

## ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNr	: gènes codant les ARN ribosomiques
AFN	: Arbres fixateurs d'azote
ARN	: Acide ribonucleique
ARNr	: Acide ribonucleique ribosome
dNTP	: désoxyribonucleotide tris-phosphate
EDTA	: éthylène diamine tétracétate
g	: gramme
<i>Hae III</i>	: Enzyme de restriction purifiée de <i>Haemophilus aegyptius</i>
IGS	: espace inter génique entre l'ADNr 16S et 23S
IRD	: Institut de Recherche pour le Développement
ISRA	: Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
kb	: Kilobase ou Kilo-paire de bases
Mg	: Milligramme
Min	: Minute
<i>Msp I</i>	: Enzyme de restriction purifiée de <i>Moraxella species</i>
p/v	:poids à volume
Pb	: paire de base
PCR	: Réaction de Polymérisation en Chaîne
pH	: potentiel hydrogène
Q.S.P	: quantité suffisante pour
RFLP	: Polymorphisme des Longueurs des Fragments de restriction
rpm	: Rotation par minute
Taq polymérase	: Enzyme (polymérase) extrait de la bactérie <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris-Borate EDTA
UCAD	: Université Cheikh Anta Diop de Dakar
µl	: microlitre
YM	: yeast mannitol
YMA	: yeast mannitol Agar

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Evolution de la production annuelle de gomme arabique au Sénégal (en kg) de 1990 à 2007 (DEFCCS,1990, 1991, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004).....	14
Tableau 2: Semences d' <i>A. senegal</i> récoltées dans différentes zones du Sénégal à différentes périodes .....	19
Tableau 3: Différents sols prélevés dans des localités de la zone sylvopastorale, du sud Bassin arachidier et du Sénégal oriental .....	20
Tableau 4: Taux de germination des graines d' <i>A. senegal</i> provenant de Vélingara I, Diaménar, Daga Diouf, Kidira, Mbeuleukhé, Vélingara II et Louga. ....	26
Tableau 5: Taux de nodulation et nombre moyen de nodosités formées au niveau des plants d' <i>A. senegal</i> de la provenance Vélingara associée aux sols de Louga, Kamb, Linguère, Kaffrine, Koulor, Goudiri et Kidira. ....	27
Tableau 6: Taux de nodulation et nombre moyen de nodosités formées au niveau des plant d' <i>A. senegal</i> de la provenance Mbeuleukhé associée aux sols de Louga, Kamb, Linguère, Kaffrine, Koulor, Goudiri et Kidira. ....	28
Tableau 7: Taux de nodulation et nombre moyen de nodosités formées au niveau des plants d' <i>A. senegal</i> de la provenance Louga associée aux sols de Louga, Kamb, Linguère, Kaffrine, Koulor, Goudiri et Kidira. ....	29
Tableau 8: Estimation du nombre moyen de bactéries par gramme de sol capable de former des nodosités sur les racines des plants d' <i>A. senegal</i> inoculés avec des sols de la zone sylvopastorale, du sud bassin arachidier et du Sénégal oriental. ....	29
Tableau 9: Amplification par PCR/RFLP de l'IGS de l'ADNr des extraits d'ADN de broyats de nodosités obtenues par piégeage de plants d' <i>A. senegal</i> . Les plants des 3 provenances ont été inoculés 7 jours après germination avec 7 sols des 3 zones écogéographiques..	31
Tableau 10: Isolement de souches de rhizobium provenants de broyats de nodosités de plants d' <i>A. senegal</i> inoculés avec les sols de Louga, Kamb, Linguère de la zone sylvopastorale, de Kaffrine du sud bassin arachidier, de Koulor, Goudiri et Kidira du Sénégal oriental.	38

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Dialogue moléculaire entre la bactérie et la plante avant la formation de la nodosité	5
Figure 2: Plant d' <i>Acacia senegal</i> .....	11
Figure 3: Fleurs et gousse d' <i>A. senegal</i> .....	11
Figure 4:Gomme arabique sur un plant d' <i>A. senegal</i> .....	14
Figure 5: Carte écogéographique du Sénégal.....	16
Figure 6: Plant d' <i>A. senegal</i> en tube Gibson.....	21
Figure 7: Plants d' <i>A. senegal</i> en tubes Gibson dans des portoirs en chambre de culture. ....	22
Figure 8: Gel d'électrophorèse montrant les profils de restriction obtenus avec les enzymes <i>HaeIII</i> et <i>MspI</i> de l'IGS des extraits d'ADNr des broyats de nodosités de plants d' <i>A. senegal</i> inoculés avec les sols de Linguère, Kaffrine et Koulor ; M=100pb. ....	33
Figure 9: Gel d'électrophorèse montrant les profils de restriction obtenus avec les enzymes <i>HaeIII</i> et <i>MspI</i> de l'IGS des extraits d'ADNr des broyats de nodosités de plants d' <i>A. senegal</i> inoculés avec les sols de Goudiri, Kidira et Kaffrine ; M=100pb.....	34
Figure 10: Gel d'électrophorèse montrant les profils de restriction obtenus avec les enzymes <i>HaeIII</i> et <i>MspI</i> de l'IGS des extraits d'ADNr des broyats de nodosités de plants d' <i>A. senegal</i> inoculés avec les sols de Louga, Linguère ; M=100pb.....	35

Figure 11: Répartition des souches de rhizobium isolées de plants d'*A. senegal* dans la zone sylvopastorale, le sud bassin arachidier et le Sénégal oriental..... 36

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>SYNTHESE BILIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>3</b>
1. Symbiose fixatrice d'Azote Légumineuses-rhizobia .....	3
1.1. Généralités sur les Légumineuses .....	3
1.2. Les rhizobia .....	3
1.3. Etablissement de la symbiose .....	4
1.4. Fonctionnement de la symbiose fixatrice de N <sub>2</sub> .....	5
2. Contraintes environnementales sur la fixation biologique de l'azote .....	6
2. 1. Influence des caractéristiques du sol .....	6
2.1.1.Eau.....	6
2.1.2.Acidité .....	6
2.1.3.Salinité.....	7
2.1.4 Carence en nutriments .....	8
2.2.Influence des facteurs climatiques .....	9
2.2.1.Température et lumière .....	9
3. <i>Acacia senegal</i> .....	10
3.1.Caractéristiques botaniques.....	10
3.2.Taxonomie.....	12
3.3.Biogéographie et Ecologie .....	12
3.4.Ethnobotanique de l'arbre .....	13
3.4.1.Production de gomme arabique.....	13
3.4.2.Agroforesterie.....	14
3.4.3. Pharmacopée .....	15
4.Présentation de la zone d'étude .....	15
4.1.Zone sylvopastorale.....	16
4.2.Zone sud bassin arachidier .....	17
4.3.Zone du Sénégal oriental.....	17
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>19</b>
1.Matériel végétal .....	19
2.Sols .....	19
3.Test de germination .....	20
4.Piégeage des populations de rhizobia.....	21
5.Estimatiion du nombre le plus probable de rhizobia par MPN .....	22
6. Caractérisation moléculaire .....	22
6.1.Extraction de l'ADN .....	22
6.2.Analyse du polymorphisme de l'ADNr 16S-23S par PCR - RFLP .....	23
6.2.1.Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne(PCR) .....	23
6.2.2.Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP) .....	24
7.Isolement des souches de rhizobia .....	25
<b>RESULTATS .....</b>	<b>26</b>
1.Taux de germination des différentes provenances .....	26
2.Piégeage .....	26
2.1. Piégeage avec la provenance Vélingara .....	27
2.2.Piégeage avec la provenance Mbeuleukhé.....	28
2.3.Piégeage avec la provenance Louga.....	28
3.Évaluation du nombre de bactéries par gramme de sol par MPN .....	29
4.Caractérisation génétique des souches d' <i>A. senegal</i> .....	30

4. 1. Amplification .....	30
4.2.Analyse du polymorphisme des fragments de restriction .....	32
4.3.Répartition des groupes RFLP selon l'origine géographique des sols.....	35
5.Isolement des souches de rhizobia .....	37
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>44</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>53</b>

## INTRODUCTION

Les acacias gommiers sont des arbres caractéristiques du Sahel où ils jouent un rôle éminent sur le plan écologique et socio-économique. L'exsudat qu'ils produisent au niveau de blessures naturelles ou artificielles (gomme arabique au sens large) est exploité par l'homme depuis la plus haute Antiquité. Il est encore très recherché dans différents secteurs industriels, notamment alimentaire (CNUCED/GATT, 1978 ; Servant-Duvallet, 1994) et pharmaceutique (Vassal et Dione, 1993). Or, le Sahel est confronté depuis plus d'une trentaine d'années à une importante sécheresse (Richard, 1990 ; Rognon, 1991 ; Pontie et Gaud, 1992). Cette situation a eu pour conséquence majeure la dégradation des terres et l'accentuation de la désertification dans ces régions (Rapp, 1976). Elle a aussi comme conséquence une importante disparition des peuplements de gommiers notamment dans le Ferlo sénégalais (Coulibaly, 1989 ; Sina, 1989).

Ainsi, la production de gomme arabique a connu une nette régression ces dernières années. Au Sénégal, la production contrôlée est passée de 10872 tonnes en 1971 à environ 120 tonnes en 1997 (Direction des Eaux, Forêts, Chasse et de la Conservation des sols, 1997).

En raison des rôles sociaux et économiques importants des gommiers, l'amélioration de la production gommifère est alors devenue une préoccupation constante au Sahel. L'une des stratégies préconisées par différents organismes a été la protection et la restauration des peuplements de gommiers dans différents pays, et notamment au Sénégal.

Comme la plupart des légumineuses, les Acacias peuvent améliorer la fertilité des sols grâce à leur association avec des microorganismes symbiotiques (rhizobia et/ou champignons mycorhiziens). De plus, cette association symbiotique naturelle permet un meilleur développement de l'arbre en améliorant sa nutrition minérale notamment en azote et en phosphore (Badji *et al.*, 1988 ; Colonna *et al.*, 1991). De nombreux auteurs ont mis en évidence un effet stimulateur de l'inoculation avec des souches efficientes de *rhizobium* sur la croissance en pépinière de légumineuses (Badji *et al.*, 1988a ; Colonna *et al.*, 1991, Räsänen *et al.*, 2001).

Cependant, du fait de la dégradation des terres, ces microsymbiontes sont souvent absents ou inefficaces dans les sols d'introduction de la plupart de ces légumineuses ligneuses. C'est ainsi que pour une exploitation optimale des potentialités agronomiques et économiques de ces plantes, l'étude de la diversité de ces microsymbiontes en relation avec des facteurs environnementaux s'avère nécessaire. Notre étude s'inscrit dans le cadre du projet

ACACIAGUM S TREP N° 032233 « Innovative management of *Acacia senegal* trees to improve land productivity and gum-arabic production in Sub-Saharan Africa ».

L'objectif général de cette étude est de faire l'inventaire de la diversité naturelle des rhizobia associés à *A. senegal* en relation avec les conditions pédoclimatiques dans trois zones écogéographiques du Sénégal : zone sylvopastorale du Ferlo, zone sud bassin arachidier et zone Sénégal oriental. Il s'agit plus particulièrement (i) d'étudier la nodulation de différentes provenances associées à divers sols de trois zones écogéographiques, (ii) d'évaluer la densité de la population naturelle de rhizobia associées à *A. senegal* des sols des trois zones écogéographiques et (iii) de caractériser les souches de rhizobia associées à *A. senegal* par les outils de biologie moléculaire.

## **SYNTHESE BILIOGRAPHIQUE**

### **1. Symbiose fixatrice d'Azote Légumineuses-rhizobia**

#### **1.1. Généralités sur les Légumineuses**

Les Légumineuses comprennent approximativement 18000 espèces et 650 genres (Polhill et Raven, 1981). Selon Broughton (1983), elles forment l'une des plus grandes familles de plantes. Elles se divisent en trois sous familles : les Papilionacées ou Fabacées, les Mimosacées et les Césalpiniacées. La spécificité des Légumineuses réside dans leur capacité à former, pour la plupart, des nodosités en symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote (de Faria *et al.*, 1998 ; Dommergues *et al.*, 1999).

Sur la totalité des Légumineuses recensées, 20 % seulement ont été étudiées du point de vu de leur nodulation. Selon Dommergues *et al.* (1999), 97 % des espèces examinées chez les Fabacées, 90 % chez les Mimosacées (Acacia...) et 23 % chez les Césalpiniacées sont capables de noduler.

Les Légumineuses occupent une place importante dans la flore du Sénégal. Elles comptent 330 espèces recensées, réparties en 94 genres. Elles représentent 16 % des espèces et 11 % des genres de la végétation totale (Diédhiou, 1993). Chez les Légumineuses spontanées, les genres les plus représentés appartiennent à la Famille des Fabacées (77 %), puis les Mimosacées (11,70 %) et enfin les Césalpiniacées (11,30 %).

#### **1.2. Les rhizobia**

La famille des Rhizobiacées est constituée par un ensemble hétérogène de bactéries en bâtonnet gram-négatives aérobies, non sporulantes. Elles peuvent s'associer avec les racines et, parfois les tiges des Légumineuses pour y former des nodosités (Dommergues *et al.*, 1999). Ces rhizobia sont capables de fixer l'azote atmosphérique ( $N_2$ ). Bien que l'atmosphère en constitue une réserve inépuisable (78 à 79 %) ; l'azote est le deuxième facteur limitant de la croissance des plantes après l'eau. Les nodosités sont le siège d'une interaction symbiotique entre d'une part ; la bactérie, qui fixe l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) et le fournit à la plante hôte sous une forme assimilable ( $NH_3$ ) et d'autre part, la plante hôte qui procure à la bactérie un micro habitat exceptionnellement favorable et les substrats carbonés provenant de la photosynthèse (Dommergues *et al.*, 1999).

Ces micro-organismes sont actuellement regroupés en 63 espèces réparties en 12 genres distribués en 2 groupes (<http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/4>) :

Les Alpha protéobactéries : *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Devosia* (Nakagawa *et al.*, 1996), *Ensifer* (*Sinorhizobium*) (Casida, 1982), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Methylobacterium* (Patt *et al.*, 1976), *Ochrobactrum* (Holmes *et al.*, 1988), *Phyllobacterium* (Knösel, 1984) et *Rhizobium* (Frank, 1889);

Les Beta protéobactéries : *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1993), *Cupriavidus* (Makkar et Casida, 1987) et *Herbaspirillum* (Baldani *et al.*, 1986).

### **1.3. Etablissement de la symbiose**

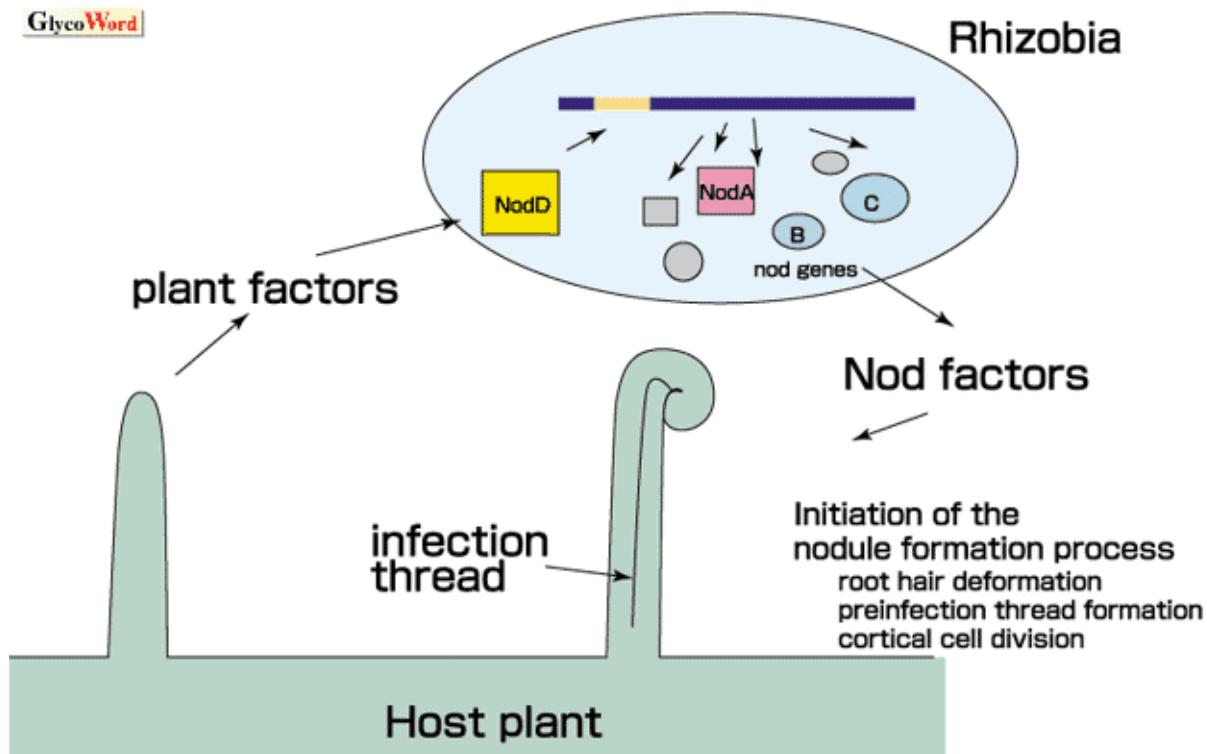
Les bactéries infectent les tiges et/ou les racines des plantes qui forment des nodosités puis s'associent à ces derniers. Dans la symbiose fixatrice d'azote, les gènes bactériens dits de nodulation, qui comprennent les gènes de structure et les gènes régulateurs, jouent un rôle central dans ce dialogue.

En présence de substances inductrices provenant des racines (flavonoïdes et bétaïnes), la bactérie est attirée par chimiotactisme et ses protéines régulatrices NodD sont activées et induisent l'expression des gènes de structure de la nodulation. La reconnaissance d'une protéine régulatrice NodD donnée par un spectre particulier d'inducteurs racinaires détermine un premier niveau de spécificité dans l'interaction symbiotique.

L'expression des gènes structuraux conduit à la production de signaux bactériens extracellulaires, appelés facteurs Nod, qui jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et l'organogenèse des nodosités. Les facteurs Nod induisent différentes réponses de la part de la racine comme les déformations des poils absorbants, la dépolarisation du potentiel de la membrane du poil absorbant et la formation du primordium nodulaire (Heidstra et Besseling, 1996). En définitive, le spectre d'hôte des rhizobia dépend dans une très large mesure de la structure des facteurs Nod.

De son côté, la plante répondrait aux signaux bactériens par l'intermédiaire de récepteurs des facteurs Nod spécifiques. Il y a là un troisième niveau de spécificité qui implique très précisément la plante. La spécificité ne dépendrait donc pas exclusivement de la structure des facteurs Nod, mais aussi des récepteurs végétaux. En d'autres termes, la spécificité serait aussi contrôlée par la plante. Ce rôle de la plante ne concerne pas seulement la spécificité de ses relations avec le rhizobium mais aussi les divers mécanismes d'infection et l'anatomie des

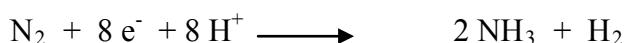
nodosités. Le rôle de la bactérie serait d'activer le programme génétique de la plante par la voie des signaux émis.



**Figure 1:** Dialogue moléculaire entre la bactérie et la plante avant la formation de la nodosité  
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/saccharide/SA-A02E.html>

#### 1.4. Fonctionnement de la symbiose fixatrice de N<sub>2</sub>

Le processus de fixation biologique de N<sub>2</sub> consiste en la réduction de l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) sous la forme ammoniacale, forme utilisable par la plante selon la réaction suivante :



La réaction de fixation de N<sub>2</sub> est catalysée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase. Cette nitrogénase est sensible à l'oxygène et la réaction est inhibée par l'azote minéral. De plus, elle a un coût énergétique élevé (Ganry et Dommergue, 1995). Le transport de l'oxygène et la protection de la nitrogénase contre l'oxygène sont assurés par la leghémoglobine chez les Légumineuses.

La plante fera usage de l'azote produit, et en retour fournit à la bactérie un micro habitat et les photosynthétats dont il a besoin. La quantité d'ammoniac produit chaque année à travers ce phénomène est supérieure à celle produite par l'ensemble de l'industrie des engrains chimiques (Boivin et Denarié, 1998).

## **2. Contraintes environnementales sur la fixation biologique de l'azote**

### **2. 1. Influence des caractéristiques du sol**

Certaines caractéristiques majeures du sol (sécheresse, acidité, salinité, ....) affectent la nodulation et la fixation d'azote des Légumineuses (Diem, 1993).

#### **2.1.1.Eau**

L'eau est le facteur limitant majeur de toutes les activités biologiques. La sécheresse est certainement la contrainte la plus dévastatrice pour la production végétale (Le Rudulier *et al.*, 1984). Toutefois, la présence de rhizobia dans les sols désertiques et la nodulation effective des légumineuses y vivant (Waldon *et al.*, 1989) montrent que les rhizobia peuvent survivre dans des sols avec un niveau d'humidité limité. Les bactéries libres sont capables de survivre en milieu sec ou à un potentiel hydrique très bas (Fuhrmann *et al.*, 1986). Des études ont montré que la sensibilité au stress hydrique change avec la souche de rhizobium (Orchard *et al.*, 1983). Les densités de population tendent à diminuer dans les conditions sèches et augmentent dès que le niveau hydrique est relevé (Tate, 1995).

#### **2.1.2.Acidité**

Par définition, tout sol dont le pH est inférieur à 7 est un sol acide, mais le sol commence à poser des problèmes seulement lorsque son pH est inférieur ou égal à 5, sauf s'il est très riche en matière organique (Dommergues *et al.*, 1999). En plus de la concentration élevée en ion H<sup>+</sup> (acidité proprement dite), les principaux problèmes posés par les sols acides sont :

- la faible teneur en nutriments, notamment en calcium ;
- les teneurs élevées en aluminium, manganèse ou fer échangeables, qui sont toxiques pour les plants ;
- l'insolubilisation du phosphore et/ou du molybdène ;

- le ralentissement de la vitesse de décomposition de la matière organique, d'où réduction de la disponibilité des substrats énergétiques (Evans et Szott, 1995).

La tolérance à l'acidité des bactéries serait liée à leur aptitude à réguler leur pH cytoplasmique. L'acidité du sol exerce probablement une pression de sélection sur les souches de rhizobia dans le sol. Toutefois, les souches isolées des sols acides ne sont pas nécessairement tolérantes à l'acidité ; car elles peuvent vivre dans des micro sites, où le pH leur est favorable (Graham, 1992). En général, les rhizobia à croissance rapide sont moins tolérants à l'acidité que les *Bradyrhizobium* (Dommergues *et al.*, 1999).

Les premières étapes de l'infection racinaire sont très sensibles à l'acidité. D'après Reddell (1995), la réduction de la nodulation qui se manifeste très nettement lorsque le pH du sol est inférieur à 5 pourrait avoir trois causes : faible teneur du sol en calcium, forte teneur en aluminium, teneur élevée en  $H^+$  et  $Mn^{2+}$ . D'après Richardson *et al.* (1988) une forte acidité du sol affecte l'activation des gènes nod bactériens par l'intermédiaire des flavones de la plante ; quelle que soit le niveau de tolérance du rhizobium à ce facteur.

### **2.1.3.Salinité**

Au moins, 7 % des terres émergées sont affectées par le sel (Dommergues *et al.*, 1999). La salinité a un effet délétère sur la croissance et la survie des populations bactériennes telluriques (Singleton *et al.*, 1982). En effet, Tu (1981) et Singleton (1983) ont observé, chez des cultivars de soja sensibles au sel que le processus d'établissement de la symbiose est très sensible au stress salin. L'initiation nodulaire est en outre extrêmement sensible au NaCl par réduction des sites d'infection de la racine, du nombre des poils radiculaires et de la proportion de ceux qui portent des codons d'infection (Zahran et Sprent, 1986). 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 (Csonka et Hanson, 1991 ; Zahran *et al.*, 1997). L'accumulation des osmolytes contrecarrerait l'effet de déshydratation, mais n'interfère pas avec la structure ou la fonction macromoléculaire (Smith *et al.*, 1994). Le tréhalose (disaccharide) joue également un rôle dans l'osmorégulation (Hoelzle et Streeter, 1990). Selon Breedveld *et al.* (1991), il s'accumule à des niveaux élevés dans les cellules de *R. leguminosarum* sous la pression osmotique induite par l'hyper salinité.

La croissance de nombreux rhizobia est inhibée par des concentrations de 100 mM NaCl. Cependant, certaines souches de Rhizobia (*Ensifer meliloti*, *E. fredii* et *R. tropici*) peuvent supporter plus de 300 mM. Quelques souches de rhizobia isolées d'*Acacia* peuvent tolérer jusqu'à 500 mM NaCl (Graham, 1992).

D'une manière générale, il n'y a pas de corrélation entre d'une part, la tolérance *in vitro* des rhizobia vis-à-vis de l'acidité ou de la salinité et d'autre part, l'amélioration de l'effectivité de la symbiose en présence de ces deux facteurs. De plus, beaucoup de souches de rhizobia peuvent supporter des valeurs bien supérieures à celles qui sont tolérées par leurs plantes hôtes. En effet, Soussi *et al.* (1999) ont montré que la plante est un facteur déterminant pour la tolérance de la symbiose au sel. Il semble que l'inhibition de la fixation biologique de l'azote dans des conditions salines devrait être attribuée plus à la plante hôte qu'au rhizobium. Par conséquent, pour obtenir une symbiose effective en milieu acide ou salé ; il est recommandé de sélectionner, en premier lieu, le cultivar ou le clone de la plante le plus résistant au facteur concerné puis l'on procédera à la sélection de la bactérie symbionte la plus effective sous l'effet du facteur à étudier (Zahran, 1991).

#### 2.1.4 Carence en nutriments

Après une infection réussie de la racine par le rhizobium, le développement de la nodosité et le fonctionnement de la nodosité sont souvent entravés par certains facteurs limitant en particulier les déficiences en divers éléments nutritifs indispensables (Diem, 1993). Dans les sols alcalins, les carences concernent essentiellement le fer et le zinc.

La carence en phosphore est très fréquente dans les sols tropicaux. Dans la solution du sol, la teneur en phosphore est comprise entre  $10^{-5}$  et  $10^{-7}$  M et dans la rhizosphère, elle peut tomber à  $10^{-8}$  M. La plupart des *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* exigent pour accroître des concentrations en phosphore d'au moins  $5.10^{-8}$  M. Certaines souches peuvent exiger plus de  $10^{-6}$  M. Subséquemment, il n'est pas exceptionnel qu'une carence en phosphore se manifeste dans la rhizosphère, surtout en milieu acide, où le phosphore en solution peut être précipité par l'aluminium (Dommergues *et al.*, 1999). Les souches sont différentes dans leur aptitude à stocker le phosphore. Une concentration minimale de phosphore est nécessaire pour que les facteurs Nod puissent se manifester. Ce seuil déterminé dans le cas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifoli* est de  $1-5.10^{-6}$  M (McKay et Djordjevic, 1993).

La carence en calcium est fréquente dans les sols acides, où elle affecte le processus d'infection en réduisant le nombre de bactéries symbiotiques dans la rhizosphère, en inhibant

leur attachement sur les racines et le développement des poils absorbants (Dommergues *et al.*, 1999). Toutefois, il est difficile de séparer les effets de la carence en calcium, des effets de l'acidité.

La carence en molybdène est fréquente dans de très nombreux sols tropicaux acides, où elle apparaît en même temps que la carence en phosphore. Comme le molybdène est un constituant de la nitrogénase et de la nitrate réductase, une carence en molybdène se traduit automatiquement par une carence en azote (Dommergues *et al.*, 1999). Les besoins en molybdène pour le fonctionnement de la nodosité de Légumineuse dépassent de beaucoup les besoins des autres processus impliqués dans la vie du végétal.

Le cobalt est absolument nécessaire pour la fixation de N<sub>2</sub> car il intervient dans la chaîne de transport des électrons chez les bactéries fixatrices de N<sub>2</sub>, dans la division cellulaire et la synthèse de l'ADN (Reddell, 1993).

Comme les déficiences en bore, manganèse et zinc, la déficience en fer apparaît en général dans des sols calcaires aussi bien sous les tropiques que dans des zones semi-arides et arides. Il est bien établi que la carence en fer inhibe l'initiation des nodosités et leur fonctionnement, mais les mécanismes impliqués sont peu connus (Dommergues *et al.*, 1999). Les besoins nutritionnels et les sources alimentaires préférées des rhizobia sont assez mal connus. Plusieurs auteurs pensent que la déficience de certains éléments nutritifs dont le fer peut être un facteur limitant de la croissance des bactéries telluriques. Les souches de rhizobia productrices de sidérophores ou celles possédant des protéines spécifiques pour capturer les complexes sidérophores-Fe en gendrés par les autres bactéries ont certainement une compétence saprophytique plus marquée que les autres souches démunies de ces propriétés (Reigh et O'Connell, 1993).

## **2.2.Influence des facteurs climatiques**

### **2.2.1.Température et lumière**

Dans les systèmes tropicaux ou subtropicaux, la température optimale est de l'ordre de 28 à 30°C. L'effet des températures plus élevées, dites supra optimales (> 40°C), sur les symbioses tropicales est encore mal connu. De telles températures inhiberaient la nodulation (Dommergues *et al.*, 1999). Il est aussi probable que les réponses à la température des différents systèmes fixateurs de N<sub>2</sub> varient considérablement suivant les souches bactériennes impliquées. Rice et Olsen (1988) ont constaté que la compétitivité des rhizobia était très

dépendante de la variation de la température dans la rhizosphère. Pour Trinick *et al.* (1983), les souches à croissance rapide sont meilleures compétitrices que celles à croissance lente aux températures modérées (25 °C) ; alors que le cas inverse se produit aux températures les plus élevées (30° C). Lorsque les températures sont élevées en surface, la nodulation à tendance à être localisée dans les horizons plus profonds (Graham, 1992).

Les arbres fixateurs d'azote (AFN) sont, en général des espèces de grande lumière (héliophiles) ; ce qui leur permet, grâce à une photosynthèse active, de satisfaire les besoins énergétiques importants du processus de la fixation de N<sub>2</sub> (Swensen, 1996). Malgré son importance, l'effet de la lumière sur la symbiose fixatrice d'azote chez les AFN n'a pas fait l'objet d'investigations particulières (Dommergues *et al.*, 1999). Toutefois, les travaux de Miettinen (1991) ont démontré que la nodulation en serre de *Casuarina equisetifolia* inoculés croît d'abord rapidement, puis plus lentement, avec l'intensité lumineuse.

### **3. *Acacia senegal***

#### **3.1. Caractéristiques botaniques**

L'*Acacia senegal* (L) Willd. (*Acacia verek* Guill. et Perr) est un arbre de 2 à 6 m de hauteur, au port flabelliforme (Figure 1). L'écorce est grise à brun rougeâtre, rugueuse ou lisse, et peut se desquamer. Les jeunes rameaux sont glabres à densément pubescents. Ils portent des aiguillons disposés par trois à l'insertion des feuilles et dont l'un, médian, est orienté vers le bas. Les aiguillons latéraux sont parfois absents. Les feuilles sont petites, vertes gris, bipennées, alternes et portent généralement 2 à 6 paires de pennes ; elles-mêmes composées de 7 à 25 paires de foliolules. Le pétiole porte souvent des glandes. Les inflorescences pédonculées très odorantes, de couleur blanche sont sur des épis de 3 à 8 cm, insérées par 2 ou 3, ou isolées à l'aisselle des feuilles (Figure 2). Les fleurs blanchâtres ou de couleur crème sont groupées en longs épis (jaunâtres) de 2 à 10 cm de long. Elles apparaissent en saison des pluies. Les fruits sont des gousses de 7 à 10 cm de long et larges de 2 cm. Ils sont aplatis, finement pubescents et de couleur grisâtre. La plupart du temps, elles se rétrécissent en pointes aux deux bouts et sont déhiscentes. Ils contiennent 3 à 6 graines aplatis, rondes, brun clair.



**Figure 2:** Plant d'*Acacia senegal*



**Figure 3:** Fleurs et gousse d'*A. senegal*

[pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de](http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de)

### **3.2.Taxonomie**

*A. senegal* (L.) Willd. est un arbre de la famille des *Leguminosae*. Il appartient à la sous Famille des *Mimosoïdeae* qui est constituée de trois tribus : les *Acacieae* (1200 espèces dans les régions tropicales et subtropicales), groupe le plus large ; les *Mimoseae* (400 à 500 espèces) et les *Ingeae* (350 à 400 espèces). Le Genre *Acacia* (Brenneau et Exelle, 1957) compte douze espèces selon Vassal (1998).

Les Acacias peuvent être regroupés en deux séries (Bentham, 1842) :

- Les Vulgares qui sont des arbres, arbustes ou lianes sans épines stipulaires à aiguillon éparses ou infra stipulaires, dans laquelle se retrouve *A. senegal*.
- Les gummifères qui comprennent des arbres et arbustes non lianescents et à épinettes stipulaires plus ou moins développées, dépourvus d'aiguillons.

Selon Brenan (1983), l'espèce *A. senegal* comprend 4 variétés : *senegal*, *kerensis* Schweinf, *rostrata* Brenan et *leiorachis* Brenan. La variété *senegal* est la plus représentée, particulièrement en Afrique.

### **3.3.Biogéographie et Ecologie**

*A. senegal* a une aire géographique située dans les sous-zones sahéliennes et soudano-sahéliennes. L'espèce est largement répandue en Afrique, du Sénégal à la mer Rouge, plus spécialement à travers le Sahel. Elle se rencontre aussi en Asie (Pakistan, Inde). Au Sénégal, elle pousse dans les sols légers sahéliens (Saint Louis, Dagana, Podor et au nord de Linguère). Ce gommier se retrouve exceptionnellement dans les sables littoraux des îles du Saloum et de la Casamance, le long du Saloum et au Sénégal oriental, dans le parc de Niokolo-Koba.

Sur le plan écologique, cette espèce affectionne les sols sableux et plus spécialement les sols brun rouge subarides ou parfois ferrugineux tropicaux (Martin, 1984 ; Nongonierma, 1990). Elle se retrouve souvent sur des dunes anciennes. Elle tolère aussi des sols argilo-sableux, plus rarement des sols squelettiques. Les sols préférentiels sont sableux et profonds. Les sols argileux sont généralement tolérés sous de plus fortes pluviométries.

*A. senegal* est très résistant à la sécheresse. Elle supporte des températures diurnes très élevées (49°C) mais pas le gel (Von Mayddell, 1990). Les températures moyennes mensuelles varient entre 20°C (pour le mois le plus froid) et 35°C (pour le mois le plus chaud). Elle apparaît donc comme une espèce à large amplitude écologique.

L'espèce est distribuée, au Sahel, entre les isohyètes 200-600 mm dans une zone marquée, en moyenne, par 9 à 11 mois de sécheresse. Elle trouve ses conditions optimales de développement dans des conditions moyennement humides (450 mm) qui lui permettent surtout de survivre aux sécheresses prolongées.

### **3.4.Ethnobotanique de l'arbre**

#### **3.4.1.Production de gomme arabique**

La gomme arabique est un exsudat naturel produit par différentes espèces d'acacias, apparaissant au niveau des troncs et des branches (Figure 4). *A. senegal* fournit à elle seule 90 % de la gomme arabique mondiale et surpassé toutes les autres gommes en qualité. C'est la seule gomme d'*Acacia* alimentaire, car elle ne contient aucun produit toxique (Von Maydell, 1983). La gomme arabique a été déjà exploitée au Néolithique. Dans l'Antiquité, elle servait à réaliser les bandelettes des momies et qu'elle était utilisée comme ingrédient alimentaire, produit anti-inflammatoire, diurétique... La gomme arabique est constituée d'une substance polysaccharidique (sucre complexe magnésium), ainsi que des traces de tanins et des enzymes (Kerharo, 1974). Les nombreuses applications de la gomme arabique sont liées au pouvoir émulsifiant, stabilisant et épaisseur de ce produit.

Dans le domaine alimentaire, environ 80 % de la gomme arabique vendue dans le commerce passe dans les aliments. Elle est surtout utilisée en confiserie et pour la fabrication de boissons aromatiques (CNUCED/GATT, 1978 ; Servant-Duvallet *et al.*, 1994). Elle est aussi utilisée en quantité très importante dans l'industrie pharmaceutique, en diététique contre l'obésité. Elle est aussi utilisée en imprimerie (colles et plaques offset) et en pyrotechnie.

Elle est l'espèce gommifère du Sahel par excellence. Au Sénégal, il a constitué « le palladium de l'industrie et du commerce » avant d'être supplanté par la culture de l'arachide. La valeur des récoltes a atteint 676 millions de francs en 1975 et 21 millions en 1978 (Rapport DEFCCS, 1978). L'essentiel de la production vient des régions de Louga (Département de Linguère) et de Saint-Louis. Les fluctuations de la production (1990 et 1993) sont généralement engendrées par les feux de brousse et la surexploitation de certains sujets. Les quantités de gomme arabique commercialisées ont connu une chute de 82 % entre 1990 et 2003 soit une baisse de 559 tonnes en 10 ans. Toutefois, ces chiffres officiels sont inférieurs à la production réelle. L'usage domestique (environ 500 tonnes/an), l'industrie alimentaire et pharmaceutique locale (150 à 200 tonnes) échappent souvent aux circuits officiels.



**Figure 4:**Gomme arabique sur un plant d'*A. senegal*

**Tableau 1:** Evolution de la production annuelle de gomme arabique au Sénégal (en kg) de 1990 à 2007 (DEFCCS,1990, 1991, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004).

Années	1990	1991	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Production	340144	208672	89724	645020	484045	254553	119536	111703	75995	128225

2001	2002	2003	2004
166927	52365	60477	86194

### 3.4.2.Agroforesterie

*A. senegal* a une importance économique à d'autres niveaux. Elle est en effet source de bois d'œuvre ou de feu ainsi que de fourrage aérien, notamment en saison sèche. Au Sénégal, le bois lourd de *A. senegal* est préféré comme combustible (bois de feu ou charbon de bois). Les feuilles et les gousses sont riches en protéines digestives disponibles en début de la saison sèche pour les chameaux, les moutons, les chèvres et animaux sauvages dans toutes les

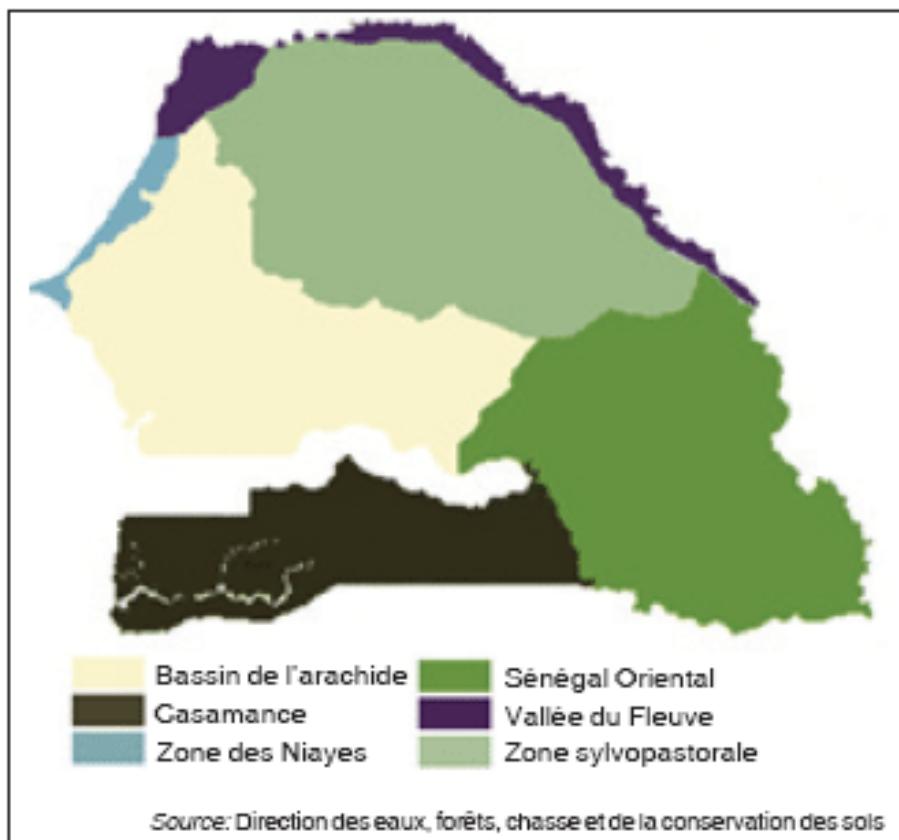
régions où l'on trouve cet arbre. *A. senegal* sert également pour tous projets de revégétalisation et pour la fixation des dunes. Il a une remarquable aptitude à fixer et à enrichir le sol en azote du fait de leur association symbiotique avec des rhizobiums et de la grande extension de leur système racinaire (Vassal, 1985 ; Dione, 1986b).

### **3.4.3. Pharmacopée**

La gomme arabique est relativement utilisée en pharmacopée populaire. On le prescrit comme adoucissant dans le traitement des maux de poitrine et est utilisée contre les inflammations locales et contre la lèpre noduleuse (Berhaut, 1975). La décoction d'écorce ou la poudre de gomme diluée dans l'eau se prend contre les maux de ventre et dans le cas de la colique aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire (Kerharo, 1974). Des propriétés empiriquement reconnues démontrent que la gomme peut servir d'anti-diarrhéique, de hémostatique, de cicatrisant et de diurétique.

## **4. Présentation de la zone d'étude**

Le Sénégal est situé entre 12° 30 N et 16°30 N de latitude et entre 11° 30 W et 17° 30 W de longitude. Le climat, de type sahélien en général, est caractérisé par une saison des pluies d'une durée variable du nord au sud (3 à 4 mois) selon la latitude et une saison sèche le reste de l'année (novembre à juin). Le pays est subdivisé en six grandes zones écogéographiques sur la base des caractéristiques climatiques, édaphiques et floristiques, relativement homogènes du point de vue des potentialités de leur système de production (figure 5) et des problèmes liés à la gestion des ressources naturelles. Les systèmes nord sahéliens à pastoralisme dominant correspondent à la zone fleuve et à la zone sylvopastorale du Ferlo.



**Figure 5:** Carte écogéographique du Sénégal

Les systèmes agro-pastoraux sahéliens sont subdivisés en systèmes agro-pastoraux sahéliens à agriculture sèche (Niayes et centre nord bassin arachidier) et les systèmes agro-pastoraux à agriculture humide (sud bassin arachidier). Les systèmes agro-pastoraux soudaniens ou les arbres et les arbustes sont présents en même temps que les graminées (zone Sénégal Oriental, zone sud). Les températures sont en permanence assez élevées et suivent le rythme des saisons. Sur l'ensemble du pays, l'aridité s'est renforcée ces trente dernières années.

Notre étude a été effectuée dans des plantations d'*A. senegal* situées en zone sylvopastorale (Louga, Kamb et Linguère); dans le sud bassin arachidier (Kaffrine) et dans le Sénégal oriental (Koulor, Goudiri et Kidira).

#### 4.1.Zone sylvopastorale

Cette zone couvre essentiellement la région administrative de Louga, excepté le département de Kébémer. C'est une zone au nord du pays caractérisée par la faiblesse et l'irrégularité des

pluies (200 à 400 mm par an). Elle se subdivise en deux parties relativement distinctes: une partie nord-ouest (Ferlo sableux) caractérisée par des sols brun rouge et des sols ferrugineux et une partie sud-est (Ferlo latéritique) où les dépôts sableux disparaissent au profit des sols gravillonnaires avec, par endroit, des affleurements latéritiques.

Les températures atteignent 41°C dans cette région qui est considérée comme la plus aride et la plus chaude.

Cette zone est un vaste secteur de parcours des animaux essentiellement vouée à l'élevage. L'action du bétail et du pasteur sur la végétation a une répercussion importante sur la couverture végétale de la zone. Les arbustes indicateurs de dégradation comme *Calotropis procera* se multiplient de façon rapide à proximité des forages et dans les dépressions, tandis que les formations d'*A. senegal* subissent de fortes mortalités. Les causes directes de la dégradation de ce potentiel ligneux sont les surcharges animales, l'émondage abusif par les éleveurs, les feux de brousses et la surexploitation.

#### **4.2.Zone sud bassin arachidier**

Elle couvre les régions administratives de Fatick et Kaolack. La pluviométrie moyenne est comprise entre 500 et 800 mm par an.

La zone est caractérisée par la forte extension du front agricole au détriment des réserves sylvo-pastorales. Elle est également marquée par l'appauprissement continual des sols et la salinisation des terres de sa frange côtière. Ces sols sont de type ferrugineux tropicaux lessivés avec une texture sableuse. Ils ont peu évolué, d'origine non climatique, gravillonnaires sur cuirasse latéritique.

Dans cette zone, les températures maximales avoisinent 38°C en fin de saison sèche (mai-juin).

#### **4.3.Zone du Sénégal oriental**

Constituée par la région administrative de Tambacounda, elle se caractérise par une végétation de type soudano-sahélien et des sols peu profonds sur cuirasse latéritique. Le climat soudanien sur les deux tiers de la zone, devient soudano-guinéen dans le tiers sud. Cette zone bénéficie d'une pluviométrie qui varie de 600 à 1000 mm, exceptée la partie septentrionale.

C'est une zone d'élevage et d'agriculture, mais c'est aussi la principale région d'exploitation forestière ; fournissant la majeure partie du combustible ligneux consommé par les agglomérations urbaines de l'Ouest du pays. L'exploitation forestière, les défrichements, les feux de brousse et les pratiques pastorales destructrices ont entraîné une dégradation accélérée de la végétation et des sols ; notamment le long des voies de communications et des vallées. Cette dégradation se manifeste par une progression des espèces arbustives au détriment des grands ligneux.

Les sols sont hydromorphes, ferrugineux tropicaux à concrétion ferrugineuse. Les températures sont supérieures à 40°C en mai.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Matériel végétal

Au cours de notre expérimentation, 7 provenances d'*A. senegal* ont été testées : Vélingara Ferlo I, Vélingara Ferlo II, Mbeuleukhé, Louga, Diaménar, Daga Diouf et Kidira. Les différentes provenances sont représentées dans le tableau suivant.

**Tableau 2:** Semences d'*A. senegal* récoltées dans différentes zones du Sénégal à différentes périodes.

Provenance	Lots de semence	Zone de récolte	Année de récolte
Vélingara Ferlo I	PRONASEF, n°SN/99/0280/D	sylvopastorale	1999
Vélingara Ferlo II	PRONASEF, n°SN/2006/0027/D	sylvopastorale	2006
Mbeuleukhé	PRONASEF, n°SN/2006/0009/D	sylvopastorale	2006
Louga	PRONASEF, n°SN/2006/0023/D	sylvopastorale	2006
Diéménar	ISRA/DRPF, n°98/6246	Vallée du fleuve Sénégal	1998
Daga Diouf	PRONASEF, n°SN/99/0330/D	Bassin arachidier	1999
Kidira	ISRA/DRPF, n°94/4482	Sénégal oriental	1994

### 2. Sols

Les sites de prélèvement sont des plantations d'*A. senegal* situées dans trois zones écogéographiques du Sénégal à luviométrie contrastée. Les sites géoréférencés sont représentés dans le tableau 3. La zone sylvopastorale au nord du Sénégal où se retrouvent les plantations de Louga, Kamb et Linguère. Cette zone se situe entre les isohyètes 200 mm et 400 mm. La zone du sud Bassin arachidier se trouve entre les isohyètes 600 mm et 800 mm tandis que celle du Sénégal Oriental est entre les isohyètes 600 mm et 1000 mm. Il s'agit de la plantation de Kaffrine au sud du bassin arachidier, au centre ouest du Sénégal et des plantations de Koulor, Goudiri, Kidira au Sénégal oriental. Des prélèvements de sol ont été effectués dans chaque plantation des sites précités. Ils ont été réalisés au niveau de la rhizosphère de trois arbres pris au hasard à l'horizon 0-0,25 m.

**Tableau 3:** Différents sols prélevés dans des localités de la zone sylvopastorale, du sud Bassin arachidier et du Sénégal oriental.

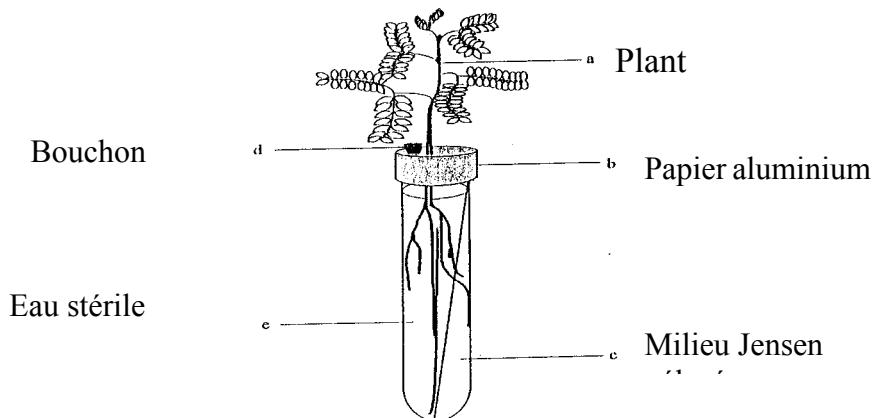
Sols	Zone de prélèvement	Coordonnées GPS
Louga	sylvopastorale	15° 36
		16° 15
Kamb	sylvopastorale	15° 19
		15° 30
Linguère	sylvopastorale	15° 23
		15° 06
Kaffrine	sud Bassin arachidier	04 52 07 2
		15 59 54 8
Koulor	Sénégal oriental	06 71 53 4
		15 45 30 3
Goudiri	Sénégal oriental	07 41 18 1
		15 68 75 8
Kidira	Sénégal oriental	07 98 58 7
		15 99 06 0
<b>3.Test</b>		<b>de</b>
<b>germination</b>		

A l'effet de lever l'inhibition tégumentaire, d'aseptiser les graines mais aussi de permettre une germination homogène ; les graines d'*A. senegal* ont été scarifiées à l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) concentré pendant 14 min. Après plusieurs rinçages avec de l'eau distillée stérile,

elles ont ensuite été placées dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée stérile (0,9 % ; p/v). Les boîtes scellées au parafilm ont par la suite été placées à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

#### 4.Piégeage des populations de rhizobia

Le piégeage a consisté à cultiver les plantes dans des tubes Gibson (Gibson *et al.*, 1963) et à les inoculer avec des suspensions de sol prélevé au niveau de la rhizosphère des arbres d'*A. senegal*. Le piégeage a été effectué avec de graines des provenances Mbeuleukhé, Vélingara et Louga. Ces provenances avaient le meilleur taux de germination.



**Figure 6:** Plant d'*A. senegal* en tube Gibson.



**Figure 7:** Plants d'*A. senegal* en tubes Gibson dans des portoirs en chambre de culture.

Les plants ont été ensuite maintenus en chambre de culture pendant 1 mois avec une photopériode de 16 h (jour) et 8 h (nuit), une température de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  (jour) et  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  (nuit), une humidité relative de  $70 \pm 5\%$  et un rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) de  $120 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ . Une semaine après repiquage, qui correspond à l'apparition des poils absorbants, les plants ont été inoculés avec une suspension de sol (1/10 ; p/v). Pour ce faire, 10 g de chaque sol ont été suspendus dans 90 ml d'eau physiologique stérile ( $\text{NaCl} : 8,77 \text{ g/l}$  ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 : 0,27 \text{ g/l}$  ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O} : 0,71 \text{ g/l}$  ou  $\text{Na}_2\text{HPO} : 0,568 \text{ g/l}$ ). Le mélange obtenu a été agité pendant une demi-heure et pour chaque sol associé à une provenance donnée, 6 répétitions ont été réalisées à raison de 1 ml par plant et 4 plants témoins non inoculés. Enfin, la nodulation a été évaluée et les nodosités récoltées au bout de 4 semaines ont été dénombrées.

## 5. Estimation du nombre le plus probable de rhizobia par MPN

La méthode Most Probable Number (MPN), décrite par Brockwell (1980), a été utilisée pour réaliser le dénombrement, dans chaque échantillon de sol, des bactéries capables de noduler les plants d'*A. senegal*.

Les plants ont été maintenus en chambre de culture pendant 1 mois dans les conditions décrites plus haut.

L'expérience précédente a montré que la provenance Mbeuleukhé présente une bonne nodulation. De plus, la nodulation est plus précoce pour les plants de cette provenance. Ainsi la provenance Mbeuleukhé a servi pour cette expérience.

## 6. Caractérisation moléculaire

### 6.1. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de nodosités d'*A. senegal* issues des tests de piégeage. Les nodosités obtenues ont été aseptisées à l'hypochlorite de calcium saturé ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) et de l'alcool absolu. Elles ont ensuite été rincées abondamment à l'eau déminéralisée. Pour chaque sol associé à une provenance, deux plants ont été retenus. Pour chaque plant 3 nodosités ont été choisies au hasard, soit au total 6 nodosités par sol associé à une provenance.

Chaque nodosité a été écrasée avec un poter en plastique dans un tube Eppendorf contenant 100 µl d'eau ultra pure stérile. En vue de l'extraction d'ADN, 50 µl du contenu ont été prélevés et les 50 µl restant ont servi pour l'isolement des souches.

Pour chaque tube Eppendorf, dans les 50 µl de broyat réservé à l'extraction, 50 µl de TES/saccharose 2X, puis 10µl de lysozyme (20 mg/ml) ont été rajoutés. Le contenu a été homogénéisé et mélangé pendant 20 s ensuite incubé à 37°C pendant 15 min. Après avoir ajouté 250 µl de GES (Guanidine Thiocyanate, EDTA, Sarcosine) dans le mélange. L'ensemble a été homogénéisé pendant 20s puis incubé à 65°C pendant 15 min. Le mélange a été centrifugé à 15 000 rpm à 4°C pendant 15 min. L'ADN a été précipité à partir du surnageant avec 180 µl d'éthanol absolu préalablement refroidi. Le contenu du tube a été mélangé par de légers retournements ; puis laissé reposé 3 min sur la paillasse. Le précipité a été centrifugé à 15 000 rpm à 4°C, pendant 15 min. Le surnageant a été versé et le culot contenant l'ADN a été gardé. L'ADN a été lavé deux fois avec 500 µl d'éthanol absolu refroidi. Le précipité a été centrifugé à 15 000 rpm à 4°C pendant 15 min. L'ADN a été séché pendant quelques minutes en laissant les tubes ouverts sur la paillasse. L'extrait d'ADN a été dissout dans un volume de NaOH 8 mM stérile permettant la dissolution complète (50 à 200 µl). Le pH de l'extrait d'ADN a été ajusté à 7,5 avec 8 µl de tampon HEPES 0,1 M (par 50 µl de l'extrait). La pureté et la quantité de l'ADN extrait ont été estimées par spectrophotométrie à des longueurs d'onde variant entre 200 nm et 340 nm, puis contrôlées sur gel d'agarose à 1% (p/v). L'ADN a été dilué, au besoin, avant la PCR avec de l'eau ultra-pure stérile.

## **6.2.Analyse du polymorphisme de l'ADNr 16S-23S par PCR - RFLP**

La région inter génique (IGS) de l'ADNr, située entre les gènes codant pour les ARN ribosomaux 16S et 23S, est très variable..

### **6.2.1.Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne(PCR)**

L'ADNr 16S-23S a été amplifié par PCR avec les amores FGPS1490-72 ; 5'-TGC GGCTGGATCCCCTCCTT-3' (Normand *et al.*, 1996) et FGPL 132'-38 ; 5'-CCGGGTTTCCCATT CGG-3' (Ponsonnet et Nesme, 1994). La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume total de 25 µl. Pour chaque réaction, le milieu réactionnel contient 2,5 µl de chaque amorce et 3 µl d'ADN. La Taq polymérase (1 unité) ainsi que les dNTPs

(200 $\mu$ M de chaque dNTP), le MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) et le tampon (10 mM Tris-HCl pH 9) et 50 mM KCl étaient déjà présents sous forme de billes lyophilisées ( Ready-To-Go™ PCR beads, Pharmacia Biotech). Un témoin négatif sans ADN a été introduit dans l'expérience. Les produits ont été amplifiés grâce à un thermocycleur Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Le programme d'amplification comprend une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min suivie de 25 cycles de dénaturation (94°C, 1 min), d'hybridation (60°C, 30s), de polymérisation (72°C, 1 min 30s) et une extension finale (72°C, 7 min).

Après la PCR, 3  $\mu$ l de chaque amplifiat ont été prélevés et additionnés à 3  $\mu$ l de bleu de charge [bleu de bromophénol 0,25 % (v/v), glycérol 30 % (v/v), EDTA 10mM, pH 8,0]. Le mélange a été déposé dans des puits d'un gel horizontal d'agarose (Sigma, La Verpillière, France) à 1 % (p/v) et coloré au bromure d'éthidium à 0,5  $\mu$ g/ml. La migration du gel s'est faite dans une cuve d'électrophorèse (Easy Cast, modèle B<sub>2</sub>) contenant du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X (89 mM Tris-Borate-Acetate, 2 mM EDTA, pH 8,3), sous une tension de 100 V et une intensité de 35 mA pendant 15 à 20 min. Le marqueur moléculaire de taille de bande de 1 kb (Pharmacia Biotech) a permis à la fois de vérifier la taille du fragment amplifié et de déterminer sa concentration. Le gel a été photographié sous UV avec le logiciel Gel Doc (Bio-Rad) après 15 à 20 min de migration à 100 V/cm dans une cuve horizontale contenant du tampon TBE 1X.

### **6.2.2.Analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP)**

La technique RFLP consiste à couper l'ADN amplifié par une endonucléase de restriction. En ce qui concerne notre étude, les enzymes *Msp* I (5'-C/CGG-3') et *Hae* III ( 5'-GG/CC-3') ont été utilisées à raison de 5U par réaction. Une aliquote de chaque produit PCR amplifié a été digérée avec les endonucléases de restriction à 37°C pendant au moins 2 h. Les fragments d'ADN digérés ont été séparés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose 2,5 % (p/v) Metaphor® (FMC Bioproduct, Rocland, Maine dans un tampon TBE. L'électrophorèse a été réalisée sous une tension de 2,5 V/cm pendant 3 h dans des cuves (Electrophoretic Gel System-Maxicell EC360 M, E-C Apparatus Corporation). Après migration les gels ont été colorés comme décrit précédemment. Les profils de restriction des deux enzymes ont été comparés par paire pour tous les extraits d'ADN.

## **7.Isolement des souches de rhizobia**

Elle a été réalisée sur les broyats de nodosités dont les extraits d'ADN ont été amplifiés et digérés avec les endonucléases de restriction citées plus haut. Les 50 µl réservés après broyage de chaque nodosité ont servi à cet effet. A partir de chaque tube, quelques gouttes du broyat ont été prélevées puis étalées sur boîte de Petri contenant du milieu YMA (Vincent, 1970). Des repiquages successifs ont été réalisés jusqu'à l'obtention de colonies pures. Les cultures pures ont été stockées à -80°C dans du milieu YMA contenant du glycérol 20 % (v/v).

## RESULTATS

### 1.Taux de germination des différentes provenances

Le taux de germination de sept provenances *d'A. senegal* de la zone sylvopastorale, du bassin arachidier et du Sénégal oriental sont représentés dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Taux de germination des graines d'*A. senegal* provenant de Vélingara I, Diaménar, Daga Diouf, Kidira, Mbeuleukhé, Vélingara II et Louga.

Provenances	Vel I	Diam	Daga	Kid	Mbeul	Vel II	Loug
Taux de Germ	61	38	10	0	95	98	92
(%)							

Vell ,Vélingara Ferlo I; D aga: Daga Diouf; VelII : Vélingara Ferlo II ; Kid: Kidira; Mbel: Mbeuleukhé; Loug: Louga; Diam: Diaménar.

Les graines de la provenance Kidira récoltées en 1994 ne germent pas. Par contre, pour les graines des provenances Vélingara Ferlo II, Mbeuleukhé et Louga récoltées en 2006, le taux de germination est supérieur à 90 %. Ce taux est plus faible pour les provenances Daga Diouf (10 %), Diaménar (38 %) et Vélingara Ferlo I (61 %) dont l'âge varie de 13 et 8 ans. Ces résultats révèlent que le taux de germination est inversement proportionnel à l'âge des graines. En effet, comme le démontre le taux de germination des graines de la provenance Vélingara Ferlo de 1999 (61 %) et 2006 (98 %), la graine perd sa faculté de germer avec le temps.

### 2.Piégeage

Le piégeage a été effectué avec une dilution au 1/10. Il a été réalisé avec les sols de la zone sylvopastorale (Louga, Kamb, Linguère), du sud du bassin arachidier (Kaffrine) et du Sénégal oriental (Koulor, Goudiri et Kidira). Les provenances de Vélingara II, Mbeuleukhé et Louga qui ont montré un meilleur taux de germination ont été utilisées. L'inoculation a été effectuée ; une semaine après repiquage, à raison de 6 répétitions par sol et par provenance.

## 2.1. Piégeage avec la provenance Vélingara

Le tableau 5 présente les résultats de la nodulation au laboratoire de plants d'*A. senegal* de la provenance Vélingara avec 7 échantillons de sols des trois zones écogéographiques : la zone sylvopastorale (Louga, Kamb et Linguère), du sud bassin arachidier (Kaffrine) et du Sénégal Oriental (Koulor, Goudiri et Kidira).

**Tableau 5:** Taux de nodulation et nombre moyen de nodosités formées au niveau des plants d'*A. senegal* de la provenance Vélingara associée aux sols de Louga, Kamb, Linguère, Kaffrine, Koulor, Goudiri et Kidira.

Sols	Louga	Kamb	Linguère	Kaffrine	Koulor	Goudiri	Kidira
Taux de Nod (%)	33	33	17	100	100	50	50
N.M.N	10±1	9±3	6	5±6	9±7	10±8	9±7

Taux de Nod : Taux de nodulation ; N.M.N : nombre moyen de nodosités par plant

Une nodulation a été notée sur tous les plants de la provenance Vélingara associée aux sols des trois zones écogéographiques. Cependant, le taux de nodulation des plants est variable suivant les sols. Alors que tous les plants testés avec les sols de Kaffrine et Koulor sont nodulés ; seule la moitié des plants inoculés avec les sols de Goudiri et Kidira ont formé des nodosités. Le plus faible taux de nodulation est noté sur les plants d'*A. senegal* associés au sol de la zone sylvopastorale. Ainsi, le taux de nodulation est de 33 % pour les plants inoculés avec les sols de Louga et Kamb. Alors qu'il n'est que 17 % pour ceux inoculés avec les sols de Linguère. Globalement, le taux de nodulation des plants inoculés avec les sols de la zone sylvopastorale est plus faible que celui obtenu avec ceux des deux autres zones écogéographiques. Toutefois, quelle que soit l'origine des sols, aucune différence significative n'a été notée entre le nombre moyen de nodosités formées. Cependant, il est à noter une importante variabilité du taux de nodulation entre individus.

## 2.2.Piégeage avec la provenance Mbeuleukhé

Les résultats de la nodulation au laboratoire des plants d'*A. senegal* avec la provenance Mbeuleukhé associée aux différents sols de la zone sylvopastorale, du sud bassin arachidier et du Sénégal oriental sont représentés dans le tableau 6.

**Tableau 6:** Taux de nodulation et nombre moyen de nodosités formées au niveau des plant d'*A. senegal* de la provenance Mbeuleukhé associée aux sols de Louga, Kamb, Linguère, Kaffrine, Koulor, Goudiri et Kidira.

Sols	Louga	Kamb	Linguère	Kaffrine	Koulor	Goudiri	kidira
Taux de Nod (%)	67	0	17	67	33	100	67
N.M.N	2±2	0	6	6±4	11±1	6±3	6±5

Taux de Nod: Taux de nodulation ; N.M.N : nombre moyen de nodosités par plant

A l’exception du sol de Kamb, une nodulation a été notée avec tous les autres sols. De même qu’avec la provenance Vélingara, le sol de Linguère présente le plus faible taux de nodulation (17 %). Le taux de nodulation des plants de la provenance Mbeuleukhé associés au sol de Louga est plus élevé que celui du sol de Koulor et égal à celui du sol de Kaffrine et de Kidira. Tous les plants inoculés avec le sol de Goudiri ont formé des nodosités avec la provenance Mbeuleukhé. Aussi bien pour la provenance Vélingara que pour la provenance Mbeuleukhé, le taux de nodulation est plus élevé pour les sols du sud bassin arachidier et du Sénégal Oriental que pour les sols de la zone sylvopastorale. Le nombre moyen de nodosités formé est plus élevé pour les sols du sud bassin arachidier et du Sénégal oriental avec la provenance Mbeuleukhé.

## 2.3.Piégeage avec la provenance Louga

Dans le tableau 7, les résultats de la nodulation au laboratoire de plants d'*A. senegal* de la provenance Louga associée aux sols de la zone sylvopastorale, du sud bassin arachidier et du Sénégal Oriental.

**Tableau 7:** Taux de nodulation et nombre moyen de nodosités formées au niveau des plants d'*A. senegal* de la provenance Louga associée aux sols de Louga, Kamb, Linguère, Kaffrine, Koulor, Goudiri et Kidira.

Sols	Louga	Kamb	Linguère	Kaffrine	Koulor	Goudiri	Kidira
Taux de Nod (%)	50	33	0	33	50	83	83
N.M.N	2±1	11±2	0	3±2	8±4	7±2	4±3

Taux de Nod : Taux de nodulation ; N.M.N : nombre moyen de nodosités

A l'exception des plants inoculés avec le sol de Louga (50 %), le taux de nodulation est faible pour les plants inoculés avec les sols de la zone sylvopastorale (Kamb, Linguère). Aucune nodulation n'a été notée sur les plants inoculés avec le sol de Linguère, 40 jours après inoculation. Le taux de nodulation le plus élevé est noté sur les plants inoculés avec les sols de Goudiri et Kidira.

Le taux de nodulation des plants varie avec l'origine des sols mais également avec la provenance des graines. Par ailleurs, le taux de nodulation des plants est plus élevé quand ils sont inoculés avec les sols du sud bassin arachidier et du Sénégal oriental.

### 3.Évaluation du nombre de bactéries par gramme de sol par MPN

Des dilutions ont été effectuées pour chacun des 7 sols. Les tests antérieurs sur le taux de nodulation ont montré une bonne nodulation avec la provenance Mbeuleukhé. De plus cette dernière présente une nodulation précoce. Ainsi, cette provenance a été servie pour les tests MPN. Des inoculations ont été réalisées sur des plants d'*A. senegal* de la provenance Mbeuleukhé à raison de 4 répétitions par dilution (Tableau 8). Le résultat des MPN est consigné dans le tableau suivant :

**Tableau 8:** Estimation du nombre moyen de bactéries par gramme de sol capable de former des nodosités sur les racines des plants d'*A. senegal* inoculés avec des sols de la zone sylvopastorale, du sud bassin arachidier et du Sénégal oriental.

Sols	Louga	Kamb	Linguère	Kaffrine	Koulor	Goudiri	Kidira
N rhiz/g sol	0	0	1,1. 10 <sup>4</sup>	2,3. 10 <sup>4</sup>	1. 10 <sup>4</sup>	32,8. 10 <sup>4</sup>	2,3. 10 <sup>4</sup>

Le nombre de bactéries par gramme de sol est plus important pour les sols du sud bassin arachidier et du Sénégal oriental que pour les sols de la zone sylvopastorale. Ce nombre est faible pour les sols de la zone sylvopastorale. Ainsi, le nombre de bactéries par gramme de sol est nul pour les sols de Louga et de Kamb. Le nombre de bactéries capable de noduler les plants d'*A. senegal* est globalement plus élevé pour les sols du Sénégal oriental.

#### **4. Caractérisation génétique des souches d'*A. senegal***

##### **4. 1. Amplification**

L'extraction de l'ADN a été effectuée sur un total de 74 broyats de nodosités de plants d'*A. senegal* des provenances de Vélingara, Mbeuleukhé et Louga, inoculés avec les sols des 3 zones écogéographiques. La pureté de l'ADN a été étudiée au spectrophotomètre. Les extraits d'ADN au nombre de 35 dont le rapport protéique est compris entre 1.5 et 2 ont été amplifiés par PCR (Polymérase Chain Reaction) et répartis en groupes IGS (Intergenic spacer) par la technique RFLP. Le tableau 6 récapitule les résultats des amplifications des groupes RFLP de souches de rhizobium issues de broyats de nodosités de plants d'*A. senegal*.

**Tableau 9:** Amplification par PCR/RFLP de l'IGS de l'ADNr des extraits d'ADN de broyats de nodosités obtenues par piégeage de plants d'*A. senegal*. Les plants des 3 provenances ont été inoculés 7 jours après germination avec 7 sols des 3 zones écogéographiques.

Sols	Provenances	Sol/Provenance	Amplifications	Groupe RFLP
Louga	Vélingara	Lo/V1	+	XIII
	Mbeuleukhé	Lo/Mb1	+	XIV
	Louga	Lo/Lo1	+	XIV
		Lo/lo2	+	XV
Kamb	Vélingara	Ka/V1	-	-
	Mbeuleukhé	Ka/Mb1	-	-
	Louga	Ka/Lo1	-	-
Linguère	Vélingara	Lin/V1	+	XVI
	Mbeuleukhé	Lin/Mb1	-	-
	Louga	Lin/Lo1	+	XI
Kaffrine	Vélingara	Kaf/V1	+	VI
		Kaf/V2	+	X
	Mbeuleukhé	Kaf/Mb1	-	-
	Louga	Kaf/Lo1	+	VI
		Kaf/Lo2	+	VIII
Koulor	Vélingara	Ko/V1	+	V
		Ko/V2	+	V
		Ko/V3	+	V
		Ko/V4	+	VI
		Ko/V5	+	VI
	Mbeuleukhé	Ko/Mb1	+	XII
	Louga	Ko/Lo1	+	III
Goudiri	Vélingara	Go/V1	+	VII
		Go/V2	+	IV
	Mbeuleukhé	Go/Mb1	+	I
		Go/Mb2	+	II
		Go/Mb3	+	II
		Go/Mb4	+	V
	Louga	Go/Lo1	-	-
Kidira	Vélingara	Kid/V1	+	III
	Mbeuleukhé	Kid/Mb1	+	I
		Kid/Mb2	+	IV
		Kid/Mb3	+	IV
		Kid/Mb4	+	IX
	Louga	Kid/Lo1	+	III
<b>Total</b>			<b>29</b>	

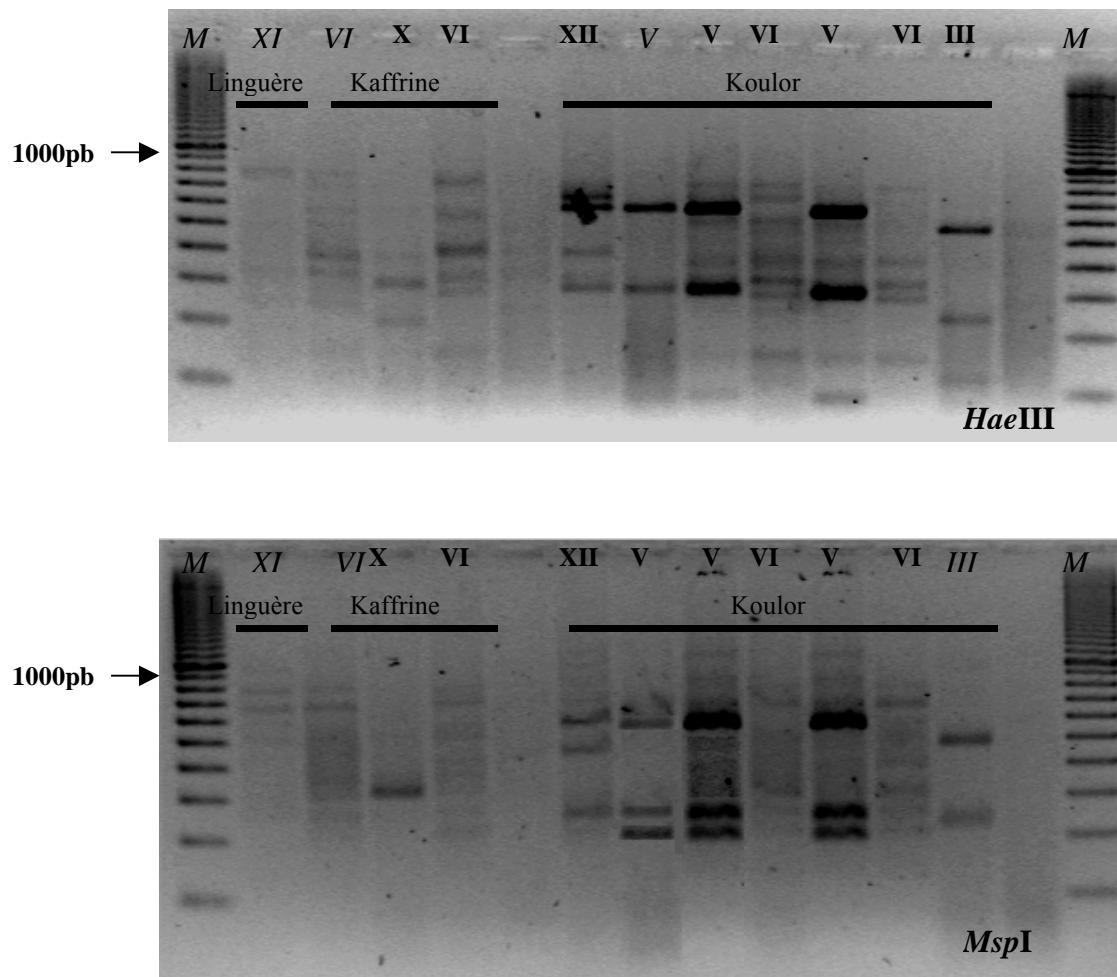
Plus de 80 % des extraits d'ADN de l'IGS de l'ADNr ont été amplifiés par PCR. Par contre, aucune amplification n'a pu être obtenue sur les extraits d'ADN de broyats de nodosités issues des plants inoculés avec le sol de Kamb. En considérant le rapport du nombre de profils

IGS sur le nombre de nodosités analysées par zone écogéographique, on constate que les sols du Sénégal oriental présentent le taux d'amplification de l'IGS de l'ADNr le plus élevé, 95 %. Le sol du sud du bassin arachidier affiche 80 % d'amplification de l'IGS de l'ADNr et enfin 60 % de L'IGS de l'ADNr des sols de la zone sylvopastorale a été amplifié.

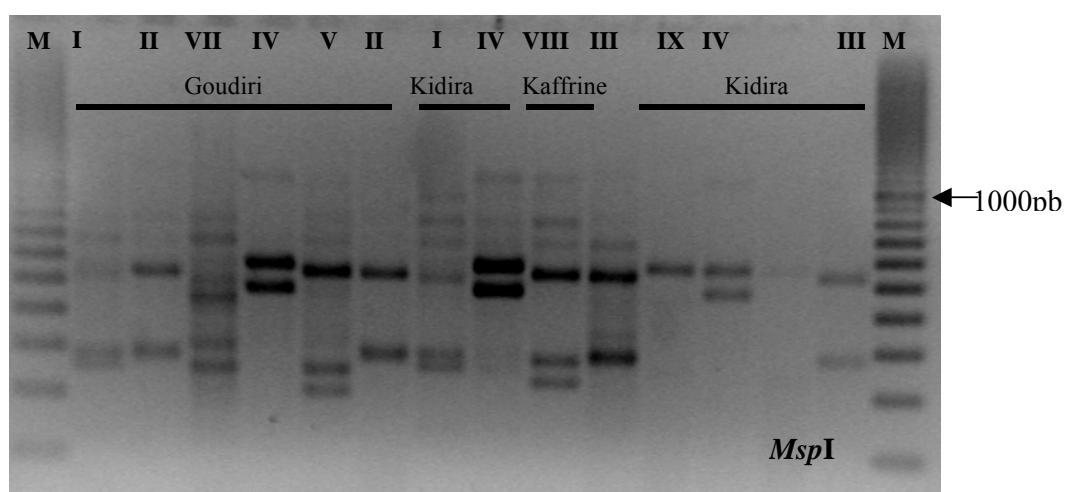
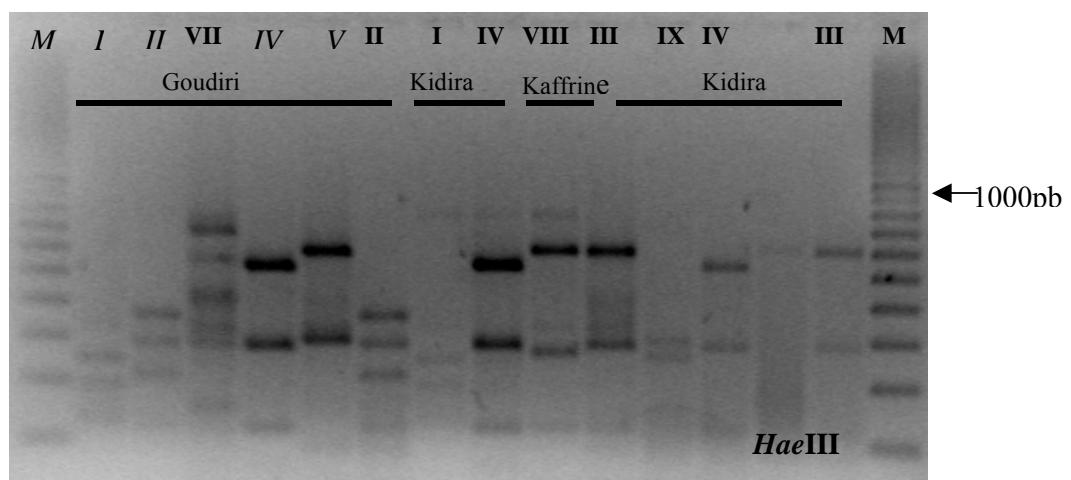
Le taux d'amplification de l'IGS de l'ADNr des extraits d'ADN de nodosités des plants d'*A. senegal* inoculés avec les sols du sud du bassin arachidier et du Sénégal Oriental est plus élevé que celui des sols de la zone sylvopastorale.

#### **4.2.Analyse du polymorphisme des fragments de restriction**

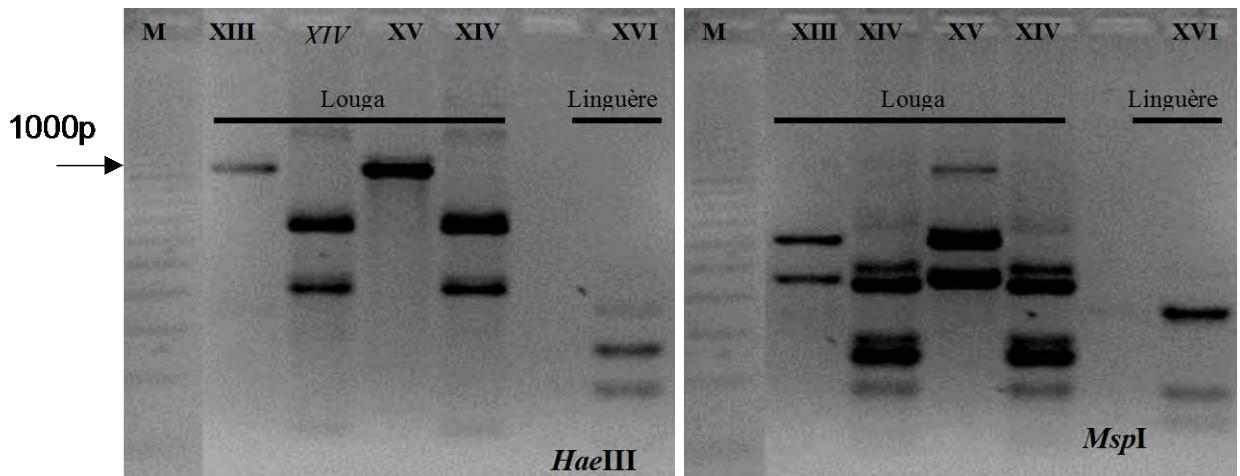
Les résultats de l'analyse du polymorphisme des fragments de restriction obtenus après la digestion avec les enzymes *HaeIII* et *MspI* de l'IGS de l'ADNr des souches de rhizobium isolées de plants d'*A. senegal* sont consignés sur les figures 7, 8 e t 9. Les groupes électrophorétiques sont regroupés sur la base de la ressemblance des profils électrophorétiques obtenus après digestion avec les enzymes *HaeIII* et *MspI*.



**Figure 8:** Gel d'électrophorèse montrant les profils de restriction obtenus avec les enzymes *Hae*III et *Msp*I de l'IGS des extraits d'ADNr des broyats de nodosités de plants d'*A. senegal* inoculés avec les sols de Linguère, Kaffrine et Koulor ; M=100pb.



**Figure 9:** Gel d'électrophorèse montrant les profils de restriction obtenus avec les enzymes *HaeIII* et *MspI* de l'IGS des extraits d'ADNr des broyats de nodosités de plants d'*A. senegal* inoculés avec les sols de Goudiri, Kidira et Kaffrine ; M=100pb.



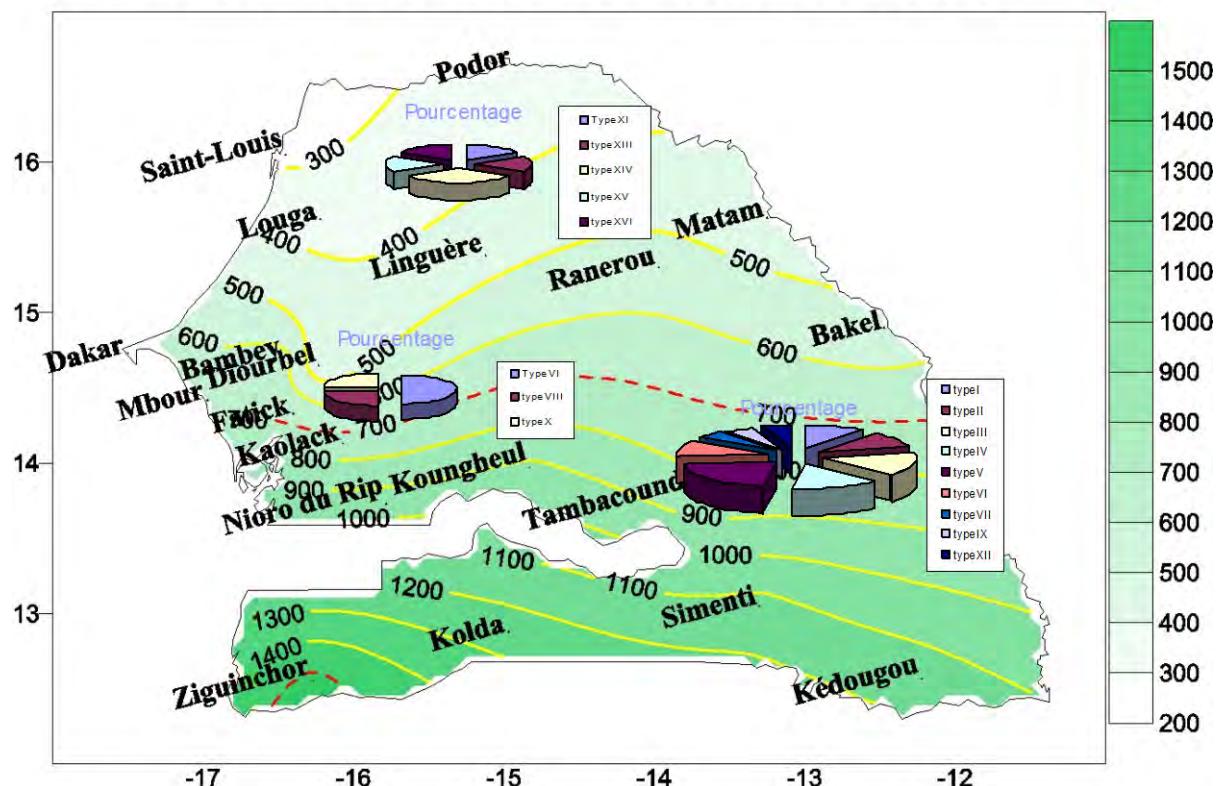
**Figure 10:** Gel d'électrophorèse montrant les profils de restriction obtenus avec les enzymes *HaeIII* et *MspI* de l'IGS des extraits d'ADNr des broyats de nodosités de plants d'*A. senegal* inoculés avec les sols de Louga, Linguère ; M=100pb.

Les profils de restriction ci-dessus sont obtenus par électrophorèse des produits de digestion des amplifiats de l'IGS des souches de rhizobia isolées d'*A. senegal* provenant des sols de la zone sylvopastorale, du sud bassin arachidier et du Sénégal oriental. L'analyse comparée des différents profils montre qu'il existe une diversité génomique non seulement entre isolats de sols différents mais également entre isolats issus d'un même sol. Les souches de rhizobia capables de noduler les plants d'*A. senegal* diffèrent selon le sol et selon la provenance qui a servi au piégeage. Par exemple, pour le sol de Goudiri, les plants d'*A. senegal* de la provenance Vélingara sont nodulés par les souches de rhizobium de profils IGS IV et VII alors qu'avec la provenance Mbeuleukhé, on retrouve les profils IGS I, II et V.

#### 4.3.Répartition des groupes RFLP selon l'origine géographique des sols

Les différents groupes de profils électrophorétiques de souches de rhizobium isolées de plants d'*A. senegal* inoculés avec des extraits aqueux de sols de la zone sylvopastorale, du sud du bassin arachidier et du Sénégal oriental sont représentés sur la carte suivante.

## Cumul Pluviométrique de l'année 2005 en mm



**Figure 11:** Répartition des souches de rhizobium isolées de plants d'*A. senegal* dans la zone sylvopastorale, le sud bassin arachidier et le Sénégal oriental.

Nos résultats semblent montrer une discrimination des souches de rhizobium associées à *A. senegal* selon l'origine géographique des sols. Ainsi, aucune souche n'est retrouvée en même temps dans les trois zones d'études. La souche VI apparaît au sud du bassin arachidier et à Koulor au Sénégal Oriental. Les souches XI, XIII, XIV, XV et XVI ne se retrouvent que dans la zone sylvopastorale de même, les souches X et VIII apparaissent qu'à Kaffrine au sud du bassin arachidier. Les souches I, II, III, IV, V, VII, IX et XII ne se retrouvent qu'au Sénégal oriental. Les sols de la zone du Sénégal oriental ont une diversité plus élevée au minimum 4 profils électrophorétiques par sol. En revanche, 3 profils IGS par sol ont été retrouvés au sud Bassin arachidier et dans la zone sylvopastorale. Cette dernière présente 31 % des profils, 19 % au sud Bassin arachidier et 50 % au Sénégal oriental. Le sol de Goudiri présente la plus importante diversité avec le plus grand nombre de profils.

## **5.Isolement des souches de rhizobia**

Il a été effectué après amplification par PCR de l'IGS de l'ADNr d'extraits de nodosités de plants d'*A. senegal* inoculés avec 7 sols provenant des 3 zones écogéographiques de la zone sylvopastorale, du sud du bassin arachidier et du Sénégal oriental. Les broyats de 29 extraits d'ADN dont l'IGS de l'ADNr a été amplifié ont été étalés sur boîte de pétri contenant du milieu YMA. Les résultats obtenus après repiquages successifs jusqu'à l'obtention de la souche pure sont consignés sur le tableau 8.

Plus de 75% des broyats des extraits d'ADN dont l'IGS a été amplifié ont été isolés. Lorsqu'on considère le nombre de souches isolées par rapport au nombre au nombre de groupes IGS, on constate que les sols du Sénégal oriental présentent 74 %. Ce taux est de 50% pour le sud du bassin arachidier et 100 % pour la zone sylvopastorale.

**Tableau 10:** Isolement de souches de rhizobium provenants de broyats de nodosités de plants d'*A. senegal* inoculés avec les sols de Louga, Kamb, Linguère de la zone sylvopastorale, de Kaffrine du sud bassin arachidier, de Koulor, Goudiri et Kidira du Sénégal oriental.

Sol/Provenance	Profils IGS	Isolats
Lo/V1	XIII	+
Lo/Mb1	XIV	+
Lo/Lo1	XIV	+
Lo/lo2	XV	+
Ka/V1	-	-
Ka/Mb1	-	-
Ka/Lo1	-	-
Lin/V1	XVI	+
Lin/Mb1	-	-
Lin/Lo1	XI	+
Kaf/V1	VI	+
Kaf/V2	X	+
Kaf/Mb1	-	-
Kaf/Lo1	VI	-
Kaf/Lo2	VIII	-
Ko/V1	V	+
Ko/V2	V	+
Ko/V3	V	+
Ko/V4	VI	+
Ko/V5	VI	-
Ko/Mb1	XII	-
Ko/Lo1	III	+
Go/V1	VII	+
Go/V2	IV	-
Go/Mb1	I	+
Go/Mb2	II	+
Go/Mb3	II	+
Go/Mb4	V	+
Go/Lo1	-	-
Kid/V1	III	+
Kid/Mb1	I	+
Kid/Mb2	IV	+
Kid/Mb3	IV	+
Kid/Mb4	IX	-
Kid/Lo1	III	-
<b>Total</b>		<b>22</b>

## **DISCUSSION**

Nos résultats ont montré que le taux de germination varie avec la provenance des graines et que ces dernières perdent leur faculté de germination avec le temps. Le taux de germination de la provenance Vélingara Ferlo varie avec l'âge des graines. Ce taux est plus important avec les graines de 2006 (98 %) qu'avec celles de 1999 (61 %). La germination dépend de la quantité et de la qualité des réserves. Ainsi, elle peut être réduite lorsque les réserves des graines sont oxydées ou bien quand elles sont insuffisantes. Une longue conservation des graines peut entraîner une oxydation des réserves, particulièrement pour les graines de nature protéique ou lipidique. La qualité et la quantité des réserves dépendraient des caractéristiques génétiques de la plante mais également de l'environnement. Ainsi, la forte variabilité génétique intra-spécifique retrouvée chez les Acacias se refléterait sur les graines de ces derniers et interférerait sur le taux de germination des provenances. Des résultats similaires ont été obtenus par Sharma (1973) et Guterman (1993). Ces auteurs ont montré que la germination est régulée par des caractéristiques génotypiques mais aussi par les conditions environnementales et, en particulier la disponibilité de l'eau dans le sol.

Nos résultats ont montré que la nodulation de plants d'*A. senegal* inoculés avec des sols de la zone sylvopastorale, du sud bassin arachidier et du Sénégal oriental varie selon les provenances des graines. Les provenances d'*A. senegal* de Vélingara, Mbeuleukhé et Louga montrent des différences en ce qui concerne la nodulation. Ainsi, il y a une différence en terme de nodulation entre les provenances de la même espèce. Ce résultat suggère que la provenance exerce une pression de sélection sur les souches de rhizobia capable de noduler *A. senegal*. Nos résultats sont similaires à ceux de Odee *et al.* (1995) qui en étudiant les paramètres caractérisant la nodulation chez *A. tortilis* ont montré l'existence d'une variabilité intra-spécifique. En fait, le dialogue moléculaire qui se produit entre la plante et la bactérie explique la spécificité de la nodulation des Légumineuses. D'où la nodulation varie en fonction de la variabilité génétique des provenances. Plusieurs auteurs ont démontré qu'il y a fréquemment une grande relation entre l'origine génétique des Légumineuses ligneuses et leur capacité à former des nodosités, et à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec les rhizobia (Nasr *et al.*, 1999 ; Lesueur et Diouf, 2001). Aussi, Sarr *et al.* (2005) ont montré qu'il existe une différence intra-provenances d'espèces d'*Acacia*, en ce qui concerne la nodulation, quand elles sont inoculées par le même sol.

Nos résultats ont montré que pour une même provenance, le taux de nodulation varie suivant l'origine du sol qui a servi à l'inoculation. En effet, les sols présentent différents potentiels en bactéries capables de noduler *A. senegal*. Ces résultats pourraient être corrélés à la densité des populations de rhizobia. Quelle que soit la provenance, nous avons noté une faible nodulation quand les plants sont inoculés avec une suspension de sol de la zone sylvopastorale. Nos résultats ont montré que le nombre le plus probable de bactéries capables de noduler *A. senegal* différent entre les 7 sols. Le taux de nodulation est plus important pour les sols de la zone sud bassin arachidier et du Sénégal oriental où le MPN est plus élevé.

Nos résultats ont montré une pauvreté des sols de la zone sylvopastorale en bactéries capables de noduler *A. senegal* estimées par MPN. Cependant, comme la plupart des espèces de Légumineuses, *A. senegal* est capable d'assurer une association symbiotique. Plusieurs facteurs semblent affecter la nodulation des arbres fixateurs d'azote, en général, et des *Acacia* spp., en particulier (Nasr *et al.*, 1999). En effet, pour certaines espèces d'*Acacia*, les facteurs du milieu peuvent agir sur leur nodulation (Dart et Zou, 1993). Les conditions physico-chimiques du sol pourraient avoir une influence sur les populations de rhizobia capables de noduler *A. senegal*. Les rhizobia sont aussi des microorganismes telluriques et sont confrontés à des situations adverses dans le sol. Par conséquent, leur maintien s'appuie sur leurs aptitudes à s'installer activement dans le sol même en présence des contraintes environnementales. Chatel *et al.* (1968) ont proposé le terme de compétence saprophytique pour désigner l'aptitude des rhizobia qui sont capables de croître comme des saprophytes et de persister dans le sol comme un composant stable de la microflore du sol. Il existe une multitude de facteurs d'origine édaphique susceptibles d'altérer la compétence saprophytique d'une souche de rhizobium (Diem, 1993). Parmi les réponses immédiates des rhizobia au stress hydrique on peut citer les changements morphologiques. Ces modifications cellulaires conduisent à une réduction de l'infection et de la nodulation des Légumineuses (Zahran, 1999). Les conditions environnementales drastiques pourraient entraîner des pertes de plasmides et donc la faculté des rhizobia à former des nodosités. Les souches de rhizobia capables de tolérer ces facteurs adverses ont probablement une grande compétence saprophytique et peuvent persister longtemps dans le sol. Diem *et al.* (1993) ont montré que les conditions de stress environnementales comme la sécheresse modifiaient la génétique et/ou les propriétés symbiotiques des souches indigènes. Il pourrait avoir une corrélation entre la densité des populations natives de rhizobia des sols de la zone sylvopastorale et les propriétés physico-chimiques du milieu. Ainsi, ce faible taux de nodulation que nous avons

observé dans cette zone pourrait être corrélé à la pauvreté en rhizobia natives capables de noduler *A. senegal*. En effet, Diouf *et al.* (2003) ont montré que la taille de l'inoculum avait une influence sur la nodulation des espèces forestières.

Cependant, la densité moindre des populations de rhizobia serait due à l'aridité du milieu. La zone sylvopastorale à une faible pluviométrie (inférieure à 400 mm) par rapport à la zone du sud bassin arachidier et du Sénégal oriental. Cela voudrait dire que la pluviométrie jouerait un rôle déterminant sur la densité des populations de rhizobia capables de noduler *A. senegal*.

Au Sénégal, notre étude menée dans la zone sylvopastorale, le sud bassin arachidier et le Sénégal oriental a montré que *A. senegal* est nodulé par une diversité de souches de rhizobia. Plusieurs auteurs ont démontré le pouvoir discriminant de l'analyse par la technique PCR-RFLP de l'ADNr pour le groupement des souches sur le plan génétique. Des études de la diversité des rhizobia nodulants les acacias sahéliens ont montré qu'il y a une diversité génétique dans les populations de rhizobia originaires du Sahel (Ba *et al.*, 2002 ; Odee *et al.*, 2002 ; Diouf *et al.*, 2007). Les résultats obtenus après amplification par PCR de l'IGS 16S-23S de l'ADNr de nos différents extraits d'ADN de nodosités et après digestion par les enzymes de restriction *Hae* III et *Msp* I, ont révélé des profils distincts. L'analyse de ces profils de restriction a révélé une importante diversité des souches de rhizobia associée à *A. senegal*. Ils se répartissent en 16 profils électrophorétiques. La zone sylvopastorale présente 31 % des profils, 19 % au sud bassin arachidier et 50 % au Sénégal oriental. Cependant, contrairement aux travaux de Krasova – Wade (2003), sur la diversité des rhizobia nodulant le niébé au Sénégal ; il nous paraît difficile d'établir une quelconque corrélation entre la diversité des rhizobia notée et les zones écogéographiques. Un échantillonnage plus important permettrait de vérifier la structuration des populations de rhizobia associées à *A. senegal* selon les conditions du milieu.

Nos résultats montrent une diversité des souches de rhizobia selon les provenances. Par exemple, quand on considère le sol de Goudiri avec la provenance de Vélingara, on retrouve la souche VII et IV, en revanche avec ce même sol, on obtient la souche I, II et V avec la provenance de Mbeuleukhé. Ceci révèle qu'il y a une relation entre la provenance de la plante hôte et la souche de rhizobium qui la nodule. Ce résultat s'expliquerait par une spécificité entre la bactérie et la plante hôte avant la formation de la nodosité. Nos résultats confirment ceux de Sarr *et al.* (2005) qui suggéraient que pour le même sol, la souche qui nodule *A. nilotica* pouvait largement dépendre de la provenance de la plante hôte.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Ce travail a consisté à faire l'inventaire de la diversité naturelle des rhizobia associés à *A. senegal* en relation avec les conditions pédoclimatiques dans trois zones écogéographiques du Sénégal : zones sylvopastorale, sud Bassin arachidier et Sénégal oriental. Nos résultats ont montré qu'il y a une différence en ce qui concerne la nodulation entre les provenances d'*A. senegal*. De plus, le nombre de bactéries par gramme de sol varie en fonction des différentes zones d'étude.

Nous avons également montré que la graine perd sa faculté de germination avec le temps. Cela a un rapport avec la qualité et la quantité des réserves mais aussi avec l'environnement. Les graines qui ont des réserves glucidiques résistent plus à l'effet de l'âge sur la germination.

Le taux de nodulation des plants d'*A. senegal* varie avec la provenance des graines mais aussi avec la pluviométrie. Les provenances exerceraient une sélection sur les rhizobia capables de noduler *A. senegal*. Par conséquent il y a une différence de performance quand à la formation des nodosités. D'autre part, les conditions pédoclimatiques en particulier la pluviométrie exerce une pression sur les rhizobia capables de former des nodosités avec *A. senegal*. De ce fait, il se révèle que la densité augmente quand ces conditions sont favorables.

La quantité de bactéries capables de former des nodosités avec *A. senegal* est plus grande pour les sols se trouvant dans des zones de pluviométrie plus élevée. Les conditions pédoclimatiques favorables permettent un meilleur développement des rhizobia. Dans ce sens, il y aura une augmentation de la densité de ces bactéries dans ces conditions.

Il y a une discrimination des souches de rhizobia capables de former des nodosités avec *A. senegal* dans les trois zones écogéographiques. Cependant, nous ne pouvons pas établir une corrélation entre la diversité des souches de rhizobia et les conditions pédoclimatiques.

En perspective, l'étude de l'infectivité et de l'effectivité de ces souches serait utile et nous permettrait d'envisager des inoculations au champ étant donné que les sols de la zone sylvopastorale sont pauvres en rhizobia capables de former des nodosités avec *A. senegal*. Il serait aussi important d'effectuer la caractérisation phénotypique des souches afin d'avoir une meilleure connaissance de l'écologie de ces rhizobia et de leur comportement vis à vis du pH,

de la salinité, de l'acidité... La détermination des caractéristiques phisico-chimiques du sol sera réalisée dans le but de mieux comprendre l'origine de cette diversité. Un échantillonnage plus grand sera effectué pour vérifier la structuration des populations de rhizobia associés à *A. senegal* selon les conditions du milieu.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1. Ba S., Willems A., de Lajudie P., Roche P., Jeder H., Quatrini P., Neyra M., Ferro Prome J.C., Gillis M., Boivin-Masson C and Lorquin J. (2002).** Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. *Syst Appl Microbiol*, **25**: 130-145
- 2. Badji S., Ducoussو M., Gueye M and Colonna J. P. (1988).** Nitrogen fixation and cross inoculation with Rhizobium from two acacias scies producing arabic gum : *Acacia senegal* L. Willd and *Acacia laeta* R. Br. Ex Benth. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **307** (série III): 663-668.
- 3. Baldani J. I., Baldani V. L. D., Seldin L and Döbereiner J. (1986).** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., s p. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **36**: 86-93.
- 4. Bentham G. (1842).** Notes on *Mimoseae*, with a synopsis of species, London Journal of Botany, **1**: 335-528.
- 5. Berhaut J. (1975).** Flore illustrée du Sénégal. Gouvernement du Sénégal, ministère du développement rural et de l'hydraulique, direction des eaux et forêt, Dakar, pp.89-90.
- 6. Boivin C et Denarié J. (1998).** La symbiose rhizobiums-Légumineuses : Gènes et signaux de nodulation en perspective. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, **13** (3) : 226-232.
- 7. Brhada F et Le Rudulier D., 1995.** Osmoregulation chez les bactéries et chez Rhizobium en particulier : rôle de la glycine bétaïne 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.
- 8. Breedveld M. W., Zevenhuizen L. P. T. M and Zehnder A. J. B. (1991).** Osmotically-regulated trehalose accumulation and cyclic beta-(1,2)-glucan excreted by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA-1. *Arch. f Microbiol*, **156**: 501–506.
- 9. Brenan J. P. M. (1983).** Manuel sur la taxonomie des espèces d'acacias Etat actuel de la taxonomie de quatre espèces d'*Acacia* (*A. albida*, *A. senegal*, *A. nilotica*, *A. tortilis*). F. A. O., Rome, 53p.

- 10. Brockwell J. (1980).** Experiment with cropand pasture legumes: principles and practice. In:Bergersen, F. J. (Ed), Methods for Evaluating BNF. Wiley, New York, pp.417-488.
- 11. Casida Jr. L. E. (1982).** *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **32**: 339-345.
- 12. Chatel D. L., Greenwood R. M et Parker C.A. (1968).** 9th Inter. Cong. Soil Scienc Trans, **2** : 65-73.
- 13. CNUCED/GATT. (1978).** Le marché de la gomme arabique : production, commercialisation, utilisation. Genève, 181p.
- 14. Colonna J. P., Thoen D., Ducoussو M and Badji S. (1991).** Comparative effects of *Glomus mossae* and P fertiliser on foliar minéral composition of *Acacia senegal* seedling inoculated with *Rhizobium*. Mycorrhiza, **1** : 35-38.
- 15. Coulibaly K. (1989).** Le gommier et les actions en cours pour sa réhabilitation au Mali In Actes 3<sup>ème</sup> Symposium sous-régional sur le Gommier et la Gomme Arabique (SYGGA III). ISRA/DRPF-CRDI, Dakar, Sénégal : 105-109.
- 16. Csonka L. N and Hanson A. D. (1991).** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *An. Rev. P. Physiol.*, **45**: 569–606.
- 17. Dart P., et Zou N. (1993).** Rhizobia for NFTS on saline soils. ACIAR Forest Newsletter 15: 3.
- 18. de Faria S. M., Lewis G. P., Sprent j. I. and Sutherland J. M. (1989).** Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytol.*, **111**: 607-619.
- 19. Diem H. G. (1993).** Reexamen des critères de sélection des souches de rhizobium utilisées en Agriculture. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **8**:12,83-87.
- 20. Direction des Eaux et forêts, Chasses et de la Conservation des Sols.** Rapports annuels 1990-2004.
- 21. Dione M. (1986).** Rôle des peuplements d'acacias gommiers de la zone nord et nord-est du Sénégal: Bilan d'action et perspectives. In Les arbres fixateurs d'azote-

l'amélioration biologique de la fertilité du sol. Actes des séminaires du 17- 25-Mars Dakar, Sénégal, ORSTOM : 122-153.

- 22. Diouf A., de Lajudie P., Neyra M., Kersters K., gillis M., Martinez-Romero E and Gueye M. (2000).** Polyphasic caractérisation of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). Int. J. Syst. Evol. Microbiol, **50**: 159-170.
- 23. Diouf D., Neyra M., Grouzi M.(2003).** Phenologie de la nodulation d'*Acacia raddiana* en milieu naturel. In : Grouzis M., Le Floc'h E (Eds) Un arbre au Desert, *Acacia raddiana*. IRD Editions, Paris, pp 171-182.
- 24. Diouf D., Neyra M., Sougoufara B. and Lesueur D. (2001).** Le plan d'action forestier au Sénégal/ bilan et perspectives des activités de reboisement de 1993 à 1998. Bois For. Trop, **270** :5-13.
- 25. Diouf D., Samba-Mbaye R., Lesueur D., Ba A. T., Dreyfus B., de Lajudie P and 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. Microbial Ecology. 54 (3) : 553-566.
- 26. Dommergues Y. R., Duhoux E et Diem H.G. (1999).** Les arbres fixateurs d'azote : caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. Montpellier, France, Rome, Italie, Paris, France, Cirad, Editions Espaces, Fao, Ird, 500p.
- 27. Dommergues Y. (1993).** L'atelier sur les symbioses acacias. In Bois et forêts des tropiques, **238** : 21-34.
- 28. Dreyfus B., Garcia J. L. and Gillis M. (1988).** Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gens. Nov., sp. Nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol, **38**:89-98.
- 29. Evans D and Szott L.T (eds). (1995).** Nitrogen fixatrices for acid soils. Nitrogen Fixing Tree Res Rep Special issue). Morrilton, Arkansas: Winrock International and NFTA.

- 30. Fuhrmann J., Davey C. B and Wollum A. G. (1986).** Dessication tolerance in clover rhizobium in sterile soils. *Soil Sci Soc Am J*, **50** :639-644.
- 31. Ganry F et Dommergues Y. R. (1995)** : Arbres fixateurs d'azote champs ouvert pour la recherche. *Agric. Et Dévelop*, **7** : 9.
- 32. Gibson A. H. (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.
- 33. Graham P. H., Sadowsky M. J., Keyser H.H., Barnet Y.M., Bradley R.S., Cooper J.E., De Ley D.J., Jarvis B. D. W., Roslycky E. B., Strijdom E. W and Young J. P. W. (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.
- 34. Graham P.H. (1992).** Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil condition. *Can J Microbiol*, **38** : 475-484.
- 35. Guterman Y. (1993).** Strategies of dispersal and germination in plants inhabiting deserts. *Bot. Rev*, **60** : 373-425.
- 36. Hoelzle I and Streeter J. G. (1990).** Increased accumulation of trehalose in rhizobia cultured under 1% oxygen. *Appl Environ Microbiol*, **56**: 3213–3215.
- 37. Holmes B., Popoff M., Kiredjian M and Kersters K. (1988).** *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **38** : 406-416.
- 38. Heidstra R and Bisseling T. (1996).** Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. *New Phytol* **133**:25-43.
- 39. Jarvis B. D. W., Van Berkum P., Chen W. X., Nour S. M., Fernandez M. P., Cleyet-Marel J. and Gillis M. (1997).** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **47**: 895-898.

- 40. Jordan D.C. (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., **32** :136-139.
- 41. Kerharo J. et J. G. Adam. (1974).** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle ; plantes médicinales et toxiques. Ed. Vigot, paris. 1011 p.
- 42. Knösel D. H. (1984).** Genus *Phyllobacterium*. In: N.R. KRIEG and J.G. HOLT (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, first edition, **1**, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, pp. 254-256.
- 43. le Rudulier D., Strom A. R and Dandekar A. M. (1984).** Molecular biology of osmoregulation. Science, **224**: 1064-1068.
- 44. Lesueur D and Diouf D. (2001).** Combined effects of rhizobia inoculation and host plant origin on growth and nodulation of *Calliandra calothyrsus*. In: Finan T. M., O'Brian M. R., Layzell D. B., Vessey J. K. and Newton W. (eds) Nitrogen fixation: Global perspectives. Proceedings of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation, Hamilton (Ontario, Canada), 2-7 July 2001. CABI Publishing, Abstract p. 491.
- 45. Makkar N. S and Casida Jr. L. E. (1987).** *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. Int. J. Syst. Bacteriol., **37**: 323-326.
- 46. Martin J. F. (1984).** Recherches sur mes acacias du Tchad: biogeography et étude socio-économique. Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle, Université Paul Sabatier, Toulouse, 300 p.
- 47. McKay I. A and Djordjevic M.A . (1993).** Production and excretion of Nod métabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifoliare* disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. Appl Environ Microbiol, **59** : 3385-3392.
- 48. Miettinen P. (1991).** Symbiosis between *Casuarina equisetifolia* Forest. And *Frankia* strain Ce4. Thesis University of Helsinki.
- 49. Nakagawa Y., Sakane T and Yokota A. (1996).** Transfer of "Pseudomonas riboflavina" (Foster 1944), a gram-negative, motile rod with long-chain 3-hydroxy fatty acids, to *Devosia riboflavina* gen. nov., sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol, **46** : 16-22.

- 50. Nasr H., Sghaier T., Ghorbal M. H. and Dommergues Y. R. (1999).** Variabilité génotypique de l'aptitude à la fixation symbiotique de l'azote chez *Acacia cyanophylla* Lindl. Can. J. Bot, **77**: 1-10.
- 51. Nongonierma A. (1990).** Les relations sols-gommiers au Sénégal. Communication présentée au colloque «Physiologie des arbres et arbustes en zones arides », Paris – Nancy (France), 16 mars – 7 avril, 1990, IFAN, Dakar, 16 p. (non publiée).
- 52. Normand P., Ponsonnet C., Nesme X., Neyra M and Simonet P. (1996).** ITS analysis of prokaryotes. Molec. Microbial. Ecol. Man., 3.4. 5.1-12.
- 53. Krassova K-W., Ndoye I., Braconnier S., Sarr B., de Lajudie P and Neyra M. (2003).** Diversity of indigences bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). Af J Biotechnol Vol. **2** (1): 13-22.
- 54. Odee D.W., Indieka S.A and Lesueur D. (2002).** Evaluation of inoculation procedures for *Calliandra calothyrsus* Meisn. Grown in tree nurseries. Biol Fertil Soils, **36**:124-128.
- 55. Orchard V. A. and Cook F. G. (1983).** Relation between soil respiration and soil moisture. Soil Biol Biochem **15**: 447–453.
- 56. Patt T. E., Cole G. C and Hanson R. S. (1976).** *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. Int. J. Syst Bacteriol, **26**: 226-229.
- 57. Polhill R. M., Raven P.H. and Stirton C. H. (1981).** Evolution and systematics of the Leguminosae. In Advances in legume Systematics, Part 1 (R. M; Polhill and P. H. Raven, Eds).pp.1-26. Royal Botanic Gardens, Kew.
- 58. Pontie G et Gaud G. (1992).** L'environnement en Afrique. Afrique contemporaine, Paris, 249p.
- 59. Ponsonnet C and Nesme X. (1994).** Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. Arch. Microbiol, **161**: 300-309.

- 60. Prévost D and Bromfield E. S. P. (1991).** Effect of low root temperature on symbiotic nitrogen fixation and competitive nodulation of *Onobrychis viciifolia* (sainfoin) by strains of arctic and temperate rhizobia. Biol. Fert. Soils, **12**: 161-164.
- 61. Räsänen L. A., Sprent J. I and Lindström K. (2001).** Symbiotic properties of sinorhizobia isolated from Acacia and Prosopis nodules in Sudan and Senegal. Plant Soil, **235**: 193-210.
- 62. Reddell P. (1993).** Soil constraints to the growth of nitrogen-fixing trees in tropical environnements. In: Subba Rao NS, Rodriguez-Barueco C (eds) Symbioses in nitrogen-fixing trees, pp 65-83. New Delhi: Oxford et IBH.
- 63. Richard J.F. (1990).** La dégradation des paysages en Afrique de l'ouest. Aupelf, UICN, Orstom, Enda, Dakar, 310p.
- 64. Reigh G and O'Connell. (1993).** Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the outer membrane of *Rhizobium meliloti*. J. Bactériol, **175**: 94-102.
- 65. Richardson A. E., Simpson R. J., Djordjevic M. A and Rolfe B. G. (1988)** Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum trifolii*.. Appl. Envir. Microbiol., **54** : 2541-2548.
- 66. Rognon P. (1991).** Les sécheresses au Sénégal replacées dans l'évolution climatique des des vingt derniers millénaires. Sécheresse, **2** : 199-210
- 67. Sarr A.,Diop B., Peltier R., Neyra M and Lesueur D. (2005).** Effect of rhizobial inoculation méthodologies and host plant provenances on nodulation and growth of *Acacia senegal* and *Acacia nilotica*. New Forests, **29** : 75-87.
- 68. Servant-Duvallet S. (1994) –** Variabilité des propriétés physique-chimiques d'exudats d'*Acacia senegal* (Gomme Arabique) d'une plantation expérimentale au Ferlo (Sénégal). Modification des chaînes. Docttorat de l'université de Rouen, 190 p.
- 69. Sharma M. L. (1973).** Simulation of drought and its effect on germination of five pasture species. Agro. J, **65**:982-987.

- 70. Singleton P. W. (1983).** A split-root growth system for evaluating the effect of salinity on the components of the soybean *Rhizobium japonicum* symbiosis. *Crop Sci.*, **23**: 259-262.
- 71. Sina S. (1989).** Synthèse des résultats de quelques travaux sur Acacia Senegal effectués au ua Burkina Fasso. In *Actes 3ème Symposium sous-régional sur le Gommier et la Gomme Arabique (SYGGA III)*. ISRA/DRPF-CRDI, Dakar, Sénégal :9-24.
- 72. Singleton P. W., El Swaif S.A and Bohlool B. B. (1982).** Effect of salinity on rhizobium growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 884-890.
- 73. Smith L. T., Allaith A. M and Smith G. M. (1994).** Mechanism of osmotically-regulated N-acetylglutaminylglutamine amide production in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil*, **161**: 103–108.
- 74. Swensen S.M. (1996).** The evolution of actinorhizal symbioses: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Amer J Bot.* **83**: 1503-1512.
- 75. Tate R.L. (1995).** Symbiotic nitrogen fixation. *Soil microbiology*, **28**:307-333.
- 76. Tu J. C. (1981).** Effect of salinity on rhizobium-root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. plant Sci.*, **61** : 231-239.
- 77. Trinick M. J., Rhodes R. L and Galbraith J.H. (1983).** Competition between fast- and slow-growing tropical legume rhizobia for nodulation of *Vigna unguiculata*. *Plant and Soil*, **73** : 105-115.
- 78. Vassal J. (1985).** Gummiferous Acacias and gum productivity, some aspects of current research. *Bull. IGSM*, **13**: 30-37.
- 79. Vassal J et Dione M. (1993).** Les acacias gommiers au Sahel : exudation gommière et productions. Perspectives. In *Natural resources and social conflicts in the Sahel*. Proceedings of the 5<sup>th</sup> Sahel Workshop, 4-6 january 1993, Aarhus University, Danemark: 180-192.
- 80. Vincent, J. M., 1970.** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. *International biology programme handbook n° 15* Blackwell scientific publication, oxford, UK.

- 81. Von Maydell H. J. (1983).** Arbres et arbustes du Sahel : leurs caractéristiques et leurs utilisations. Eschborn, Allemagne, Gtz, 538 p.
- 82. Waldon H. B., Jenkins M. B., Virginia R. A and Harding E. E. (1989).** Characteristics of wolfgang rhizobial populations from surface and deep-soil environnements of the Sonoan desert. Appl Environ Microbiol, **55** :3058-3064.
- 83. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T and Arakawa M. (1992).** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. immunol., **36** : 1251-1275.
- 84. Zahran H. H. and Sprent J. I. (1986).** Effects of sodium chloride and polyéthylène glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta, **167**: 303-309.
- 85. Zahran H. H., Mohammad E. M., Emam M. M and Ismael S. S. (1997).** The chemical composition, structure and ultrastructure of a halotolerant rhizobia isolated from Egypt. *Proceedings of the 9th Microbiology Conference*. Pp: 121–148.
- 86. Zahran H. H . (1999).** Rhizobium-Legumes Symbiosis and Nitrogen Fixation under sévère Conditions and in Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/>

## **ANNEXE**

### **1) Milieu YM et YMA (Vincent, 1970)**

Mannitol	10g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5g
Glutamate de sodium	0,5g
NaCl (solution à 50 mg/ml)	1ml
Solution T (MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O, 10g/l)	10ml
Solution U (CaCl <sub>2</sub> , 40g/l)	1ml
Solution V (FeCl <sub>3</sub> , 4g/l)	1ml
Extrait de Levure	1g
Eau distillée Q .S.P.	1000ml
Agar	20g

Ajuster le pH 6,8 et stériliser à 120°C pendant 20 min

### **2) Milieu Jensen (Vincent, 1970)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (20g/l) + MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (20g/l)	10ml
NaCl (20g/l)	10ml
CaHPO <sub>4</sub> (50g/l)	20ml
FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O (4g/l) ou 11,11ml de FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O en solution	10ml
Solution d'oligo-éléments de Jensen	1 ml
Eau distillée Q.S.P.	1000ml
Agar	20g

Ajuster le pH à 6,7 ; l'addition d'agar se fait après ajustement du pH

Stériliser à 120°C pendant 20 min

### **3) Solutions pour l'extraction de l'ADN des nodosités**

#### **a) TES : Tampon de broyage (TES/Saccharose)**

Trizma Base	20mM
EDTANa <sub>2</sub>	1mM
NaCl	50mM
Saccharose	8%p/v
pH	8,0

Conservé à 4° C

**b) GES (Guanidine thioacide, EDTA, Sarcosine)**

Guanidine thiocyanate	0,5mM
EDTANa <sub>2</sub>	100mM
N-Lauryle sarcosine	1% p/v
pH	8,0

**c) Lysozyme**

Lysozyme	20mg/ml
Tris-HCl	10mM
EDTANa <sub>2</sub>	1mM

Conservé à -20° C

Ne pas dépasser 2 mois de conservation à -20° C

**d) Tampon Tris-Borate (TBE)**

Tris-Base	1,1 % (p/v)
Na <sub>2</sub> EDTA, 2H <sub>2</sub> O	0,074 % (p/v)
Acide Borique	0,55 % (p/v)

Ajuster le pH à 8,0 et stériliser à 120°C pendant 20 min

**e) Glycérol 60 %**

Glycérol 100 %	60 ml
Eau déminéralisée	40 ml
Stériliser à 120°C pendant 20 min	

**f) Tampon de charge**

Bleu de Bromophénol	0,25 %
Glycérol	30 %

**g) Solution de bromure d'Ethidium (BET)**

Bromure d'Ethidium	100 µl
Eau distillée QSP	1000 ml