

Liste des abréviations

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr :	Acide DésoxyriboNucléique ribosomal
ARN :	Acide RiboNucléique
BET :	Bromure d’Ethidium
C :	Cytosine
dNTP :	désoxyriboNucléotide Tris-Phosphate
G :	Guanine
IGS :	InterGenic Spacer
IRD :	Institut de Recherche pour le Développement
ORS :	Collection de bactéries de l’Institut de Recherche pour le Développement
p/v :	poids par volume
pb :	paire de bases
PCR :	Polymerase chain reaction
Qsp :	Quantité suffisante pour
rpm :	rotation par minute
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism
Taq :	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE :	Tris Borate EDTA
UCAD :	Université Cheikh Anta Diop de Dakar
UV :	Ultrat Violet
v/v :	volume par volume
YM :	Yeast Mannitol
YMA :	Yeast Mannitol Agar
MA :	mycorhiziens arbusculaires
MPN :	Most probable Number (nombre le plus probable)
mM :	millimole/l
µl :	microlitre

Liste des Figures

Figure 1 : Plante adulte

Figure 2 : Localisation des sites de provenances des sols

Figure 3 : Espace intergénique entre les gènes codant pour l'ADNr 16S et 23S

Sommaire

Introduction

CHAPITRE 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. La symbiose mycorhizienne.....	3
1.1. La symbiose mycorhizienne arbusculaire	3
1.2. Classification des champignons MA	5
1.3. Les avantages de la mycorhization	6
1.3.1. Nutrition hydrominérale	6
1.3.2. Protection	7
2. La symbiose rhizobium-légumineuse.....	8
3. La salinité	8
3.1. Définition	8
3.2. Effet du sel sur la symbiose	9
3.2.1. Effets sur les rhizobiums	9
3.2.2. Effets sur les champignons MA	9
3.2.2.1. Effets sur la germination sporale.....	
3.2.2.2. Effets sur la croissance hyphale	
3.2.2.3. Effets sur la croissance colonisation racinaire	
3.3. Effets du sel sur la plante hôte	
4. Rôle des microorganismes symbiotiques sur la tolérance à la salinité	
4.1. Apport de la symbiose mycorhizienne	
4.2. Avantage de la double inoculation (R+M)	
5. Généralité sur <i>A. nilotica</i>	
5.1. Description	

5.2. Phénologie.....	
5.3. Utilisation.....	
CHAPITRE 2	
MATERIELS ET METHODES.....	
	17
Site d'étude et prélèvements	17
.....	
1.2. Potentiel mycorrhizogène des sols étudiés	17
1.2.1. Préparation des dilutions de sols	17
	17
1.2.2. Préparation des graines.....	17
1.2.3. Coloration et observation histologique des racines.....	17
1.2.4. Estimation du MPN par la méthode de Cochran.....	18
.....	
2. Piégeage des champignons.....	18
2.1. Extraction de spores	18
3. Efficience des champignons arbusculaires sur <i>A. nilotica</i> en condition de stress salin	19
3.1. Substrat de culture et matériel végétal	19
3.2. Inoculum fongiques et inoculation des plants	20
3.3. Dispositif expérimental	20
3.4. Traitement salin.....	21
3.5 Paramètres mesurés	21
La croissance	21
Le poids	21
La mycorhization	21
Taux de mortalité	22
3. 6. Analyse statistiques	22
4. Etude des Rhizobiums.....	22
4.1. Culture des plantes en tubes et inoculation	22
4.2. Isolement et constitution d'une collection de souches	23
4.3. Caractérisation moléculaire des souches isolées par PCR /RFLP.....	23
4.3.1. Amplification de la région intergénique 16S-23S.....	

4.3.2. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction	
--	--

CHAPITRE 3

RESULTATS	26
1 Potentiel mycorhizogène(MPN) des sols.	26
2. Piégeage	26
3. Extraction des spores.....	26
4. croissance en hauteur	28
5. Effet de la concentration en sel (NaCl) et des symbiotes racinaires sur la production de matière sèche.	30
6. Influence du sel sur la mycorhization	30
6.1. Observation des lames.....	30
6.2. Fréquence et intensité.....	32
7. Taux de mortalité	
8. Analyse de la diversité des rhizobiums présents dans les nodules obtenus par piégeage.....	35

CHAPITRE 4

DISCUSSION.....	
Conclusions et Perspectives.....	
Références bibliographiques.....	

Introduction

Introduction

La sécheresse et la salinité constituent des contraintes majeures limitant considérablement la production végétale. La salinité est donc un problème grave car elle réduit ou empêche la croissance et le développement des plantes surtout en zones arides et semi aride (Apse *et al* 1999). Chaque année la salinité gagne du terrain en raison de l'extension des surfaces irriguées (utilisation d'eau impropre) du fort ensoleillement et de la faible pluviométrie qui engendre l'extension de la salinisation. Prés de 1milliard d'hectares de terre dans le monde ne sont plus utilisables à cause de la salinité (Jain et al 1989) ce qui représente 7% de la surface de la terre.

La vallée du fleuve Sénégal occupe une place centrale dans la stratégie globale de développement de la Mauritanie et du Sénégal, car c'est une région qui recèle un bon potentiel agricole. Mais suite à l'édification des barrages de Diama (à 26 km de l'embouchure du fleuve) et de Manantali (à quelque 1.000 km en amont), la région a connu de profondes modifications sociales et environnementales. L'irrigation intensive qui y est pratiquée permet de lever la principale contrainte pour la production, mais elle peut engendrer a long terme des risques pour l'évolution des sols : salinisation et acidification.

La salinisation, qui a accompagné l'aménagement des barrages, pose des problèmes environnementaux dans le delta et la basse vallée. Ces zones ne sont plus comme autrefois lessivées par l'eau douce du fleuve. Les sécheresses et la diminution de l'ampleur de la crue ont entraîné le dépérissement de vastes peuplements d'*Acacia nilotica*, notamment au niveau du parc du Diawling, dont les sols sont soumis actuellement à deux contraintes majeures: la salinité et l'acidité.

Dans la vallée du fleuve Sénégal, *A. nilotica* est une des rares espèces adaptée à ces sols salés. Cette légumineuse joue écologique et économique considérable en offrant ombrage, abri, combustibles...et assurant la fertilisation azotée des sols par le biais de leurs potentialités symbiotiques. En effet, cette plante s'associe à des microorganismes du sol tels que les champignons mycorhiziens et les rhizobiums lui permettant d'améliorer sa nutrition hydrominérale. L'exploitation du potentiel symbiotique mycorhizienne et rhizobienne de l'espèce pourrait permettre d'atténuer les effets néfastes du sel sur la survie et la productivité des végétaux tout en maintenant le couvert végétal des zones dégradées.

L'intérêt de ce travail réside dans le fait qu'il contribuera à envisager l'utilisation des microorganismes comme biofertilisants pour la revalorisation des terres dégradées, devenue

Introduction

une priorité pour l'agriculture en zone sahélienne. Il permettra d'étudier le rôle de microorganismes symbiotiques dans l'adaptation de *A. nilotica* au stress salin. Ceci pourra nous conduire à proposer des solutions pour une meilleure adaptation de *A. nilotica* face à l'épineux problème de dégradation des sols dans les programmes de reboisement en pays Sahéliens en général, en Mauritanie et au Sénégal en particulier.

C'est dans ce contexte que nous avons entamé une étude sur le rôle de microorganisme à l'adaptation à la salinité. Plusieurs essais ont été menés pour :

- déterminer du potentiel mycorrhizogène du sol de Diawling,
- déterminer la biodiversité des microorganismes symbiotiques associés à *A. nilotica* dans les sols salés du parc par des études morpho anatomiques et moléculaires,
- évaluer l'efficacité de la symbiose *A. nilotica* /champignons mycorrhiziens sous stress salin.

CHAPITRE 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Symbiose mycorhizienne

Les mycorhizes (du grec mukês =champignons et rhiza=racine) sont des associations entre les racines des végétaux et les champignons symbiotiques du sol. Il s'agit d'une union mutualiste basée sur des échanges réciproques actifs entre deux partenaires (champignons - plantes).

Cette symbiose a été mise en évidence en 1885 par le botaniste allemand Franck, même si son existence semble très ancienne et remonterait au carbonifère, il y a 300 millions d'années environ (Stubblefield *et al.*, 1988 ; Pirozynski et Dalpé, 1989 ; Simon *et al.* 1993). De plus, il a été avancé par Taylor et Osborne (1995) que les végétaux supérieurs n'auraient pu conquérir la terre ferme s'ils n'avaient pas été associés à des champignons mycorhiziens, soulignant ainsi le rôle crucial qu'ont joué, et jouent encore, les mycorhizes dans l'évolution des plantes terrestres.

Les différents types de mycorhizes qui existent se distinguent à la fois par les groupes taxonomiques des partenaires symbiotiques impliqués et par les structures typiques formées par la symbiose. On distingue ainsi trois groupes principaux de mycorhizes sur la base de critères morphologiques : ce sont les ectomycorhizes, les endomycorhizes (constituées des endomycorhizes à peloton d'hyphes cloisonnés et des endomycorhizes à vésicules et arbuscules) et les éctendomycorhizes. Parmi les mycorhizes, celles à arbuscules constituent la symbiose végétale la plus commune car concernent environ 80% des plantes terrestres.

Commentaire [d1]: ajouté les structures des endos et mettre une illustration

1.1 La symbiose mycorhizienne arbusculaire

Les symbioses mycorhiziennes arbusculaires, très répandue à cause de l'ubiquité des champignons concernés. Ces associations sont rencontrées dans presque toutes les familles du règne végétale (kendrick, 1992) soit 80 % des plantes terrestres (Heigelen *et al.*, 1992)

Le terme « arbuscule » caractérisant les champignons MA décrit la structure typique formée par toutes les espèces de cet ordre. Les arbuscules prennent l'apparence d'un arbuste (Gallaud 1905 ; Brundett *et al.*, 1984) et se retrouvent à l'intérieur des cellules corticales de la racine. Ils sont le lieu d'échange entre les deux partenaires (champignon et plante hôte), ils ont une vie éphémère et ne se rencontrent que dans les cellules vivantes. Certains champignons arbusculaires produisent en plus des vésicules qui sont des organes de réserves

A ce jour on dénombre environ 150 symbiotes arbusculaires (Walker et Trappe, 1993). Ils ne peuvent être cultivés seuls (en absence de la plante hôte) et sont qualifiés de biotrophes obligatoires. Leur cycle biologique dans le sol repose entièrement sur la présence de racines vivantes de la plante hôte (Hepper, 1987).

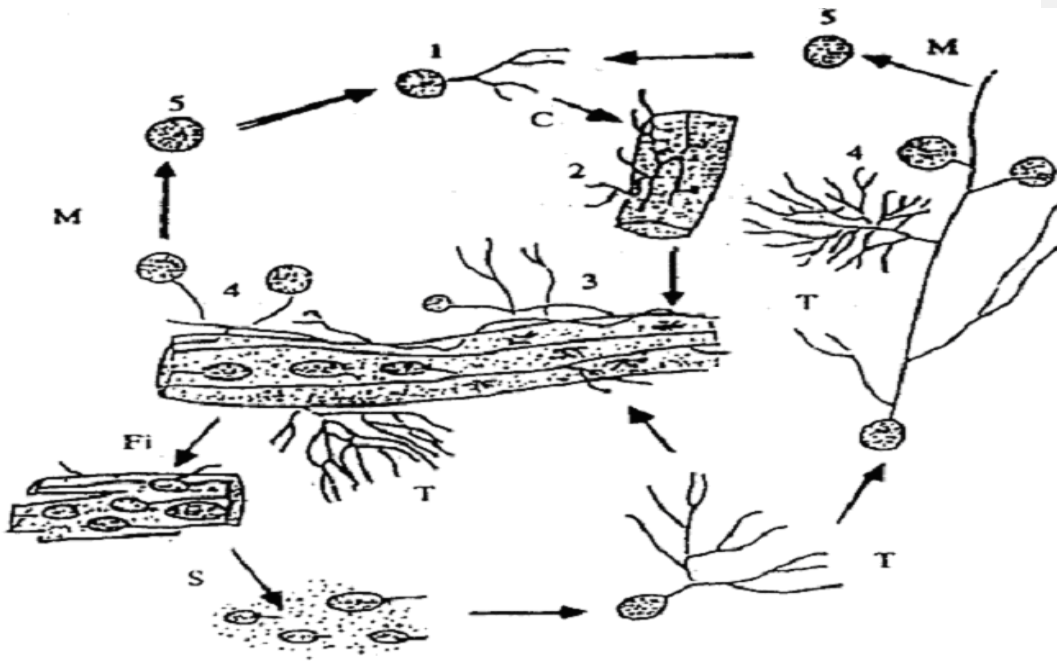


Figure : Cycle de développement des *Glomus* : 1 à 5 stades de développement ; c : contact racinaire ; Fi : forme intraracinaire ; M : maturation sporale ; S : phase saprophytique ; T : thalle. (Strullu *et al.*, 1997)

Plusieurs travaux ont montré que le bon fonctionnement de la symbiose plante - champignon permettent une amélioration de la nutrition minérale (Khaled *et al.* 2003), une résistance aux stress environnementaux tels que la sécheresse la salinité le froid les pathogènes (Dehne, 1982 ; Sylvia et Williams, 1992 ; Manga, 2005) et une amélioration de l'enracinement et de la floraison. Ces champignons symbiotiques utilisent les d'hydrates de carbone que les plantes

produisent par photosynthèse (Harley et Smith, 1983) et fournissent en échange aux végétaux des substances minérales essentielles et de l'eau.

1.2. Classification des champignons MA

Selon la classification de Morton et Benny, (1990), les mycorhizes arbusculaires appartiennent aux zygomycètes et ont été regroupés en ordre, celui des Glomales avec deux sous-ordre : les Endogonales et les Glomales. L'essentiel des espèces connues appartiennent à la famille des Glomacées (Pirozynski et Dalpé, 1989).

Dans la nouvelle classification (Schüßler *et al.*, 2001 ; Walker et Schüßler, 2004), les champignons MA sont regroupés sur la base d'études moléculaires sous l'embranchement des *Glomeromycota* (anciennement Glomales). Cette classification rapproche les champignons MA des Ascomycètes et des Basidiomycètes contrairement à la classification de Morton et Benny, (1990).

Tableau : classification de Schüßler et al. (2001)

Embranchement : GLOMEROMYCOTA

Classe : glomeromycètes

Ordre : Paraglomerales

Famille : Paraglomaceae

Ordre : Archaeosporales

Famille : Archaeosporaceae

Famille : Geosiphonaceae

Ordre : Diversiporales

Famille : Acaulosporaceae

Famille : Diversiporaceae

Famille : Gigasporaceae

Famille : Pacisporaceae

Ordre : des glomérules

Famille : Glomeraceae

1.3. Les avantages de la mycorhization

1.3.1. Une meilleure nutrition hydrominérale

Une plante mycorhizée s'avère mieux nourrie et mieux adaptée à son environnement. En effet il a été montré que les mycorhizes accroissent sensiblement la résistance à la sécheresse, et à la salinité (Sylvia, 1995 ; Mukerji, 1996 ; Abdelilah *et al.*, 2000) grâce à une augmentation du volume de sol exploré par les hyphes fongiques (Gianinnazzi-Pearson et Dem, 1982 ; Cornel et al. 1982), à une augmentation de la conductivité hydrique et à une meilleure absorption d'eau (Safir *et al.* 1972). Coperman *et al.* (1996) ont montré que la tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivée en présence de champignon MA, présente une augmentation du seuil de tolérance au sel et production de matière sèche plus élevée par rapport à une plante non mycorhizée. Cependant, tous les mécanismes impliqués dans ces processus ne sont pas bien connus. Il a été avancé que les champignons MA pourraient capturer ou exclure le NaCl et de ce fait conférer aux plantes une meilleure tolérance au sel (Hildebrandt *et al.*, 2001). Selon Allen et Cunnungham (1983), la tolérance à la salinité serait due à une hyperactivité de la pompe Na/K qui échange le sodium cytoplasmique contre le potassium rhizosphérique. Cette hyperactivité de la pompe Na/K est sous tendue par une importante consommation d'ATP (Adénosine triphosphate). L'augmentation de l'absorption du phosphore et du potassium par les MA pourrait être nécessaire au fonctionnement de la pompe Na/K.

L'amélioration de la nutrition hydrique est corrélée à celle de la nutrition minérale principalement azotée et phosphatée (Safir *et al.*, 1971 ; Hardie et Leyton, 1982 ; Gianninazi 2006). Ces deux minéraux étant des facteurs limitants dans les pays tropicaux (Halley et Smith, 1989). Plusieurs travaux (Abdelilah *et al.* 2000 ; Giri et Mukerji, 2003) ont montré que l'absorption de P est améliorée chez les plantes mycorhizées. Il est en plus établi que cet apport dépend de la plante et de l'isolat fongique.

Les capacités lytiques du champignon sont largement supérieures à celle de la plante, ainsi donc la présence du champignon augmenterait la capacité de la plante à solubiliser des formes peu solubles de phosphore (Gollote, 2006). Selon Bowen et Théodorou (1967), cet apport en phosphore résulterait plutôt de la présence de nombreux sites d'absorption du phosphore en arrière de l'apex de la racine mycorhizée. L'azote est l'élément nutritif le plus indispensable aux cultures, la nutrition azotée est aussi facilitée par la mycorhization comme en illustrent les travaux de Johansen *et al.*, 1996 ; Ruiz-Lozano et Azcon, 2000 ; Manga, 2006 .

Chez les légumineuses, déjà avantagées par leur symbiose avec les bactéries (fixatrices d'azote du genre *Rhizobium*), l'association mycorhizienne accroît la fixation d'azote, surtout dans les sols pauvres en phosphore (Chevalier *et al.*, 1990)

La mycorhization favorise également l'absorption par les plantes de certains ions métalliques indispensables tels que cu, zn ,Fe (Mosse 1973 ; Smith et Gianinazi-pearson, 1998)

1.3.2. Amélioration de l'état phytosanitaire chez les plantes

De nombreuses observations ont montré que la présence des mycorhizes diminue l'effet de certaines maladies racinaires par plusieurs mécanismes :

- limitation du nombre de parasite du fait de la compétition entre champignons. En effet Sikora (1979) rapporte la réduction de la population de *Meloidogyne incognito* chez le tabac (*Nicotiana tabacum*), l'avoine *Avenia sativa*) et de la tomate (*Lycopersicum esculentum*) endomycorhizée par rapport aux témoins non mycorhizée
- augmentation des mécanismes de résistances naturelles de la plante par synthèse de chitinases. C'est le cas de la tomate, du pois et du maïs colonisés par *Glomus mosseae* (Dehne *et al.*, 1978); accumulation de phytoalexines chez la féverole et *Vigna unguiculata* colonisés par *Glomus fasciculatum* (Sundaresan *et al.*, 1993) et une synthèse accrue de phénols chez l'oignon (Grandmaison *et al.*, 1993).
- Une modification de la nutrition des plantes mycorhizées par accumulation de phosphore (Daft *et al.*, 1973 ; Davis *et al.*,1980 ; Singh *et al.*, 1990).

Comme les parasites réduisent la masse du système racinaire ou sa capacité à absorber des nutriments, la colonisation endomycorhizienne permet aux racines restantes d'être plus efficaces et de compenser en partie la réduction de biomasse provoquée par le parasite. Par contre, d'autres auteurs (Dumas *et al.*, 1989, 1990; Gianninazzi-Pearson *et al.*,1992) pensent que les mécanismes de résistances sont peu ou pas du tout stimulés par les mycorhizes à arbuscules.

En définitive, les mycorhizes constituent un espoir formidable pour les pays pauvres aux sols ingrats. En effet la plupart des plantes cultivées forment des mycorhizes arbusculaires, qui constituent un outil biologique de choix pour meilleure tolérance des plantes aux aléas environnementaux que constituent la sécheresse et la salinité, tout en favorisant la réduction de l'utilisation d'intrants chimiques (pesticides, fertilisants).

2. La symbiose rhizobium-légumineuse

L'azote est un composant essentiel des protéines et des acides nucléiques ; il est par conséquent un élément minéral nécessaire à tout organisme vivant (Hansen, 1994). Sous sa forme gazeuse, la molécule d'azote constitue plus de trois quarts de l'atmosphère terrestre

mais, les organismes végétaux et animaux supérieurs ne peuvent l'utiliser sous cette forme. Certains microorganismes tous des procaryotes sont capables d'assimiler directement l'azote moléculaire N_2 (Blondeau, 1980). Ce processus appelé « fixation biologique de l'azote » consiste en la réduction enzymatique de l'azote moléculaire (N_2) en ammoniac (NH_3).

Les plantes de la famille des Légumineuses établissent des symbioses fixatrices d'azote atmosphérique avec les bactéries du sol communément appelées rhizobiums (Allen et Allen, 1981). L'interaction rhizobium-légumineuse conduit à la formation de structures différenciées et spécialisées appelées nodules. Ces derniers apparaissent soit au niveau des tiges (nodulation caulinaire), soit au niveau des racines, cas de la majorité des légumineuses. C'est précisément à l'intérieur de ces organes que les rhizobiums se différencient en bactéroïdes capables de réduire l'azote moléculaire en ammoniac par l'intermédiaire d'un complexe enzymatique, la nitrogénase. Durant ce processus, la zone centrale du nodule prend une teinte rose caractéristique de la léghémoglobine indiquant que les bactéroïdes commencent à fixer l'azote atmosphérique. La bactérie approvisionne ainsi le partenaire végétal en azote combiné, ce dernier l'intègre dans son métabolisme azoté. En retour, la plante hôte procure à la bactérie des produits carbonés et autres nutriments issus de la photosynthèse. L'enrichissement du sol se fait par l'intermédiaire de la litière qui, après décomposition, libère l'azote sous des formes directement assimilables par les plantes. La capacité de fixation symbiotique de l'azote des légumineuses peut être améliorée en inoculant le sol avec des souches performantes de rhizobiums (Date, 2000).

3. La Salinité

3.1. Définition

La salinisation représente le processus par lequel les sels s'accumulent dans les sols. Ainsi les sols salins sont caractérisés par le fait qu'ils contiennent des concentrations excessives de sels solubles ($NaCl$, Na_2SO_4) ou en sodium échangeable $NaCO_3$ ou les deux à la fois.

Plusieurs facteurs tels que la topographie, la composition des couches géographiques sous jacentes et les facteurs hydrobiologiques semblent être à l'origine de ce phénomène.

L'eau de mer et les cours d'eau peuvent être source de salinisation dans les terrains adjacents faiblement lessivés. La salinisation est particulièrement marquée dans les zones arides et semi arides irriguées.

3.2. Effet du sel sur la symbiose

La salinité a des effets négatifs à la fois sur les microorganismes (champignons mycorhiziens et rhizobiums), sur les plantes hôtes et sur la relation symbiotiques.

3.2.1. Effets du sel sur les rhizobiums

La salinité réduit la survie et la multiplication des rhizobiums dans le sol et dans la rhizosphère (Alexandre, 1983), elle affecte aussi le processus d'établissement d'infection du rhizobium (Rai et Prasad, 1983) en l'inhibant. Cette inhibition serait due au blocage des mécanismes de reconnaissance des deux partenaires symbiotiques suite à une dénaturation des sites d'infection de la plante hôte (Singleton et Ben Bohlood, 1984), et éventuellement de la bactérie. Néanmoins l'hypothèse de l'inhibition, en milieu très fortement salin de l'expression des gènes (nod) responsables de l'inféctivité de Rhizobium ; n'est pas à exclure.

La salinité est aussi néfaste pour la fonction de la nodosité qui est déterminée comme contenu en lég-hémoglobine (Delgado *et al.*, 1994) et l'activité respiratoire des bactéroïdes (Delgado *et al.*, 1993). Le sel a aussi un effet osmotique sur la croissance des Rhizobiums (El Sheikh, 1998). Cet effet résulterait d'une déshydratation et de la perte de turgescence des cellules.

L'obtention des symbioses efficaces en milieu salé nécessite au préalable des travaux pour sélectionner d'abord des plantes hôtes halotolérantes car la résistance de l'arbre à la salinité est, dans certains cas, plus déterminante pour la nodulation que celle sa bactérie symbiotique (Girgis *et al.*, 1992). Cette différence de comportement physiologique entre les deux partenaires symbiotiques soumis à des stress analogues est confirmée par les travaux de Nasr *et al.* (1995). En effet, ces auteurs ont conclu que l'inféctivité des souches de rhizobiums semblent complément inhibée à des niveaux de salinité élevés bien que les deux symbiotes soient présents.

3.2.2. Effet du sel sur les champignons MA

Les champignons MA sont des symbiotes obligatoires. De ce fait, tout facteur environnemental qui affecte la physiologie de la plante hôte est susceptible d'affecter le champignon symbiotique.

La contrainte salinité des sols peut affecter la croissance et l'activité des champignons MA par différents mécanismes.

Commentaire [d2]: Mal dit

3.2.2.1. Effet de la salinité sur la germination sporale et le pouvoir infectieux des champignons

La germination des spores de champignons MA est réduite par l'augmentation de la concentration de sel dans le sol (Hirrel, 1981 ; Estaun 1989, 1991 ; Juniper and Abbot, 1991). Certains travaux rapportent que la salinité peut agir sur les premiers stades de l'infection mycorhiziennes en retardant le processus d'apparition du tube germinatif et même parfois en inhibant complètement la germination des spores. C'est ainsi que Hirrel (1981) a démontré l'effet négatif du sel sur la survie des spores de *Gigaspora margarita*. Toutefois il n'est encore formellement établi que l'effet du sel sur la germination sporale est dû à un effet toxique des ions sodium ou à un effet osmotique.

3.2.2.2. Effet du sel sur la croissance hyphale

La croissance du tube de germination peut être stimulée à proximité du système racinaire (Mosse and Hepper 1975) par l'exsudat racinaire (Graham, 1972). La stimulation de la croissance et la modification de la morphologie du tube de germination par les exsudats racinaires pourraient donc être modifiée en condition saline puisque l'exsudat racinaire est grandement influencé par la composition chimique du sol.

McMillen *et al.* (1998) ont montré que le sel inhibe la croissance hyphale et diminue l'extension de la colonisation mycorhizienne. De même, Estaun (1989), rapporte que la croissance de *Glomus mosseae* cultivé sur l'agar, est inhibé par la présence du sel.

La salinité affecte aussi la viabilité des hyphes mycorhiziens qui constituent les principales sources de propagation des champignons et des arbuscules qui représentent le site privilégié d'échange entre les deux partenaires de la symbiose. Cependant certaines espèces de champignons possèdent une large gamme de tolérance à la salinité qui dépendrait de leur habitat d'origine (Coperman *et al.*, 1996).

3.2.2.3. Effet de la salinité sur la colonisation racinaire

Certaines études ont montré que le sel réduit la colonisation des racines par champignons mycorhiziens arbusculaires (Hirrel et Gerdemann 1980 ; Ojal *et al.*, 1983 ; Dixon *et al.*, 1993 ; Green *et al.*, 1995 ; Mc Millen *et al.*, 1998 ; Juniper 1996). A contrario, d'autres études rapportent que la colonisation n'est pas réduite par la salinité (Levy *et al.*, 1984 ; Hartmond *et al.*, 1987).

3.3. Effet du sel sur la plante hôte

Le stress salin est un facteur de déséquilibre pour l'organisme végétal à plusieurs niveaux :

- la présence du sel conduit à un abaissement du potentiel hydrique du sol menaçant ainsi l'approvisionnement en eau de la plante qui se trouve ainsi placée dans un état de stress physiologique,
- l'absorption du sel dans les tissus menace le bon fonctionnement physiologique des cellules. En effet, l'excès de sel dans le plasma conduit à des perturbations de la balance ionique, ainsi qu'à des perturbations enzymatiques, membranaires et autres macromolécules.
- lorsque la concentration excède le niveau de tolérance la plante, des perturbations fonctionnelles apparaissent au niveau de la photosynthèse par effet du sel sur le stroma chlorophyllien qui perturbe le transport des électrons.

4. Rôle des microorganismes symbiotiques sur la tolérance à la salinité

La tolérance à la salinité des plantes consiste en leur capacité à maintenir leur croissance dans des environnements salés (Ashraf, 1994). Les associations symbiotiques sont bien connues pour améliorer la nutrition et la productivité des plantes notamment chez les légumineuses qui sont capables de développer simultanément des associations aussi bien avec les champignons MA qu'avec les rhizobiums.

4.1. Apport de la symbiose mycorhizienne

Plusieurs travaux ont permis de montrer les effets bénéfiques des champignons MA chez les plantes soumises à un stress salin. C'est pour cette raison que certains auteurs considèrent la symbiose mycorhizienne comme un élément important pour aider les plants à faire face aux conditions environnementales défavorables.

Les études de Hirrel (1981) sur l'oignon et celle de Ruiz-Lozano *et al.* (1996) sur la laitue en condition de stress salin ont montré l'effet bénéfique de la mycorhization sur la protection des plantes contre les effets néfastes du NaCl.

Les mécanismes par lesquels les champignons mycorhiziens protègent la plante sont très variables et semblent dépendre de l'espèce de champignons et de la plante hôte.

L'effet positif de *Glomus mosseae* et de *Glomus fasciculatum* sur la laitue en conditions de stress salin semble basé sur l'augmentation de l'activité de photosynthétique de la transpiration de la conductance stomacale, plutôt que l'augmentation de l'apport en N ou P.

Les travaux de Giri *et al.* (2003) sur *Acacia auriculiformis* en condition de stress salin étaient ce résultat. En effet ils ont montré une augmentation de la teneur en chlorophylle des plantes

inoculées par rapport aux témoins. Cette augmentation en chlorophylle s'explique selon eux par une élévation de l'absorption en Mg, l'accumulation de cet élément dans les tissus limite l'absorption de Na, connu pour ses effets négatifs sur la synthèse de la chlorophylle (Jentschke *et al.*, 2000). *Glomus sp.*, quant à lui favorise le développement de la plante hôte en stimulant la croissance hyphale du champignon symbiotique (Gianinnazzi-Pearson et Dem, 1982).

Selon d'autres auteurs (Giri *et al.*, 2003), l'effet bénéfique de la mycorhization est lié à une accumulation de potassium. Giri et ses collaborateurs (2003) ont montré que l'augmentation de la teneur en sel du sol s'accompagne d'une accumulation de K chez *Acacia auriculiformis* mycorhizé. Cette accumulation de K peut être bénéfique car elle permet de maintenir un rapport k/Na élevé.

Selon Coperman *et al.* (1996), la quantité d'ion chlorures est réduite dans les racines des plantes de tomates mycorhizées et s'accumule dans les feuilles. Cette exclusion racinaire pourrait être responsable du maintien de l'absorption de nutriments et par conséquent confère à la plante une tolérance au sel.

4.2. Effets de la double inoculation (Rhizobiums et champignons mycorhiziens)

Les associations symbiotiques sont bien connues pour améliorer la nutrition et la productivité des plantes notamment chez les légumineuses qui sont capables de développer des associations aussi bien avec les Rhizobiums qu'avec les champignons mycorhiziens

La symbiose *Rhizobium* légumineuse permet la réduction enzymatique de l'azote moléculaire (N_2) en ammoniac (NH_3) alors que la symbiose mycorhizienne développe les mécanismes physiologiques et biochimiques nécessaire à la mobilisation de phosphore du sol tout en améliorant l'état hydrique de la plante

Certains travaux (Nabil et Coudret, 1995 ; Pons *et al.*, 1985 ; Pfeifferand et Bloss, 1988) ont pu montrer que la tolérance des plantes à la salinité peut être améliorée par les symbiotes racinaires. Dans le cas des légumineuses la double inoculation avec les champignons mycorhiziens et les rhizobiums augmenterait leur tolérance à la salinité (Borea *et al.*, 1992).

Cependant les travaux de Khaled *et al.* (2003), montrent que la double inoculation (mycorhize et rhizobiums) du trèfle s'est avérée moins efficace pour l'amélioration de la production de biomasse pour les différentes doses de sel qu'ils ont utilisées. Cette étude a révélé un antagonisme entre les deux symbiotes.

5. *Acacia nilotica*

Les acacias par leur adaptabilité en conditions extrêmes et leur capacité à développer simultanément des associations aussi bien avec les mycorhizes qu'avec les Rhizobiums présentent un intérêt majeur pour la restauration des sols en particulier dans les régions arides et semi arides. La grande plasticité écologique des acacias leur permet de vivre non seulement sous les tropiques africains, mais parfois sous les tropiques proches orientaux et indiens. Cette adaptabilité édapho-climatique, ainsi que l'importance économique et écologique confère au genre une place de choix parmi les plantes qui intéressent les sciences fondamentales et appliquées (Nongonierma, 1977).

Acacia nilotica est un des acacias les plus répandus et les plus communs de l'Afrique tropicale sèche, de l'Arabie et des Indes.

Une telle distribution s'explique par une adaptation de l'espèce à différentes conditions climatiques. De plus elle présente une très grande variabilité. En effet *Acacia nilotica* renferme actuellement 9 sub-espèces à répartition géographique plus ou moins distincte.

Acacia nilotica résiste à des inondations temporaires et supporte une hydromorphie de longue durée. C'est certainement l'un des acacias les mieux adaptés aux milieux humides.

Cette espèce résiste également très bien à la sécheresse puisqu'elle ne commence à perdre ses feuilles qu'après 12 à 14 mois sans eau.

Elle résiste, enfin, à de légères salinités puisqu'en irrigation, sa croissance reste très bonne.

Selon Gupta *et al.* (1986), *Acacia nilotica* peut survivre à des teneurs de sel élevées (conductivité supérieure à 15ms/cm) *Acacia nilotica ssp tomentosa* peut survivre à des teneurs de sel comprises entre 2 et 2,5g/l (référence).

5.1. Description

A. nilotica est un grand arbre qui peut atteindre une taille de 10m avec une hauteur moyenne de 4 à 7 m. La couronne est légèrement aplatie ou arrondie avec une densité modérée (fig 1).

L'écorce brun gris ou foncée noirâtre et profondément crevassée exsudant une gomme rougeâtre utilisée dans les indes en teinturerie.

Les feuilles sont deux fois composées, les folioles sont linéaires et le sommet est en coin.

Les gousses ressemblent à un collier perlé, elles sont coriaces et indéhiscents, très étranglées entre les loges des graines. Elles sont aussi parfumées une fois écrasées et contiennent un fluide collant. Chaque gousse renferme 8 à 12 graines. Les graines sont ovoïdes, brun foncé, brillantes avec une enveloppe dure (fig 2 : caractères botaniques).

La plupart *A. nilotica* sont tétraploïdes ($2n = 8x = 52$) ; mais des chiffres plus élevés ont été trouvés chez la subssp. *nilotica* ($2n = 8x = 104$) et *tomentosa* ($2n = 16x = 208$) (Nongonierma, 1976).

5.2. Phénologie

La phénologie de *A. nilotica* est variable et fonction des conditions climatiques. En zone semi-aride, l'eau détermine la phénologie.

La Feuillaison, les arbres gardent généralement leurs feuilles toute l'année dans les zones humides.

La floraison, au terme de chaque période pluvieuse probable, la moindre pluie provoque la floraison. Il est donc possible d'avoir trois floraisons dans l'année.

La fructification, quel que soit le nombre de floraison dans l'année, il n'y aura qu'une fructification. Cette mise à fruits est toujours issue d'une floraison octobre-novembre.

Les gousses, légèrement marcescentes, sont mûres à partir de février-mars. Les différences hygrométriques entre jour et nuit et les bourrasques de vent font tomber les gousses à maturité.

5.3. Utilisation

A. nilotica est un arbre fourrager par excellence pour le bétail et les animaux sauvages.

Les arbres sont émondés pour le feuillage qui est très apprécié des petits ruminants et des camelins.

L'arbre possède de nombreuses vertus. La macération des gousses dans l'eau est utilisée comme boisson pour les diabétiques et les ulcéreux. Au Soudan, on déverse les fruits dans les étangs pour tuer les mollusques qui transmettent la bilharziose.

Les feuilles, les écorces et les gousses sont utilisées pour soigner les ophtalmies et la dysenterie.

Les gousses riches en tanins (en moyenne 32% matière sèche) sont employées pour tanner les peaux alors que le bois est utilisé dans la construction, dans les ménages (charbon de bois, bois de feu) ou bien on en fait des manches d'outils tels que hache, houe . . .

La décoction de l'écorce est un remède pour la toux, l'écorce exsude une gomme de qualité médiocre. Elle a seulement des usages industriels et ne peut être employée en alimentation (Anderson, 1989). Toutefois Vanwyk et al. (2000), Wikens et al. (1996) Considèrent que la gomme des subssp. *nilotica* et *subalata* est comestible.

Synthèse bibliographique

nilotica est utilisée avec succès pour la réhabilitation des sols salés ou alcalins dégradés à condition que leur teneur en sel solubles soit inférieur à 3%. C'est ainsi qu'en Inde on a réhabilité plus de 50 000 ha de ravines par semi aérien d' *A. nilotica*, en mélange avec deux autres espèces.



Fig : plante adulte de *A. nilotica* **(a)**, Caractéristique botanique de *A. nilotica***(b)**

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET METHODES

1. Site d'étude et prélèvements

Commentaire [d3]: Il serait bien de mettre une carte

Le site d'étude est le parc de Diawling qui correspond à un triangle étroit délimité par l'océan atlantique à l'ouest, et le fleuve Sénégal à l'Est, dans l'extrême sud-ouest de la Mauritanie. Cette zone soumise aux crues du fleuve Sénégal et aux fortes marées de l'océan Atlantique favorise la salinisation et constitue une contrainte majeure des sols de Diawling

Les échantillons de sol ont été prélevés sous *Acacia nilotica* entre 0 et 15 cm de profondeur, à différents endroits localisés à l'intérieur du parc.

1.2. Potentiel mycorhizogène (MPN) du sol de diawling

1.2.1. Préparation des dilutions de sol

Pour déterminer le MPN, tous les échantillons de sol, prélevés dans le parc de diawling ont été mélangés et homogénéisés pour en faire un échantillon commun. Une partie de cet échantillon a été stérilisée à 120°C pendant 2h. Les dilutions suivantes ont été effectuées :

10^{-1} (30g de sol non stérile de l'échantillon commun + 270g du même sol stérile) ;

10^{-2} (30g du sol 10^{-1} + 270g de sol stérilisé) ;

10^{-3} (30g du sol 10^{-2} + 270g de sol stérilisé) ;

10^{-4} (30g du sol 10^{-3} + 270g de sol stérilisé) ;

10^{-5} (30g du sol 10^{-4} + 270g de sol stérilisé) ;

10^{-6} (30g du sol 10^{-5} + 270g de sol stérilisé).

Pour chaque niveau de dilution, 5 répétitions ont été effectuées et mis dans des pots à raison de 50g par pot (Annexe1).

1.2.2. Préparation des graines

Les graines de maïs utilisées pour la culture ont été désinfectées l'eau de javel (10 %) pendant 3 min puis rincées à l'eau stérile avant de les mettre en germination dans des boîtes de Petri contenant de l'eau gélosée (0,8%). Elles sont incubées à l'obscurité à 30°C. Après 48h, les graines ayant germés ont été repiquées dans les pots contenant les différentes dilutions

1.2.3. Coloration et Observation histologique des racines

Après six semaines de culture, les plantes ont été récoltées et leurs racines soigneusement rincées à l'eau de robinet afin de les débarrasser des particules de sables. Ces racines ont été mises dans des tubes à essai et colorées selon la méthode de Phillips et Hayman (1970).

Les fragments de racines sont baignés dans une solution de KOH (10 %) afin de les éclaircir et vider leur contenu cytoplasmique puis portés à ébullition au bain marie pendant 1h à 90°C.

Le KOH est éliminé par rinçage à l'eau puis du bleu de Trypan est mis dans les tubes contenant les racines et l'ensemble est porté à ébullition pendant 20min. Un dernier rinçage est effectué à la fin de la coloration.

Après coloration, le système racinaire de chaque plante est observé à la loupe afin de déterminer s'il y a infection par des champignons arbusculaires ou pas.

La plante est considérée comme mycorhizée si au moins un point d'infection ou une figure de colonisation est observé.

1.2.4 Estimation du MPN par la méthode de Cochran

Cette estimation a été faite à l'aide de la table 1 de Cochran, 1950 (Annexe 2). Le principe de cette lecture consiste à considérer comme p1 le plus faible niveau de dilution présentant le plus de plants mycorhizés. Le total de plants mycorhizés de cette dilution et des deux suivantes respectivement p2 et p3 donne un nombre de trois chiffres que l'on reporte sur la table de Cochran. Ce nombre correspond à un coefficient. Pour obtenir le MPN de 50g de sol initial, il faut multiplier ce coefficient par le facteur de dilution de p2. L'écart type correspondant est obtenu en utilisant la table 2 de Cochran (Annexe 3).

2. Piégeage des champignons

Les échantillons de sols et de racines ramenés du site d'étude ont été utilisés pour le piégeage des champignons MA en serre. Le maïs (*zea mays*) a été utilisé comme plante piège dans des pots de polyéthylène contenant le substrat de culture stérile (sable de plage). Dans chaque pot 2 à 3 graines de maïs préalablement imbibées dans de l'eau stérile pendant 2h sont mises à germer. Après la levée, les plants ont été inoculés en enfouissant quelques grammes de sol de piégeage (échantillonné du site d'étude) autour du système racinaire de la plante-piège.

Un arrosage régulier à la capacité au champ à l'eau de robinet a été effectué avec apport de solution nutritive de Long Ashton (Hewitt, 1996) (Annexe 4) tous les 15 jours.

La culture a été maintenue pendant 6 mois au bout desquels la récolte a été effectuée.

Le substrat et les racines des plantes ont été conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

2.1. Extraction de spores

L'extraction de spores a été effectuée selon la méthode du tamisage humide décrite par Gerdemann et Nicolson (1963). Un échantillon de Cent grammes de chaque sol de piégeage a été mélangé avec un excès de l'eau de robinet dans un bûcher de 2l. Ce mélange eau-sol a été agité quelques minutes puis laissé décanter pendant quelques secondes. Le surnageant

contenant les spores, a été filtré à travers un jeu de tamis de mailles décroissantes (500µm, 200µm, 100 µm, 50µm).

Pour récupérer le maximum de spores l'opération de tamisage humide a été répétée au moins trois fois. Les particules retenues dans les tamis de 200µm, 100 µm et 50µm ont été récupérées dans des tubes de centrifugation (tubes corex de 25 ml) puis deux solutions de saccharose (20% et 60%) ont été injectées successivement à l'aide d'une pipette au fond des tubes. Après centrifugation à 3000 tours par minutes pendant trois minutes et à 4°C, les spores et les particules en suspension dans chaque solution de saccharose ont été récupérées dans un tamis de 50µm à l'aide d'une pipette. Un dernier rinçage à l'eau permet d'éliminer le saccharose puis le contenu du tamis est recueilli dans une boîte de Petri. Les spores sont prélevées sous la loupe à l'aide d'une pipette et placées dans des tubes Eppendorf contenant un mélange (glycérol / éthanol absolu v/v) permettant une meilleure conservation.

3. Etude de l'efficiencia des champignons arbusculaires sur *A. nilotica* en condition de stress salin.

3.1. Substrat de culture et matériel végétal

Du sol de Sangalkam caractérisé par une teneur faible en phosphore assimilable (5,5 ppm), (Sarr, 2001) a été utilisé comme substrat pour cette expérience. Ce sol a été stérilisé à 120°C pendant 2h.

Le matériel végétal constitué de graines d'*A. nilotica* (provenance Ndiobéne). Ces graines, ont été mises à notre disposition par le projet national de semences forestières (PRONASEF).

Les graines d'*A. nilotica* ont été traitées par scarification dans de l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré à 96 % pendant 2h puis abondamment rincées avant d'être imbibées pendant une nuit dans de l'eau distillée stérile. Ensuite, elles ont été mises à germer dans des boîtes de Petri contenant de la gélose (0,8 %) et placées à l'obscurité à 30°C pendant 48 H. Après germination, les plantules ont été repiquées dans des gaines en plastique de capacité 1,5kg contenant du sol stérile de Sangalkam.

Les plantes ont été placées en serre et la durée de l'expérience a été de 105 jours.

3.2. Inoculum fongique et inoculation des plants

Le matériel fongique utilisé est constitué de quatre espèces champignons arbusculaires appartenant à la collection du laboratoire. Cette collection est entretenue par culture régulière avec des plantes mycotrophes comme le maïs (*Zea mays*) dans un substrat de culture constitué de sable grossier de plage. Ce sol se caractérise par sa pauvreté en phosphore. Les champignons utilisés sont :

Glomus mosseae (Nicholson & Gerd.Gerd. & Trappe) (DAOM 227131), Isolé a Diokoul au Sénégal ;

Glomus fasciculatum (Thaxter sensu Gerdemann Gerd.)(DAOM227130), Isolé au Québec au Canada ;

Glomus intraradices (Schenk et Smith)(DAOM197198), Isolé au Québec au Canada ;

Glomus aggregatum (Schenke & Smith emendand. Koske) (DAOM227128), Isolé à Dindéresso au Burkina Faso.

3.4. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental adopté est un dispositif en bloc totalement randomisé avec 3 facteurs. Le premier facteur est la provenance avec 1 niveau (provenance Niobène) ; le deuxième facteur est l'inoculation avec 5 niveaux (témoin, *G. mosseae*, *G. aggregatum*, *G. fasciculatum*, *G. intraradices*) et le troisième facteur, la salinité avec 5 niveaux (0 mM, 200 mM, 400 mM, 600 mM et 800 mM). Chaque traitement est répété 10 fois soit un total de 250 plants.

Dispositif expérimental

Provenance Ndiobène

Gi	Gf	Gm	T	Ga
Ga	T	Gf	Gm	Gi
T	Gm	Gi	Ga	T
Gm	Ga	T	Gi	Gf
Gf	Gi	Ga	Gf	Gm
0mM	200 mM	400 mM	600 mM	800 mM

L'inoculation a été réalisée au cours de la transplantation des graines ayant pré germées en gaines. Chaque plante reçoit 20g d'inoculum appliqué contre le système racinaire des jeunes plantes. L'application de NaCl a été faite après 15 jours de culture.

3.5. Paramètres mesurés

Les paramètres suivants ont été mesurés au cours de cet essai :

La croissance : la croissance en hauteur des plantes a été mesurée tous les 15 jours pendant 105 jours de culture ;

Le poids : au terme de l'expérience, les parties aériennes et racinaires des plantes ont été récoltées et séchées à l'étuve (80°C pendant 48h) puis pesées avec une balance de précision afin de déterminer le poids de matière sèche.

La mycorhization : les racines des plantes de *A. nilotica* ont été colorées au bleu de Trypan et L'estimation de l'état de mycorhization du système racinaire à été réalisé selon la méthode décrite par Trouvelot *et al.* (1985). (Annexe 5) pour déterminer la fréquence et l'intensité de mycorhization en condition de stress salin. La fréquence de mycorhization encore appelée taux de mycorhization s'exprime en pourcentage et se calcule comme suit :

$$F (\%) = (\text{nb de fragments mycorhizé} / \text{nb total de fragments}) \times 100.$$

L'intensité de l'infection est exprimée en pourcentage et se calcule comme suit :

$$I (\%) = (90n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) \times 100$$

Ou n5 = nombre de fragments notés 5

n4 = nombre de fragment notés 4

etc.

Le taux de mortalité est déterminé en faisant le rapport nombre de plantes mortes après application du stress sur le nombre total de plantes initial $\times 100$.

3.6. Analyse statistique

Les données numériques issues de l'estimation des paramètres étudiés sont soumises à des analyses de variance (ANOVA). Les données en pourcentage ont été transformées en arc sinus avant l'analyse de variance.

4. Étude des rhizobiums

Les échantillons de sol utilisés pour le piégeage des rhizobiums ont été prélevés sous des *A. nilotica* à différents endroits du Parc de Diawling

4.1. Culture des plantes en tubes et inoculation

La culture des plantes en tubes a été réalisée selon la technique de Gibson (1963). Après germination, chaque graine germée a été transférée dans un tube à essai de 22×220 mm contenant 30 ml de milieu Jensen gélosé, stérile et incliné (Vincent, 1973) et rempli d'eau distillée stérile. Les graines germées ont ensuite été recouvertes par du papier absorbant imbibé d'eau stérile et l'ensemble a été placé en atmosphère confinée humide pendant au moins 24 heures. Les jeunes plantes en tubes ont ensuite été maintenues en chambre de culture à 28°C , sous éclairage intermittent.

Trois jours après le repiquage (temps qui correspond à l'apparition des racines secondaires), les jeunes plants ont été inoculés avec 1 ml d'une suspension aqueuse contenant du sol provenant de la région d'échantillonnage (10 g de sol dans 90 ml d'eau physiologique). Le système racinaire des plantes a été observé tous les deux jours afin de noter la date d'apparition des nodosités. Après 30 jours de culture, les plantes ont été récoltées pour prélever les nodules présents au niveau de leurs racines. Pour chaque plant, les nodules ont été abondamment lavés à l'eau distillée stérile puis désinfectés avec de l'éthanol 96° pendant trois minutes. L'éthanol 96° a ensuite été éliminé et les nodules ont été abondamment lavés par une série de rinçages à l'eau distillée stérile.

4.2. Isolement et constitution d'une collection de souches

Le milieu utilisé pour la croissance des souches de rhizobiums est le milieu YMA, pour la conservation, nous avons utilisé le milieu YM (Vincent, 1970) (Annexe 6). Les nodules ont été broyés séparément à l'aide d'une baguette en plastique flambée à l'alcool et le repiquage a été réalisé à l'aide d'une öse de platine. Les cultures ont été ensuite incubées à l'étuve à 30 °C.

Des isolats purs ont été obtenus après plusieurs repiquages et ont été testés pour leur aptitude à former des nodules sur la plante hôte puis conservés à -80 °C.

4.3. Caractérisation moléculaire des souches isolées par PCR /RFLP

La PCR/RFLP a été utilisée pour caractériser les souches de rhizobiums natives présentes dans les **nodosités** et de les comparer avec les souches de références de la collection (ORS3164, ORS3163, ORS3168, ORS3171, ORS3165, ORS 3178) isolées toutes à partir de nodosités d' *A. nilotica* par Ndoye *et al.* (non publié)

La caractérisation moléculaire permet de préciser l'étude de la diversité, elle fait appel à des techniques d'exploration du génome. La PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism*) est une technique de la biologie moléculaire qui permet d'obtenir rapidement un bon nombre d'informations sur le plan génotypique à partir de l'ADN génomique.

Le but de la PCR est d'amplifier une séquence cible d'ADN c'est-à-dire de produire en grande quantité et de façon spécifique un fragment d'ADN. Elle s'effectue en présence d'une enzyme polymérase (la *Taq* polymérase) thermostable, de dNTPS, de tampon (Tris-HCl, KCl), de MgCl₂ et de deux fragments d'ADN tenant lieu d'amorce à l'activité enzymatique.

L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction d'ADN amplifiés (RFLP) permet une discrimination entre les genres des isolats étudiés et peut aller jusqu'au niveau de la souche. La RFLP présente de nombreux avantages pour l'étude de la diversité microbienne : relative rapidité, possibilité d'application à l'ensemble des taxons bactériens, bonne reproductibilité, possibilité d'analyse simultanée d'un grand nombre de souches, intérêt au niveau taxonomique (Neyra *et al.*, 1998).

4.3.1. Amplification de la région intergénique 16S-23S

Dans notre étude, la région étudiée est l'espace intergénique (IGS) qui est une zone variable du génome situé entre les gènes codant pour les ARN ribosomiques 16S et 23S.



Figure 3 : Espace intergénique (IGS) entre les gènes codant pour l'ADN 16S et 23S

Les amorces utilisées sont dérivées de régions conservées des gènes 16S et 23S. Ce sont la FGPS1490-72 (5'-TGCGGCTGGATCCCCTCCTT-3' ; Navarro *et al.*, 1992) et la FGPL132-38 (5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3' ; Ponsonnet et Nesme, 1994).

Les étapes successives de la réaction d'amplification sont réalisées en conditions d'automatisation, dans un amplificateur de type Gene Amp PCR Système 2400 Perkin Elmer (USA), selon la programmation suivante :

- Une première dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 minutes ;
- 35 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes, une extension des amorces le long de l'ADN matrice à 72°C pendant 1 min et une extension finale à 72°C pendant 7 min. (Figure X).

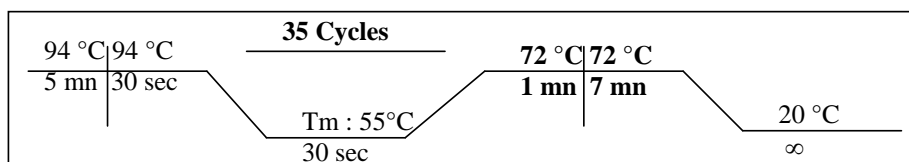


Figure X. schéma représentatif du programme d'amplification d'ADN par la méthode PCR

T_m : température d'hybridation des amorces

L'amplification des fragments d'ADN a été mise en évidence par électrophorèse sur gel agarose 1 % (Sigma type II). Un marqueur de poids moléculaire 1 Kb (Pharmacia biotech) a servi d'étalon de contrôle de taille. En présence de BET (10 %) les amplifiats sont révélés sous lumière UV et photographiés.

4.4.2. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction

L'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction d'ADN amplifiés a été réalisée à l'aide de deux enzymes de restriction *Hae*III, *Msp*I par digestion des produits de PCR. Ces enzymes reconnaissent des sites à 4 bases et coupent la molécule d'ADN à chaque

Matériel et Méthodes

fois qu'elles rencontrent leurs sites de restriction qui sont respectivement pour *Hae*III et *Msp*I : GG/CC, C/CGG. La mise en évidence des profils de restriction a été faite par électrophorèse sur un gel agarose (2,5 %) p/v Metaphor (FMC Bioproducts, Rockland, Marine USA) à 100 volts pendant 3 heures dans du tampon TBE. Un marqueur de poids 100 pb (Pharmacia Biotech) a été utilisé comme échelle de poids moléculaire. Un fragment va migrer d'autant plus loin qu'il est court.

CHAPITRE 3

Résultats

1 Potentiel mycorrhizogène(MPN) des sols.

Le potentiel mycorrhizogène du sol de Diawling est de 170 propagules par 50g de sol avec un intervalle de confiance de 5,1 à 3,5.

2. Piégeage

Les racines colorées ont montré que le maïs (*zea mays*) est une plante très mycotrophe car le piégeage a permis d'obtenir de nombreuses hyphes et vésicules.

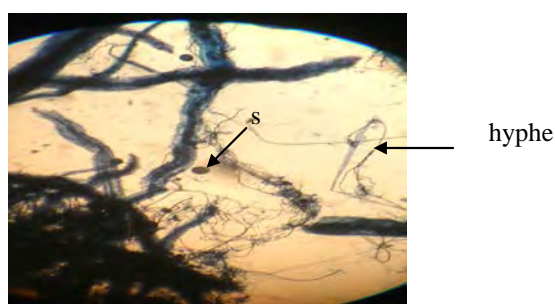
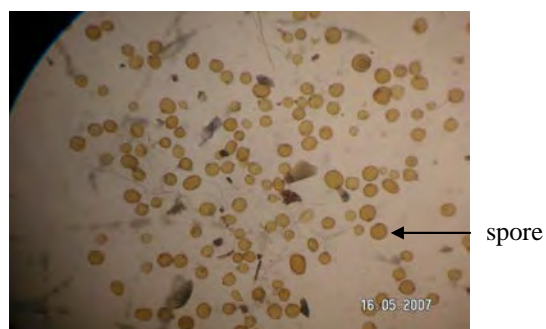


Fig : Aspect d'une racine de plante piège montrant des hyphes et des spores (s)

3. Extraction des spores.

La technique de tamisage a permis d'obtenir des spores matures en nombre variable selon l'échantillon de sol (fig x). La plupart des spores sont rondes et jaunâtre. Elles mesurent entre 50 μm et 450 μm . certains conservent encore l'hyphe suspenseur. Le genre *glomus* est dominant dans le sol de piégeage.



Spores récoltées du piégeage

Provenance Ndiobène

Résultats

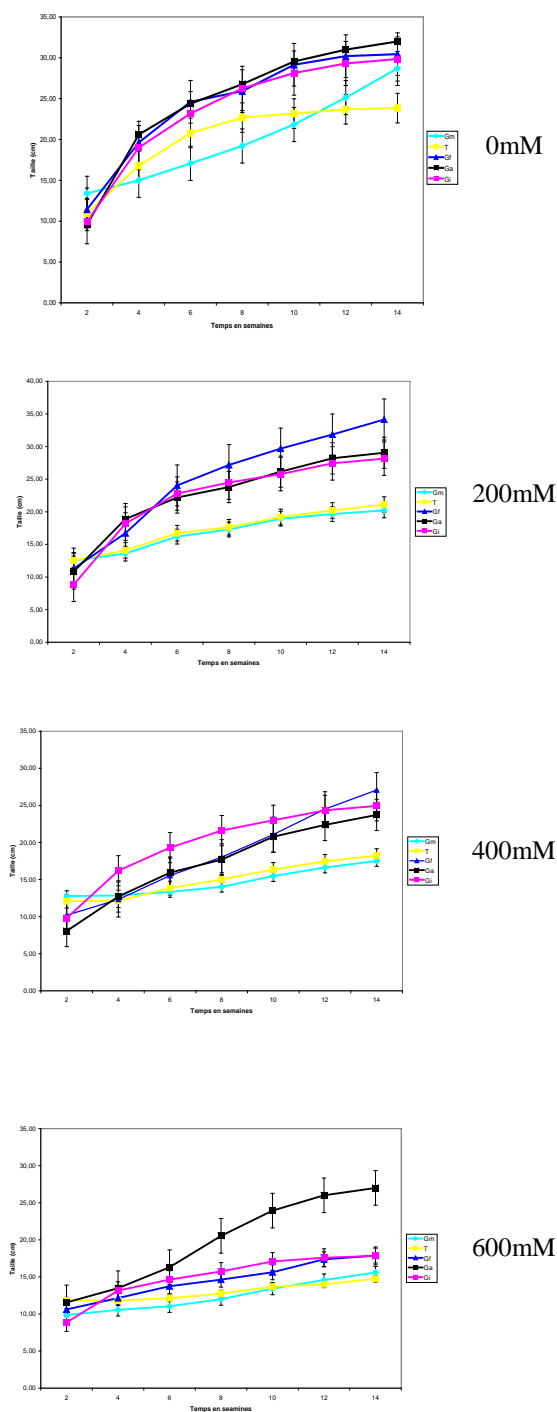


Figure : influence de la mycorrhization sur la croissance en hauteur des plants de *Acacia nilotica* (provenance Niobène) cultivés sur un substrat à différents niveaux de salinité. (**Ga** : *Glomus aggregatum* ; **Gi** : *Glomus intraradices* ; **Gf** : *Glomus fasciculatum* ; **Gm** : *Glomus mosseae*, **T** : témoin non inoculé) inoculée. Les barres verticales représentent les écarts-types à la moyenne.

4. croissance en hauteur

La croissance en hauteur des plants varie suivant la dose de sel appliquée et suivant l'espèce de champignons MA inoculée. De manière générale, les plants inoculés ont présenté une meilleure croissance à tous les niveaux de salinité. Au niveau de salinité 800 mM, aucune mesure de taille n'a été effectuée car le taux de mortalité est de 100%.

À tous les niveaux de salinité, la croissance en hauteur des plants inoculés avec *G. aggregatum*, *G. fasciculatum* et *G. intraradices* reste significativement plus élevée en comparaison à la croissance en hauteur des plants témoins et ceux inoculés avec *G. mosseae*.

Au niveau de salinité 0 mM, les tailles moyennes de croissance à la 14^e semaine sont de : 32cm ; 31.1cm ; 30.45cm et 28cm et pour respectivement les plants inoculés avec *G. aggregatum*, *G. intraradices*, *G. fasciculatum* et *G. mosseae*. Les plants témoins ont la plus faible moyenne (21cm).

Au niveau de salinité 200 mM, les tailles moyennes de croissance à la 14^e semaine sont de : 34.15cm ; 29cm ; 28.15cm et 19.3cm pour respectivement les plants inoculés avec *G. fasciculatum*, *G. aggregatum*, *G. intraradices*, et *G. mosseae*. Les plants témoins ont une moyenne (21,10cm). La tendance des courbes de croissance au niveau de salinité 400 mM est semblable celle des courbes obtenues à la concentration de 200 mM dans le substrat de culture.

A 600mM, les courbes de croissance se répartissent en trois groupes suivant la taille moyenne des plants à la 14^e semaine. Les plants inoculés avec *G. aggregatum* montrent des tailles significativement plus élevées 28.72cm, puis le groupe intermédiaire constitué des plants inoculés avec *G. intraradices* et ceux inoculés avec *G. fasciculatum* avec respectivement 17.83cm et 17.875cm et enfin le groupe constitué des plants témoins et ceux inoculés avec *G. mosseae* avec respectivement 14.7cm et 15.6cm à la 14^e semaine.

Le stress salin a provoqué une diminution des croissances en hauteur des jeunes plants. Cette diminution a été de 13.9%, 9.3%, 9.6%, 11%, 7.8% en passant de 0 mM à 200 mM pour respectivement les plants T (témoin non inoculé), les plants inoculés avec *G. aggregatum*, *G. intraradices*, *G. fasciculatum* et *G. mosseae*. En passant de 0 mM à 400 mM, les chutes de croissance sont de 25.2% ; 25.9% ; 19% ; 11% et 20.4% pour respectivement les plants témoins, les plants inoculés avec *G. aggregatum*, *G. intraradices*, *G. fasciculatum* et *G. mosseae*. En fin, en passant de 0 mM à 600 mM les baisses de croissance deviennent plus importantes avec les pourcentages suivantes : 42.9% ; 13% ; 42.5% ; 41.5% et 28% pour respectivement les plants témoins, les plants inoculés avec *G. aggregatum*, *G. intraradices*, *G. fasciculatum* et *G. mosseae*.

Résultats

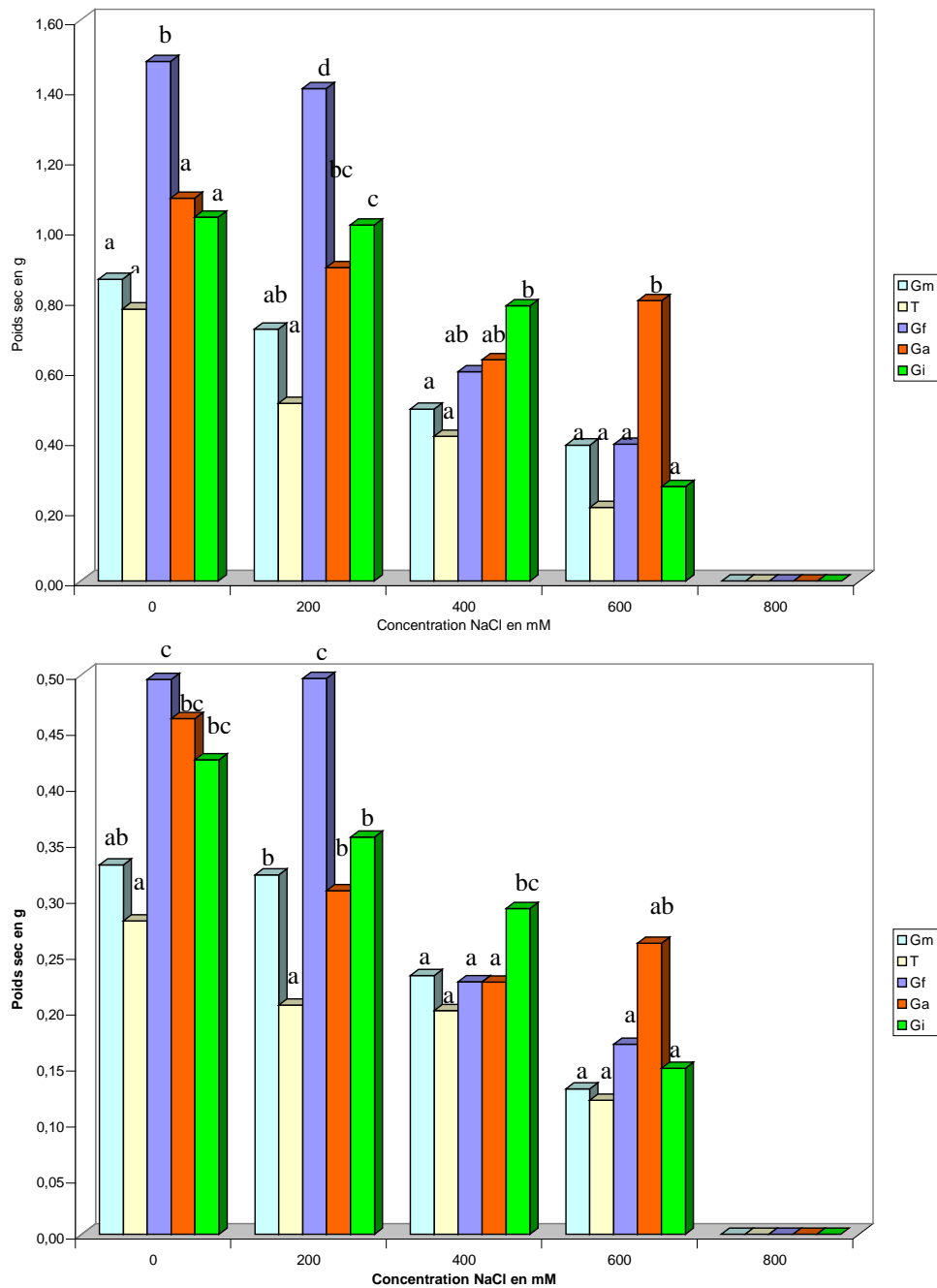


Fig : effet de l'interaction du NaCl et des champignons MA sur la production de matière sèche aérienne (a) et racinaire (b). Les barres avec les mêmes lettres pour chaque variable ne sont significativement différentes au seuil de 95%(test de Newman-Keuls)

5. Effet de la concentration en sel (NaCl) et des symbiotes racinaires sur la production de matière sèche.

Les figures **a et b (ci-contre)** montrent résultats de la production de matière sèche en fonction de la concentration en sel dans le cas des différents traitements. Globalement, les plants inoculés ont des poids de matières sèches aériens plus élevés par rapport aux plants témoins.

Au niveau 0mM, mis appart les plants inoculés *G. fasciculatum*, les autres traitements ne présentent pas de différence significative comparé aux témoins cependant la biomasse des plants inoculés est légèrement plus élevée. Quant aux biomasses racinaires, les plants inoculés ont des moyennes de poids de matière sèche significativement plus élevées que les plants non inoculés.

A 200 mM, les poids de matière sèche aériens et racinaires des plants inoculés sont statistiquement plus élevés que chez les plants non inoculés. Parmi les plants inoculés, ceux mycorhizés avec *G. fasciculatum* ont donné les plus importantes biomasses aériennes et racinaires (1,4g et 0,49g respectivement), Suivi des plants inoculés avec *G. intraradices* (1,016g et 0,35g respectivement).

A 400 mM, les plants inoculés avec *G. intraradices* ont donné des poids de matière sèche plus élevés que les autres traitements qui ne sont pas significativement différents autant pour les parties aériennes que racinaires.

A 600 mM, aucune différence significative n'est notée en comparant les moyennes de poids de matière sèche des biomasses aériennes et racinaires respectivement.

6. Influence du sel sur la mycorhization

6.1. Observation des lames

Les observations de lames sous microscope optique révèlent un bon établissement de la mycorhization des plantes *A. nilotica* avec la présence de structures mycorhiziennes arbusculaires typiques. Ces structures se caractérisent par des hyphes intercellulaires et la formation de vésicules allongées ou globoïdes localisées entre les cellules (fig x). Le nombre de structures diminue lorsque le niveau de salinité augmente.

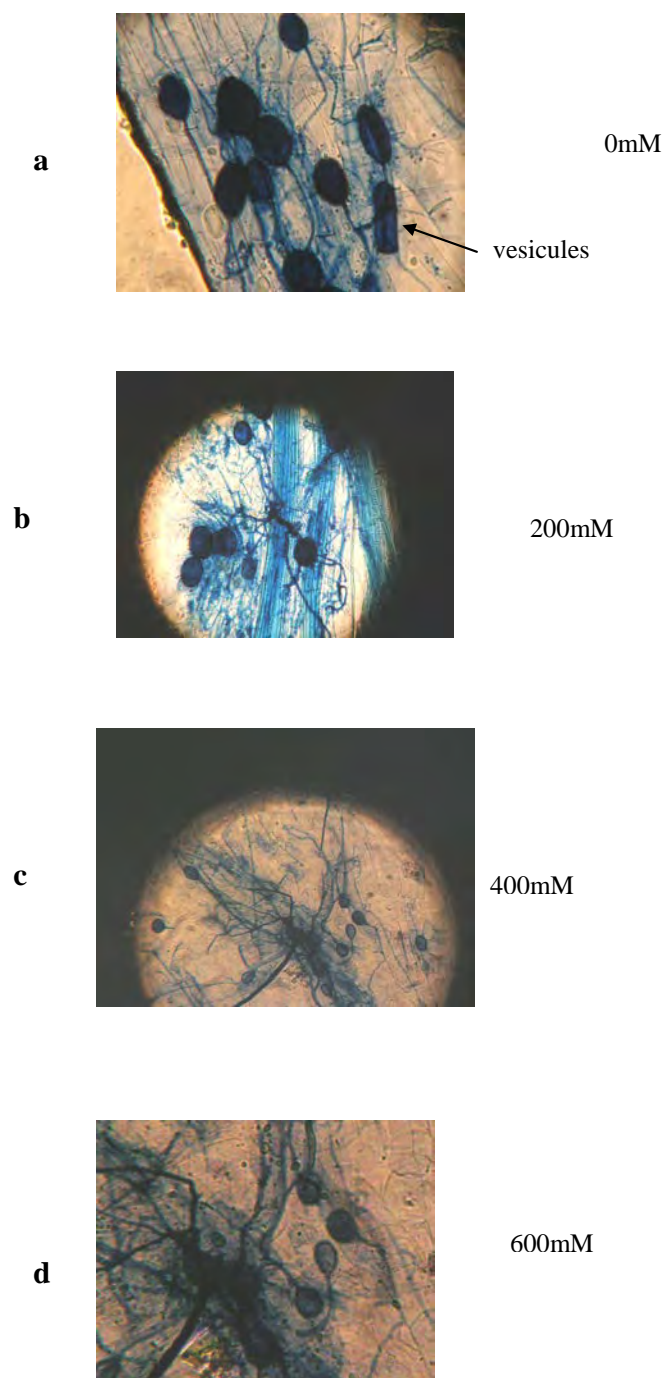


Fig x : Aspect de la mycorhization des plants de *A nilotica* aux différents niveaux de salinité

6.2. Fréquence et intensité

Les observations de fragments de racines colorées des différents traitements ont montré l'absence de la colonisation chez les plants non inoculés. Par contre, la mycorhization était présente à degrés divers chez les plants inoculés (tableau). Les plants sous stress ont des intensités et des fréquences de colonisation généralement plus faibles que les plants qui ne subissent pas le stress salin.

Les intensités et fréquences de mycorhization des différents traitements ne sont pas significativement différentes en passant de 0mM à 200mM sauf pour *Glomus intraradices* ou les réductions significatives. Aux niveaux de salinité 400mM et 600mM, les intensités et fréquences de mycorhization ne sont pas statistiquement différentes cependant les différences sont significatives en comparaison au niveau de salinité 0mM. La comparaison des intensités de mycorhization pour les mêmes concentrations en NaCl varie suivant l'espèce de champignon inoculée. Au niveau 0mM, aucune différence significative entre les différentes inoculations.

Au niveau 200mM, sauf les plants inoculés avec *G. intraradices* ont présenté des intensités et fréquences de mycorhization significativement plus faibles que les autres traitements qui ne sont pas statistiquement différents.

A 400mM, les intensités et fréquences sont significativement plus élevées chez les plants inoculés avec *G. mosseae* et *G. aggravation* comparée aux autres traitements.

A 600mM, aucune différence significative entre les différentes inoculations.

7. Taux de mortalité

Jusqu'au moment de l'application du stress salin (deuxième semaine), le taux de mortalité des jeunes plants d'*A. nilotica* était nul pour tous les traitements. L'évaluation de ce taux de mortalité à la récolte révèle : une mortalité nulle au niveau de salinité 0 mM et 200 mM, une faible mortalité au niveau 400 mM et une forte mortalité au stress sévère (600 et 800 mM). Par ailleurs, le taux de mortalité varie suivant la provenance des graines et suivant le traitement fongique.

Le taux de mortalité le plus élevé (30%) au niveau 400 mM est enregistré chez les plants témoins tandis que chez les plants inoculés le taux de mortalité est très faible (10% chez les plants inoculés avec *G. intraradices* et ceux qui sont inoculés avec *G. aggregatum*) voire nul (chez les plants inoculés avec *G. mosseae* et ceux qui sont inoculés avec *G. fasciculatum*).

Au niveau 600 mM, le taux de mortalité est supérieur ou égal à 50% pour tous les traitements alors qu'il est de 100% chez les plants non inoculés.

Au niveau 800 mM, le taux de mortalité est de 100% pour tous les traitements (plants inoculés et plants non inoculés).

Tableau x

Traitement	Salinité (mM)				
	0	200	400	600	800
G. fasciculatum	0	0	30	60	100
<i>G. aggregatum</i>	0	0	10	90	100
Témoin	0	0	10	80	100
G. mosseae	0	0	10	60	100
<i>G. intraradices</i>	0	0	10	40	100

Résultats

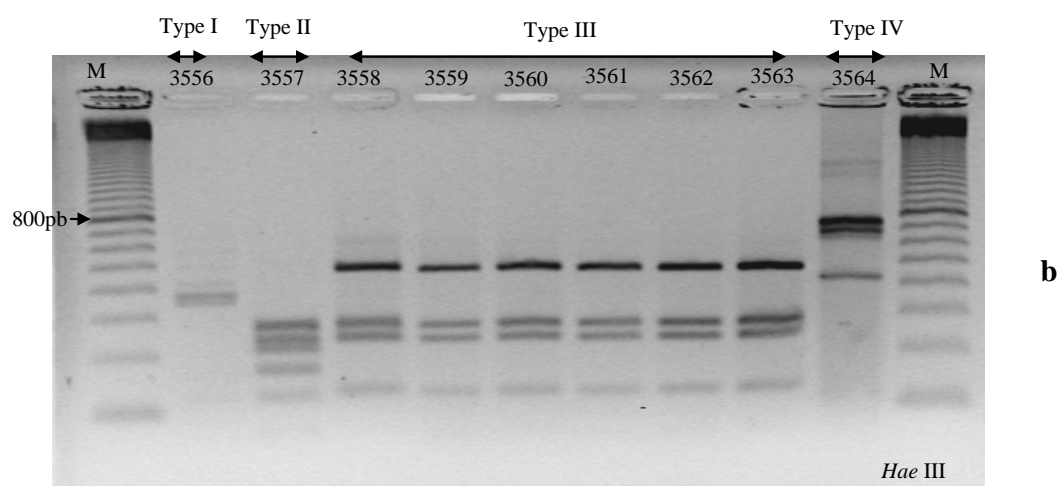
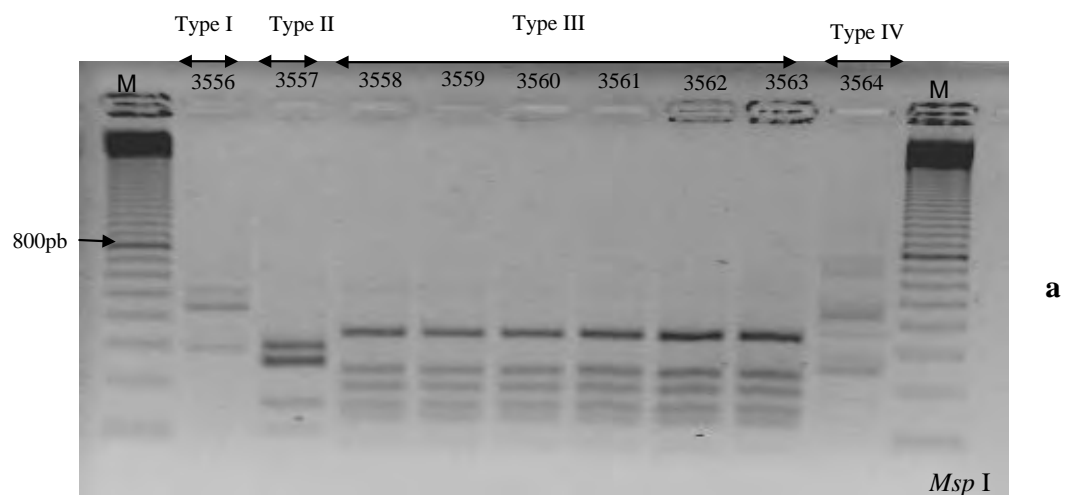


Figure x: Profils RFLP de l'IGS des souches de rhizobiums présentes dans les nodules d' *A. nilotica*. Par digestion avec *Msp I* (**a**), *Hae III* (**b**)
M : Marqueur de poids moléculaire (100 pb).

8. Analyse de la diversité des rhizobiums présents dans les nodules obtenus par piégeage.

Les résultats obtenus après amplification par PCR de l'IGS et digestion par les enzymes *MspI* et *HaeIII* sont consignés sur les figures ci-contre.

Les profils de restriction obtenus sont regroupés en sous-ensemble ou types suivant leur similarité. Un numéro ORS de référence est attribué à chaque profil.

Les résultats montrent six types profils correspondant à six souches différentes

Les souches ORS 3558, ORS 3559, ORS 3560, ORS 3561, ORS 3562, ORS 3563 et ORS 3564, ont les mêmes profils RFLP-IGS et constituent le type III. Les souches ORS 3556, ORS 3557 et ORS 3564 ont des profils différents et constituent respectivement les types I, II et IV. Le type III **est largement majoritaire dans les nodules récoltés** (il a été rencontré 6 fois alors que les types I IV, VI n'ont été rencontrés qu'une fois chacun).

Aucune des cinq souches nouvellement isolées n'a montré un profil IGS ressemblant à celui des souches de référence pour les deux enzymes de restriction.

Toutes les souches testées sauf le type I (ORS 3556) ont induit la formation de nodosité sur les plants d'*A. nilotica*. Cela confirme que les isolats des types II, III et IV obtenus sont des rhizobiums capables d'induire la nodulation d'*A. nilotica*. Ces souches à croissance rapide ont été cataloguées dans la collection de rhizobiums du LCM sous les numéros d'accèsion ORS 3556, ORS 3557, ORS 3558, ORS 3559, ORS 3560, ORS 3561, ORS 3562, ORS 3563, ORS 3564.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

MPN et piégeage

La richesse en propagules de champignons telluriques est tributaire de la diversité et de la densité de la végétation des écosystèmes, de la période d'échantillonnage, et du niveau de salinité du sol. Le dénombrement des champignons MA a montré que le sol de Diawling à un potentiel symbiotique faible ce qui pourrait être corrélé à une dégradation des ses sols induite par la salinité. En effet plusieurs travaux ont que le taux de salinité élevé réduit la survie et la multiplication des microorganismes dans le sol et dans la rhizosphère (Alexandre, 1983 ; Hirrel, 1981 ; Estaun 1989, 1991 ; Juniper and Abbot 1991) et influence les processus symbiotiques par inhibition ou blocage des mécanismes de reconnaissances des partenaires de la symbiose.

Le nombre peu élevé de spores récoltées après extraction pourrait être dû à la pauvreté du sol de Diawling ou à la difficulté que présentes certaines espèces à germer et à former des symbioses lorsqu'elles sont cultivées en serre du fait qu'elles ne sont plus dans les conditions naturelles optimales.

Effet de la concentration en sel et des champignons mycorhiziens arbusculaires sur la croissance et la production de matière sèche.

Globalement les productions en matière sèche sont améliorées chez les plants inoculés par rapport aux plants témoins. Des réponses analogues ont été signalées dans le cas de *Leucaena* avec *Glomus sp* (Dixon et al. 1993), dans le cas du trèfle mycorhizé avec *G. mosseae* (Laaziza et al. 2003) et dans le cas de *Acacia seyal* mycorhizé par différents champignons MA (Manga, 2005).

L'effet bénéfique de l'inoculation est plus marqué lorsque la concentration du sel dans le substrat ne dépasse pas 400 mM. Les fortes intensités de mycorhization à ces niveaux de salinité pourraient avoir contribué à la nutrition hydrominérale des plants aboutissant au développement de ces dernières.

A 600mM, la réduction de la masse du système racinaire ou sa capacité à absorber les nutriments pourrait expliquer la perte de l'efficacité de la symbiose. En effet, la concentration élevée de sel dans le substrat entraîne un stress osmotique pour les deux partenaires de la symbiose ce qui a pour conséquence une difficulté des plantes à s'approvisionner correctement en eau et en élément minéraux.

L'augmentation des biomasses racinaires des plants mycorhizées par rapport aux témoins pourrait être dû à une stimulation du développement racinaire pour permettre à la plante de supporter les niveaux de salinité élevés par amélioration de sa nutrition hydrominérale. Une

Discussion

réponse analogue a été observée par Jalaludin (1993) chez les plants de maïs mycorhizés et Ruiz- Lozano et Azcon (2000) chez la laitue mycorhizée par *Glomus sp.* Le mécanisme de cette stimulation n'est pas connu exactement. Cependant, puisque Allen et al. (1980) ont signalé une production accrue de phytohormone dans les racines des plantes mycorhizées, on peut penser que ces substances peuvent intervenir dans la stimulation de la rhizogenèse.

La comparaison des mesures de taille et de biomasse montre une absence de corrélation entre l'augmentation de la croissance en hauteur et le gain de biomasse. En effet, si les tailles des plants inoculés et non inoculés sont sensiblement les mêmes, nous constatons que les biomasses correspondantes sont significativement plus élevées chez les plants inoculés. Au niveau 0mM par exemple (provenance 3), aucune différence significative n'a été notée entre les différents traitements pour la croissance en hauteur cependant les biomasses aériennes et racinaires sont statistiquement plus élevées chez les plants inoculés par rapport aux témoins. Cette absence de corrélation entre biomasse et hauteur pourrait

Mycorhization

Les fréquences et les intensités de mycorhization au stress modéré montrent la compatibilité fonctionnelle entre les racines des plants de *A. nilotica* et les champignons mycorhiziens arbusculaires.

À forte concentration (600 mM), la chute de la fréquence et l'intensité de mycorhization a probablement été accompagnée d'une réduction de la propagation du champignon. En effet, la sensibilité de la croissance des hyphes fongiques au sel entraîne une diminution de leur propagation, de la colonisation mycorizienne (Ruiz Lozano et al. 1995; Mc Millen et al. 1998) et une perte de la viabilité des hyphes qui peut s'avérer critique pour la survie et la réussite l'installation de la mycorhization (Estaun, 1989 ; Dixon et al. 1993). Certains travaux rapportent que cette salinité peut agir sur les premiers stades de l'infection mycorhizienne en retardant le processus d'apparition du tube germinatif ou en inhibant la germination des spores (Hirell et Gerdemann 1980).

L'efficacité symbiotique des champignons MA., associés varie d'une provenance à une autre bien que la mycorhization ne montre pas de préférence pour une provenance ce qui pourrait s'expliquer par une spécificité fonctionnelle.

Taux de mortalité

Discussion

A. nilotica peut tolérer des taux de salinité élevée (jusqu'à 400mM) surtout lorsqu'il associe aux champignons mycorhiziens. La limite de tolérance se situerait au environ de 600mM.

Le taux de mortalité élevée à 800mM s'expliquerait par le dépassement des limites de tolérances des plantes. A cause de la forte concentration du substrat en sel, les plantes meurent par sécheresse physiologique suite à une difficulté à s'approvisionner en eau

Caractérisation génotypique des isolats

La digestion des produits PCR par les enzymes de restriction *Hae* III et *Msp* I a engendré des profils différents. Cela signifie la coupure de l'ADN des produits PCR par les enzymes a généré des fragments de différentes tailles. En effet, ces enzymes ont des sites de restriction spécifiques et coupent l'ADN à chaque fois qu'elles rencontrent leur site de restriction.

La taille des fragments varie d'une souche à une autre donnant ainsi après électrophorèse sur gel des profils sous forme de codes barre différents d'une souche à l'autre.

Les souches constituant le type III peuvent être considérées comme un clone descendant d'une même lignée. En effet, la comparaison des séquences de l'IGS permet de regrouper des rhizobiums génétiquement très proche (Jensen *et al.*, 1993 ; Gürtler et Stanisich, 1996 ; Laguerre *et al.*, 1996 ; Bala *et al.* 2002).

cinq souches de rhizobium seulement ont été isolées dans nos échantillons de sols cependant le nombre de bactéries capable de s'associer à *A. nilotica* peut être plus importante sur le terrain. En effet à cause de la compétitivité des souches, seules les bactéries les plus compétitifs seront piégées, par conséquent la diversité des espèces associées à la plante n'est pas explorée (McDermott et Graham 1989).

La contrainte salinité pourrait aussi expliquer le nombre très faible de bactéries *A. nilotica*. Plusieurs travaux (Nasr *et al.* 1995) ont montré que les salinités élevées inhibent la croissance et la survie des bactéries dans le sol. La richesse du sol en microorganisme varie aussi selon la période d'échantillonnage.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Alexander M. 1984.** Ecology of Rhizobium. In Biological Nitrogen fixation : Ecology, technology and physiology (M. Alexander, ed.), *Penum Press*, N.Y. 39-50.
- Allen O.N. et Allen E. K., 1981.** The leguminosae : A source book of characteristic, uses and nodulation. The university of Wisconsin Press, Madison.
- Anderson DMW. 1989.** NFT Gums : ancient and modern commercial products. NFT Highlights : NFTA
- Audru J., Labonne, M., Guérin, H., Arun Bilha, 1991.** *Acacia nilotica*, une espèce fourragère traditionnelle chez les Afars de Djibouti. Une espèce de base dans les projets de restauration du milieu pastoral. (*expert consultation on legume trees and other fodder trees as protein source of live stock*). Malaysian Agricultural Research and développement Institute(MARDI). Kuala Lumpur (Malasia).
- Augé R.M., Schekel K.A., Wample R.L . 1986.** Greater leaf conductance of well watered VA mycorrhizal rose plants is not related to phosphorus nutrition. *New Physiol.*, **103** : 107-116.
- Berhaut, J. 1976.** Flore illustrée du Sénégal. Dicotylédones. **Tome V. Fabacées.** Gouvernement du Sénégal. Ministère du Développement rural et de l'Hydraulique Direction des Eaux et Forêts (Dakar). 630-633.
- Blondeau, R. 1980.** Fixation biologique de l'azote. Thèmes Vuibert Université Biologie. Série animée par Guy Marchal. Université de Lille. 91-98.
- Brenan J.P.M. 1983.** Manual on taxonomy of Acacia species. Food and agricultural organisation of United Nation, Rome.pp. 1-47.
- Cochran W.G . 1950.** Estimation of bacterial densité mean of the <Most Probable Number >. *Biometrics.* **6** : 105-116.
- Coperman R . H., Martin, C.A., Stutz., J.C. 1996.** Tomato growth in response to salinity and mycorrhizal fungi from saline and non saline soils. *Host Science* **31** : 341-344.
- Daft, M.J., B.O. Okusanya, 1973.** Effect of Endogone mycorrhizae on plant growth. V. influence of infection on the multiplication of virus on tomato, petunia and strawberry, *New Phytol.*, **72** : 975-983.
- Davis, R.M ; Menge, J.A. 1980.** Influence of *Glomus fasciculatum* and soil phosphorus on phytophthora root rot of citrus, *Phytopathology*, **40** : 447-452.

Références bibliographiques

- Delgado M.J., Garrido J.M., Ligeró F., Lluch C. 1993.** Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodule and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiol. plant.* **89** : 824-829.
- Delgado M.J., Ligeró F., Lluch C. 1994.** Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol. Biochem.* **26**(3) : 371-376
- EL sheikh 1998.**
- Estaun M.V. 1991.** Effect of NaCl and manitol on germination of two isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Abstracts, 3rd European Symposium on mycorrhizas, University of Sheffield, Sheffield UK.
- Ghazi N., Al-Karaki. 2000.** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza*. : 51-54.
- Gianinazzi-Pearson V., Diem, H.G. 1982.** Endomycorrhizae in tropiques. In : Microbiology of tropical soils and plant productivity (Dommergues, Y. R. et Diem, H.G., eds), Martinus Nijhoff, the Hague, 209-251.
- Gianinazzi-Pearson V. 1976.** Les symbioses endotrophes : état actuel des connaissances et possibilité d'application dans la pratique culturale. *Annales de phytopathologie* **8** : 249-256.
- Girgis M.G.Z., Ishac Y.Z., Diem H.G., Dommergues Y.R. 1992.** Selection of salt tolerant *Casuarina glauca* and *Frankia*. *Acta Oecologica*, **13** : 443-451
- Giri B., Kapoor, R., Mukerji, K.G. 2003.** Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biol. Fertil Soils* **38** : 170-175.
- Gollote A., 2006.** Mycorhize à arbuscules du persil certains microorganismes vivent en symbiose et jouent un rôle important dans le développement des plantes Inra (http://www.dijon.inra.fr/la_sciences/les_mycorhizes_le_sol_et_le_developpement_vegetal).
- Graham J.A. 1972.** Effect of citrus roots exudates in germination of chlamydospore of the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeum*. *Mycologia*. **74** : 831-835.
- Grandmaison, J., G.M. Olah, M.R. Van Calsteren ; V. Furlan, 1994.** Characterisation and localization of Plant phenolics likely involved in pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots *Mycorrhiza*, **3** : 155-164.
- Gupta G.N., Prasad, K.G., Mohan, S. et Manivachakam, P. 1986.** Salt tolerance in some tree species at seedling stage. – Indian for. **112** : 101-103.

Références bibliographiques

- Hansen, A. P. 1994. Symbiotic Nitrogen fixation of crop légumes : Achievement and perspectives. Center for Agriculture in the Tropics and Subtropics, University of Hohenheim. *Hohenheim tropical agriculture* 2 : 1.
- Harley L.J. and Smith S.E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. *Academic Press*, New York and London, UK.
- Harmond U., Schaesberg, N.V., Graham, J.H., Syvertsen, J.P. 1987. salinity and flooding stress effects on mycorrhizal and nonmycorrhizal citrus rootstock seedlings. *Plant Soil* 104 : 37-43.
- Hatimi A. Achouri M., Oihabi A. 1991. Endomycorhization de Légumineuse fixatrice de dunes : croissance et nutrition phosphaté, sécheresse, 8 : 99-102.
- Hewitt E.J. 1966. Sand and water cultural methods used in study of plant nutrition. commonweath Agri. Bureau, Tech. Comm22. rev. 2nd edition.
- Hirel MC., Gerdeman JW. 1980. Improved growth of onion and bell paper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci Soc Am J* 44 : 654-655.
- Hirrel M.C. 1981. The effect of sodium and choride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. *Mycologia* 73 : 610-617.
- Jain P.K., Paliwal, K., Dixon, R.K., and Gjerstad, D.M. 1989. improving productivity of multiporpose trees on substandard soil in Indiana . J. for. 87 : 38-42.
- Juniper S., Abbott, L.K. 1991. The effet of salinity on spore germination and hyphe extension of some mycorrhizal fungi. Abtract, 3rd European Symposium on Mycorrhizas, University of Shelffield, Shelffield, UK.
- Juniper S., Abbot, L. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity. *Mycorrhizas* 4 : 45-57.
- Laazia za Ben Khaled, Asucón Morte Gomez, El Moustapha Quarraqi, Abdallah Oihabi, 2003. Réponse physiologiques et biochimiques du trèfle (*Trifolium alexandinum*. L.) à la double association mycorrhizes-rhizobiums sous une contrainte saline.
- Levy Y., Dodd, J., Krikum, J. 1983. Effect of irrigation water salinity and rootstock on the vertical distribution of vesicular- arbuscular mycorhize in citrus roots. *New Physiol.* 95 : 397-403.
- Manga A.G.B. 2005. Biodiversité des champignons mycorhiziens arbusculaires d'*Acacia seyal* Del. et évaluation de leurs potentialités symbiotiques en milieux salé. Thèse de Doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 118 pages.
- Mc Demott T.R., Graham P.H. 1989. Appl ; envir. Microbiol, 54 : 2387-2392.

Références bibliographiques

- Millen M.C., Juniper, S., Abott, L.K.1998.** Inhibition of hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil containing sodium chloride limits the spread of infection from spores. *Soil Biol Biochem* 30(13) : 1639-1646.
- Mosse B. 1962.** the stablishment of vesicular-arbuscular mycorrhize under aseptic conditions. *J. Gen Microbiol* 27 ; 509.
- Mosse B., Hepper, C.1975.** Vesicular-arbuscular mycorrhize infections in root organ cultures. *Physiol.Plant pathol.* 5 : 215-223.
- Nabil M., Coudret, A. 1995.** Effects of sodium chloride on growth, tissue elasticity and solute adjustement in two *Acacia nilotica* subspecies. *Physiol.Plant.* 93 :217-224.
- Nasr H., Ghorbal M.H., M' Hiri A. 1995.** Effet de la salinité du sol sur la nodulation in situ de *Acacia cyanophylla* Lindl. et la dynamique des populations des souches de *Rhizobium*. Dans eacteurs limitant la fixation symbiotique de l'azote ddans le basin Méditerranéen. Acte de la reunion du FABAMED.Monpellier, 6 au 8 avril 199. Éditeur : J.J Devron- INRA Paris pp 85-91.
- Navarro, E., Simonet, P., Normand, P. and Bardin, R. 1992.** Characterisation of natural population of *Nitrobacter* spp. using PCR-RFLP analysis of ribosomal intergenic spacer. *Arch. Microbiol.* 157 : 107-115.
- Neyra, M., Khbaya, B., de Lajudie, P., Dreyfus, B. and Normand, P. 1998.** Computer-assisted selection of restriction enzymes for rrs genes PCR-RFLP discrimination of rhizobial species. *Genet. Sel. Evol.* 30 : 297-309.
- Nongonierma A. 1976.** Contribution à l'étude biosystématique du genre *Acacia* Miller en Afrique occidentale. II. Caractères des inflorescences et des fleurs. *Bulletin IFAN*, série A. 38 : 487-657.
- Nongonierma A. 1977.** Contribution à l'étude biosystématique du genre *Acacia* Miller en Afrique occidentale. III. Edaphologie. *Bulletin IFAN*, série A. 39 : 23-74.
- Pirozynski, K.A., et Dalpé, Y. 1989.** Geological history of the Glomaceae with particular referme to mycorrhizal symbiosis, *symbiosis*, 7 : 1-36.
- Ponsonnet, C. and Nesme, X. 1994.** Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pti and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.* 161 : 300-309.
- Ruiz-Lozano J.M., Azcon, R., Gomez, M. 1996.** Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants. *Physiol. Plant* 98 :767-772.
- Sheikh M. I. 1974.** Aforestation in waterlogged and saline areas. – Pak. J. For. 24 : 186-192.
- Sikora, R. A., 1979.** Prédisposition to meloidogyne infection by endomorphisme mycorrhizal fungus *Glomus mossea*, dans Root-Knot Nematodes (meloidogynespecies).

Références bibliographiques

- Systematic, Biology and control, F. Lamberti et C.E Taylor (éds), *Academic press*, New York, pp399-400.
- Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C., Ladone, M. 1993.** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vesicular plants, *Nature*, **363** :67-69
- Singleton P.W., Bohlool B.B. 1984.** Effect of salinity on nodule formation by soybean. *Plant Physiol.* **74** : 72-76.
- Smith S.E., Gianinnazzi-Pearson V. 1988.** Physiological interactions between symbiots in vesicular- arbuscular mycorrhizal plants, *Annu. Rev. Plant physiol. plant. Mol. Biol.* **39** : 221-224.
- Smith, G.S., 1988.** The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi, *Phytopathology*, **78** :371-374.
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997.** Mycorrhizal symbiosis, second edition . *Academic press*, London, U.K. pp 453-469.
- Stubblefield, S.P. Taylor, T.N., Trappe, 1987.** Fossil Mycorrhizae : A case for symbiosis ,*Science*, **237** : 59-60 .
- Sundaresan, P., Raja, N.U., Gunasekaran, P. 1993.** Induction and accumulation of phytoalexins in cowpea roots infected with a mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and their resistance to fusarium wilt disease, *J.Biosci. (Bangalore)*, **18** : 291-301
- Trouvelot A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V. 1986.** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle mycorrhizae : Physiology and genetics. ESM Dijon, 1-5. July 1985 ,Inra Paris.
- Walker C., Trappe, J.M. 1953.** Name and epithets in Glomales and Endogonales. mycological Research **97** : 339-344.
- Wikens G E, Seif El Din AG, Sita G, Nahol I. 1996.** Rôle des acacias dans l'économie rurale des régions sèches d'Afrique et du proche Orient. R