \frac{S}{\sqrt{n}} \times z$$

s est la limite supérieur ; i est la limite inférieure ; n est le nombre de répétitions soit 5 dans le cas présent ; $\sqrt{n} = \sqrt{5} = 2,2361$; S = 0,4483 est la valeur de la variance MPN pour une dilution au 1/4 (Sieverding, 1991) ; z = 1,645 au seuil de 95% (Sieverding, 1991).

2.2.8. Analyses statistiques

Les données ont été soumises à une analyse de variance ANOVA à un facteur. Les comparaisons entre les différentes moyennes ont été effectuées par le test de Tukey HSD à 5% de probabilité. Les données de fréquence et d'intensité de mycorhization ont été transformées en arc sinus avant d'être soumises à l'analyse ANOVA. Les analyses ANOVA ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT version 2010.

2.3. RESULTATS

2.3.1. Effet de *S. robustus* sur la germination des graines de *P. juliflora* et *A. seyal*

Les résultats concernant l'impact des touffes de *S. robustus* ont montré un effet significativement élevé de la graminée sur la cinétique de germination d'*A. seyal* (Figure 12). Chez *P. juliflora*, la présence de la graminée n'a pas eu d'effet significatif sur le taux final de germination. Cependant, *S. robustus* a accéléré la germination de *P. juliflora* durant les huit premiers jours.

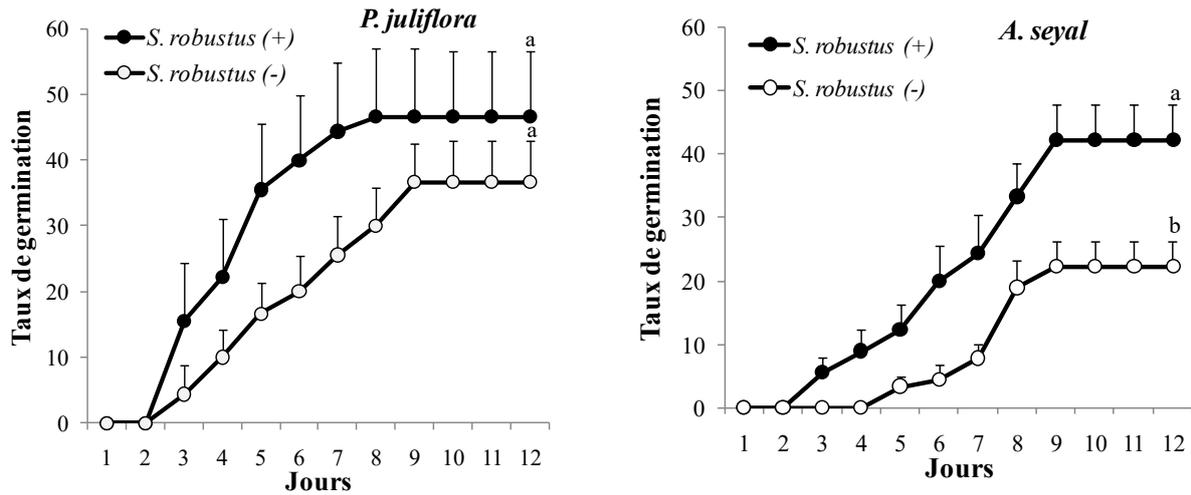


Figure 12. Cinétique et taux final (12 jours) de germination (%) des graines de *P. juliflora* et *A. seyal* en présence (+) ou non (-) de *S. robustus*. Test de Tukey HSD ($P < 0.05$).

2.3.2. Effet de *S. robustus* sur la survie et la croissance des plants de *P. juliflora* et *A. seyal*

S. robustus améliore la survie des plants. Ainsi, en présence de la graminée, 66% des plants d'*A. seyal* ont survécu après 4 mois de culture contre 44% en absence de *S. robustus* (Tableau 4). Chez *P. juliflora*, 100% des plants associés à *S. robustus* ont survécu après 4 mois de croissance. Par contre, 55% seulement des plants de *P. juliflora* ont pu survivre lorsqu'ils ont été cultivés seuls.

Tableau 4. Taux de survie des plantes de *P. juliflora* et *A. seyal*, après 4 mois de croissance en serre, en présence (+) ou non (-) de *S. robustus*.

Légumineuses	<i>S. robustus</i>	Taux de survie	
		Nombre de plantes vivantes	%
<i>A. seyal</i>	-	4	44 ^b
<i>A. seyal</i>	+	6	66 ^b
<i>P. juliflora</i>	-	5	55 ^b
<i>P. juliflora</i>	+	9	100 ^a

Pour une même espèce, les données suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD ($P < 0.05$).

L'effet de *S. robustus* sur les paramètres de croissance de *P. juliflora* et d'*A. seyal* est représenté sur la figure 13. Les résultats n'ont montré aucun effet significatif de la graminée sur le poids sec aérien, racinaire et sur le poids sec total des plants des 2 légumineuses.

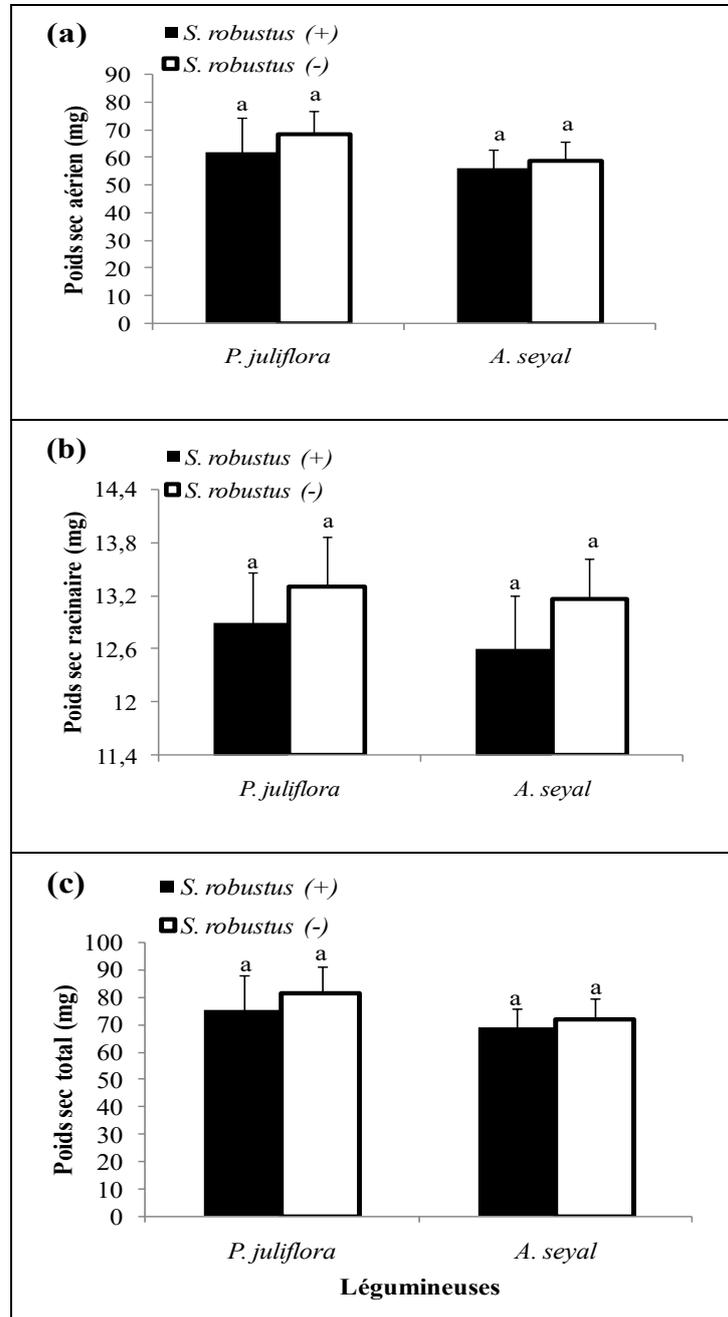


Figure 13. Poids sec aérien (a), poids sec racinaire (b) et poids sec total (c) des plants de *P. juliflora* et d'*A. seyal*, après 4 mois de culture en serre, en présence (+) ou en absence (-) de *S. robustus*. Test de Tukey HSD ($P < 0.05$).

2.3.3. Effet de *S. robustus* sur la mycorhization des plants de *P. juliflora* et d'*A. seyal* et le nombre de spores des sols sous légumineuses

L'effet de *S. robustus* sur la mycorhization des plants de *P. juliflora* et d'*A. seyal* a été déterminé après 4 mois de croissance des légumineuses (Tableau 5). Les résultats ont révélé un effet hautement significatif de la présence de *S. robustus* sur les intensités et fréquences de mycorhization des légumineuses. En effet, les légumineuses en présence de la graminée ont des taux de mycorhization statistiquement supérieurs à ceux observés en culture seule.

Le nombre de spores des sols sous *P. juliflora* et *A. seyal* a été significativement amélioré par la présence de *S. robustus*. Ainsi, après 4 mois de croissance des légumineuses, le taux de mycorhization en présence de *S. robustus* a été plus de 10 fois supérieure à celui des plants cultivés seuls (Tableau 5).

Tableau 5. Taux de mycorhization de *P. juliflora* et d'*A. seyal* et nombre de spores des sols sous légumineuses, après 4 mois de croissance en serre, en présence (+) ou non (-) de *S. robustus*.

Légumineuses	<i>S. robustus</i>	Mycorhization (%)		Nombre de spores (/100 g de sol)
		Intensité	Fréquence	
<i>A. seyal</i>	-	0 ^b	0 ^b	34 ^b
<i>A. seyal</i>	+	34,83 ^a	86 ^a	385 ^a
<i>P. juliflora</i>	-	01,33 ^b	10 ^b	38 ^b
<i>P. juliflora</i>	+	43,96 ^a	96 ^a	458 ^a

Pour une même espèce de légumineuses, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD ($P < 0.05$).

2.3.4. Effet de *S. robustus* sur le potentiel mycorhizogène et la salinité des sols sous *P. juliflora* et *A. seyal*

L'estimation du nombre de propagules par la méthode des MPN (Most Probable number) a été effectuée sur des sols sous *P. juliflora* et *A. seyal* associés ou non à *S. robustus*, après 4 mois de croissance des légumineuses (Tableau 6). Les résultats ont révélé qu'en présence de la graminée les sols sous légumineuses présentent un nombre de propagules mycorhiziennes nettement plus élevé que sous *P. juliflora* et *A. seyal* en culture seule.

L'analyse des caractéristiques chimiques des sols à la fin de l'expérience a montré une diminution de la salinité des sols sous les plants d'*A. seyal* en présence de la graminée (Figure

14). Toutefois, bien qu'une tendance baissière du niveau de salinité ait été notée sous *P. juliflora* en présence de la graminée, aucun effet significatif n'a été noté entre les deux traitements.

Tableau 6. Estimation du nombre le plus probable de propagules (MPN) des sols sous *P. juliflora* et *A. seyal*, après 4 mois de croissance en serre, en présence (+) ou en absence (-) de *S. robustus*.

Légumineuses	<i>S. robustus</i>	MPN/100 g de sol	Intervalle de confiance (95%)
<i>A. seyal</i>	-	(1,46) x 10 ⁴	(0,93 - 4,27) x 10 ⁴
<i>A. seyal</i>	+	(31,7) x 10 ⁴	(14,97 - 68,38) x 10 ⁴
<i>P. juliflora</i>	-	(4) x 10 ⁴	(1,87 - 8,54) x 10 ⁴
<i>P. juliflora</i>	+	(42,07) x 10 ⁴	(20 - 90) x 10 ⁴

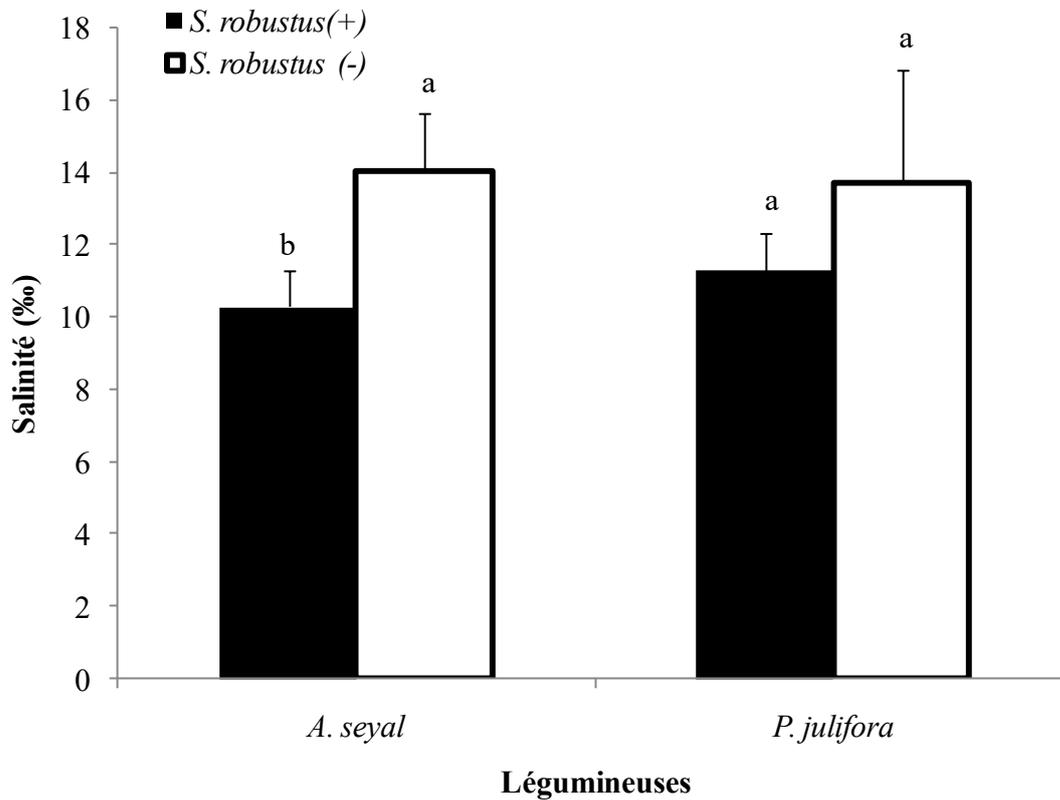


Figure 14. Salinité (‰) des sols sous *P. juliflora* et *A. seyal*, après 4 mois de croissance en serre, en présence (+) ou en absence (-) de *S. robustus*. Test de Tukey HSD ($P < 0.05$).

2.4. DISCUSSION

Les résultats issus de cette étude ont montré une diminution de la salinité des sols sous les plants d'*A. seyal* en présence de *S. robustus*. Ces résultats suggèrent qu'en condition de stress salin, *S. robustus* développe des mécanismes pour s'adapter à la salinité. Parmi ces mécanismes, nous pouvons citer l'exclusion des ions toxiques et la synthèse d'osmolytes compatibles. Ces résultats corroborent ceux de Zou et al. (1995) qui ont montré que les halophytes développent des mécanismes anatomiques, morphologiques et physiologiques pour s'adapter et se développer dans ces zones salées. La diminution de la salinité pourrait expliquer les taux de germination des graines d'*A. seyal* significativement plus élevés en présence de la graminée. La graminée n'a pas eu d'effet significatif sur la germination des graines de *P. juliflora* contrairement aux graines d'*A. seyal*. La germination d'*A. seyal* est plus sensible à la salinité comparée à *P. juliflora* (Fall et al., 2016). La survie de *P. juliflora* a été positivement affectée par *S. robustus*. Par contre, chez *A. seyal*, la graminée n'a pas eu d'effet significatif sur le taux de survie des plants. Ces résultats suggèrent que la tolérance au sel des légumineuses en phase germinative peut être différente de celle au stade jeune plant. Ces résultats corroborent ceux de Radhouane (2008) qui a montré que la réponse de *Pennisetum glaucum* à la salinité diffère selon son stade de développement.

S. robustus a stimulé le potentiel infectieux mycorhizogène des sols. L'impact positif de la graminée sur le potentiel mycorhizogène serait probablement lié aux exsudats racinaires produits par la plante. Certains auteurs ont montré que les exsudats racinaires peuvent influencer la germination de spores et la croissance des hyphes (Gianinazzi-Pearson et al., 1989). Une amélioration du potentiel mycorhizogène du sol a été rapportée dans des plantations d'arbres du Sénégal (Ingleby et al., 1997 ; Diagne et al., 2006) et attribuée à la flore herbacée sous-jacente plutôt qu'à la contribution de l'arbre même.

S. robustus a eu un effet significativement élevé sur les taux de mycorhization de *P. juliflora* et d'*A. seyal*. Enkhtuya et al. (2005) ont montré que des plantes herbacées bien implantées peuvent faciliter la mycorhization de jeunes arbres nouvellement installés *via* le réseau mycélien. L'effet positif de *S. robustus* sur les paramètres de mycorhization des légumineuses et sur le potentiel infectieux mycorhizogène des sols expliqueraient en partie les meilleurs taux de germination et de survie observés respectivement chez *A. seyal* et *P. juliflora*, pourtant, *S. robustus* n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance des deux légumineuses.

S. robustus en diminuant la salinité des sols et en stimulant le potentiel infectieux mycorhizogène des sols, crée un microhabitat favorable à la germination, à la mycorhization et à la survie des légumineuses. *S. robustus* serait une plante facilitatrice ou plante nurse pour la germination et la survie des jeunes légumineuses en condition de stress salin. Plusieurs études (Bruno et al., 2003 ; Padilla et Pugnaire, 2006 ; Duponnois et al., 2013) ont montré que les plantes nurses matérialisent des micro habitats favorables à la germination des semences et/ou aux besoins des plantes. Ces auteurs ont montré que les plantes nurses améliorent les conditions environnementales, permettant ainsi l'installation d'espèces végétales moins tolérantes aux stress d'origine abiotique.

2.5. CONCLUSION

Les résultats issus de cette étude ont montré que *S.robustus* a favorisé la germination d'*A. seyal* et la survie de *P. juliflora*. Toutefois, la graminée n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance des légumineuses.

L'intensité et la fréquence de mycorhization de *A. seyal* et *P. juliflora* ont significativement augmenté avec la graminée.

S. robustus a stimulé le potentiel infectieux mycorhizogène des sols sous *A. seyal* et *P. juliflora*. La graminée a également diminué la salinité des sols sous les légumineuses.

Ainsi, *S. robustus* serait une plante facilitatrice pour la germination et l'établissement d'*A. seyal* et *P. juliflora* en condition de stress salin. *S. robustus* pourrait être utilisé comme plante facilitant l'installation des deux légumineuses dans des opérations de reboisement des zones salées du Sine et Saloum. Le mécanisme par lequel *S. robustus* diminue la salinité du sol reste à élucider. C'est l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 3 **Réponses morphologique et physiologique de *Sporobolus robustus* Kunth à la salinité**

3.1. INTRODUCTION

Plus de 6% des terres dans le monde sont affectées par le sel, ce qui représente plus de 800 millions d'hectares de terres (FAO, 2008). La salinité est un facteur limitant le développement des cultures et la productivité, en particulier dans les régions arides et semi-arides (Yadav et al., 2011). Il provoque une inhibition de la croissance des plantes, en particulier les glycophytes par la diminution de la disponibilité en eau, l'accumulation des ions sodium et les déséquilibres minéraux qui entraînent des dommages cellulaires et moléculaires (Kosova et al., 2013). Contrairement aux glycophytes, les plantes halophytes sont naturellement adaptées aux environnements salés grâce aux stratégies d'adaptation qu'elles développent. En effet, les halophytes utilisent principalement deux stratégies d'adaptations physiologique, biochimique et moléculaire: (i) Exclusion des ions toxiques et contrôle de leur transport par les racines, (ii) Compartimentation des ions toxiques dans les feuilles et synthèse d'osmolytes compatibles. L'ajustement osmotique est réalisé par des osmoticums organiques comme la proline (Farkhondeh et al., 2012).

Les halophytes concernent de nombreuses familles de plantes avec toutefois une prédominance des Chenopodiaceae et des Poaceae ou graminées (Flowers et Colmer, 2008). Les graminées ont le plus grand nombre d'espèces halophytes (Flowers et al., 1986) et sont bien adaptées à la salinité, ce qui leur permet de se développer dans les conditions de fortes salinité. Leur culture pourrait constituer une approche judicieuse pour la réhabilitation et la récupération des sols salés (Rogers et al., 2005). Chez les graminées, le genre *Sporobolus* est connu comme étant une halophyte car la plupart des espèces de *Sporobolus* sont distribuées dans les habitats salés (Rogers et al., 2005). Des espèces de *Sporobolus* ont également montré une grande tolérance à la salinité en condition contrôlée. Sur les 13 espèces de *Sporobolus* qui se développent dans les habitats salés, 9 ont montré une tolérance à la salinité en condition contrôlée (Roger et al., 2005). Hameed et al., (2013) ont comparé en situation de stress salin deux populations de *S. arabicus*, l'une provenant d'un habitat salé et l'autre d'un habitat non salé. La population de l'habitat salé a mieux toléré le sel que celle du milieu non salé grâce aux mécanismes suivants : maintien du potentiel hydrique, accumulation de faibles quantités

de Na⁺ et Cl⁻ dans les racines et feuilles et synthèse d'osmolytes organiques. Gulzar et al. (2005) ont montré un effet négatif de la salinité sur la conductance stomatique et la teneur en ions toxiques des parties aériennes de *S. ioclados*. Hester et al. (2003) ont montré que *S. virginicus* a besoin d'une concentration modérée de sel pour optimiser sa croissance. *S. robustus* est une graminée pérenne stolonifère des sols salés largement distribuée dans le Delta du Sine Saloum au Sénégal (Fall et al., 2015).

Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer les réponses morphologique et physiologique de jeunes plants de *S. robustus* à la salinité

3.2. MATERIEL ET METHODES

3.2.1. Substrat de culture

Le substrat utilisé dans cette étude est un sol sableux non salé, prélevé à l'horizon 0-25 cm dans le site de Niam Diarokh (16°46' W et 14°17' N) dans la région de Fatick au Sénégal. Le sol, échantillonné en novembre 2013 hors du couvert végétal, a été tamisé (2 mm). Les caractéristiques physico-chimiques du sol déterminées au LAMA, ont été : argile 14,6% ; Silt 32,6% ; sable fin 49,6% ; sable grossier 0,3% ; pH (H₂O) 6,8 ; conductivité électrique 0,3 mS/cm ; salinité 0,2‰ ; C total 1,15% ; N total 0,10% ; N assimilable 4,19 mg/kg ; C/N 12 ; P total 93 mg P/kg ; P assimilable 4 mg P/kg.

3.2.2. Matériel végétal et conditions de cultures

Les graines de *S. robustus* ont été collectées à Niam Diarokh, Fatick, Sénégal. Elles ont été mises à germer dans du sable préalablement stérilisé (120°C, 2h) provenant de Sangalkam au Sénégal. Les jeunes plants de *S. robustus* âgés de deux semaines ont ensuite été repiqués individuellement dans des gaines (24 cm de hauteur et 12 cm de diamètre). Les gaines ont été remplies jusqu'au 4/5 de leur volume avec le sol non salé de Niam Diarokh. La culture des plants a été menée sous serre à Bel-Air (17°30'W et 14°44'N), dans des conditions d'éclairage naturel (14 h), de température ambiante (35°C jour, 27°C nuit) et d'humidité relative de 75%. Les jeunes plants ont été arrosés régulièrement avec de l'eau de robinet pendant 4 semaines avant l'application du NaCl.

3.2.3. Dispositif expérimental et traitement salin

Les doses de NaCl ont été choisies en tenant compte de la gamme de salinité des sols sous *S. robustus* dans le site de Niam Diarokh (Données non représentées). Afin d'éviter un choc osmotique, le traitement salin a été appliqué progressivement en ajoutant 25 mM de NaCl tous les 2 jours jusqu'à atteindre les teneurs en sel souhaitées (0, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 mM). Les niveaux de salinité du sol dans les gaines ont été contrôlés une fois par semaine avec un salinomètre (Digit 100 ATC Salinity pocket refractometer, CETI, Optical Instruments, Belgium) et ajustés au besoin. Les plants ont été disposés dans un bloc complètement randomisé avec le seul facteur salinité à sept niveaux. Chaque traitement a été répété 12 fois. Le traitement sans NaCl mesuré avec le salinomètre a été retenu comme témoin.

3.2.4. Récolte et analyse des paramètres

Les plants de *S. robustus* ont été récoltés et analysés à 50, 100 et 150 jours de croissance. Quatre plants ont été récoltés par niveau de salinité et par période de récolte. Le poids sec des plants a été déterminé après séchage à 60 °C pendant 96 heures.

L'indice de tolérance au sel (ITS) a été évalué selon l'équation suivante de Seydi et al., (2003): $ITS = [(PST \text{ à } S_x / PST \text{ à } S_1) \times 100]$, avec PST = Poids sec total de la plante, S1 = Poids sec du Traitement témoin et Sx = Poids sec du Traitement NaCl considéré.

La concentration en proline a été quantifiée en spectrophotométrie à 520 nm avec 100 mg de feuilles fraîches, selon la méthode décrite par Monneveux et Nemmar (1986), modifiée par Diouf et al. (2005). La concentration en proline a été déduite d'une gamme d'étalonnage (Cf. annexe 4).

Les teneurs en chlorophylles ont été déterminées en broyant 100 mg de feuilles fraîches (Makeen, 2007). Les concentrations en chlorophylles a, b et chlorophylle totale ont été calculées à partir de la formule de Arnon (1949).

Après séchage et broyage, les parties aérienne et racinaire des plants de *S. robustus* âgés de 150 jours ont été digérés dans une solution d'acide nitrique. Les teneurs en Na et K ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique (VARIAN 220 FS) selon la méthode de Wang et Zhao (1995).

3.2.5. Analyses statistiques

Une analyse ANOVA à un facteur a été réalisée pour tester l'effet de la salinité sur le poids sec total, l'indice de tolérance au sel, les teneurs en proline, chlorophylle a, chlorophylle b et chlorophylle total des plants de *S. robustus* à 50, 100 et 150 jours de traitement. Les données des teneurs en Na, K et K/Na ont été analysées par ANOVA uniquement après 150 jours de traitement. Pour tous les paramètres mesurés, les moyennes des valeurs ont été comparées avec le test de Tukey HSD ($P < 0,05$). Les analyses ANOVA ont été réalisées en utilisant le logiciel XLSTAT version 2010.

3.3. RESULTATS

3.3.1. Effet de la concentration en NaCl sur la production de biomasse

Les résultats ont montré qu'à 50 jours de traitement salin, le poids sec aérien des plants a significativement diminué à 250 et 300 mM de NaCl, comparé aux plants témoins. Le poids sec racinaire a significativement diminué au delà de 50 mM alors que le poids sec total a été négativement affecté à partir de 200 mM de NaCl (Figure 1). A 100 jours de traitement, le poids sec aérien a connu une baisse significative à 300 mM. Par contre, le poids sec racinaire a significativement diminué pour des concentrations en NaCl variant entre 50 et 300 mM. A cette période de récolte, le poids sec total a diminué à 250 et 300 mM. A la fin de l'expérimentation (150 jours après traitement), jusqu'à 150 mM de NaCl, il n'y a pas eu de diminution significative de la biomasse des plants de *S. robustus* par rapport aux témoins non soumis au stress salin. Ces résultats montrent une forte tolérance de *S. robustus* à la salinité.

3.3.2. Les indicateurs de la tolérance à la salinité

Quatre indicateurs de tolérance à la salinité ont été mesurés. Il s'agit de l'indice de tolérance au sel, les teneurs en proline et en chlorophylle a, b et total et le ratio K/Na (Figure 15, 16 et 17).

L'indice de tolérance au sel a été négativement affecté par la concentration de 200 mM de NaCl à 50 et 150 jours de traitement. A 100 jours de traitement, la tolérance au sel de *S. robustus* a diminué à des concentrations de 250 et 300 mM de NaCl.

La teneur en proline des feuilles de *S. robustus* a significativement augmenté à 300 mM à 50 jours de traitement (Figure 16). A 100 jours de traitement, la concentration de 250 mM a eu un effet positif sur la teneur en proline. Par contre, à 150 jours de traitement, seule la dose de 200 mM a significativement augmenté la concentration en proline des feuilles de *S. robustus*.

La teneur en chlorophylle a des plants de *S. robustus* récoltés à 50 jours après traitement a significativement augmenté à une concentration en NaCl comprise entre 150 et 300 mM (Figure 16). A 100 et 150 jours de traitement, la teneur en chlorophylle a des plants n'a pas varié. Comparée aux plants témoins, la teneur en chlorophylle b de *S. robustus* n'a pas varié aux trois périodes de récoltes. Toutefois, la teneur en chlorophylle b a légèrement augmenté à 50 mM à 150 jours de traitement (Figure 16). La teneur en chlorophylle totale de *S. robustus* a significativement augmenté à 200 mM à 50 jours de traitement (Figure 16). A 100 et 150 jours de traitements, les teneurs en chlorophylle totale n'ont pas varié. Cependant, les teneurs en chlorophylle totale ont connu une légère augmentation à 50 mM à 150 jours de traitement.

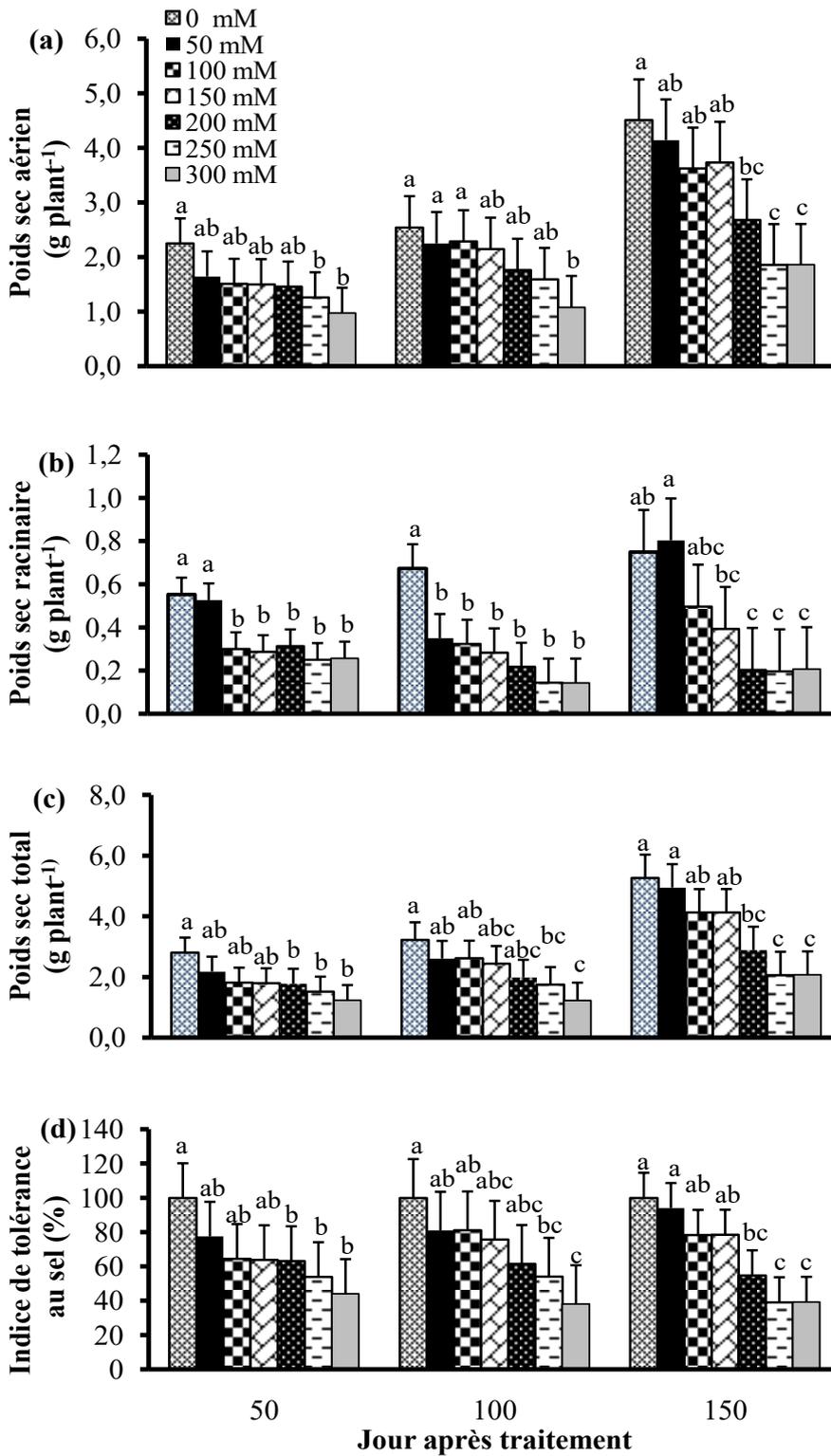


Figure 15. Effet de la concentration en NaCl sur le poids sec aérien (a), racinaire (b), total (c) et l'indice de tolérance au sel (d) de *S. robustus* à 50, 100 et 150 jours de traitement. Pour chaque période de récolte, les valeurs (moyennes de 4 mesures) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD (5%).

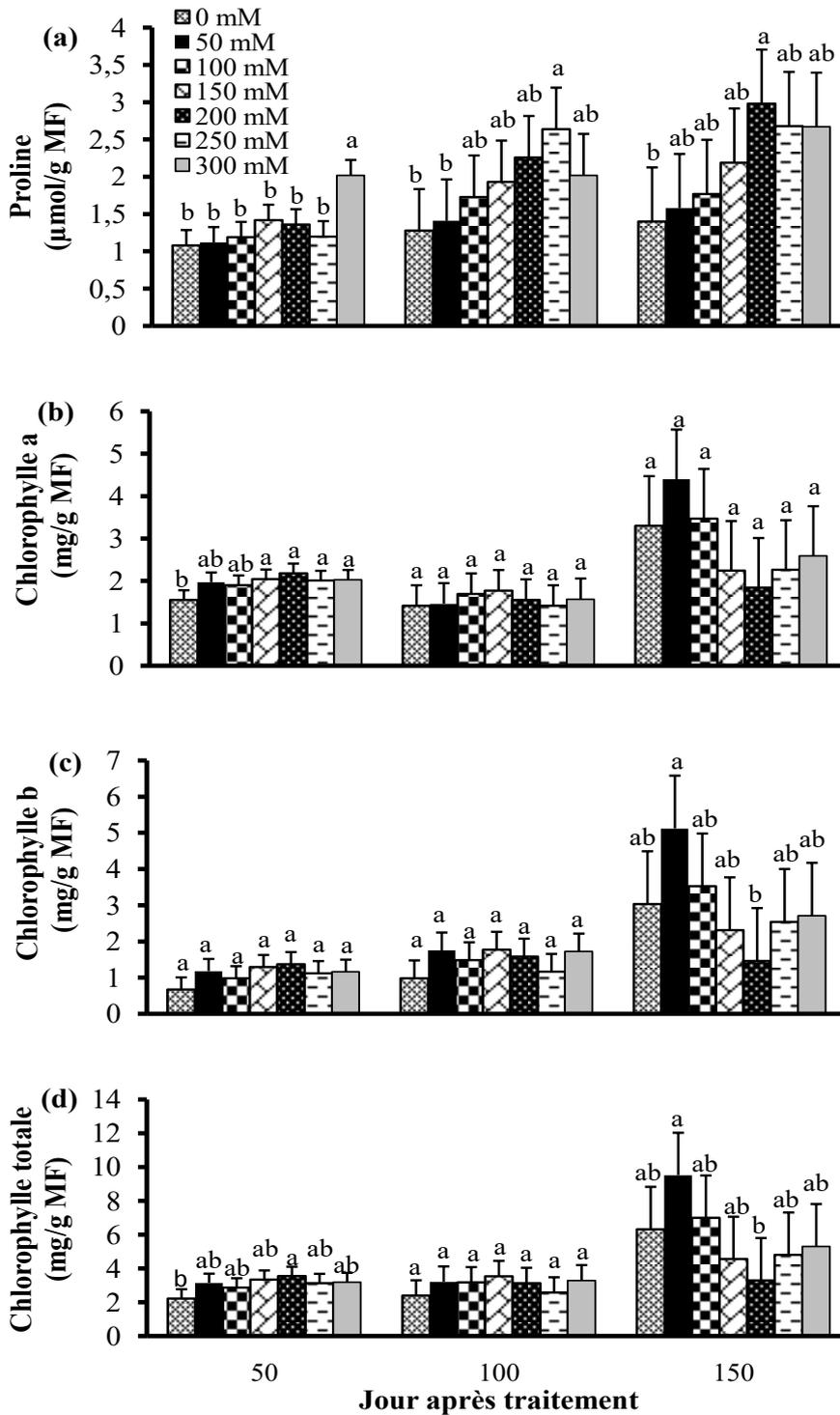


Figure 16. Effet de la concentration en NaCl sur les teneurs en proline (a), chlorophylle a (b), chlorophylle b (c) et chlorophylle totale (d) de *S. robustus* à 50, 100 et 150 jours de traitement. MF, matière fraîche. Pour chaque période de récolte, les valeurs (moyennes de 4 mesures) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD (5%).

Nos résultats ont montré que le Na des parties aérienne et racinaire a augmenté proportionnellement avec la salinité à 150 jours (Figure 17). Les fortes teneurs en Na ont été enregistrées dans les parties aériennes comparées aux parties racinaires. La salinité tend à diminuer les teneurs en K des parties aériennes. Par contre, les teneurs en K des parties racinaires ne sont pas affectées par la salinité. Le rapport K/Na a significativement diminué pour tous les traitements de NaCl comparés aux témoins non soumis aux stress salin (Figure 17).

3.3.3. Corrélation entre les paramètres mesurés

Les concentrations de NaCl ont été positivement corrélées avec les teneurs en proline et Na des parties aérienne et racinaire (Tableau 7). Par contre, les concentrations de NaCl ont été inversement corrélés au poids sec total, à l'indice de tolérance au sel, aux teneurs en K et au ratio K/Na. Une corrélation positive a été observée entre les teneurs en proline et l'accumulation de Na dans les parties aérienne et racinaire. Par contre, les teneurs en proline ont été négativement corrélées aux teneurs en K et au ratio K/Na. Les plants de *S. robustus* n'ont montré aucune corrélation entre les teneurs en chlorophylle et les autres paramètres mesurés. Des corrélations négatives ont été notées entre les teneurs en Na et K des parties aériennes et entre Na et le ratio K/Na des parties aérienne et racinaire.

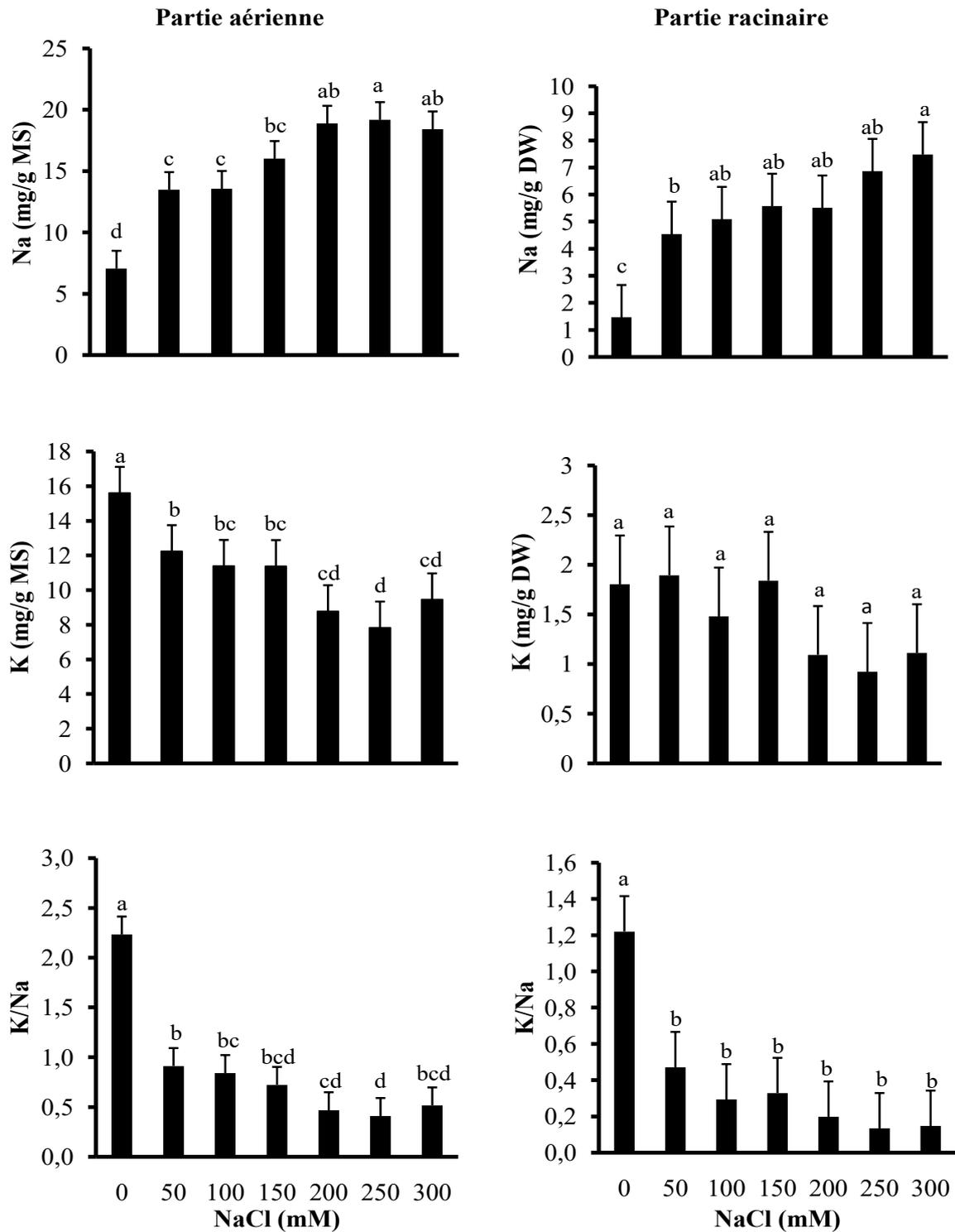


Figure 17. Effet de la concentration en NaCl sur les teneurs en Na et K et sur le ratio K/Na des parties aériennes et racinaires de *S. robustus* à 150 jours. MS, matière sèche. Les valeurs (moyennes de 4 mesures) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD (5%).

Tableau 7. Corrélation entre les paramètres mesurés.

Variable	PST	ITS	Proline	Chl. total	Na-PA	Na-R	K-PA	K-R	K/Na-PA	K/Na-R
NaCl	-0.99***	-0.97***	0.96***	-0.43 ^{ns}	0.90**	0.91**	-0.88**	-0.83*	-0.79*	-0.80*
PST		0.99***	-0.94**	0.37 ^{ns}	-0.91	-0.92**	0.91**	0.87*	0.82*	0.83*
ITS			-0.93**	0.36 ^{ns}	-0.91**	-0.93**	0.92**	0.87*	0.82*	0.83*
Proline				-0.56 ^{ns}	0.92**	0.85*	-0.90**	-0.84*	-0.79*	-0.78*
Chl.total					-0.27 ^{ns}	-0.10 ^{ns}	0.30 ^{ns}	0.55 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.03 ^{ns}
Na-PA						0.93**	-0.97***	-0.74 ^{ns}	-0.96**	-0.94**
Na-R							-0.90**	-0.68 ^{ns}	-0.93**	-0.94**
K-PA								0.84*	0.93**	0.92**
K-R									0.61 ^{ns}	0.63 ^{ns}
K/Na-PA										0.99***

‘***’ P < 0,001 ; ‘**’ P < 0,01 ; ‘*’ P < 0,05 ; ‘NS’ P > 0, 5.

3.4. DISCUSSION

Les plantes halophytes sont capables de survivre et de boucler leur cycle de vie à des teneurs en NaCl autour de 200 mM et parfois plus (Flowers et Colmer 2008). Ces plantes accumulent les ions Na⁺ et Cl⁻ dans les vacuoles pour maintenir la pression de turgescence et synthétisent des solutés compatibles tels que la proline pour maintenir le potentiel osmotique dans le cytoplasme. Les plantes halophytes peuvent être classées en halophytes obligatoires dont la production de biomasse est stimulée par la présence de sel, et en halophytes facultatives qui présentent une légère augmentation de biomasse à des teneurs faibles en sels (Rogers et al., 2005).

Dans notre étude, une diminution significative du poids sec des plants de *S. robustus* a été observée avec l'augmentation des concentrations en NaCl. La croissance optimale de *S. robustus* a été obtenue entre 0 et 150 mM de NaCl à 150 jours. Parallèlement, l'indice de tolérance au sel a diminué progressivement avec la salinité. Toutefois dans les écosystèmes naturels, *S. robustus* est capable de survivre à des salinités élevées d'environ 300 mM (données non présentées). Par conséquent, *S. robustus* pourrait être considérée comme une espèce végétale appartenant au groupe des halophytes facultatives qui ne présentent pas de besoin physiologique par rapport à la salinité, mais peuvent tolérer une certaine gamme de salinité sans réduction significative de la biomasse (Sleimi et al., 2015). Les mesures des niveaux de tolérance à la salinité ont été reportées chez plusieurs espèces de *Sporobolus*. Hameed et al. (2013) ont montré une augmentation significative du poids sec des racines de *S. arabicus* jusqu'à 100 et 150 mM de NaCl. La croissance optimale de *S. virginicus* a été observée entre 100 et 150 mM de NaCl (Bell et O'Leary, 2003). La croissance de *S. ioclados* a diminué progressivement entre 0 et 500 mM avec de fortes mortalités à 500 mM de NaCl (Gulzar et al., 2005).

Les teneurs en proline de *S. robustus* ont été plus élevées à des concentrations de NaCl comprises entre 200 et 300 mM pour les trois périodes de récoltes. Ainsi, une corrélation positive a été observée entre l'accumulation de proline et de Na dans les plants de *S. robustus* soumis aux stress salin. Des résultats similaires ont été rapportés par Khedr et al. (2003) et Naidoo et al. (2008) sur d'autres graminées (*Pancratium maritimum* et *Odysea paucinervis*). La forte accumulation de proline dans les parties aériennes de *S. robustus* pourrait constituer l'une des principales stratégies dans l'adaptation de cette plante à la salinité. La proline est un osmolyte organique jouant un important rôle dans la tolérance au sel des plantes (Fleurs et

Colmers, 2008). L'augmentation des teneurs en proline en condition de stress abiotique permet d'ajuster le potentiel osmotique des cellules pour contrecarrer celui du sol (Shafi et al., 2011; Flowers et Colmer, 2008).

Les teneurs en chlorophylle a et chlorophylle totale de *S. robustus* ont augmenté à 50 jours de traitement. Par contre, aucune variation des teneurs en chlorophylle a, chlorophylle b et chlorophylle totale n'a été observée avec la salinité à 100 et 150 jours de traitement. La teneur en chlorophylle est fondamental pour comprendre la réponse des plantes à l'environnement dans lequel elles résident (Demiroğlu et al., 2001). Elle est considérée comme l'un des critères permettant de détecter la sensibilité au stress salin de la plupart des plantes (Kanwal et al., 2011). Sous une contrainte saline, l'accumulation de certains ions toxiques cause des dommages sur la machinerie photosynthétique et par conséquent, diminue le taux de carbone assimilable et la production de biomasse (Kanwal et al., 2011). Ces auteurs ont montré de fortes teneurs en chlorophylle chez plusieurs variétés de blé en réponse à leur tolérance à la salinité. Akça et Samsunlu (2012) ont montré, sous stress salin, une diminution de la teneur en chlorophylle chez les plantes sensibles, comparées aux plantes tolérantes.

Les teneurs en Na des parties aériennes et racinaires ont augmenté avec la salinité. L'augmentation du Na avec la salinité chez *S. robustus* a été accompagnée par une diminution de K des parties aériennes. La diminution de l'absorption de K peut être liée à une compétition entre K et Na au niveau des transporteurs membranaires (Silva et al., 2015). Ces auteurs ont rapporté que *Jatropha curcas* avait des concentrations en Na plus importantes comparées au K, suggérant ainsi que cette plante serait de type "includer". D'autres auteurs ont montré une augmentation de la teneur en Na chez *S. virginicus* et *Heleochloa setulosa* (Tawfik et al., 2011 ; Joshi et al., 2002). Nos résultats ont montré une diminution du rapport K/Na avec la salinité. La tolérance des plantes à la salinité est souvent accompagnée par des valeurs élevées de K/Na ((Flowers et Colmers, 2008). Toutefois, un ratio K/Na adéquat devrait être supérieur à 1 pour constituer un bon indicateur de tolérance des plantes adaptées au stress salin (Siva et al., 2015). Chez *S. robustus*, tous les traitements de NaCl ont eu des valeurs de K/Na inférieures à 1 aussi bien au niveau des parties aériennes que racinaires. Ces résultats suggèrent que le ratio K/Na ne peut pas être utilisé comme un indicateur de tolérance à la salinité pour *S. robustus*. Ces résultats corroborent ceux de Saleh (2011) et Silva et al. (2015) qui ont respectivement montré que le ratio K/Na des parties aériennes du coton et de *Jatropha curcas* diminue avec la salinité. Par contre, Hameed et al. (2013) ont trouvé chez

une variété tolérante de *S. arabicus*, contrairement à la variété sensible, de fortes concentrations foliaires en K et de faible teneur en Na, traduisant ainsi un ratio K/Na élevé.

3.5. CONCLUSION

Cette étude a montré que *S. robustus* est tolérant à la salinité et que son optimum de croissance est compris entre 0 et 150 mM de NaCl à 150 jours. *S. robustus* est une plante halophyte facultative.

La capacité de *S. robustus* à s'adapter au stress salin était principalement liée à sa capacité à accumuler des ions Na entre 50 et 150 mM et de fortes teneurs de proline dans ses parties aériennes. A 50 jours de traitement, les teneurs en chlorophylle a et chlorophylle totale ont significativement augmenté avec la salinité. A 100 et 150 jours de traitement, les teneurs en chlorophylle sont similaires pour toutes les concentrations de NaCl. L'indice de tolérance au sel et le ratio K/Na ne sont pas apparus comme de bons indicateurs de tolérance au sel chez *S. robustus*. Toutefois, la capacité de *S. robustus* à accumuler des quantités importantes de Na pourrait faire de cette halophyte un outil précieux de désalinisation des sols, ce qui faciliterait l'établissement de légumineuses (*P. juliflora* et *A. seyal*) dans les sols salés du Sine et Saloum au Sénégal.

Par ailleurs, *S. robustus* pourrait partager avec *A. seyal* et *P. juliflora* une communauté de rhizobia adaptée à la salinité et potentiellement bénéfique aux légumineuses. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la diversité des rhizobia de la rhizosphère de *S. robustus* et des 2 légumineuses le long d'un gradient de salinité. Toutefois, *A. seyal* étant absent à certains niveaux de salinité du fait de sa sensibilité aux sels, l'étude de la diversité des rhizobia a été effectué que sur *P. juliflora* dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Diversité des rhizobia associés à la rhizosphère de *Sporobolus robustus* Kunth et *Prosopis juliflora* (SW) DC le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide

4.1. INTRODUCTION

La salinisation des terres dans le Sine-Saloum est devenue très préoccupante à cause de l'intrusion de l'eau de mer et de la remontée des sels par capillarité consécutivement au déficit hydrique (Boivin et Le Brusq, 1985). Elle a pour conséquences une diminution des rendements des cultures, et parfois la disparition du couvert végétal naturel remplacé par d'immenses étendues de zones salées (ou tannes) (Boivin et Job, 1988). L'utilisation d'espèces de légumineuses ligneuses à usages multiples, modérément tolérantes au sel, telle que *Prosopis juliflora*, a été recommandée comme une approche intégrée de gestion appropriée des terres salées (Öztürk et al., 2006; Qadir et Oster, 2002; Singh, 2009). *Prosopis juliflora* (SW) DC est une légumineuse très appréciée par les populations rurales comme source de fourrage et de bois. C'est une espèce forestière d'une importance majeure pour le reboisement dans les zones aride et semi-aride du fait principalement de sa capacité à s'établir naturellement sur des sols pauvres et dégradés. La capacité de *P. juliflora* à croître dans ces zones salées serait en partie liée à son aptitude à s'associer avec des bactéries fixatrices d'azote (Diouf et al., 2007; Manga et al., 2007). En effet, la symbiose fixatrice d'azote légumineuse-rhizobium joue un rôle très important dans la fertilisation des sols et l'adaptation des plantes à certains stress environnementaux notamment la salinité. Kang et al. (1985) et Wilson et al. (1986) ont affirmé que le principal avantage de l'utilisation des arbres fixateurs d'azote pour améliorer la fertilité des sols en agroforesterie résulte de leur aptitude à fixer de l'azote atmosphérique. L'efficacité de la fixation biologique de l'azote chez les légumineuses peut être optimisée par l'inoculation des plantes avec des souches de rhizobia performantes (Sutherland et al., 2000 ; Requena et al., 2001; Diouf et al., 2005 ; Shamseldin et Werner, 2005).

Dans la zone d'étude où la salinité est la contrainte majeure de la végétation ligneuse, les peuplements de *P. juliflora* se développent sur un tapis de *Sporobolus robustus*, une graminée halophyte pérenne dominant la strate herbacée. Des jeunes plants de la légumineuse émergent souvent des touffes de la graminée. La graminée halophyte pourrait créer un

microenvironnement tellurique favorable à l'établissement des jeunes plants de *P. juliflora*. En effet, elle pourrait réduire les impacts négatifs du sel, maintenir des populations de rhizobia et ainsi améliorer le développement des jeunes plants de *P. juliflora* en milieu salé. On sait par ailleurs que de nombreuses graminées hébergent presque toujours dans leur rhizosphère d'importantes communautés bactériennes en particulier des bactéries fixatrices d'azote libres ou symbiotiques utiles au développement des légumineuses (Dommergues et al., 1999). On peut les qualifier de plantes facilitatrices dans la mesure où elles stimulent la microflore bactérienne et protègent les jeunes plants contre des stress d'origine abiotique (Manaut et al., 2015). Les communautés bactériennes se nourrissent et se multiplient en partie grâce aux rhizodépôts (ex. acides organiques, sucres, hormones, enzymes) fournis par les racines (Haldar et Sengupta, 2015). Il existe une grande variabilité des communautés bactériennes dans la rhizosphère qui dépend des plantes (ex. espèces, génotypes) et des conditions pédoclimatiques.

Dans le cadre de notre étude, nous suggérons que la graminée *S. robustus* maintiendrait dans sa rhizosphère des communautés de rhizobia en nombre et en espèce favorables à l'établissement et au fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote chez de jeunes plants de *P. juliflora* en milieu salé. Pour évaluer l'effet « nurse » de *S. robustus*, il était important d'une part de dénombrer et d'identifier les rhizobia de sa rhizosphère le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide et, d'autre part, d'évaluer leurs propriétés symbiotiques sur de jeunes plants de *P. juliflora*.

Mohamed et al. (2000) ont signalé que la caractérisation de la diversité phénotypique génétique, et symbiotique des populations de rhizobia indigènes est essentielle pour identifier et sélectionner des souches efficaces et adaptées aux conditions édapho-climatiques. Il semblerait que la diversité des rhizobia soit d'une grande importance dans la stabilité du fonctionnement des écosystèmes en fournissant un pool génétique diversifié de souches qui donne à la plante une meilleure résistance aux contraintes environnementales (Mohamed et al., 2000). La caractérisation phénotypique des différentes souches permettra de mettre en évidence l'étendue des variations phénotypiques qui existent entre les souches mais aussi d'exploiter ces variations pour la sélection de candidats pouvant maintenir une capacité supérieure de fixation d'azote sous les variations des facteurs du milieu qui varient en fonction des saisons (sèche et humide) et du gradient de salinité. Ces variations peuvent influencer la diversité des rhizobia. Ainsi, il serait important de déterminer l'impact des saisons sur la diversité des rhizobia de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora*. L'analyse

de l'ADNr 16S est devenue, depuis le début des années 1990, la technique la plus utilisée pour la phylogénie des bactéries et des autres organismes du vivant (Olsen, 1994). Plusieurs autres gènes sont utilisés en phylogénie notamment ceux qui interviennent dans la nodulation, la spécificité d'hôtes et la fixation d'azote. Il s'agit notamment des gènes *nod* communs (ex. *nodA*, *nodB*) qui codent pour la production de facteurs Nod intervenant dans la reconnaissance des deux partenaires, des gènes *nod* spécifiques (ex. *nodZ*, *nodK*) qui interviennent dans la spécificité de la symbiose et des gènes de fixation d'azote (ex. gène *nif*) (Perret et al., 2000). L'utilisation des gènes de ménage est nécessaire pour parfois analyser plus finement le degré de parenté entre des groupes de bactéries et définir de nouvelles espèces bactériennes (Gaunt et al., 2001). Il s'agit notamment des gènes *atpD*, *glnA*, *gyrB* et *recA*.

Les objectifs de cette étude étaient (i) d'étudier la diversité des rhizobia se développant dans la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* et hors du couvert végétal suivant un gradient de salinité et des saisons ; (ii) de déterminer les caractéristiques phénotypiques des rhizobia (tolérance à la salinité, aux variations de pH et aux antibiotiques) et (iii) de déterminer leurs caractéristiques symbiotiques sur les plantes hôtes, *Acacia seyal* et *P. juliflora*. *A. seyal* coexiste avec *P. juliflora* dans la zone d'étude et a servi de plante piège dans ce travail.

4.2. MATERIEL ET METHODES

4.2.1. Echantillonnage de sols

Dans chacune des parcelles élémentaires (Figure 18), des échantillonnages de sols de la rhizosphère de trois individus de *P. juliflora* et *S. robustus* ont été réalisés en saison sèche (juin 2014) et en saison humide (août 2014). Du sol hors du couvert végétal a également été prélevé. Les sols ont été prélevés (environ 2 kg/prélèvement) à l'horizon 0-20 cm à l'aide d'une tarière. Ils ont ensuite été tamisés (3 mm de maille) et leurs caractéristiques physico-chimiques ont été déterminées au LAMA. Ainsi, chaque parcelle élémentaire a été affectée d'une valeur de salinité (‰) qui représente la moyenne des échantillons de sols sous *P. juliflora*, *S. robustus* et hors du couvert végétal (Figure 18). Les valeurs de salinités sur la figure 1 correspondent ainsi au gradient de salinité du site d'étude en saisons sèche et humide. Une partie des échantillons de sols a servi à la détermination du potentiel infectieux rhizobien et aux piégeages des rhizobia en conditions contrôlées.

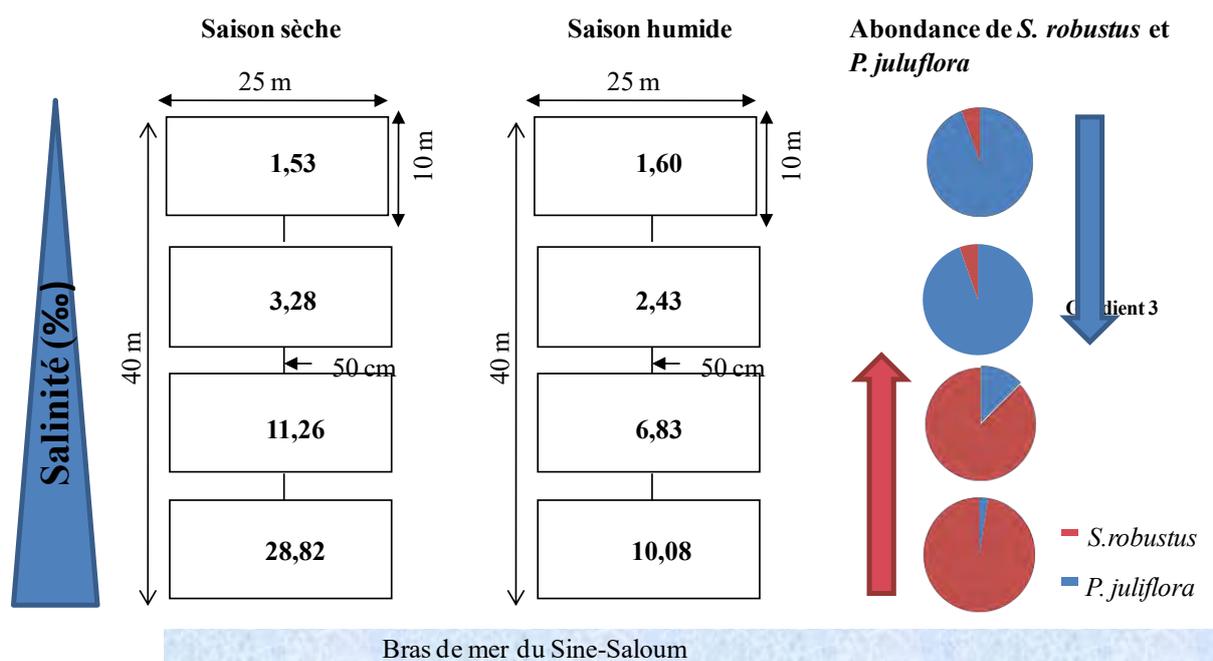


Figure 18. Gradient de salinité du site d'étude de Niam-Diarokh en saisons sèche et humide.

4.2.2. Estimation du potentiel infectieux rhizobien des sols

Le potentiel infectieux rhizobien de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora*, et hors du couvert végétal, le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide, a été estimé en tube Gibson (Gibson, 1963). Les légumineuses *P. juliflora* et *A. seyal* ont servi de plantes pièges. *A. seyal* est une légumineuse qui coexiste avec *P. juliflora* dans la zone d'étude. Les graines de *A. seyal* et *P. juliflora*, provenant de la zone salée de Foundiougne, ont été scarifiées avec de l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4 , 96%), rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile puis mises à germer dans de l'eau gélosée (0,9 % ; p/v) à 37°C pendant 48 h à l'obscurité. Les graines pré-germées ont été transférées dans les tubes Gibson et maintenues en chambre de culture pendant 45 jours avec une photopériode de 16h (jour) et 8h (nuit), une température de $28 \pm 1^\circ C$, une humidité relative de $70 \pm 5\%$ et un rayonnement photosynthétique actif de $120 \mu mol m^2 s^{-1}$. Le nombre de rhizobia capable de former des nodosités avec *P. juliflora* et *A. seyal* a été dénombré selon la méthode décrite par Brockwell (1980).

4.2.3. Piégeage des rhizobia

Des piégeages de rhizobia ont été réalisés comme décrit ci-dessus. Des graines pré-germées de *A. seyal* et *P. juliflora* et repiquées en tube Gibson ont été inoculées avec 1 ml de

suspension de sol obtenue en agitant, pendant 1h, 10 g de chaque échantillon de sol dans 90 ml de solution saline tamponnée stérile à pH 7 (NaCl, 0,15 mol.l⁻¹; KH₂PO₄, 0.002 mol.l⁻¹; Na₂HPO₄, 0.004 mol.l⁻¹). Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon de sol. Les plants non inoculés ont été utilisés comme témoin. La nodulation des plantes a été suivie pendant deux mois.

4.2.4. Isolement des rhizobia

Deux mois après l'inoculation, les nodosités récoltées ont été désinfectées superficiellement avec une solution de peroxyde d'hydrogène 30 % puis rincées avec de l'eau distillée stérile. Chaque nodosité a été écrasée dans un volume de 150 µl de milieu YM (Vincent, 1970) à 20% de glycérol préalablement stérilisé. Une goutte (environ 50 µl) de broyat a été étalée sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture YMA. Au bout de 48 à 72h d'incubation à 28°C, les colonies bactériennes apparues ont été purifiées par des repiquages successifs sur milieu YMA. Une colonie de chaque isolat purifié a été suspendue dans 20 ml d'eau stérile. Ces suspensions bactériennes ont servi de matrice pour la caractérisation moléculaire, par PCR, des rhizobia.

4.2.5. Diversité génétique des rhizobia

Les souches de rhizobia utilisées pour cette étude ont été isolées de sols rhizosphériques de *S. robustus* et *P. juliflora* et de sols hors du couvert végétal. Ces échantillons de sols ont été prélevés le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide.

4.2.5.1. Amplification par PCR et séquençage de l'espace intergénique 16S-23S de l'ADNr des rhizobia

L'espace intergénique de la région 16S-23S ADNr des rhizobia isolés a été amplifiée en utilisant les amorces front et reverse : BR5 ; 5'-CTTG TAGCTCAGTTGGTTAG-3' (Willems et al., 2001) et 23S-38 ; 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3' (Normand et al., 1992). Les réactions d'amplification PCR ont été réalisées avec le kit Go-Taq DNA polymérase (Promega) dans un volume de 25 µl. Chaque réaction comprenait 5 µl de tampon (5X Green Go-Taq Reaction Buffer), 2 µl de dNTPs (10 mM de chaque dNTP), 0,125 µl de Go-Taq DNA polymérase (2,5 Unité/réaction), 1 µl de chaque amorce (front et reverse) (20 pmol/µl) et 14 µl d'eau distillée. Un témoin négatif sans ADN a été inclus dans l'expérience pour servir de contrôle de la PCR. L'amplification a été réalisée grâce à un thermocycleur GeneAmp PCR

System 2400 (Perkin Elmer) selon le programme suivant: dénaturation initiale (94°C, 5 min), suivie de 35 cycles de dénaturation (94°C, 30 s), d'hybridation des amorces (55°C, 30 s) et d'élongation (72°C, 1 min) et une élongation finale (72°C, 7 min). Les produits PCR ont été visualisés par électrophorèse horizontale sur un gel d'agarose de 1% (p/v) dans un tampon TAE (Tris Acetate EDTA) 1X, puis photographiés sous lumière UV. Le gel a été coloré avec du BET (1 mg ml⁻¹). Le marqueur de taille standard d'ADN (Eurogentec Smart ladder) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le séquençage partiel de la région ITS a été réalisé par la société Genoscreen (Lille, France) sur un séquenceur Applied Biosystems ABI3730 en utilisant l'amorce front BR5 (Willems et al., 2001). Les séquences obtenues ont été comparées à des séquences de référence dans GenBank en utilisant le programme BLASTN (Altschul et al., 1990). Elles ont été alignées par le logiciel Clustal W (Thompson et al., 1997). Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance et la méthode *neighbor-joining* (Saitou et Nei, 1987) avec le logiciel MEGA6 (Tamura et al., 2013). Les arbres ont été enracinés avec *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii*.

4.2.5.2. Amplification par PCR et séquençage de différents marqueurs taxonomiques

Des fragments d'ADNr 16S et de cinq (04) gènes de ménage *atpD*, *glnA*, *gyrB* et *recA* des rhizobia ont été amplifiés et séquencés. Les réactions d'amplification PCR ont été réalisées avec le kit Go-Taq DNA polymérase (Promega) comme décrit précédemment. Les différentes amorces et programmes PCR utilisés sont décrits dans le Tableau 8. Les produits PCR ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1% (p/v) dans un tampon TAE (Tris Acetate EDTA) 1X, puis photographiés sous lumière UV. Ils ont par la suite été séquencés par la société Genoscreen (Lille, France). Les gènes 16S, *atpD*, *glnA*, *gyrB* et *recA* ont été séquencés respectivement avec les amorces 16S-1080r, *atpD*-F, *glnA*-F, *gyrB*-F et *recA*-F. Une phylogénie bayésienne a également été produite à partir du concaténât des alignements des différents gènes étudiés. Un arbre concaténé à partir de l'approche bayésienne a été obtenu avec le logiciel MEGA6.

Tableau 8. Amorces et programmes PCR utilisés pour le gène 16S et les gènes de ménage.

Gènes	Amorces	Séquences dans le sens 5'-3'	Taille (pb)	Référence	Dénaturation initiale	Cycle	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Elongation finale
16S rDNA	FGPS6 FGPS1509	GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG AAGGAGGGGATCCAGCCGCA	1500	Normad et al., 1992	94°C, 5 min	35	94°C, 30 s	56°C, 30s	72°C, 90 s	72°C, 10 min
atpD	atpD-F atpD-R	ATCGGCGAGCCGGTCGACGA GCCGACACTTCCGAACCNGCCTG	470	Gaunt et al., 2001	95°C, 2 min	30	95°C, 30 s	60°C, 30s	68°C, 2 min	68°C, 7 min
glnA	glynA-F glynA-R	GGACATGCGYTCYGARATGC TGGAKCTTGTTCTTGATGCCG	530	Martens et al., 2007	94°C, 2 min	30	94°C, 45 s	55°C, 90s	68°C, 2 min	68°C, 7 min
gyrB	gyrB-F gyrB-R	TGCTGCTCACCTTCTTCTTCCG CCYTTGTAGCGCTGCATGGT	695	Alexandre et al., 2008	95°C, 2 min	30	95°C, 30 s	55°C, 60s	68°C, 60 s	68°C, 5 min
recA	recA-F recA-R	ATCGAGCGGTCGTTTCGGCAAGGG TTGCGCAGCGCCTGGCTCAT	440	Gaunt et al., 2001	94°C, 5 min	35	94°C, 30 s	56°C, 30s	72°C, 45 s	72°C, 7 min

4.2.6. Diversité symbiotique des rhizobia

Les gènes symbiotiques *nodA* (putative acyltransferase), *nodC* (N- acetylglucosaminyl transferase) et *nifH* (nitrogenase dehydrogenase) des rhizobia représentatifs de la diversité génétique observée ont été identifiés par séquençage.

Les amorces NodA1F ; 5'-TGC-RGT-GGA-ARN-TRB-VYT-GGG-AAA-3' et NodAB1R ; 5'- GGN-CCG-TCR-TCR-AAW-GTC-ARG-TA-3' (Sy et al., 2001) ont été utilisées pour l'amplification de 550 à 600 pb du gène *nodA* dans un volume de 25 µl. Une "touchdown" PCR a été réalisée en utilisant les conditions suivantes: une étape de dénaturation initiale (94°C, 5 min) suivie de 20 cycles de dénaturation (94°C, 30 s), d'hybridation des amorces (à partir de 60°C jusqu'à 50°C, 30 s) et d'élongation (72°C, 42 s), suivie par 22 cycles de dénaturation (94°C, 30 s), d'hybridation des amorces (50°C, 30 s), d'élongation (72°C, 42 s) et une élongation finale (72°C, 7 min).

Les amorces nodC538F ; 5'-ATY-GAY-ATG-GAR-TAY-TGG-CT-3' et nodC3R ; 5'-CGH-GAC-AGC-CAR-TCG-CTR-TTG-3' (modifiées de Sarita et al., 2005) ont été utilisées pour l'amplification de 600 pb des 1300 pb du gène *nodC* dans un volume de 25 µl (comme décrit précédemment). Le programme d'amplification de l'ADN a été réalisé selon les étapes suivantes : dénaturation initiale (95°C, 3 min), suivie de 35 cycles de dénaturation (94°C, 1 min), d'hybridation des amorces (55°C, 1 min) et d'élongation (72°C, 2 min) et une élongation finale (72°C, 3 min) (Laguerre et al., 1994).

Environ 371 pb du gène *nifH* ont été amplifiées en utilisant les amorces MPolF1; 5'-TGCGAICCSAAIGCIGACTC-3' et MPolR; 5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3' (Wartiainen et al., 2008 ; Poly et al., 2001). L'amplification par PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel de 25 µl (comme décrit précédemment) et a été effectuée comme suit: dénaturation initiale (94°C, 5 min), suivie de 35 cycles (94°C, 30 s), d'hybridation des amorces (55°C, 30 s) et d'élongation (72°C, 30 s) et une élongation finale (72°C, 7 min).

Les produits PCR ont été envoyés pour séquençage à Genoscreen (Lille, France). Les gènes *nodA*, *nodC* et *nifH* ont été séquencés respectivement avec les amorces NodAB1R, nodC538F et MPolF1. Les séquences ont été assemblées, alignées et les arbres phylogénétiques ont été construits avec le logiciel MEGA version 6 selon la méthode décrite ci-dessus. Les arbres ont été enracinés avec *Bradyrhizobium japonicum* et *Bradyrhizobium elkanii*.

4.2.7. Diversité phénotypique des rhizobia

La résistance des rhizobia à différents antibiotiques (ampicilline, chloramphénicol, rifampicine, streptomycine, kanamycine et tétracycline) a été testée sur le milieu YMA. Les solutions d'antibiotique ont été préparées avec de l'eau distillée stérile à des doses variables (10, 20 50 et 100 µg/ml). Les solutions d'antibiotique ont été stérilisées par filtration (0,2 µm) avant d'être ajoutées au milieu YMA. Les boîtes de Pétri contenant du milieu YMA ont été subdivisées en 20 secteurs. Chaque secteur a étéensemencé avec 10 µl d'une pré-culture bactérienne préparée sur milieu YM liquide et contenant environ 10⁸ cellules/ml. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque antibiotique et pour chaque souche. Les boîtes ont été mises en incubation à 28°C à l'obscurité pendant quatre jours.

Les souches de rhizobia ont été évaluées pour leur tolérance à la variation du pH après une semaine d'incubation à 28°C. L'expérience a été réalisée sur milieu YMA avec différents pH : 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10. Le test a été réalisé comme dans le cas précédent.

La capacité de croissance des rhizobia en condition de salinité a été déterminée sur des boîtes de Pétri contenant du milieu TY (Tryptone-yeast extract) solide avec des teneurs croissantes en NaCl : 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 et 900 mM. Le test a été réalisé comme dans le cas précédent. Les boîtes ont ensuite été mises en incubation à 28°C à l'obscurité pendant une semaine. La croissance des bactéries a été estimée par l'apparition de colonies.

4.2.8. Test d'infectivité et d'effectivité des rhizobia en condition de stress salin

Les rhizobia représentatifs de la diversité génétique, identifiés par séquençage de l'ADNr 16S-23S, ont été testés pour leur capacité à réinfecter les plantes d'*A. seyal* et *P. juliflora* en tube Gibson. Les tubes Gibson contenaient du milieu Jensen enrichi à différentes concentrations de NaCl (0, 50 et 100 mM). Pour les concentrations en 50 et 100 mM de NaCl, 7 souches ont été testées sur la base de leur niveau de tolérance contrasté au NaCl sur milieu YMA. La souche ORS3365 caractérisée par sa forte tolérance au NaCl a été utilisée comme référence dans cette étude. Les graines des légumineuses ont été pré-germinées et les plants cultivés en tube Gibson comme décrit précédemment (voir § 2.2.3). Les jeunes plants des deux légumineuses ont été inoculés séparément avec les rhizobia. L'inoculation a été réalisée avec du milieu YM liquide contenant chacun une culture d'une souche de rhizobia. Les souches ont été au préalable cultivées dans des tubes Falcon à 28 °C pendant 48 h sur un agitateur orbital (200 rpm). Les plants ont été inoculés avec 1 ml de suspension bactérienne contenant environ 10⁸

cellules/ml, ou 1 ml du milieu de culture sans bactéries dans le cas des traitements témoins. Chaque traitement a été répété quatre fois. Au bout de deux mois après inoculation, un numéro d'identification « LCM » qui fait référence à la collection de culture du Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD de Dakar au Sénégal a été affecté aux rhizobia infectifs sur les plants de *A. seyal* et *P. juliflora* à 0 mM de NaCl. L'infectivité a été mesurée en comptant le nombre de nodosités par plant. L'effectivité a été estimée par la mesure de la biomasse produite. L'activité réductrice de l'acétylène (ARA) a été mesurée sur l'ensemble des souches testées dans les trois niveaux de NaCl.

4.2.9. Mesure de l'activité réductrice d'acétylène des rhizobia (ARA)

Les mesures de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) ont été effectuées selon Hardy et al. (1968) sur les nodosités fraîches en utilisant un chromatographe en phase gazeuse (GC Agilent série 6850 System) pour déterminer l'activité de la nitrogénase. La mesure de l'ARA donne une estimation ponctuelle de la fixation d'azote atmosphérique (Fisher et Binkley, 2000; Watt et al., 2003). Après deux mois de culture en tube Gibson contenant du milieu Jensen incliné, les plants ont été récoltés individuellement et placés dans des flacons en verre de 150 ml. Un volume d'air du bocal correspondant à 10 % (15 ml) a été prélevé et remplacé par 15 ml d'acétylène (C₂H₂). Chaque flacon contenait un mélange d'air et d'acétylène (9:1, v/v). Au bout de 3 heures d'incubation à 28°C, un volume de 1 ml du mélange de gaz a été prélevé à l'aide d'une seringue et injecté dans le chromatographe en phase gazeuse. On lit sur l'enregistreur l'aire occupé par l'éthylène. L'éthylène produit par heure correspond à :

Aire brute C₂H₄ – Aire résiduel C₂H₄/ temps d'incubation.

Les nodosités ont été retirées du flacon et comptées après analyse ARA. Les parties aériennes ont été séparées des systèmes racinaires. Les échantillons ont été séchés à 65°C pendant 72 h et pesés. L'activité spécifique de réduction d'acétylène (SARA) a été calculée comme le rapport entre l'ARA et la biomasse sèche des nodosités.

4.2.10. Analyses statistiques

Les données des caractéristiques chimiques des sols et du potentiel infectieux rhizobien ont été soumises à une analyse de variance ANOVA à deux facteurs. Les différences dans la structure des communautés de rhizobia entre les niveaux de salinité et les saisons ont été étudiées en évaluant et en comparant l'abondance relative, la diversité α et la diversité β . L'abondance relative des rhizobia est définie comme étant le nombre de génotypes

appartenant à une espèce particulière. La diversité α , c'est à dire la richesse en espèces au sein d'un écosystème, a été calculée conjointement à partir des indices de diversité de Shannon (1948), de l'indice d'équitabilité de Pielou (1966) et de l'indice de diversité de Simpson (1949). La diversité β , c'est-à-dire le degré de similarité des communautés de rhizobia entre les niveaux de salinité, a été calculée à partir de l'indice de Sørensen (C_s) selon la formule suivante : $C_s = 2c / (S_1 + S_2)$, où c représente le nombre d'espèces coexistant entre deux sites, S_1 représente le nombre total d'espèce dans un sol (S_1) et S_2 représente le nombre total d'espèce dans un sol (S_2).

Les données de biomasse totale, de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) et de l'activité réductrice d'acétylène spécifique (SARA) ont été soumises à un test ANOVA à un et deux facteurs. Pour tous les paramètres mesurés, les moyennes des valeurs ont été comparées avec le test de Newman-Keuls ($P < 0,05$). Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée afin de déterminer la corrélation entre la distribution des rhizobia et les paramètres chimiques des sols. Les analyses ANOVA et ACP ont été réalisées en utilisant le logiciel XLSTAT version 2010.

4.3. RESULTATS

4.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols

Les caractéristiques physiques des sols sous *S. robustus* et *P. juliflora* et des sols hors du couvert végétal, échantillonnés en juin 2013 dans le site de Niam-Diarokh sont représentés dans le Tableau 9. Les résultats ont montré qu'à l'exception des sols sous *P. juliflora* échantillonnés à un niveau de salinité de 28,82‰ qui sont de type limoneux fins, tous les sols échantillonnés le long du gradient de salinité sont de type sables fins.

L'analyse ANOVA à deux facteurs des caractéristiques chimiques des sols est représentée dans le Tableau 10. Les valeurs de salinité (‰) à chaque niveau de salinité représentent la moyenne des deux saisons (sèche et humide). Il s'agit de valeurs moyennes des sols sous *S. robustus*, *P. juliflora* et hors du couvert végétal. Les résultats ont montré que le pH des sols a été plus élevé en saison humide contrairement à la conductivité électrique (CEe), au N total, C total et N assimilable (assim.) qui ont été plus importantes en saison sèche. Les teneurs en P total et P assimilable des sols n'ont pas varié avec les saisons. Les valeurs de pH, conductivité électrique, P total et P assimilable ont augmenté avec la salinité. Par contre, le N assimilable n'a pas varié avec la salinité. Sous *S. robustus* et hors du couvert végétal, la conductivité

électrique des sols a été plus élevée que celle mesurée sous *P. juliflora*. Les valeurs de pH, P et N assimilable sont plus élevées hors du couvert végétal que dans les sols sous *Sporobolus* et *Prosopis*. Les sols sous *S. robustus* ont enregistré les valeurs de N total les plus élevées. Les valeurs de P et C total des sols n'ont pas varié quelle que soit la plante hôte.

Tableau 9. Composition physique des sols sous *S. robustus*, *P. juliflora* et hors du couvert végétal le long du gradient de salinité en saison sèche.

Salinité (‰)	Echantillon de sols	Argiles	Limons fins	Limons gros	Sables fins	Sables grossiers
1,53	Sous <i>S. robustus</i>	15,10	5,90	23,10	56,00	0,30
	Sous <i>P. juliflora</i>	14,20	10,60	25,30	48,90	0,40
	Hors couvert	14,6	7,80	24,80	49,6	0,30
3,28	Sous <i>S. robustus</i>	17,80	5,90	24,90	49,40	0,50
	Sous <i>P. juliflora</i>	11,60	12,50	24,00	46,90	0,40
	Hors couvert	23,00	8,40	21,60	44,80	0,40
11,26	Sous <i>S. robustus</i>	24,80	5,30	24,60	42,90	0,30
	Sous <i>P. juliflora</i>	16,10	14,60	26,40	35,10	0,80
	Hors couvert	12,90	8,70	23,90	50,90	0,30
28,82	Sous <i>S. robustus</i>	27,02	12,98	16,60	38,51	0,43
	Sous <i>P. juliflora</i>	9,20	45,70	9,20	33,40	2,00
	Hors couvert	32,40	8,60	16,50	35,20	4,50

Tableau 10. Quelques caractéristiques chimiques des sols de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* et hors du couvert végétal selon la salinité et la saison.

Facteurs testés	pH	CE	Salinité	P total	Passim.	N	N	C total
		mS/cm	‰	mg/kg	mg/kg	total	assim.	‰
Saison								
Sèche	7,33 ^b	8,75 ^a	11,22 ^a	161,53 ^a	10,75 ^a	3,11 ^a	6,46 ^a	1,39 ^a
Humide	7,75 ^a	17,88 ^b	5,24 ^b	151,22 ^a	10,08 ^a	0,10 ^b	1,24 ^b	1,28 ^b
Salinité (‰)								
1,56	6,85 ^d	2,74 ^c	1,56	116,11 ^c	5,16 ^c	0,10 ^b	4,27 ^a	1,14 ^c
2,85	7,31 ^c	5,13 ^c	2,85	125,90 ^c	8,33 ^{bc}	0,12 ^b	3,18 ^a	1,41 ^{ab}
9,05	7,78 ^b	15,02 ^b	9,05	164,22 ^b	9,66 ^b	6,12 ^a	3,94 ^a	1,51 ^a
19,45	8,21 ^a	30,38 ^a	19,45	219,27 ^a	18,50 ^a	0,10 ^b	4,01 ^a	1,27 ^{bc}
Sol								
Sous <i>S. robustus</i>	7,38 ^b	14,72 ^a	9,41 ^a	149,83 ^a	8,00 ^b	4,61 ^a	1,76 ^b	1,35 ^a
Sous <i>P. juliflora</i>	7,31 ^b	7,01 ^b	4,19 ^b	154,75 ^a	8,25 ^b	0,10 ^b	2,38 ^b	1,29 ^a
Hors couvert	7,92 ^a	18,22 ^a	11,09 ^a	164,55 ^a	15,00 ^a	0,11 ^b	7,41 ^a	1,37 ^a

CE : conductivité électrique des sols à 25°C ; P assim : P assimilable ; N assim : N assimilable. ANOVA à deux facteurs ; pour chaque colonne et pour chaque facteur, les données suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ($P < 0.05$).

4.3.2. Potentiel infectieux rhizobien des sols

Les variations saisonnières ont influencé le nombre de rhizobia (Tableau 11). En effet, en saison humide, le nombre de rhizobia a été 20 fois plus élevé qu'en saison sèche. La salinité représentant la moyenne des deux saisons, a affecté négativement le nombre de rhizobia des sols avec des MPN de $24,10 \cdot 10^2$ et $28,19 \cdot 10^2$ pour respectivement 19,45‰ et 9,05‰ de salinité. Toutefois, le MPN n'a pas varié avec la plante piège. Le couvert végétal (*Sporobolus* et *Prosopis*) a augmenté significativement le nombre de rhizobia des sols comparativement aux sols hors du couvert végétal.

Tableau 11. Impact des quatre facteurs (salinité, plante piège, saison et sol) sur le nombre le plus probable (MPN) de rhizobia des sols de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* et hors du couvert végétal.

Facteurs testés	Nombre de rhizobia/gramme de sol (MPN)	Intervalle de confiance (95%)
Saison		
Sèche	15,50 x 10 ²	(5,93 – 40,56) x 10 ²
Humide	332,12 x 10 ²	(127,10 – 869,25) x 10 ²
Plante piège		
<i>A. seyal</i>	180,90 x 10 ²	(69,23 – 473,46) x 10 ²
<i>P. juliflora</i>	166,72 x 10 ²	(63,80 – 436,35) x 10 ²
Salinité (%)		
1,56	353,47 x 10 ²	(135,27 – 925,13) x 10 ²
2,85	289,49 x 10 ²	(110,79 – 757,67) x 10 ²
9,05	28,19 x 10 ²	(10,78 – 73,78) x 10 ²
19,45	24,10 x 10 ²	(9,22 – 63,07) x 10 ²
Sol		
Sous <i>S. robustus</i>	294,18 x 10 ²	(112,58 – 769,95) x 10 ²
Sous <i>P. juliflora</i>	220,90 x 10 ²	(84,54 – 578,15) x 10 ²
Hors couvert	6,36 x 10 ²	(2,43 – 16,64) x 10 ²

Pour chaque facteur, les valeurs de MPN ont été comparées à partir des intervalles de confiance (95%).

4.3.3. Diversité génétique des rhizobia

Les résultats ont montré une diversité génétique élevée dans les populations de rhizobia isolées des sols sous *S. robustus*, *P. juliflora* et des sols hors du couvert végétal (Tableau 12). Toutefois, la diversité génétique des populations de rhizobia est structurée en fonction de la saison et du gradient de salinité.

4.3.3.1. Diversité génétique par analyse des profils ITS de l'espace intergénique 16S-23S de l'ADNr

Sur l'ensemble des 600 nodules traités pour toutes les saisons et plantes, nous avons obtenu une amplification de l'ADNr de 420 isolats de rhizobia. Le séquençage du gène codant pour l'ADNr 16S-23S de ces isolats a révélé quatorze (14) profils ITS distincts (Tableau 12). Les profils ITS s'apparentent aux genres *Ensifer* (Syn. *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*,

Rhizobium et *Burkholderia*. Le genre *Mesorhizobium* est majoritaire et représente 57% des souches isolées. *Rhizobium*, *Ensifer* et *Burkholderia* représentent respectivement 21%, 14% et 0,07% des souches isolées. Un numéro d'identification « LCM » qui fait référence à la collection de culture du Laboratoire Commun de Microbiologie a été affecté aux différents profils ITS. L'analyse de la répartition des 14 profils des ITS a montré une structuration de la diversité des rhizobia en de fonction des saisons (Tableau 12). Les profils II, III et X se retrouvent uniquement en saison sèche alors que les profils XI, XII, XIII et XIV n'étaient présents qu'en saison humide. Certains profils étaient présents quelle que soit la saison. Cependant, leur fréquence a varié d'une saison à une autre (Tableau 12).

Tableau 12. Profil ITS de l'espace intergénique 16S-23S de l'ADNr des isolats de rhizobia.

Profils ITS	Isolats de rhizobia	Position taxonomique proposée	Nombre d'isolats de rhizobia	
			Saison sèche	Saison humide
I	LCM4571	<i>Ensifer fredii</i>	14	49
II	LCM4572	<i>Burkholderia</i> sp	1	0
III	LCM4573	<i>Rhizobium pisi</i>	4	0
IV	LCM4574	<i>Mesorhizobium</i> sp	35	40
V	LCM4575	<i>Mesorhizobium</i> sp	20	37
VI	LCM4576	<i>Mesorhizobium</i> sp	5	2
VII	LCM4577	<i>Mesorhizobium</i> sp	3	7
VIII	LCM4578	<i>Mesorhizobium</i> sp	49	17
IX	LCM4579	<i>Ensifer fredii</i>	65	67
X	LCM4580	<i>Mesorhizobium</i> sp	2	0
XI	LCM4581	<i>Rhizobium</i> sp	0	2
XII	LCM4582	<i>Rhizobium</i> sp	0	1
XIII	LCM4583	<i>Mesorhizobium</i> sp	0	2
XIV	LCM4584	<i>Mesorhizobium</i> sp	0	1

4.3.3.1.1. Distribution des rhizobia en fonction de la composition chimique des sols de saison sèche

L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour déterminer les corrélations entre les isolats de rhizobia et les caractéristiques chimiques des sols (Figure 19) échantillonnés en saison sèche. Les Deux axes F1 et F2 ont expliqué près de 78% de la diversité des rhizobia obtenue. Les résultats ont montré une corrélation positive entre les souches du groupe A (LCM4571, LCM4573, LCM4579) et valeurs de conductivité électrique

(CE) et de teneurs en P et N. Ces souches ont été fortement liées au niveau de salinité de 28,82‰ contrairement aux souches du groupe C (LCM4574, LCM4575 et LCM4577) qui ont été fréquentes à 1,53‰ de salinité avec des valeurs de CE, pH, N et P faibles. Les souches du groupe B (LCM4576, LCM4578 et LCM4580) et la LCM4572 liées respectivement à 11,26‰ et 3,28‰ de salinité, ont occupé une position intermédiaire.

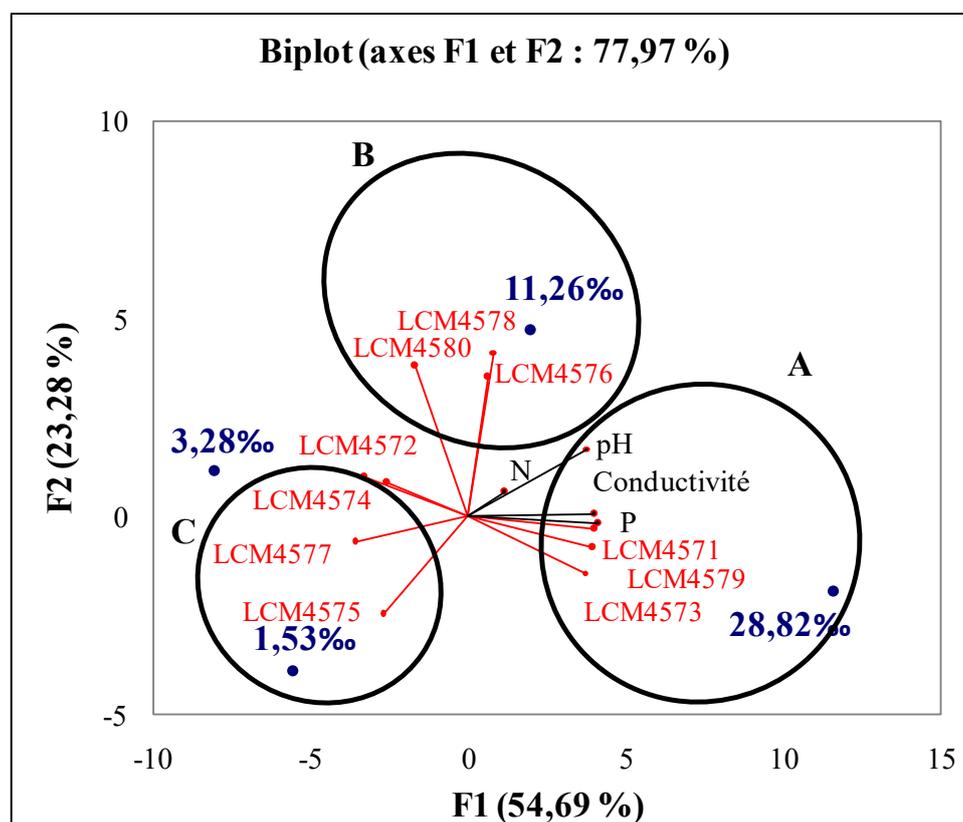


Figure 19. Représentation graphique de l'analyse en composantes principales (ACP) des effets combinés des caractéristiques chimiques des échantillons de sols prélevés sous *S. robustus*, *P. juliflora* et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité et des souches de rhizobia isolées dans ces sols en saison sèche.

4.3.3.1.2. Distribution des rhizobia en fonction de la composition chimique des sols de saison humide

En saison humide, les axes F1 et F2 ont expliqué plus de 82 % de la diversité génétique des rhizobia obtenue. La souche LCM 4571 a été plus fréquente à 10,08‰ de salinité. Elle a été positivement corrélée aux valeurs de CE, pH et P (Figure 20). La teneur en N a été négativement corrélée à la salinité du sol. Ainsi, les souches du groupe C (LCM4575, LCM4577, LCM4578, LCM4582 et LCM4584) associées aux plus fortes teneurs en N ont

été plus fréquentes au faible taux de salinité (1,60‰). Les souches du groupe B (LCM4574, LCM4576, LCM4579 et LCM4583) et la LCM4581 liées respectivement à 6,83‰ et 2,43‰ de salinité, ont occupé une position intermédiaire.

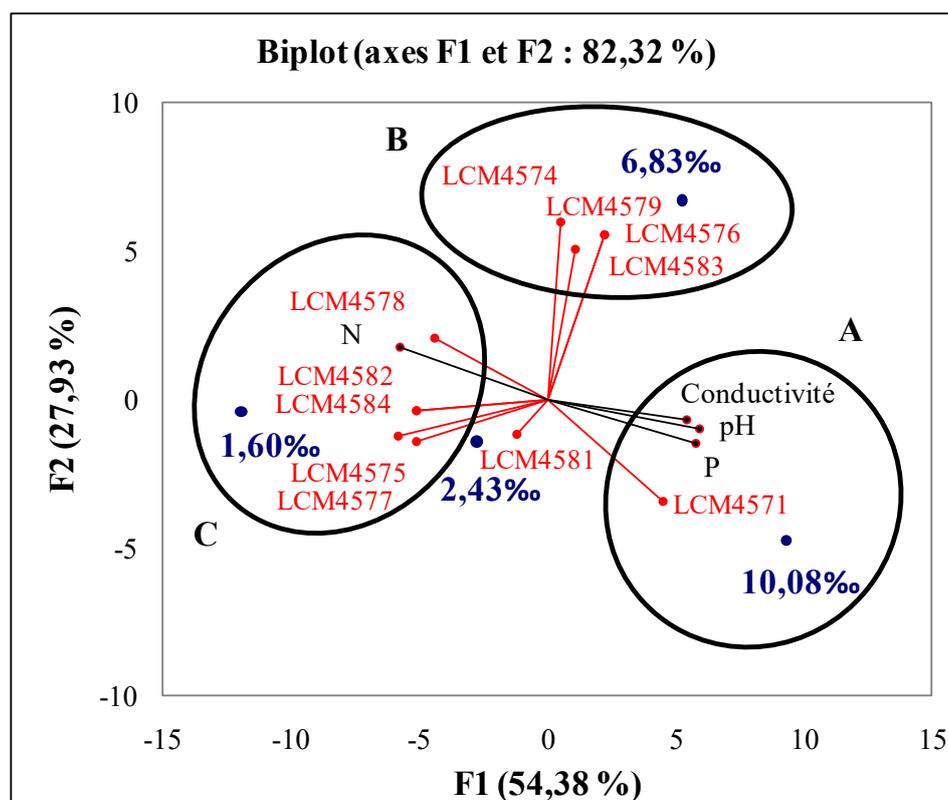


Figure 20. Représentation graphique de l'analyse en composantes principales (ACP) des effets combinés des caractéristiques chimiques des échantillons de sols prélevés sous *S. robustus*, *P. juliflora* et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité et des souches de rhizobia isolées dans ces sols en saison humide.

4.3.3.1.3. Répartition des rhizobia le long d'un gradient de salinité, en saison sèche

La répartition des rhizobia a varié en fonction du niveau de salinité et du couvert végétal. Le genre *Ensifer* représenté par les souches LCM4571 et LCM4579 a semblé plus adapté à la salinité avec des fréquences majoritaires à 28,82‰ de salinité (Figure 21). Ces deux souches ont été communes à *S. robustus* et *P. juliflora* à 28,82‰ et 11,26‰ de salinité. A 3,28‰, la souche de *Ensifer* LCM4579 a également été partagée entre *S. robustus* et *P. juliflora*, par contre à 1,53‰, elle a été présente uniquement sous *S. robustus*. La souche de *Ensifer* LCM4571 a été spécifique aux sols sous *P. juliflora* à 3,28‰. La souche de *Mesorhizobium* LCM4578 est apparue le long du gradient de salinité. A 1,53‰ et 3,28‰ de salinité, elle a été

partagée entre *S. robustus* et *P. juliflora*, par contre à des niveaux de salinité élevée (11,26‰ et 28,82‰), la LCM4578 a été présente uniquement sous *S. robustus*. Une autre souche de *Mesorhizobium* LCM4574 a été partagée entre *S. robustus* et *P. juliflora* à 1,53‰ et 3,28‰ de salinité. A 11,26‰, cette souche est apparue uniquement sous *P. juliflora*. La souche de *Mesorhizobium* LCM4580 n'a été retrouvée que sous *P. juliflora* à 3,28‰ alors qu'à un niveau de salinité plus élevé (11,26‰), elle est apparue seulement dans la rhizosphère de *S. robustus*. La souche de *Mesorhizobium* LCM4577 a été présente uniquement dans la rhizosphère de *S. robustus* à 1,53‰ et 3,28‰. Toujours pour le genre *Mesorhizobium*, la LCM4576 a été présente seulement dans la rhizosphère de *P. juliflora* à 11,26‰. Par contre, la LCM4575 a été partagée entre *S. robustus* et *P. juliflora* à 1,53‰. Les souches de *Burkholderia* LCM4572 et *Rhizobium* LCM4573 ont respectivement été présentes sous *P. juliflora* à 3,28‰ et 28,82‰ de salinité. 50% des souches de rhizobia identifiées en saison sèche ont été présentes hors du couvert végétal. Il s'agit des souches de *Mesorhizobium* (LCM4574, 4575 et 475), *Rhizobium* LCM4573 et *Ensifer* LCM4579.

En somme, 60% des souches identifiées en saison sèche ont été partagées entre *S. robustus* et *P. juliflora*. 30% des souches sont spécifiques à *P. juliflora* contre 10% pour *S. robustus*.

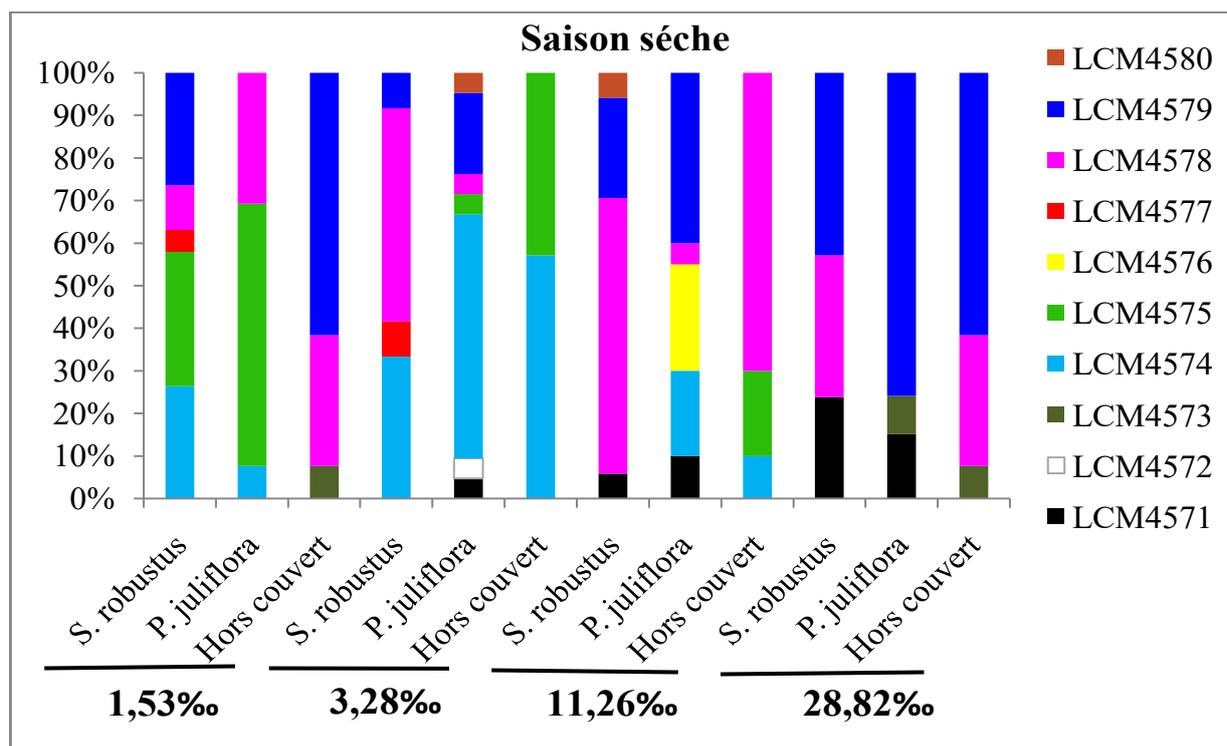


Figure 21. Fréquences des souches de rhizobia isolées dans la rhizosphère de *P. juliflora*, *S. robustus* et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité en saison sèche.

4.3.3.1.4. Répartition des rhizobia le long d'un gradient de salinité, en saison humide

En saison humide, les souches de *Ensifer* LCM4571 et LCM4579 ont été partagées entre *S. robustus* et *P. juliflora* le long du gradient de salinité. Ces deux souches de *Ensifer* sont les seules présentes à 10,08‰ de salinité (Figure 22). *S. robustus* et *P. juliflora* ont partagé la souche de *Mesorhizobium* LCM4575 à 1,60‰ et 2,43‰. La souche de *Mesorhizobium* LCM4574 a par contre été partagée entre ces deux plantes à 2,43‰ et 6,83‰. A 1,60‰, la LCM4574 a été spécifique aux sols sous *S. robustus*. Les deux souches de *Mesorhizobium* LCM4576 et LCM4583 ont été présentes uniquement sous *S. robustus* à 6,83‰. Une autre souche de *Mesorhizobium* retrouvée uniquement sous *S. robustus* a été la LCM4584. Cette souche a été présente à 1,60‰ de salinité. La souche de *Mesorhizobium* LCM4577 a été retrouvée respectivement sous couvert végétal de *P. juliflora* et *S. robustus* à 1,60‰ et 2,43‰. La souche de *Mesorhizobium* LCM4578 a été retrouvée à 1,60‰ où elle a été partagée entre *S. robustus* et *P. juliflora*. Par contre à 6,83‰, la LCM4578 a été retrouvée que sous *S. robustus*. La souche de *Rhizobium* LCM4581 a été présente sous *P. juliflora* à 2,43‰. *S. robustus* a hébergé dans sa rhizosphère la souche de *Rhizobium* LCM4582 à 1,60‰ de salinité. A l'exception de la souche de *Ensifer* LCM4571 présente hors du couvert végétal à

10,08%, la LCM4579 (*Ensifer*) a été la seule souche présente hors du couvert végétal le long du gradient de salinité.

Globalement, 54,5% des souches identifiées en saison humide ont été partagées entre *S. robustus* et *P. juliflora*. 36,3% ont été retrouvés uniquement sous *S. robustus* contre 1% des souches identifiées sous *P. juliflora*.

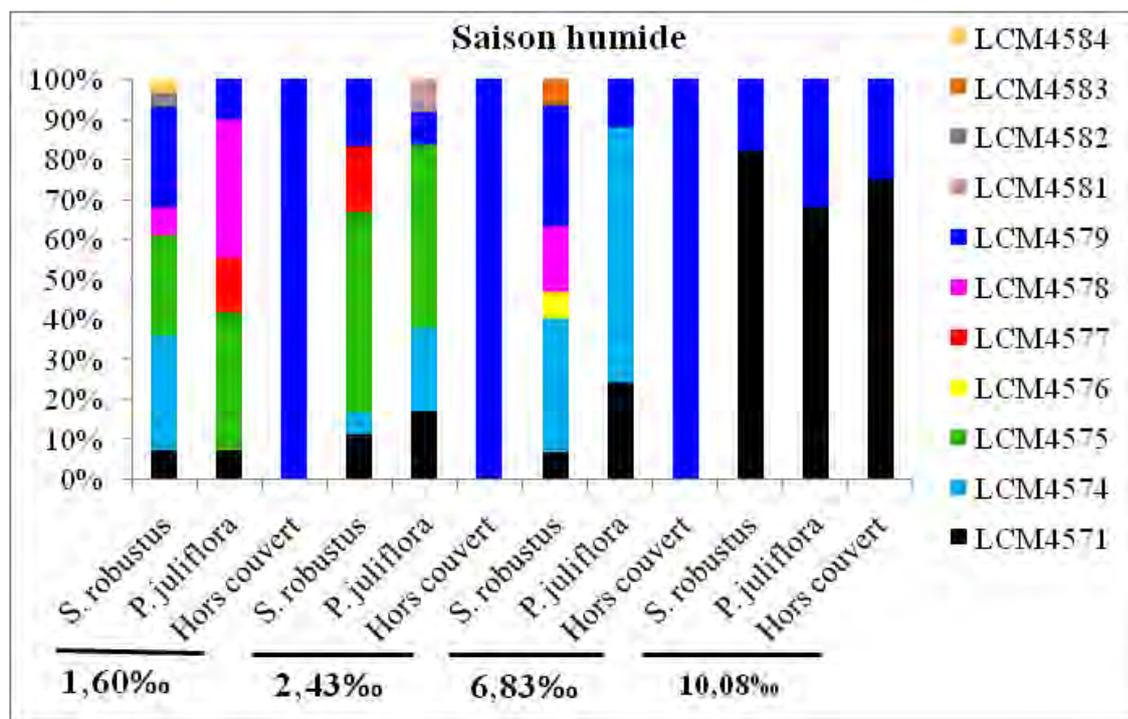


Figure 22. Fréquences des souches de rhizobia isolées dans la rhizosphère de *P. juliflora*, *S. robustus* et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité en saison humide.

4.3.3.1.5. Abondance et diversité α des rhizobia

Les résultats enregistrés dans le Tableau 13 ont montré un effet positif de la salinité sur l'abondance des rhizobia des sols sous *S. robustus*, *P. juliflora* et les sols hors du couvert végétal, en saisons sèche et humide. Globalement, l'abondance des rhizobia des sols sous *P. juliflora* a été plus élevée que celle des sols sous *S. robustus*.

Contrairement à l'abondance, la richesse des rhizobia a diminué avec la salinité. En effet, la diversité des rhizobia appréciée par l'indice de Shannon a été plus faible à 28,82‰ en saison sèche ($H'=1,04$) et à 10,08‰ en saison humide ($H'=0,59$). Par contre, l'indice de Shannon le plus élevé a été observé en saison humide à 1,60‰ de salinité ($H'=1,77$). L'indice de diversité de Simpson a montré de plus faibles valeurs à 28,82‰ en saison sèche ($D=0,55$) et à 10,08‰ en saison humide ($D=0,40$). L'indice de Simpson a été plus important en saison humide à 1,60‰ ($D=0,80$). Globalement, la répartition des espèces a été assez uniforme entre les

niveaux de salinité avec un indice d'équitabilité qui a varié entre 0,72 à 0,86 le long du gradient de salinité en saisons sèche et humide.

Tableau 13. Abondance et diversité α des rhizobia de la rhizosphère de *S. robustus*, *P. juliflora* et hors du couvert végétal dans les 4 niveaux de salinité, en saisons sèche et humide.

Saisons	Salinité (%)	Abondance des rhizobia			Diversité α			
		<i>S. robustus</i>	<i>P. juliflora</i>	Hors couvert	Richesse	Shannon (H')	Simpson (D)	Equitabilité (J)
Sèche	1,53	3,80	2,60	0,00	5	1,38	0,71	0,86
	3,28	3,00	2,62	0,87	8	1,58	0,74	0,81
	11,26	2,42	2,85	1,42	7	1,50	0,70	0,72
	28,82	4,20	6,60	2,60	4	1,04	0,55	0,75
Humide	1,60	3,50	3,62	0,37	8	1,77	0,80	0,85
	2,43	3,00	4,00	2,33	6	1,48	0,73	0,83
	6,83	5,00	4,16	1,83	6	1,39	0,70	0,77
	10,08	5,5	14,00	2,00	2	0,59	0,40	0,85

4.3.3.1.6. Diversité bêta (β) des rhizobia

La diversité β a été déterminée par les calculs d'indices de diversité de Sørensen. Les résultats obtenus (Tableau 14) ont indiqué qu'en saison sèche, les communautés présentes à 11,26‰ de salinité ont été les plus proches de celles de 3,28‰ ($\beta = 0,80$). A 3,28‰, les communautés ont été assez proches de celle de 1,53‰ où plus de 70% des souches seraient communes. Par contre les communautés les plus éloignées ont été celles de 28,82‰ et 1,53‰ de salinité ($\beta = 0,44$).

En saison humide, le niveau de salinité de 10,08‰ a semblé avoir la communauté la plus distincte des autres avec des indices de diversité de Sørensen compris entre 0,40 et 0,50 (Tableau 15). Les communautés de 2,43‰ ont été les plus proches de celles de 1,60‰ ($\beta = 0,71$).

Tableau 14. Diversité β des rhizobia de la rhizosphère de *S. robustus*, *P. juliflora* et en hors couvert végétal des 4 niveaux de salinité en saison sèche.

Salinité (‰)	Salinité (‰)			
	1,53	3,28	11,26	28,82
1,53	-			
3,28	0,77	-		
11,26	0,66	0,80	-	
28,82	0,44	0,50	0,54	-

Tableau 15. Diversité β des rhizobia de la rhizosphère de *S. robustus*, *P. juliflora* et en hors couvert végétal des 4 niveaux de salinité en saison humide.

Salinité (‰)	Salinité (‰)			
	1,60	2,43	6,83	10,08
1,60	-			
2,43	0,71	-		
6,83	0,57	0,50	-	
10,08	0,40	0,50	0,50	-

4.3.3.2. Phylogénie de la région intergénique (ITS) 16S-23S de l'ADNr

L'arbre phylogénétique généré à partir des séquences de l'ITS 16S-23S de l'ADNr des souches de rhizobia montre quatre (04) genres (Figure 23).

Le genre *Mesorhizobium* regroupe huit (08) souches (LCM4574, LCM4575, LCM4576, LCM4577, LCM4578, LCM4580, LCM4583 et LCM4584). Ces souches présentent une de grande similitude (93%) avec la souche type de *Mesorhizobium plurifarum* LMG11892^T. Le genre *Ensifer* regroupe les souches LCM4571 et LCM4579, étroitement liées à la souche type de *Ensifer fredii* LMG6217^T avec 92% de similarité. Le genre *Rhizobium* est constitué par les souches LCM4573, LCM4581 et LCM4582. Ces souches sont proches de la souche de *Rhizobium* sp. LCM3718 (90% de similarité) isolées d'*Acacia seyal* et de la souche type de *Rhizobium pisi* DSM30132 (85% de similarité). La souche LCM4572 se retrouve dans le genre *Burkholderia* et présente 99% de similarité avec la souche *Burkholderia* sp LCM3750 isolée d'*A. senegal*.

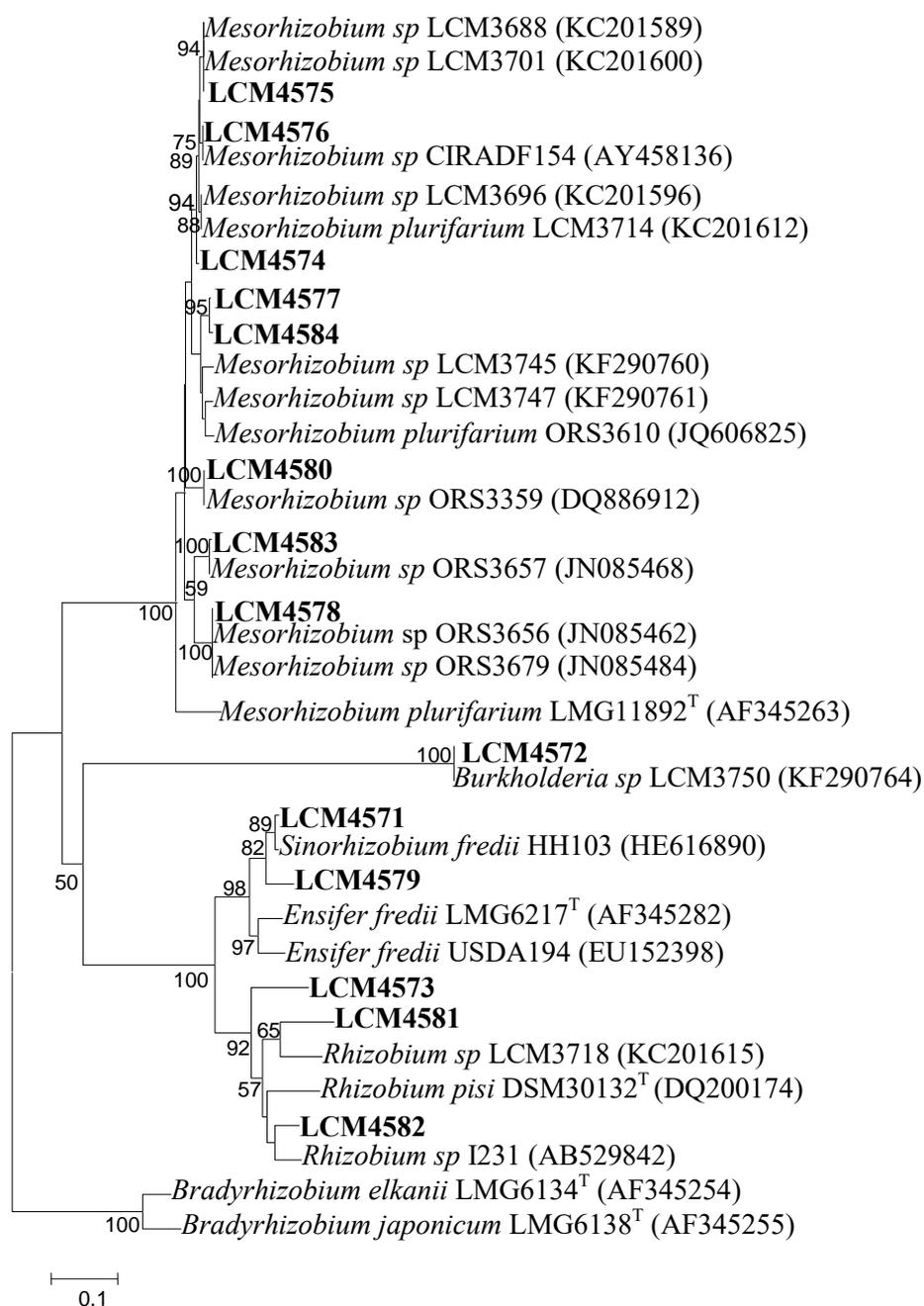


Figure 23. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes ITS des souches de rhizobia (en gras) isolées dans la rhizosphère de *P. juliflora*, *S. robustus* et hors du couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank.

La valeur de bootstrap indiquée sur les noeuds a été calculée après une répétition de 100 fois (seules les valeurs supérieures à 50% ont été représentées). Les souches types sont représentées par « T ». Les numéros d'accèsion Genbank sont donnés entre parenthèses. L'arbre a été enraciné avec les souches *Bradyrhizobium elkanii* LMG 6134^T et *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138^T.

4.3.3.3. Phylogénie du gène 16S de l'ADNr et des gènes de ménage des souches de rhizobia

4.3.3.3.1. Phylogénie du gène 16S

L'arbre phylogénétique du gène 16S (Figure 24) a montré que les souches de rhizobia isolées de la rhizosphère de *P. juliflora* et *S. robustus* et hors couvert végétal appartiennent à 04 genres. Le genre *Mesorhizobium* est subdivisé en deux sous groupes. Le sous groupe I regroupant les souches LCM4574, LCM4575, LCM4576, LCM4577, LCM4580 et LCM4584, sont fortement liées à la souche type *Mesorhizobium plurifarum* LMG11892^T avec 99% de similarité. Les souches LCM4578 et LCM4583 forment le sous groupe II et présentent des similarités de 99% avec *Mesorhizobium* sp AB11 isolée d'*A. senegal*.

Le genre *Ensifer* regroupe les souches LCM4571 et LCM4579 proches de la souche type *Ensifer meliloti* LMG6133^T (98% de similarité) et de la souche de *Ensifer meliloti* SEMIA6162 (99% de similarité), isolée du Brésil à partir de nodules de *Prosopis juliflora* (Menna et al., 2006).

Le genre *Rhizobium* regroupe les souches LCM4573, LCM4581 et LCM4582. Ces dernières sont proches de la souche type *Rhizobium cauense* CCBAU101002^T (97% de similarité) et similaires à 99% des souches *Rhizobium petrolearium* LW2, *Rhizobium* sp R1.4, *Rhizobium* sp SEMIA6411 isolées respectivement de sols rhizosphériques du riz et de nodosités d'*A. senegal* et *Clitoria fairchildiana*, une Fabacée originaire du Brésil.

La souche LCM4572 se retrouve dans le genre *Burkholderia* et présente 99% de similarité avec la souche *Burkholderia* sp PNG-April.

4.3.3.3.2. Phylogénie des gènes *atpD*, *recA*, *gyrB* et *glnA*

Sur les 14 souches représentatives des profils ITS, identifiés par séquençage de l'ADNr 16S-23S, les gènes *atpD*, *recA*, *gyrB* et *glnA* de 8 isolats ont pu être amplifiés. Les amorces définies, n'ont pas permis d'amplifier les séquences des 4 gènes de ménage symbiotiques de 6 isolats de notre collection (LCM4572, LCM4573, LCM4574, LCM4578, LCM4581 et LCM4584). Les 8 souches ont ainsi été utilisées pour construire l'arbre concaténé des 4 gènes (Figure 25). Il apparaît clairement que les souches LCM4575, LCM4576, LCM4577, LCM4580 et LCM4583 sont phylogénétiquement proches de la souche type *Mesorhizobium plurifarum* LMG11892^T. La souche LCM4582 est fortement liée à la souche type *Rhizobium*

leguminosarum LMG14904^T. Les souches LCM4571 et LCM4579 sont phylogénétiquement proches de la souche type de *Ensifer fredii* LMG6217^T.

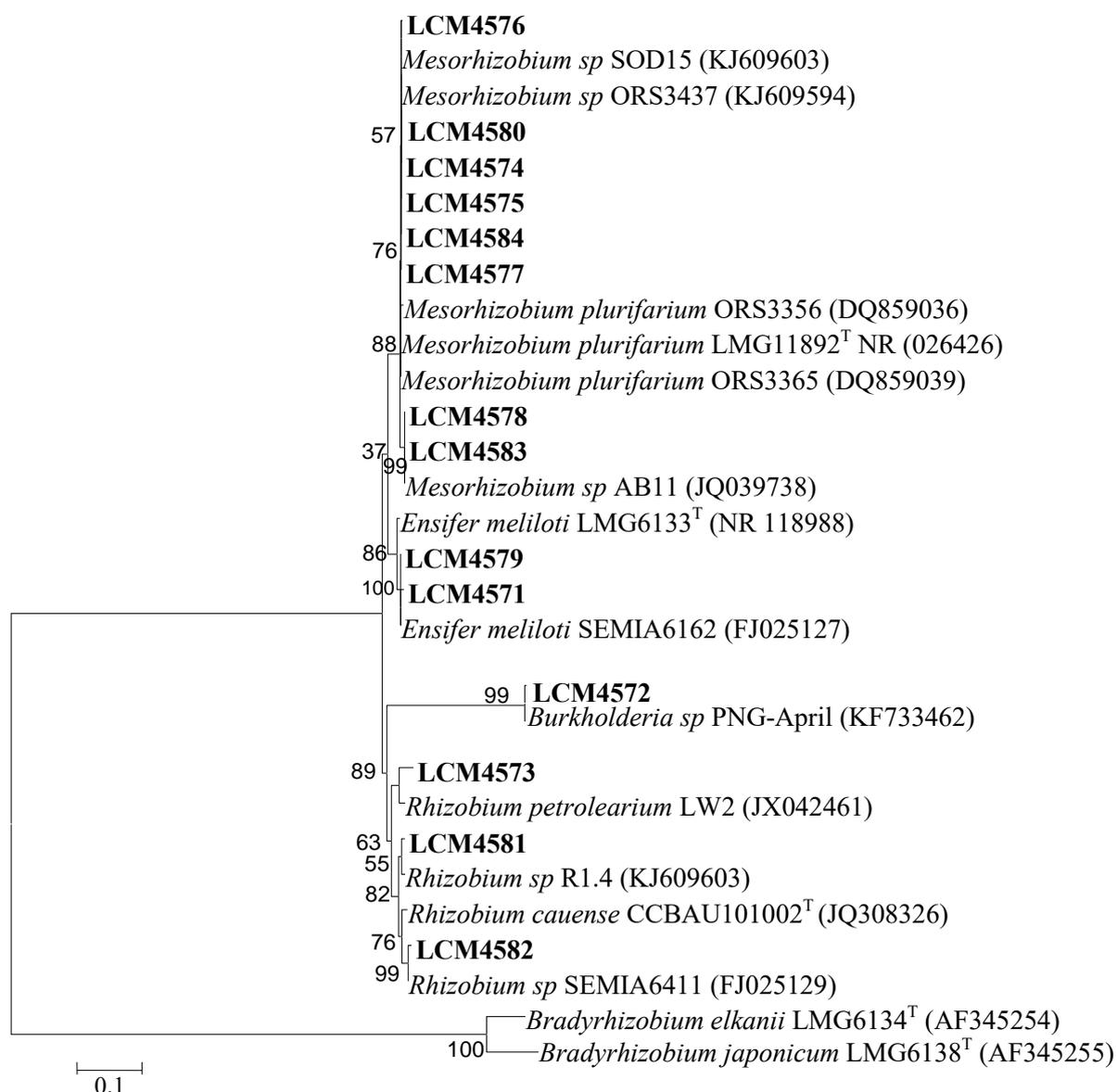


Figure 24. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes ARNr 16S des souches de rhizobia (en gras) isolées de la rhizosphère de *P. juliflora*, *S. robustus* et en hors couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank.

La valeur de bootstrap indiquée sur les noeuds a été calculée après une répétition de 100 fois (seules les valeurs supérieures à 50% ont été représentées). Les souches types sont représentées par « T ». Les numéros d'accèsion Genbank sont donnés entre parenthèses. L'arbre a été enraciné avec les souches *Bradyrhizobium elkanii* LMG 6134^T et *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138^T.

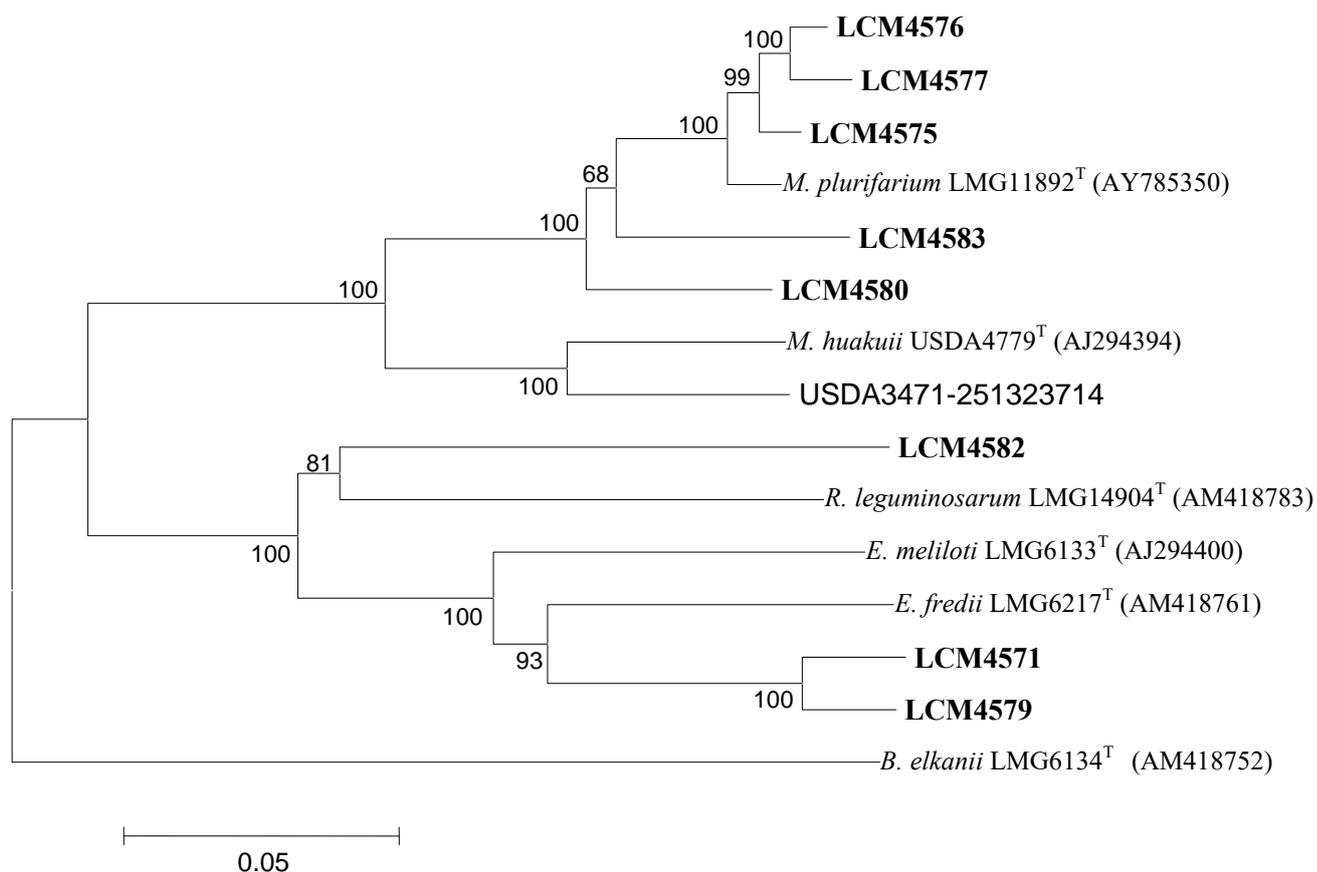


Figure 25. Phylogénie bayésienne de l'alignement de 4 gènes (*atpD-recA-gyrB-glnA*) des souches de rhizobia (en gras) isolées de la rhizosphère de *P. juliflora*, *S. robustus* et hors du couvert végétal et celles de souches types appartenant aux genres *Mesorhizobium*, *Ensifer* et *Rhizobium*. L'arbre a été enraciné avec la souche *Bradyrhizobium elkanii* LMG 6134^T.

4.3.4. Diversité symbiotique des rhizobia

Les relations phylogénétiques des 14 isolats représentatifs des profils ITS, identifiés par séquençage de l'ADNr 16S-23S ont été analysées en utilisant les séquences des gènes symbiotiques (*nodA*, *nodC* et *NifH*). Les amorces définies, n'ont pas permis d'amplifier les séquences des gènes symbiotiques de 04 isolats de notre collection. Il s'agit des souches de *Burkholderia* LCM4572 et de *Rhizobium* (LCM4573, LCM4581 et LCM4582). Les résultats obtenus pour les 10 isolats ont montré que la phylogénie des gènes de nodulation (*nodA* et *nodC*) était presque semblable à la phylogénie du gène de fixation d'azote *nifH*.

4.3.4.1. Phylogénie du gène *nodA*

L'arbre phylogénétique du gène *nodA*, réalisé sur 10 souches sur 14 (Figure 26) a montré que les souches de rhizobia appartenant au genre *Mesorhizobium* étaient subdivisées en deux sous groupes. Le sous groupe I regroupant les souches LCM4576, LCM4577, LCM4578, LCM4580 et LCM4583, présente 100% de similarité avec la souche *Mesorhizobium plurifarum* ORS1096 isolée de nodosités d'*A tortilis* subsp. *raddiana* au Sénégal. Les souches LCM4574, LCM4575 et LCM4584 forment le sous groupe II et présente des similarités de 95% avec *Mesorhizobium plurifarum* CFN ESH26 isolé d'*Acaciella angustissima* au Mexique. Le genre *Ensifer* regroupe les souches LCM4571 et LCM4579, étroitement liées à la souche *Ensifer* sp ORS1085 (99% de similarité) isolée de *A tortilis* subsp. *raddiana* au Sénégal.

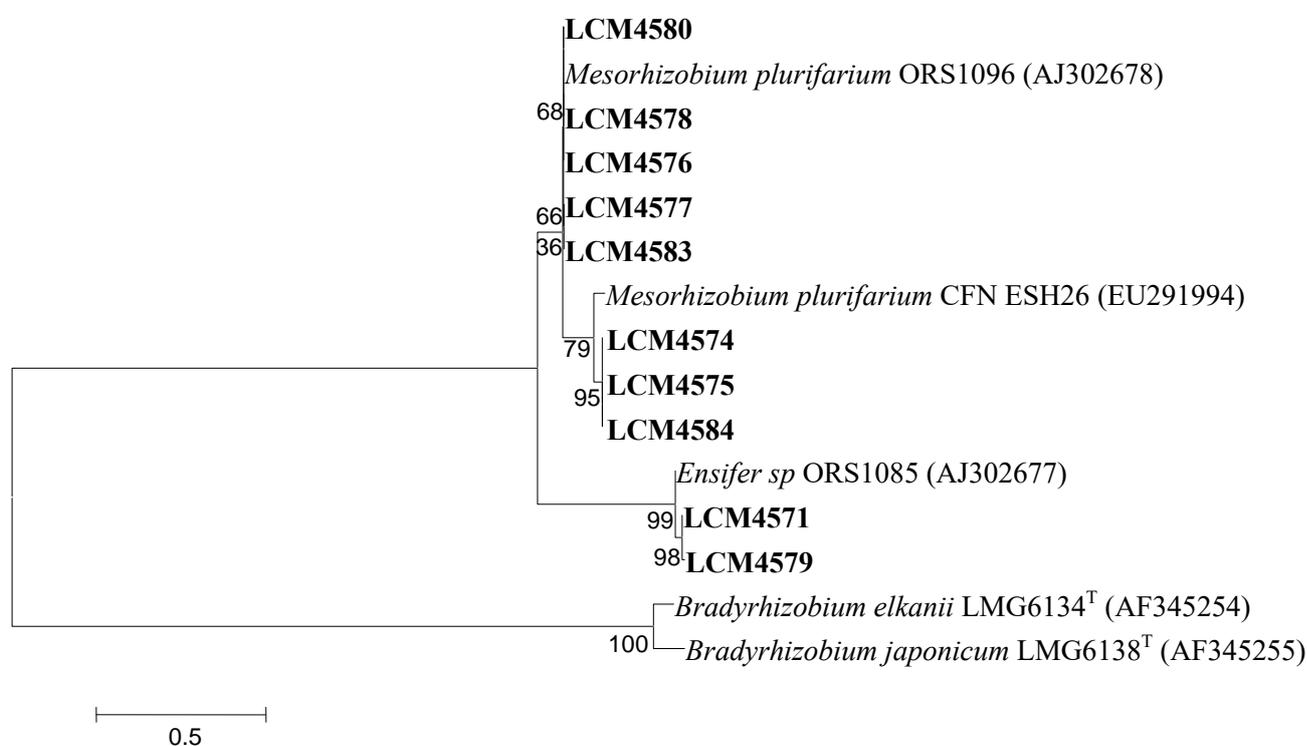


Figure 26. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes *nodA* des souches de rhizobia (en gras) isolées dans la rhizosphère de *P. juliflora*, *S. robustus* et hors du couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank.

La valeur de bootstrap indiquée sur les noeuds a été calculée après une répétition de 100 fois (seules les valeurs supérieures à 50% ont été représentées). Les souches types sont représentées par « T ». Les numéros d'accèsion Genbank sont donnés entre parenthèses. L'arbre a été enraciné avec les souches *Bradyrhizobium elkanii* LMG 6134^T et *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138^T.

4.3.4.2. Phylogénie du gène *nodC*

L'arbre phylogénétique du gène *nodC*, réalisé sur 10 souches sur 14 (Figure 27) a montré que les souches de rhizobia appartenant au genre *Mesorhizobium* étaient subdivisées en deux sous groupes. Le sous groupe I regroupant les souches LCM4576, LCM4577, LCM4578, LCM4580 et LCM4583, est lié aux souches *Mesorhizobium sp* ORS3404 isolée de nodosités d'*A. seyal* et de *Mesorhizobium plurifarum* ORS1096, *Mesorhizobium sp* AC39e2 et *Mesorhizobium sp* ORS3365 (99% de similarité) isolés respectivement de nodosités de *A tortilis* subsp. *Raddiana*, *A. abyssinica* et *A. seyal*. Les souches LCM4574, LCM4575 et LCM4584 ont formé le sous groupe II et présenté des similarités de 100% avec *Mesorhizobium sp* SCAU215 isolé de *Leucaena leucocephala*. Le genre *Ensifer* regroupe les souches LCM4571 et LCM4579, étroitement liées à la souche *Ensifer sp* JNVU avec 97% de similarité.

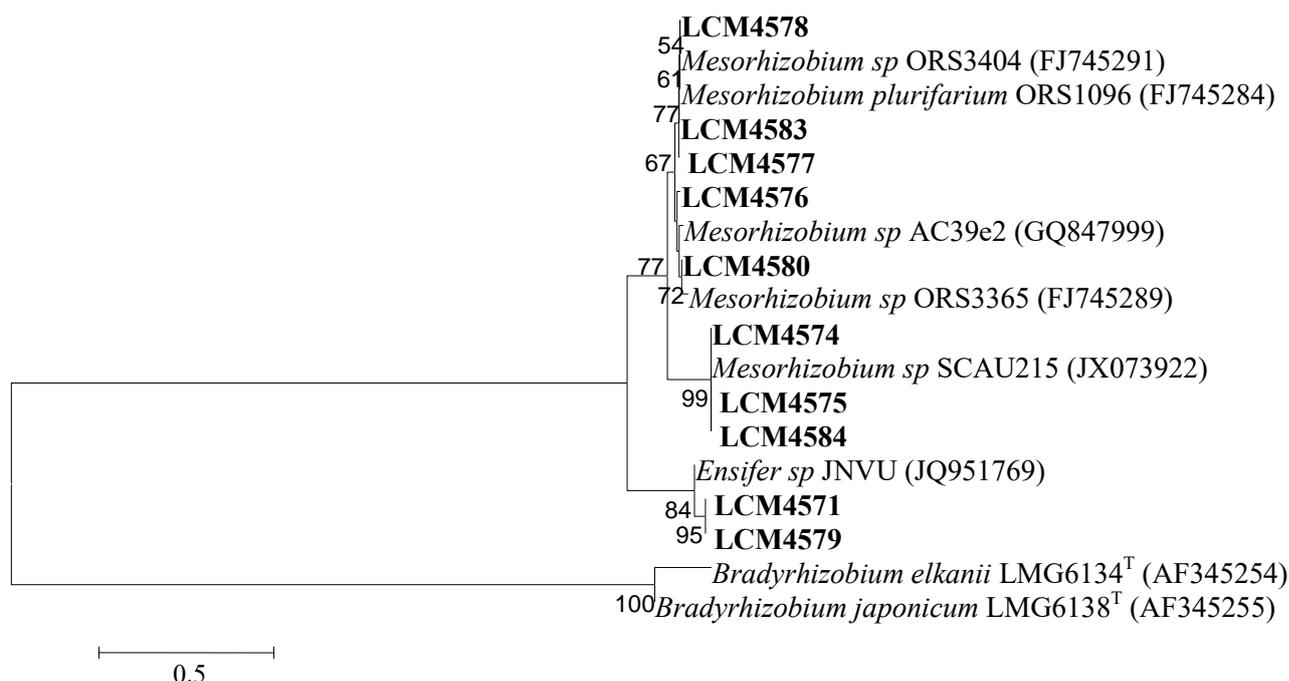


Figure 27. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes *nodC* des souches de rhizobia (en gras) isolées dans la rhizosphère de *P. juliflora*, *S. robustus* et hors du couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank.

La valeur de bootstrap indiquée sur les noeuds a été calculée après une répétition de 100 fois (seules les valeurs supérieures à 50% ont été représentées). Les souches types sont représentées par « T ». Les numéros d'accession Genbank sont donnés entre parenthèses. L'arbre a été enraciné avec les souches *Bradyrhizobium elkanii* LMG 6134^T et *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138^T.

4.3.4.3. Phylogénie du gène *nifH*

L'arbre phylogénétique du gène *nifH*, réalisé sur 10 souches sur 14 est représenté sur la figure 28. Le groupe I représenté par le genre *Mesorhizobium* est subdivisé en 2 sous groupe. Le sous groupe I constitué par les souches LCM4576, LCM4577, LCM4578 et LCM4583, est lié à la souche *Mesorhizobium sp* ORS3365 avec 99% de similarité. Le sous groupe II regroupant les souches LCM4574, LCM4575 et LCM4584, présente 99% de similarité avec *Mesorhizobium sp* RITF1564. Les souches LCM4571 et LCM4579 ont formé le groupe II (*Ensifer*). Ces souches ont été groupées avec *Ensifer sp* JNVUAJ31 avec 98% de similarité.

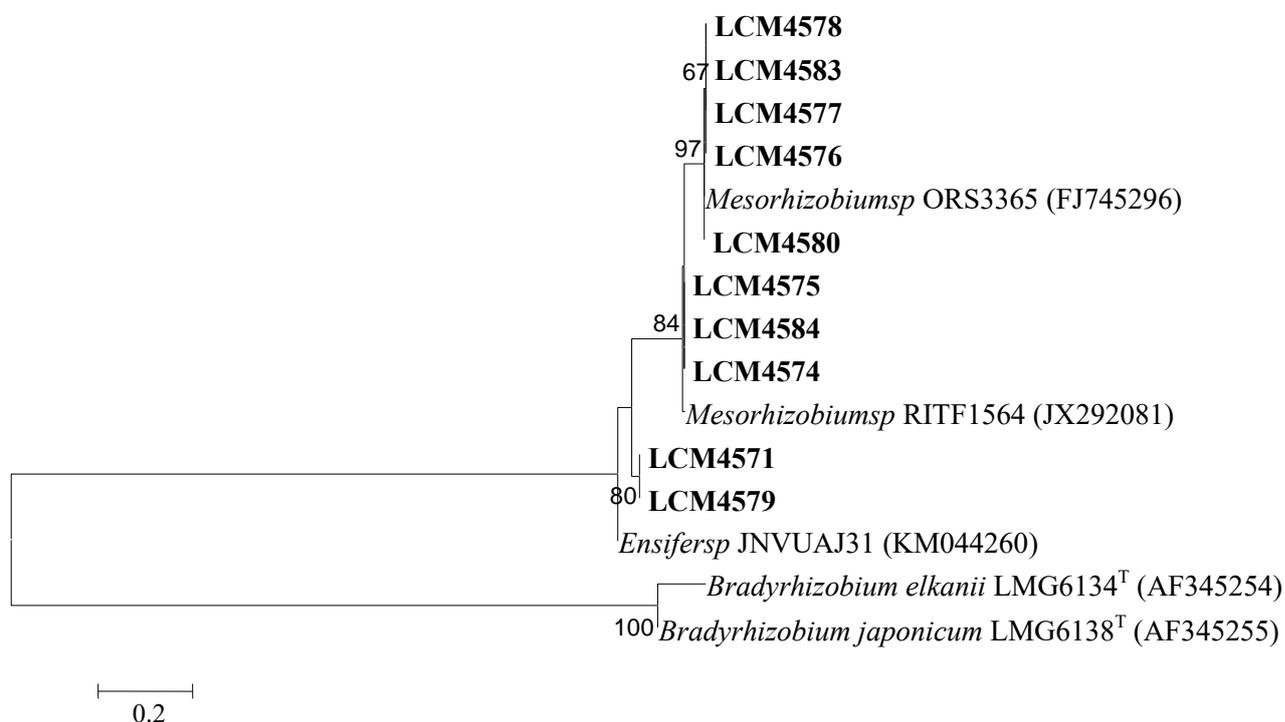


Figure 28. Arbre phylogénétique montrant les relations entre les séquences des gènes *nifH* des souches de rhizobia (en gras) isolées dans la rhizosphère de *P. juliflora*, *S. robustus* et hors du couvert végétal et celles de souches de référence de la base de données GenBank.

La valeur de bootstrap indiquée sur les nœuds a été calculée après une répétition de 100 fois (seules les valeurs supérieures à 50% ont été représentées). Les souches types sont représentées par « T ». Les numéros d'accèsion Genbank sont donnés entre parenthèses. L'arbre a été enraciné avec les souches *Bradyrhizobium elkanii* LMG 6134^T et *Bradyrhizobium japonicum* LMG 6138^T.

4.3.5. Diversité phénotypique des rhizobia

Les marges de résistance des 14 souches de rhizobia aux différents antibiotiques testés sont représentées dans le Tableau 16. Les résultats ont montré des réponses variables des souches de rhizobia aux différents antibiotiques testés. De fortes résistances allant jusqu'à 100 µg/ml ont été notées avec l'ampicilline pour toutes les souches testées. Ces dernières ont été par contre faiblement tolérantes à la kanamycine et n'ont pas pu croître au delà d'une concentration de 25 µg/ml. Les souches de *Mesorhizobium* LCM4576 et LCM4578 ont été sensibles à la rifampicine alors que la souche LCM4583 est restée sensible au chloramphénicol. Globalement, les souches testées se sont montrées assez tolérantes à la tétracycline et à la streptomycine.

Le test de tolérance aux pH acides et alcalins a montré que toutes les souches de rhizobia pouvaient se développer sur des pH allant de 5 à 10 (données non présentées). Seule la souche de *Rhizobium* LCM4581 a été capable de croître à des pH 4.

Les résultats obtenus pour la croissance des souches à différentes doses de NaCl sont rapportés sur la figure 29. Les souches étudiées se sont avérées tolérantes à une large gamme de concentration en NaCl. La limite de tolérance de la souche de *Rhizobium* LCM4581 a été de 100 mM alors que les souches *Burkholderia* LCM4572 et *Rhizobium* LCM4573 ont pu tolérer jusqu'à 700 mM de NaCl. Les deux souches de *Ensifer* (LCM4571 et LCM4579) ont pu croître jusqu'à des doses de 600 mM de NaCl. Les souches de *Mesorhizobium* ont occupé une position intermédiaire et se sont développées sur des doses de NaCl variant entre 200 et 400 mM.

Tableau 16. Résistance intrinsèque des souches de rhizobia à différents antibiotiques.

Isolats de rhizobia	Antibiotiques (µg/ml)					
	Kan.	Tétr.	Strep.	Chl.	Amp.	Rif.
LCM4571	10	75	100	50	100	50
LCM4572	10	75	50	100	100	75
LCM4573	25	100	100	100	100	75
LCM4574	25	50	100	100	100	75
LCM4575	10	100	100	100	100	75
LCM4576	10	50	100	100	100	<10
LCM4577	10	50	100	25	100	10
LCM4578	10	75	100	25	100	<10
LCM4579	10	25	100	25	100	10
LCM4580	10	50	75	25	100	50
LCM4581	10	50	75	25	100	50
LCM4582	10	75	75	75	100	50
LCM4583	10	100	100	<10	100	50
LCM4584	25	50	100	10	100	50

Kan : Kanamycine ; Tétr : Tétracycline ; Strep : Streptomycine ; Chl : Chloramphénicol ; Amp : Ampicilline ; Rif : Rifampicine.

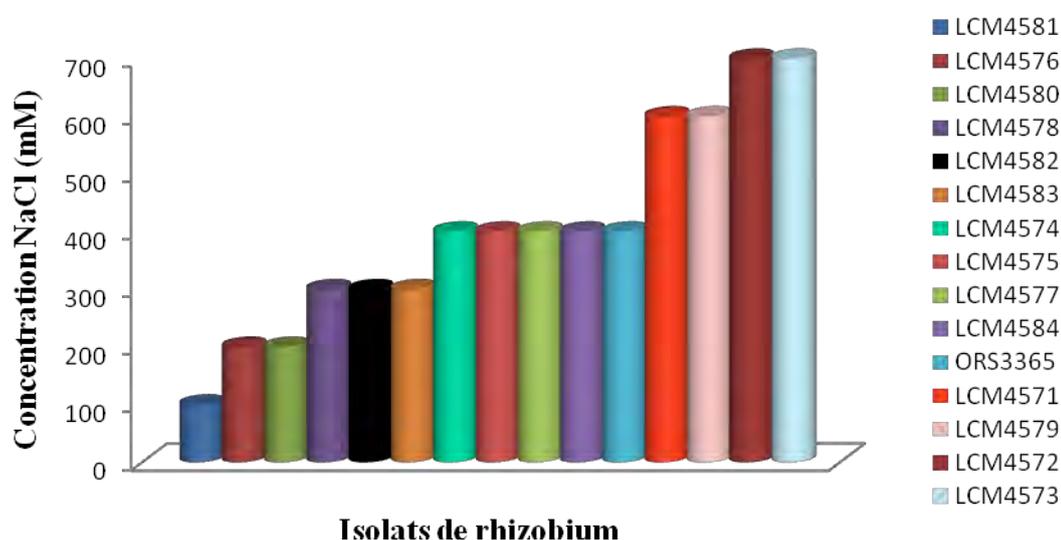


Figure 29. Tolérance des souches de rhizobia à différentes concentrations de NaCl.

4.3.6. Infectivité et effectivité des isolats de rhizobia et la fixation d'azote des plants d'*A. seyal* et de *P. juliflora*

Les résultats enregistrés dans le Tableau 17 ont montré que les plants d'*A. seyal* forment des nodosités avec toutes les souches de rhizobia. Le pourcentage de nodulation des plants d'*A.*

seyal a été faible avec les souches de *Burkholderia* LCM4572 et de *Rhizobium* (LCM4581 et LCM4582). Les souches de *Ensifer* (LCM4571 et LCM4579) et de *Mesorhizobium* (LCM4577 et LCM4580) ont amélioré le poids sec des nodosités des plantes d'*A. seyal* comparé aux plantes témoins. Comparés aux plants témoins, l'inoculation des plantes d'*A. seyal* avec la souche de *Ensifer* LCM4579 a eu un effet positif sur la production de biomasse sèche totale, la fixation d'azote (ARA) et l'activité spécifique de réduction d'acétylène (SARA). Une seule souche de *Mesorhizobium* LCM4580 a eu un effet positif sur la fixation d'azote d'*A. seyal*, par contre, elle n'a pas amélioré la biomasse sèche totale des plants.

Les plants de *P. juliflora* n'ont pas formé de nodosités avec les souches de *Burkholderia* LCM4572, *Rhizobium* (LCM4573, LCM4581 et LCM4582) et *Mesorhizobium* (LCM4576 et LCM4583). Les souches de *Ensifer* (LCM4571 et LCM4579) ont significativement augmenté le poids sec des nodosités et la production de biomasse sèche totale des plants de *P. juliflora* comparés aux plants témoins. L'inoculation de *P. juliflora* avec les 14 isolats n'a pas eu d'effet significatif sur la fixation d'azote des plants. Par contre, la SARA a été améliorée avec la souche de *Mesorhizobium* LCM4574.

La souche de référence ORS3365 n'a pas eu d'effet significatif sur les paramètres de nodulation et de croissance et la fixation d'azote d'*A. seyal* et *P. juliflora*.

Tableau 17. Paramètres de nodulation, de croissance et de fixation d'azote mesurés sur les plants d'*A. seyal* et de *P. juliflora* en inoculation croisée.

Plantes pièges	Isolats de rhizobia	TN (%)	PSN (mg)	PST (mg)	ARA ($\mu\text{mole C}_2\text{H}_4^{\text{h}^{-1}}\text{plant}^{-1}$)	SARA
<i>A. seyal</i>	Témoin	0	00,00 ^b	154,25 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4571	100	12,75 ^a	190,25 ^b	0,123 ^b	0,010 ^{ab}
	LCM4572	25	00,75 ^b	175,50 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4573	50	02,75 ^b	132,25 ^b	0,015 ^b	0,002 ^b
	LCM4574	50	00,32 ^b	082,00 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4575	50	00,62 ^b	096,75 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4576	100	05,65 ^{ab}	116,75 ^b	0,028 ^b	0,000 ^b
	LCM4577	100	12,00 ^a	178,75 ^b	0,059 ^b	0,005 ^{ab}
	LCM4578	100	03,90 ^b	097,75 ^b	0,043 ^b	0,011 ^{ab}
	LCM4579	100	11,75 ^a	407,25 ^a	0,241 ^a	0,020 ^a
	LCM4580	100	12,25 ^a	203,50 ^b	0,229 ^a	0,018 ^{ab}
	LCM4581	25	00,03 ^b	131,00 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4582	25	00,02 ^b	115,50 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4583	100	07,50 ^{ab}	161,50 ^b	0,059 ^b	0,010 ^{ab}
	LCM4584	75	00,08 ^b	092,25 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b
ORS3365	100	05,25 ^{ab}	187,00 ^b	0,075 ^b	0,014 ^{ab}	
<i>P. juliflora</i>	Témoin	0	0	061,75 ^b	0,000 ^a	0,000 ^b
	LCM4571	100	05,37 ^a	120,50 ^a	0,013 ^a	0,002 ^b
	LCM4572	0	00,75 ^b	106,50 ^{ab}	0,001 ^a	0,001 ^b
	LCM4573	0	00,00 ^b	103,25 ^{ab}	0,000 ^a	0,000 ^b
	LCM4574	100	01,20 ^b	080,75 ^{ab}	0,048 ^a	35,948 ^a
	LCM4575	25	00,75 ^b	091,75 ^{ab}	0,031 ^a	3,759 ^b
	LCM4576	0	00,00 ^b	060,75 ^b	0,000 ^a	0,000 ^b
	LCM4577	25	00,75 ^b	101,25 ^{ab}	0,000 ^a	0,000 ^b
	LCM4578	25	00,50 ^b	070,50 ^{ab}	0,014 ^a	7,952 ^b
	LCM4579	100	05,25 ^a	112,25 ^a	0,041 ^a	0,007 ^b
	LCM4580	25	00,23 ^b	105,75 ^{ab}	0,000 ^a	0,000 ^b
	LCM4581	0	00,00 ^b	071,75 ^{ab}	0,000 ^a	0,000 ^b
	LCM4582	0	00,00 ^b	078,00 ^{ab}	0,000 ^a	0,000 ^b
	LCM4583	0	00,00 ^b	108,00 ^{ab}	0,000 ^a	0,000 ^b
	LCM4584	50	01,25 ^b	099,75 ^{ab}	0,023 ^a	9,757 ^b
ORS3365	75	01,20 ^b	108,50 ^{ab}	0,021 ^a	0,012 ^b	

Pour chaque colonne et pour chaque espèce de légumineuse, les moyennes des valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (5%). TN : taux de nodulation ; PSN : poids sec nodulaire ; PST : poids sec total ; ARA : activité réductrice d'acétylène ; SARA : activité réductrice d'acétylène spécifique.

4.3.7. Impact du stress salin sur l'infectivité et l'effectivité des isolats de rhizobia et sur la fixation d'azote des plants d'*A. seyal* et de *P. juliflora*

Huit souches de rhizobia présentant une gamme variée de tolérance à la salinité sur milieu YMA (200 à 700 mM de NaCl) et appartenant aux 4 genres identifiés dans cette étude, ont été choisies pour ce test. Il s'agit des souches de *Ensifer* (LCM4571 et LCM4579), *Mesorhizobium* (LCM4577, LCM4580 et LCM4583), *Burkholderia* LCM4572 et *Rhizobium* LCM4573). La souche de *Mesorhizobium* ORS3365 isolée des nodosités d'*A. seyal* et présentant une forte tolérance à la salinité, a été utilisée comme référence pour ce test. Les résultats ont montré un effet négatif de la salinité sur les paramètres de nodulation, de croissance et de fixation d'azote des plants d'*A. seyal* et de *P. juliflora* (Tableau 18). Sous stress salin, *A. seyal* a formé des nodosités avec toutes les 14 isolats. Par contre, *P. juliflora* n'a pas formé de nodosités avec les souches de *Rhizobium* LCM4573 et de *Mesorhizobium* LCM4583. Les souches de *Ensifer* (LCM4571 et LCM4579) et *Mesorhizobium* (LCM4577 et LCM4580) ont significativement augmenté le poids sec des nodosités de *A. seyal*, alors que chez *P. juliflora*, seules les souches de *Ensifer* ont amélioré le poids sec des nodosités. Chez *A. seyal*, la souche de *Ensifer* LCM4579 s'est montrée performante pour la production de biomasse sèche et la fixation d'azote. La *Mesorhizobium* LCM4580 a seulement augmenté la fixation d'azote d'*A. seyal*. Chez *P. juliflora*, l'augmentation de la production de biomasse sèche a été assurée par les souches de *Rhizobium* LCM4573 et *Mesorhizobium* LCM4583. Par contre la LCM4579 (*Ensifer*) a eu un effet bénéfique sur la fixation d'azote de *P. juliflora*. La souche de référence ORS3365 n'a pas eu d'effet significatif sur les paramètres de nodulation et de croissance et la fixation d'azote d'*A. seyal* et *P. juliflora* en condition de stress salin.

Tableau 18. Paramètres de nodulation, de croissance et de fixation d'azote mesurés sur les plants d'*A. seyal* et de *P. juliflora* en inoculation croisée, sous stress salin.

Plantes hôtes	Facteurs testés	TN (%)	PSN (mg)	PST (mg)	ARA ($\mu\text{mole C}_2\text{H}_4^{\text{h}^{-1}}\text{plant}^{-1}$)	SARA
<i>A. seyal</i>	Salinité					
	0 mM	75	7,22 ^a	198,91 ^a	0,089 ^a	0,009 ^a
	50 mM	65	0,86 ^b	149,50 ^a	0,001 ^b	0,001 ^b
	100 mM	8	0,01 ^b	047,22 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b
	Isolats de rhizobia					
	Témoin	0	0,00 ^b	104,75 ^b	0,000 ^b	0,000 ^a
	LCM4571	75	4,76 ^a	120,58 ^b	0,041 ^{ab}	0,001 ^a
	LCM4572	16	0,39 ^b	103,00 ^b	0,000 ^b	0,000 ^a
	LCM4573	25	0,91 ^b	097,16 ^b	0,003 ^b	0,001 ^a
	LCM4577	58	4,16 ^a	122,91 ^b	0,018 ^b	0,002 ^a
	LCM4579	66	4,61 ^a	291,83 ^a	0,079 ^a	0,007 ^a
	LCM4580	58	4,41 ^a	122,66 ^b	0,076 ^a	0,007 ^a
	LCM4583	50	2,84 ^{ab}	101,50 ^b	0,018 ^b	0,005 ^a
	ORS3365	58	2,16 ^{ab}	122,50 ^b	0,026 ^b	0,006 ^a
<i>P. juliflora</i>	Salinité					
	0 mM	41	1,50 ^a	103,97 ^a	0,009 ^a	0,002 ^a
	50 mM	32	0,81 ^b	089,83 ^b	0,006 ^a	0,001 ^{ab}
	100 mM	0	0,00 ^c	038,61 ^c	0,000 ^b	0,000 ^b
	Isolats de rhizobia					
	Témoin	0	0,00 ^b	57,66 ^b	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4571	66	2,62 ^a	81,00 ^{ab}	0,012 ^b	0,002 ^{ab}
	LCM4572	33	0,48 ^b	78,66 ^{ab}	0,001 ^b	0,001 ^b
	LCM4573	0	0,00 ^b	93,75 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4577	8	0,25 ^b	69,50 ^{ab}	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4579	66	3,00 ^a	74,75 ^{ab}	0,026 ^a	0,006 ^a
	LCM4580	8	0,07 ^b	79,66 ^{ab}	0,000 ^b	0,000 ^b
	LCM4583	0	0,00 ^b	84,16 ^a	0,000 ^b	0,000 ^b
	ORS3365	25	0,52 ^b	78,08 ^{ab}	0,007 ^b	0,004 ^{ab}

Pour chaque colonne et pour chaque espèce de légumineuse, les moyennes des valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (5%). TN : taux de nodulation ; PSN : poids sec nodulaire ; PST : poids sec total ; ARA : activité réductrice d'acétylène ; SARA : activité réductrice d'acétylène spécifique.

4.4. DISCUSSION

Dans le présent travail, le potentiel infectieux rhizobien des sols échantillonnés dans 4 niveaux de salinité durant les saisons sèche et humide, a été évalué par la méthode MPN sur des plants d'*A. seyal* et *P. juliflora*. L'analyse des données MPN a montré un effet négatif de la salinité sur le nombre de rhizobia des sols. Ces résultats confirment ceux de Martyniuk et al. (2005) et Borucki et Sujkowska (2008) qui ont montré que la salinité des sols peut affecter la densité des rhizobia. La capacité des populations indigènes de bactéries symbiotiques à infecter et à former des nodosités *in vitro* sur des racines d'*A. seyal* et *P. juliflora* est fortement stimulée en saison humide. En effet, le nombre de rhizobia par gramme de sol a été vingt fois plus élevé en saison humide qu'en saison sèche. En condition de déficit hydrique, la croissance et la survie des rhizobia ont été affectées (Hungria et Vargas, 2000) et la nodulation est réduite (Sangakkara et al., 1996 ; Lazali, 2009). Le nombre de rhizobia par gramme de sols échantillonnés sous *S. robustus* a été significativement élevé, comparés aux sols en hors du couvert végétal. Ainsi, *S. robustus* stimulerait la microflore rhizobienne des sols rhizosphériques. Ce constat est en accord avec ceux des études menées par Garau et al. (2009) et Gueye et al. (2009) qui ont montré que les herbacées tapissant les sous bois comprennent des hôtes potentiels pour les rhizobia. Le nombre le plus probable de rhizobia par gramme de sols a été le même dans la rhizosphère de *S. robustus* (plante non hôte) et *P. juliflora* (plante hôte). Ces résultats suggèrent que la présence de souches de rhizobia serait en partie dépendante de la rhizosphère de la plante, mais indépendante du statut d'hôte de la plante. Ainsi, le maintien ou l'augmentation des populations de rhizobia nécessiterait la présence de la rhizosphère de la plante. En effet, la rhizosphère est le volume de sol exploré par les racines et soumis à leur influence directe. Les racines exsudent des substances (ex. acides organiques, sucres, flavonoïdes) favorables à la multiplication des rhizobia et à l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote (Haldar et Sengupta, 2015). Par ailleurs, les deux plantes pièges utilisées pour le test MPN ont montré des résultats comparables entre les sols. La plante piège ne peut donc pas être un facteur majeur expliquant la différence des nombres de rhizobia par gramme de sols des différents échantillons.

Les résultats ont montré une grande diversité génétique des souches de rhizobia isolées de la rhizosphère de *S. robustus*, *P. juliflora* et des sols hors du couvert végétal, le long d'un gradient de salinité durant les saisons sèche et humide. La diversité des rhizobia a été mise en évidence par l'analyse de la région 16S-23S (ITS) de l'ADNr. Les souches de rhizobia ont été

regroupées dans 14 profils ITS. Les résultats obtenus avec les 14 souches pour les gènes de ménage, l'ADNr 16S et la région 16S-23S (ITS) de l'ADNr ont été concordants. Les représentants de ces bactéries ont été classés dans 4 genres : *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* et *Burkholderia*. Ces résultats mettent en évidence l'existence dans la zone d'étude d'une importante population de rhizobia appartenant à ces différents genres bactériens. D'autres travaux menés sur la diversité génétique des rhizobia associés aux légumineuses annuelles et pérennes (Diouf et al., 2007 ; Fall et al., 2008 ; Gueye et al., 2009 ; Pule-Meulenberg et al., 2010 ; Séné et al., 2012 ; Bakhoum et al., 2014) corroborent cette observation. Ces auteurs ont montré une large présence de rhizobia appartenant aux genres *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* et *Rhizobium* dans la plupart des sols tropicaux. Dans le groupe des *Mesorhizobium*, la plupart des souches ont été proches des souches type de *Mesorhizobium plurifarum* LMG11892 (AF345263) et de *Mesorhizobium huakuii* LMG14107^T(AF345259). Ces résultats confirment une large diffusion de l'espèce *Mesorhizobium plurifarum* à travers les tropiques (de Lajudie et al., 1998). Les séquences ITS de l'ADNr ont montré une diversité évidente entre les souches de *Ensifer* sp. De nombreuses études rapportent qu'une forte proportion de rhizobia formant des nodosités avec des arbres en Afrique, en particulier des *Acacia* spp., sont plus étroitement liés aux espèces du genre *Ensifer* (Romdhane et al., 2006).

Les données disponibles concernant la répartition des 14 profils des ITS ont montré une structuration de la diversité des rhizobia en fonction des saisons. Certaines souches de rhizobia résistantes à la sécheresse, peuvent dominer dans le sol et s'associer avec la plante hôte (McIntyre et al., 2007). D'autres travaux ont montré que le manque d'eau et la sécheresse affectent directement la persistance, la survie et la diversité génétique des rhizobia dans le sol (Mnasri et al., 2007 ; Graham, 1992). Une analyse en composantes principales a confirmé que la diversité des rhizobia isolés de la rhizosphère de *P. juliflora* et de *S. robustus* et des sols hors du couvert végétal, était structurée par les paramètres chimiques des sols. Ainsi, la variation de la disponibilité des éléments nutritifs du sol peut avoir une influence sur les microorganismes. Certaines souches de rhizobia sont fortement liées à la conductivité électrique, au pH et P des sols. Ces résultats suggèrent qu'il existe des souches de rhizobia adaptées à des niveaux de salinité et de sodicité élevés. Une corrélation positive entre la conductivité électrique et la teneur en P ($r= 0,99$ et $P < 0,001$) laisse supposer que sous stress salin, la quantité de P allouée aux plantes par les rhizobia est fortement réduite. Ceci pourrait être lié aux effets négatifs de la salinité sur le processus d'établissement de la symbiose et de

l'initiation nodulaire. L'augmentation des valeurs de pH en fonction de la salinité indique une disponibilité des ions Na^+ au détriment des ions H^+ . Contrairement au P, le N est négativement corrélé à la conductivité électrique ($r = -0,98$ et $P < 0,001$). Ces résultats suggèrent qu'en condition de stress salin, les plantes optimisent leur développement par l'utilisation de N disponible dans le sol.

La majorité des souches isolées des sols sous *S. robustus* et *P. juliflora* ont été communes à ces deux espèces végétales. Ces résultats suggèrent que *S. robustus* et *P. juliflora* partagent un cortège rhizobien.

Dans cette étude, l'indice de diversité de Shannon et de Simpson ont été plus faibles dans les sols à 28,82‰ et 10,08‰ de salinité respectivement en saisons sèche et humide. Ces résultats indiquent un effet négatif de la salinité sur la diversité des populations de rhizobia. Ces résultats sont confortés par des travaux antérieurs qui ont montré un effet délétère de la salinité sur la diversité des rhizobia (Zahran, 1991, 1999). L'analyse de la diversité bêta a montré une variabilité de la structure des populations des rhizobia entre les niveaux de salinité. En effet en saison humide, les communautés de 10,08‰ de salinité ont été plus éloignées de celles de 1,60‰. Par contre, les communautés de 1,60‰ ont été plus proches de celles de 2,43‰. Le même constat a été noté en saison sèche. Ces résultats suggèrent que deux sites proches partagent des génotypes similaires. Une situation comparable a été décrite dans les travaux de Rahi et al. (2012). Contrairement à la diversité, l'abondance relative des populations de rhizobia a augmenté avec la salinité. Ces résultats indiquent que quelques espèces de rhizobia isolés des sols à forts taux de salinité ont été capables de se multiplier et de coloniser les sols sous couvert végétal.

Les amorces qui ont pu être définies sur la base des zones conservées au sein des gènes de nodulation connus n'ont pas permis d'amplifier les séquences *nodA* ou *nodC* des souches de *Burkholderia* LCM4572 et de *Rhizobium* (LCM4573, LCM4581 et LCM4582) isolées de la rhizosphère de *S. robustus*, *P. juliflora* et de sols hors du couvert végétal. Ces observations laissent supposer que les gènes de nodulation de ces souches possèdent des séquences particulières à ce groupe de spécificité d'hôtes. Il ressort de nos résultats que les souches de rhizobia formant des nodosités avec *A. seyal* et *P. juliflora*, ont des gènes symbiotiques assez proches. D'autres travaux basés sur un plus grand nombre d'isolats ont conclu que la phylogénie du gène *nifH* était globalement similaire à celle des gènes de nodulation (Vinuesa et al., 2005 ; Zhang et al., 2012). Toutefois, les gènes symbiotiques n'ont pas été corrélés au

gène 16S et à l'IGS 16S-23S. Ce constat est en accord avec ceux des travaux menés par de Mergaert et al. (1997) et Suominen et al. (2001) qui ont montré que les marqueurs taxonomiques ne fournissent aucune information sur les propriétés symbiotiques des rhizobia et que la dissémination des gènes de nodulation résulte de transferts latéraux entre les populations de rhizobia.

Une grande diversité à la résistance aux antibiotiques, aux pH et à la salinité des rhizobia a été mise en évidence dans cette étude. La diversité au sein des populations de rhizobia pourrait leur permettre de s'adapter à des environnements différents pour la survie et la nodulation. Ces résultats corroborent ceux de Diouf et al. (2008) et Fall et al. (2008). Les antibiotiques sont inhibiteurs de la synthèse des protéines et de membrane plasmique, notamment la kanamycine qui s'est révélée le plus néfaste sur la croissance des souches. En effet, moins de 25% des souches ont pu croître avec la kanamycine à des concentrations supérieures à 25µg/ml. Dans les travaux de Zerhari et al. (2000), la kanamycine s'est révélé l'antibiotique le plus inhibiteur de la croissance de quelques souches capables de former des nodosités avec des espèces d'*Acacia* au Maroc. Graham et al. (1991) ont rapporté que l'effet inhibiteur d'un antibiotique dépend de sa nature et de sa concentration dans le milieu et que le degré d'inhibition est variable d'une espèce à une autre et d'une souche à l'autre. Toutes les souches de rhizobia ont montré une grande tolérance à l'ampicilline. La sélection de souches présentant une résistance multiple aux différents antibiotiques est très intéressante du fait que cette résistance peut être utilisée comme un important marqueur pour l'identification des souches et l'étude de leur diversité (Sawada et al., 1990).

Les souches de rhizobia isolées des sols échantillonnés tolèrent une large gamme de pH variant entre 5 et 10. Nos résultats sont en accord avec ceux de Yadav et Vyas (1971) qui ont montré qu'une vingtaine de souches isolées de huit espèces différentes de légumineuses ont pu tolérer des pH élevés de l'ordre de 10 sous des conditions non salines. Au pH 4, seule la souche LCM4581 est capable de se développer. Ainsi, les souches de rhizobia ont manifesté une sensibilité à des valeurs de pH inférieures à 5. Selon Jordan (1984), les rhizobia sont sensibles à des pH inférieurs à 4,5.

Les souches étudiées se sont avérées très tolérantes à des concentrations élevées en NaCl. Zerhari et al. (2000) ont montré que des souches formant des nodosités avec *Acacia*, *Prosopis* et *Leucaena* se sont révélées tolérantes à 500 mM et 850 mM NaCl. Les limites de tolérance à la salinité entre les rhizobia peuvent varier considérablement d'une espèce à une autre (Elsheikh et Wood, 1989). Les souches de *Ensifer* sont plus tolérantes à la salinité comparées

aux souches de *Mesorhizobium*. Ces résultats sont confortés par les travaux de Odee et al. (1997) qui ont montré que les souches à croissance rapide sont plus tolérantes à la salinité. Cette grande aptitude à la tolérance au sel des souches de rhizobia peut être un atout pour leur survie mais également pour leur performance symbiotique en conditions de stress salin. Cependant, dans les environnements salins, la symbiose rhizobia-légumineuse dépend non seulement du microorganisme mais également de la plante hôte.

L'augmentation de la concentration en NaCl du milieu de culture a diminué significativement le taux de nodulation, le poids sec des nodosités, la production de biomasse et la fixation symbiotique de l'azote des plantes d'*A. seyal* et *P. juliflora*. Certains auteurs ont rapporté des effets dépressifs du NaCl sur la croissance d'espèces agroforestières (Diouf et al., 2005; Mills, 2006). Toutefois, nos résultats ont montré un effet positif de l'inoculation avec la souche de *Ensifer* LCM4579 sur les paramètres de croissance et de nodulation et sur la fixation d'azote des plantes d'*A. seyal* et *P. juliflora*. Plusieurs études ont démontré que l'inoculation des légumineuses par des souches de rhizobia tolérantes au sel peut améliorer la nodulation et la fixation de l'azote en conditions de stress salin (Diouf et al., 2005; Lal et Khanna, 1994). Ces études soulignent que les souches de rhizobia tolérantes au sel peuvent former des nodosités avec des légumineuses ligneuses modérément tolérantes au sel et former des symbioses fixatrices d'azote efficaces dans des sols salins. Certains auteurs suggèrent que l'efficacité de la symbiose rhizobium-légumineuse en sols salins est obtenue lorsque les deux partenaires sont résistants au stress salin (Cordovilla et al., 1995). Nos résultats ont montré que les souches les plus efficaces sur les plantes d'*A. seyal* et *P. juliflora* en absence de sel semblent être les plus efficaces après application du stress salin sur la croissance, la nodulation et la fixation d'azote de ces espèces végétales. Contrairement aux plantes de *P. juliflora*, toutes les plantes d'*A. seyal* ont formé des nodosités, quel que soit le niveau de NaCl. Les souches de *Burkholderia* LCM4572 et *Rhizobium* (LCM4573, LCM4581 et LCM4582) ont été capables d'initier la formation de nodosités sur *A. seyal* alors qu'il n'a pas été possible d'amplifier et de caractériser les gènes de nodulation *nodA* et *nodC* de ces souches. Cela pourrait signifier que la relation entre *A. seyal* et sa bactérie symbiotique est très spécifique et implique des gènes *nodA* et *nodC* très particuliers. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les amorces utilisées ne permettent pas d'amplifier les séquences de ces gènes. Toutefois ces souches ne fixent pas d'azote, ce qui est en accord avec les résultats du séquençage du gène *nifH*. Il faut noter que la LCM4572 est affiliée au genre *Burkholderia* qui nodule pour l'essentiel des espèces du genre *Mimosa*.

4.5. CONCLUSION

En s'appuyant sur nos résultats, discutés ci-dessus, nous pouvons conclure que la diversité génétique des rhizobia associés à la rhizosphère de *Sporobolus* et *Prosopis* et hors du couvert végétal était importante et structurée en fonction de la saison et du gradient de salinité. Les rhizobia identifiés appartiennent aux genres *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* et *Burkholderia*. La salinité a eu un effet négatif sur les indices de diversité de Shannon et Simpson. L'étude de la diversité symbiotique des rhizobia a montré que la phylogénie des gènes de nodulation était semblable à celle du gène *nifH*.

Les souches isolées sous *S. robustus*, *P. juliflora* et hors du couvert végétal ont été capables de pousser sur une gamme assez large de pH allant de 5 à 10. Les souches de *Burkholderia* LCM457 et *Rhizobium* LCM4573 ont toléré jusqu'à 700 mM de NaCl. Quant aux souches de *Ensifer* (LCM4571 et LCM4579), elles ont pu tolérer des concentrations en NaCl allant jusqu'à 600 mM de NaCl. Le niveau de tolérance le plus élevé des souches de *Mesorhizobium* est de 400 mM de NaCl.

L'inoculation des plants de *A. seyal* et *P. juliflora* avec les souches de rhizobia en condition de stress salin, a montré un effet négatif de la salinité sur les paramètres de croissance et de nodulation et sur la fixation d'azote de ces légumineuses. Toutefois, certaines souches notamment la LCM4579 (*Ensifer*) a eu un effet bénéfique sur *A. seyal* et *P. juliflora*. En effet la LCM4579, commune à *S. robustus* et *P. juliflora*, a amélioré la production de biomasse sèche et la fixation d'azote des légumineuses.

Ainsi, *S. robustus* héberge dans sa rhizosphère des bactéries efficaces sur les légumineuses. Cette graminée est un bon indicateur de biofonctionnement des sols. Aussi, les rhizobia étaient plus abondants dans les sols sous *S. robustus* que dans les sols hors du couvert végétal. *S. robustus* a augmenté ou du moins maintenu des populations de rhizobia. La majorité des souches identifiées ont été partagées entre *S. robustus* et *P. juliflora*. Parallèlement aux rhizobia, des CMA ont été identifiés sur les racines de *S. robustus* et *P. juliflora*. Les CMA sont des symbiotes fongiques souvent nécessaires à la fixation d'azote. De ce fait, nous avons jugé nécessaire d'identifier les CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* et d'étudier la diversité et la structure de ces symbiotes fongiques en fonction de la salinité et des saisons.

Chapitre 5 **Diversité et structure génétique des communautés de champignons mycorrhiziens à arbuscules (CMA) de *Sporobolus robustus* Kunth et *Prosopis juliflora* (SW) DC le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide**

5.1. INTRODUCTION

La salinisation est l'un des principaux facteurs de dégradation des terres surtout dans les zones aride et semi-aride (Evelin et al., 2009 ; Ruiz-Lozano et al., 2012 ; Porcel et al., 2012). La salinité affecte l'établissement, la croissance et le développement des plantes (Evelin et al., 2009). Dans le Delta du Sine et du Saloum au Sénégal, *Sporobolus robustus* est une graminée halophyte pérenne, dominant la strate herbacée (Fall et al., 2015). *S. robustus* constitue une source de fourrage pour le bétail transhumant en période de soudure. Elle est généralement associée à *Prosopis juliflora*, une légumineuse moins tolérante à la salinité et utilisée comme bois de service et de combustible. Dans le Delta du Sine et du Saloum au Sénégal, de jeunes plants de *P. juliflora* émergent souvent des touffes de *S. robustus*. La graminée halophyte pourrait agir comme plante nurse pour l'établissement de jeunes plants de *P. juliflora* moins tolérants à la salinité. L'effet bénéfique de *S. robustus* sur *P. juliflora* pourrait provenir de l'augmentation du potentiel mycorrhizien du sol et/ou de la présence d'un cortège de champignons mycorrhiziens à arbuscules (CMA) plus diversifié chez la graminée qui renforcerait la tolérance de la légumineuse à la salinité. La croissance et la productivité des plantes dans les écosystèmes sont, en effet, influencés de façon importante par la diversité des CMA (van der Heijden et al., 1998). Les plantes, dans leur environnement naturel, sont souvent colonisées par des CMA qui constituent une composante microbienne symbiotique importante des écosystèmes terrestres naturels ou cultivés. Ils sont adaptés aux environnements salins (Giri et al., 2003 ; Smith et Read 2008). Des études ont montré que les CMA confèrent à la plante hôte une forte tolérance à la salinité (Ruiz-Lozano et al., 2011; Dodd et Ruiz-Lozano, 2012; Mbadi et al., 2015). La tolérance au stress salin des plantes mycorrhizées est attribuée, en général, à une meilleure nutrition hydrominérale. Le mycélium extra-racinaire des CMA permet à la plante d'augmenter sa capacité d'absorption des minéraux (ex. P, N, Cu, Fe, Zn) et de l'eau (Al-Karaki, 2000). Les plantes tolérantes au sel

sont généralement plus fortement colonisées par les CMA que les plantes sensibles (Al-karaki et al., 2001).

La morphologie des spores a été utilisée comme outil pour identifier les CMA mais cette approche présente des limites (Hart et al., 2015). Certains CMA sporulent abondamment dans certaines conditions ou pendant certaines périodes de l'année et cessent de sporuler dès que les conditions changent (Redecker et al., 2003). L'étude de la diversité des communautés et des populations de CMA a évolué passant du comptage des spores et de leur identification par des critères morphologiques à des méthodes moléculaires basées sur l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) d'extraits d'ADN racinaires. Il existe plusieurs gènes utilisés comme marqueurs et différentes amorces plus ou moins spécifiques leur correspondant (Thiery et al., 2016). L'opéron ribosomal nucléaire des gènes codant les ARNr, qui existe en plusieurs copies, comprend la petite sous-unité (SSU) avec un ARNr (18S) et la grande sous-unité (LSU) avec trois ARNr (5S, 28S et 5,8S), séparées par des espaceurs transcrits ITS1 et ITS2 qui sont des régions très variables (Hart et al., 2015). Bien que les régions de l'opéron soient largement utilisées comme marqueurs chez les CMA, aucune d'entre elles ne constitue un code barre génétique satisfaisant pour toutes les lignées de *Glomeromycota* (Öpik et al., 2014). Le choix des marqueurs pour les CMA fait encore l'objet de controverses. Cependant, un consensus se dégage sur le choix de la SSU pour comparer les communautés de CMA dans les écosystèmes. Au moins trois raisons à cela : (i) l'existence d'amorces spécifiques, (ii) la taille de l'amplicon est adaptée au séquençage haut débit, (iii) la base de données en séquences est plus exhaustive que celles de la LSU et de l'ITS. Le marqueur SSU a été utilisé avec succès dans la description de la composition des communautés de CMA dans des systèmes écosystèmes naturels (Grilli et al., 2015 ; Sara Varela-Cervero et al., 2015).

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier suivant un gradient de salinité et des saisons, (i) la densité et la diversité morphologique des spores de CMA se développant dans la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* et (ii) la diversité génétique des CMA dans les racines de *S. robustus* et *P. juliflora*.

5.2. MATERIEL ET METHODES

5.2.1. Echantillonnage de sols et racines

Des prélèvements de sols rhizosphériques et de racines ont été réalisés sur trois individus de

S. robustus et *P. juliflora* dans chacune des 4 parcelles délimitées le long d'un gradient de salinité en saisons sèche et humide (voir chapitre 4). Le gradient de salinité a varié entre 0,40 et 11,21‰ (0,82 et 18,72 mS/cm) en saison humide et entre 0,81 et 27,75‰ (1,36 et 41,59 mS/cm) en saison sèche. Les racines prélevées ont été rincées puis séchées et conservées dans du Silicagel pour l'évaluation des taux de mycorhization et la caractérisation moléculaire des CMA. Les échantillons de sols ont servi à l'évaluation du potentiel infectieux mycorhizogène et à l'extraction des spores.

5.2.2. Potentiel mycorhizogène du sol et mycorhization de *S. robustus* et *P. juliflora*

Le potentiel infectieux mycorhizogène des sols a été estimé par la méthode MPN (voir chapitre 2).

Les spores ont été extraites par la méthode du tamisage humide puis dénombrées sous une loupe binoculaire (voir chapitre 2). Les spores ont été triées sous la loupe binoculaire suivant la taille, la forme, la couleur et certaines caractéristiques de la paroi (ex. nombre de couches, hyphes suspenseur, bouclier de germination). Les spores morphologiquement identiques ont été montées entre la lame et lamelle dans une goutte de PVLG (polyvinyl polypyrrolidone) additionné du réactif de Melzer et observées en microscopie optique. Les prises de photos ont été effectuées grâce au logiciel Cell P. Les caractères morphologiques des spores ont été comparés à la base de données de l'INVAM (*International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal fungi*) (<http://invam.caf.wvu.edu>).

Les racines ont été colorées au bleu de Trypan et la mycorhization évaluée selon la méthode de Philips and Hayman, 1970) (voir chapitre 2).

5.2.3. Diversité génétique des CMA des racines de *P. juliflora* et *S. robustus*

5.2.3.1. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN de CMA à partir de racines de *S. robustus* et *P. juliflora* a été effectuée avec le kit « Fast DNA SPIN Kit ». Dans le cas de notre étude, 80 mg de racines fraîches ont été introduites dans des tubes à matrice de lyse A. Dans chaque tube contenant un échantillon de racine, ont été ajoutés respectivement 800 µl de solution de lyse CLS-VF (Cell Lysis/DNA Solubilizing) et 200 µl de solution PPS (Protein Precipitation Solution). Le mélange a été homogénéisé avec le broyeur Fast Prep pendant 40 s à la vitesse de 6,0 m/s. Le broyat a été centrifugé à 14000 tours par min pendant 10 min. Le surnageant obtenu (environ 800 µl) a été

transféré dans un microtube de 2 ml auquel un volume égal d'une solution de matrice de liaison (800µl) a été ajouté. Le surnageant et la matrice de liaison ont été bien mélangés par inversion des tubes puis le mélange a été incubé pendant 5 min à la température ambiante. Le mélange a été transféré sur un filtre SPIN contenu dans un tube de capture puis centrifugé à 14000 tours par min pendant une min. Le culot obtenu a été dissout avec 500 µl de solution de lavage SEW-M. Une nouvelle centrifugation a été effectuée à 14000 tours/min pendant une min puis le tube de capture a été vidé à nouveau. Ensuite 100 µl de solution DES (DNase/Pyrogen-Free Water) ont été soigneusement déposés sur la matrice de liaison au dessus du filtre SPIN. Les tubes ont été incubés pendant 5 min à 55°C puis centrifugés à 14000 tours par min. L'ADN obtenu a été conservé à -20°C.

5.2.3.2. Amplification par PCR et séquençage

Un fragment d'ADN (600 pb) de la petite sous-unité ribosomale (18S) a été amplifié en utilisant les amorces suivantes :

NS31-i ; 5-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3' (modifié par Santos-Gonzalez, 2007) et AML2-i ;

5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAACCCAAACACTTTGGTTTCC-3'

(modifié par Lee et al., 2008). Les réactions d'amplification PCR ont été réalisées avec le kit Go-Taq DNA polymérase (Promega) dans un volume de 25 µl. Chaque réaction comprenait 5 µl de tampon (5X Green Go-Taq Reaction Buffer), 2 µl de dNTPs (10 mM de chaque dNTP), 0,2 µl de Go-Taq DNA polymérase (1 Unité totale), 0,625 µl de chaque amorce (front et reverse) (20 pmol/µl), 0,5 µl de BSA (200 ng/µl), 2 µl d'extrait ADN (15 ng/µl) et 14 µl d'eau ultrapure stérile. Un témoin négatif sans ADN a été utilisé pour servir de contrôle négatif de la PCR. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) selon le programme suivant: dénaturation initiale (94°C, 3 min), suivie de 30 cycles de dénaturation (94°C, 30 s), d'hybridation des amorces (58°C, 1 min) et d'élongation (72°C, 1 min 20 s) et une élongation finale (72°C, 10 min). Les produits PCR ont été visualisés par électrophorèse horizontale sur un gel d'agarose de 1% (p/v) dans un tampon TAE (Tris Acetate EDTA) 1X, puis photographiés sous lumière UV. Le gel a été coloré avec du BET (1 mg ml⁻¹). Le marqueur de taille Smartladder (Eurogentec) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le séquençage Illumina Miseq de la région 18S a été réalisé par la société Genotoul (Toulouse, France) en utilisant les amorces NS31i et AML2i.

5.2.3.3. Traitement des données de séquençage

Les données de séquençage illumina ont été analysées avec le logiciel Mothur (Schloss et al., 2011). Les séquences ont été débruitées et celles inférieures à 200 pb ou présentant des bases ambiguës ont été éliminées. Une étape de pré-clusterisation (Huse et al., 2010) a été réalisée pour éliminer les séquences dont la présence serait liée aux erreurs de séquençage. Les chimères ont été détectés et éliminés à l'aide de la commande Uchime (Edgar et al., 2011) du logiciel Mothur. Toutes les séquences non redondantes (les singletons) ont été éliminées car elles présentent le risque de correspondre à des séquences artificielles. Les séquences ont ensuite été classées en utilisant une base de données d'alignement Silva-compatible et celles n'appartenant pas aux *Glomeromycota* ont été éliminées. Le regroupement des séquences en OTU (Operational Taxonomic Unit) a été réalisé avec les commandes de clusterisation installées dans Mothur. Les OTU correspondent aux séquences ayant 3% de divergence (97% de similarité) ont été regroupées. Le nombre de séquences entre les échantillons a été normalisé avec la commande « sub-sample ». L'étape de sous échantillonnage permet de réduire le nombre d'OTU parasite et d'avoir une estimation robuste de la diversité alpha et bêta. Les affiliations taxonomiques sont basées sur le « k-nearest neighbor consensus » et la méthode de Wang et al. (2007) avec le logiciel Mothur (fonction Classify.seqs). Les séquences de références sont tirées de la base de Krüger et al. (2012). Ainsi, à partir du jeu de données obtenu (161 232 séquences regroupées en 5279 OTU), plusieurs analyses ont été effectuées. La diversité (Shannon, Simpson, taux de recouvrement), la richesse (Nombre d'OTU, Chao) et l'Equitabilité ont été calculées avec le logiciel Mothur. Les OTU indicatrices de la salinité, saison et plante ont été déterminées avec le logiciel R en utilisant le package « Indicspecies » et la fonction « multipatt ». Le modèle utilisé pour estimer les OTU indicatrices est le modèle inval.g (De Caceres et al., 2010).

5.2.4. Analyses statistiques

Les données sur les caractéristiques chimiques des sols, le potentiel infectieux mycorhizogène des sols, la densité des spores et le taux de mycorhization ont été soumises à une analyse de variance ANOVA à trois facteurs (salinité, saison et plante) en utilisant le test de Tukey HSD ($P < 5\%$). La structure des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* a été analysée par la PERMANOVA en utilisant le logiciel R. La PERMANOVA ou analyse de la variance par permutation (Anderson, 2005) est une analyse statistique non paramétrique qui ne

nécessite pas la transformation des données lorsque la normalité des résidus et l'homogénéité de la variance ne sont pas vérifiées. La comparaison de la structure des communautés de CMA, entre paire de niveaux de salinité, entre saison sèche et saison humide à chaque niveau de salinité et entre *P. juliflora* et *S. robustus* à chaque niveau de salinité, a été analysée par la PERMANOVA. L'analyse de variance (ANOVA) a permis de comparer la diversité alpha des communautés de CMA en fonction de la salinité et de la saison en utilisant le test de Tukey HSD ($p < 0,05\%$). Toutes les analyses ANOVA ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT version 2010.

5.3. RESULTATS

5.3.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols

Les caractéristiques physiques des sols sont représentées dans le chapitre 4.

Les valeurs des différents paramètres chimiques mesurés par niveau de salinité (Tableau 19), correspondent à la moyenne des valeurs obtenues pour *S. robustus* et *P. juliflora* en saisons sèche et humide. Les résultats ont montré que tous les paramètres mesurés, à l'exception de la teneur en N et P, ont augmenté avec la salinité. La salinité et le N assimilable étaient plus élevés en saison sèche alors que le pH était plus important en saison humide. Les autres paramètres ne varient pas avec la saison. Les sols rhizosphériques de *S. robustus* ont des valeurs de pH, de salinité et de N assimilable plus élevées comparés aux sols sous *P. juliflora*. Les autres paramètres ne varient pas avec la plante.

Tableau 19. Quelques caractéristiques chimiques des sols de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* selon la salinité et la saison.

Facteurs testés	pH	Conductivité électrique	Salinité	N assimilable	N total	P assimilable	P total	C total	C/N
		mS/cm	‰	mg/kg	%	mg/kg	mg/kg	%	
Salinité (‰)									
0,61	6,52 ^c	1,09 ^c	0,61 ^c	1,88 ^b	0,10 ^b	4,75 ^c	126,66 ^b	1,17 ^b	11,49 ^b
1,18	6,82 ^c	2,05 ^{bc}	1,18 ^c	1,95 ^b	0,11 ^{ab}	6,50 ^{bc}	126,00 ^b	1,33 ^{ab}	11,41 ^b
6,09	7,43 ^b	10,15 ^b	6,09 ^b	2,11 ^{ab}	0,13 ^a	9,00 ^b	172,75 ^a	1,58 ^a	11,75 ^{ab}
19,49	8,12 ^a	30,16 ^a	19,49 ^a	2,35 ^a	0,09 ^b	12,25 ^a	183,75 ^a	1,19 ^b	12,29 ^a
Saison									
Sèche	6,94 ^b	14,73 ^a	9,50 ^a	3,37 ^a	0,18 ^a	8,25 ^a	148,00 ^a	1,34 ^a	11,56 ^a
Humide	7,51 ^a	6,99 ^b	4,19 ^b	0,77 ^b	0,11 ^a	8,00 ^a	156,58 ^a	1,29 ^a	11,91 ^a
Plante									
<i>S. robustus</i>	7,33 ^a	14,72 ^a	9,41 ^a	1,76 ^b	0,11 ^a	8,04 ^a	149,83 ^a	1,35 ^a	11,60 ^a
<i>P. juliflora</i>	7,12 ^b	7,01 ^b	4,27 ^b	2,38 ^a	0,10 ^a	8,29 ^a	154,75 ^a	1,29 ^a	11,87 ^a

Pour chaque colonne et pour chaque facteur, les données suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD ($P < 0.05$).

5.3.2. Potentiel infectieux mycorrhizogène des sols

Les données sur le potentiel infectieux mycorrhizogène (valeurs de MPN) des sols de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* sont représentées dans le tableau 20. A la salinité de 19,49‰, les MPN des sols sous *S. robustus* et *P. juliflora* n'ont pas pu être déterminés. En effet, à ce taux de salinité, la plante piège (*S. robustus*) n'a pas pu se développer. Toutefois, la salinité n'a pas affecté le potentiel mycorrhizogène. Les valeurs de MPN ont été comparables en saisons humide et sèche. Les sols sous *S. robustus* ont eu en moyenne le même nombre de propagules que les sols sous *P. juliflora*.

Tableau 20. Impact des trois facteurs (salinité, saison et plante) sur le nombre le plus probable de propagules (MPN) des sols de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora*.

Facteurs testés	MPN/100 g de sol	Intervalle de confiance (95%)
Salinité (‰)		
0,61	(22,00) x 10 ⁴	(82,28 – 375,98) x 10 ⁴
1,18	(13,75) x 10 ⁴	(51,42 – 234,98) x 10 ⁴
6,09	(13,11) x 10 ⁴	(49,03 – 224,04) x 10 ⁴
19,49	nd	nd
Saison		
Sèche	(14,74) x 10 ⁴	(55,12 – 251,90) x 10 ⁴
Humide	(17,83) x 10 ⁴	(66,68 – 304,71) x 10 ⁴
Plante		
<i>S. robustus</i>	(17,66) x 10 ⁴	(66,04 – 301,80) x 10 ⁴
<i>P. juliflora</i>	(14,91) x 10 ⁴	(55,76 – 254,81) x 10 ⁴

Pour chaque facteur, les valeurs de MPN ont été comparées à partir des intervalles de confiance (95%) ; nd= non déterminé

5.3.3. Nombre et diversité morphologique des spores de CMA

Le nombre de spores des sols de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* a significativement augmenté avec la salinité (Tableau 21). Le nombre de spores a été plus élevé en saison sèche qu'en saison humide. La densité des spores n'a pas varié avec la plante. La caractérisation morpho-anatomique des spores a révélé la présence de CMA appartenant aux genres *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Acaulospora* et *Glomus*. Les spores du genre *Gigaspora*

sont de couleur jaune, globuleuse (Figure 30a). De grandes tailles (diamètre compris entre 260-400µm), elles possèdent un hyphe suspenseur bulbeux pouvant atteindre 236 µm de long. La membrane est constituée de trois couches notées de l'extérieur vers l'intérieur de L1 à L3 (Figure 30b).

Les spores de *Scutellospora* sont de grande taille (diamètre compris entre 160-363 µm) et visibles à l'œil nu (Figure 31a). Elles sont sphériques à subsphériques, de couleur brun foncé à noire et présentent un bulbe suspenseur et un bouclier de germination. Trois couches ont été observées dans la paroi en microscopie photonique (Figure 31b).

Les spores de *Glomus* sp sont de petite taille (diamètre compris entre 75-120 µm) et de couleur marron. La paroi présente deux couches (Figure 32a). *Acaulospora* sp présente deux couches avec des pores sur la paroi et des saccules (Figure 32b).

Tableau 21. Impact des trois facteurs (salinité, saison et plante) sur le nombre de spores et la mycorhization de *P. juliflora* et *S. robustus*.

Traitements	Nombre de spores (/100 g de sol)	Mycorhization (%)
Salinité (%)		
0,61	6,16±0,85 ^b	31,46±2,52 ^a
1,18	23,83±3,55 ^b	14,67±1,75 ^b
6,09	69,16±13,15 ^a	16,00±1,82 ^b
19,49	65,00±14,76 ^a	21,40±4,30 ^b
Saison		
Sèche	47,45±12,44 ^a	17,41±2,73 ^b
Humide	34,62±9,87 ^b	24,35±3,20 ^a
Plante		
<i>S. robustus</i>	41,62±11,06 ^a	12,72±1,97 ^b
<i>P. juliflora</i>	40,45±11,55 ^a	29,05±3,01 ^a

Pour chaque colonne et pour chaque facteur, les données suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD ($P < 0.05$).

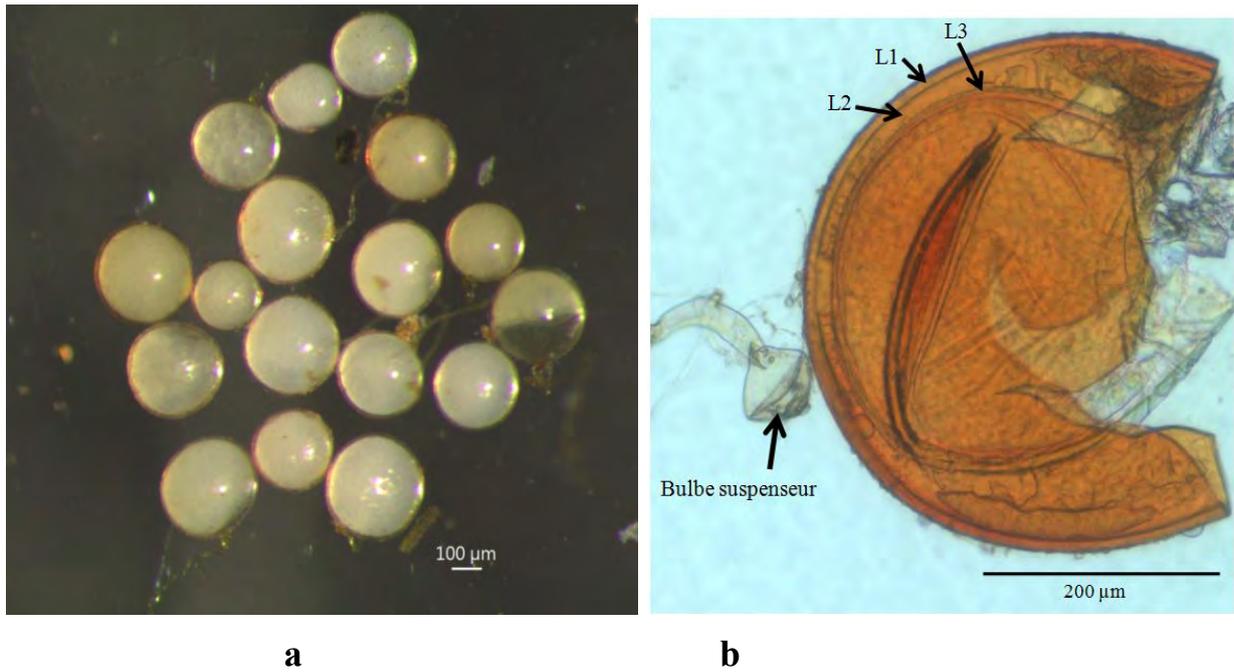


Figure 30. Morphologie (a) et structure de la paroi (b) des spores de *Gigaspora* sp.

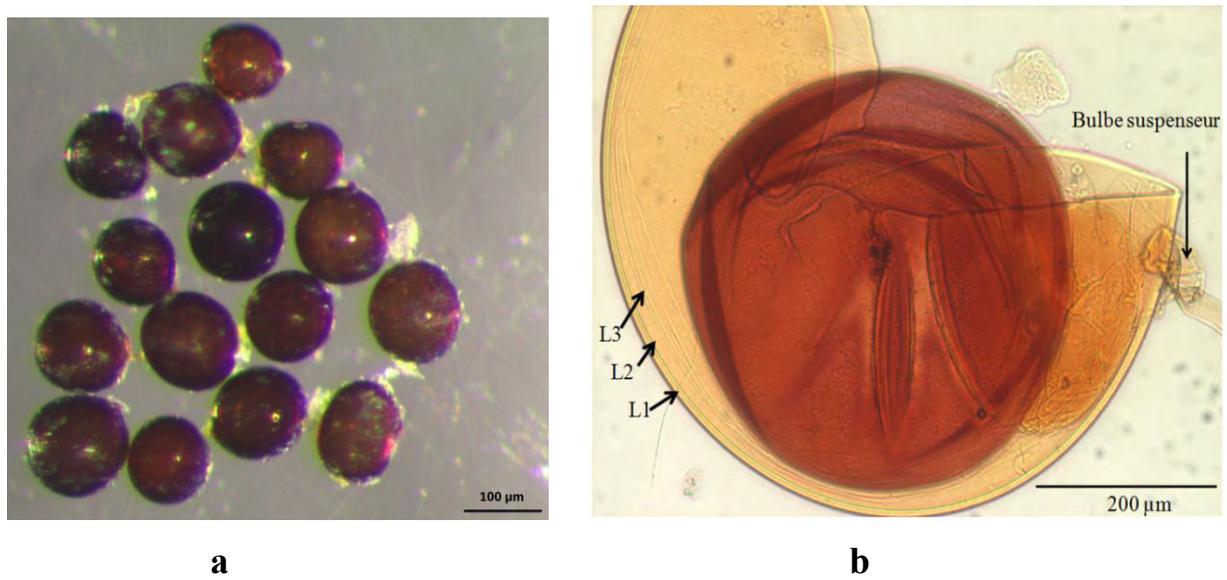


Figure 31 . Morphologie (a) et structure de la paroi (b) de spores de *Scutellospora* sp.

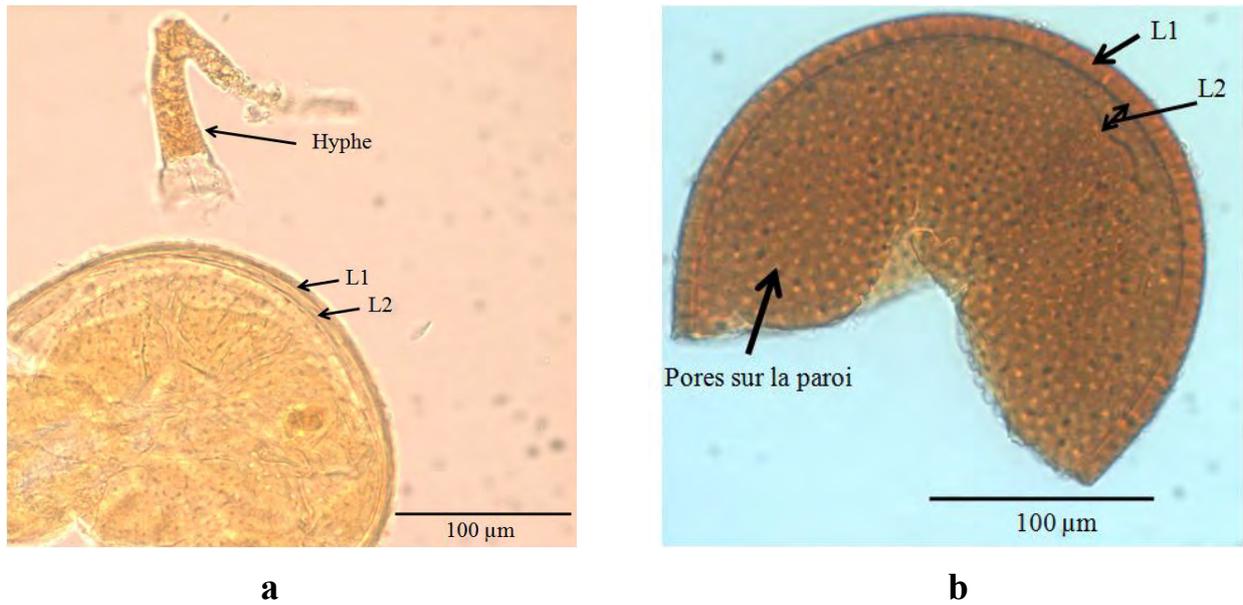


Figure 32. Structure de la paroi des spores de *Glomus* sp (a) et de *Acaulospora* sp (b).

5.3.4. Mycorhization de *S. robustus* et *P. juliflora*

L'intensité de mycorhization de *S. robustus* et *P. juliflora* a été négativement affectée par la salinité (Tableau 4). La mycorhization de ces deux espèces a été plus faible en saison sèche qu'en saison humide. La mycorhization de *P. juliflora* a été supérieure à celle de *S. robustus*.

5.3.5. Diversité génétique des CMA de *S. robustus* et *P. juliflora*

Les résultats ont montré une grande diversité génétique de CMA de *S. robustus*, *P. juliflora*. Toutefois, la diversité génétique des populations de CMA a été uniquement structurée par la salinité (Tableau 5).

5.3.5.1. Distribution des OTU et composition des communautés de CMA

Les 161 232 séquences obtenues ont été regroupées dans 5279 OTU. La famille *Glomeraceae* était majoritaire avec 77.1% des OTU (Figure 33) suivie de *Diversiporaceae* (6%), *Paraglomeraceae* (4,8%), *Acaulosporaceae* (4,4%) et *Gigasporaceae* (3,7%) (Figure 33). Environ 55% des familles ont affiliés à moins de 2% des OTU (Figure 33).

Le genre le plus représenté était *Rhizophagus* (34,4%), suivi par *Incertae-sedis* (20,3%), *Sclerocystis* (11,2%), *Redeckera* (5,3%), *Glomus* (5,2%), *Paraglomus* (4,8%) et *Acaulospora* (4,4%) (Figure 35). Environ 67% des genres ont été affiliés à moins de 2% des OTU (Figure 34).

(a) Famille

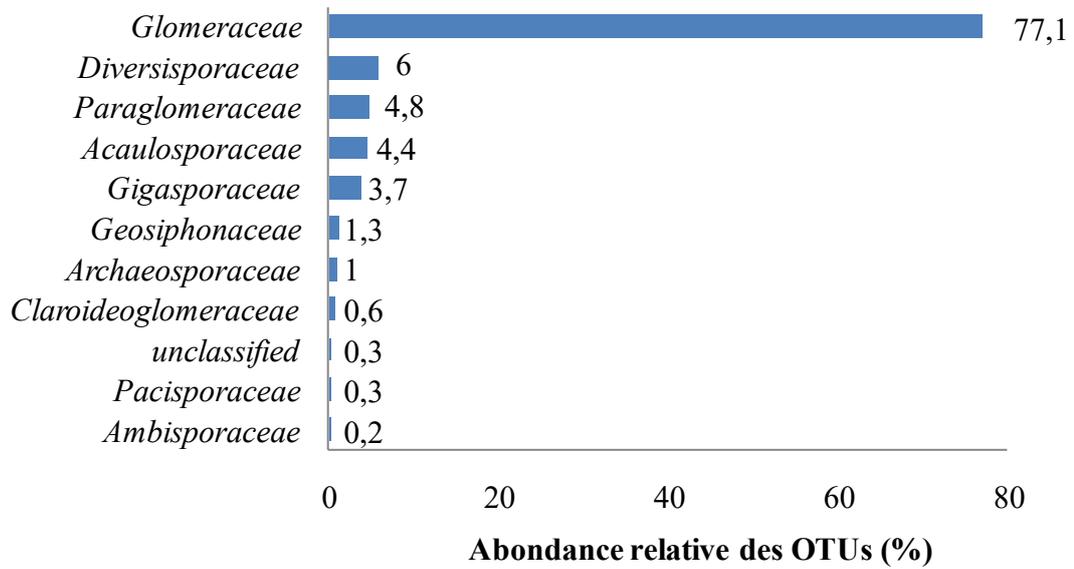


Figure 33. Distribution des OTU dans les différentes familles de CMA.

(b) Genre

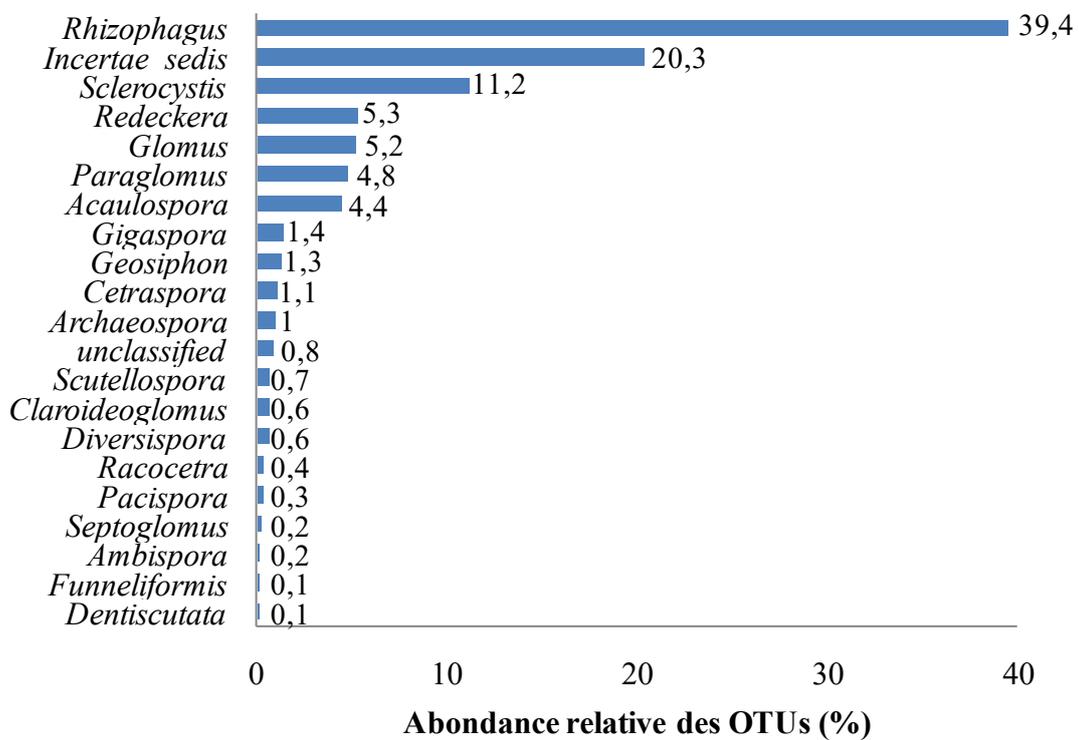


Figure 34. Distribution des OTU dans les différents genres de CMA.

5.3.5.2. Distribution des communautés de CMA suivant la salinité, la saison et la plante

Les résultats de la PERMANOVA ont mis en évidence l'effet de la salinité, de la saison, de la plante et de leurs interactions sur la structure des communautés de CMA (Tableau 22). Seule la salinité a eu un impact significatif sur la structure des communautés de CMA. La salinité apparaît donc comme le facteur structurant les communautés de CMA des deux plantes.

Tableau 22. Impact des trois facteurs (salinité, saison et plante) et de leurs interactions sur la structure des communautés de CMA de *Prosopis* et *Sporobolus*. df= degré de liberté ; SS= somme des carrés ; R²= coefficient de détermination.

Facteurs testés	df	SS	F-value	R ²	P
Salinité	3	3,34	8,72	0,35	0,001***
Saison	1	0,17	1,37	0,018	0,24
Plante	1	0,25	1,98	0,02	0,12
Salinité x saison	3	0,50	1,31	0,05	0,25
Salinité x plante	3	0,55	1,43	0,05	0,19
Saison x plante	1	0,09	0,77	0,01	0,48
Salinité x saison x plante	3	0,29	0,75	0,03	0,64

La PERMANOVA est basée sur la distance de Bray-Curtis (***) $P < 0,001$.

5.3.5.2.1. Distribution des communautés de CMA suivant la salinité

La salinité a structuré 8 parmi les 20 genres de CMA identifiés dans les racines de *S. robustus* et *P. juliflora* (Tableau 23). L'abondance relative de *Rhizophagus*, *Incertae-sedis* et *Glomus* a diminué avec la salinité tandis que *Ambispora* a disparu à la salinité de 19,49‰ (Figure 35). Par contre, *Sclerocystis*, *Paraglomus* et *Acaulospora* ont été dominants à 19,49‰ (Figure 35).

La structure des 8 genres de CMA a été comparée par paire de niveaux de salinité, entre saisons sèche et humide à chaque niveau de salinité et entre *P. juliflora* et *S. robustus* à chaque niveau de salinité (Tableau 24). Les comparaisons par paire de niveaux de salinité de la composition des huit genres de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* ont révélé des différences significatives selon le genre et la paire de niveaux de salinité (Tableau 7a).

Tableau 23. Impact de la salinité sur la structure des huit genres de CMA de *Prosopis* et *Sporobolus*. SS= somme des carrés ; R^2 = coefficient de détermination.

Genres	Salinité			
	SS	F-value	R^2	P
<i>Rhizophagus</i>	2,81	5,88	0,29	0,001***
<i>Incertae-sedis</i>	2,11	5,95	0,25	0,001***
<i>Sclerocystis</i>	3,52	6,50	0,29	0,001***
<i>Glomus</i>	4,08	6,62	0,29	0,001***
<i>Paraglomus</i>	1,14	2,16	0,09	0,018*
<i>Acaulospora</i>	1,58	2,44	0,12	0,013*
<i>Ambispora</i>	3,85	9,93	0,35	0,002**
<i>Redeckera</i>	2,24	6,98	0,28	0,001***

La PERMANOVA est basée sur la distance de Bray-Curtis ($P < 0.05$). '***' $P < 0,001$; '**' $P < 0,01$; '*' $P < 0,05$.

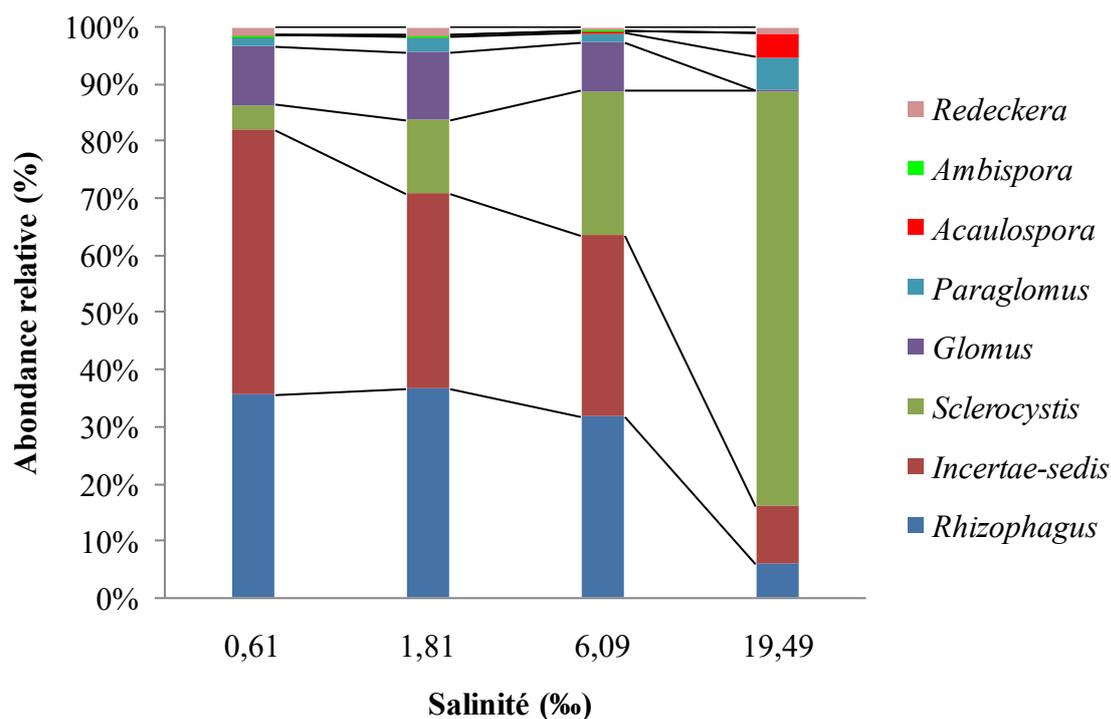


Figure 35. Abondance relative des huit genres de CMA de *P. juliflora* et *S. robustus* en fonction de la salinité.

Tableau 24. Comparaison de la structure des huit genres de CMA (a) par paire de niveaux de salinité, (b), entre saisons sèche et humide à chaque niveau de salinité (c) entre *P. juliflora* et *S. robustus* à chaque niveau de salinité.

(a) Comparaison par paire (Salinité en ‰)	<i>Rhizophagus</i>	<i>Incertae-sedis</i>	<i>Sclerocystis</i>	<i>Glomus</i>	<i>Paraglomus</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Ambispora</i>	<i>Redeckera</i>	Autres
0,61 vs 19,49	*** (+)	*** (+)	*** (-)	* (+)	NS	*(-)	* (+)	NS	NS
0,61 vs 6,09	NS	NS	* (-)	NS	NS	NS	* (+)	* (+)	NS
0,61 vs 1,18	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
1,18 vs 19,49	*** (+)	** (+)	*** (-)	*** (+)	NS	*(-)	* (+)	NS	NS
1,18 vs 6,09	NS	NS	NS	NS	NS	NS	* (+)	** (+)	NS
6,09 vs 19,49	** (+)	* (+)	** (-)	NS	*(-)	NS	NS	NS	NS

(b) Salinité (‰)	Comparaison par paire	<i>Rhizophagus</i>	<i>Incertae-sedis</i>	<i>Sclerocystis</i>	<i>Glomus</i>	<i>Paraglomus</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Ambispora</i>	<i>Redeckera</i>	Autres
0,61	sèche vs humide	* (-)	** (+)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
1,18	sèche vs humide	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
6,09	sèche vs humide	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	* (-)	NS
19,49	sèche vs humide	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

(c) Salinité (‰)	Comparaison par paire	<i>Rhizophagus</i>	<i>Incertae- sedis</i>	<i>Sclerocystis</i>	<i>Glomus</i>	<i>Paraglomus</i>	<i>Acaulospora</i>	<i>Ambispora</i>	<i>Redeckera</i>	Autres
0,61	<i>S. robustus</i> vs <i>P. juliflora</i>	NS	NS	* (-)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
1,18	<i>S. robustus</i> vs <i>P. juliflora</i>	NS	* (+)	NS	* (-)	NS	NS	NS	NS	NS
6,09	<i>S. robustus</i> vs <i>P. juliflora</i>	NS	NS	NS	NS	* (+)	NS	NS	NS	NS
19,49	<i>S. robustus</i> vs <i>P. juliflora</i>	NS	NS	* (-)	NS	NS	NS	NS	NS	NS

‘****’ $P < 0,001$; ‘***’ $P < 0,01$; ‘*’ $P < 0,05$; ‘NS’ $P > 0,05$; NS= Non significatif ‘(+)’ ou ‘(-)’ indique que le premier facteur de la comparaison a un impact positif sur la structure des communautés de CMA et vice versa.

5.3.5.2.2. Distribution des communautés des huit genres de CMA suivant la plante

La PERMANOVA n'a pas montré d'effet significatif de la plante sur la structure des communautés de CMA (Tableau 22). Toutefois, la comparaison des huit genres de CMA, par paire de plantes à chaque niveau de salinité, a révélé quelques différences significatives selon la salinité et la plante (Tableau 24c). En effet, à la salinité de 1,18‰, *Incertae-sedis* a été plus abondant chez *S. robustus* que sur *P. juliflora*. Par contre, *Paraglomus* a été plus abondant sur *S. robustus* à 6,09‰ de salinité. *Sclerocystis* a été dominant chez *P. juliflora* aussi bien au faible (0,61 ‰) qu'au fort niveau de salinité (19,49‰).

Le nombre d'OTU que partage *S. robustus* et *P. juliflora* à chaque niveau de salinité est représenté sur la figure 36. Les résultats ont montré que le nombre d'OTU partagé entre les deux plantes par niveau de salinité, n'a pas varié. Toutefois, le nombre d'OTU commun à *S. robustus* et *P. juliflora* par niveau de salinité, a diminué avec la salinité.

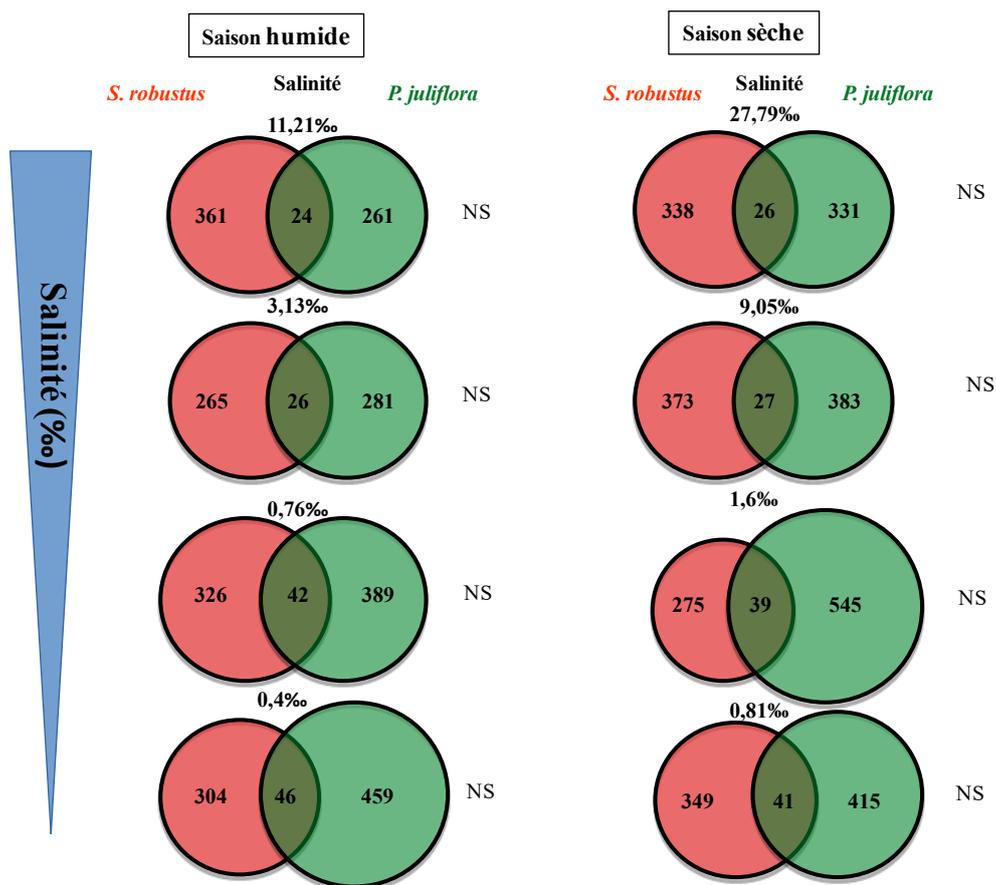


Figure 36. Structure des communautés de CMA partagées entre *S. robustus* et *P. juliflora* à chaque niveau de salinité en saisons sèche et humide.

5.3.5.2.3. Distribution des communautés des huit genres de CMA suivant la saison

La PERMANOVA n'a pas montré d'effet significatif de la saison sur la structure des communautés de CMA (Tableau 22). Toutefois, des différences significatives ont été observées entre les abondances relatives des taxons fongiques en saisons sèche et humide dans certains niveaux de salinité (Tableau 24b). A la salinité de 0,61‰, *Rhizophagus* est plus abondant en saison humide alors que *Incertae-sedis* domine en saison sèche. A un niveau de salinité plus élevé (6,09‰), *Redeckera* est plus abondant en saison humide.

5.3.5.3. Les OTU indicatrices de la salinité, du type de plante et de la saison

Les OTU indicatrices des niveaux de salinité sont représentées dans le Tableau 25. Ces OTU au nombre de 34 ont été réparties dans 9 genres. Parmi ces 9 genres, 7 ont été structurés par la salinité dans notre étude. Ainsi, les OTU indicatrices de salinité ont été réparties dans le genre *Glomus* (3), *Rhizophagus* (7), *Sclerocystis* (6), *Incertae-sedis* (8), *Redeckera* (4), *Acaulospora* (1) et *Paraglomus* (2) (Tableau 25). Les OTU indicatrices de forte salinité (19,49‰) ont été au nombre de 10 et sont réparties dans *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Incertae-sedis*, *Redeckera* et *Acaulospora*. Une seule OTU indicatrice de salinité comparable à 6,09‰ a été identifiée. Elle a été affiliée au genre *Glomus*. Dix (10) OTU ont été indicatrices de salinité modérée (1,18‰) et sont regroupées dans *Glomus*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Incertae-sedis*, *Redeckera* et *Paraglomus*. Les OTU indicatrices de faible salinité (0,61‰) ont été également au nombre de 10. Elles ont été réparties dans *Glomus*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Incertae-sedis*, *Redeckera* et *Paraglomus*.

Les OTU indicatrices de la plante ont été au nombre de 10 et sont regroupées dans *Glomus* (1), *Rhizophagus* (1), *Sclerocystis* (1), *Incertae-sedis* (2), *Redeckera* (1) et *Paraglomus* (4) (Tableau 26). Six (6) OTU ont été indicatrices de *P. juliflora* et sont réparties dans *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Incertae-sedis* et *Paraglomus*. Les OTU indicatrices de *S. robustus*, au nombre de 4, ont été regroupées dans *Glomus*, *Redeckera* et *Paraglomus*.

Onze (11) OTU indicatrices de la saison ont été identifiées et parmi lesquelles, 9 sont réparties dans 5 genres structurés par la salinité dans notre étude (Tableau 27). Il s'agit de *Glomus* (2), *Rhizophagus* (1), *Incertae-sedis* (2), *Redeckera* (3) et *Paraglomus* (1). La majorité des OTU (6) ont été indicatrices de saison humide et regroupées au sein de *Glomus*, *Rhizophagus*, *Redeckera* et *Paraglomus*. Les OTU indicatrices de saison sèche ont été au nombre de 3 et sont réparties dans *Glomus* et *Incertae-sedis*.

Tableau 25. Les OTU indicatrices des niveaux de salinité.

OTU	Salinité (‰)								Famille	Genre
	0,61		1,18		6,09		19,49			
	Valeur indicatrice	P value	Valeur indicatrice	P value	Valeur indicatrice	P value	Valeur indicatrice	P value		
12					0,793	0,023*			Glomeraceae	<i>Glomus</i>
7			0,650	0,015*					Glomeraceae	<i>Glomus</i>
128	0,500	0,042*							Glomeraceae	<i>Glomus</i>
203							0,500	0,050*	Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>
6			0,711	0,024*					Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>
125			0,577	0,012*					Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>
154			0,577	0,012*					Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>
139			0,500	0,041*					Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>
28	0,788	0,001***							Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>
138	0,577	0,010*							Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>
13							0,877	0,001***	Glomeraceae	<i>Sclerocystis</i>
1							0,835	0,001***	Glomeraceae	<i>Sclerocystis</i>
224							0,500	0,049*	Glomeraceae	<i>Sclerocystis</i>
8			0,772	0,002**					Glomeraceae	<i>Sclerocystis</i>
43	0,632	0,007**							Glomeraceae	<i>Sclerocystis</i>
84	0,589	0,007**							Glomeraceae	<i>Sclerocystis</i>
9							0,914	0,001***	Glomeraceae	<i>Incertae-sedis</i>
9							0,914	0,001***	Glomeraceae	<i>Incertae-sedis</i>
24							0,825	0,001***	Glomeraceae	<i>Incertae-sedis</i>
32							0,670	0,013*	Glomeraceae	<i>Incertae-sedis</i>
22			0,733	0,005**					Glomeraceae	<i>Incertae-sedis</i>

60	0,657	0,003**				Glomeraceae	<i>Uncertae-sedis</i>	
20	0,794	0,002**				Glomeraceae	<i>Uncertae-sedis</i>	
02	0,639	0,04*				Glomeraceae	<i>Uncertae-sedis</i>	
67			0,596	0,018*		Diversisporaceae	<i>Redeckera</i>	
86			0,527	0,041*		Diversisporaceae	<i>Redeckera</i>	
21	0,733	0,002**				Diversisporaceae	<i>Redeckera</i>	
30					0,656	0,010**	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>
131					0,500	0,045*	Acaulosporaceae	<i>Redeckera</i>
62					0,577	0,009**	Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
119			0,471	0,036*			Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
61	0,687	0,002**					Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
27					0,637	0,016*	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
73					0,598	0,017*	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>

Les OTU indicatrices ont été obtenues selon l'analyse des espèces indicatrices proposée par Dufrêne et Legendre (1997) avec le model inval.g de De Caceres et al. (2010). *** P<0,001 ; ** P<0,01 ; * P<0,05.

Tableau 26. Les OTU indicatrices de *S. robustus* et *P. juliflora*.

OTU	<i>P. juliflora</i>		<i>S. robustus</i>		Famille	Genre
	Valeur indicatrice	<i>P</i> value	Valeur indicatrice	<i>P</i> value		
114	0,456	0,044*			Glomeraceae	<i>Rhizophagus</i>
10	0,717	0,026*			Glomeraceae	<i>Incertae-sedis</i>
37	0,591	0,014*			Glomeraceae	<i>Incertae-sedis</i>
100	0,456	0,050*			Glomeraceae	<i>Sclerocystis</i>
12			0,734	0,016*	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
80			0,500	0,023*	Diversisporaceae	<i>Redeckera</i>
110	0,456	0,047*			Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
119	0,456	0,050*			Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
11			0,964	0,001***	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
18			0,789	0,001***	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>

Les OTU indicatrices ont été obtenues selon l'analyse des espèces indicatrices proposée par Dufrêne et Legendre (1997) avec le model inval.g de De Caceres et al. (2010). *** P<0,001 ; ** P<0,01 ; * P<0,05.

Tableau 27. Les OTU indicatrices des saisons sèche et humide.

OTU	Saison sèche		Saison humide		Famille	Genre
	Valeur indicatrice	P value	Valeur indicatrice	P value		
05			0,793	0,039*	Glomeraceae	<i>Rhizopagus</i>
17			0,716	0,001***	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
16	0,636	0,050*			Glomeraceae	<i>Glomus</i>
37	0,587	0,018*			Glomeraceae	<i>Incertae sedis</i>
71	0,549	0,047*			Glomeraceae	<i>Incertae-sedis</i>
52			0,540	0,012*	Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i>
56			0,612	0,002**	Diversisporaceae	<i>Redeckera</i>
57			0,577	0,008**	Diversisporaceae	<i>Redeckera</i>
31			0,577	0,001***	Diversisporaceae	<i>Redeckera</i>
11			0,895	0,031*	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
27			0,612	0,002**	Geosiphon	<i>Geosiphon</i>

Les OTU indicatrices ont été obtenues selon l'analyse des espèces indicatrices proposée par Dufrêne et Legendre (1997) avec le model inval.g de De Caceres et al. (2010). *** P<0,001 ; ** P<0,01 ; * P<0,05.

5.3.5.4. Corrélation entre l'abondance relative des communautés des huit genres de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* et les caractéristiques chimiques du sol

Les corrélations entre les abondances relatives des genres fongiques et les paramètres chimiques du sol sont représentées dans le Tableau 28. *Rhizophagus* est a été négativement corrélé à la salinité, à la conductivité électrique ($r = -0,98$; $P < 0,05$) et au rapport C/N ($r = -0,97$; $P < 0,05$). Une corrélation négative a été observée entre les abondances de *Incertae-sedis* et le pH, la conductivité électrique, la salinité ($r = -0,95$; $P < 0,05$) et le P assimilable ($r = -0,96$; $P < 0,05$). Contrairement à *Rhizophagus* et *Incertae-sedis*, les genres *Sclerocystis* et *Acaulospora* sont positivement corrélés à la conductivité électrique ($r = 0,99$; $P < 0,01$) et à la salinité ($r = 0,97$; $P < 0,05$). *Sclerocystis* a été également lié au pH ($r = 0,96$; $P < 0,05$), au P assimilable ($r = 0,96$; $P < 0,05$) et au rapport C/N ($r = 0,97$; $P < 0,05$). *Acaulosporaa* été positivement corrélé au rapport C/N ($r = 0,95$; $P < 0,05$).

Tableau 28. Corrélation entre l'abondance relative des communautés des huit genres de CMA et des caractéristiques chimiques des sols.

Genre	pH	Conductivité électrique	Salinité	N assimilable	N total	P assimilable	P total	C total	C/N
<i>Rhizophagus</i>	-0,90	-0,98*	-0,98*	-0,87	0,57	-0,90	-0,70	0,33	-0,97*
<i>Incertae-sedis</i>	-0,95*	-0,95*	-0,95*	-0,63	0,31	-0,96*	-0,81	0,08	-0,91
<i>Sclerocystis</i>	0,96*	0,99**	0,99**	0,77	-0,42	0,96*	0,84	-0,18	0,97*
<i>Glomus</i>	-0,91	-0,98*	-0,98*	-0,88	0,53	-0,90	-0,83	0,29	-0,98*
<i>Paraglomus</i>	0,78	0,88	0,89	0,77	-0,65	0,79	0,56	-0,48	0,83
<i>Acaulospora</i>	0,88	0,97*	0,97*	0,86	-0,61	0,88	0,74	-0,38	0,95*
<i>Ambispora</i>	-0,91	-0,76	-0,75	-0,25	-0,25	-0,91	-0,92	-0,48	-0,75
<i>Redeckera</i>	-0,49	-0,32	-0,30	-0,01	-0,55	-0,46	-0,73	-0,73	-0,39

***' $P < 0,01$; '**' $P < 0,05$.

5.3.5.5. Diversité alpha des CMA de *S. robustus* et *P. juliflora*

Les résultats de l'analyse ANOVA mettant en évidence l'effet de la salinité, de la saison et de la plante sur l'alpha-diversité des CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* sont représentés dans le Tableau 29. La salinité n'a pas eu d'effet significatif sur la richesse des communautés de CMA et sur le taux de recouvrement. La salinité a significativement affecté l'indice de diversité de Shannon et l'Équitabilité des communautés de CMA. Un effet significatif de la saison a pu être observé sur l'indice de Chao. Aucun impact du type de plante n'a pu être observé. Toutefois, nous pouvons noter un impact significatif de l'interaction entre la plante et la salinité sur la diversité et l'équitabilité.

L'indice de Chao n'a pas varié avec la salinité (Figure 37). Par contre, il a significativement augmenté en saison sèche. Alors que l'indice de Shannon et l'Équitabilité ont été positivement affectés par la salinité, le taux de recouvrement n'a pas varié avec la salinité (Figure 38a, b et c).

Tableau 29. Impact de la salinité, de la saison, du type de plante et de l'interaction des trois facteurs sur l'alpha-diversité des communautés de *Glomeromycota* de *P. juliflora* et *S. robustus*.

	Sobs (Richesse)	Chao (Richesse)	Shannon (diversité)	Équitabilité (Shannon- dépendant)	Taux de recouvrement (%)
Salinité	NS	NS	***	***	NS
Saison	NS	***	NS	NS	NS
Plante	NS	NS	NS	NS	NS
Salinité x saison	NS	NS	NS	NS	NS
Salinité x plante	NS	NS	*	*	NS
Saison x plante	NS	NS	NS	NS	NS
Salinité x saison x plante	NS	NS	NS	NS	NS

Les statistiques ont été effectuées en utilisant le test ANOVA '****' $P < 0,001$; '*' $P < 0,05$; 'NS' $P > 0,05$.

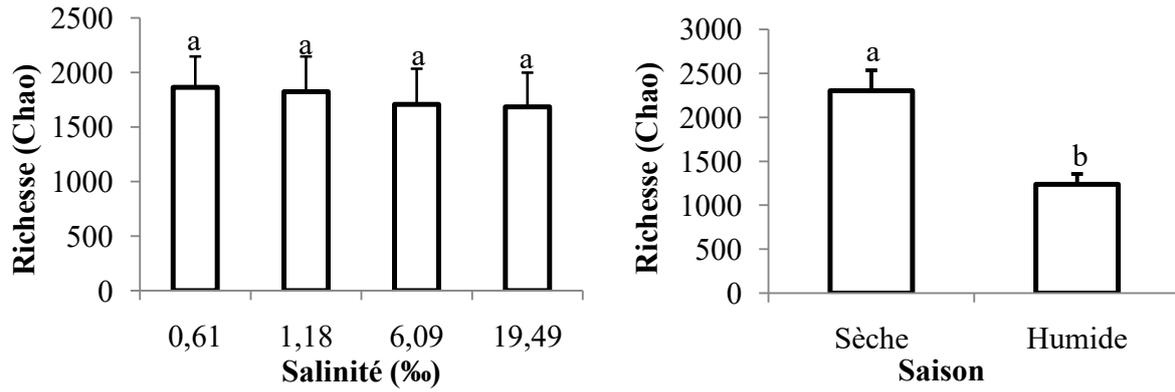


Figure 37. Richesse (Chao) des communautés de CMA en fonction de la salinité et de la saison. Les statistiques ont été effectuées en utilisant le test ANOVA (Tukey HSD à $P < 5\%$).

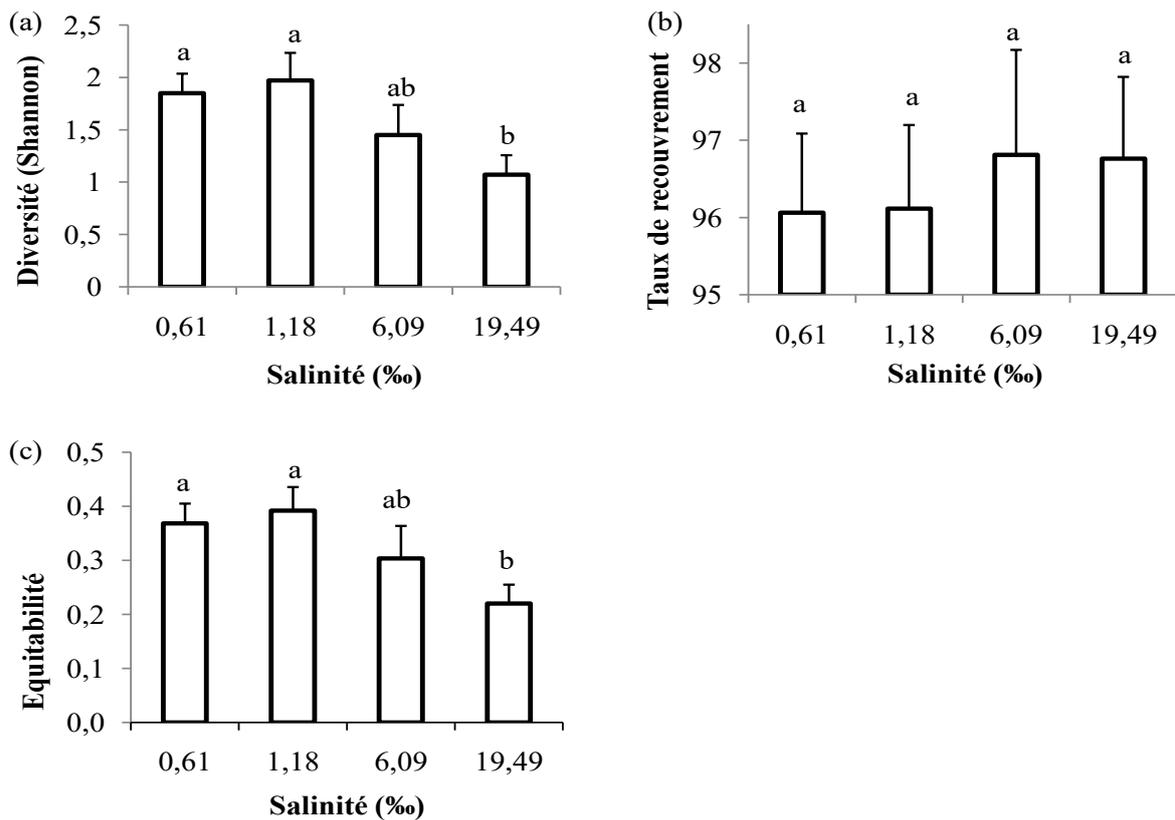


Figure 38. Diversité et Equitabilité des communautés de CMA en fonction de la salinité : (a) diversité de Shannon, (b) taux de recouvrement (%), (c) Equitabilité (Shannon-dépendant). Les statistiques ont été effectuées en utilisant le test ANOVA (Tukey HSD à $P < 5\%$).

5.4. DISCUSSION

Nos résultats ont montré qu'aucun des trois facteurs étudiés (salinité, saison et plante) n'a eu d'effet significatif sur le potentiel infectieux mycorhizogène des sols. La salinité a augmenté le nombre de spores des sols sous *S. robustus* et *P. juliflora*. Par contre, elle a diminué significativement la mycorhization de ces espèces. Le potentiel infectieux du sol représente le nombre de propagules (spores, hyphes, fragments de racine) dans le sol. Les différents niveaux de salinité maintiennent le nombre de propagules à peu près constant tout en stimulant la sporulation, ce qui laisse penser la présence de CMA adaptés aux différents niveaux de salinité dans nos conditions expérimentales. Dans la littérature, les résultats sur l'impact du sel sur la germination des spores, le MPN et la mycorhization sont souvent contradictoires. Certains travaux montrent que la salinité diminue le potentiel mycorhizien des sols (Tian et al., 2004 ; Saint-Etienne et al., 2006 ; Giri et al., 2007). La salinité peut également diminuer le nombre de spores tout en inhibant leur germination (Juniper et Abbott, 2006; Saint-Etienne et al., 2006 ; Giri et al., 2007; Tian et al., 2004; Sheng et al., 2008). D'autres travaux (Juniper et Abbott, 1993 ; Aliasgharzadeh et al., 2001 ; Yamato et al., 2008) montrent le contraire. D'autres facteurs notamment la nature du sel liée au stress peut influencer la germination des spores. Juniper et Abbott (1993) ont rapporté que pour un même potentiel osmotique, le NaCl a montré une meilleure germination des spores comparé au KCl.

Les spores de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* ont été plus nombreuses en saison sèche qu'en saison humide contrairement à l'intensité de mycorhization de ces espèces. Ndoye et al. (2012) ont montré que le nombre de spores était plus important dans la zone aride de Dahra contrairement à la localité de Goudiry beaucoup plus humide. Escudero et Mendoza (2005) ont montré des résultats similaires sur *Lotus glaber* dans des prairies en Argentine. Le manque d'eau peut constituer un facteur limitant la germination des spores et la mycorhization des plantes. En effet les spores pour germer et coloniser la plantes hôte, elles ont besoin d'un certain niveau d'hydratation (Evelin et al., 2009 ; Tommerup, 1984). D'autres études ont montré une diminution significative de la colonisation racinaire des plantes en condition de stress hydrique (Kaya et al., 2003 ; Morte et al., 2000 ; Wu et Xia, 2005).

La mycorhization de *P. juliflora* a été plus élevée comparée à *S. robustus*. Cette différence dans la colonisation racinaire de *Sporobolus* et *Prosopis* pourrait être liée à la morphologie de leurs systèmes racinaires (Eissenstat et al., 2015). En effet, *S. robustus*, grâce à ses racines

finies et ses nombreux poils absorbants, peut puiser les nutriments essentiels pour sa croissance sans grand recours aux mycorhizes. Par contre, *P. juliflora* présente de grosses racines et par conséquent, cette plante pourrait améliorer sa nutrition hydrominérale grâce à la symbiose MA. D'autres auteurs affirment que le taux de mycorhization des plantes dépend de leur stade phénologique de la plante (Carvalho et al., 2001 ; Johnson-Green et al., 1995). *P. juliflora* a présenté un niveau de mycorhization naturelle plus élevé comparé à d'autres légumineuses notamment *A. senegal* dans des peuplements naturelles et en plantations à Dahra et Goudiry (Ndoye et al., 2012).

Les résultats du séquençage Illumina Miseq ont montré qu'il existe une grande diversité de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora*. Au total, 20 genres de CMA répartis dans 10 familles ont été identifiés par séquençage partiel du 18S. Le 18S a une bonne résolution au niveau spécifique chez les *Glomeraceae*. Par contre, ce marqueur a un faible pouvoir résolutif chez les *Gigasporaceae* et *Diversisporaceae* (Hart et al., 2015). C'est pourquoi, l'affiliation des OTU aux espèces n'a pas été présentée dans ce travail. Les *Glomeraceae* ont représenté la famille la plus abondante (77%). Nos résultats suggèrent que les *Glomeraceae* sont les champignons les plus représentés dans les racines de *S. robustus* et *P. juliflora* dans les zones salées au Sénégal. La prédominance des *Glomeraceae* dans la plupart des écosystèmes au Sénégal (Manga et al., 2007; Sene et al., 2012; Ndoye et al., 2012), suggère une meilleure adaptation de cette famille aux conditions de stress abiotiques (Blaszkowski et al., 2002). L'autre raison pour expliquer la dominance des *Glomeraceae* dans ces écosystèmes pourrait être liée à leur aptitude à former des anastomoses après une rupture des filaments mycéliens. En effet, comparées aux autres familles de CMA, les *Glomeraceae* forment plus facilement des anastomoses entre les hyphes du mycélium et pourraient donc avoir la capacité à rétablir un réseau interconnecté après une rupture mécanique des hyphes et à s'échanger des nutriments et du matériel génétique (de la Providencia et al., 2005).

Parmi les trois facteurs étudiés (salinité, saison et plante), seule la salinité a eu un impact significatif sur la structure des communautés de CMA dans les racines de *S. robustus* et *P. juliflora*. La salinité apparaît donc comme le principal facteur structurant les communautés de CMA représentées majoritairement par des *Glomaceae*. Elle a structuré 8 genres parmi les 20 genres de CMA identifiés. *Sclerocystis* et *Rhizophagus* ont été les plus abondants. L'abondance relative des *Sclerocystis* et *Acaulospora* a augmenté avec la salinité, ce qui se traduit par des corrélations positives entre ces genres fongiques et la salinité. Ces résultats

indiquent que ces deux genres fongiques ont été les plus tolérants à la salinité. L'abondance de ces genres fongiques dans les racines de *S. robustus* et *P. juliflora* a été confortée par le nombre important de spores à 19,49‰ et 6,09‰ de salinité. Ces résultats suggèrent une absence de mycorhization dite « préférentielle » de *S. robustus* et *P. juliflora*, contrairement à ce qui a été observé chez *Acacia seyal* (Manga et al., 2007). Contrairement à *Sclerocystis* et *Acaulospora*, *Rhizophagus*, *Incertae-sedis* et *Glomus* ont été plus sensibles à la salinité, avec des corrélations négatives observées entre ces genres fongiques et la salinité. La dominance des *Sclerocystis* dans les racines a été également corrélée positivement à la disponibilité du phosphore dans le sol. Ces résultats suggèrent que *Sclerocystis* serait plus tolérant aux fortes teneurs en P que les autres genres fongiques. *Sclerocystis* coloniserait donc mieux le système racinaire de *S. robustus* et *P. juliflora* dans les sols salés où le P a tendance à augmenter. Ces résultats sont similaires avec ceux de Oehl et al. (2004) qui ont montré que les concentrations élevées en phosphore dans le sol diminuent la colonisation racinaire par les CMA. Le phosphore étant accessible à la plante, cette dernière aura tendance à limiter l'interaction avec le champignon (Javot et al., 2007). Il est en effet bien connu que la mycorhization est affectée négativement par la présence de fortes concentrations en P. Cette inhibition peut s'expliquer par le coût de C que représente la symbiose pour la plante. L'abondance relative des *Sclerocystis* et *Incertae-sedis* varie avec le pH. En effet, les *Sclerocystis* sont positivement corrélés au pH ($r= 0,96$; $p < 0,01$) contrairement aux *Incertae-sedis* ($r= -0,95$; $p < 0,05$). Ces résultats corroborent ceux de Coughlan et al. (2000) indiquant que des pH du sol compris entre 5 et 7, pouvaient affecter positivement les communautés de CMA. L'abondance des *Sclerocystis* et des *Acaulospora* dans les racines a été fortement liée au rapport C/N du sol, suggérant une forte utilisation du C de la plante par certains CMA pour la colonisation racinaire (Burleigh et al., 2002 ; Pena et al., 2010).

La richesse (Chao) des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* n'a pas été affectée par la salinité. Par contre, l'indice de diversité de Shannon et l'Equitabilité ont significativement diminué avec la salinité. Dans la littérature, les effets négatifs de la salinité sur la diversité des CMA sont largement débattus. Guo et Gong (2012) ont montré un effet dépressif de la salinité sur la diversité des communautés de CMA de 18 espèces végétales comprenant des halophytes et des non-halophytes. La diminution de la diversité des communautés de CMA observée avec la salinité pourrait être liée aux faibles taux de mycorhization de *S. robustus* et *P. juliflora*. Ces résultats corroborent ceux de Yamato et al. (2012) sur la diversité des CMA de *Ixeris repens*. Le taux de recouvrement des communautés

de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* n'a pas varié avec la salinité. Ce taux a été élevé (plus de 96%) et presque similaire dans les 4 niveaux de salinité. Ces résultats suggèrent que le nombre de séquences analysées par échantillon a été suffisant pour estimer la diversité des CMA dans les racines de *S. robustus* et *P. juliflora*.

La plante (*S. robustus* et *P. juliflora*) n'a pas eu d'effet significatif sur la structure des communautés de CMA. Ces résultats indiquent que *S. robustus* et *P. juliflora* ont partagé les mêmes communautés de CMA avec des abondances relatives comparables. Hetrick et al. (1994 ; 1989) ont montré que les mêmes CMA peuvent coloniser plusieurs espèces et améliorer leur nutrition hydrominérale. Selon ces auteurs, ces symbiotes fongiques constituent des agents importants pour la promotion de la coexistence des plantes. Toutefois, la comparaison des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* à chaque niveau de salinité a montré une préférence d'hôte de certains genres fongiques. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux sur la spécificité d'hôte des CMA (Hart et al., 2003 ; Klironomos, 2003 ; van der Heijden et al., 1998 ; Bever et al., 1996).

La richesse et la diversité des communautés de CMA n'ont pas été affectées par la plante. Le nombre d'OTU que partagent *S. robustus* et *P. juliflora* à chaque niveau de salinité n'a pas été différent. Cependant, ce nombre a diminué avec la salinité. Ces résultats supposent qu'en condition de stress salin, chaque espèce végétale a tendance à garder ses symbiotes fongiques pour mieux faire face au stress du milieu.

La saison n'a pas eu d'effet significatif sur la structure des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora*. Tous les genres fongiques identifiés sur les racines de ces plantes ont été communs en saisons sèche et humide. Ces résultats indiquent que les CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* sont adaptés aussi bien à l'humidité qu'au déficit hydrique. Ces résultats corroborent ceux de Santos-Gonzalez et al. (2007) qui n'ont pas trouvé d'effet significatif de la variation saisonnière sur la diversité des CMA de *Prunella vulgaris* et *Antennaria dioica*. Par contre, Vandenkoornhuyse et al. (2002) ont montré un effet dynamique de la saison sur la diversité des CMA de *Agrostis capillaris* et *Trifolium repens*.

L'indice de Shannon, l'Equitabilité et le taux de recouvrement des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* n'ont pas été affecté par la saison. Par contre, l'indice de Chao (richesse) a significativement augmenté en saison sèche. L'indice de Chao est basé sur la fréquence des espèces rares dans le jeu de données (Chao et al., 2009). Ainsi, les résultats

obtenus dans notre étude indiquent qu'il y a plus d'espèces rares en saison sèche qu'en saison humide.

5.5. CONCLUSION

L'étude de la densité et diversité morphologique des CMA se développant dans la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* a montré que le potentiel mycorhizogène des sols sous *S. robustus* et *P. juliflora* était à peu près constants dans les différents niveaux de salinité. Ce potentiel n'était pas significativement différent entre la saison sèche et humide. Les spores identifiées dans la rhizosphère de ces plantes étaient principalement des *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Glomus* et *Acaulospora*. Les spores de CMA ont augmenté avec la salinité et étaient plus abondantes en saison sèche qu'en saison humide. Contrairement au nombre de spores, le taux de mycorhization de *S. robustus* et *P. juliflora* a diminué avec la salinité. La mycorhization de ces plantes était plus élevée en saison humide et chez *P. juliflora*.

Une grande diversité génétique de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* a été révélée par séquençage Illumina Miseq. Les *Glomeraceae* ont représenté la famille la plus abondante avec plus de 77% des OTU. Parmi les trois facteurs étudiés (salinité, plante et saison), la salinité a été le seul facteur structurant des communautés de CMA. Elle a structuré 8 parmi les 20 genres identifiés. La salinité n'a pas eu d'effet significatif sur la richesse des communautés de CMA, par contre elle a significativement diminué l'indice de diversité de Shannon et l'Equitabilité. *S. robustus* et *P. juliflora* ont partagé les mêmes communautés de CMA aussi bien en saison sèche qu'en saison humide.

Ainsi, *S. robustus* héberge des communautés de CMA potentiellement bénéfiques à *P. juliflora* et *A. seyal*. *S. robustus* serait un bon candidat comme plante facilitatrice pour l'établissement des deux légumineuses dans des sols salés. Toutefois, l'étude de la réponse de *S. robustus* à l'inoculation mycorhizienne en condition contrôlée est une étape préalable pour la prise en compte de la symbiose dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes. Nous avons effectué la mycorhization de *S. robustus* avec des souches de collection. Une autre graminée halophyte (*Leptochloa fusca*) coexistant avec *S. robustus* dans la zone a été introduite dans l'étude à titre de comparaison.

Chapitre 6 **Effet de l'inoculation avec des champignons mycorhiziens à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale de *Sporobolus robustus* Kunth et *Leptochloa fusca* (L.) Stapf en condition contrôlée.**

6.1. INTRODUCTION

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sont des microorganismes bénéfiques aux plantes et présents dans les écosystèmes naturels et anthropisés (Smith et Read, 2008). Les CMA améliorent la nutrition hydrominérale de la plante et en retour ils bénéficient du carbone issu de la photosynthèse (Smith et Read, 2008). En effet, le mycélium extra-racinaire des CMA permet à la plante d'augmenter sa capacité d'absorption de l'eau et des sels minéraux (ex. P, N, Cu, Zn). Plusieurs travaux ont montré l'effet bénéfique des CMA sur l'amélioration de la croissance des graminées (White et al., 2008 ; Smith et al., 1998 ; Cavender et Knee, 2006). Johnson (1998) a également montré que l'inoculation avec des souches de CMA a amélioré la croissance de la graminée indigène *Panicum virgatum* en présence de faible teneur en phosphore. Toutefois, la réponse des graminées à la symbiose mycorhizienne dépend essentiellement de leur degré de dépendance vis-à-vis des CMA (Wilson et Hartnett, 1998 ; Maherali, 2014). La dépendance mycorhizienne des graminées varie et dépend de la souche de CMA. En effet, Tawaraya (2003) et Saif et al. (1987) ont montré de fortes dépendances mycorhiziennes de *Andropogon pintoii* et *Brachiaria decumbens* inoculés avec *Glomus manihotis*. Par contre, Hetrick et al. (1993) ont montré que plusieurs espèces de *Triticum* ne dépendent pas de *Glomus etunicatum*.

Sporobolus robustus et *Leptochloa fusca* sont des graminées fourragères halophytes largement distribuées dans le Delta du Sine et du Saloum au Sénégal. Elles constituent un fourrage d'appoint pour le bétail surtout en saison sèche. Ce sont des herbes pérennes, rhizomateuses et peuvent se propager à partir de graines ou par bouturage. Ces graminées croient généralement sur des sols argileux soumis à des inondations temporaires. Elles se développent mieux dans de l'eau légèrement saumâtre (Abdullah et al., 1990; Ahmad, 2010). Toutefois, très peu de données sont disponibles sur la domestication de ces graminées en vue de les utiliser dans des programmes de restauration des sols salés. La mycorhization contrôlée pourrait être une composante importante dans la domestication des deux graminées. L'expérimentation en condition contrôlée est une étape préalable pour évaluer l'effet

bénéfique des CMA sur la croissance de *S. robustus* et *L. fusca*. Bien que certaines espèces de *Sporobolus* et de *Leptochloa* aient déjà fait l'objet d'études (Kennedy et al., 2002 ; Ahmad, 2010), il n'y a pas de données disponibles sur la mycorhization de *S. robustus* et *L. fusca*.

Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer l'impact de l'inoculation sur la croissance, la nutrition minérale et la mycorhization de *S. robustus* et *L. fusca*.

6.2. MATERIEL ET METHODES

6.2.1. Matériel végétal et substrat de culture

Les graines de *S. robustus* et *L. fusca* utilisées dans cette étude ont été collectées en mars 2010 à Niam-Diarokh (16°46' W, 14°17' N) dans la région de Fatick au Sénégal. Les graines ont été stérilisées superficiellement avec une solution de NaClO (5%) pendant 2 min. Après trois rinçages à l'eau distillée stérile, les graines ont été mises à germer dans du sable préalablement stérilisé (120°C, 1h) et constamment humidifiée avec de l'eau distillée stérile. Après deux semaines en pépinière, les jeunes plants de *L. fusca* et *S. robustus* ont été individuellement transplantés dans des gaines (24 cm de hauteur et 12 cm de diamètre) contenant du sol provenant de la localité de Sangalkam, Sénégal, pauvre en propagules mycorhiziens (Duponnois et al., 2002). Les caractéristiques physico-chimiques du sol déterminées au LAMA, étaient: argile 3,6% ; limon 0,8 ; sable fin 55,5% ; sable grossier 39,44% ; pH (H₂O) 5,3 ; conductivité électrique 0,1 mS/cm ; C total 0,17% ; N total 0,02% ; C/N 8,5 ; P total 39 mg P/kg ; P assimilable 4,8 mg P/kg.

6.2.2. Matériel fongique et inoculation

Les souches de CMA testés dans cette étude sont *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson and Gerd.) C. Walker and A. Schüssler (Redecker et al., 2013), *Rhizophagus irregularis* IR27 (syn. *Glomus aggregatum* IR27; Bâ et al. 1996) et *Rhizogloium intraradices* (N.C. Schenck and G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva and Oehl (Sieverding et al., 2014). Un inoculum mixte composé des trois espèces de champignons a également été testé. Toutes les espèces de CMA proviennent de la collection du Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM). Elles ont été multipliées sur des plants de maïs pendant 12 semaines. L'inoculum est constitué de sable, de spores, de fragments d'hyphes et de fragments de racines mycorhizées.

L'inoculation avec les CMA a été effectuée au cours de la transplantation des jeunes plantes de *L. fusca* et *S. robustus*, en apportant environ 20 g d'inoculum de chaque souche de CMA.

L'inoculum mixte est réalisé en mélangeant une quantité égale d'inoculum de chacun des trois CMA. Le traitement témoin a reçu 20 g d'inoculum mixte préalablement stérilisé à 120°C pendant 1h. Le dispositif expérimental est un dispositif complètement randomisé avec 2 facteurs. La combinaison du facteur plante à deux niveaux (2 espèces de graminées) et du facteur inoculation à cinq niveaux (les 3 champignons, l'inoculum mixte et le témoin) représente les 10 traitements à comparer. Chaque traitement a été répété dix fois. Les plants de *L. fusca* et *S. robustus* ont été cultivés en serre, dans des conditions d'éclairage naturel (14 h), de température ambiante (32°C jour, 26°C nuit) et d'humidité relative de 75%. Les jeunes plants ont été arrosés régulièrement avec de l'eau de robinet. Ils ont été récoltés 4 mois après inoculation.

6.2.3. Détermination de l'intensité de mycorhization des plants de *L. fusca* et *S. robustus*

Les racines de *L. fusca* et *S. robustus* ont été soigneusement rincées à l'eau de robinet afin d'éliminer les particules de sol. Une partie de ces échantillons frais de racines a été colorée au bleu de Trypan selon la méthode de Philips et Hayman (1970). L'intensité de mycorhization a été évaluée au microscope optique comme décrit par Trouvelot et al. (1986). Voir chapitre 2.

6.2.4. Détermination des paramètres de croissance des plants de *L. fusca* et *S. robustus*

La hauteur et le nombre de tiges des plants de *L. fusca* et *S. robustus* ont été déterminés. Les parties aérienne et racinaire des plants ont ensuite été séparées et les poids secs ont été déterminés par pesée après séchage à 60 °C pendant 96 h.

La dépendance mycorhizienne de chacune des graminées a été calculée selon la formule de Plenchette et al. (1983): $DM (\%) = 100 \times (PST_M - PST_T) / PST_M$, avec PST_M = Poids sec total des plantes inoculées avec une souche de CMA et PST_T = Poids sec total des plantes témoin.

6.2.5. Détermination de la teneur en éléments minéraux des parties aériennes des plants de *L. fusca* et *S. robustus*

Après détermination des paramètres de croissance, les poids secs aériens des plantes de *L. fusca* et *S. robustus* ont été utilisés pour la détermination de leurs concentrations en C, N, P, Mg et K. Les analyses chimiques de ces éléments minéraux ont été réalisées au LAMA. Le carbone et l'azote total ont été quantifiés à l'aide du système de combustion CHN Thermo Finnigan EA 1112 Series Elemental Analyzer flash. Les teneurs en K et Mg ont été déterminés par spectrométrie d'absorption atomique.

6.2.6. Analyses statistiques

Les données ont été soumises à une analyse de variance ANOVA à un facteur. Les comparaisons entre les différentes moyennes ont été effectuées par le test de Newman-Keuls à 5% de probabilité. Les données de l'intensité de mycorhization ont été transformées en arc sinus avant d'être soumises à une analyse ANOVA. Les analyses ANOVA ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT version 2010. Le coefficient de corrélation de Pearson a été déterminé entre les différents variables avec le même logiciel.

6.3. RESULTATS

6.3.1. Effet de l'inoculation sur la colonisation racinaire de *S. robustus* et *L. fusca*

Les résultats ont montré une colonisation racinaire de tous les plants de *S. robustus* et *L. fusca* inoculés avec les trois espèces de CMA et l'inoculum mixte (Tableau 30). Par contre, les plants témoins n'ont pas été colonisés par les CMA (Tableau 30). L'intensité de mycorhization des graminées a varié en fonction de la souche de CMA. La colonisation racinaire des plants de *S. robustus* a été améliorée par l'inoculation avec *R. intraradices* comparée aux autres traitements. Chez *L. fusca*, l'inoculation des jeunes plants avec *R. intraradices* et *F. mosseae* a significativement augmenté la colonisation racinaire, comparée aux plants inoculés par *R. irregularis* IR27 et l'inoculum mixte.

6.3.2. Effet de l'inoculation sur la croissance de *S. robustus* et *L. fusca*

Les résultats ont montré que les effets de l'inoculation avec les CMA sur les paramètres de croissance de *S. robustus* et *L. fusca* étaient différents suivant l'espèce végétale et la souche de CMA utilisée (Tableau 30). Les hauteurs des plants de *S. robustus* et *L. fusca* n'ont pas été affectées par l'inoculation avec les CMA. Contrairement à *S. robustus*, l'inoculation avec *F. mosseae* et *R. intraradices* a significativement augmenté le nombre de tige des plants de *L. fusca* comparés aux témoins. Le poids sec racinaire des plants de *S. robustus* n'a été amélioré que par l'inoculation avec *F. mosseae* et le mixte CMA, comparé aux plants témoins. Par contre chez *L. fusca*, le poids sec racinaire des plants a été amélioré avec *R. intraradices*. Le poids sec aérien des graminées a été amélioré par l'inoculation avec *R. intraradices*. Les plants de *S. robustus* et *L. fusca*, colonisés respectivement par *F. mosseae* et *R. intraradices*, ont enregistré des valeurs de poids sec total les plus élevées comparés aux plants témoins. L'inoculation avec *F. mosseae* et le mixte CMA a significativement augmenté le ratio poids

sec racinaire sur poids sec aérien des plants de *S. robustus*. L'inoculation n'a pas eu d'effet significatif sur le ratio poids sec racinaire sur poids sec aérien des plants de *L. fusca*.

La dépendance mycorhizienne des graminées à l'inoculation avec les 3 CMA et l'inoculum mixte est représentée dans le tableau 31. *S. robustus* et *L. fusca* ont eu des valeurs de dépendance mycorhizienne comparables lorsqu'elles sont inoculées respectivement avec *F. mosseae* et *R. intraradices*. Les plus faibles valeurs de dépendance mycorhizienne de *S. robustus* ont été enregistrées chez les plants inoculés avec *R. intraradices*, *R. irregularis* IR27 et l'inoculum mixte. Les plants de *L. fusca* inoculés avec *F. mosseae*, *R. irregularis* IR27 et l'inoculum mixte ont montré de faibles valeurs de dépendance mycorhizienne.

Tableau 30. Effet de l'inoculation sur la croissance et la mycorhization de *S. robustus* et *L. fusca* après 4 mois de culture en serre.

Graminées	Champignons mycorhiziens	Nombre de tiges	Hauteur (cm)	PSR (g/plant)	PSA (g/plant)	PST (g/plant)	PSR/PSA	Mycorhization (%)
<i>S. robustus</i>	Témoin	16,00 ^a	105,30 ^a	04,80 ^b	14,23 ^b	19,04 ^b	0,33 ^b	-
	<i>F. mosseae</i> DAOM 227131	16,80 ^a	109,00 ^a	06,17 ^a	15,83 ^{ab}	22,01 ^a	0,39 ^a	18,51 ^{ab}
	<i>R. irregularis</i> IR27	16,80 ^a	104,90 ^a	04,97 ^b	14,94 ^{ab}	19,92 ^{ab}	0,33 ^b	17,60 ^b
	<i>R. intraradices</i> DAOM 197198	16,10 ^a	109,80 ^a	04,89 ^b	15,93 ^a	20,82 ^{ab}	0,30 ^b	23,73 ^a
	Inoculum mixte	16,80 ^a	109,10 ^a	05,89 ^a	14,28 ^b	20,17 ^{ab}	0,41 ^a	16,92 ^b
<i>L. fusca</i>	Témoin	15,60 ^b	74,90 ^a	04,81 ^{ab}	09,60 ^b	14,42 ^b	0,50 ^a	-
	<i>F. mosseae</i> DAOM 227131	20,50 ^a	70,60 ^a	04,19 ^b	10,17 ^b	14,36 ^b	0,41 ^a	23,06 ^a
	<i>R. irregularis</i> IR27	18,80 ^{ab}	75,90 ^a	04,58 ^b	09,71 ^b	14,30 ^b	0,47 ^a	11,61 ^b
	<i>R. intraradices</i> DAOM 197198	20,80 ^a	72,80 ^a	05,59 ^a	11,29 ^a	16,88 ^a	0,50 ^a	19,73 ^a
	Inoculum mixte	18,10 ^{ab}	77,20 ^a	04,20 ^b	10,27 ^b	14,48 ^b	0,41 ^a	10,97 ^b

PSR : Poids sec racinaire ; PSA : Poids sec aérien ; PST : Poids sec total ; PSR/PSA : Ratio poids sec racinaire/poids sec aérien ; l'inoculum mixte est constitué du mélange des 3 champignons. Les moyennes des valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (5%).

Tableau 31. Dépendance mycorhizienne de *S. robustus* et *L. fusca* après 4 mois de culture en serre.

Champignons mycorhiziens	<i>S. robustus</i>	<i>L. fusca</i>
<i>F. mosseae</i> DAOM 227131	13,12±6,43 ^a	0,00±8,50 ^b
<i>R. irregularis</i> IR27	03,27±11,46 ^a	0,00±11,49 ^b
<i>R. intraradices</i> DAOM 197198	07,12±13,12 ^a	13,69±8,92 ^a
Inoculum mixte	04,40±12,33 ^a	0,72±9,89 ^b

Les moyennes des valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (5%).

6.3.3. Effet de l'inoculation sur les teneurs en éléments minéraux des parties aériennes de *S. robustus* et *L. fusca*

L'inoculation des plants de *S. robustus* et *L. fusca* avec trois CMA et l'inoculum mixte n'a pas eu d'effet significatif sur les concentrations en N, K, Mg et C des parties aériennes des deux graminées (Tableau 32). La concentration en P des plants de *S. robustus* a été améliorée par l'inoculation avec l'inoculum mixte. Par contre, chez *L. fusca*, la concentration en P n'a pas été affectée par l'inoculation.

Tableau 32. Effet de l'inoculation sur les teneurs en éléments minéraux des parties aériennes de *S. robustus* et *L. fusca* après 4 mois de culture en serre.

Graminées	Champignons mycorhiziens	N (%)	P (%)	K (ppm)	Mg (ppm)	C (%)
<i>S. robustus</i>	Contrôle	0,39 ^a	0,88 ^b	4,96 ^a	2,77 ^a	43,74 ^a
	<i>F. mosseae</i> DAOM 227131	0,61 ^a	1,04 ^{ab}	5,78 ^a	2,43 ^a	43,90 ^a
	<i>R. irregularis</i> IR27	0,61 ^a	1,03 ^{ab}	5,29 ^a	2,49 ^a	43,38 ^a
	<i>R. intraradices</i> DAOM 197198	0,61 ^a	0,90 ^b	5,16 ^a	2,48 ^a	43,56 ^a
	Inoculum mixte	0,51 ^a	1,23 ^a	5,57 ^a	3,03 ^a	43,46 ^a
<i>L. fusca</i>	Témoin	0,77 ^a	0,96 ^{ab}	7,52 ^a	5,81 ^a	43,05 ^a
	<i>F. mosseae</i> DAOM 227131	0,83 ^a	1,17 ^a	7,50 ^a	5,88 ^a	42,46 ^a
	<i>R. irregularis</i> IR27	0,64 ^a	0,99 ^{ab}	6,40 ^{ab}	4,97 ^a	42,99 ^a
	<i>R. intraradices</i> DAOM 197198	0,82 ^a	0,86 ^b	5,50 ^b	5,60 ^a	43,11 ^a
	Inoculum mixte	0,64 ^a	1,00 ^{ab}	6,63 ^{ab}	4,37 ^a	43,25 ^a

Les moyennes des valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (5%).

6.3.4. Corrélation entre les paramètres mesurés

Aucune corrélation n'a été observée entre l'intensité de mycorhization et les paramètres de croissance des deux graminées (Tableaux 33 et 34).

Chez *S. robustus* (Tableau 33), le poids sec racinaire des plants a été positivement corrélé ($r = 0,98$; $p < 0,05$) à la teneur en K. La teneur en C a été positivement corrélée au poids sec total et à la dépendance mycorhizienne ($r = 0,99$; $p < 0,01$). Une corrélation négative a été observée entre la teneur en Mg et N ($r = 0,99$; $p < 0,01$).

Tableau 33. Corrélation entre les paramètres mesurés chez *S. robustus*.

Variables	PSA	PST	DM	I (%)	N	P	K	Mg	C
PSR	-0,16	0,56	0,58	-0,54	-0,42	0,63	0,98*	0,34	0,64
PSA		0,73	0,70	0,74	0,82	-0,86	-0,11	-0,84	0,65
PST			0,99**	0,24	0,40	-0,29	0,59	-0,48	0,99**
DM				0,20	0,39	-0,26	0,62	-0,47	0,99**
I (%)					0,49	-0,83	-0,60	-0,47	0,13
N						-0,88	-0,29	-0,99**	0,33
P							0,57	0,86	-0,19
K								0,20	0,67
Mg									-0,42

PSR : Poids sec racinaire ; PSA : Poids sec aérien ; PST : Poids sec total ; I (%) : Intensité de mycorhization. *** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Tableau 34. Corrélation entre les paramètres mesurés chez *L. fusca*.

Variables	PSA	PST	DM	I (%)	N	P	K	Mg	C
PSR	0,79	0,94	0,92	0,24	0,40	-0,83	-0,89	0,34	0,35
PSA		0,94	0,96*	0,45	0,61	-0,61	-0,65	0,34	0,27
PST			0,99**	0,36	0,53	-0,76	-0,81	0,36	0,33
DM				0,33	0,51	-0,77	-0,81	0,30	0,37
I (%)					0,98*	0,31	0,21	0,94	-0,73
N						0,13	0,03	0,92	-0,59
P							0,99**	0,24	-0,80
K								0,11	-0,72
Mg									-0,75

PSR : Poids sec racinaire ; PSA : Poids sec aérien ; PST : Poids sec total ; I (%) : Intensité de mycorhization. *** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Chez *L. fusca* (Tableau 34), la dépendance mycorhizienne a été positivement corrélée aux poids sec aérien et total des plants ($r = 0,99$; $p < 0,01$). L'intensité de mycorhization a été positivement corrélée à la teneur en N. Une corrélation positive a été observée entre la teneur en P et K.

6.4. DISCUSSION

Le présent travail montre l'importance des CMA sur la croissance de *L. fusca* et *S. robustus*. Ces résultats sont confortés par des travaux antérieurs qui ont montré que les CMA améliorent la croissance de *Eleusine coracana* et du blé (Ramakrishnan et Bhuvanewari, 2014; Jan et al., 2014; Graham et Abbott, 2000). Diouf et al. (2005) ont montré que la souche de *R. intraradices*, inoculée sur des plants de *Acacia mangium*, pouvait améliorer leur croissance. L'inoculation de quelques arbres fruitiers notamment le jujubier avec la souche *R. irregularis* IR27, a significativement augmenté la production de matière sèche (Bâ et al., 2000). Le ratio poids sec racinaire/poids sec aérien des plants de *S. robustus* a significativement augmenté par l'inoculation avec *F. mosseae* et l'inoculum mixte. Ces résultats indiquent que ces espèces de CMA améliorent le poids sec racinaire et non le poids sec aérien de *S. robustus*. Les paramètres de croissance des deux graminées n'ont pas été corrélés à l'intensité de mycorhization, suggérant que l'amélioration de la croissance des plantes n'est pas directement liée à leur colonisation racinaire par les CMA. Ces résultats corroborent ceux de Smith et al. (2004) et Hetrick et al. (1992) qui ont conclu que les intensités de mycorhization ne sont pas toujours corrélées à la croissance des plantes. Diagne et Ingleby (2003) ont rapporté que dans les zones semi-arides, un taux élevé de colonisation mycorhizienne ne se traduit pas nécessairement par une meilleure croissance des plantes. Diop et al. (2013) ont montré qu'en dépit des paramètres de mycorhization significativement plus élevés chez les plantes de niébé inoculés avec *R. intraradices*, il n'y a pas eu d'effet positif significatif sur la croissance. Cette souche pourrait être qualifiée d'opportuniste. Toutefois, ces résultats, obtenus avec des CMA de collection, doivent être reconsidérés en sélectionnant des souches natives mieux adaptées à l'aire de distribution des deux graminées.

L'intensité de mycorhization de *S. robustus* a significativement augmenté avec la souche *R. intraradices*. Chez *L. fusca*, la mycorhization a été améliorée avec *R. intraradices* et *F. mosseae*. Ces résultats sont similaires à ceux de Diop et al. (2013) et Diouf et al. (2005) sur le niébé et des espèces d'acacias. Toutefois, les taux de mycorhization des deux graminées ont été faibles avec *R. irregularis* IR27 et l'inoculum mixte. Ces résultats ne corroborent pas ceux

de Bâ et al. (2000) qui ont montré des taux de mycorhization élevés sur des plants de jujubier inoculés avec *R. irregularis* IR27. Plusieurs études antérieures ont montré une variabilité génétique importante entre les espèces végétales et/ou CMA sur leur capacité symbiotique. Tagu et al. (2005) ont montré que la capacité du peuplier à former une symbiose ectomycorhizienne était sous le contrôle de son patrimoine génétique. Korkama et al. (2007) ont montré que le génotype de la plante peut jouer un rôle déterminant dans le contrôle de l'association entre la plante et les communautés microbiennes du sol. Klironomos (2003) a montré que la colonisation racinaire était fortement influencée par la plante hôte.

La dépendance mycorhizienne traduit l'efficacité relative de la symbiose sur la production végétale (Plenchette et al., 1983). En fonction de la réponse des plantes à l'inoculation, la dépendance mycorhizienne peut être différente ou similaire. Selon la classification de Cruz et al. (1999), trois catégories de plantes peuvent être distingués suivant leur réponse à la mycorhization: les plantes à forte dépendance mycorhizienne ($DM > 40\%$), celles avec une dépendance mycorhizienne moyenne ($10\% < DM < 40\%$) et le groupe de plantes qui ne dépendent pas des mycorhizes ($MD \leq 10\%$). En considérant la classification de Cruz et al. (1999), *S. robustus* et *L. fusca* ont été modérément dépendants de l'inoculation avec *F. mosseae* et *R. intraradices*. Par contre, *S. robustus* et *L. fusca* ne dépendent pas de *R. irregularis* IR27 et de l'inoculum mixte. Ces résultats indiquent que la réponse des deux graminées à l'inoculation dépend de la combinaison plante-CMA et confirment des travaux antérieurs qui montrent que la dépendance mycorhizienne dépend de la plante (Zangaro et al., 2007) mais aussi de l'espèce de CMA (Nogueira et Cardoso, 2007; Othira et al., 2012). La dépendance mycorhizienne d'une plante peut dépendre également de la morphologie de son système racinaire (Baylis, 1975). Ce dernier suggère que la longueur et la fréquence des poils absorbants sont des indices de mycotrophie. En effet, la longueur et la densité des poils absorbants peuvent influencer la dépendance mycorhizienne des plantes de par leur contribution à l'acquisition de minéraux notamment le P (Tawaraya, 2003 ; Gahoonia et al., 1997). *S. robustus* et *L. fusca* présentent des racines fines avec beaucoup de poils absorbants. Dans la littérature, des corrélations négatives entre la densité des poils absorbants et la dépendance mycorhizienne ont été apportées par plusieurs auteurs (Manjunath et Habte, 1991 ; Schweiger et al., 1995) sur *Sesbania* et *Lolium rigidum*. Les faibles dépendances mycorhiziennes observées chez *S. robustus* et *L. fusca* ont été rapportées par Hetrick et al. (1993) sur quelques espèces de *Triticum* inoculées avec *Glomus etunicatum*. Par contre,

d'autres auteurs ont montré de forte dépendance mycorhizienne de deux graminées *Andropogon pintoii* (55%) et *Brachiaria decumbens* (94%) inoculées avec *Glomus manihotis* (Saif et al., 1987 ; Tawaraya, 2003). Bâ et al. (2000) ont montré que le jujubier était fortement dépendant de *R. irregularis* IR27 avec plus de 70%. La même souche *R. irregularis* IR27 a conféré à *Prosopis juliflora* une dépendance de 26,2% (Duponnois et al., 2001).

Par ailleurs, les faibles dépendances mycorhiziennes de *S. robustus* et *L. fusca* pourraient constituer un atout pour l'établissement d'autres espèces ou du moins pour la coexistence de ces graminées avec d'autres plantes. En effet, des travaux (Hart et al., 2003 ; Allen et Allen, 1990) ont montré que les CMA peuvent promouvoir la coexistence des plantes lorsque l'espèce dominant (facilitateur) est moins dépendant des mycorhizes. Des résultats similaires ont été rapportés par Hartnett et al. (1993) sur *Andropogon gerardii*, une graminée fortement dépendante des mycorhizes et *Elymus canadensis*, faiblement dépendante. En effet, ces auteurs ont montré que l'effet compétiteur de *Andropogon* sur *Elymus* disparaissait en absence des CMA.

L'amélioration de la productivité des plantes mycorhizées a été attribuée particulièrement, à l'augmentation de l'absorption de nutriments de faible mobilité comme le phosphore (Smith et Read, 2008 ; Rohyadi et al., 2004). Les CMA, grâce à leur réseau d'hyphes très dense, fournissent à la plante hôte jusqu'à 80% de leur besoin en P (Ezawa et al., 2002 ; Ruiz-Lozano et Azcon, 2000 ; Marschner et Dell, 1994). L'inoculation des plants de *S. robustus* avec l'inoculum mixte a significativement augmenté la concentration en P des parties aériennes. Des résultats similaires ont été obtenus par Liu et al. (2001) qui ont montré que l'inoculation du blé avec *G. mosseae* a amélioré sa teneur en P et sa croissance, comparé aux plants témoins non inoculés. Toutefois, chez les plants de *L. fusca*, l'inoculation n'a pas eu d'effet significatif sur la concentration en P de la plante. L'effet bénéfique des mycorhizes sur la nutrition minérale des plantes ne se limite pas seulement au P. L'amélioration de l'absorption de d'autres éléments comme le Mg, K et N a été démontrée chez plusieurs espèces végétales (Clark et al., 1999). Cependant, dans notre étude, tous les CMA testés n'ont pas eu d'effet positif sur les concentrations en Mg, K et N des parties aériennes de *L. fusca* et *S. robustus*. L'absence d'effet positif des CMA sur la nutrition minérale des graminées pourrait être liée à la morphologie de leur système racinaire. En effet, les graminées possèdent des racines fines avec des poils absorbants denses de sorte qu'elles peuvent prélever les éléments minéraux du sol indépendamment de la symbiose mycorhizienne.

Une corrélation positive a été observée entre la concentration en N et la colonisation racinaire des plants de *L. fusca*. Par contre, cette corrélation n'était pas significative chez *S. robustus*. Ces résultats indiquent que la quantité de N prélevée serait liée au volume de sol prospecté par les CMA. Une corrélation positive a été notée entre la concentration en K et la concentration en P des parties aériennes de *L. fusca*, suggérant que l'augmentation de la concentration en K peut être une conséquence de l'augmentation de la disponibilité en P pour la plante. La concentration en K des parties aériennes de *S. robustus* a été positivement corrélée à son poids sec racinaire. Par contre, cette corrélation n'était pas significative chez *L. fusca*. Ces résultats indiquent que les CMA améliorent la production de biomasse de *S. robustus* à travers une augmentation de l'absorption de K. La concentration en C de *S. robustus* a été positivement corrélée à sa production de biomasse sèche et à sa dépendance mycorhizienne. Partant du principe que lors de l'association symbiotique les plantes optimisent leur nutrition en P et N en fournissant aux CMA la quantité de C nécessaire, il est probable que les plantes qui ont de faibles valeurs de dépendance mycorhizienne, contrairement à celles qui dépendent fortement des mycorhizes, limiteraient la quantité de C à allouer aux CMA.

6.5. CONCLUSION

Les jeunes plants de *S. robustus* et *L. fusca* inoculés avec les souches de CMA de la collection de LCM, ont connu une augmentation significative de la production de biomasse sèche. La mycorhization des graminées a été améliorée avec *R. intraradices* et *F. mosseae*. La souche *R. irregularis* IR27 et l'inoculum mixte n'ont pas eu d'effet significatif sur la mycorhization de *S. robustus* et *L. fusca*.

S. robustus et *L. fusca* ont été modérément dépendants de l'inoculation avec *F. mosseae* et *R. intraradices*. Par contre, ces deux graminées ne dépendent pas de *R. irregularis* IR27 et de l'inoculum mixte. Les faibles dépendances mycorhiziennes observées chez les deux graminées pourraient favoriser leur coexistence avec *P. juliflora* et *A. seyal*.

L'absorption du P a été améliorée uniquement avec l'inoculum mixte chez *S. robustus*. Par contre, tous les autres éléments chimiques (N, Mg, C, K et P chez *L. fusca*) n'ont pas connu d'effet positif de leur absorption par les graminées, malgré les corrélations positives qui ont été observées entre ces éléments et les paramètres mesurés.

7. DISCUSSION GENERALE

Dans le Delta du Sine et du Saloum, la dégradation des sols par la salinité entraîne une baisse du rendement des cultures et la disparition du couvert végétal naturel remplacé par d'immenses étendues de terres salées (ex. tannes). La réhabilitation de ces vastes zones salées, passe en partie par l'utilisation de plantes tolérantes au sel. Parmi les espèces qui sont adaptées à ces zones salées, figurent *P. juliflora* et *A. seyal*, des légumineuses très appréciées par les populations rurales comme source de fourrage et de bois. Ce sont des espèces forestières d'une importance majeure pour le reboisement dans les zones aride et semi-aride du fait principalement de leurs capacités à s'établir naturellement sur des sols pauvres et dégradés grâce en partie à leur aptitude à s'associer avec des bactéries fixatrices d'azote et des CMA. Dans les sols salés, de jeunes plants de *P. juliflora* et *A. seyal* émergent souvent des touffes de *S. robustus*, une graminée halophyte pérenne, capable de s'associer à des CMA présents naturellement dans sa rhizosphère. Elle pourrait réduire les impacts négatifs du sel sur les légumineuses et stimuler la microflore rhizobienne et mycorhizienne potentiellement bénéfique à *P. juliflora* et *A. seyal*. *S. robustus* serait susceptible d'agir en tant que plante facilitatrice ou plante nurse pour l'établissement et la croissance de *P. juliflora* et *A. seyal* dans les zones salées.

Notre étude a consisté à évaluer en condition contrôlée l'effet nurse de *S. robustus* sur *P. juliflora* et *A. seyal* sous stress salin de même que les potentialités d'adaptation de la graminée à la salinité. Les communautés de rhizobia partagées par *S. robustus* et *P. juliflora* en fonction de la salinité et de la saison ont été identifiées, et leurs propriétés symbiotiques ont été déterminées. Nous avons identifié les communautés de CMA partagées par *S. robustus* et *P. juliflora* en fonction de la salinité et de la saison. L'efficacité de trois souches de CMA de la collection du LCM a été testée sur *S. robustus* afin de sélectionner les souches performantes en condition contrôlée.

7.1. *S. robustus*, une plante facilitatrice de germination et vectrice de propagation des CMA en condition de stress salin

Notre étude, réalisée en condition contrôlée en serre, a montré que *S. robustus* favorise la germination d'*A. seyal*. Cet effet positif de la graminée sur la germination d'*A. seyal* pourrait s'expliquer par une diminution significative de la salinité des sols en présence de *S. robustus*. La salinité est un facteur limitant la germination des graines (Guma et al., 2010; Wei et al., 2008). L'impact négatif du sel sur la germination des graines réside dans l'augmentation de la

pression osmotique de la solution du sol, qui limite l'absorption de l'eau nécessaire au déclenchement des processus métaboliques impliqués dans la germination (Ungar, 1982). La salinité peut également avoir un effet toxique sur la germination des graines (Mâalem et al., 2010 ; Khemiri et al., 2004). Contrairement à *A. seyal*, la germination des graines de *P. juliflora* n'a pas été facilitée par la graminée, suggérant une plus grande sensibilité à la salinité de la germination d'*A. seyal*.

S. robustus a augmenté significativement le potentiel infectieux mycorhizogène des sols sous *A. seyal* et *P. juliflora* par une stimulation de la multiplication des propagules fongiques mycorhiziennes. L'impact positif de la graminée sur le potentiel mycorhizogène serait probablement lié aux exsudats racinaires produits par la plante. Certains auteurs ont montré que les exsudats racinaires peuvent influencer la germination de spores et la croissance des hyphes (Gianinazzi-Pearson et al., 1989). Une amélioration du potentiel mycorhizogène du sol a été rapportée dans des plantations d'arbres au Sénégal et attribuée à la flore herbacée sous-jacente plutôt qu'à la contribution de l'arbre même (Ingleby et al., 1997 ; Diagne et al., 2006).

Dans notre étude, la graminée n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance d'*A. seyal* et *P. juliflora* en condition saline. *S. robustus* affecterait certaines étapes du cycle de développement des légumineuses. En effet, *A. seyal* est positivement affecté par la graminée durant la phase germinative alors que chez *P. juliflora*, la graminée a eu un impact positif sur la survie de cette légumineuse.

S. robustus serait une plante facilitatrice de la germination d'*A. seyal* et vectrice de la multiplication des propagules mycorhiziennes dans la rhizosphère en condition de stress salin. Une autre hypothèse liée à la capacité *S. robustus* à accumuler des sels pourrait expliquer en partie son impact positif sur la survie des jeunes plants de *P. juliflora* en milieu salé.

7.2. *S. robustus*, une plante accumulatrice de Na

Dans notre étude, l'augmentation de la concentration en NaCl est positivement corrélée à l'accumulation d'ion Na dans les parties aérienne et racinaire de *S. robustus*. *S. robustus* se maintiendrait dans les sols salés grâce à sa capacité à accumuler les ions Na et à assurer l'ajustement osmotique. Des résultats similaires ont été rapportés par Vasquez et al. (2006) sur *Spartina alterniflora*. *S. robustus* a accumulé des ions Na au détriment des ions K. La diminution de l'absorption de K serait liée à une compétition entre K et Na au niveau des

transporteurs membranaires (Silva et al., 2015). L'accumulation d'ion Na est associée à une diminution de la production de biomasse sèche de *S. robustus*. Toutefois une croissance optimale de *S. robustus* a été observée entre 0 et 150 mM de NaCl à 150 jours de stress. Par conséquent, *S. robustus* pourrait être considérée comme une espèce végétale appartenant au groupe des halophytes facultatives qui ne présentent pas de besoin physiologique par rapport à la salinité, mais peuvent tolérer une certaine gamme de salinité sans réduction significative de la biomasse (Sleimi et al., 2015). Les variations dans la tolérance des plantes à la salinité ont été rapportées chez plusieurs graminées halophytes. Hameed et al. (2013) ont montré une augmentation significative du poids sec des racines de *S. arabicus* jusqu'à 100 et 150 mM de NaCl. La croissance optimale de *S. virginicus* a été observée entre 100 et 150 mM de NaCl (Bell et O'Leary, 2003). Une autre halophyte, *Spartina alterniflora*, a montré une croissance maximale à des salinités comprises entre 0 et 100 mM (Sleimi et Abdelly, 2003). Outre le Na, *S. robustus* accumule des osmolytes organiques dont la proline. L'augmentation de la teneur en proline avec la salinité a été rapportée sur la graminée halophyte, *Odyssea paucinervis* par Naidoo et al. (2008). La proline est impliquée dans les stratégies d'adaptation développées par la plante pour contrecarrer les effets négatifs de la salinité (Shafi et al., 2011; Flowers et Colmer 2008). Des auteurs ont montré que les plantes qui synthétisent de grandes quantités de proline sont plus tolérantes aux stress salin (Mehdi et al., 2010; Demiral et Türkan, 2005). L'accumulation de Na et la synthèse de proline pour assurer l'ajustement osmotique constituent des marqueurs de tolérance de *S. robustus* à la salinité. Par ailleurs, l'effet facilitateur de *S. robustus in situ* pourrait être lié à sa capacité à héberger dans sa rhizosphère une communauté de rhizobia adaptée à la salinité et potentiellement bénéfique à *P. juliflora* et *A. seyal*.

7.3. Des communautés de rhizobia de la rhizosphère de *P. juliflora* et *S. robustus* abondantes et diversifiées en zone salée.

L'étude de la diversité des rhizobia associés à la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* a été menée dans 4 niveaux de salinité en saisons sèche et humide dans le site de Niam-Diarokh. Les résultats ont montré que les rhizobia ont été plus abondants dans les sols sous *S. robustus* comparés aux sols hors du couvert végétal. Ainsi, *S. robustus* a stimulé la microflore rhizobienne des sols rhizosphériques. Ces résultats corroborent ceux de Garau et al. (2009) et Gueye et al. (2009) qui ont montré que les herbacées tapissant les sous-bois de légumineuses *Rhynchosia ferulifolia* et *Zornia glochidiata* sont des hôtes potentiels pour les rhizobia. Les

racines des plantes fournissent des rhizodépôts tels que les sucres, les acides aminés et quelques métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes, etc.) favorables à la reconnaissance et à la multiplication des communautés rhizobiennes (Haldar et Sengupta 2015).

Notre étude a montré une grande diversité génétique des populations de rhizobia associés à *S. robustus* et *P. juliflora*. Ces rhizobia appartiennent aux genres *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* et *Burkholderia*. Dans le groupe des *Mesorhizobium*, la plupart des souches sont proches des souches type de *Mesorhizobium plurifarum* LMG11892 et de *Mesorhizobium huakuii* LMG14107. Ces résultats confirment une large diffusion de l'espèce *Mesorhizobium plurifarum* à travers les tropiques (de Lajudie et al., 1998). Dans notre étude, la grande diversité des rhizobia observée est comparable à des travaux sur des légumineuses annuelles et pérennes poussant dans différents sols au Sénégal (Diouf et al., 2007 ; Fall et al., 2008 ; Gueye et al., 2009 ; Séné et al., 2012 ; Bakhoum et al., 2014). Des génotypes communs ont été isolés des sols sous *S. robustus* et *P. juliflora*. Ces résultats suggèrent de ces deux espèces partagent un cortège rhizobien. La diversité des rhizobia a été structurée par la saison. En effet, certaines souches ont été communes à une saison contrairement à d'autres qui apparaissaient durant les deux saisons. McIntyre et al. (2007) ont montré que les souches de rhizobia résistantes à la sécheresse peuvent dominer les populations bactériennes dans le sol. Par contre, Mnasri et al. (2007) et Graham (1992) ont montré que la sécheresse affecte directement la persistance, la survie et la diversité génétique des rhizobia dans le sol. La diversité des rhizobia est structurée par les paramètres chimiques du sol dont la salinité. La variation des niveaux de salinité peut influencer les microorganismes. Ainsi, une corrélation positive a été notée entre certaines souches de rhizobia et la conductivité électrique des sols de sous *S. robustus*, *P. juliflora* et hors du couvert végétal. Ces résultats suggèrent que certaines souches de rhizobia sont adaptées à des niveaux de salinité élevés. Dans notre étude, l'analyse des indices de Shannon et de Simpson a montré un effet négatif de la salinité sur la diversité des populations de rhizobia. Ce constat est en accord avec les travaux de Zahran (1991 ; 1999).

L'analyse phénotypique portant sur la tolérance des souches de rhizobia à différentes concentrations de NaCl en milieu solide (gélose) a mis en évidence l'existence de souches tolérantes au sel. En effet, certaines souches de *Ensifer* pouvaient tolérer jusqu'à 600 mM de NaCl. Les souches de *Mesorhizobium* ont toléré jusqu'à 400 mM de NaCl. D'autres études ont montré que certaines souches de *Mesorhizobium* isolées d'*A. seyal* et d'*A. senegal*

pouvaient tolérer jusqu' à 340 mM de NaCl (Diouf et al., 2007 ; Fall et al., 2008 ; Diouf et al., 2015). La souche type *Mesorhizobium plurifarium* ORS1032 a toléré jusqu'à 400 mM de NaCl (Diouf et al., 2015). Les souches de *Ensifer* ont été plus tolérantes à la salinité que les souches de *Mesorhizobium*. Ces résultats sont confortés par les travaux de Odee et al. (1997) qui montrent que des souches à croissance rapide sont plus tolérantes à la salinité. La tolérance des rhizobia à la salinité est souvent positivement corrélée à l'efficacité symbiotique (Lal et Khanna, 1994 ; Miller-Williams et al., 2006; Domínguez-Ferreras et al., 2009). Ainsi, les tests d'infectivité et d'efficacité des isolats de rhizobia sur les plantes d'*A. seyal* et *P. juliflora* ont montré un effet positif de l'inoculation par les souches de *Ensifer* sur les paramètres de croissance, de nodulation et de fixation d'azote des plantes d'*A. seyal* et *P. juliflora*. Diouf et al. (2005) ont démontré que l'inoculation de *A. mangium* et *A. auriculiformis* par des souches de rhizobia tolérantes au sel peut améliorer la nodulation en conditions de stress salin. Certains auteurs suggèrent que l'efficacité de la symbiose rhizobium-légumineuse en sols salins est obtenue lorsque les deux partenaires sont résistants au stress salin (Cordovilla et al., 1995). La tolérance au sel des souches de *Ensifer* et *Mesorhizobium*, à la fois infectives et efficaces sur les plants d'*A. seyal* et *P. juliflora* peu tolérants, est prometteuse en ce qui concerne l'amélioration de l'établissement de ces plantes sur des sols salés. *S. robustus* héberge une communauté de rhizobia bénéfique aux 2 légumineuses. *S. robustus* serait un bon candidat comme plante facilitatrice de l'établissement des 2 légumineuses dans des sols salés.

Parallèlement à l'étude des rhizobia, nous avons identifié les CMA des 2 plantes. Les CMA sont des symbiotes fongiques souvent nécessaires à la fixation d'azote en milieu salé.

7.4. Des communautés de CMA de *P. juliflora* et *S. robustus* structurées par la salinité

Notre étude a été réalisée sur des racines de *S. robustus* et *P. juliflora* prélevées dans 4 niveaux de salinité en saisons sèche et humide. Une grande diversité de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* a été notée après séquençage massif du 18S. Au total, 20 genres répartis dans 10 familles ont été identifiés chez *S. robustus* et *P. juliflora*. Les *Glomeraceae* ont été majoritaires sur les racines de *S. robustus* et *P. juliflora* dans les zones salées au Sénégal. Ces résultats suggèrent une meilleure adaptation des *Glomeraceae* à la salinité. D'autres études (Manga et al., 2007; Séné et al., 2012; Ndoye et al., 2012) ont montré la prédominance des *Glomeraceae* dans la plupart des écosystèmes au Sénégal. Blaszkowski et al. (2002) ont

montré une adaptation des *Glomeraceae* aux conditions les plus hostiles telles que la sécheresse, la salinité et les autres stress environnementaux.

Parmi les 3 facteurs étudiés à savoir la salinité, la plante et la saison, seule la salinité a eu un effet significatif sur la structure des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora*. La salinité apparaît donc comme le facteur structurant les communautés de CMA. En effet, sur les 20 genres associés à *S. robustus* et *P. juliflora*, 8 ont été affectés par le sel. Ainsi, l'abondance relative des *Sclerocystis*, *Paraglomus* et *Acaulospora* a augmenté avec la salinité, suggérant une adaptation de ces genres fongiques aux conditions de salinité. Par contre, les genres *Rhizophagus*, *Incertae-sedis*, *Glomus*, *Redeckera* et *Ambispora* apparaissent plus sensibles à la salinité. La salinité n'a pas eu d'effet significatif sur la richesse (Chao) des communautés de CMA. Par contre, elle a significativement diminué l'indice de Shannon et l'Équitabilité des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora*. Nos résultats corroborent ceux de Guo et Gong (2012) qui ont montré que la salinité avait un effet négatif sur la diversité de 18 espèces végétales associant des halophytes et non halophytes. Yamato et al. (2012) ont rapporté des effets similaires sur *Ixeris repens*. Dans notre étude, le taux de recouvrement n'a pas été impacté par la salinité. Ce taux, à peu près comparable dans tous les niveaux de salinité, est supérieur à 96%. Le taux élevé de recouvrement de la diversité suggère que le nombre de séquences analysées par échantillon a été suffisant pour estimer la diversité des CMA dans les racines de *S. robustus* et *P. juliflora*.

La plante n'a pas eu d'effet significatif sur la structure des communautés de CMA, suggérant que *S. robustus* et *P. juliflora* ont partagé les mêmes communautés de CMA avec des abondances relatives comparables. Nos résultats sont en accord avec ceux de Hetrick et al. (1994 ; 1989) qui ont montré que des souches de CMA peuvent coloniser plusieurs espèces et améliorer leur nutrition hydrominérale. La plante n'a pas eu d'effet significatif sur l'indice de Shannon, l'Équitabilité et la richesse (Chao) des communautés de CMA. Ainsi, le nombre d'OTU que partage *S. robustus* et *P. juliflora* à chaque niveau de salinité n'a pas varié. Toutefois, il faut noter que le nombre d'OTU partagé entre ces deux espèces a diminué avec la salinité. Ces résultats indiquent qu'en condition de stress salin, chaque plante a tendance à garder ses symbiotes fongiques pour mieux s'adapter à la salinité.

La saison n'a pas eu d'effet significatif sur la structure des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora*. Ce qui signifie que tous les genres fongiques identifiés sur les racines de *S. robustus* et *P. juliflora* ont été présents en saisons sèche et humide. Ces CMA seraient

adaptés à l'humidité et à la sécheresse. La saison n'a pas eu d'impact significatif sur les indices de diversité de Shannon et l'Équitabilité. Nos résultats sont confortés par les travaux de Santos-Gonzalez et al. (2007) qui ont montré que la variation saisonnière n'a pas d'effet significatif sur la diversité des CMA de *Prunella vulgaris* et *Antennaria dioica*. Contrairement à la diversité, la richesse (Chao) des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora* a significativement augmenté en saison sèche. Ces résultats indiquent que les espèces rares sont plus fréquents en saison sèche qu'en saison humide (Chao et al., 2009).

S. robustus héberge une communauté de CMA potentiellement bénéfique aux 2 légumineuses. *S. robustus* serait un bon candidat comme plante facilitatrice de l'établissement des 2 légumineuses dans des sols salés. Toutefois, l'étude de la réponse de *S. robustus* et *L. fusca* à l'inoculation mycorhizienne en condition contrôlée est une étape préalable pour la prise en compte de la symbiose dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes.

7.5. Des souches de CMA efficaces sur *S. robustus* et *L. fusca*

Dans cette étude, la réponse de *S. robustus* et *L. fusca* à l'inoculation avec trois souches exotiques de CMA et un inoculum mixte des 3 souches a été testée en condition contrôlée. Nos résultats ont montré un effet bénéfique de la souche *F. mosseae* sur le poids sec racinaire et total de *S. robustus*. La souche *F. mosseae* et l'inoculum mixte ont significativement augmenté le ratio poids sec racinaire/poids sec aérien de *S. robustus*, suggérant que ces espèces de CMA améliorent le poids sec racinaire et non le poids sec aérien. La souche *R. intraradices* a significativement augmenté le poids sec aérien des plants de *S. robustus*, tandis que l'inoculum mixte a amélioré sa biomasse sèche racinaire. Chez *L. fusca*, seule la souche *R. intraradices* a significativement augmenté le poids sec aérien et total des plants. Ces résultats sont confortés par les travaux de Ramakrishnan et Bhuvaneshwari (2014) et Jan et al. (2014) qui ont montré que l'inoculation avec les CMA améliore la croissance de graminées *Eleusine coracana* et *Triticum aestivum*. D'autres travaux réalisés au LCM ont montré que les souches *R. intraradices* et *R. irregularis* IR27 pouvaient significativement augmenter la production de biomasse sèche de *A. mangium* et *Zizuphus mauritiana* (Diouf et al., 2005 ; Bâ et al., 2000). Dans notre étude, les paramètres de croissance de *S. robustus* n'ont pas été toujours corrélés à la mycorhization des plants. En effet, *S. robustus* a montré les meilleurs taux de mycorhization avec *R. intraradices*. Toutefois, cette souche n'a pas eu d'effet significatif positif sur le poids sec total des plants. Cette souche pourrait être qualifiée d'opportuniste. Nos résultats corroborent ceux d'autres auteurs qui ont montré que des

intensités de mycorhization élevées des plantes ne se traduisent pas nécessairement par une meilleure croissance. Des résultats similaires ont été rapportés par Diop et al. (2013) sur du niébé inoculé avec la souche *R. intraradices*.

La DM est un concept opérationnel de prise en compte des MA dans les systèmes de culture (Fortin et al., 2016). Elle traduit l'efficacité relative de la symbiose sur la production végétale (Plenchette et al., 1983). D'après la classification de Cruz et al. (1999), *S. robustus* et *L. fusca* sont modérément dépendants de l'inoculation avec *F. mosseae* et *R. intraradices*. Par contre, ces graminées dépendent peu de *R. irregularis* IR27 et de l'inoculum mixte pour leur croissance. La DM de la plupart des graminées est relativement faible (Fortin et al., 2016). Une des hypothèses avancées est reliée aux caractéristiques morphologiques des racines notamment la longueur et la densité des poils absorbants. La plupart des graminées présentent un système racinaire de type graminéoïde avec des racines fines pourvues de poils absorbants, ce qui limiterait la mycorhization. En effet, les poils absorbants auraient un rôle équivalent aux hyphes extra-racinaires pour l'absorption des nutriments (Fortin et al., 2016). En conséquence, les plantes type graminéoïde seraient moins dépendantes des mycorhizes que les plantes type magniloïde qui possèdent un système racinaire grossièrement ramifié avec peu de poils absorbants. L'absence d'effet positif des CMA sur la nutrition minérale de *S. robustus* pourrait être liée à la morphologie de son système racinaire. En effet, cette graminée possède des racines fines avec des poils absorbants denses de sorte qu'elle pourrait prélever les éléments minéraux du sol indépendamment de la symbiose mycorhizienne. Toutefois, la corrélation entre la DM et la présence de poils absorbants n'est pas toujours établie comme c'est le cas des fruitiers forestiers (Guissou et al., 1998). Nos résultats indiquent aussi que la réponse des deux graminées à l'inoculation dépend de la souche de CMA. L'efficacité du champignon revêt donc dans ce cas une importance particulière, et la recherche de souches indigènes performantes et adaptées est à entreprendre parmi les CMA identifiés dans les sols salés de notre site d'étude.

L'inoculation des plants de *S. robustus* avec l'inoculum mixte a significativement augmenté la concentration en P des parties aériennes. Par contre, chez *L. fusca*, l'inoculation n'a pas eu d'effet significatif sur la nutrition minérale des plants. Des auteurs ont rapporté que l'amélioration de la productivité des plantes mycorhizées était attribuée à l'augmentation de l'absorption de nutriment de faible mobilité comme le phosphore (Smith et Read, 2008 ; Rohyadi et al., 2004). Liu et al. (2001) ont montré que l'inoculation du blé avec *F. mosseae* a

amélioré sa teneur en P et sa croissance, comparé aux plants témoins non inoculés. Cependant, dans notre étude, tous les CMA testés n'ont pas eu d'effet positif sur les concentrations en Mg, K et N des parties aériennes de *S. robustus*.

8. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail de thèse était d'évaluer l'effet plante nurse de *S. robustus* pour l'établissement de *P. juliflora* et *A. seyal* en milieu salé. Notre étude a montré un effet positif de la graminée sur la germination d'*A. seyal* et la survie de *P. juliflora* en condition de stress salin. Ceci pourrait être dû à la capacité de *S. robustus* à diminuer la salinité du sol et à assurer l'ajustement osmotique. *S. robustus* a également stimulé ou maintenu les potentiels infectieux mycorhizogène et rhizobien des sols sous *A. seyal* et *P. juliflora* et augmenté significativement le taux de mycorhization de ces légumineuses. La question se posait de savoir si *S. robustus* hébergeait dans sa rhizosphère une microflore symbiotique potentiellement bénéfique aux deux légumineuses.

Notre étude a révélé une grande diversité génétique de populations de rhizobiums associés à la rhizosphère de *P. juliflora* et *S. robustus*. Ces rhizobiums appartiennent aux genres *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* et *Burkholderia*. Dans le groupe des *Mesorhizobium*, la plupart des souches sont proches des souches type de *Mesorhizobium plurifarum*. La diversité des rhizobiums est structurée par la salinité et la saison. La salinité a eu un effet négatif sur la diversité des rhizobiums. Des génotypes communs ont été isolés des sols sous *S. robustus* et *P. juliflora*, suggérant que ces deux espèces végétales partagent un cortège rhizobien. Les génotypes communs sont performants sur *P. juliflora* et *A. seyal*. *S. robustus* sélectionnerait dans sa rhizosphère des communautés rhizobiennes adaptées au sel et efficaces sur les 2 légumineuses.

Parallèlement, une approche de séquence massive (Illumina) du 18S a montré une grande diversité de CMA communs à *S. robustus* et *P. juliflora*. Les *Glomeraceae* sont la famille la plus représentée chez *S. robustus* et *P. juliflora* dans les zones salées. Seul le facteur salinité a eu un effet significatif sur la structure des communautés de CMA de *S. robustus* et *P. juliflora*. Sur les 20 genres identifiés chez *S. robustus* et *P. juliflora*, 8 ont été plus ou moins affectés par le sel. L'abondance relative des *Sclerocystis*, *Paraglomus* et *Acaulospora* a augmenté avec la salinité alors qu'elle a été plus faible chez *Rhizophagus*, *Incertae-sedis*, *Glomus*, *Redeckera* et *Ambispora*. *S. robustus* et *P. juliflora* ont des OTU communes. *S. robustus* sélectionnerait dans sa rhizosphère des taxons fongiques adaptés au sel et potentiellement efficaces sur *P. juliflora*. Les souches de la collection du LCM étant peu efficaces sur *S. robustus*, le choix de souches indigènes efficaces et adaptées au sel est à

privilégier parmi les espèces appartenant aux genres *Sclerocystis*, *Paraglomus* et *Acaulospora* dont l'abondance a augmenté avec la salinité.

Toutes ces propriétés feraient de *S. robustus* un bon candidat comme plante facilitatrice pour l'établissement des 2 légumineuses moins tolérantes au sel. L'effet facilitateur de *S. robustus* devrait être pris en compte dans les programmes de restauration des zones salées du Delta du Sine et Saloum. Il s'agira de promouvoir les systèmes agroforestiers *S. robustus/P. juliflora* et *S. robustus/A. seyal* dans les zones dénudées par une approche agroécologique (intensification écologique) basée sur l'utilisation de *S. robustus* comme plante de couverture pour réhabiliter les sols salés. Pour cela, nous proposons des itinéraires techniques basés sur l'association de *S. robustus* avec les 2 légumineuses dans les zones salées : (i) installation de *S. sporobolus* comme plante de couverture grâce à sa capacité à se multiplier végétativement, (ii) semis direct des 2 légumineuses sur couverture végétale permanente de *S. robustus*. La gestion de ces systèmes agroforestiers requiert des connaissances sur les modalités d'installation de la plante de couverture (période et durée de plantation, densité du semis direct, boutures ou éclats de souches, impact du bétail transhumant, etc.) et des légumineuses (période de plantation sur couvert végétale, densité du semis direct, repiquage de jeunes plants, impact du bétail transhumant, etc.).

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdullah M, Akram M, Khan AD, Qureshi RH (1990). Internal water resources management by plants under various root environment stresses with special reference to kallar grass *Leptochloa fusca* (L.) Stapf. Proceedings of the National Seminar on Water Resources Development and its Management in Arid Areas, 6-8 October 1990, Quetta, Pakistan.
- Ahmad F (2010). *Leptochloa fusca* (L.) Stapf cultivation for utilization of salt-affected soil and water resources in Cholistan desert. Rev Soc Nat 22(1): 141-149.
- Akça Y, Samsunlu E (2012). The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline and nutrient accumulation, and K/Na Ratio in walnut. Pak J Bot 44 (5): 1513-20.
- Alatar AA (2011). Effect of temperature and salinity on germination of *Achillea fragrantissima* and *Moringa peregrina* from Saudi Arabia. Afr J Biotechnol 10 (17): 3393-3398.
- Alazard D, Duhoux E (1990). Development of stem nodules in a tropical forage legume, *Aeschynomene afraspera*. J Exp Bot 41: 1199-1206.
- Alexandre A, Laranjo M, Young JPW, Oliveira S (2008). dnaJ is a useful phylogenetic marker for alphaproteobacteria. Int J Syst Evol Microbiol 58: 2839-2849.
- Al-Garni SMS (2006). Increasing NaCl-salt tolerance of a halophytic plant *Phragmites australis* by mycorrhizal symbiosis. Amer-Eurasian J Agri Environ Sci 1: 119-126.
- Aliasgharzadeh N, Saleh Rastin N, Towfighi H, Alizadeh A (2001). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of the Tabriz Plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. Mycorrhiza 11: 119-122.
- Al-Karaki GN, Hammad R, Rusan M (2001). Response of two tomato cultivars differing in salt tolerance to inoculation with mycorrhizal fungi under salt stress. Mycorrhiza 11: 43-47.
- Al-Karaki GN (2000). Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. Mycorrhiza 10: 51-54.
- Allen EB, Allen MF (1990). The mediation of competition by mycorrhizae in successional and patchy environments. In Perspectives in Plant Competition (Grace, J.B. and Tilman, D., eds), Academic Press, pp. 367-389.
- Amann G, Stetter KO, Llobet-Brossa E, Amann R, Antón J (2000). Direct proof for the presence and expression of two 5% different 16S rRNA genes in individual cells of *Haloarcula marismortui*. Extremophiles 4: 373-376.
- Arnon DI (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24: 1-15.
- Anderson S (2005). Spread of the introduced tree species *Prosopis juliflora* (Sw.) DC, in the lake Baringo area, Kenya. Institutionen för skoglig vegetationsekologi SLU, Umeå, Sweden. ISSN 1652-4918.
- Andrade G, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (1998). Bacterial associations with the mycorrhizosphere and hyphosphere of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Plant Soil 202 : 79-87.

- Anonyme (2006). Conférence électronique sur la salinisation: Extension de la salinisation et Stratégies de prévention et réhabilitation. Organisée et coordonnée par: IPTRID du 6 février au 6 Mars 2006, pp. 20.
- Anonyme (1998). Conférence électronique sur la salinisation : Extension de la salinisation et stratégies de prévention et réhabilitation, 6 février au 6 Mars 2006. In Conference électronique sur la salinisation. IPTRID, FAO, CISEAU, pp. 12.
- Anschütz U, Becker D, Shabala S (2014). Going beyond nutrition: regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *J Plant Physiol* 171: 670-687.
- Augé R, Toler H, Sams C, Nasim G (2008). Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza* 18: 115-121.
- Augé RM (2004). Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Can J Soil Sci* 84: 373-381.
- Azcon-Aguilar C, Palenzuela J, Roldan A, Bautista S, Vallejo R, Barea JM (2003). Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Appl Soil Ecol* 22: 29-37.
- Bâ AM, Duponnois R, Moyersoen B, Diedhiou AG (2012). Ectomycorrhizal symbiosis of tropical African trees. *Mycorrhiza* 22: 1-29.
- Bâ A, Duponnois R, Diabaté M, Dreyfus B (2011). Les champignons ectomycorhiziens des arbres forestiers en Afrique de l'Ouest : méthodes d'étude, diversité, écologie, utilisation en foresterie et comestibilité. Editions IRD, pp. 250.
- Bâ AM, Plenchette C, Danthu P, Duponnois R, Guissou T (2000). Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit trees in Senegal. *Agrofor Syst* 50: 95-105
- Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20: 642-50.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2003). Carbon Export from Arbuscular Mycorrhizal Roots Involves the Translocation of Carbohydrate as well as Lipid. *Plant Physiol* 131: 1496-1507.
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2000). Update on Symbiosis Arbuscular Mycorrhizas. *Plant physiol* 124: 949-957.
- Bahrani A, Hagh Joo M (2012). Response of Some Wheat (*Triticum aestivum L.*) Genotypes to Salinity at Germination and Early Seedling Growth Stages. *World Appl Sci J* 16 (4): 599-609.
- Bainard LD, Klironomos JN, Gordon AM (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi in tree-based intercropping systems: a review of their abundance and diversity. *Pedobiologia* 54: 57-61.
- Bakhom N, Le Roux C, Diouf D, Kane A, Ndoye F, Fall D, Duponnois R, Noba K, Sylla SN, Galiana A (2014). Distribution and diversity of Rhizobial populations associated with *Acacia senegal* (L.) Willd. Provenances in Senegalese Arid and Semiarid Regions. *Open J Forest* 4:136-143.
- Balestrini R, Lanfranco L (2006). Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 16: 509-524.

- Bano A, Fatima M (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with Rhizobium and Pseudomonas. *Biol Fert Soils* 45: 405-413.
- Batut J, Andersson SG, O'Callaghan D (2004). The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. *Nat Rev Microbiol* 2(12): 933-945
- Becard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Roux C (2004). Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can J Bot* 82: 1186-1197.
- Beijerinck MW (1888). Die Bacterien der papilionaceenknöllchen. *Bot Ztg* 46: 797-804.
- Bell HL, O'Leary JW (2003). Effects of salinity on growth and cation accumulation of *Sporobolus virginicus* (Poaceae). *Am J Bot* 90: 1416-1424.
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L (2005). Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 15: 620-627.
- Benmahioul B, Daguin F, Kaid-harche M (2009). Effet du stress salin sur la germination et la croissance in vitro du pistachier (*Pistacia vera* L.). *C R Biologies* 332: 164-170.
- Bergey DH, Harrison FC, Breed RS, Hammer BW, Huntoon FM (1923). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins, Baltimore.
- Bertin C, Yang XH, Weston L (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256: 67-83.
- Besserer A, Puech-Pages V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J-C, Roux C, Becard G, Sejalon-Delmas N (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* 4: 1239-1247.
- Bethlenfalvay GJ, Cantrell IC, Mihara KL, Schreiner RP (1999). Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota and nitrogen nutrition. *Biol Fertil Soil* 28: 356-363.
- Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA (1996). Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J Ecol* 84: 71-82.
- Blahá G, Stelzl U, Spahn CMT, Agrawal RK, Frank J, Nierhaus KH (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods in Enzymol* 317: 292-309.
- Blaszkowski J, Tadych M, Madej T (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales Zygomycota) of the Bledowska Desert Poland. *Acta Soc Bot Pol* 71: 71-85.
- Bliss RD, Platt-Aloia KA, Thomson WW (1986). The inhibitory effect of NaCl on barley germination. *Plant Cell Environ* 9: 727-733.
- Boivin P, Le Brusq JY (1985). Désertification et salinisation des terres au Sénégal: Problèmes et remèdes. *In Séminaire National sur la désertification*, Saint Louis, Sénégal, 22-26 avril, pp. 5. Evolution de la salinité des sols et des eaux en relation avec la riziculture submergée dans le delta du fleuve Sénégal (campagne 1981-1982).
- Boivin P, Job JO (1988). Conductivimétrie électromagnétique et cartographie automatique des sols salés. *Cahiers ORSTOM de Pédologie* 24.
- Bonfante P, Genre A (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* 1: 48.

- Boscari A, Mandon K, Poggi MC, Le Rudulier D (2004). Functional expression of *Sinorhizobium meliloti* BetS, a high-affinity betaine transporter, in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Appl Environ Microbiol* 70: 5916-5922.
- Borucki W, Sujkowska M (2008). The effects of sodium chloride salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Acta Physiol Plant* 30: 293-301.
- Bouaouina S, Zid E, Hajji M (2000). Tolérance à la salinité, transports ioniques et fluorescence chlorophyllienne chez le blé dur (*Triticum turgidum* L.) CIHEAM–Options Méditerranéennes : 239-243.
- Boulghalagh J, Berrichi A, EL Halouani H, Boukroute A (2006). Effet des stress salin et hydrique sur la germination des graines du jojoba (*Simmondsia chinensis* [link] schneider). Recueil des résumés. Le Premier Congrès National sur l'Amélioration de Production Agricole, Settat, Maroc, pp. 24.
- Bressan RA, Nelson DE, Iraki NM, Larosa PC, Singh NK, Hasegawa PM, Carpita NC (1990). Reduced cell expansion and changes in cell walls of plant cells adapted to NaCl. In F Katterman, ed, *Environmental Injury to Plants*. Academic Press, London, pp. 137-171.
- Brhada F, Le Rudulier D (1995). Osmoregulation chez les bactéries et chez *Rhizobium* en particulier : rôle de la glycine bêtaïne dans l'osmorégulation chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. Dans : Facteurs limitant la fixation d'azote dans le bassin Méditerranéen, 6-8 Avril 1994. Montpellier, France, pp. 127-137.
- Brockwell J (1980). Experiment with cropland pasture legumes: principles and practice. In: Bergersen, F. J. (Ed), *Methods for Evaluating BNF*. Wiley. New York, pp. 417-488.
- Broughton W J, Jabbouri S, Perret X (2000). Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol* 182: 5641-5652.
- Brundrett MC (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant soil* 320: 37-77.
- Bruno JF, Stachowicz JJ, Bertness MD (2003). Inclusion of facilitation into ecological theory *Trends Ecol Evol* 18: 119-125.
- Burleigh SH, Cavagnaro TR, Jakobsen I (2002). Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. *J Exp Bot* 53: 1-9.
- Burriss RH, Wilson PW (1957). in *Methods of Enzymology* (Colowick SP, Kaplan NO. eds.), Academic Press, New York 4: 355-365.
- Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (1991). Plant genetic control of nodulation. *Annu Rev Microbiol* 45: 345-382.
- Caravaca F, Barea JM, Roldan A (2002). Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subsp. *Sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. *Appl Soil Ecol* 20: 107-18.
- Carvalho SM, Caçador I, Martins-loução A (2001). Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza* 11: 303-309.

- Cavender N, Knee M (2006). Relationship of seed source and arbuscular mycorrhizal fungal inoculum type to growth and colonization of bigbluestem (*Angropogon gerardii* Vitman.). *Plant Soil* 285: 57-65.
- Cesar AI, Esther MG, Daniel M, Ruben L, Estibaliz L, Erena GQ (2011). Physiological response of legume nodules to drought. *Plant stress* 5: 24-31.
- Chandler MR (1978). Some Observations on Infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. *J Exp Bot* 29: 749-755.
- Chao A, Colwell RK, Lin CW, Gotelli NJ (2009). Sufficient sampling for asymptotic minimum species richness estimators. *Ecology* 90: 1125-1133.
- Chapelle E, Mendes R, Bakker PA, Raaijmakers JM (2015). Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. *ISMEJ*. 82.
- Cheeseman JM (2014). The evolution of halophytes, glycophytes and crops, and its implications for food security under saline conditions. *New Phytol* 206: 557-570.
- Chen BD, Zhu YG, Duan J, Xiao XY, Smith SE (2007). Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. *Environ Pollut* 147: 374-380.
- Clark RB, Zobel RW, Zeto SK (1999). The effects of mycorrhizal fungus isolates on mineral acquisition by *Penicum virgatum* L. in acid soils. *Mycorrhiza* 9(3): 167-176.
- Cordovilla M, Ocana A, Ligerio F, Liuch C (1995). Salinity effects on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes-rhizobium symbiosis. *J Plant Nutr* 18: 1596-1609.
- Coughlan AP, Dalpé Y, Lapointe L, Piché Y (2000). Soil pH-induced changes in root colonization, diversity, and reproduction of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi from healthy and declining maple forests. *Can J For Res* 30: 1543-1554.
- Cramer GR (2003). Differential effects of salinity on leaf elongation kinetics of three grass species. *Plant Soil* 253: 233-244.
- Cronk Q, Ojeda I, Pennington RT (2006). Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Curr Opin Plant Biol* 9: 99-103.
- Cruz RE, de la Zarade JF, Agganzae NS, Lorilla EB (1999). Differential mycorrhizal development of some agricultural, horticultural and forestry crops to inoculation of mycorrhizal fungi. In: Jasper D (ed) *Proceedings of the international symposium on management of mycorrhizas on agriculture, horticulture and forestry*. Aust Inst Agric Sci. Australia pp. 54.
- Dabin B (1965). Application des dosages automatiques à l'analyse des sols. *Cah. Orstom. Ser. Pedol* 3(4): 335-366.
- Daffé M, Sadio S (1988). Etude pédologique. Régénération des sols salins du bassin du Sine Saloum. *Projet UNSO/SEN/83/XO2/ISRA/DRPF*, pp. 78.
- Debez A, Chaibi W, Bouzid S (2001). Effet du NaCl et de régulateurs de croissance sur la germination d'*Atriplex halimus* L. *Agriculture* 2 (10): 8-135.
- De Faria S, Lewis G, Sprent J, Sutherland J (1989). Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytol* 111: 607-619.

- De Lacerda CF, Cambraia J, Oliva MA, Ruiz HA (2005). Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. *Environ Exp Bot* 54: 69-76.
- de Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins MD, Lindstrom K, Dreyfus B, Gillis M (1998). Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 48: 369-382.
- de la Peña E, Rodriguez-Echeverria S, van der Putten WH, Freitas H, Moens M (2006). Mycorrhizal fungi control migratory endoparasitic nematodes in *Ammophila arenaria*. *New Phytol* 169: 829-840.
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernández F, Delmas NS, Declerck S (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytol* 165: 161-271.
- Demiral T, Türkan I (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ Exp Bot* 53: 247-257.
- Demiroğlu G, Khalvati MA, Avcıoğlu R (2001). Effect of different salt concentrations on the resistance of maize cultivars (2) some physiological characteristics and ion accumulation in early growth. *Turk J Field Crops* 6: 55-59.
- Denarie J, Debelle F, Prome JC (1996). Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65: 503-535
- Diagne O, Seck AS, Gassama-Dia YK (2006). Seasonal and spatial distribution of roots and arbuscular mycorrhizal fungi under live fences of *Acacia laeta* and *Acacia mellifera* in Senegal. *South Afr Forest J* 207: 41-46.
- Diagne O, Ingleby K (2003). Ecologie des champignons mycorrhiziens arbusculaires infectant *Acacia raddiana* Savi. Un arbre au desert. IRD Editions. Paris, pp. 205-2280.
- Diagne O (1996). « Utilisation and Nitrogen fixation of *Prosopis* in Senegal » in Peter Felker, James Moss: *Prosopis* : Semiarid Fuelwood and Forage Tree Building Consensus for the Disen franchised. A Workshop 13-15 March 1996 U.S.S Notional Academy of Sciences Building 2101 Constitution avenue Washigton, D.C.
- Diagne O, Baker DD (1994). Quantification of symbiotic N fixation by *Prosopis juliflora* (swartz) D.C. using ¹⁵N-isotope dilution methodology. *Soil Biol Biochem* 26: 1709-1710.
- Diatta ILD, Kane A, Agbangba CE, Sagna M, Diouf D, Aberlenc-Bertossi F, Duval Y, Borge A, Sane D (2014). Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves seedlings growth of two sahelian date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L., cv. Nakhlahamra and cv. Tijib) under salinity stresses. *Adv Biosci Biotechnol* 5: 64-72.
- Diouf D, Fall D, Chaintreuil C, Ba AT, Dreyfus B, Neyra M, Ndoye I, Moulin L (2010). Phylogenetic analyses of symbiotic genes and characterization of functional traits of *Mesorhizobium spp.* strains associated with the promiscuous species *Acacia seyal* Del. *J Appl Microbiol* 108(3): 818-830.

- Diouf D, Ndoye I, Fall D, Kane A, Ba AT, Neyra M (2008). Phenotypic and symbiotic characterization of *Mesorhizobium* spp. Strains nodulating *Acacia seyal* Del. J Sci Technol 7: 1-10.
- Diouf D, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, de Lajudie P, Neyra M (2007). Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. Microb Ecol 54: 553-566.
- Diouf D, Duponnois R, Ba AT, Neyra M, Lesueur D (2005). Symbiosis of *Acacia auriculiformis* A.Cunn. and *A. mangium* Willd. with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* sp. Improves salt tolerance in greenhouse conditions. Funct Plant Biol 32: 1143-1152.
- Diouf F, Diouf D, Klonowska A, Le Queré A, Bakhoun N, Fall D, Neyra M, Parrinello H, Diouf M, Ndoye I, Moulin L (2015). Genetic and genomic diversity studies of acacia symbionts in senegal reveal new species of mesorhizobium with a putative geographical pattern. PLoS One 10(2): e0117667.
- Dita MA, Rispaïl N, Prats E, Rubiales D, Singh KB (2006). Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. Euphytica 147: 1-24.
- Dobert RC, Breil BT, Triplett EW (1994). DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. Mol Plant Microbe Interact 7(5): 564-572.
- Dodd IC, Ruiz-Lozano JM (2012). Microbial enhancement of crop resource use efficiency. Curr Opin Biotechnol 23: 236-242.
- Domínguez-Ferreras A, Soto MJ, Pérez-Arnedo R, Olivares J, Sanjuan J (2009). Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* Osmotolerance and nodulation of Alfalfa roots. J Bacteriol 191: 7490-7499.
- Dommergues Y, Duhoux E, Diem HG (1999). Les arbres fixateurs d'azote. Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux, avec référence particulière aux zones subhumides et arides. CIRAD, FAO, IRD, Montpellier, pp. 499.
- Dufrêne M, Legendre P (1997). Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. Ecol Monogr 67: 345-366.
- Duponnois R, Ramanankierana H, Hafidi M, Baohanta R, Baudoin E, Thioulouse J, Sanguin H, Bâ A, Galiana A, Bally R, Lebrun M, Prin Y (2013). Des ressources végétales endémiques pour optimiser durablement les opérations de réhabilitation du couvert forestier en milieu méditerranéen et tropical : exemple des plantes facilitatrices vectrices de propagation des champignons mycorrhiziens. C R Biologies 336: 265-272.
- Duponnois R, Founoune H, Lesueur D (2002). Influence of the dual ectomycorrhizal and rhizobial symbiosis on the growth of *Acacia mangium* Willd. provenances, the indigenous symbiotic microflora and the structure of plant parasitic nematode communities. Geoderma 109: 85-102.
- Eardly BD, Young JPM, Selander RK (1992). Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. Strain ORS 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. Appl Environ Microbiol 58: 1809.
- Egamberdieva D, Kucharova Z (2009). Selection for root colonizing bacteria stimulating wheat growth in saline soils. Biol Fert Soil 45: 563-571.

- El-Keblawy A, Al-Rawai A (2005). Effects of salinity, temperature and light on germination of invasive *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. *J Arid Environ* 61(4): 555-565.
- Elsheikh EAE, Wood M (1989). Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ion effects of salts. *Soil Biol Biochem* 21: 889-895.
- Enkhtuya B, Poschl M, Vosatka M (2005). Native grass facilitates mycorrhizal colonisation and P uptake of tree seedlings in two anthropogenic substrates. *Water Air Soil Pollut* 166: 217-236.
- Escudero V, Mendoza RE (2005). Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungi in temperate grasslands along a wide hydrologic gradient. *Mycorrhiza* 15: 291-299.
- Evelin H, Kapoor R, Giri B (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Ann Bot* 104: 1263-1280.
- Ezawa T, Cavagnaro TR, Smith SE, Smith FA, Ohtomo R (2004). Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytol* 161: 387-392.
- Fall D, Diouf D, Neyra M, Diouf O, Diallo N (2009). Physiological and biochemical responses of *Acacia seyal* (Del.) seedlings under salt stress. *J Plant Nutr* 32: 1122-1136.
- Fall D, Diouf D, Ourarhi M, Faye A, Abdelmounen H, Neyra M, Sylla SN, Missbah El Idrissi M (2008). Phenotypic and genotypic characteristics of *Acacia senegal* (L.) Willd. Root nodulating bacteria isolated from soils in the dryland part of Senegal. *Lett Appl Microbiol* 47(2): 85-97.
- Fall F, Diouf D, Fall D, Ndoeye I, Ndiaye C, Kane A, Bâ AM (2015). Effect of arbuscular mycorrhizal inoculation on growth, biomass production and nutrient uptake of the two grass species, *Leptochloa fusca* (L.) Stapf and *Sporobolus robustus* Kunth, in greenhouse conditions. *Afr J Biotechnol* 14(39) : 2770-2776.
- FAO (2008). FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- FAO, IPTRID (2006). Electronic conference on salinization : extension of salinization and strategies of prevention and rehabilitation. Project CISEAU. www.agrireseau.qc.ca/agroenvironnement...Salinisation_irrigation.
- FAO. CSE (2003). L'évolution de la dégradation des terres. Projet FAO Land Degradation Assessment (LADA): FAO, pp. 62.
- Farkhondeh R, Nabizadeh E, Jalilnezhad N (2012). Effect of salinity stress on proline content, membrane stability and water relations in two sugar beet cultivars. *Int J Agric Sci* 2: 385-392.
- Felker P (1981) Use of tree in semiarid regions. *Econ Bot* 35: 174-186.
- Fellbaum CR, Gachomo EW, Beesetty Y, Choudhari S, Strahan GD, Pfeffer PE, Kiers ET, Bücking H (2012). Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 2666-2671.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J Integr Plant Biol* 52: 61-76.

- Finlay RD (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot* 50(5): 115-1126.
- Fisher RF, Binkley D (2000). *Ecology and Management of Forest Soils*, third ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, pp. 489.
- Fisher RA, Yates F (1948). *Statistical Tables for Biological Agriculture and Medical Research*, sixth ed. Hafner Publ Comp, Davien.
- Flowers TJ, Colmer TD (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol* 179: 945-963.
- Flowers TJ, Hajibagheri MA, Clipson NJW (1986). Halophytes. *Q Rev Biol* 61: 313-337.
- Fortin JA, Plenchette C, Piché Y (2008). Les mycorhizes, la nouvelle révolution verte. (Eds. Multimondes et Quae), pp. 131.
- Frank B (1889). Über die pilzsymbiose der leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges* 7: 332-346.
- Fred EB, Baldwin IL, McCoy E (1932). Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin Press, Madison, Wis. (in: Elkan, 1902).
- Fuhrer T, Fischer E, Sauer U (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J Bacteriol* 187(5): 1581-1590.
- Garau G, Yates R, Deiana P, Howieson JG (2009). Novel strains of nodulating Burkholdeira have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soil. *Soil Biol Biochem* 41: 125-134.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgilp SA, Young JWP (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2037-2048.
- Geetanjali M, Neera G (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol Plant* 30: 595-618.
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br mycol soc* 46: 235-244.
- Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S (1989). *In-vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-255.
- Gibson AH (1963). Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. the effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L.) plants. *Aust J Biol Sci* 16: 28-42.
- Giri B, Kapoor R, Mukerji KG (2007). Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microb Ecol* 54: 753-760.
- Giri B, Kapoor R, Mukerji KG (2003). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biol Fertil Soils* 38: 170-175.
- Girlanda M, Perotto S, Bonfante P (2007). Mycorrhizal Fungi: their habitats and nutritional strategies. In *The Mycota IV Environmental and Microbial Relationships*, 2nd edn. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, pp. 229-256.

- Gahoonia TS, Care D, Nielsen NE (1997). Root hairs and phosphorus acquisition of wheat and barley cultivars. *Plant Soil* 191: 181-188.
- González-Sama A, Lucas MM, de Felipe MR, Pueyo JJ (2004). An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytol* 163: 371-380.
- Graham JH, Abbott LK (2000). Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 220: 207-218.
- Graham PH, Vance CP (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Res* 65: 93-106.
- Graham PH (1992). Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can J Microbiol* 38: 475-484.
- Gravot A (2007). Réponses aux stress chez les végétaux. Présentation power point
- Grilli G, Urcelay C, Galetto L, Davison J, Vasar M, Saks Ü, Jairus T, Opik M (2014). The composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities in the roots of a ruderal forb is not related to the forest fragmentation process. *Environ Microbiol* 17: 2709-2720.
- Grime JP, Campbell BD (1991). Growth rate, habitat productivity, and plant strategy as predictors of stress response. In: Mooney HA, Winner WE, Pell EJ, Chu E (eds) *Response of Plants to Multiple Stresses*, Academic Press, Inc., San Diego, London, pp. 143-159.
- Grimont F, Grimont PAD (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *An Inst Pasteur Microbiol* 137B: 165-175.
- Guether M, Neuhauser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante P (2009). A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol* 150: 73-83.
- Gueye F, Moulin L, Sylla S, Ndoeye I, Béna G (2009). Genetic diversity and distribution of *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* strains associated with the herb legume *Zornia glochidiata* sampled from across Senegal. *Syst Appl Microbiol* 32: 387-399.
- Guissou T, Bâ AM, Guinko S, Duponnois R., Planchette C (1998). Influence des phosphates naturels et des mycorhizes à vésicules et à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale de *Zizyphus mauritiana* Larn, dans un sol à pH alcalin. *Ann Sei For* 55: 925-931.
- Gulzar S, Khan MA, Ungar IA, Liu X (2005). Influence of salinity on growth and osmotic relations of *Sporobolus ioclados*. *Pak J Bot* 37: 119-129.
- Guma IR, Padrón-Mederos MA, Santos-Guerra A, Reyes-Betancort JA (2010). Effect of temperature and salinity on germination of *Salsola vermiculata* L. (Chenopodiaceae) from Canary Islands. *J Arid Environ* 74(6): 708-711.
- Gürtler V, Stanisich VA (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol* 142: 3-16.
- Haldar S, Sengupta S (2015). Plant-microbe cross-talk in the rhizosphere: insight and biotechnological potential. *Open Microbiol J* 9: 1-7.

- Hameed M, Nawaz T, Ashraf M, Naz N, Batool R, Ahmad MSA, Riaz A (2013). Physio-anatomical adaptations in response to salt stress in *Sporobolus arabicus* (Poaceae) from the Salt Range, Pakistan. *Turk J Bot* 37: 715-724.
- Haouala F, Ferjani H, Ben El Hadj S (2007). Effet de la salinité sur la répartition des cations (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}) et du chlore (Cl^-) dans les parties aériennes et les racines du ray-grass anglais et du chiendent. *Bitechnol Agronom Soc Environ* 11 (3): 235-244.
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC (1968). The acetylene ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43: 185-207.
- Harrison MJ (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann rev microbiol* 59: 19-42.
- Hart MM, Aleklett K, Chagnon PL, Egan C, Ghignone S, Helgason T, Lekberg Y, Opik M, Pickles BJ, Waller L (2015). Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 207(1): 235-247.
- Hart MM, Reader RJ, Klironomos JN (2003). Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi. *Trends Ecol Evol* 18: 418-423.
- Hasegawa PM, Bressan AB, Zhu JK, Bohnert HJ (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 463-499.
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D (2002). Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiol* 130(3): 1213-20.
- Hetrick BAD, Hartnett DC, Wilson GWT, Gibson DJ (1994). Effects of mycorrhizae, phosphorus availability, and plant density on yield relationships among competing tall grass prairie grasses. *Can J Bot* 72: 168-176.
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Cox TS (1993). Mycorrhizal dependence of modern wheat cultivars and ancestors-A synthesis. *Can J Bot* 71: 512-518.
- Hetrick BDA, Wilson GWT, Cox TS (1992). Mycorrhizal dependency of modern wheat varieties, landraces and ancestors. *Can J Bot* 70: 2032-2040.
- Hetrick BAD, Wilson GT, Hartnett DC (1989). Relationship between mycorrhizal dependence and competitive ability of two tall grass prairie grasses. *Can J Bot* 67: 2608-2615.
- Hillis DM, Dixon MT (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol* 66: 411-453.
- Hiltner L (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb DLG* 98: 59-78
- Hirsch A, Bauer W, Bird D, Cullimore J, Tyler B, Yoder JI (2003). Molecular signals and receptors: Controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology* 84: 858-868.
- Ho I, Trappe JM (1973). Translocation of ^{14}C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* 244: 30-31.
- Hoelzle I, Streeter JG (1990). Increased Accumulation of Trehalose in Rhizobia Cultured under 1% Oxygen. *Appl Environ Microbiol* 56(10): 3213-3215.

- Huang B, Chengqun LV, Yili Zhao, Rong Huang (2012). A Novel Strain D5 Isolated from *Acacia confuse*. Edited by Luis Herrera-Estrella, PLoS ONE 7(11) : e49236.
- Hungria M, Vargas MAT (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain leguminous in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crop Res* 65: 151-164.
- Ingleby K, Diagne O, Deans JD, Lindley DK, Neyra M, Ducouso M (1997). Distribution of roots, arbuscular mycorrhizal colonisation and spores around fast-growing tree species in Senegal. *For Ecol Manag* 90: 19-27.
- Jahromi F, Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2008). Influence of salinity on the in vitro development of *Glomus intraradices* and on the in vivo physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microb Ecol* 55: 45-53.
- Jan B, Sharif M, Khan F, Bakht J (2014). Effect of arbuscular mycorrhiza fungal inoculation with Compost on yield and P uptake of Wheat in alkaline calcareous soil. *Am J Plant Sci* 5: 1995-2004.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ (2007). A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1720-1725.
- Jeffries P, Barea JM (2001). Arbuscular mycorrhiza: a key component of sustainable plant-soil ecosystems. In: Hock B (ed) *The Mycota: fungal associations*, Vol. IX. Springer, Berlin, pp. 95-113.
- Jensen MA, Straus N (1993). Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods Appl* 3: 186-194.
- Jin HR (2009). Arginine bi-directional translocation and breakdown into ornithine along the arbuscular mycorrhizal mycelium. *Sci in China Series C: Life Sci* 52(4): 381-389.
- Johansen A, Finlay R, Olsson P A (1996). Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* 133: 705-712.
- Johnson NC (1998). Responses of *Salsola kali* L. and *Panicum virgatum* L. to mycorrhizal fungi, phosphorus and soil organic matter: implications for reclamation. *J Appl Ecol* 35: 86-94.
- Johnson-Green PC, Kenkel NC, Booth T (1995). The distribution and phenology of arbuscular mycorrhizae along an inland salinity gradient. *Can J Bot* 73: 1318-1327.
- Jordan D (1984). Family III. Rhizobiaceae. *N R Krieg J G Holt (Eds), Bergey's Man Syst Bacteriol Williams Wilkins, Balt* 1: 234-256.
- Jordan DC (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *Int J Syst Bacteriol* 136-139.
- Joshi AJ, Mali BS, Harsha H (2005). Salt tolerance and germination and early growth of two forage grasses growing in marshy habitats. *Environ Exp Bot* 54: 267-274.
- Juniper S, Abbott LK (2006). Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16: 371-379.
- Juniper S, Abbott L (1993). Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity. *Mycorrhiza* 4: 45-57.

- Kahindi JHP, Woomer P, George T, Moreira FM, Karanja NK, Giller KE (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Appl Soil Ecol* 6: 87-108.
- Kaminski PA, Boistard P (1998). A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. In the *Rhizobiaceae*, pp. 431-460. In Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (eds). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic.
- Kämpfer P, Glaeser SP (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era--the polyphasic approach revisited. *Environ Microbiol* 14: 291-317.
- Kang BT, Grimme H, Lawson TT (1985). Alley cropping sequentially cropped maize and cowpea with leucaena on sandy soil in Southern Nigeria. *Plant Soil* 85: 267-277.
- Kanwal H, Ashraf M, Shahbaz M (2011). Assessment of salt tolerance of some newly developed and candidate wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using gas exchange and chlorophyll fluorescence attributes. *Pak J Bot* 43(6): 2693-2699.
- Kaya C, Higgs D, Kırnak H, Taş I (2003). Ameliorative effect of calcium nitrate on cucumber and melon plants drip irrigated with saline water. *J Plant Nutr* 26: 1665-1681.
- Kennedy LJ, Tiller RL, Stutz JC (2002). Associations between arbuscular mycorrhizal fungi and *Sporobolus wrightii* in riparian habitats in arid South-western North America *J Arid Environ* 50: 459-475.
- Khan AH, Marshall C (1981). Salt tolerance within populations of chewing fescue (*Festuca rubra* L.). *Commun Soil Sci Plant Anal* 12: 1271-1281.
- Khemiri H, Belguith H, Jridi T, Ben El Arbi M, Ben Hamida J (2004). Caractérisation biochimique d'une amylase active au cours du processus germinatif des graines de colza (*Brassica napus* L.). *Enzymologie et métabolisme* pp. 146-149. Congrès International de Biochimie. Marrakech 3-6 mai 2004.
- Kinet M, Benrebaha FZ, Bouzid S, Lailcahar S, Dupuit P (1998). Atelier biotechnologies et écologie pour une sécurité alimentaire accrue en régions arides et semi arides. *Cahiers Agricultures. Réseau Atriplex* 7 (6): 505-509.
- Klironomos JN (2003). Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84: 2292-2301.
- Kohl KI (1997). NaCl homeostasis as a factor for the survival of the evergreen halophyte *Armeria maritima* (Mill.) Willd. under salt stress in winter. *Plant Cell Environ* 20: 1253-1263.
- Korkama T, Fritze H, Kiikkila O, Pennanen T (2007). Do same-aged but different height Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst) clones affect soil microbial community? *Soil Biol Biochem* 39: 2420-2423.
- Kosova K, Prasil IT, Vitamvas P (2013). Protein Contribution to Plant Salinity Response and Tolerance Acquisition. *Int J Mol Sci* 14: 6757-6789
- Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Hakoyama T, Nakagawa T, Umehara Y, Sukanuma N, Kawaguchi M (2010). How Many Peas in a Pod? Legume Genes Responsible for Mutualistic Symbioses Underground. *Plant Cell Physiol* 51: 1381-1397.
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol* 193: 970-984.

- Kumar S G, Reddy A M and Sudhakar C (2003). NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Sci* 165: 1245-1251.
- Kyalangalilwa B, Boatwright JS, Daru BH, Maurin O, VAN DER Bank M (2013). Phylogenetic position and revised classification of *Acacia* s.l. (Fabaceae : Mimosoideae) in Africa, including new combinations in *Vachellia* and *Senegalia*. 500-523.
- Lal B, Khanna S (1994). Selection of salt-tolerant *Rhizobium* isolates of *Acacia nilotica*. *World J Microbiol Biotechnol* 10: 637-639.
- Lazali M (2009). Etude de la symbiose à rhizobium chez l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) Cultivée sous contrainte hydrique : aspects morpho-physiologiques et agronomiques. Magister thesis Ins, nati agro, EL Harrach, pp.72.
- Lee J, Lee S, Young JPW (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 339-349.
- Levigneron A, Lopez F, Vansuyt G, Berthomieu P, Fourcroy P, Casse-Delbart F (1995). Les plantes face au stress salin. *Cah Agric* 4: 263-273.
- Levitt J (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. Acad Press New York vol II.
- Levitt J (1972). Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York.
- Lewis GP, Schrire B, Mackinder B, Lock M (2005). Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, Surrey, UK. Pp. 577.
- Liais E (2014). Identification et caractérisation de virus aviaires par des approches de séquençage à haut débit. Thèse, Université de Toulouse, pp. 157.
- Limpens E, Bisseling T (2003). Signaling in symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 6: 343-350.
- Lindstrom K, Murwira M, Willems A, Altier N (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Res Microbiol* 161: 453-463.
- Liu B, Li H, Zhu B, Koide RT, Eissenstat DM, Guo D (2015). Complementarity in nutrient foraging strategies of absorptive fine roots and arbuscular mycorrhizal fungi across 14 coexisting subtropical tree species. *New Phytol* 208: 125-136.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison M (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J* 50: 529-44.
- Liu A, Hamel C, Hamilton RI, Smith DL (2001). Mycorrhizae formation and nutrient uptake of new corn (*Zea mays* L.) hybrids with extreme canopy and leaf architecture as influenced by soil N and P levels. *Plant Soil* 221: 157-166.
- Long SR (2001). Genes and Signals in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. *Plant Physiol* 125: 69-72.
- Le Brusq JY, Loyer JY (1982). Relation entre les mesures de conductivité sur des extraits de sol de rapports sol/solution variables dans la vallée du fleuve Sénégal. *Cah. ORSTOM, série Pédo* 9(3) : 293-301.
- Ludwig W, Schleifer KH (1999). Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA Standard. *ASM News* 65 : 752-757.

- Madritch MD, Hunter MD (2002). Phenotypic diversity influences ecosystem functioning in an oak sandhills community. *Ecology* 83: 2084-2090.
- Maherali H (2014). Is there an association between root architecture and mycorrhizal growth response? *New Phytol* 204: 192-200.
- Maillard J (2001). Le point sur l'Irrigation et la salinité des sols en zone sahélienne. Risques et recommandations. *Handicap International* pp. 34.
- Makeen K, Babu GS, Lavanya GR, Abraham G (2007). Studies of Chlorophyll Content by different Methods in Black Gram (*Vigna mungo* L.). *Int J Agric Res* 2 (7) : 651.
- Malbreil M (2014). La biologie du champignon mycorrhizien à arbuscules *Rhizophagus irregularis* DAOM 197198 à la lumière de la génomique et de la transcriptomique. Thèse, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, pp. 265.
- Manaut N, Sanguin H, Ouahmane L, Bressan M, Thioulouse J, Baudoin E, Galiana A, Hafidi M, Prin Y, Duponnois R (2015). Potentialities of ecological engineering strategy based on native arbuscular mycorrhizal community for improving afforestation programs with carob trees in degraded environments. *Ecol Eng* 79: 113-119.
- Manga A, Diop TA, Van Tuinen D, Neyra M (2007). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Acacia seyal* in a semiarid zone of Senegal. *Sécheresse* 18: 129-133.
- ManJunath A, Habte M (1991). Root morphological characteristics of host species having distinct mycorrhizal dependency. *Can J Bot* 69 : 671-676.
- Marlet S (2005). Gestion de l'eau et salinisation des sols dans les systèmes irrigués Synthèse de l'atelier du PCSI sur : Vers une maîtrise des impacts environnementaux de l'irrigation. CIRAD/AMIS, Montpellier, France, n°40, pp. 12-23.
- Marschner H, Dell B (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159: 89-102.
- Martens M, Delaere M, Coopman R, De Vos P, Gillis M, Willems A (2007). Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 489-503.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* 17: 458-466.
- Maynaud G, Willems A, Soussou S, Vidal C, Maure L, Moulin L, Cleyet-Marel JC, Brunel B (2012). Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Syst Appl Microbiol* 35: 65-72.
- Mbadi SH, Alipour ZT, Asghari H, Kashefi B (2015). Effect of the salinity stress and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the growth and nutrition of *Marigold* (*Calendula officinalis* L.). *J Biodivers Environ Sci* 6: 215-219.
- McIntyre HJ, Davies H, Hore TA, Miller SH, Dufour JP, Ronson CW (2007). Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. *Appl Environ Microbiol* 73: 3984-3992.
- Mehdi H, Chaabouni AC, Boujnah D, Boukhris M (2010). The response of young pistachio trees grown under saline conditions depends on the rootstock. *in* Zakyntinos G. (ed.). *XIV GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds*. Zaragoza : CIHEAM / FAO / AUA /

- TEI Kalamatas/NAGREF. (Options Méditerranéennes : Série A., Séminaires Méditerranéens; n. 94), pp. 261-265.
- Mergaert P, Van Montagu M, Holsters M (1997). Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol Microbiol* 25(5): 811-817.
- Mguis K, Albouchi A, Brahim NB (2014). Germination responses of *Corchorus olitorius L.* to salinity and temperature. *Afr J Agric Res* 9(1): 65-73.
- Miche L, Moulin L, Chaintreuil C, Contreras-Jimenez JL, Munive-Hernandez JA, Del Carmen Villegas-Hernandez M, Crozier F, Bena G (2010). Diversity analyses of *Aeschynomene* symbionts in Tropical Africa and Central America reveal that nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Environ Microbiol* 12 : 2152-2164.
- Miller-Williams M, Loewen PC, Oresnik IJ (2006). Isolation of saltsensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rml 021. *Microbiol* 152: 2049-2059.
- Mills AJ (2006). The role of salinity and sodicity in the dieback of *Acacia xanthophloea* in Ngorongoro Caldera, Tanzania. *Afr J Ecol* 4 : 61-71.
- Mnasri B, Mrabet M, Laguerre G, Aouani M E and Mhamdi R (2007). Salt-tolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for symbiotic N₂-fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (bv. *mediterranense*) of *Sinorhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* 187: 79-85.
- Mohammed A, Sharma RS, Ali S, Babu CR (2001). Molecular diversity of the plasmid genotypes among *Rhizobium* gene pools of sesbanias from different habitats of a semi-arid region (Delhi). *FEMS Microbiol Lett* 205: 171-178.
- Mohamed SH, Smouni A, Neyra M, Kharchaf D, Filali-Maltouf A (2000). Phenotypic characteristics of root-nodulating bacteria isolated from *Acacia* spp. grown in Libya. *Plant Soil* 224: 171-183.
- Monneveux P, Nemmar M (1986). Contribution to the study of biochemical mechanisms of resistance to water stress: proline accumulation during the vegetative cycle of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Agronomie* 6: 583-590.
- Morte A, Lovisolo C, Schubert A (2000). Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia clavaryi*. *Mycorrhiza* 10: 115-9.
- Morton JB, Benny GL (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (zygomycetes) : a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporineae and Gigasporaceae with an emendation of Glomaceae. *Micotaxon* 37: 471-491.
- Munns R (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25: 239-250.
- Naidoo G, Somaru R, Achar P (2008). Morphological and physiological responses of the halophyte, *Odyssea paucinervis* (Staph) (Poaceae), to salinity. *Flora* 203: 437-447.
- Ndoye F, Kane A, Mangaptché ELN, Bakhoun N, Sanon A, Diouf D, Sy MO, Baudoin E, Noba K, Prin Y (2012). Changes in land use system and environmental factors affect

- arbuscular mycorrhizal fungal density and diversity, and enzyme activities in rhizospheric soils of *Acacia senegal* (L.) Willd. ISRN Ecology 13.
- Ndoye I, Gueye M, Danso SKA, Dreyfus B (1995). Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal* and *Acacia seyal* estimated using the ¹⁵N isotope dilution technique. *Plant Soil* 172: 175-180.
- Ndoye I, de Billy F, Vasse J, Dreyfus B, Truchet G (1994). Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J Bacteriol* 176: 1060-1068.
- Newton WE (1998). Nitrogénases : fonction et évolution. *Bull Soc Fr Microbiol* 13: 238-241.
- Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiol* 109: 735-742.
- Nogueira MA, Cardoso EJBN (2007). Phosphorus availability changes the internal and external endomycorrhizal colonization and affects symbiotic effectiveness. *Sci Agric* 64: 295-300.
- Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M, Simonet P (1996). ITS analysis of prokaryotes. *Mol Microbiol Ecol Manage* 3: 5-12.
- Normand P, Cournoyer B, Simonet P, Nazaret S (1992). Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* 111: 119-124.
- Odee DW, Sutherland JM, Makatiani ET, Mc Inroy SG, Sprent JI (1997). Phenotypic characteristics and composition of the rhizobia associate with woody legumes growing in diverse Kanyen conditions. *Plant et Soil* 188: 65-75.
- Oehl F, Sieverding E, Mäder p, Dubois D, Ineichen K, Boller T, Wiemken A (2004). Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138: 574-583.
- Oka-Kira E, Kawaguchi M (2006). Long-distance signaling to control root nodule number. *Curr Opin Plant Biol* 9: 496-502
- Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Ann Rev Genet* 45: 119-144.
- Oldroyd GE, Downie JA (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(7): 566-576.
- Ollivier J, We ST, Bannert A, Hai B, Kastl EM, Meyer A, Su MX, Kleineidam K Schloter M (2011). Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbiol Ecol* 78: 3-16.
- Olsen GJ, Woese CR, Overbeek R (1994). The Winds of (Evolutionary) Change: Breathing New Life into Microbiology. *J Bacteriol* 1-6.
- Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS, Dean LA (1954). Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. *Circ.* 939. US Department of Agriculture.
- Opik M, Davison J, Moora M, Zobel M (2014). DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany-Botanique* 92: 135-147.
- Orcutt DM, Nilsen ET (2000). The physiology of plants under stress soil and biotic factors. New York: JohnWiley and Sons Inc. Pp. 680

- Othira JO, Omolo JO, Wachira FN, Onek LA (2012). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in protection of maize (*Zea mays* L) against witchwee (*Striga hermonthica* Del Benth) infestation. *J Agric Biotechnol Sustain Dev* 4(3): 37-44.
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* 15: 531-535
- Ouahmane L, Duponnois R, Hafidi M, Kisa M, Boumezouch A, Thioulouse J, Plenchette C (2006). Some Mediterranean plant species (*Lavandula* spp. and *Thymus satureioides*) act as potential “plant nurses” for the early growth of *Cupressus atlantica*. *Plant Ecol* 185: 123-134.
- Ouerghi Z, Zid E, Hajji M, Soltani A (1998). Comportement physiologique du blé dur (*Triticum durum* L.) en milieu salé. *CIHEAM - Options Méditerranéennes* : 309-31.
- Qadir M, Oster JD, Schubert S, Murtaza G (2006) Vegetative bioremediation of sodic and saline-sodic soils for productivity enhancement and environment conservation. In ‘Biosaline agriculture and salinity tolerance in plants’. (Eds M Öztürk, Y Waisel, MA Khan). (Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland) pp. 137-146.
- Padilla FM, Pugnaire FI (2006). The role of nurse plants in the restoration of degraded environments. *Front Ecol Environ* 4: 196-202.
- Parniske M (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr Opin Plant Biol* 3(4): 320-8.
- Paszkowski U (2006). Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *Curr Opin Plant Biol* 9(4): 364-370.
- Pawlowska TE, Taylor JW (2004). Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 427: 733-737.
- Pena R, Offermann C, Simon J, Naumann PS, Gessler A, Holst J, Dannenmann M, Mayer H, Kogel-Knabner I, Rennenberg H, Polle A (2010). Girdling affect ectomycorrhizal fungal (EMF) diversity and reveals functional differences in EMF community composition in a beech forest. *Appl Environ Microbiol* 76: 1831-1841.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. A reviews. *Microbiol Mol Biol* 64: 180-201.
- Perry JJ, Staley JT, Lory S (2004). *Microbiologie*. Edition Dunod, Paris.
- Phillips JM, Hayman DS (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55: 158-161.
- Piepho HP, Koch G (2000). Codominant analysis of banding data from a dominant marker system by normal mixtures. *Genetics* 155: 1459-1468.
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V (1983). Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil* 70: 199-209.
- Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbiere F, Jocteur-Monrozier, LJ (2001). Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl Environ Microbiol* 67: 2255-2262.

- Porcel R, Aroca R, Ruiz-Lozano JM (2012). Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agron Sust Dev* 32: 181-200.
- Pule-Meulenberg F, Belane AK, Krasova-Wade T, Dakora FD (2010). Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. *BMC Microbiol* 10: 89-100.
- Qadir M, Oster J (2002). Vegetative bioremediation of calcareous sodic soils: history, mechanisms, and evaluation. *Irrigation Sci* 21: 91-101.
- Qadir M, Schubert S (2002). Degradation processes and nutrient constraints in sodic soils. *Land Degrad Dev* 13: 275-294.
- Radhouane L (2008). Effet du stress salin sur la germination, la croissance et la production en grains chez quelques écotypes de mil (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) autochtones de Tunisie. *C R Biologies* 331(4) : 278-28.
- Rahi P, Kapoor R, Young JP, Gulati A (2012). A genetic discontinuity in root-nodulating bacteria of cultivated pea in the Indian trans-Himalayas. *Mol Ecol* 21 : 145-159.
- Rai AN, Soderback E, Bergman B (2000). Cyanobacteria-plant symbioses. *New Phytol* 147: 449-481.
- Ramakrishnan K, Bhuvaneshwari G (2014). Effect of inoculation of AM fungi and beneficial microorganisms on growth and nutrient uptake of *Eleusine coracana* (L) Gaertn. (Finger millet). *Int Lett Nat Sci* 13: 59-69.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer S, Morton J, Walker C (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* 23(7): 515-531.
- Redecker D, Raab P (2006). Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): Recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98: 885-895.
- Redecker D, Hijri I, Wiemken A (2003). Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. *Folia Geobot* 38: 113-124.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000). Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Rengel Z (2002). Breeding for better symbiosis. *Plant Soil* 245: 147-162
- Requena N, Serrano E, Ocon A, Breuninger M (2006). Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68: 33-40.
- Requena N, Perez-Solis E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM (2001). Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl Environ Microbiol* 67(2): 495-498.
- Rillig MC (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can J Soil Sci* 84: 355-363.
- Rodriguez-Navarro DN, Dardanelli MS, Ruiz-Sainz JE (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* 272: 127-136.
- Rogers ME, Craig AD, Munns RE, Colmer TD, Nichols PGH, Malcolm CV, Barrett-Lennard EG, Brown AJ, Semple WS, Evans PM, Cowley K, Hughes SJ, Snowball R, Bennett SJ, Sweeney GC, Dear BS, Ewing MA (2005). The potential for developing fodder plants for

- the salt-affected areas of southern and eastern Australia: an overview. *Aust J Exp Agric* 45: 301-329.
- Rohyadi A, Smith FA, Murray RS, Smith SE (2004). Effects of pH on mycorrhizal colonisation and nutrient uptake in cowpea under conditions that minimise confounding effects of elevated available aluminium. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. *Plant Soil* 260(1/2): 283-290.
- Romdhane SB, Nasr H, Samba-Mbaye R, Neyra M, Ghorbal M H and De Lajudie P (2006). Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA genes analysis. *J Appl Microbiol* 100: 436-445.
- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Azcon R, Aroca R (2012). Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants. New challenges in physiological and molecular studies. *J Exp Bot* 63: 4033-44.
- Ruiz-Lozano JM, Perálvarez MC, Aroca R, Azcón R (2011). The application of a treated sugar beet waste residue to soil modifies the responses of mycorrhizal and non mycorrhizal lettuce plants to drought stress: *Plant Soil* 346: 153-166.
- Ruiz-Lozano JM, Azcon R (2000). Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. From saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza* 10: 137-143.
- Sadio S (1991). Pédogenèse et potentialités forestières des sols sulfatés acides salés des tannes du Sine Saloum, Sénégal. ORSTOM, Bondy, France, pp. 269.
- Saif SR (1987). Growth responses of tropical forage plant species to vesicular-arbuscular mycorrhizae I. Growth, mineral uptake and mycorrhizal dependency. *Plant Soil* 97: 25-35.
- Saint-Etienne S, Paul S, Imbert D, Dulormne M, Muller F, Toribio A, Plenchette C, Bâ AM (2006). Arbuscular mycorrhizal soil infectivity in a stand of the wetland tree *Pterocarpus officinalis* along a salinity gradient. *For Ecol Manag* 232: 86-89.
- Saleh B (2011). Effect of salt stress (NaCl) on biomass and K⁺/Na⁺ ratio in cotton. *J Stress Physiol Biochem* 7: 5-14.
- Sanders IR, Croll D (2010). Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Ann Rev Genet* 44: 271-92.
- Sangakkara UR, Jartwig UA, Nösberger J (1996). Soil moisture and potassium affect the performance of symbiotic nitrogen fixation in faba bean and common bean. *Plant Soil* 184: 123-130.
- Sangeeta Y, Mohd I, Aqil A, Shamsul H (2011). Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *J Environ Biol* 32: 667-685.
- Santos-Gonzalez JC, Finlay RD, Tehler A (2007). Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland. *Appl Environ Microbiol* 73: 5613-5623.
- Sarita S, Sharma PK, Priefer UB, Prell J (2005). Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 54(1): 1-11.
- Santos-gonzález J (2007). Diversity of Arbuscular ycorrhizal Fungi in Grasslands and Arable Fields. Ecological factors related to community composition and dynamics. Doctoral

- thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, pp. 105.
- Sawada Y, Miyashita K, Yokoyama T (1990). Diversity within serogroups of Japanese isolates of *Bradyrhizobium* as indicated by intrinsic antibiotic resistance. Soil Sci Plant Nutr 30 : 501-504.
- Schlaman HRM, Lugtenberg BJJ, Okker RJH (1992). The NodD protein does not bind to the promoter of inducible nodulation genes in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. J Bacteriol 174: 6109-6116.
- Schleifer KH (2009). Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. Syst Appl Microbiol 32: 533-542
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009). 'Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities', Appl Environ Microbiol 75: 7537- 41.
- Schumpp O, Deakin WJ (2010). How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. Trends Plant Sci 15: 189-195
- Schüssler A, Schwarzott D, Walker C (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. Mycol Res 105(12): 1413-1421.
- Schwarzott D, Walker C, Schüßler A (2001). *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. Mol Phylo Evol 21: 190-197.
- Sene G, Thiao M, Manga A, Kane A, Samba-Mbaye R, Mbaye MS, Khasa D, Sylla SN (2012). Arbuscular mycorrhizal soil infectivity and spores distribution across plantations of tropical, subtropical and exotic tree species: a case study from the forest reserve of Bandia, Senegal. Afr J Ecol 50: 218-232.
- Seydi AB, Hassan EK, Yilmaz ZA (2003). Determination of the salt tolerance of some barley genotypes and the characteristics affecting tolerance. Turk J Agric Forest 27: 253-260.
- Shafi M, Bakht J, Khan MJ, Khan MA, Raziuddin M (2011). Role of abscisic acid and proline in salinity tolerance of wheat genotypes. Pak J Bot 43: 1111-1118.
- Shamseldin AAY, Vinuesa P, Thierfelder H, Werner D (2005). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate *Phaseolus vulgaris* in Egyptian Soils and Display Cultivar-Dependent Symbiotic Efficiency. Symbiosis 38: 145-161.
- Sharifi M, Ghorbanli M, Ebrahimzadeh H (2007). Improved growth of salinity-stressed soybean after inoculation with salt pre-treated mycorrhizal fungi. J Plant Physiol 164: 1144-1151.
- Sharma KK, Lavanya M (2002). Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. JIRCAS Working Report 23: 61-73.
- Sheng M, Tang M, Zhang FF, Huang YH (2011). Influence of arbuscular mycorrhiza on organic solutes in maize leaves under salt stress. Mycorrhiza 21: 423-430.
- Sheng M, Tang M, Chen H, Yang BW, Zhang FF, Huang YH (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. Mycorrhiza 18: 287-296.

- Shokri S, Maadi B (2009). Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on the mineral nutrition and yield of *Trifolium alexandrinum* plants under salinity stress. *J Agron* 8: 79-83.
- Sieverding E, da Silva GA, Berndt R, Oehl F (2014). *Rhizoglosum*, a new genus of the *Glomeraceae*. *Mycotaxon* 129(2): 373-386.
- Sieverding E (1991). Vesicular–Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. GTZ, Germany, pp. 371.
- Silvia N, Vendrame SWA, Crane JH, Pereira MC, Costa A, Reis ST (2015). Variability in reproductive traits in *Jatropha curcas* L. accessions during early developmental stages under warm subtropical conditions. *Glob Chang Biol Bioenergy* 7: 122-134
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Singh G (2009). Salinity-related desertification and management strategies: Indian experience. *Land Degrad Dev* 20: 367-385.
- Slama F (2004). La salinité et la production végétale. Ed .Centre de publication universitaire Tunis. Pp.163.
- Sleimi N, Guerfali S, Bankaji I (2015). Biochemical indicators of salt stress in *Plantago maritima*: implications for environmental stress assessment. *Ecol Indic* 48: 570-577.
- Smil V (1999) Nitrogen in crop production. *Global Biogeochem Cycles* 13: 647-662
- Smith SE, Jakobsen I, Gronlund M, Smith FA (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol* 156: 1050-1057.
- Smith FA, Grace EJ, Smith SE (2009). More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol* 182: 347-358.
- Smith SE, Read DJ (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edn. Academic Press, London.
- Smith MR, Charvat I, Jacobson RL (1998). Arbuscular mycorrhizae promote establishment of prairie species in a tallgrass prairie restoration. *Can J Bot* 76: 1947-1954.
- Smith SE, Read DJ (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*, Academic Press, London.
- Smith LT, Allaith AM, Smith G (1994). Mechanism of osmotically-regulated N-acetylglutaminylglutamine amide production in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil* 161: 103-108.
- Sprent JI (1995). Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biol Biochem* 27(4/5): 401-407.
- Sprent J (1989). Which steps are essential for the formation of functional legume nodules? *New Phytol* 111: 129-153.
- Somasegaran P, Hoben HJ (1994). *Handbook for Rhizobia*. Springer verlage New York.
- Soumare A, Manga A, Thiao M, Ndoeye I, Diop TA (2008). Effet de l'inoculation des champignons mycorrhiziens arbusculaires sur le développement de *Acacia nilotica* subsp astringens soumis à différentes concentrations de sel. *J Sci Technol* 7(1): 74-83.
- Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, D May G (2006). Genetics and functional

- genomics of legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol* 9: 110-121.
- Stukenbrock EH, Rosendahl S (2005). Development and amplification of multiple co dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. *Fungal Genet Biol* 42: 73-80.
- Subba-Rao NS, Mateos PF, Baker D, Pankratz HS, Palma J, Dazzo FB, Sprent JI (1995). The unique root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and the aquatic legume, *Neptunia natans* (L. f.) Druce. *Planta* 196: 311-320.
- Sullivan JT, Ronson CW (1998). Evolution of rhizobia by acquisition of a 500 kb symbiosis island integrates into a phe-rRNA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5145-5149.
- Suominen L, Roos C, Lortet G, Paulin L, Lindstrom K (2001). Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol* 18(6): 907-916.
- Sutherland JM, Odee DW, Muluvi GM, McInroy SG, Patel A (2000). Single and multi-strain rhizobial inoculation of African acacias in nursery conditions. *Soil Biol Biochem* 32: 323-333.
- Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C, Dreyfus B (2001). Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol* 183(1): 214-220.
- Tagu D, Bastien C, Faivre-Rampant P, Garbaye J, Vion P, Villar M, Martin F (2005). Genetic analysis of phenotypic variation for ectomycorrhiza formation in an interspecific F1 poplar full-sib family. *Mycorrhiza* 15: 87-91.
- Talaat NB, Shawky BT (2011). Influence of arbuscular mycorrhizae on yield, nutrients, organic solutes, and antioxidant enzymes of two wheat cultivars under salt stress. *J Plant Nutr Soil Sci* 174: 283-291.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Tawarayama K (2003). Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Sci Plant Nutr* 49: 655-668.
- Tawfik MM, Amany EM Abd El Lateef, Bahr A, Hozayen M (2011). Prospect of Biofertilizer Inoculation for Increasing Saline Irrigation Efficiency. *Res J Agric Biol Sci* 7(2): 182-189.
- Thiéry O, Vasar M, Jairus T, Davison J, Roux C, Kivistik PA, Metspaalu A, Milani L, Saks Ü, Moora M, Zobel M, Öpik M (2016). Sequence variation in nuclear ribosomal small subunit, internal transcribed spacer and large subunit regions of *Rhizophagus irregularis* and *Gigaspora margarita* is high and isolate-dependent. *Mol Ecol* 25(12): 2816-2832.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Tian CY, Feng G, Li XL, Zhang FS (2004). Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants. *Appl Soil Ecol* 26: 143-148.
- Tommerup IC (1984). Effect of soil water potential on spore germination by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *T Brit Mycol Soc* 83: 193-202.

- Tremblin G, Binet P (1984). Halophilie et résistance au sel chez *Halopepelis amplexicaulis* (Vahl) Ung. Oecol Plant 5: 291-293.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986). Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) Physiology and genetics aspects of mycorrhizae. INRA, Paris, pp. 217-221.
- Ungar IA (1982). Germination ecology of halophytes. In: Sen DN, Rajpurohit KS (eds) Contribution to the ecology of halophytes. W. Junk Publishers, The Hague, pp. 143-154.
- Vandamme P, Coenye T (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int J Syst Evol Microbiol 54: 2285-2289.
- Vandenkoornhuyse P, Husband R, Daniell TJ, Watson IJ, Duck JM, Fitter AH, Young JPW (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. Mol Ecol 11: 1555-1564.
- Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature 396: 69-72.
- Van der Zon A (1992). Graminées du Cameroun. Wageningen Agr Univ Papers 92: 558.
- Van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. Mol Ecol 7: 879-887.
- Varela-Cervero S, Vasar M, Davison J, Barea JM, Opik M, Azcon-Aguilar C (2015). The composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities differs among the roots, spores and extraradical mycelia associated with five Mediterranean plant species. Environ Microbiol 17(8): 2882-2895.
- Vasquez EA, Glenn EP, Guntenspergen GR, Brown JJ, Nelson SG (2006). Salt tolerance and osmotic adjustment of *Spartina alterniflora* (Poaceae) and the invasive M haplotype of *Phragmites australis* (Poaceae) along a salinity gradient. Am J Bot 93: 1784-1790.
- Ventura M, Canchaya C, van Sinderen D, Fitzgerald GF, Zink R (2004). *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: Identification of the atp (atpBEFHAGDC) Operon and Analysis of Its Genetic Structure, Characteristics, and Phylogeny. Appl Environ Microbiol 70: 3110-3121.
- Vincent JM (1970). A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: Programme IB ed. International Biological Programme. Blackwell, Oxford: Handbook no. 15.
- Vinuesa P, Leon-Barrios M, Silva C, Willems A, Jarabo-Lorenzo A, Perez-Galdona R, Werner D, Martinez-Romero E (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int J Syst Evol Microbiol 55(2): 569-575.
- Wais RJ, Keating DH, Long SR (2002). Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. Plant Physiol 129: 211-224.
- Walter MH, Floß DS, Hans J, Fester T, Strack D (2007). Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway

- isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* 68: 130-138.
- Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H (2012). Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. *Cell Microbiol* 14: 334-342.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole R (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73(16): 5261-5267.
- Wang WX, Vinocur B, Altman A (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Wang Y, Zhang Z (2000). Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiology* 146 (1): 2845-2854.
- Wang BS, Zhao KF (1995). Comparison of extractive methods of Na⁺ and K⁺ in wheat leaves. *Plant Physiol Commun* 3: 50-52.
- Wartiainen I, Eriksson T, Zheng WW, Rasmussen U (2008). Variation in the active diazotrophic community in rice paddy—nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Appl Soil Ecol* 39: 65-75.
- Watt MS, Clinton PW, Whitehead D, Richardson B, Mason EG, Leckie AC (2003). Above-ground biomass accumulation and nitrogen fixation of broom (*Cytisus scoparius* L.) growing with juvenile *Pinus radiata* on a dryland site. *Forest Ecol Manag* 184: 93-104.
- Wei Y, Dong M, Huang Z, Tan D (2008). Factors influencing seed germination of *Salsola affinis* (Chenopodiaceae), a dominant annual halophyte inhabiting the deserts of Xinjiang, China. *Flora* 203: 134-140.
- Weir BS (2016). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lae DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.
- White J, Tallaksen J, Charvat I (2008). The effects of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation at a roadside prairie restoration site. *Mycologia* 100: 6-11.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In ‘‘PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications’’ (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Eds.) Academic Press, San Diego, CA, pp. 315-322,
- Willems A, Coopman R, Gillis M (2001). Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51(2): 623-632.
- Wilson GWT, Hartnett DC (1998). Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *Am J Bot* 85: 1732-1738.
- Wilson GF, Kang BT, Mulongoy K (1986). Alley cropping : trees as sources of green-manure and mulch in the tropics. *Biol Agric Hort* 3: 251-267.
- Wu QS, Xia RX (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under wellwatered and water stress conditions. *J Plant Physiol* 163: 417-425.

- Yadav S, Irfan M, Ahmad A, Hayat S (2011). Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *J Environ Biol* 32: 667-685.
- Yadav NK, Vyas SR (1971). Response of root nodule bacteria to saline, alkaline and acid conditions. *Indian J Agric Sc* 41: 875-881.
- Yamato M, Ikeda S, Iwase K (2008). Community of arbuscular mycorrhizal fungi in coastal vegetation on Okinawa Island and effect of the isolated fungi on growth of sorghum under salt-treated conditions. *Mycorrhiza* 18: 241-249.
- Yang CW, Chong JN, Li CY, Kim CM, Shi DC, Wang DL (2007). Osmotic adjustment and ion balance traits of an alkali resistant halophyte *Kochia sieversiana* during adaptation to salt and alkali conditions. *Plant Soil* 294: 263-276.
- Yates R, Howieson J, Nandasena KG, O'Hara GW (2004). Root-nodule bacteria from indigenous legumes in the north-west of Western Australia and their interaction with exotic legumes. *Soil Biol Biochem* 36: 1319-1329.
- Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H (2003). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - a reply to Farrand et al. (2003). *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1689-1695.
- Young JPW, Haukka KE (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol* 133: 87-94.
- Young JPW (1991). Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem-nodulating bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 41: 582-587.
- Zahran HH (2001). Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J Biotechnol* 91(2-3): 143-153.
- Zahran HH (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 968-989.
- Zahran HH, Mohammad EM, Emam MM, Ismael SS (1997). The chemical composition, structure and ultrastructure of a halotolerant rhizobia isolated from Egypt. *Proceedings of the 9th Microbiology Conference*. Pp. 121-148.
- Zangaro W, Nishidate FR, Vandresen J, Andrade G, Nogueira MA (2007). Root mycorrhizal colonization and plant responsiveness are related to root plasticity, soil fertility and successional status of native woody species in Southern Brazil. *J Trop Ecol* 23: 53-62.
- Zerhari K, Aurag J, Khbaya B, Kharchaf D, Filali-Maltouf A (2000). Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating acacia species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett Appl Microbiol* 30(5): 351-357.
- Zhang JJ, Liu TY, Chen WF, Wang ET, Sui XH, Zhang XX, Li Y, Chen WX (2012). *Mesorhizobium muleiense* sp. nov., nodulating with *Cicer arietinum* L. in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 2737-2742.
- Zhu JK (2007). Plant Salt Stress. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. Pp. 1-3.

10. ANNEXES

9.1. Communications

Fall F, Diouf D, Bâ AM, Fall D, Bakhoun N, Ndiaye C, Kane A, Ndoye I, Sanguin H. Identification et structure des champignons mycorhiziens à arbuscules de *Sporobolus robustus* et *Prosopis juliflora* suivant la salinité et la saison au Sénégal. Communication orale au Colloque IAVAO/IESOL/LAPSE à l'hôtel les Almadies, Dakar, Sénégal du 10 au 11 mai 2016.

Fall F, Diouf D, Fall D, Kane A, Ndoye I, Bâ AM. Impact des touffes d'une graminée halophyte (*Sporobolus robustus* Kunth) sur la germination de semences d'*Acacia seyal* Del. et de *Prosopis juliflora* (Swartz) DC en condition de stress salin. Communication orale aux 3^{ème} journées du Lapse au Campus UCAD2, Dakar, Sénégal du 01 au 02 avril 2015.

Fall F, Diouf D, Fall D, Kane A, Ndoye I, Bâ AM. Rôle de la graminée halophyte (*Sporobolus robustus* Kunth) dans l'établissement de légumineuses à usages multiples sur des sols salés du Sine et du Saloum au Sénégal. Communication orale aux journées des allocataires de recherches du WAAPP au Pôle de Recherches de Hann, Dakar, Sénégal du 25 au 26 juin 2014.

Fall F, Diouf D. Potentialités d'adaptation d'une graminée pérenne (*Sporobolus robustus* Kunth) à la salinité. Poster présenté aux doctoriales de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement à l'UCAD2, Dakar, Sénégal du 08 au 09 2015.

Fall F, Diouf D, Fall D, Diouf F, Ndiaye C, Bakhoun B, Kane A, Ndoye I, Bâ AM. The perennial halophytic grass *Sporobolus robustus* Kunth acts as a "plant nurse" for the germination of *Acacia seyal* Del. and *Prosopis juliflora* (Swartz) seeds under salt stress. Poster présenté au 3^{ème} Congrès International sur les Mycorhizes à Marrakech, Marocco du 15 au 17 octobre 2014.

9.2. Article 1.

academicJournals

Vol. 14(39), pp. 2770-2776, 30 September, 2015
 DOI: 10.5897/AJB2015.14840
 Article Number: 8CD3BA555639
 ISSN 1684-5315
 Copyright © 2015
 Author(s) retain the copyright of this article
<http://www.academicjournals.org/AJB>

African Journal of Biotechnology

Full Length Research Paper

Effect of arbuscular mycorrhizal fungal inoculation on growth, and nutrient uptake of the two grass species, *Leptochloa fusca* (L.) Stapf and *Sporobolus robustus* Kunth, under greenhouse conditions

Fatoumata Fall^{1,2,3*}, Diégane Diouf^{1,2,3}, Dioumacor Fall^{2,3,4}, Ibrahima Ndoye^{1,2,3},
 Cheikh Ndiaye^{2,3}, Aboubacry Kane^{1,2,3} and Amadou Mustapha Bâ^{5,6}

¹Département de Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop, BP 5005 Dakar, Sénégal. ²Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM) IRD/ISRA/UCAD, Centre de Recherche de Bel-Air, Route des Hydrocarbures, BP 1386 Dakar, Sénégal.

³Laboratoire Mixte International Adaptation des Plantes et microorganismes associés aux Stress Environnementaux (LAPSE), BP 1386 Dakar, Sénégal.

⁴Université des Antilles et de la Guyane 97159, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.

⁵Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, Université des Antilles, 97159, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.

⁶Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR113 INRA/AGRO-M/CIRAD/IRD/UM2 - TA10/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France.

Received 6 June, 2015; Accepted 14 September, 2015

The aim of our work was to assess the effect of inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (*Rhizoglyphus aggregatum* (N.C. Schenck and G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva and Oehl., *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson and Gerd.) C. Walker and A. Schüssler, and *Rhizoglyphus intraradices* (N.C. Schenck and G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva and Oehl.), and a mixed inoculum of these AMF on root colonization, biomass production, mycorrhizal dependency (MD) and shoot mineral contents of two salt tolerant grasses *Leptochloa fusca* L. Stapf and *Sporobolus robustus* Kunth. After four months of growth in a sterilized soil and greenhouse conditions, grasses inoculated with AMF showed significantly higher total biomass production than non-inoculated seedlings. MD and shoot mineral contents (especially P) varied with AMF host plants. Maximum values of MD (13%) were observed in *L. fusca* and *S. robustus* seedlings when inoculated with *R. intraradices* and *F. mosseae*, respectively. Only P contents were higher in the *S. robustus*/mixed-AMF combinations than the other treatments. These results demonstrate the potential benefits in our experimental conditions of AMF inoculation for improving growth and P acquisition particularly in the *L. fusca*/*F. mosseae* and *S. robustus*/mixed-AMF combinations.

Key words: Grass species, symbiosis, mycorrhizal dependency, mineral nutrition.

INTRODUCTION

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are beneficial and ubiquitous fungi in natural and agricultural ecosystems (Smith and Read, 2008). These fungi establish symbiosis

with the majority of terrestrial plants, supplying mineral nutrients to the plants in exchange for photosynthetically fixed carbon (Smith and Read, 2008). The extraradical

9.3. Article 2.

Growth and physiological responses of *Sporobolus robustus* Kunth seedlings to salt stress

Fatoumata Fall^{1,2,3}, Diégane Diouf^{1,2,3}, Dioumacor Fall^{2,3,4}, Niokhor Bakhom^{1,2,3}, Babacar Thioye^{1,2,3}, Aboubacry Kane^{1,2,3}, Cheikh Ndiaye^{2,3}, Ibrahima Ndoye^{1,2,3}, Amadou Mustapha Bâ^{5,6}

En révision à Arid Land Research and Management

¹Université Cheikh Anta Diop (UCAD) de Dakar, Département de Biologie Végétale, BP 5005, Dakar-Sénégal.

²Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM) IRD/ISRA/UCAD, Centre de Recherche de Bel-Air, Route des Hydrocarbures, BP 1386, Dakar-Sénégal.

³Laboratoire Mixte International Adaptation des Plantes et Microorganismes associés aux Stress Environnementaux (LAPSE), BP 1386, Dakar-Sénégal.

⁴Institut Sénégalais de Recherche Agricoles (ISRA), Centre National de Recherches Forestières (CNRF), Route des Pères Maristes, BP 2312, Daka-Sénégal.

⁵Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, Université des Antilles, 97159, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France.

⁶Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR113 INRA/AGROM/CIRAD/IRD/UM2 – TA10/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France.

Acknowledgements

This research was funded by the grants “Fonds d’Impulsion de la Recherche Scientifique et Technique (FIRST)” and “Projet d’Appui à la Promotion des Enseignantes-chercheuses (PAPES)”. F. Fall received grants from Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) and World Federation of Scientists (WFS).

Address correspondence to F. Fall, UCAD/LCM-Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, Centre de Recherche de Bel-Air, BP 1386 CP 18524, Dakar-Sénégal. E-mail : fall1481@yahoo.fr.

Abstract

This work aimed to assess the ability of *Sporobolus robustus* to respond to salt stress. Seedlings of *S. robustus* were exposed to increasing NaCl concentrations (0, 50, 100, 150, 200, 250 and 300 mM) for 50, 100 and 150 days in greenhouse conditions. Total dry weight and salt tolerance index decreased gradually with increasing NaCl concentrations. The optimum growth of *S. robustus* was obtained between 0 and 150 mM at 150 days after salt stress. Foliar chlorophyll a and total chlorophyll contents increased with NaCl concentration at 50 days after treatment. There was no significant effect of salinity on chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll contents at 100 and 150 days after treatment. The higher Na contents were in the shoot as compared to the root. The Na content increased, while K decreased with increasing NaCl concentrations, suggesting competitive inhibition between absorptions of Na and K as a consequence, the K/Na ratios in shoots and roots decreased with increasing salinity. The proline contents in *S. robustus* were more pronounced at NaCl concentrations between 200 and 300 mM as compared to nonsaline treatment. Overall, *S. robustus* could be considered as salt tolerant on the basis of their performance in biomass production, accumulation of Na, similar foliar chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll contents, and accumulation of proline with increasing salinity. The potential ability of *S. robustus* to accumulate significant amounts of Na makes this halophyte promising as a desalinization tool of salted soils.

Keywords grass, biomass production, proline, Na accumulation, chlorophyll, osmotic adjustment.



Potentialités d'adaptation d'une graminée pérenne (*Sporobolus robustus* Kunth) à la salinité.

UER 301

Biotechnologies Végétales
Amélioration des Plantes

Fatoumata FALL

UMR/UR/ESP

Amélioration des Plantes

Directeur de thèse : Dr Diégane DIOUF

Adresse : Biologie Végétale, BP 5005 Dakar, Sénégal

Email : diegane.diouf@ucad.edu.sn

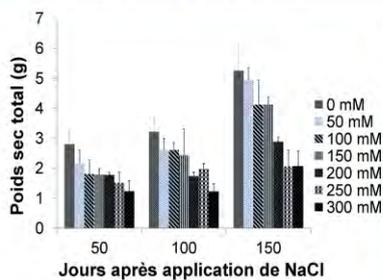
Introduction

La salinisation affecte environ 1700 000 ha de terres (LADA 2009) au Sénégal. Dans le delta du Sine-Saloum, en dépit de la salinité, se développe une graminée pionnière: *Sporobolus robustus* Kunth. Cette graminée fourragère forme des touffes à l'intérieur desquelles émergent souvent de jeunes plants de *Acacia seyal* Del. et *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. *S. robustus* pourrait développer des stratégies d'adaptation à la salinité lui permettant de se maintenir dans ces zones. Par ailleurs, cette graminée serait une plante facilitatrice, pour l'établissement de ces 2 légumineuses moins tolérantes aux sels, grâce à sa capacité à diminuer la salinité des sols par accumulation de sels. Ainsi, cette étude vise à évaluer l'effet de la salinité sur (1) la cinétique de production de biomasse sèche ; (2) les teneurs en proline et chlorophylle et (3) la nutrition minérale de *S. robustus* en condition semi-contrôlée.



Matériel et Méthodes

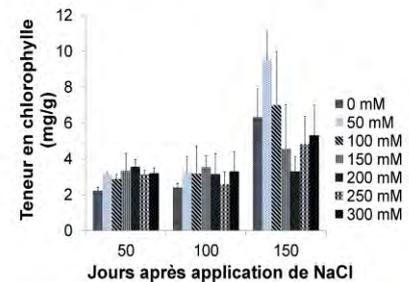
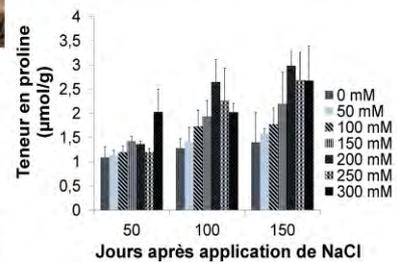
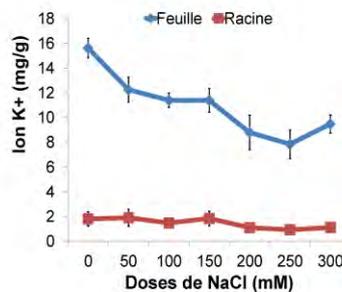
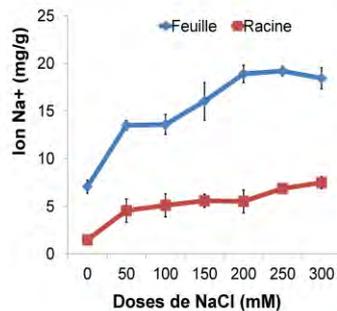
Sept doses de NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 250 et 300 mM) ont été appliquées sur de jeunes plantes de *S. robustus*. La production de biomasse a été évaluée tous les 50 jours pendant 150 jours. Parallèlement, les teneurs en proline et en chlorophylle ont été déterminées respectivement suivant la méthode de Monneveux and Nemmar (1986) et Makeen (2007). La nutrition en ions Na⁺ et K⁺ a été déterminée à la fin de l'expérimentation.



Résultats obtenus

La production de biomasse de *S. robustus* augmente en fonction du temps quelle que soit la dose de NaCl. Toutefois, elle est meilleure chez les plantes soumises aux faibles doses de NaCl. Sous stress salin, *S. robustus* produit des osmoprotecteurs dont la proline. L'évolution de la teneur en chlorophylle montre que *S. robustus* est tolérante au stress salin jusqu'à 100 jours après application des doses de NaCl. Au-delà de cette période, la réponse de la plante à de fortes doses de NaCl (200 mM) devient négative.

S. robustus accumule les ions Na⁺ aux niveaux des parties aériennes, la présence excessive de ces ions limite l'absorption des ions K⁺.



Retombées scientifiques

Cette étude a permis de mieux comprendre les stratégies d'adaptation de *S. robustus* à la salinité mais aussi son rôle de plante facilitatrice pour *A. seyal* et *P. juliflora*, grâce à sa capacité à accumuler certains ions toxiques tels que le Na⁺. Des itinéraires techniques de co-culture légumineuses-graminée sont envisagés pour revégétaliser ces zones.

Conclusion

Les teneurs en chlorophylle nous renseignent sur le degré de tolérance de *S. robustus* à la salinité. L'augmentation des teneurs en proline de *S. robustus* sous stress salin traduit un ajustement osmotique pour contre-carrer l'effet du potentiel osmotique du sol.

S. robustus accumule les ions Na⁺ ce qui contribue à la diminution de la salinité des sols.

Impacts socio-économique

Le bois fourni par ces essences agroforestières (*A. seyal* et *P. juliflora*) pourra constituer une source de revenu non négligeable pour les populations locales.

Ces zones revégétalisées pourront devenir propices à l'agriculture.

The perennial halophytic grass *Sporobolus robustus* Kunth acts as a "plant nurse" for the germination of *Acacia seyal* Del. and *Prosopis juliflora* (Swartz) seeds under salt stress

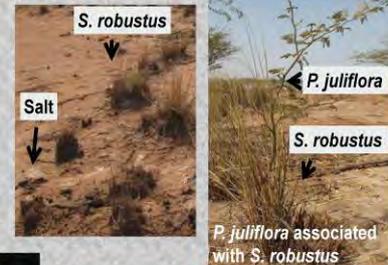


Fatoumata FALL^{1,2}, Diégane DIOUF¹, Dioumacor FALL², Fatou DIOUF^{1,2}, Cheikh Ndiaye¹, Niokhor BAKHOUM¹, Aboubacry KANE¹, Ibrahima NDOYE¹, Amadou BA^{1,3}
¹UCAD/LCM Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, Centre de Recherche de Bel-Air, Route des Hydrocarbures BP 1386, Dakar-Sénégal; ²ISRA/CNRF, Route des Pères Maristes, BP 2312, Dakar-Sénégal; ³UAG/Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), UMR 113, Campus de Baillarguet, A10/J, 34398 Montpellier, Cedex 5, France.

Mail: fal1481@yahoo.fr

Introduction

The salinization of soils is a serious land-degradation problem in arid and semi-arid areas. In Senegal, about 6% (Sadio, 1991) of land are affected by salinity. *Prosopis juliflora* and *Acacia seyal* are moderately salt-tolerant legume trees, while *Sporobolus* is a highly salt tolerant grass. In saline soils of Sine Saloum (Senegal), *Prosopis* and *Acacia* seedlings grow often in tussocks of grass. The aim of the present study was to determine the effect of *S. robustus* on germination of *P. juliflora* and *A. seyal* seeds.

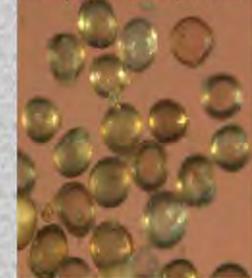


Material and methods

Acacia and *Prosopis* seeds were previously scarified with sulfuric acid 95%, rinsed with sterile distilled water and sowed in tussocks of *Sporobolus* growing in pots containing soil, under greenhouse during 4 months. The electric conductivity (EC) of the soil was 2.20 mS/cm (highly salty soil; according to the classification of Daffé & Sadio, 1988). For each nitrogen-fixing legume, two treatments were compared: 1) germination of seeds with *Sporobolus*; 2) germination of seeds without *Sporobolus*. Germinated seedlings were counted every day during 12 days after sowing. Furthermore, spores were extracted (Gerdemann and Nicolson, 1963) and spore density was evaluated.

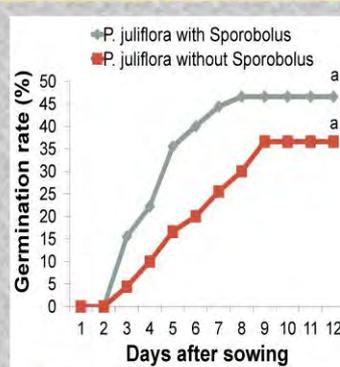
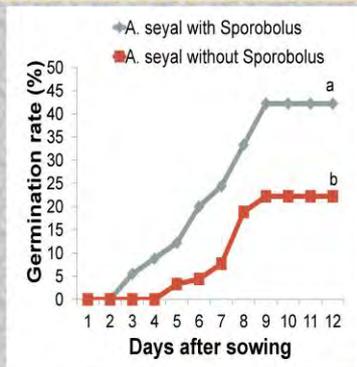


Spores extracted from rhizospheric soil of *Sporobolus*

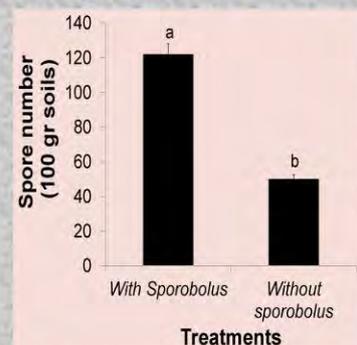


Results and discussion

Cumulative germination percentages of *A. seyal* and *P. juliflora* seeds with or without *Sporobolus* (Values at each treatment having the same letter are not significantly different ($p \leq 0,05$))



Spore density in soils after germination test



Sporobolus increased the germination percentage of *A. seyal* but not *P. juliflora*. The highest values were showed with *A. seyal* which is less tolerant to salinity than *P. juliflora*. At the end of the experiment, soil salinity in *sporobolus* pots was reduced. The EC was decreased from 2.2 to 1.84 mS/cm. Spores numbers were significantly increased in the *sporobolus* pots.

Conclusions and perspectives

Sporobolus promotes both germination of *A. seyal* and development of AMF by reducing soil salt content. Studies are ongoing to test this hypothesis.

ACKNOWLEDGMENTS

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Projet FIRST et PAPES), PPAO/WAPP, USAID ERA, WFS, SCAC, LMI LAPSE

Reference:

Daffé M. & Sadio S., 1988. Projet UNSO/SEN/83/XO2/ISRA/DRPF, 78p
 Gerdemann J. & Nicolson T., 1963. Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 235-244
 Sadio S. 1991. ORSTOM, Bondy, France. 269 p.

9.4. Gamme étalon pour dosage de la proline

Concentration (nmoles)	Volume solution de proline 0,5 mM (μ l)	Volume d'eau à ajouter (μ l)
0	0	1000
50	100	900
75	150	850
125	250	750
175	350	650
250	500	500
375	750	250
500	1000	0

Résumé :

Sporobolus robustus Kunth est une graminée halophyte pérenne utilisée comme fourrage d'appoint pour le bétail. Dans le Delta du Sine- Saloum où la salinité est la contrainte majeure de la végétation ligneuse, *S. robustus* forme des touffes à l'intérieur desquelles émergent souvent de jeunes *Vachellia seyal* Del. (Syn. *Acacia seyal* Del.) et *Prosopis juliflora* (Swartz) DC, deux légumineuses d'intérêts écologiques. La graminée halophyte pourrait créer un microenvironnement tellurique favorisant la germination et l'établissement de *P. juliflora* et d'*A. seyal* dans les sols salés selon deux mécanismes non exclusifs : (i) diminution de la salinité des sols par accumulation de sels, (ii) stimulation de la microflore symbiotique adaptée au sel. Par ailleurs, *S. robustus* pourrait partager avec les légumineuses une microflore rhizobienne et mycorrhizienne, adaptée à la salinité et potentiellement bénéfique aux légumineuses. L'objectif principal de ce travail de thèse est d'évaluer l'effet plante nurse de *S. robustus* pour l'établissement de *V. seyal* et *P. juliflora* en milieu salé.

Une expérimentation réalisée en serre a montré que *S. robustus* améliore la germination d'*A. seyal*, la survie de *P. juliflora* et le taux de mycorhization des deux légumineuses en condition de stress salin. Cela pourrait être dû à la capacité de *S. robustus* à diminuer la salinité des sols par accumulation de Na. La graminée a également stimulé le potentiel mycorrhizogène et maintenu le potentiel rhizobien des sols rhizosphériques des deux légumineuses.

La diversité génétique des rhizobia de la rhizosphère de *S. robustus* et *P. juliflora* a été déterminée par le séquençage Sanger. Les résultats ont montré que les communautés de rhizobia sont partagées par *S. robustus* et *P. juliflora*. Les rhizobia, identifiés comme des *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* et *Burkholderia*, ont été structurés par la salinité et la saison. Ils se sont révélés efficaces sur de jeunes plants de *P. juliflora* et *A. seyal*.

Le séquençage Illumina Miseq du 18S a révélé des communautés de champignons mycorrhiziens à arbuscules (CMA) communes à *S. robustus* et *P. juliflora*. Les CMA ont été identifiés à 20 genres, en majorité des Glomeraceae, dont 8 (*Glomus*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Incertae-sedis*, *Redeckera*, *Acaulospora*, *Paraglomus* et *Ambispora*) ont été structurés par la salinité. Toutefois, *S. robustus* s'est révélée modérément dépendante de CMA issus de la collection du LCM. Nos résultats suggèrent que *S. robustus* diminue la salinité des sols et héberge dans sa rhizosphère des rhizobia et CMA potentiellement bénéfiques aux deux légumineuses. *S. robustus* serait une plante facilitatrice de la germination et de l'établissement des deux légumineuses dans des sols salés au Sénégal.

Thesis title. The impact of *Sporobolus robustus* Kunth on symbiotic microflora and establishment of multipurpose legumes on salt affected soils of from the Sine - Saloum Delta in Senegal

Abstract:

Sporobolus robustus Kunth is a halophytic perennial grass and provides fodder for livestock. In the Sine and Saloum Delta where the salinity is the major constraint of woody vegetation, two multipurpose leguminous trees *Vachellia seyal* Del. (Syn. *Acacia seyal* Del.) and *Prosopis juliflora* (Swartz) DC seedlings grow often in tussocks of grass. *S. robustus* may create a microenvironment more conducive to legumes establishment through two non-exclusive mechanisms: (i) the decrease of soil salinity by accumulating salts, (ii) the stimulation of the symbiotic microflora adapted to salt. In thus, *S. robustus* could share with *P. juliflora* and *V. seyal* a salt adapted rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) communities which would be beneficial to regenerating legumes seedlings. The aim of this study was to evaluate the *S. robustus* nurse plant effect on *A. seyal* and *P. juliflora* establishment in saline soil.

An experiment was done in controlled conditions to assess the effect of *S. robustus* in the regeneration processes of the tree species *A. seyal* and *P. juliflora* in salt stress condition.

The results showed that *S. robustus* improved the germination of *A. seyal*, the survival of *P. juliflora* and the mycorrhizal colonization of both legumes. This could be due to the ability of *S. robustus* to reduce soil salinity by Na accumulation. The grass also stimulated the mycorrhizal potential and maintained rhizobial potential of rhizospheric soils of both legumes.

The rhizobia genetic diversity was determined by Sanger sequencing. Our results showed that some rhizosphere microbial communities belonging to rhizobia were shared by *S. robustus* and *P. juliflora*. The rhizobia identified to *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Rhizobium* et *Burkholderia*, were structured by the salinity and the season. They were efficient on growth of *P. juliflora* and *A. seyal* seedlings.

We used Illumina Miseq of the 18S rRNA gene to assess AMF diversity in *S. robustus* and *P. juliflora* roots. The results showed that the AMF were identified to 20 genera, mostly belonging to Glomeraceae, and 8 of them (*Glomus*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Incertae-sedis*, *Redeckera*, *Acaulospora*, *Paraglomus* and *Ambispora*) were structured by salinity. Nevertheless, *S. robustus* was moderately dependent on AMF from the collection of LCM.

Our results suggest that *S. robustus* reduces soil salinity and hosts in its rhizosphere rhizobia and AMF that are potentially beneficial to both legumes. *S. robustus* would be a nurse plant for germination and establishment of both legumes in salted soils from Senegal.

Discipline : Biotechnologies Végétales et microbiennes et Amélioration des plantes

Mots clés. Salinité, champignons mycorrhiziens à arbuscules, rhizobium, proline, sodium, séquençage Illumina, séquençage Sanger, plante facilitatrice, *Sporobolus robustus*, *Prosopis juliflora*, *Acacia seyal*.

ED-SEV, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, BP 5005 Dakar- Sénégal.