



Université Cheikh Anta DIOP de Dakar
Faculté des Sciences et Techniques
Département de Biologie Végétale
Ecole doctorale sciences de la vie, de la
santé et de l'environnement

Année : 2017



Université des Antilles
Faculté des Sciences Exactes et Naturelles
Ecole doctorale Milieu insulaire tropical à risques:
Protection, valorisation, santé et développement

N° d'identification : 2017ANTI0157

THESE DE DOCTORAT **(en co-tutelle)**

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Présentée par : Babacar THIOYE

Amélioration de la croissance et de la production fruitière de
***Ziziphus mauritiana* Lam. par l'inoculation mycorhizienne**
dans deux vergers au Sénégal

Soutenue le 01 juillet 2017 devant le jury composé de :

| | | | |
|------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------|
| Président | M. Kandioura NOBA | Professeur titulaire | UCAD-BV |
| Rapporteurs | M. Tahir Abdoulaye DIOP | Professeur titulaire | UCAD-BV |
| | M. Diégane DIOUF | Maître de conférences | UCAD-BV |
| | M. Saliou FALL | Maître de recherches | ISRA |
| Examineurs | Mme Mame Ourèye SY | Professeure titulaire | UCAD-BV |
| | Mme Diaminatou SANOGO | Chargée de recherches | ISRA |
| Directeur de thèse | M. Amadou BA | Professeur titulaire | UA |
| Co-directeur de thèse | M. Samba Ndao SYLLA | Professeur titulaire | UCAD-BV |

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE : Sciences de la Vie, de la Sante et de l'Environnement
FACULTE : Sciences et Techniques

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Nom et prénom du candidat : Babacar THIOYE

Titre de la thèse : Amélioration de la croissance et de la production fruitière de *Ziziphus mauritiana* Lam. par l'inoculation mycorrhizienne dans des vergers au Sénégal

Date et lieu de la soutenance : 01 juillet 2017, UCAD, Dakar, Sénégal

Composition du jury :

| | | | |
|--------------------------------|------------------------------|----------------|---------------------------|
| M. Kandioura NOBA | Professeur titulaire | UCAD-BV | Président |
| M. Tahir Abdoulaye DIOP | Professeur titulaire | UCAD-BV | Rapporteur interne |
| M. Diégane DIOUF | Maître de conférences | UCAD-BV | Rapporteur interne |
| M. Saliou FALL | Maître de recherches | ISRA | Rapporteur externe |
| Mme Mame Ourèye SY | Professeure titulaire | UCAD-BV | Examineur |
| Mme Diaminatou SANOGO | Chargée de recherches | ISRA | Examineur |
| M. Amadou BA | Professeur titulaire | UA | Examineur |
| M. Samba Ndao SYLLA | Professeur titulaire | UCAD-BV | Examineur |

Résumé :

Le jujubier (ou *Ziziphus mauritiana* Lam.) est un arbuste épineux à usages multiples (fruits, fourrage, bois de service) prioritaire pour le reboisement et l'arboriculture fruitière dans le Sahel. Dans ce contexte où les sols sont souvent dégradés et pauvres en minéraux (P en particulier), la mycorhization et la fertilisation phosphatée pourraient jouer un rôle important dans l'amélioration de la croissance et de la productivité des jujubiers.

L'objectif principal de ce travail était d'améliorer la croissance et la production fruitière de *Z. mauritiana* par l'inoculation mycorrhizienne dans deux vergers au Sénégal. Il avait pour objectifs spécifiques (i) d'évaluer les réponses à l'inoculation avec des CMA de différentes espèces de *Ziziphus* et de provenances de *Z. mauritiana* en serre, (ii) d'évaluer l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la croissance, la survie et la production fruitière de *Z. mauritiana*, (iii) d'évaluer l'impact de l'inoculation sur la diversité des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation et (iv) de déterminer la persistance de *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation.

Le champignon *R. irregularis* IR27 s'est avéré le plus efficace parmi les CMA testés. Le couple *Z. mauritiana* /*R. irregularis* IR27 a donc été choisi comme modèle pour étudier l'impact de l'inoculation sur la production fruitière de deux provenances, Gola (variété indienne sélectionnée pour ses fruits de grosse taille) et Tasset (provenance locale à fruits de petite taille) dans deux sites contrastés (Amally et Keur Mangari). Nos résultats ont montré un effet positif de l'inoculation sur la croissance, la survie et le taux de mycorhization de *Z. mauritiana* à 13 et 24 mois respectivement à Amally et à Keur Mangari. L'inoculation a également augmenté la production fruitière des jujubiers à 18 et 30 mois de plantation à Keur Mangari. Ces résultats montrent la grande capacité de *R. irregularis* IR27 à compétir face aux CMA indigènes. Le séquençage Illumina MiSeq du gène *18S* a permis de révéler un impact négatif de l'inoculation sur la diversité et la richesse des communautés de CMA natifs à Amally contrairement à Keur Mangari où l'inoculation n'a pas eu d'impact ni sur la diversité ni sur la richesse des CMA. Le gène *RPBI* s'est révélé pertinent comme marqueur pour détecter *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* inoculés et évaluer par qPCR l'intensité de la colonisation racinaire des jujubiers par *R. irregularis* IR27 qui a représenté 11 à 13% à 13 mois de plantation à Amally et 12 à 15% à 24 mois de plantation à Keur Mangari. Cependant, il s'avère important d'évaluer à plus long terme l'impact de *R. irregularis* IR27 et son devenir dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation sur plusieurs conditions environnementales.

Mots clés : *Ziziphus mauritiana*, *Rhizophagus irregularis* IR27, Mycorhization contrôlée, Arboriculture fruitière, Gène *18S*, Gène *RPBI*, Ingénierie écologique.

Nom et prénom du candidat : Babacar THIOYE

Titre de la thèse : Amélioration de la croissance et de la production fruitière de *Ziziphus mauritiana* Lam. par l'inoculation mycorrhizienne dans des vergers au Sénégal

Date et lieu de la soutenance : 01 juillet 2017, UCAD, Dakar, Sénégal

Composition du jury :

| | | | |
|--------------------------------|------------------------------|----------------|---------------------------|
| M. Kandiouara NOBA | Professeur titulaire | UCAD-BV | Président |
| M. Tahir Abdoulaye DIOP | Professeur titulaire | UCAD-BV | Rapporteur interne |
| M. Diégane DIOUF | Maître de conférences | UCAD-BV | Rapporteur interne |
| M. Saliou FALL | Maître de recherches | ISRA | Rapporteur externe |
| Mme Mame Ourèye SY | Professeure titulaire | UCAD-BV | Examineur |
| Mme Diaminatou SANOGO | Chargée de recherches | ISRA | Examineur |
| M. Amadou BA | Professeur titulaire | UA | Examineur |
| M. Samba Ndao SYLLA | Professeur titulaire | UCAD-BV | Examineur |

Abstract :

The jujube (or *Ziziphus mauritiana* Lam.) is an important multipurpose species (e.g. fruits, fodder, wood) for reforestation and fruit farming in the Sahel. In this context where soils are often degraded and deficient in phosphorus, mycorrhization and phosphorus fertilization could play a major role on improvement of jujube growth and productivity.

The main objective of this work was to improve growth and fruit production of *Z. mauritiana* by mycorrhizal inoculation in two orchards at Senegal. This work aims (i) to evaluate the responses of different species of *Ziziphus* and provenances of *Z. mauritiana* to inoculation with AMF in greenhouse conditions, (ii) to assess the impact of inoculation with *R. irregularis* IR27 on growth, survival and fruit production of *Z. mauritiana*, (iii) to assess the impact of inoculation on diversity of native AMF communities associated to *Z. mauritiana* after planting and (iv) to determinate the persistence of *R. irregularis* IR27 in roots of *Z. mauritiana* after planting.

The fungus *R. irregularis* IR27 proved to be the most effective AMF tested in this work. The pair *Z. mauritiana* /*R. irregularis* IR27 has been chosen as model to study the impact of inoculation on fruit production of two provenances, Gola (Indian variety selected for its large size fruits) and Tasset (local cultivar with small-sized fruits) in two sites with contrasting rainfall (Amally and Keur Mangari). Our results showed a positive effect of inoculation on growth, survival and mycorrhizal colonization of *Z. mauritiana* plants at 13 and 24 months after planting at Amally and Keur Mangari respectively. Inoculation increased also fruit production of jujubes at 18 and 30 months after planting at Keur Mangari. These results indicated the high ability of *R. irregularis* to compete with indigenous AMF. The MiSeq Illumina sequencing of *18S rRNA* gene revealed a negative impact of inoculation on AMF richness and diversity at Amally, unlike at Keur Mangari where inoculation had no impact on AMF richness and diversity. The *RPB1* gene proved to be an appropriate marker to detect of *R. irregularis* IR27 in inoculated *Z. mauritiana* roots and to evaluate by qPCR the root colonization of *R. irregularis* IR27 which accounted for 11 to 13% at 13 months after planting at Amally and 12 to 15% at 24 months after planting at Keur Mangari. Therefore, it is important to assess at long-term the impact of *R. irregularis* IR27 and its persistence in inoculated *Z. mauritiana* roots in large environmental conditions.

Keywords: *Ziziphus mauritiana*, *Rhizophagus irregularis* IR27, Controlled mycorrhization, Fruit farming, *18S rRNA* gene, *RPB1* gene, Ecological engineering.

REMERCIEMENTS

Cette thèse s'est déroulée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre l'université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD) et l'université des Antilles (UA).

Je tiens dans un premier temps à remercier **Pr Abdoulaye Samb** et **Pr Jean Vaillant**, respectivement Responsable de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement à l'UCAD et l'Ecole Doctorale Milieu Insulaire Tropical à Risques: Protection, valorisation, santé et développement à l'université des Antilles, pour avoir autorisé toutes mes inscriptions en thèse.

Je souhaite remercier l'Institut de Recherche pour le Développement (**IRD**), le National Council of Scientific and Technological Development (**CNPq**) du Brésil, l'Agence Universitaire de la Francophonie (**AUF**), le Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (**CIRAD**), le Service de Coopération d'Action Culturelle de l'ambassade de France à Dakar (**SCAC**), l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (**ISRA**) à travers le projet **WAAPP** et le Laboratoire Mixte International Adaptation des Plantes et microorganismes associés aux Stress Environnementaux (**LMI-LAPSE**), pour avoir mis à ma disposition toutes les facilités financières et administratives.

J'adresse mes sincères remerciements au **Pr Ibrahima Ndoye** et **Pr Samba Ndao Sylla**, respectivement ancien et nouveau Responsable de la Formation doctorale Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des plantes de l'UCAD.

De simples remerciements ne sont pas suffisants pour exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude envers **Pr Amadou Bâ**, qui m'a transmis sa passion pour la recherche depuis mon Master 2. Je vous remercie sincèrement et très vivement pour l'intérêt que vous avez toujours porté à mes travaux. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre confiance, votre rigueur scientifique et votre efficacité. Merci également pour les différentes opportunités scientifiques et pour les nombreuses discussions que nous avons eues et qui m'ont été d'une aide précieuse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au **Pr Samba Ndao Sylla**, qui a toujours été réceptif. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour votre constante disponibilité, votre sens de l'écoute et pour la qualité des relations humaines. Merci Professeur, pour votre aide continue surtout administrative au cours de ces années sans oublier vos nombreux conseils et encouragements.

Je remercie **Dr Diégane Diouf** et **Dr Saliou Fall** de m'avoir accueilli chaleureusement au sein du Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM, Dakar) et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions. Ces lignes traduisent toute mon admiration et ma reconnaissance.

Je tiens à remercier **Pr Michel Lebrun** et **Dr Robin Duponnois**, de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes et de m'avoir permis de

travailler dans de bonnes conditions. Un grand merci au **Dr Hervé Sanguin** pour toute son aide, sa confiance et ses nombreux conseils et encouragements et pour m'avoir initié aux nouvelles technologies de séquençage (NGS). Merci au **Dr Frédéric Mahé**, pour votre aide sur les traitements bioinformatiques des données NGS.

Je souhaite remercier **Dr Philippe Lemenceau**, directeur de l'UMR Agroécologie de Dijon pour son accueil au sein du pôle Mécanismes et gestions des Interactions Plante-Microorganismes (IPM). Je tiens aussi à remercier très sincèrement **Pr Dirk Redecker** pour l'accueil sympathique et sans hésitation qu'il m'a réservé au sein de son équipe. C'était un privilège pour moi d'avoir travaillé avec vous et merci d'avoir partagé votre expertise avec moi sur la caractérisation moléculaire de la souche *Rhizophagus irregularis* IR27. Mes sincères remerciements au **Dr Diederik van Tuinen**, pour votre gentillesse, vos conseils pertinents et encouragements. Merci pour vos remarques et suggestions pertinentes, et tout le temps que vous m'avez consacré pour caractériser la souche IR27 avec une efficacité remarquable.

J'exprime toute ma gratitude au **Pr Kandioura Noba** pour avoir accepté de juger ce travail et de présider ce jury. Merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.

Je tiens à remercier **Dr Diégane Diouf** d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur et ménagé aucun effort dans l'organisation et à la réalisation de nos missions de terrain. Merci pour votre disponibilité et vos nombreux encouragements.

Je tiens à remercier **Pr Tahir Abdoulaye Diop** et **Dr Saliou Fall** de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Ces mêmes remerciements s'adressent au **Pr Mame Ourèye Sy** d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Je remercie **Dr Diaminatou Sanogo** d'avoir accepté de juger ce travail et de nous avoir mis en rapport avec le producteur privé du village de Keur Mangari.

Je remercie **Dr Aboubacry Kane** pour son soutien, sa constante disponibilité et surtout pour la qualité de ses relations humaines. Vous avez fortement contribué à ce travail sur les plans méthodologiques et pratiques.

Un grand merci au **Dr Sergio Mania de Faria** et à l'ensemble de son équipe pour leur collaboration et les analyses chimiques des sols et du matériel végétal, au **Dr Ahmedou Ould Soule**, **Dr Kadidia Sanon**, **Pr Ousmane Sacko** et **Dr Alzouma M. Zoubeirou** pour la fourniture des semences de jujubiers.

Ma gratitude s'adresse au **Dr Dioumacor Fall** pour son aide précieuse, sa disponibilité et ses remarques parfois très critiques mais toujours pertinentes.

Je remercie également **Dr Laurent Laplaze** pour son soutien et ses nombreux encouragements et **Dr Abdala Diédhiou** pour sa sympathie, ses encouragements et ses précieux conseils qui m'ont beaucoup servi.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à **Cheikh Ndiaye**, technicien du LCM qui a toujours été à mes côtés pendant mon travail en terrain et en laboratoire.

Un merci du fond du cœur à **M. et Mme Touré** pour votre accueil pendant tous mes séjours passés à Montpellier et vos précieux conseils. Cher El Hadji, je te remercie pour ta constante disponibilité. Nos discussions ont été toujours très intéressantes et enrichissantes.

Mes vifs et sincères remerciements :

-Au personnel du Laboratoire Commun de Microbiologie de Dakar

-Au personnel du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes de Montpellier

-Au personnel de l'UMR Agroécologie de Dijon

-A tous les étudiants stagiaires, doctorants et post-doctorants de ces trois structures

J'adresse ma profonde reconnaissance à mes amis et frères **Amadou Niakary Diallo, Ahmadou Ndao Senghor, Dr Mandicou Ba, Dr Mouhamadou Hady Senghor, Maodo Malick Fall, Djimé Touré** sans oublier **Souleymane Thiam** et **Babacar Fall**. Mes amis et collègues **Fatou Corka Kane, Nancy Aw, Ibrahima Mbaye Ndiaye, Malick Louis Noël, Ndiémé Hane Cissé** pour votre soutien et vos nombreux encouragements.

Je remercie toute ma famille pour votre patience, vos nombreux encouragements, votre compréhension et votre soutien inconditionnel particulièrement à ma mère **Fatou Senghor, Amou, Aminata, Titine, Babacar Ndiaye** sans oublier mon grand IGE **Mouhamadou Lamine Diallo**.

Mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont épaulé et accompagné tout au long de cette aventure intellectuelle et humaine.

Je finis par remercier l'Agence Nationale Grande Muraille Verte (**ANGMV**) et le groupement féminin pour avoir permis la réalisation de ce travail dans le jardin polyvalent du site d'Amally.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

CMA : Champignon mycorhizien à arbuscules

ITS : Intergenic Transcribed Spacer (espace inter-génique transcrit)

LSU : Large sub-unit

mtLSU : Mitochondrial large ribosomal subunit gene

NGS : Next-Generation Sequencing (Nouvelle Génération de Séquençage)

OTU : Operational Taxonomic Unit (Unité Taxonomique Opérationnelle)

pb : Paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

q-PCR : Quantitative – Polymerase Chain Reaction

RPB1 : RNA polymerase II gene

SSU : Small sub-unit

LISTE DES ACRONYMES ET SIGLES

ANGMV : Agence Nationale Grande Muraille Verte

ANACIM : Agence Nationale de l'Aviation Civile et de la Météorologie

AUF : Agence Universitaire de la Francophonie

CNRF : Centre National de Recherches Forestières

FNRAA : Fonds National de la Recherche Agricole et Agroalimentaire

ICRAF : Centre International pour la Recherche en Agroforesterie

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

ISRA : Institut Sénégalais de Recherche Agricole

LAMA : Laboratoire des Moyens Analytiques

LCM : Laboratoire Commun de Microbiologie

LMI-LAPSE : Laboratoire mixte international Adaptation des Plantes et microorganismes associés aux Stresses Environnementaux

LSTM : Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes

PRONASEF : Programme National de Semences Forestières

SCAC : Service de Coopération d'Action Culturelle de l'ambassade de France à Dakar

SERP : Société des Etudes et de Réalisation des Phosphates de Matam

UCAD : Université Cheikh Anta Diop de Dakar

UA : Université des Antilles

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Structures des ectomycorhizes et des endomycorhizes à arbuscules..... | 6 |
| Figure 2. Les trois étapes de l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules..... | 9 |
| Figure 3. Caractéristiques morpho-anatomiques des spores de CMA | 17 |
| Figure 4. Arbre phylogénétique des Glomérormycètes basé sur les séquences codant pour l'ARNr 18S | 18 |
| Figure 5. Phylogénie actuelle des Glomeromycota..... | 20 |
| Figure 6. L'emplacement de différentes combinaisons d'amorces sur des régions-cibles d'ADNr. | 23 |
| Figure 7. Schéma représentant la structure du gène RPB1 amplifié par les couples d'amorces de PCR gigogne..... | 26 |
| Figure 8. Différentes méthodes de séquençage utilisées en NGS. | 29 |
| Figure 9. Dispositif expérimental mis en place pour étudier les réponses à l'inoculation des 7 espèces de <i>Ziziphus</i> | 47 |
| Figure 10. Dispositif expérimental mis en place pour étudier les réponses à l'inoculation des 6 provenances de <i>Z. mauritiana</i> | 48 |
| Figure 11. Graines de jujubier | 69 |
| Figure 12. Dispositif expérimental 1 en pépinière. | 70 |
| Figure 13. Dispositif expérimental 2 en pépinière. | 70 |
| Figure 14. Plants de <i>Z. mauritiana</i> utilisés pour la mesure des paramètres de croissance..... | 71 |
| Figure 15. Localisation géographique des sites d'étude..... | 72 |
| Figure 16. Tracé de la GMV au Sénégal et situation du site d'étude d'Amally..... | 73 |
| Figure 17. Plants de maïs après 45 jours de croissance en serre. | 75 |
| Figure 18. Dispositif expérimental de la plantation des jujubiers à Amally. | 77 |
| Figure 19. Dispositif expérimental de la plantation des jujubiers à Keur Mangari..... | 78 |
| Figure 20. Effet de l'inoculation sur la croissance en hauteur de <i>Z. mauritiana</i> (Gola)..... | 80 |
| Figure 21. <i>Ziziphus mauritiana</i> âgé de 13 mois en plantation à Amally..... | 86 |
| Figure 22. <i>Ziziphus mauritiana</i> âgés de 18 mois en plantation à Keur Mangari. | 88 |
| Figure 23. Branches portant des fruits de jujubiers (A : Gola ; B : Tasset) | 93 |
| Figure 24. Prélèvement de racines au niveau des plantations de jujubiers. | 102 |
| Figure 25. Amplification du gène 18S à partir des échantillons d'ADN extraits des racines de jujubiers. | 107 |
| Figure 26. Richesse des communautés de CMA en fonction de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée.. | 109 |
| Figure 27. Diversité des communautés de CMA en fonction de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée.. | 109 |
| Figure 28. Abondance relative des familles de CMA détectées dans les racines de <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Amally. | 112 |
| Figure 29. Abondance relative des genres de CMA détectés dans les racines de <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Amally. | 113 |
| Figure 30. Abondance relative des familles de CMA détectées dans les racines de <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Keur Mangari. | 120 |

| | |
|--|-----|
| Figure 31. Abondance relative des genres de CMA détectés dans les racines de <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Keur Mangari. | 121 |
| Figure 32. Alignement des séquences <i>RPB1</i> de <i>R. irregularis</i> disponibles dans GenBank et de la séquence <i>RPB1</i> obtenue à partir de <i>R. irregularis</i> IR27.. | 135 |
| Figure 33. Arbre phylogénétique de la souche inoculée <i>R. irregularis</i> IR27 avec des séquences de références du gène <i>RPB1</i> de la base de données NCBI. | 140 |
| Figure 34. Amplification des Eucaryotes dans les racines de <i>Z. mauritiana</i> avec le couple d’amorces spécifiques LR1/NDL22. | 141 |
| Figure 35. Amplification des Gloméromycètes dans les racines de <i>Z. mauritiana</i> avec le couple d’amorces spécifiques FLR3/FLR4. | 141 |
| Figure 36. Amplification de la souche inoculée <i>R. irregularis</i> IR27 avec le couple d’amorces spécifiques <i>RPB_GA-F/RPB_DvT922</i> dans les racines de <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Keur Mangari. | 142 |
| Figure 37. Amplification de la souche inoculée <i>R. irregularis</i> IR27 avec le couple d’amorces spécifiques <i>RPB_GA-F/RPB_DvT922</i> dans les racines de la provenance Gola en plantation à Amally. | 143 |
| Figure 38. Amplification de la souche inoculée <i>R. irregularis</i> IR27 avec le couple d’amorces spécifiques <i>RPB_GA-F/RPB_DvT922</i> dans les racines de la provenance Tasset en plantation à Amally. | 143 |
| Figure 39. Quantification par qPCR de l’intensité de la colonisation racinaire des jujubiers inoculés avec <i>R. irregularis</i> IR27 par rapport à la population indigène de <i>R. irregularis</i> après 24 mois de plantation à Keur Mangari. | 144 |
| Figure 40. Quantification par qPCR de l’intensité de la colonisation racinaire des jujubiers (Gola) inoculés avec <i>R. irregularis</i> IR27 par rapport à la population indigène de <i>R. irregularis</i> après 13 mois de plantation à Amally. | 145 |
| Figure 41. Quantification par qPCR de l’intensité de la colonisation racinaire des jujubiers (Tasset) inoculés avec <i>R. irregularis</i> IR27 par rapport à la population de <i>R. irregularis</i> après 13 mois de plantation à Amally. | 145 |

LISTE DES PLANCHES

| | |
|--|----|
| Planche 1. Aspect morphologique de <i>Ziziphus mauritiana</i> Lam. A : arbre adulte, B : rameau portant des fruits..... | 34 |
| Planche 2. Aspect morphologique de <i>Ziziphus lotus</i> (L.) Lam., A : arbres adultes dans une steppe désertique, B : rameaux contenant des feuilles et des fleurs..... | 36 |
| Planche 3. Aspect morphologique de <i>Ziziphus amphibia</i> A. Chev., A : arbuste dans son aire de distribution, B : feuilles et fleurs, C : fruits, D : endocarpes. | 37 |
| Planche 4. Aspect d'un pied de <i>Ziziphus spina-christi</i> (L) Desf., A : arbre adulte, B : écorce, C : feuilles et fruits. | 38 |
| Planche 5. <i>Ziziphus mucronata</i> Willd., A : arbre adulte, B : rameaux, feuilles et fruits..... | 39 |
| Planche 6. <i>Ziziphus abyssinica</i> A. Rich., A : feuilles et fleurs, B : fruits. | 40 |
| Planche 7. Aspect morphologique de <i>Ziziphus sphaerocarpa</i> Tul., A : arbre adulte, B : fruits. | 41 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. Origines des semences des différentes espèces de <i>Ziziphus</i> | 46 |
| Tableau 2. Origines des différentes provenances de semences de <i>Z. mauritiana</i> | 47 |
| Tableau 3. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la croissance, la dépendance mycorhizienne, la mycorhization et la longueur de hyphes chez les 7 espèces de <i>Ziziphus</i> | 53 |
| Tableau 4. Effet de l'inoculation avec les CMA sur les teneurs en P et K des 7 espèces de <i>Ziziphus</i> | 55 |
| Tableau 5. Coefficients de corrélation (r) entre la longueur des hyphes, l'intensité de mycorhization, la dépendance mycorhizienne, le ratio BR/BA et les teneurs en P et en K des feuilles des espèces de <i>Ziziphus</i> | 56 |
| Tableau 6. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la croissance, la dépendance mycorhizienne, la mycorhization et la longueur de hyphes chez les 6 provenances de <i>Z. mauritiana</i> | 59 |
| Tableau 7. Effet de l'inoculation avec les CMA sur les concentrations en P et K des feuilles des 6 provenances de <i>Z. mauritiana</i> | 61 |
| Tableau 8. Coefficients de corrélation (r) entre la longueur des hyphes, l'intensité de mycorhization, la dépendance mycorhizienne, le ratio BR/BA et les teneurs en P et en K des feuilles des provenances de <i>Z. mauritiana</i> | 62 |
| Tableau 9. Composition chimique des sols des sites d'étude. | 74 |
| Tableau 10. Dilution des échantillons de sol avec du sol stérilisé de Sangalkam. | 75 |
| Tableau 11. Potentiels mycorhiziens des sols des sites d'étude..... | 76 |
| Tableau 12. Effet de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance, la mycorhization et la nutrition minérale des jujubiers après 4 mois de croissance en serre..... | 82 |
| Tableau 13. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance et la survie des jujubiers après 3 et 8 mois en plantation à Amally. | 84 |
| Tableau 14. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance, le taux de survie et la mycorhization des jujubiers après 13 mois en plantation à Amally. | 85 |
| Tableau 15. Coefficients de corrélation (r) entre les paramètres de croissance et l'intensité de mycorhization des jujubiers en plantation à Amally. | 86 |
| Tableau 16. Impact de l'inoculation sur la croissance et le taux de survie des jujubiers après 4 et 8 mois en plantation à Keur Mangari. | 89 |
| Tableau 17. Impact de l'inoculation sur la croissance et le taux de survie des jujubiers après 12 et 18 mois en plantation à Keur Mangari. | 90 |
| Tableau 18. Impact de l'inoculation sur la croissance et la mycorhization des jujubiers après 24 et 30 mois en plantation à Keur Mangari. | 91 |
| Tableau 19. Coefficients de corrélation (r) entre les paramètres de croissance, l'intensité de mycorhization et la production fruitière des jujubiers en plantation à Keur Mangari. | 92 |
| Tableau 20. Impact de l'inoculation sur la production fruitière des jujubiers évalué en 2014 (18 mois en plantation) et en 2015 (30 mois en plantation) à Keur Mangari. | 94 |
| Tableau 21. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la diversité alpha des communautés de CMA associés à <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Amally. | 108 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 22. Impact des facteurs (provenance, inoculation et fertilisation) et de leur interaction sur la structure des communautés de CMA associés à <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Amally. | 111 |
| Tableau 23. OTU indicatrices des facteurs provenance, inoculation et fertilisation au niveau des plantations à Amally. | 115 |
| Tableau 24. Impact de l'inoculation sur la diversité- α des communautés de CMA associés à <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Keur Mangari. | 117 |
| Tableau 25. Impact des facteurs (provenance et inoculation) et de leur interaction sur la structure des communautés de CMA associés à <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Keur Mangari. | 119 |
| Tableau 26. OTU indicatrices des facteurs provenance et inoculation au niveau des plantations de Keur Mangari. | 123 |
| Tableau 27. Liste des amorces utilisées. | 134 |

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| CHAPITRE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 5 |
| I. La symbiose mycorhizienne..... | 5 |
| I.1. Généralités..... | 5 |
| I.2. Les mycorhizes à arbuscules (MA) | 7 |
| I.2.1. Partenaire végétal..... | 7 |
| I.2.2. Etablissement de la symbiose MA..... | 7 |
| I.2.3. Rôle des MA | 9 |
| I.3. Dépendance mycorhizienne..... | 12 |
| II. Etude de la diversité des CMA | 14 |
| II.1. Morphologie des CMA..... | 14 |
| II.2. Taxonomie et phylogénie des CMA..... | 17 |
| II.3. Emergence de la taxonomie moléculaire..... | 21 |
| II.4. Marqueurs génétiques..... | 22 |
| II.4.1. Diversité interspécifique..... | 22 |
| II.4.2. Diversité intraspécifique..... | 25 |
| II.5. Méthodes de séquençage haut-débit..... | 26 |
| II.5.1. Technologie 454 Life Sciences..... | 27 |
| II.5.2. Technologie CRT Solexa/illumina | 27 |
| III. Stratégies d'ingénierie écologique basées sur l'utilisation des CMA pour l'amélioration de la productivité végétale..... | 30 |
| III.1. Utilisation des plantes nurses..... | 30 |
| III.2. Mycorhization contrôlée | 31 |
| IV. Les jujubiers | 32 |
| IV.1. Généralités | 32 |
| IV.2. Systématique..... | 33 |
| IV.3. Présentation des espèces étudiées..... | 33 |
| IV.3.1. <i>Ziziphus mauritiana</i> Lam. | 34 |
| IV.3.2. <i>Ziziphus lotus</i> (L.) Lam. | 36 |
| IV.3.3. <i>Ziziphus amphibia</i> A. Chev..... | 37 |
| IV.3.4. <i>Ziziphus spina-christi</i> (L.) Desf. | 38 |
| IV.3.5. <i>Ziziphus mucronata</i> Willd..... | 39 |
| IV.3.6. <i>Ziziphus abyssinica</i> A. Rich..... | 40 |
| IV.3.7. <i>Ziziphus sphaerocarpa</i> Tul. | 41 |

| | |
|--|-----------|
| IV.4. Domestication de <i>Ziziphus mauritiana</i> Lam..... | 42 |
| CHAPITRE II. REPONSES A L'INOCULATION AVEC DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES DE DIFFERENTES ESPECES DE <i>ZIZIPHUS</i> ET DE PROVENANCES DE <i>Z. MAURITIANA</i> EN SERRE | 44 |
| I. Introduction | 44 |
| II. Matériel et méthodes..... | 45 |
| II.1. Préparation du sol..... | 45 |
| II.2. Matériel fongique | 45 |
| II.3. Matériel végétal..... | 46 |
| II.4. Mesure de la hauteur, de la biomasse totale et de la dépendance mycorhizienne..... | 48 |
| II.5. Evaluation du taux de mycorhization des plants inoculés..... | 49 |
| II.6. Dosage des teneurs en P et en K des feuilles | 49 |
| II.7. Mesure de la longueur des hyphes | 49 |
| II.8. Analyses statistiques des données | 50 |
| III. Résultats..... | 50 |
| III.1. Effet de l'inoculation avec les CMA sur l'intensité de mycorhization et la longueur des hyphes chez les 7 espèces de <i>Ziziphus</i> | 50 |
| III.2. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la croissance et la dépendance mycorhizienne des 7 espèces de <i>Ziziphus</i> | 51 |
| III.3. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la nutrition minérale des 7 espèces de <i>Ziziphus</i> | 52 |
| III.4. Effet de l'inoculation avec les CMA sur l'intensité de mycorhization et la longueur des hyphes chez les 6 provenances de <i>Z. mauritiana</i> | 56 |
| III.5. Effet de l'inoculation avec des CMA sur la croissance et la dépendance mycorhizienne des 6 provenances de <i>Z. mauritiana</i> | 57 |
| III.6. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la nutrition minérale des 6 provenances de <i>Z. mauritiana</i> | 57 |
| IV. Discussion | 63 |
| V. Conclusion | 66 |
| CHAPITRE III. IMPACT DE L'INOCULATION AVEC <i>R. IRREGULARIS</i> IR27 SUR LA CROISSANCE, LA SURVIE ET LA PRODUCTION FRUITIERE DE <i>Z. MAURITIANA</i> | 67 |
| I. Introduction | 67 |
| II. Matériel et méthodes..... | 68 |
| II.1. Production de plants de jujubiers en serre..... | 68 |
| II.2. Evaluation de paramètres de croissance, de mycorhization et de nutrition minérale | 71 |
| II.3. Sites d'étude | 72 |
| II.3.1. Amally | 72 |

| | |
|--|------------|
| II.3.2. Keur Mangari..... | 73 |
| II.4. Caractérisation des sols des sites d'étude..... | 74 |
| II.4.1. Caractéristiques chimiques des sols | 74 |
| II.4.2. Potentiel mycorhizien des sols | 74 |
| II.5. Dispositifs expérimentaux..... | 76 |
| II.5.1. Amally | 76 |
| II.5.2. Keur Mangari..... | 77 |
| II.6. Evaluation des paramètres de croissance et de l'intensité de mycorhization..... | 79 |
| II.7. Evaluation de la production fruitière..... | 79 |
| II.8. Analyses statistiques des données | 79 |
| III. Résultats..... | 80 |
| III.1. Effet de l'inoculation sur la croissance, le taux de mycorhization et la nutrition minérale de <i>Z. mauritiana</i> en serre | 80 |
| III.1.1. Effet sur la croissance | 80 |
| III.1.2. Effet sur le taux de mycorhization | 81 |
| III.1.3. Effet sur la nutrition minérale | 81 |
| III.2. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance, la survie et la mycorhization de <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Amally | 83 |
| III.3. Corrélation entre les paramètres mesurés après 13 mois de plantation à Amally.... | 83 |
| III.4. Impact de l'inoculation sur la croissance, la survie et la mycorhization de <i>Z. mauritiana</i> en plantation à Keur Mangari..... | 87 |
| III.5. Corrélation entre les paramètres mesurés après 30 mois de plantation à Keur Mangari..... | 88 |
| III.6. Impact de l'inoculation sur la production fruitière de <i>Z. mauritiana</i> à Keur Mangari | 92 |
| IV. Discussion | 95 |
| V. Conclusion | 98 |
| CHAPITRE IV. IMPACT DE L'INOCULATION SUR LA DIVERSITE DES COMMUNAUTES DE CMA NATIFS ASSOCIES A <i>Z. MAURITIANA</i> EN PLANTATION | 100 |
| I. Introduction..... | 100 |
| II. Matériel et méthodes..... | 101 |
| II.1. Echantillonnage des racines de <i>Z. mauritiana</i> | 101 |
| II.2. Caractérisation moléculaire des CMA associés aux racines de <i>Z. mauritiana</i> | 102 |
| II.2.1. Extraction d'ADN total de racines | 102 |
| II.2.2. Amplification de la région 18S de l'ADNr par PCR..... | 103 |
| II.2.3. Purification des produits PCR et dosage au Nanodrop..... | 104 |

| | |
|---|------------|
| II.2.4. Séquençage massif du 18S avec la technologie Illumina MiSeq | 104 |
| II.3. Traitement bio-informatique des données | 105 |
| II.4. Analyses statistiques | 106 |
| III. Résultats..... | 106 |
| III.1. Caractérisation moléculaire des CMA associés aux racines de jujubiers | 106 |
| III.2. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la diversité alpha des communautés de CMA natifs à Amally..... | 107 |
| III.3. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la bêta-diversité des communautés de CMA natifs en plantation à Amally | 110 |
| III.3.1. Composition taxonomique des communautés de CMA | 110 |
| III.3.2. Structure des communautés de CMA..... | 110 |
| III.3.3. OTU indicatrices de la provenance, de l'inoculation et de la fertilisation | 114 |
| III.4. Impact de l'inoculation sur la diversité alpha des communautés de CMA natifs en plantation à Keur Mangari | 117 |
| III.5. Impact de l'inoculation sur la bêta-diversité des communautés de CMA natifs en plantation à Keur Mangari | 118 |
| III.5.1. Composition taxonomique des communautés de CMA | 118 |
| III.5.2. Structure des communautés de CMA..... | 118 |
| III.5.3. OTU indicatrices de la provenance et de l'inoculation à Keur Mangari..... | 122 |
| IV. Discussion | 125 |
| V. Conclusion..... | 129 |
| CHAPITRE V. PERSISTANCE DE <i>R. IRREGULARIS</i> IR27 DANS LES RACINES DE <i>Z. MAURITIANA</i> EN PLANTATION..... | 130 |
| I. Introduction | 130 |
| II. Matériel et méthodes..... | 132 |
| II.1. Echantillonnage des racines de <i>Z. mauritiana</i> en plantation..... | 132 |
| II.2. Caractérisation moléculaire de <i>R. irregularis</i> IR27 | 132 |
| II.2.1. Extraction de spores..... | 132 |
| II.2.2. Extraction d'ADN de spores..... | 132 |
| II.2.3. Amplification du gène <i>RPB1</i> et séquençage..... | 133 |
| II.2.4. Analyses phylogénétiques de la séquence <i>RPB1</i> de <i>R. irregularis</i> IR27 | 135 |
| II.2.5. Construction d'amorce spécifique à <i>R. irregularis</i> IR27 | 135 |
| II.3. Traçage moléculaire de <i>R. irregularis</i> IR27 dans les racines de <i>Z. mauritiana</i> | 136 |
| II.3.1. Extraction d'ADN total des racines | 136 |
| II.3.2. PCR de vérification de l'extraction d'ADN | 136 |
| II.3.3. Détection des CMA dans les racines | 136 |

| | |
|---|------------|
| II.3.4. Détection de <i>R. irregularis</i> IR27 dans les racines | 137 |
| II.3.5. Quantification de la colonisation racinaire de <i>R. irregularis</i> IR27 | 137 |
| III. Résultats..... | 139 |
| III.1. Caractérisation moléculaire de <i>R. irregularis</i> IR27 | 139 |
| III.2. Persistance de <i>R. irregularis</i> IR27 dans les racines de <i>Z. mauritiana</i> | 141 |
| III.3. Quantification de la colonisation racinaire par <i>R. irregularis</i> | 144 |
| IV. Discussion | 146 |
| V. Conclusion | 149 |
| DISCUSSION GENERALE..... | 150 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... | 157 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 160 |
| ANNEXES..... | A |
| Annexe 1. Caractéristiques physico-chimiques du sol de Sangalkam..... | A |
| Annexe 2. Liste des publications | B |
| Annexe 3. Liste des communications | D |
| Annexe 4. Films scientifiques | L |

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Dans la zone sahélienne, la principale menace environnementale est la désertification (Ozer *et al.*, 2010). Elle se traduit par la dégradation des propriétés physico-chimiques et biologiques des sols et par la disparition du couvert végétal. La désertification provoque l'insécurité alimentaire qui pousse les populations vulnérables à la migration. Pour fixer les populations dans leur terroir et lutter contre la désertification, il est important de développer des productions agricoles et forestières afin de restaurer les écosystèmes et satisfaire leurs besoins alimentaires et générer des revenus. Le projet panafricain « Grande Muraille Verte » (GMV) est un exemple de restauration écologique et de développement socio-économique intégré qui répond à ces préoccupations dans les zones arides (Dia & Niang, 2010). Il regroupe 11 pays d'Afrique de Dakar à Djibouti (Sénégal, Mauritanie, Mali, Burkina Faso, Niger, Nigeria, Tchad, Soudan, Ethiopie, Erythrée, Djibouti) sur un tracé de 7100 km de long et de 15 km de large. Au Sénégal, l'Agence Nationale de la GMV (ANGMV) développe dans le Ferlo des activités de reboisement avec des espèces forestières dites prioritaires (ex. *Acacia senegal*, *Balanites aegyptiaca*, *Ziziphus mauritiana*), des activités d'arboriculture fruitière (ex. *Z. mauritiana* variété Gola) et des activités de maraîchage associant des groupements féminins dans des jardins polyvalents irrigués par un système goutte à goutte grâce à la proximité d'un forage. L'arboriculture fruitière (ex. jujubier, manguier) est également développée dans des vergers de producteurs privés de la zone du Bassin Arachidier qui couvre le centre ouest du Sénégal. Le Bassin Arachidier possède une longue tradition de cultures vivrières (mil, niébé, etc.) et arachidière sous pluie sur des sols ferrugineux tropicaux. En concentrant près de 60% de la population rurale, cette zone occupe une bonne partie de la production agricole au Sénégal. Avec la pression démographique et le faible niveau d'utilisation des engrais chimiques, les sols deviennent de plus en plus pauvres en nutriments (P en particulier) et très vulnérables à l'érosion avec la destruction du couvert végétal ligneux. Il en résulte une baisse de la productivité dans les sols en particulier quand ils sont soumis à la monoculture.

Dans la zone soudano-sahélienne, les fruitiers forestiers sont des arbres dits « négligés » malgré leur grand intérêt alimentaire et économique (Awodoyin *et al.*, 2015). Leurs fruits comestibles riches en vitamines, sucres et oligo-éléments, participent à l'équilibre nutritionnel des populations (Assobadjo, 2006). Les fruitiers forestiers sont également des espèces à usages multiples dans les systèmes agroforestiers des zones aride et semi-aride de l'Afrique de l'Ouest (Bâ *et al.*, 2000). Ils fournissent des fruits qui sont également une source de revenus non négligeable pour les populations, notamment en période de soudure (De Caluwé

et al., 2010). Dans le cadre des programmes de lutte contre la désertification mis en place au Sénégal, un accent particulier est mis sur la promotion d'espèces à plus-value économique parmi lesquelles les essences fruitières. Ces programmes permettent de concilier au mieux les impératifs environnementaux (ex. restauration du couvert végétal) et socio-économiques (ex. lutte contre la pauvreté, malnutrition). Dans ce contexte, un fruitier forestier d'intérêts qui est le *Ziziphus mauritiana* Lam., communément appelé jujubier, a retenu notre attention. *Z. mauritiana* est une essence alimentaire utilisée pour le reboisement. Des études menées au Burkina Faso, au Mali, au Niger et au Sénégal ont révélé que le jujubier figure parmi les 10 espèces les plus prisées par les agriculteurs (Bonkougou *et al.*, 1998). Le jujubier joue également un rôle important dans la conservation des sols en raison de la vigueur de son système racinaire (Depommier, 1988 ; Arndt, 2001). Il est aussi planté comme haie vive pour protéger les cultures pendant la saison sèche. En Afrique de l'Ouest, les producteurs sont intéressés par les variétés indiennes de jujubiers en raison de leur fructification précoce, du goût et de la grosse taille des fruits (Danthu *et al.*, 2004). Cependant, la petite taille des fruits de cultivars locaux (1 à 2 g par fruit) et leur sensibilité aux attaques et aux ravageurs limitent leur culture (Ouédraogo, 1998 ; Diallo *et al.*, 2000). En Asie, la domestication de *Z. mauritiana* date de plusieurs décennies et plus de 300 cultivars ont été enregistrés (Azam-Ali *et al.*, 2006). Pour une meilleure domestication du jujubier, des méthodes de multiplication végétative horticoles (greffage) et *in vitro* (microgreffage) ont donné des résultats satisfaisants au Sénégal (Danthu *et al.*, 2002). Plusieurs approches ont pu être envisagées pour améliorer le jujubier: (i) la conservation de la ressource, (ii) la multiplication végétative par le clonage d'individus repérés *in situ* pour la qualité de leur fruit, (iii) le greffage, (iv) l'introduction de variétés d'arbres fruitiers domestiquées et productives, (v) la création par hybridation de variétés améliorées qui peuvent être caractérisées du point de vue moléculaire (Okafor, 1991 ; Leaky, 1998 ; 1999). Par ailleurs, l'utilisation de certaines techniques sylvicoles adaptées à la gestion des espèces fruitières forestières permet également d'améliorer la production. Il s'agit des techniques de taille de l'arbre, d'irrigation, de fertilisation phosphatée avec des engrais solubles ou des phosphates naturels et de la mycorhization contrôlée (Bajwa *et al.*, 1988 ; Depommier, 1988 ; Bonkougou *et al.*, 1989 ; Garbaye, 1991 ; Smith & Read, 1997 ; Bâ *et al.*, 2000 ; Bâ *et al.*, 2003). L'une des techniques prometteuses qui peut être utilisée dans la domestication des arbres fruitiers indigènes est l'inoculation avec les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA). Plusieurs études ont montré l'importance de la symbiose mycorhizienne pour la croissance et la nutrition hydrique et minérale de ces arbres fruitiers (Guissou *et al.*, 1998b ; Mathur & Vyas 2000 ; Bâ *et al.*, 2000, 2001 ; Sidibé *et al.*, 2012 ;

Guissou *et al.*, 2016). Des tests de mycorhization avec le champignon *Rhizophagus irregularis* IR27 (syn. *Glomus aggregatum* isolat IR27 ; Bâ *et al.*, 1996) menés sur 11 fruitiers sahéliens, ont montré que le jujubier répondait le mieux pour sa croissance, sa nutrition phosphatée et sa capacité à résister au stress hydrique (Bâ *et al.*, 2000 ; Guissou *et al.*, 1998b). Cependant, toutes ces études ont été limitées en pépinière et ne permettaient pas d'élucider le rôle des CMA dans l'amélioration de la production fruitière. Par ailleurs, il a été démontré que *R. irregularis* IR27 permet au jujubier de mobiliser efficacement le phosphore (P) des phosphates naturels (PN) ouest africains (Guissou *et al.*, 1998a ; Bâ *et al.*, 2001). Le Sénégal dispose de ressources en PN en particulier celui de Matam (30% de P₂O₅) qui est le plus réactif des PN. Il est bien établi que les sols ouest-africains sont très souvent carencés en phosphore biodisponible (Koide, 1991 ; Azcon & Barea, 1997). De manière générale, la faible disponibilité du phosphore limite considérablement la nutrition phosphatée des plantes et la productivité végétale. Dans ce contexte de faible disponibilité en P des sols, l'utilisation des PN serait une alternative pour la reconstitution des réserves en P et l'amélioration de la production fruitière du jujubier (Ouédraogo *et al.*, 2006).

Du fait que des variétés améliorées du jujubier ont déjà été diffusées (Danthu *et al.*, 2002), le développement d'une stratégie d'ingénierie écologique basée sur la mycorhization permettrait d'augmenter son rendement et de restaurer la fertilité des sols dégradés dans des vergers au Sénégal.

Ce travail de recherche a pour objectif général d'améliorer la croissance et la production fruitière de *Z. mauritiana* par l'inoculation mycorhizienne dans des vergers au Sénégal. Il s'articule autour de quatre objectifs spécifiques :

1° Evaluer les réponses à l'inoculation avec des CMA de différentes espèces de *Ziziphus* et de provenances de *Z. mauritiana* en conditions contrôlées ;

2° Evaluer l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la croissance, la survie et la production fruitière de *Z. mauritiana* ;

3° Evaluer l'impact de l'inoculation sur la diversité des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation ;

4° Déterminer la persistance de *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation.

Cette thèse est organisée en cinq chapitres :

Le **chapitre I** est consacré à la synthèse bibliographique qui présente l'état des connaissances sur le jujubier et ses espèces, l'établissement et la diversité des mycorhizes à arbuscules (MA) et les stratégies d'ingénierie écologique basées sur l'utilisation des CMA pour l'amélioration de la productivité végétale.

Le **chapitre II** traite la dépendance mycorhizienne de différentes espèces de *Ziziphus* et de provenances de *Z. mauritiana* en conditions contrôlées. Ce chapitre a fait en partie l'objet d'un article publié dans *Fruits, the International Journal of Tropical and Subtropical Horticulture*.

Le **chapitre III** porte sur l'évaluation de l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la croissance, la survie et la production fruitière de deux provenances de *Z. mauritiana*, Gola (variété indienne sélectionnée pour ses fruits de grosse taille) et Tasset (provenance locale à fruits de petite taille).

Le **chapitre IV** est consacré à l'évaluation de l'impact de l'inoculation sur la diversité des communautés de CMA natifs associés à *Z. mauritiana* en plantation.

Le **chapitre V** porte sur l'évaluation de la persistance de la souche inoculée *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation

Les chapitres III, IV et V feront l'objet d'un article dans *Frontiers in Microbiology*.

CHAPITRE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La symbiose mycorhizienne

I.1. Généralités

En milieu naturel, les plantes sont associées à des communautés microbiennes très denses autour de leur racine (Garbaye, 2013). Si les bactéries constituent de loin la plus grande diversité d'espèces dans ces communautés microbiennes, les champignons sont aussi très présents. Ainsi un gramme de sol naturel contiendrait près de 200 mètres d'hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2014). Parmi ceux-ci, plusieurs mètres sont constitués d'hyphes de champignons symbiotiques des plantes (van der Heijden *et al.*, 1998). Ces champignons symbiotiques sont associés aux racines des plantes pour former des mycorhizes (du grec « myco » pour champignon et « rhize » pour racine). Les mycorhizes sont les symbioses végétales les plus répandues dans les écosystèmes naturels ou cultivés (Smith & Read, 2008). L'interaction entre la plante et le champignon se traduit par la mise en place d'un réseau d'hyphes extramatriciel qui augmente la surface d'absorption de l'eau et de nutriments (ex. P, N) des racines (Smith & Read, 2008). Il existe plusieurs types de mycorhizes, mais les plus étudiées sont les ectomycorhizes et les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA) ou mycorhizes à arbuscules (MA) (Figure 1).

Les ectomycorhizes (du grec *ektos* : à l'extérieur) chez lesquelles les champignons se développent essentiellement autour de la racine, en formant un manteau mycélien ; de ce manteau part des hyphes qui se développent entre les cellules corticales de la racine pour former le réseau de Hartig sans jamais traverser la paroi de ces dernières (Figure 1). Les champignons ectomycorhiziens appartiennent aux Basidiomycètes (ex. Bolets, Russules, Laccaire) et aux Ascomycètes (ex. Truffes).

Les endomycorhizes à VA ou MA (du grec *endon* : à l'intérieur) sont caractérisées par l'absence de manchon mycélien externe et par la pénétration des hyphes fongiques dans l'espace périplasmique des cellules corticales (Figure 1). Les hyphes croient dans la racine de façon intercellulaire et intracellulaire, pour former des vésicules et des arbuscules.

Nous nous intéressons plus particulièrement aux MA qui constituent le type de mycorhize le plus répandu et le plus ancien remontant à la première apparition des plantes terrestres il y a environ 450 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000a). Ces champignons sont des symbiotes obligatoires non cultivables en l'absence de la plante-hôte.

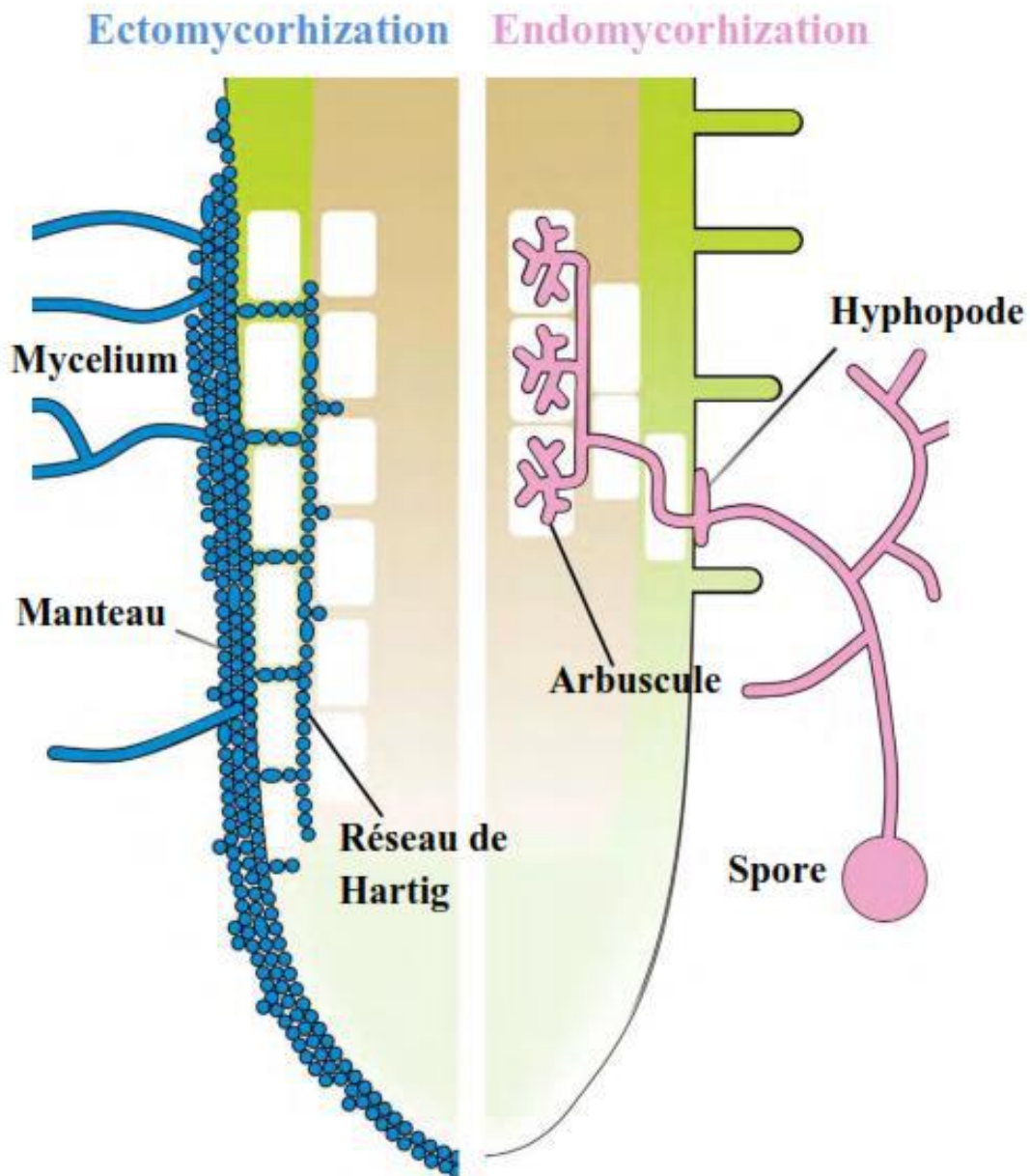


Figure 1. Structures des ectomycorhizes (bleu) et des endomycorhizes à arbuscules (rose) (Bonfante & Genre, 2010). Les champignons ectomycorhiziens forment le manteau, un amas d'hyphes qui entoure la racine jusqu'à l'apex en développant un réseau extraracinaire, et le réseau de Hartig, un réseau d'hyphes colonisant les espaces intercellulaires. Les champignons endomycorhiziens développent un hyphopode au point de contact avec la racine et des arbuscules dans l'espace périplasmique des cellules corticales. Dans ce cas, l'apex de la racine n'est pas colonisé.

I.2. Les mycorhizes à arbuscules (MA)

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) étant des symbiotes obligatoires, ils nécessitent impérativement une plante-hôte pour se développer et se reproduire (Garbaye, 2013). La symbiose MA concerne au moins 86% des plantes terrestres (Newman & Reddell, 1987 ; Wang & Qiu, 2006 ; Smith & Read, 2010). Les CMA forment un phylum monophylétique (Gehrig *et al.*, 1996 ; Schüßler, 1999 ; Redecker *et al.*, 2000a ; Schwarzott *et al.*, 2001) appelé *Glomeromycota* (Schüßler *et al.*, 2001b) et ils sont ubiquitaires des écosystèmes terrestres (Smith & Read, 1997).

I.2.1. Partenaire végétal

Chez les plantes terrestres, la mycorhization est la règle, la non-mycorhization l'exception. Un très grand nombre d'espèces sont capables d'interagir avec les CMA notamment les Bryophytes, les Lycopodes, les Monilophytes, les Gymnospermes et les Angiospermes (Wang & Qiu, 2006). Il existe, malgré tout, plusieurs familles de plantes incapables de réaliser cette symbiose comme les *Pinaceae* qui ne sont pas endomycorhizables mais interagissent avec d'autres champignons symbiotiques, les champignons ectomycorhiziens (Wang & Qiu, 2006). Les *Brassicaceae* non mycotrophes, comme la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ont souvent des poils racinaires plus longs, et donc une capacité naturelle plus grande à absorber l'eau et les nutriments (Bucher, 2007).

I.2.2. Etablissement de la symbiose MA

La mise en place de la symbiose endomycorhizienne à arbuscules se déroule en trois phases :

a) phase asymbiotique : au cours de cette phase, la spore, même en absence d'une plante hôte, peut germer spontanément (si les conditions physicochimiques sont favorables) et produire un ou plusieurs tubes germinatifs et quelques ramifications (Figure 2). La croissance du champignon, très limitée, ne durera que quelques jours et n'aura alors consommé que très peu des réserves carbonées contenues dans la spore (Bécard *et al.*, 2004).

b) phase présymbiotique : cette phase commence lorsque le partenaire fongique a perçu la présence de son hôte et active alors son métabolisme et sa croissance. Elle se poursuit ensuite par la reconnaissance de la présence du champignon par la plante. C'est donc une phase où sont échangés, avant le contact physique entre les partenaires, des signaux d'origines végétale

et fongique (Figure 2). Pendant cette phase les deux partenaires modifient leur métabolisme et leur expression génique. Cela peut conduire à la mise en place d'une réponse morphologique adaptée pour favoriser l'interaction, telle que la ramification des hyphes chez le champignon, et la formation des racines latérales chez la plante.

c) phase symbiotique : après le contact avec le partenaire végétal et afin de pénétrer dans la racine, le champignon MA forme un hyphopode à la surface de celle-ci (Figure 2). Si les conditions sont favorables, la plante répond positivement en développant dans la cellule de l'épiderme racinaire située au contact de l'hyphopode un appareil de pré-pénétration (PPA). Ce PPA, correspond à une profonde réorganisation du cytosquelette et forme une sorte de tunnel cytoplasmique dans lequel les hyphes du champignon s'immiscent (Genre *et al.*, 2005). La symbiose devient effective avec le développement d'une structure fongique particulière, l'arbuscule, formée au sein des cellules du cortex racinaire.

Le champignon colonise donc la racine avec son mycélium en formant des organes de réserves (les vésicules), des organes d'échange (les arbuscules) et des hyphes et des spores dans le sol. Toutes ces structures (spores, hyphes, vésicules, arbuscules, fragments de racines colonisées) sont des propagules de dissémination et de conservation dans le sol en l'absence de plante-hôte. La colonisation des racines de plantes s'effectue à partir des propagules fongiques et en particulier des spores présentes dans le sol. Des hyphes extra-radiculaires se développent aussi sur plusieurs centimètres à l'extérieur de la racine, explorant le sol aux alentours, et pouvant porter une multitude de spores.

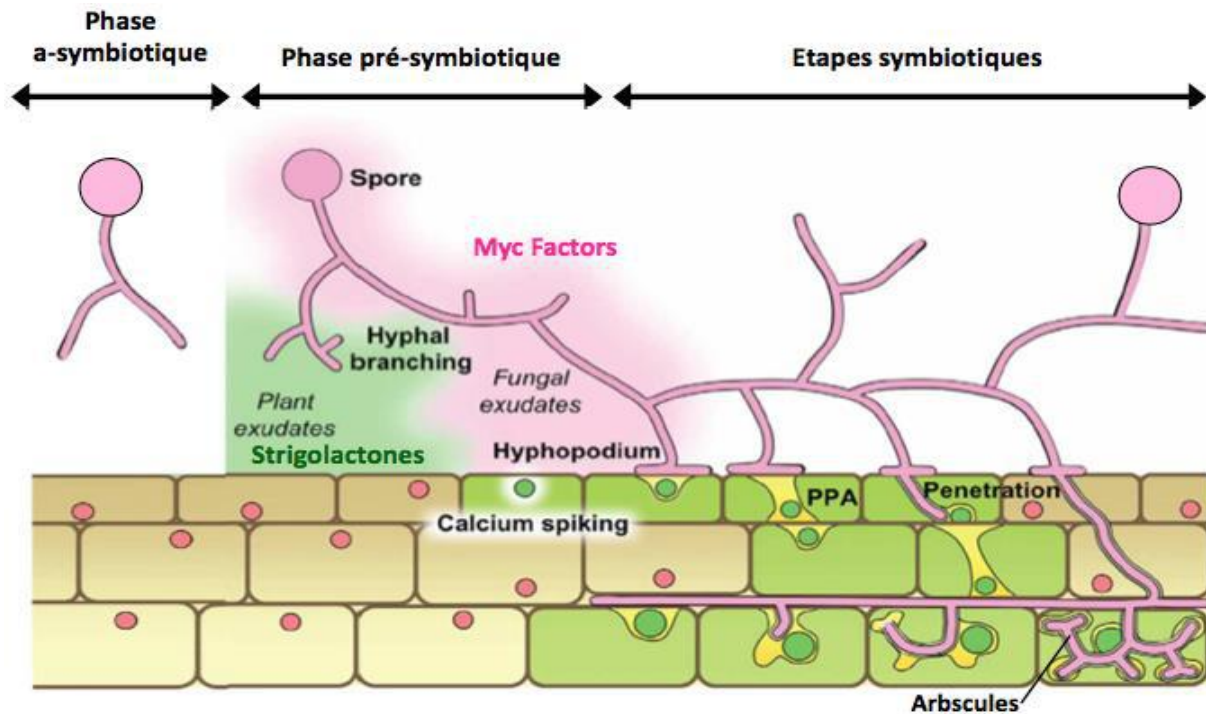


Figure 2. Les trois étapes de l'établissement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules (Bonfante & Genre, 2010). Durant la phase a-symbiotique la spore germe et développe quelques hyphes primaires sans la plante-hôte. La phase pré-symbiotique correspond à la reconnaissance des deux partenaires *via* des échanges de signaux (strigolactones et facteurs Myc). Le champignon entre alors en contact avec la racine de la plante par l'intermédiaire d'un hyphopode. Les étapes symbiotiques se traduisent par la formation de l'appareil de pré-pénétration (PPA) développé par la plante, le développement du réseau extraracinaire, la formation des spores et des arbuscules.

I.2.3. Rôle des MA

Si la symbiose MA est autant répandue dans le monde végétal, c'est parce qu'elle est bénéfique à la plante. En effet, les CMA favorisent la croissance et le développement des plantes grâce à une amélioration de la nutrition minérale et en particulier le phosphore biodisponible (Smith & Read, 2008). Ils permettent aussi aux plantes d'explorer au mieux les ressources en eau et de résister à des stress abiotiques (salin et hydrique).

I.2.3.1. Alimentation minérale

Le principal avantage pour la plante est donc une meilleure nutrition minérale en particulier en phosphore (Smith & Read, 2008). Il est bien établi que les CMA peuvent contribuer à une

amélioration significative de l'absorption de P par les plantes (Smith *et al.*, 2011). Les plantes mycorhizées reçoivent du phosphore du champignon et cela se traduit le plus souvent par une augmentation de la biomasse par rapport à des plantes non mycorhizées. L'effet est d'autant plus net que les plantes sont en conditions de carence phosphatée. Ceci s'accompagne souvent de teneurs en phosphore supérieures chez les plantes mycorhizées. Le phosphore est un des éléments nutritifs les plus importants pour la croissance des plantes car il intervient dans de nombreux processus métaboliques en particulier la perméabilité membranaire des racines. C'est aussi l'élément dont la concentration dans la plante est la plus fortement augmentée par la symbiose MA (Bolan, 1991 ; Smith & Read, 1997). Le phosphore est en effet prélevé sous forme de phosphate inorganique P_i par les plantes. Or cette forme minérale du phosphore est en quantité limitée dans le sol. La vitesse d'absorption du P_i est supérieure à celle de son renouvellement dans la solution du sol. De plus, la vitesse de diffusion du P_i est faible dans le sol. Il se crée ainsi une zone d'appauvrissement en P_i autour des poils absorbants. La présence du champignon est donc essentielle pour explorer le sol au-delà des poils absorbants afin de mobiliser le P_i dont la plante a besoin pour se développer (Smith & Smith, 2011).

D'autres macroéléments tels que l'azote, le magnésium, le calcium, le potassium et oligoéléments tels que le cuivre (Li *et al.*, 1991), le zinc ou encore le fer, sont mieux absorbés par la plante grâce aux CMA (Smith & Read, 2008). Dans certains sols acides ($pH < 5$), où les éléments Ca, Mg et K sont déficients, les plantes mycorhizées ont des concentrations foliaires en ces éléments supérieures aux plantes non mycorhizées (Clark, 1997). L'amélioration de l'absorption de ces éléments est associée à une augmentation de la biomasse des plantes mycorhizées. Néanmoins les effets observés sont variables selon les caractéristiques du sol (P assimilable, C organique, pH, CEC, texture, etc.) et l'association plante – champignon (Monzon & Azcón, 1996 ; Jakobsen *et al.*, 1992).

I.2.3.2. Alimentation hydrique

L'amélioration de la nutrition hydrique des plantes par l'intermédiaire des mycorhizes s'explique par un plus grand volume de sol exploré par les hyphes mycorhiziens (Strullu, 1991 ; Smith & Read, 1997 ; Auge, 2001). Les hyphes des CMA sont capables de baisser leur potentiel hydrique de manière à maintenir un flux d'eau de la solution du sol vers la racine des plantes (Auge, 2001). Les CMA renforceraient ainsi la résistance des plantes au stress hydrique (Auge, 2001). Il semblerait aussi que les CMA jouent un rôle direct dans l'acquisition de l'eau chez les plantes puisque des gènes codant pour des aquaporines,

protéines membranaires des cellules formant des canaux perméables aux molécules d'eau, ont été récemment détectés dans le génome de l'espèce fongique *Rhizophagus irregularis* (Tisserant *et al.*, 2013). Les hyphes externes des CMA sécrètent abondamment de la glomaline, une glycoprotéine, qui contribue à l'adhésion des constituants du sol entre eux et à améliorer ainsi la structure du sol.

I.2.3.3. Protection contre les agents pathogènes

L'interaction des CMA avec les autres organismes du sol en font un agent protecteur vis-à-vis du stress biotique provoqué par les pathogènes. Les MAs protègent la plante des dégâts causés aux racines par des nématodes (Elsen *et al.*, 2003), mais aussi par des champignons pathogènes tels que *Aphanomyces euteiches* (Thygesen *et al.*, 2004) et diverses bactéries pathogènes (Filion *et al.*, 1999). Cette protection des CMA contre les pathogènes est certainement liée à un ensemble de processus tels qu'une compétition pour la colonisation des racines et pour l'absorption des nutriments, une activation par le champignon des mécanismes de défense de la plante ou encore la production de substances fongiques perturbant le développement des pathogènes. Alors que le rôle de protection direct des CMA sur les plantes ne se fait que par la présence du réseau mycélien faisant office de barrière physique contre les microorganismes pathogènes, le rôle de protection indirect est plus vaste. En effet, ce rôle indirect passe par l'augmentation des défenses des plantes ou par l'augmentation de leurs tolérances face aux attaques pathogènes et autres stress. Il a été montré que des plantes mycorhizées sont plus résistantes à certains pathogènes racinaires (Whipps, 2004) mais aussi foliaires (Liu *et al.*, 2007 ; Campos-Soriano *et al.*, 2011).

I.2.3.4. Tolérance aux stress abiotiques

Les stress osmotiques (sécheresse et salinité) sont des stress abiotiques fréquemment rencontrés par les plantes et l'association avec les CMA permet de réduire les symptômes du stress en complément des mécanismes protecteurs intrinsèques de la plante (Ruiz-Lozano, 2003). L'état mycorhizé fournit aussi à la plante une meilleure résistance aux stress abiotiques comme le stress hydrique, salin ou la présence de métaux lourds (Al-Karaki, 2000 ; Aroca *et al.*, 2007 ; Hildebrandt *et al.*, 2007). La réponse des plantes mycorhizées en conditions de sécheresse se traduit par de meilleur taux de transpiration et de photosynthèse, une conductance stomatique et des teneurs en N et P dans les feuilles plus élevées et donc une

meilleure croissance que les plantes non mycorhizées (Ruiz-Lazono *et al.*, 1995). Par exemple, une augmentation de la densité des racines et une modification de leur morphologie suite à la colonisation par le champignon permet aux plantes mycorhizées de prélever beaucoup plus d'eau que celles non mycorhizées en condition de stress hydrique (Davies *et al.*, 1992, 1996). D'autre part, la salinité peut affecter aussi bien la plante-hôte que le symbiote fongique. Les CMA généralement observés en conditions de stress salin sont du genre *Glomus* (Wang *et al.*, 2004 ; Manga *et al.*, 2005). Sous ces conditions il a été observé une croissance plus importante chez les plantes inoculées comparées aux plantes non inoculées (Giri *et al.*, 2003 ; Sannazzaro *et al.*, 2007 ; Zuccarini & Okurowska, 2008). Des résultats similaires ont été obtenus par Diouf *et al.* (2005) qui ont montré que la double inoculation champignon et bactérie fixatrice d'azote (*Bradyrhizobium*) confère une meilleure résistance au stress salin à *Acacia mangium* et *Acacia auriculiformis*.

I.3. Dépendance mycorhizienne

La notion de dépendance mycorhizienne (DM), utilisée pour la première fois par Plenchette *et al.* (1983), exprime le degré de réponse d'une plante à l'inoculation mycorhizienne. Elle est calculée en utilisant l'équation suivante : [(masse sèche des plants mycorhizés – masse sèche des plants non mycorhizés)/masse sèche des plants mycorhizés] x 100 selon Plenchette *et al.* (1983). C'est une caractéristique génotypique des plantes qui varie non seulement en fonction des espèces, mais aussi des cultivars. La DM est aussi modulée par la teneur en phosphore du sol. Moins il y a d'ions phosphates dans la solution du sol, plus la plante peut bénéficier de l'association mycorhizienne. Cependant, il faut bien noter que la réponse d'une plante à la mycorhization dépendra d'un certain nombre de facteurs, dont, entre autres, la souche fongique en présence (Plenchette *et al.*, 1983 ; Miller *et al.*, 1985 ; van der Heijden *et al.*, 1998) et le niveau de dépendance mycorhizienne de la plante-hôte fortement lié à la fertilité du sol (Janos, 1980 ; Plenchette *et al.*, 1983 ; Brundrett, 1991 ; Smith & Read, 1997). On s'aperçoit ainsi que certaines espèces répondent en moyenne peu à la symbiose, comme le blé, alors que d'autres sont si dépendantes que leur développement complet n'est possible qu'en association avec des CMA, comme les arbres fruitiers. Par exemple, la réponse à l'inoculation du jujubier (*Z. mauritiana*) avec des CMA diffère en fonction de la colonisation racinaire, de l'absorption de nutriments et des caractères morphologiques des racines (Guissou *et al.*, 1998b ; Mathur & Vyas, 2000 ; Bâ *et al.*, 2000, 2001 ; Sidibé *et al.*, 2012). La DM de *Z. mauritiana* peut atteindre un maximum de 78% (Bâ *et al.*, 2000). Des résultats similaires ont

été trouvés par Guissou *et al.* (2001) et Sidibé *et al.* (2012). Bâ *et al.* (2001, 2003) ont conclu que l'absence de mycorhizes chez les plants de *Z. mauritiana* en pépinière pourrait conduire à une mortalité élevée des plants après transplantation. Des études ont montré que les espèces végétales peuvent différer dans leur réactivité vis-à-vis des CMA (Klironomos, 2003 ; Tawaraya, 2003). Suivant la colonisation par les CMA, certaines espèces présentent des avantages majeurs en termes de croissance tandis que d'autres montrent une croissance très réduite.

L'influence des MA se traduit par une stimulation de la croissance de la plante-hôte. Beaucoup d'études ont montré que la plupart des plantes dépendent des mycorhizes pour une meilleure croissance dans le sol, à un niveau de fertilité donnée (Jaizme-Vega & Azcon, 1995). Chez les arbres fruitiers, Bâ *et al.* (2000) ont montré que le jujubier s'est révélé être l'espèce fruitière qui répond le mieux à la mycorhization avec le champignon MA *Glomus aggregatum*. Ainsi, en comparant la dépendance mycorhizienne du jujubier à celle de douze autres arbres fruitiers forestiers, leurs résultats permettent de conforter le choix du jujubier utilisé comme plante-

modèle dans l'étude des interactions entre arbres fruitiers et microorganismes. Hetrick *et al.* (1996) ont montré que la dépendance mycorhizienne serait positivement corrélée avec la dépendance de l'absorption du phosphore lorsque la concentration de phosphore disponible dans le sol est le facteur limitant pour la croissance de la plante. La capacité d'acquisition et l'utilisation efficace du phosphore par la plante-hôte peuvent déterminer la dépendance mycorhizienne. Il est bien établi que la symbiose MA se produit principalement sous de faibles niveaux du statut nutritionnel de la plante (principalement P) ou de faible niveau de fertilité des sols (Smith & Read, 2008). En outre, la dépendance des plantes vis-à-vis des CMA pour les éléments nutritifs du sol pourrait dépendre de l'architecture des racines et principalement des poils absorbants (Baylis, 1975). Selon l'hypothèse de Baylis (1975), le CMA peut donc être très bénéfique en augmentant le volume de sol exploré permettant une absorption adéquate de l'eau et des nutriments tels que le phosphate (Schreiner, 2005). Toutefois, Maherali *et al.* (2014) ont montré que l'architecture racinaire est peu susceptible de limiter la variation de la réponse de croissance des plantes à la colonisation par les CMA. Garbaye (2013) a montré que chaque espèce végétale s'associe préférentiellement aux CMA qui lui sont le plus favorables en termes de stimulation de croissance. L'efficacité des symbioses à transmettre le phosphore du sol à la plante semble jouer un rôle dans ce processus, puisque les espèces ou les variétés végétales qui répondent le plus à la fertilisation

phosphatée sont souvent aussi très dépendantes de la symbiose. Cependant, le caractère physiologique et génétique de la dépendance mycorhizienne reste encore à élucider (Johnson *et al.*, 1997). On est très loin de pouvoir se faire une idée claire des facteurs et des mécanismes qui déterminent les différences de DM entre plantes, en partie du fait des grandes difficultés expérimentales rencontrées pour faire la part de l'extension du système racinaire, de son degré de colonisation fongique et de l'importance du mycélium extra-racinaire dans l'amélioration de la nutrition minérale de la plante.

II. Etude de la diversité des CMA

L'utilisation des CMA en foresterie ou en agriculture durable nécessite la compréhension de la diversité et de la dynamique de ces champignons dans leur environnement naturel (Gianinazzi *et al.*, 2010). Durant les dernières décennies, la taxonomie classique, basée sur les observations morpho-anatomiques des spores (Rosendahl *et al.* 1994 ; Morton & Benny, 1990), a profité des percées moléculaires à travers l'analyse moléculaire de l'ADN basée sur l'amplification des régions ribosomiques (ex. 18S) par PCR pour mieux définir les espèces voire les taxons moléculaires. Grâce aux outils de la biologie moléculaire, toute la classification des CMA a été revue. A l'état actuel, il y a 240 espèces de Gloméromycètes décrites (<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>; 2 janvier 2013) et la taxonomie est constamment mise à jour : de nouvelles espèces sont régulièrement décrites et des taxons supérieurs sont également réorganisés (Schüßler et Walker 2010 ; Oehl *et al.*, 2011b ; Krüger *et al.*, 2012 ; Redecker *et al.*, 2013). L'identification et la quantification de différents taxons de CMA à partir de racines ou de sol à l'aide de techniques basées sur l'ADN sont essentielles pour comprendre la structure des communautés de CMA.

II.1. Morphologie des CMA

Les Gloméromycètes sont les premiers fossiles morphologiquement proches des CMA (Remy *et al.*, 1994 ; Redecker *et al.*, 2000a) et auraient divergé il y a 450 millions d'années au cours de l'Ordovicien (Schüßler *et al.*, 2001b). En tant que biotrophes obligatoires, les CMA ont besoin d'un hôte végétal afin de compléter leur cycle de développement. Le champignon peut tout de même se retrouver à l'état de spores dans le sol, consommant avec parcimonie ses réserves carbonées afin de rester viable et de germer lorsque les conditions de température et

d'hygrométrie sont satisfaisantes (Smith & Read, 2008). La diversité de structure et de forme des spores, isolées, sous formes de grappes ou dans des sporocarpes, a souvent été la base de la classification des CMA qui a été quelque peu remise en question ces dernières années. Selon Morton *et al.* (1995) et Sturmer et Bellei (1991), les spores sont parmi les moyens disponibles pour mesurer la richesse et la diversité des CMA dans un sol. Les communautés de ces champignons présentes dans un sol peuvent être estimées en termes de nombre d'espèces présentes et d'abondance de chacune d'elles dans la communauté. L'estimation de l'abondance peut être faite par l'observation directe et le comptage du nombre de spores présent dans le sol (Gerdemann et Nicolson, 1963 ; Brundrett *et al.*, 1994). Par contre, leur identification est le plus souvent difficile à cause des faibles variations morphotypiques. Les spécialistes utilisent plusieurs critères qui permettent de distinguer au moins les genres. Selon Brundrett *et al.* (1994), ces critères sont (Figure 3) :

- **le développement de la spore** : c'est un critère essentiel pour définir le genre chez les glomales (Morton, 1988). Les espèces des genres *Scutellospora* et *Gigaspora* ont des spores qui se développent à partir d'un bulbe de l'hyphe suspendeur, par contre les espèces du genre *Glomus* se forment à partir d'un hyphe étroit tandis que les espèces d'*Acaulospora* et *Entrophospora* ont des spores qui deviennent sessiles après leur détachement du saccule sporifère ;
- **l'arrangement des spores** : les spores des CMA peuvent être produites isolées ou en sporocarpes dans le sol ;
- **la forme de la spore** : la majorité des spores des CMA ont une forme globuleuse mais une forme ovoïde, allongée ou amorphe peut être trouvée chez certaines espèces ;
- **la taille de la spore** : c'est un critère peu utilisé du fait de l'existence d'une grande variabilité dans la taille des spores des CMA ;
- **la couleur de la spore** : elle peut être utilisée pour distinguer et séparer les spores entre morphotypes ;
- **la paroi sporale** : les spores peuvent avoir aussi une ou plusieurs couches sporales qui varient dans leur épaisseur, leur structure et leur apparence. Par exemple : *Acaulospora*, *Entrophospora* et *Scutellospora* ont une structure sporale complexe avec une couche externe très épaisse ;
- **le contenu de la spore** : les spores contiennent des lipides et autres composés qui varient selon la couleur et peuvent être arrangées en granules ou en gouttellettes ;

-la germination de la spore : elle peut être utilisée pour distinguer les spores des CMA, particulièrement les espèces du genre *Scutellospora* qui ont des boucliers de germination avec des replis complexes sur leur paroi externe.

Walker et Sanders (1986) ont standardisé la technique de description des parois et de nouvelles contributions taxonomiques et systématiques pour compléter la monographie des Endogonaceae de Gerdemann & Trappe (1974). Jusqu'à ces dernières décennies, l'identification des spores de CMA isolées directement à partir d'échantillons de sol ou à partir de plantes piège était le principal moyen de détection et d'identification des CMA (Sanders, 2004 ; Robinson-Boyer *et al.*, 2009). Actuellement ces données morphologiques sont complétées par d'autres techniques pour délimiter les taxons. On dénombre aujourd'hui environ 150 espèces, une estimation qui pourrait s'avérer largement en dessous de la réalité en raison de la difficulté de délimiter clairement les espèces chez ces organismes (Smith & Read, 2008). L'identification des CMA nécessite généralement plusieurs mois de culture à partir de piégeages en serre. En effet, la culture en serre s'effectuant dans des conditions différentes des conditions naturelles, les champignons arbusculaires cultivés peuvent ne pas être tout à fait les mêmes que ceux trouvés sur le terrain du fait de nouvelles contraintes. En outre, le peu de variations morphologiques entre les spores de CMA rend cependant difficile l'identification des espèces (Sanders *et al.*, 1995 ; Redecker & Raab, 2006). Par ailleurs, le comptage des spores et leur identification ne reflètent pas suffisamment la structure des communautés réellement actives dans les racines. En effet, la production de spores n'est pas toujours corrélée avec la colonisation des racines (Clapp *et al.*, 1995 ; Merryweather & Fitter, 1998) car la sporulation de certains membres des Glomérormycètes est assez discontinue voire absente (Schüßler *et al.*, 2001a). En Afrique de l'Ouest, le genre *Glomus* est généralement le plus représenté en termes d'espèces dans les sols des agrosystèmes, probablement à cause de sa capacité d'adaptation aux sols dégradés (Bâ *et al.*, 1996 ; Dalpé *et al.*, 2000). Cependant, la taxonomie basée sur la morphologie des spores présentent les inconvénients suivants : les caractères morphologiques peu stables, la faible variation entre les espèces, la sporulation non corrélée avec la colonisation racinaire et la diversité non représentative des communautés fongiques actives des racines.

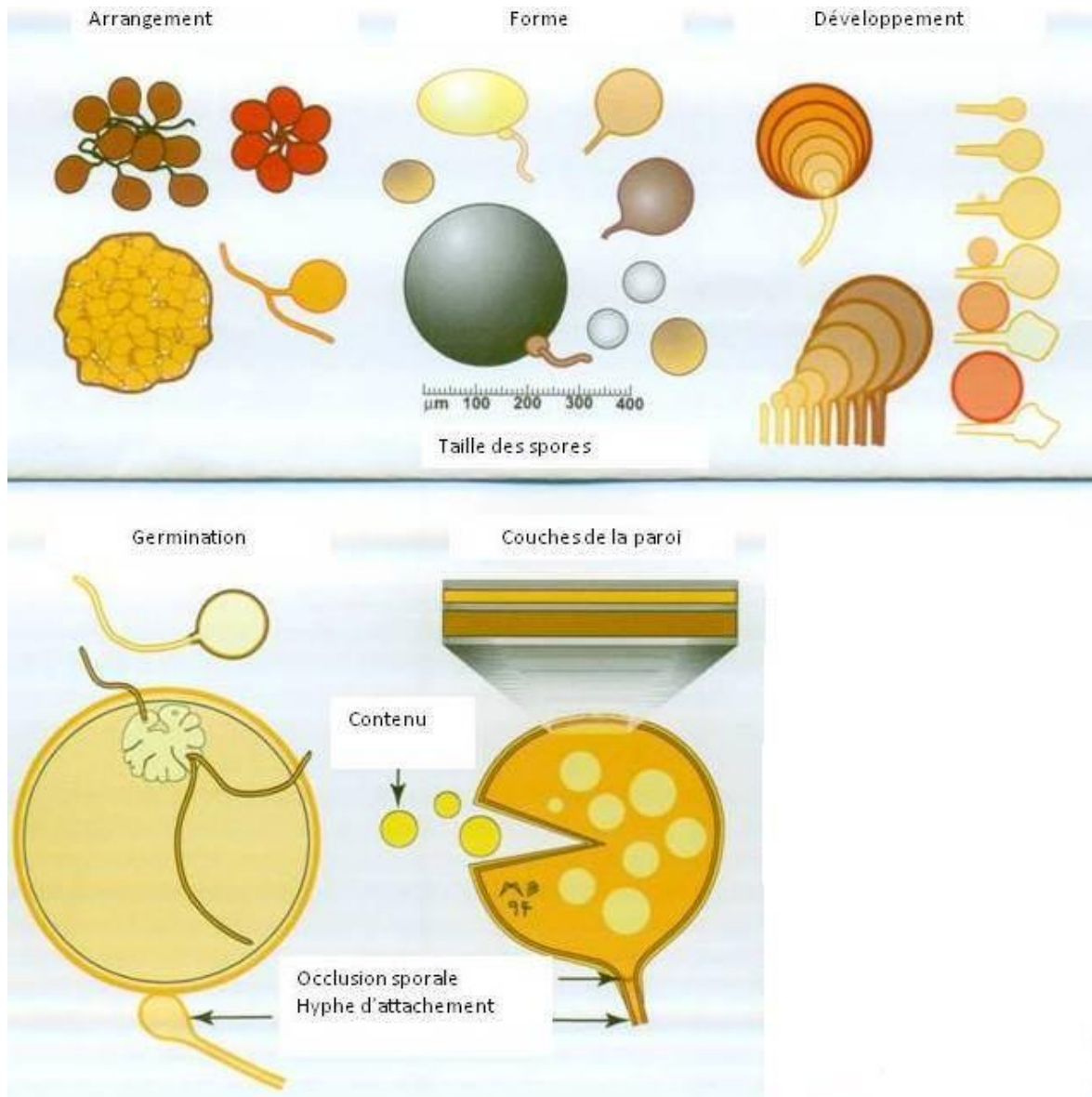


Figure 3. Caractéristiques morfo-anatomiques des spores de CMA (Brundrett *et al.*, 1994).

II.2. Taxonomie et phylogénie des CMA

Durant les dernières décennies, la taxonomie classique, basée sur les observations morfo-anatomiques des spores, a profité des avancées moléculaires et des techniques mises au point pour l'analyse moléculaire de l'ADN. Comme alternative, les études moléculaires sont utilisées pour rechercher les relations phylogénétiques et la variabilité génétique chez les Glomérormycètes (Hegelson *et al.*, 1999). D'après la classification de Schüßler *et al.* (2001b), les Glomérormycètes sont composés de quatre ordres : les Glomérales (*Glomus* groupes A et B), les Paraglomérales (*Paraglomus*), les Archéosporales (*Archeospora*, *Ambispora* et *Geosiphon*) et les Diversisporales (*Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Pacispora* et

Diversispora) et de neuf familles (Figure 4). La phylogénie des Glomérormycètes au sens de Schüßler *et al.* (2001b) est entièrement construite sur la base du gène codant l'ARNr 18S. Le développement des techniques moléculaires et la concordance des résultats avec les caractéristiques morphologiques ont fait évoluer la phylogénie (Morton & Redecker, 2001a). Grâce à ces techniques, il est aujourd'hui prouvé que des spores ayant des morphologies similaires peuvent être produites par des champignons qui sont phylogénétiquement distants (Walker *et al.*, 2007).

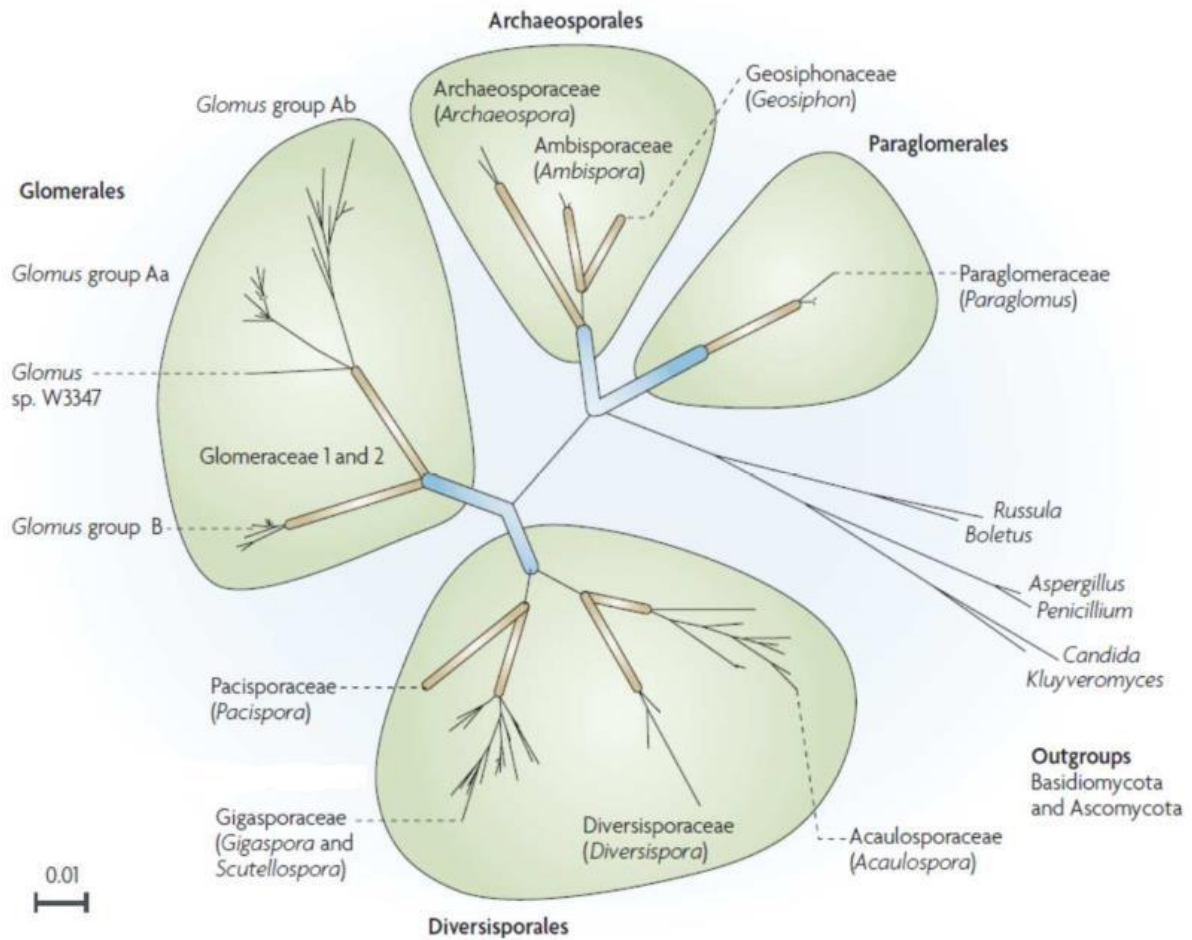


Figure 4. Arbre phylogénétique des Glomérormycètes basé sur les séquences codant pour l'ARNr 18S répartissant les CMA en 4 ordres (Diversisporales, Glomerales, Archaeosporales, Paraglomérales), 10 familles et 19 genres (Schüßler *et al.* 2001b).

Récemment, la communauté scientifique a même été amenée à changer les noms de différents champignons mycorrhiziens dont le champignon modèle *Glomus intraradices* (DAOM197198), qui a été reclassé en 2009 sous le nom de *Glomus irregularis* (Stockinger *et*

al., 2009). Plus récemment, Walker et Schüßler ont proposé pour cette espèce le nom de *Rhizophagus irregularis* (Schüßler & Walker, 2010 ; Krüger *et al.*, 2012). Après de nombreux changements dans la classification des Glomérormycètes ces dernières années (Oehl *et al.*, 2008 ; Morton & Msiska, 2009 ; Schüßler & Walker, 2010 ; Oehl *et al.*, 2011a, b, c), la plus récente prend en compte les aspects de phylogénie moléculaire et de morphologie (Redecker *et al.*, 2013). Le phylum des Glomérormycètes fait mention d'environ 240 espèces décrites à ce jour, réparties en 4 ordres, 11 familles et 25 genres (Figure 5). Avec cette classification, une grande partie des noms scientifiques des espèces a été revue et elle sera employée au cours de cette thèse. Toutefois, Sieverding *et al.* (2014) ont conclu que le nom du genre *Rhizophagus* ne peut pas être appliqué à un groupe de CMA formant des spores dans les racines des plantes, comme le suggère Schüßler et Walker (2010). Par conséquent, ils proposent un nouveau genre, *Rhizoglosum*, pour dénommer les *Glomeraceae* qui forment souvent des spores dans le sol et dans les racines des plantes vasculaires. Ils précisent que la séparation taxonomique des *Rhizoglosum* en fonction des caractéristiques morphologiques a été corroborée par la phylogénie qui place *Rhizoglosum* spp. dans un clade à part (Schüßler & Walker 2010 ; Krüger *et al.*, 2012), formellement nommé « *Glomus* groupe Ab2 » (Oehl *et al.*, 2011b). Le débat reste encore ouvert sur la taxonomie des *Glomeraceae* en particulier au niveau des genres *Glomus* et *Rhizophagus*.

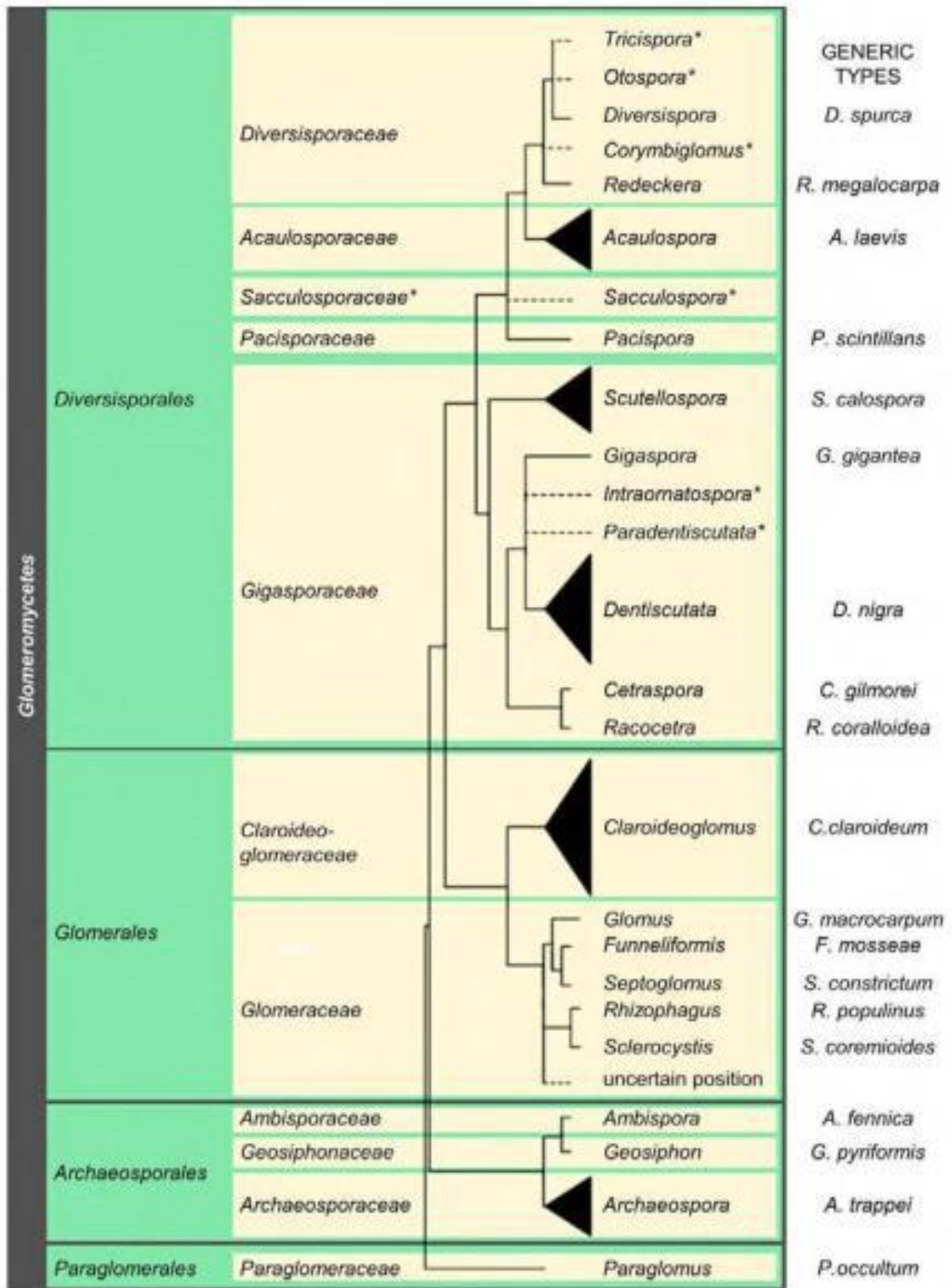


Figure 5. Phylogénie actuelle des *Glomeromycota*. Les traits pointillés indiquent une position phylogénétique incertaine. Les astérisques, quant à eux, soulignent les genres pour lesquels il manque des données mais qui n'ont pas été remaniés (Redecker *et al.*, 2013).

II.3. Emergence de la taxonomie moléculaire

Parmi les régions utilisables en taxonomie moléculaire, l'unité de transcription des ARN ribosomiques est celle qui a retenu le plus l'attention des taxonomistes moléculaires. Cette unité de transcription, répétée de nombreuses fois dans le génome, est constituée de 2 sous-unités : la grande sous-unité LSU (« Large sub-unit ») constituée des gènes codant les ARNr 5S, 28S et 5.8S et la petite sous-unité SSU (« Small sub-unit ») constituée des gènes qui codent l'ARNr 18S. Les gènes qui codent les ARNr 18S, 5.8S et 28S sont relativement conservés et proches dans l'opéron ribosomique. Ils sont séparés par des espaceurs transcrits internes variables (ITS1 et ITS2). Les premiers marqueurs moléculaires utilisés pour l'identification des CMA représentent le gène SSU de l'ARNr (Simon *et al.*, 1992, 1993a, 1993b ; Helgason *et al.*, 1998), l'ITS (Sanders *et al.*, 1995 ; Franken & Gianinazzi-Pearson, 1996 ; Lloyd-MacGilp *et al.*, 1996 ; Redecker *et al.*, 1997) et le gène LSU de l'ARNr (van Tuinen *et al.*, 1998 ; Kjoller & Rosendahl 2000, 2001). Ces différentes régions sont les plus utilisées car elles ne sont pas affectées par des changements de caractères durant l'ontogénèse ou la différenciation des CMA (Redecker *et al.*, 1997). L'amplification des régions de l'ADNr par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) à l'aide d'amorces nucléotidiques universelles et spécifiques des champignons (White *et al.*, 1990) et le séquençage de l'ADN des CMA à partir de spores ou de racines colonisées permettent d'identifier directement les espèces et d'étudier les relations phylogénétiques entre les différents groupes (Simon *et al.*, 1992 ; Sanders *et al.*, 1995 ; Redecker *et al.*, 1997).

Depuis la fin du XX^{ème} siècle, l'avènement des outils moléculaires a permis de faire du traçage hautement spécifique de CMA dans des échantillons environnementaux (Helgason *et al.*, 1998 ; Redecker, 2000b ; Krüger *et al.*, 2009) soit par séquençage (Öpik *et al.*, 2009 ; Jumpponen *et al.*, 2010 ; Tedersoo *et al.*, 2010 ; Pellegrino *et al.*, 2012) soit par empreinte génétique moléculaire (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003 ; Golotte *et al.*, 2004) ou une combinaison des deux (Börstler *et al.*, 2010 ; Kivlin & Hawkes, 2011). La plupart des séquences amplifiées à partir de racines ne correspondent pas à celles des taxa connus, ce qui suggère qu'il existe une diversité considérable de CMA encore méconnus dans les racines mycorhizées. Ce dernier point a par ailleurs été longtemps sous-estimé *via* les approches d'identification ciblant seulement les spores dans le sol (Rosendahl, 2008). En effet, la taxonomie nouvelle est basée sur des espèces dont les spores ont été isolées. Les nouvelles techniques de séquençage permettent d'obtenir directement des séquences à partir de racines ou du sol, donnant ainsi accès à d'autres espèces non sporogènes ou très discrètes, voire

d'autres genres (Öpik *et al.*, 2013). D'ailleurs, la mise en évidence de séquences provenant du sol pourrait s'avérer très efficace dans l'étude de la diversité des CMA du sol, en particulier de ceux soumis à divers stress. Lors d'études utilisant à la fois des échantillons de sol et de racines, il a été reporté des différences de communautés de CMA selon le type d'échantillon (Börstler *et al.*, 2006 ; Hempel *et al.*, 2007) mais aussi parfois une grande similarité entre échantillons de sol et de racines (Borriello *et al.*, 2012). Les approches et les défis d'utilisation des techniques de métagénomique pour l'étude des communautés de CMA ont été récemment examinés par Hart *et al.* (2015). Cependant, le développement de marqueurs moléculaires pour estimer la diversité génétique au sein d'une espèce de CMA est encore très peu étudié.

II.4. Marqueurs génétiques

II.4.1. Diversité interspécifique

La biologie moléculaire est nécessaire pour caractériser les espèces fongiques directement associées aux plantes (Helgason *et al.*, 1999 ; Clapp *et al.*, 2002). Afin d'accéder à la diversité des CMA en milieu naturel, les recherches se sont basées sur l'amplification directe des marqueurs moléculaires à partir de l'ADN environnemental. Historiquement, les gènes codant pour l'ARN des sous-unités de ribosome (LSU et SSU) se sont imposés comme des marqueurs phylogénétiques de premier choix (Woese & Fox, 1977 ; Long & Dawid, 1980). La région ITS a été proposée comme marqueur général pour les champignons (Schoch *et al.*, 2012). Toutefois, elle est généralement considérée comme hypervariable à l'intérieur des espèces de CMA et possède une faible résolution parmi les espèces pour certains groupes comme les *Gigasporaceae* (Redecker *et al.*, 1997). Les CMA peuvent être détectés *in planta* grâce à la majorité des approches actuelles ciblant les gènes ARNr nucléaires (Helgason *et al.*, 1998 ; Wubet *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2008 ; Krüger *et al.*, 2009). Cette procédure fournit une évaluation des taxa de CMA qui sont présents dans les racines formant vraisemblablement la mycorhize active, par opposition aux spores dans le sol qui peuvent être en dormance (Sanders, 2004). Ainsi, les premières amorces ciblant la SSU des CMA ont été VANS1 (Simon *et al.*, 1992) et le couple d'amorces AM1-NS31 (Helgason *et al.*, 1998). Au même moment, l'amplification partielle du gène LSU a été possible puisque l'ADN qui code pour l'ARNr 5.8S a pu être amplifié grâce aux amorces ITS1, ITS4, NS5 (White *et al.*, 1990 ; Sanders *et al.*, 1995 ; Redecker *et al.*, 1997 ; Redecker *et al.*, 1999). Le 18S est le marqueur

moléculaire le plus largement utilisé pour les études moléculaires ciblant spécifiquement les CMA (Öpik *et al.*, 2010 ; Kivlin *et al.*, 2011 ; Davison *et al.*, 2012 ; Öpik *et al.*, 2014). L'un des avantages majeurs du 18S est qu'il est possible avec ce marqueur de comparer un très grand nombre de séquences entre elles grâce à la disponibilité d'un nombre croissant et très élevé des séquences de ce gène, entières ou partielles, dans les bases de données publiques. Cependant, le 18S n'est pas très résolutif pour distinguer les CMA phylogénétiquement très proches ou faisant partie de la même espèce. Par exemple, ce marqueur a un faible pouvoir résolutif chez les *Gigasporaceae* et *Diversisporaceae* (Hart *et al.*, 2015). La méthode classiquement utilisée consiste à cloner et séquencer le 18S de chaque clone. Les banques ainsi construites, riches de plusieurs dizaines ou centaines de clones, sont supposées être représentatives de la diversité spécifique du gène amplifié à partir de l'ADN environnemental, et donc par extension, de la communauté présente dans l'échantillon environnemental. La technique associant clonage et PCR-RFLP permet également d'étudier la structure des communautés mycorrhiziennes complexes directement à partir d'échantillons de racines (Clapp *et al.*, 1995 ; Helgason *et al.*, 1998 ; Redecker, 2000b). Elle a souvent été utilisée avec succès pour tester si des plantes co-existantes sont préférentiellement colonisées par un taxon particulier (Helgason *et al.*, 1998, 1999, 2002 ; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002, 2003 ; Öpik *et al.*, 2003 ; Mummey *et al.*, 2005). Cependant, la PCR gigogne (nested PCR) de la LSU de l'ADNr peut être appliquée avec succès pour détecter les espèces de CMA colonisant les racines des plantes (van Tuinen *et al.*, 1998 ; Jacquot *et al.*, 2000 ; Kjølner & Rosendahl, 2000) et étudier la diversité des CMA au champ (Jacquot-Plumey *et al.*, 2001 ; Turnau *et al.*, 2001).

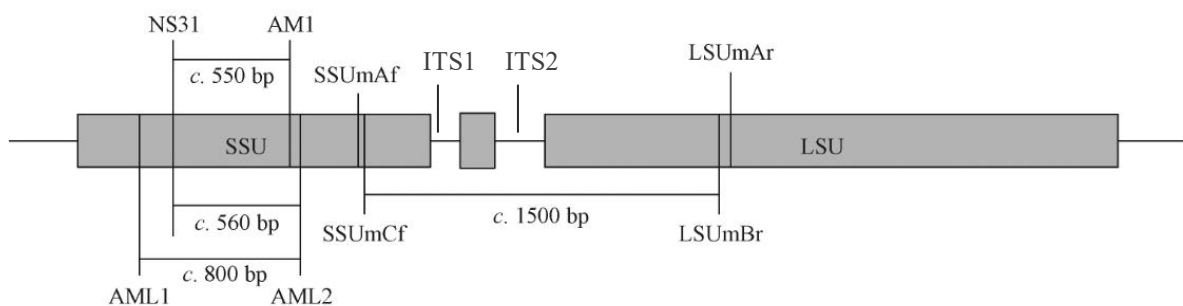


Figure 6. L'emplacement de différentes combinaisons d'amorces sur des régions-cibles d'ADNr. La longueur du fragment amplifié est d'environ 550, 560, 800 et 1500 pb respectivement avec les couples d'amorces NS31-AM1, NS31-AML2, AML1-AML2 et SSUmCf-LSUmBr (Krüger *et al.*, 2009 ; van Geel *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont appliqué des amorces de l'ADNr pour évaluer la diversité et la co-existence des CMA dans les racines des plantes (Helgason *et al.*, 1998, 1999 ; Daniell *et al.*, 2001 ; Vanderkoornhuyse *et al.*, 2002). Ces études ont montré une certaine préférence des plante-hôtes vis-à-vis des CMA (Helgason *et al.*, 2002 ; Vanderkoornhuyse *et al.*, 2002). Helgason *et al.* (1998) ont conçu une amorce AM1 spécifique aux CMA à partir de séquences SSU de l'ADNr, couplée avec l'amorce NS31 spécifique aux eucaryotes. Ce couple d'amorces NS31-AM1 a été utilisé avec succès pour étudier les communautés de CMA dans plusieurs écosystèmes (Vanderkoornhuyse *et al.*, 2003 ; Helgason *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2009 ; Öpik *et al.*, 2009 ; Xiang *et al.*, 2014). Mais il a été montré que l'amorce AM1 ne pouvait pas détecter certaines espèces des Paraglomerales et Archaeosporales (Lee *et al.*, 2008) et dans certaine circonstance, elle pourrait amplifier des séquences non affiliées aux Gloméromycètes (Liu *et al.*, 2009). Pour améliorer la spécificité et le recouvrement des amorces PCR des CMA, plusieurs nouvelles amorces et couples d'amorces ciblant la région SSU de l'ADNr ont été développées au cours des dernières années. Par exemple, Lee *et al.* (2008) ont construit une nouvelle paire d'amorces (AML1-AML2) avec une spécificité et un recouvrement plus élevés que le couple NS31-AM1. Liu *et al.* (2011) ont combiné NS31 avec AML2 en les utilisant avec succès dans la détection des communautés de CMA à partir d'échantillons de racines. Cependant, certains auteurs ont suggéré que l'inclusion des régions ITS et LSU de l'ADNr pourrait largement améliorer la résolution au niveau de l'espèce (Krüger *et al.*, 2009). Sur cette base, Krüger *et al.* (2009) ont défini 4 amorces (SSUmAf, SSUmCf, LSUmAr et LSUmBr) qui couvrent une partie de la SSU, la région entière de l'ITS et des régions partielles de la LSU (Figure 6). Toutes ces amorces mentionnées ci-dessus ont été fréquemment utilisées pour détecter les communautés de CMA au champ, mais deux questions se posent : (i) quelle est la meilleure paire d'amorces ? (ii) est-ce que différents couples d'amorces donnent des communautés de CMA distinctes ? Toutefois, des travaux ont montré que parmi 6 paires d'amorces spécifiques aux Gloméromycètes testées, seul le couple NS31/AML2 correspondait parfaitement à toutes les séquences de Gloméromycètes en montrant le plus grand nombre de lectures en termes de spécificité et de taux de couverture (van Geel *et al.*, 2014).

Ainsi, le choix des amorces détermine les résultats d'une étude de communautés de CMA et les conclusions qu'on en tire. Dans les sols cultivés par exemple, Hijri *et al.* (2006) ont trouvé une diversité de CMA plus élevée que celle trouvée précédemment par Helgason *et al.* (1998) et Daniell *et al.* (2001). Ces derniers utilisaient la paire d'amorces AM1-NS31, qui est réputée

pour ne détecter que certains groupes de CMA comme la famille des *Glomus* groupe (A) (Redecker *et al.*, 2000b). Hijri *et al.* (2006) avaient le mélange d'amorces développées par Redecker (2000b) qui détecte une très large proportion de CMA. Mais il est aussi possible qu'il y ait des espèces de CMA présentes dans les racines ou dans le sol qui ne soient pas détectées par les méthodes utilisées actuellement (Daniell *et al.*, 2001).

II.4.2. Diversité intraspécifique

Afin d'étudier la diversité intraspécifique, des gènes en général en simple copie dans le génome, ont été proposés (Schoch *et al.*, 2012). Trois d'entre eux ont été utilisés en phylogénie des champignons : le gène codant pour le facteur d'élongation 1 alpha et les gènes *RPB1* et *RPB2* codant pour des sous-unités de l'ARN polymérase II (Helgason *et al.*, 2003 ; Tanabe *et al.*, 2004 ; James *et al.*, 2006). Bien que l'ITS soit le code-barre génétique universel chez les champignons, c'est le gène *RPB1* qui a été sélectionné comme code-barre secondaire des champignons (Schoch *et al.*, 2012). En effet, ce marqueur a pour avantage de ne pas présenter de polymorphisme au sein des isolats de CMA, ce qui facilite la distinction d'espèces proches chez les CMA (Redecker & Raab, 2006). Ce gène a un pouvoir de résolution spécifique supérieur à celui de l'ITS chez les champignons testés (Schoch *et al.*, 2012) même si le nombre de séquences de référence est jugé insuffisant pour le moment. Récemment, Stockinger *et al.* (2014) ont développé des mélanges d'amorces spécifiques du gène *RPB1*, avec une très haute spécificité, permettant d'amplifier tous les CMA testés (Figure 7). Les amplicons obtenus avec ces amorces sont d'une longueur approximative de 750 pb.

Par ailleurs, le gène nucléaire de la mitochondrie codant pour la grande sous-unité de l'ARN ribosomal (mtLSU) a été également identifié comme marqueur moléculaire chez les CMA (Raab *et al.*, 2005). Afin d'étudier avec précision la structure des populations de *Rhizophagus irregularis* à partir de racines colonisées, une méthode d'amplification du mtLSU par PCR gigogne a été développée par Börstler *et al.* (2008). Pour différencier des haplotypes au niveau intraspécifique et étudier la structure et la répartition des populations de *R. irregularis* au champ, Börstler *et al.* (2010) ont pu montrer que ce marqueur moléculaire présente un polymorphisme au sein de l'espèce.

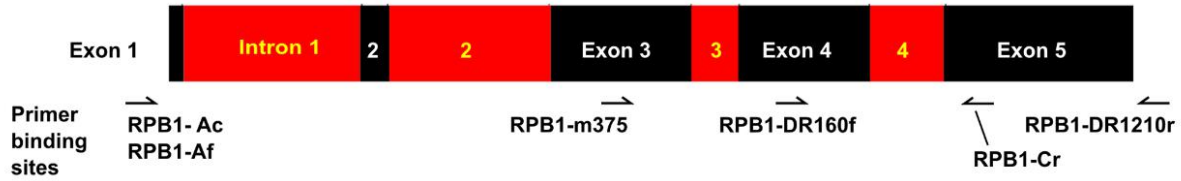


Figure 7. Schéma représentant la structure du gène *RPB1* amplifié par les couples d'amorces de PCR gigogne utilisées par Stockinger *et al.* (2014).

II.5. Méthodes de séquençage haut-débit

Bien que le clonage et le séquençage de Sanger aient permis de détecter et d'identifier les CMA *in situ* sans avoir besoin de caractéristiques morphologiques reconnaissables, l'apparition récente d'une deuxième génération des techniques de séquençage, appelée séquençage massif ou nouvelle génération de séquençage (Next-Generation Sequencing [NGS]) a bouleversé cette approche non seulement par le très grand nombre de séquences obtenues à moindre coût, mais par l'économie de l'étape de clonage supposée associée à différents biais. Il existe plusieurs techniques de séquençage haut-débit telles que le 454 GS-FLX (454 Genome Sequencer FLX) de l'entreprise Roche Diagnostic Corporation, la technologie illumina de Illumina Incorporation ou encore les systèmes SOLiDTM promus par Applied Biosystems TM. L'introduction du séquençage massif d'échantillons d'ADN provenant directement de l'environnement a révolutionné notre capacité à explorer la diversité microbienne et a permis aux chercheurs de dévoiler une diversité encore insoupçonnée. Pour ce faire, on séquence uniquement certaines régions génomiques d'intérêt taxonomique comme les régions ITS, 16S (procaryotes) et 18S (eucaryotes) des ARN ribosomiaux. De nombreux logiciels et outils bioinformatiques consacrés aux traitements de données NGS ont vu le jour. Nous pouvons citer comme exemple les logiciels Mothur (Schloss *et al.*, 2009), Qiime (Caporaso *et al.*, 2010) ou encore DIYA (Stewart *et al.*, 2009) mais il en existe d'autres.

Du point de vue pratique, toutes les méthodes de NGS reposent approximativement sur le même principe (Shendure & Ji, 2008) (Figure 8A). On ne séquence plus un fragment simple d'ADN, mais un mélange complexe, allant jusqu'à un génome entier. Ce mélange est fragmenté et les fragments sont ligaturés à de courtes séquences universelles (adaptateurs) constituant une banque (library). Chaque molécule est amplifiée localement, dans une émulsion (ePCR : 454/Roche) ou *in situ* sur une lame (Illumina).

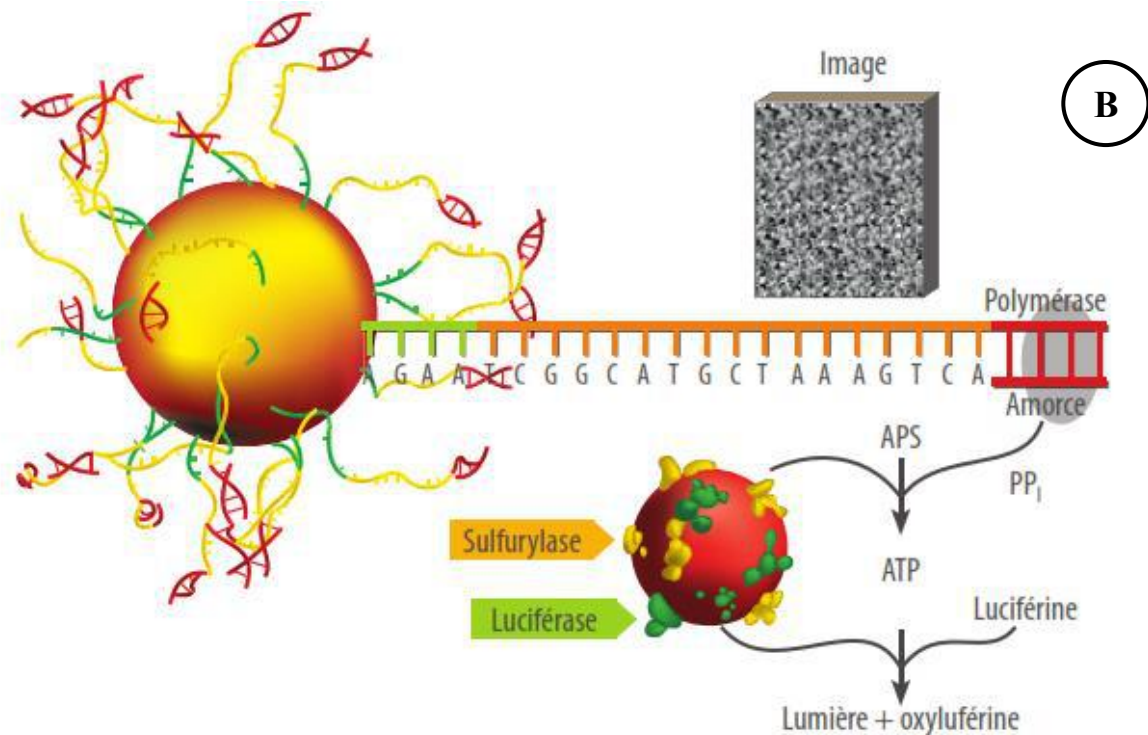
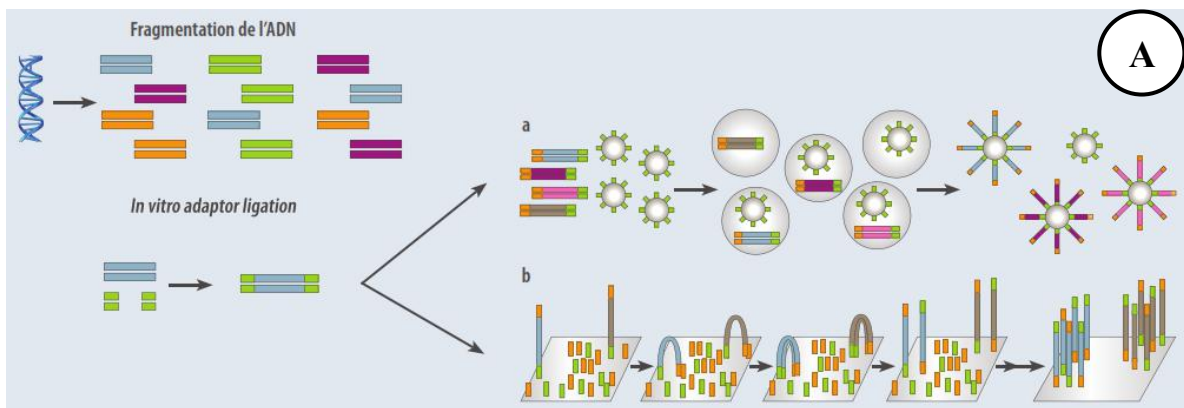
II.5.1. Technologie 454 Life Sciences

Le système de pyroséquençage Roche/454 a été la première technologie de séquençage de nouvelle génération introduite sur le marché en 2005 (Figure 8B) (Margulies *et al.*, 2005). Après fragmentation de l'ADN par nébulisation, les fragments sont sélectionnés par la taille puis chaque fragment est fixé individuellement à une nanobille grâce à des adaptateurs spécifiques. Ces billes sont placées dans une émulsion permettant l'amplification des fragments en parallèle par PCR (Polymerase Chain Reaction). Chaque bille est ensuite déposée dans un puits sur une plaque de picotitration et les réactions de séquençage ont lieu simultanément dans chacun des puits. Pendant le pyroséquençage, chaque cycle se compose de l'introduction d'un type unique de nucléotides. Pendant le pyroséquençage, chaque cycle se compose de l'introduction d'un type unique de nucléotides. L'incorporation d'un nucléotide complémentaire par la polymérase, au sein du brin néosynthétisé dans l'un des puits, libère un groupe pyrophosphate. Ce groupe pyrophosphate va être converti en ATP par une ATP-sulfurylase à partir d'APS (adénosine 5'phosphosulfate). Finalement, un signal lumineux sera produit par l'enzyme luciférase lors de l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine. Cette réaction est rendue possible par la présence d'ATP. Le signal lumineux sera alors capté par une caméra à transfert de charge (CCD) capable de détecter la position de la lumière émise. On peut ainsi en déduire la séquence à partir d'une succession de pics de signaux lumineux (pyrogramme).

II.5.2. Technologie CRT Solexa/illumina

Solexa est la seconde technologie NGS apparue sur le marché (Figure 8C) (Bentley *et al.*, 2008). Les brins d'ADN sont fragmentés aléatoirement par nébulisation et des adaptateurs sont fixés à chaque extrémité des fragments. Pour cette technologie, l'amplification des fragments se fait en phase solide. Les fragments sont fixés arbitrairement sur une surface par hybridation des adaptateurs. Les extrémités libres des fragments immobilisés s'hybrident à une amorce complémentaire (amplification par ponts) et sont copiés par la polymérase. Ce processus d'amplification est ensuite répété, aboutissant à la formation de clusters de brins d'ADN. Plusieurs millions (100 à 200) de clusters sont ainsi amplifiés simultanément sur la surface. En fin d'amplification, chaque cluster contient jusqu'à 1000 molécules identiques. Cette haute densité de brins d'ADN facilite et augmente le débit de séquençage. Le séquençage des fragments amplifiés se fait via un procédé de séquençage par synthèse qui incorpore les quatre nucléotides, marqués par des fluorochromes différents, au sein de brins

d'ADN immobilisés. A chaque cycle de séquençage, les quatre terminateurs réversibles ainsi que des amorces et la polymérase sont ajoutés sur la plaque de verre. Les terminateurs réversibles sont alors incorporés dans les brins d'ADN. Après l'excitation laser, l'image de la fluorescence émise par chaque cluster est capturée par lecture optique. Chaque cycle se termine par le clivage du terminateur et la restauration du groupement fonctionnel du nucléotide incorporé, ce qui permet à l'ADN polymérase d'incorporer le prochain nucléotide lors du cycle suivant. Les cycles sont ainsi répétés pour déterminer la séquence de chacun des fragments, base par base. Cette technique reposant sur la chimie des terminateurs, les insertions et les délétions sont rares. Les substitutions sont le type d'erreurs le plus courant pour cette technologie. La très haute densité de la puce (plus de 100 millions de molécules par centimètre carré) permet de séquencer jusqu'à plusieurs dizaines de millions de lectures.



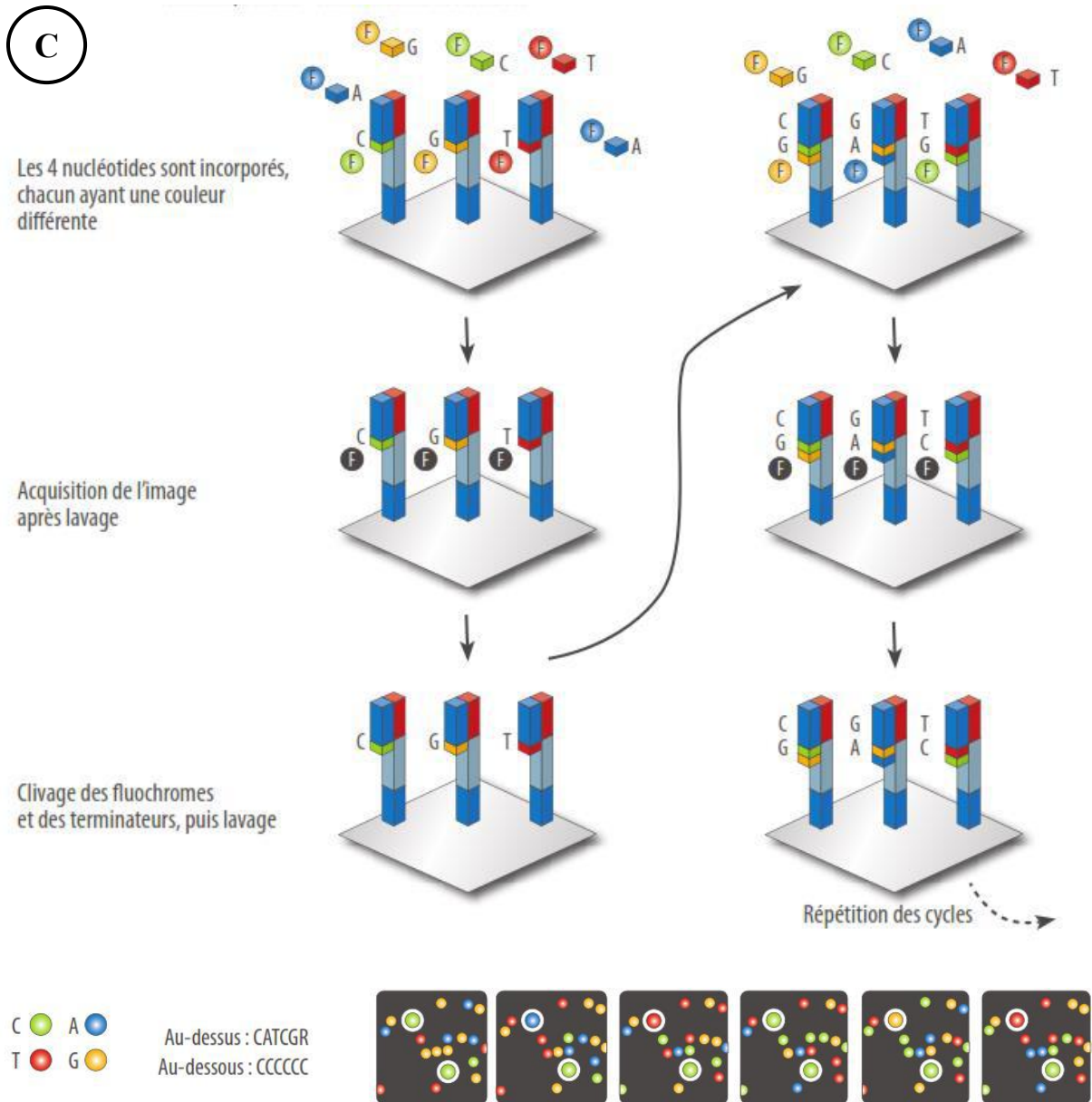


Figure 8. Différentes méthodes de séquençage utilisées en NGS.

A : Établissement des banques de fragments et amplification avant séquençage. L'ADN est tout d'abord fragmenté, les extrémités sont "réparées" et ligaturées à des adaptateurs (petits rectangles verts). Selon les constructeurs, 2 méthodes d'amplification sont proposées le plus souvent : a. Amplification en émulsion (ePCR), b. Amplification in situ sur la lame de verre.

B : Principe du pyroséquençage, utilisé pour 454/Roche.

C : Principe du séquençage utilisé sur la plateforme Illumina/Solexa.

III. Stratégies d'ingénierie écologique basées sur l'utilisation des CMA pour l'amélioration de la productivité végétale

L'effet positif de la symbiose mycorhizienne sur la nutrition minérale et hydrique ainsi que sur la résistance aux maladies des plantes-hôtes, conjointement à l'état du microbiote mycorhizosphérique, pourrait être considéré comme un indicateur de qualité des sols. En foresterie, deux principales stratégies d'ingénierie écologique peuvent être utilisées afin d'améliorer le potentiel mycorhizien des sols et ainsi permettre à la symbiose mycorhizienne de développer ses propriétés au profit du développement de la plante : l'utilisation des plantes nurses et la mycorhization contrôlée.

III.1. Utilisation des plantes nurses

Les plantes-nurses sont des espèces végétales susceptibles de stimuler le développement des symbiotes fongiques dans le sol (Duponnois *et al.*, 2001 ; Azcon-Aguilar *et al.*, 2003). Dans les écosystèmes arides et semi-arides, la promotion d'herbacées pionnières mycotrophes et fixatrices d'azote (Ex. *Zornia glochidiata*, *Panicum* spp.) adaptées aux conditions de stress hydrique serait un atout pour augmenter le potentiel microbien des sols (Duponnois *et al.*, 2011). En effet, il a été démontré que le sol influencé par des herbacées mycotrophes pouvait stimuler la mycorhization et la croissance en hauteur de plants forestiers avec des effets également positifs sur l'activité microbienne des sols en comparaison avec l'inoculation d'une souche de champignon mycorhizien (Duponnois *et al.*, 2011). Des études de co-cultures associant *Lavandula multifida* comme plante nurse et une espèce de Cyprès (*Cupressus arizonica*) ont été réalisées en conditions contrôlées (Ouahmane *et al.*, 2006a) afin d'évaluer les possibles interconnexions susceptibles de s'établir entre les deux types de plantes. Les résultats ont montré un effet bénéfique de la présence de la plante-nurse *L. multifida* sur la croissance en hauteur des plants de Cyprès comparable à l'effet d'un champignon mycorhizien inoculé, *Glomus intraradices*. Dans certains cas, le potentiel de l'inoculum de CMA ne suffit pas pour assurer le développement des arbres forestiers et l'utilisation de plantes-nurses comme *Thymus satureioides* ou *Lavandula* spp. pourrait être d'un grand intérêt pour la restauration de la couverture végétale (Ouahmane *et al.*, 2006b). D'un point de vue pratique, cette pratique culturale à faible coût, pourrait être d'une grande importance pour améliorer les performances de programmes de plantations ligneuses en zones arides et semi-arides (Sène *et al.*, 2012) en favorisant l'abondance et la diversité des propagules mycorhiziennes.

III.2. Mycorhization contrôlée

La mycorhization contrôlée est un ensemble de techniques qui permet d'optimiser la symbiose à partir d'un processus d'isolement, de culture, de sélection, de multiplication, d'inoculation et de suivi d'un champignon dans le sol afin de produire des plants « biologiquement améliorés » (Garbaye, 1991). L'objectif de l'inoculation par les CMA est d'établir une symbiose adéquate en mettant à la disponibilité des racines de plantes hôtes un ou des champignons capables de leur apporter un surplus en matière de croissance et de nutrition. La technique de la mycorhization contrôlée fait l'objet de très peu d'études sur les arbres tropicaux, en particulier en Afrique tropicale (Bâ *et al.*, 2011). Néanmoins, ces dernières années, il y a un regain d'intérêt pour l'étude de la mycorhization contrôlée de quelques essences locales. En Afrique tropicale, les études sur la symbiose mycorhizienne et sa prise en compte dans les itinéraires techniques de productions agricole et forestière restent limitées. Cependant, l'effet de l'inoculation avec des souches de CMA sur la croissance, la nutrition et la résistance au stress hydrique de quelques espèces fruitières sauvages ou domestiquées (ex. *Ziziphus mauritiana*, *Balanites aegyptiaca*, *Parkia biglobosa*, *Balanites aegyptiaca*) a été étudié en conditions de pépinière (Guissou *et al.*, 1998b ; Guissou *et al.*, 2001 ; Bâ *et al.*, 2001) et au champ (Bâ *et al.*, 2001).

L'utilisation de la mycorhization contrôlée est donc particulièrement adaptée aux opérations de réhabilitation des sols dégradés qui présentent généralement de fortes carences en éléments minéraux et plus particulièrement en P assimilable. Les critères de sélection des meilleures souches de CMA sont entre autres la compétitivité, l'effet bénéfique sur la croissance des plants inoculés et la teneur en éléments minéraux des différents organes des plants, en particulier le phosphore (Garbaye, 2013). Le processus de sélection doit commencer par une analyse de la diversité des CMA. Il nécessite ensuite leur isolement et multiplication. L'efficacité de chaque espèce ou de mélanges d'espèces est déterminée avec une plante-test mycotrophe sous des conditions expérimentales contrôlées (Sieverding, 1991). L'isolement des spores des CMA peut se faire moyennant la méthode de Gerdemann & Nicolson (1963). La finalité de cette étape est d'isoler des spores pour les étudier ou pour entamer la production de l'inoculum. La multiplication des CMA en culture pure est très difficile, mais est réalisable sur des racines transformées (Diop *et al.*, 1994). Actuellement, la technologie de production d'inoculum la plus utilisée consiste à multiplier les CMA sur les racines d'une plante mycotrophe cultivée en conditions contrôlées en serre ou en chambre de culture. Les plantes

mycotrophes les plus communément utilisées sont le poireau (Fortin *et al.*, 2008), le mil (Bâ *et al.*, 2001), le trèfle (Echairi *et al.*, 2008) et le maïs.

IV. Les jujubiers

IV.1. Généralités

Les jujubiers appartiennent au genre *Ziziphus* Miller (1764), *Zizyphus* Jussieu (1789), à la famille des Rhamnacées et à l'ordre des Rhamnales. Ils comprennent entre 86 et 170 espèces (Azam-Ali *et al.*, 2006) réparties dans toutes les régions tropicales et subtropicales du globe. Ce sont des arbustes qui comportent de nombreuses espèces dont la plus connue au Sud du Sahara est *Ziziphus mauritiana* Lam. variété *orthacantha* (DC) (syn. *Ziziphus orthacantha* DC ; Chevalier, 1952). Le fruit constitue l'intérêt principal du jujubier, largement consommé par les populations et faisant l'objet d'un commerce lucratif impliquant surtout les femmes. C'est une drupe dont la pulpe est très riche en vitamines A et C, en phosphore, en protéines et en sels minéraux. Les fruits sont consommés frais ou séchés et la farine extraite offre une bonne boisson (Ouédraogo & Nikiema, 1997). Ils contiennent 14 à 16 % de sucre et 160 mg de vitamine C pour 100 g de pulpe (Vashishtha, 1997). En outre, les fruits peuvent être conservés pendant près de 6 mois, tout en conservant quasiment la même quantité de vitamines A et C (Baumer, 1995). Le jujubier apparaît comme l'un des fruitiers spontanés qui supportent le mieux les fortes températures et les longues périodes (de 6 à 12 mois parfois) sèches (Depommier, 1988). Très rustique, le jujubier se rencontre dans des stations pluviométriques parfois très faibles (100 mm ; Chevalier, 1952). Sa plasticité écologique lui confère un intérêt accru surtout pour les pays sahéliens dans un contexte de désertification et de baisse des productions agricoles. En outre, l'espèce est très utilisée dans les systèmes agroforestiers tels que les haies vives défensives (Djimdé, 1997). Le jujubier joue un rôle important dans l'alimentation humaine. C'est sans doute sous l'action de l'homme et des animaux en particulier les ruminants que l'aire de distribution et la densité des peuplements de *Ziziphus* se sont donc considérablement étendues.

IV.2. Systématique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : *Rosidea*

Ordre : Rhamnales

Famille : *Rhamnaceae*

Genre : *Ziziphus*

Nom scientifique : *Ziziphus mauritiana* Lam.

Noms locaux : dem (wolof) ; diabé (peulh) ; ngit (sérère) ; n'tomon (bambara)

Synonymes : *Ziziphus jujuba* (L) Lam., *Z. jujuba* (L.) Gaertn. (incluant var. *stenocarpa* Kuntze et var. *aequilatrifolia* Engl.), *Z. tomentosa* Poir., *Z. rotundata* D.C., *Z. aucheri* Boiss., *Z. insularis* Smith, *Z. sororia* Roem. and Schult., *Z. orthocantha* D.C. (Azam-Ali *et al.*, 2006).

IV.3. Présentation des espèces étudiées

Les espèces de jujubier les plus connues dans le monde sont *Ziziphus mauritiana* Lam. (Jujubier d'Inde) et *Ziziphus jujuba* Mill. (Jujubier de Chine). Force est de constater que le continent africain est le plus pauvre en espèces de *Ziziphus* : on n'y connaît que six à huit espèces mais trois d'entre elles, *Z. mauritiana* Lam., *Z. spina-christi* Willd. et *Z. mucronata* Willd., ont une large distribution. Dans le cadre de nos travaux, nous nous sommes intéressés à six espèces de jujubier (*Z. mauritiana*, *Z. spina-christi*, *Z. lotus*, *Z. amphibia*, *Z. mucronata* et *Z. abyssinica*) distribuées en Afrique tropicale et à l'espèce *Z. sphaerocarpa* présente aux Antilles françaises (Guadeloupe). A part *Z. mauritiana*, le statut mycorhizien des autres espèces de *Ziziphus* n'était pas encore connu.

IV.3.1. *Ziziphus mauritiana* Lam.



Planche 1. Aspect morphologique de *Ziziphus mauritiana* Lam. A : arbre adulte, B : rameau portant des fruits (Soule, 2011).

Ziziphus mauritiana Lam. est de toutes les espèces, celle qui couvre aujourd'hui l'aire la plus étendue à la surface du globe, soit comme arbuste spontané ou naturalisé, soit comme arbre fruitier cultivé et devenu par endroits subspontané. Elle aurait été introduite en Asie tropicale, en Océanie, en Australie, à Madagascar, dans les îles Mascareignes et aux Antilles. En Afrique tropicale, *Z. mauritiana* occupe une aire de distribution très large et constitue l'espèce souvent dominante qui s'étend au Sud du Sahara, de l'Atlantique (Sénégal et Mauritanie) jusqu'à la Somalie et se prolonge même en Arabie et dans l'Inde. L'espèce est largement distribuée sur les terrains sablonneux, rocheux et sur les bords des rivières et des oueds dans les zones sahéennes ou sahélo-soudaniennes. Elle est parfaitement adaptée au climat de ces zones à pluviométrie variant de 150 à 500 mm par an. Elle constitue un des principaux éléments de la brousse des épineux de la zone sahéenne.

Arbre ou arbuste, il peut atteindre 6 à 8 m de hauteur, à ramure tortueuse et à branches vertes épineuses (Planche 1A). L'écorce est souvent grise fissurée et les feuilles sont alternes, ovales-lancéolées, vert lisse brillant, et dentelées sur la face supérieure, blanchâtres et tomenteuses sur la face inférieure. La floraison abondante a lieu en saison sèche d'octobre à janvier où les fleurs nombreuses, petites et jaunâtres sont regroupées en grappe par 2 ou 3 qui fructifient après la 4^{ème} année. Le fruit est une drupe de 1,2 cm de diamètre, ronde, rouge brun renfermant un gros noyau revêtu d'une pulpe rougeâtre de faible épaisseur (Maydel, 1990) (Planche 1B). La plantation de *Z. mauritiana* se fait avec un écartement de 5 m × 5 m suivant

les stations et celui-ci pouvant être réduit à 1 m × 1 m pour les haies vives défensives. Au Sénégal, la contrainte majeure de l'espèce est qu'elle est attaquée par plusieurs parasites des feuilles et des fruits.

Espèce ligneuse alimentaire largement distribuée au Sénégal, *Z. mauritiana* produit des fruits qui peuvent être consommés mûrs, frais ou séchés et réduits en poudre servant à la préparation de boissons rafraîchissantes par les populations. Les fruits font l'objet d'un commerce important ce qui augmente substantiellement les revenus des populations rurales en période de soudure (Soule, 2011). Les feuilles sont très appréciées par le bétail et les branches servent à faire des clôtures de parc à bétail. En médecine traditionnelle, les feuilles sont utilisées pour soigner les maux de ventre, la bilharziose, la bronchite, les infections intestinales, les maladies du foie et le diabète. Son bois est de très bonne qualité, facile à travailler et à polir et du tanin est extrait à partir des racines et des écorces. Au Sénégal, il existe des peuplements importants de *Z. mauritiana* mais beaucoup d'entre eux nécessitent encore d'être identifiés et géoréférencés. Néanmoins, des collectes de semences de cette espèce sont organisées chaque année par les services du Programme National de Semences Forestières (PRONASEF).

IV.3.2. *Ziziphus lotus* (L.) Lam.



Planche 2. Aspect morphologique de *Ziziphus lotus* (L.) Lam., A : arbres adultes dans une steppe désertique, B : rameaux contenant des feuilles et des fleurs (Soule, 2011).

Ziziphus lotus (L.) Lam., ou jujubier de Berbérie, est un arbuste très épineux et sarmenteux ou forme un buisson de 1 à 2 m de hauteur qui vit sur d'immenses territoires en Afrique du Nord notamment en Mauritanie (Aubreville, 1950) et en Asie. Son aire de distribution s'étend de la Mauritanie au Niger et au Sahara, exclusivement dans les steppes désertiques, dans les regs ou sur des terrains rocaillieux des zones sahariennes à saharo-sahéliennes (Planche 2A). Les feuilles, très petites, sont alternes, ovales ou elliptiques, plus ou moins pubescentes en dessous (Planche 2B). Elles sont également très appréciées par le bétail et une fois sèches pulvérisées et additionnées d'eau, donnent une sorte de bouillie avec laquelle les femmes se tressent les cheveux (Soule, 2011). Cette bouillie aurait la propriété de noircir et d'allonger la chevelure. La floraison a lieu en fin de saison des pluies au cours de laquelle les fleurs sont en fascicules de 2 à 3 ou solitaires, blanc jaunâtre, et disposées à l'aisselle des feuilles. Les fruits sont sous forme de drupes globuleuses, glabres, de 0,8-1 cm de diamètre, ocre orangé à maturité, contenant un gros noyau noyé dans une pulpe plus ou moins farineuse. Les fruits de *Z. lotus* font l'objet d'une exploitation sous forme de cueillette par les populations. Riches en vitamines A et C, ils sont consommés frais ou secs à l'état de fruit ou réduits en poudre servant à la préparation de boissons rafraîchissantes. A notre connaissance, cette espèce n'est pas encore repertoriée au Sénégal.

IV.3.3. *Ziziphus amphibia* A. Chev.

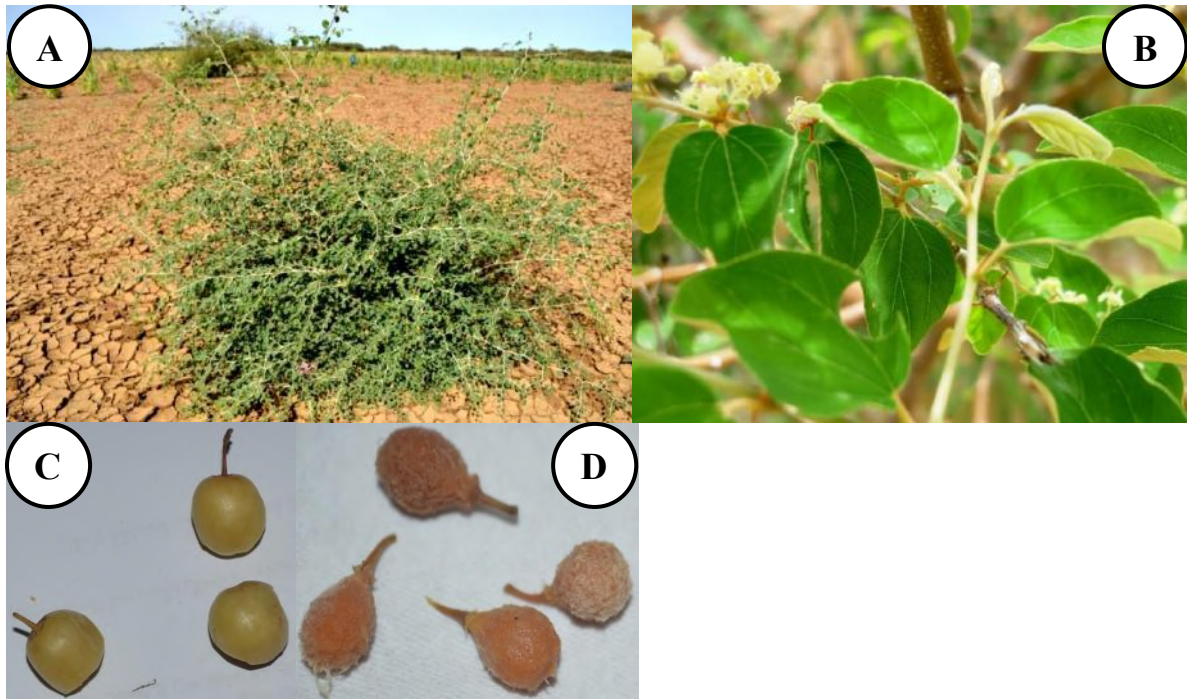


Planche 3. Aspect morphologique de *Ziziphus amphibia* A. Chev., A : arbuste dans son aire de distribution, B : feuilles et fleurs, C : fruits, D : endocarpes (Soule, 2011).

Ziziphus amphibia A. Chev. est un arbuste très buissonnant, de 3 à 4 m de hauteur que les Bambaras nomment Tomboro du fleuve (Planche 3A). Il vit dans des conditions particulières, dans le lit même des fleuves et des grandes rivières submergées pendant la saison des pluies. L'écorce est gris clair crevassée et les feuilles sont ovales ou elliptiques, arrondies aux deux extrémités, glabres et entières (Planche 3B). En saison sèche, après la crue, cette espèce émet des repousses feuillées qui fleurissent en juin et produisent des fruits mûrs en juillet-août. Les fleurs pubescentes sont rouges à maturité donnant des fruits qui sont des drupes globuleuses contenant un noyau enrobé dans une pulpe plus ou moins visqueuse. Les fruits de *Z. amphibia* sont très acides (Planche 3C et 3D). Ils mûrissent pendant l'hivernage au moment des inondations où ils sont difficilement accessibles (Soule, 2011). A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour cette espèce au Sénégal.

IV.3.4. *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf.



Planche 4. Aspect d'un pied de *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf., A : arbre adulte, B : écorce, C : feuilles et fruits (Soule, 2011).

Z. spina-christi (L.) Desf. est une espèce du Moyen-Orient, de l'Afrique de l'Ouest et du Nord-Est, de l'Ethiopie et de l'Afrique de l'Est. On la trouve particulièrement dans les savanes sahéliennes à sahélo-soudaniennes en bordure des mares et des rivières. Elle est à la fois adaptée au climat aride du désert dans les oasis et au climat tropical dans les pays à longue saison sèche pendant laquelle elle perd en partie ses feuilles. Elle a probablement été introduite en Afrique par les commerçants arabes le long de la côte méditerranéenne, mais aussi à travers la Corne de l'Afrique (Azam-Ali *et al.*, 2006). Arbuste épineux de 4 à 5 m de hauteur à fût tortueux atteignant 0,6 m de diamètre, à cime arrondie avec les branches enchevêtrées, ou encore un buisson formant un fourré impénétrable (Planche 4A). L'inflorescence en cymes courtes, axiales, avec plusieurs fleurs jaune pâle et fasciculées, l'écorce gris clair s'écaillant en plaques rougeâtres (Planche 4B) et les feuilles sont alternes, ovales, lancéolées vert brillant. Les fruits sont des drupes globuleuses rouges à maturité contenant un gros noyau enrobé dans une pulpe plus ou moins visqueuse (Planche 4C). *Z. spina-christi* (L.) Desf. est évoqué dans le Coran et considéré par certains musulmans comme

un arbre sacré, ou "arbre du paradis". La pulpe du fruit est consommée fraîche ou sèche dans de nombreuses régions du sud-ouest d'Asie par exemple au Yémen, en Jordanie et en Arabie Saoudite (Arndt, 2001) mais aussi dans de nombreuses régions d'Afrique de l'Ouest (Hutchinson et Dalziel, 1958). Le bois lourd, dur, résistant aux termites, est utilisé pour faire des piquets, des meubles, des poteaux, des manches d'outils, ou comme bois de feu et de charbon. Cette espèce produit un ombrage ce qui lui vaut sa réputation dans certains pays comme le Niger et la Mauritanie comme arbre de concession et alentours. En médecine traditionnelle, la poudre d'épines calcinées s'utilise contre les morsures des serpents et d'autres utilisations médicinales sont faites comme compresses en cas d'escarres ou pour purifier le sang.

Il n'existe pas de peuplements importants de cette espèce au Sénégal. Par contre, dans certains pays comme le Niger, des semences sont collectées chaque année pour la production de plants. A notre connaissance, aucune donnée bibliographique ne permet d'affirmer qu'un travail a été entrepris au Sénégal sur l'amélioration génétique de cette espèce.

IV.3.5. *Ziziphus mucronata* Willd.



Planche 5. *Ziziphus mucronata* Willd., A : arbre adulte, B : rameaux, feuilles et fruits (Soule, 2011).

Ziziphus mucronata Willd. est appelé le Jujubier de l'hyène ou « Sidem Bouki » en langue Wolof au Sénégal. Largement distribué dans les savanes sahéliennes et sahélo-soudaniennes dans des stations relativement humides, bords des mares, des rivières, sur différents sols ou

sur des termitières, *Z. mucronata* Willd. est un arbuste épineux et sarmenteux de 4 à 5 m de hauteur avec des branches enchevêtrées et retombantes (Planche 5A). Il se présente sous la forme d'un arbuste buissonnant. Les rameaux, brun foncé et noirâtres sont en zigzag et l'écorce gris foncé à tranches rouges, est lisse ou fissurée. Les feuilles sont alternes largement ovales, pointues, glabres et nettement asymétriques et les fleurs sont en fascicules de 10 à 20 fleurs jaunâtres ou verdâtres, courtement pédicellées, glabres. Les fruits sont des drupes globuleuses, brun rouge, foncées à maturité et contenant un gros noyau enrobé dans une pulpe blanc rosâtre plus ou moins farineuse (Planche 5B). Les fruits sont généralement de couleur rouge et le goût de la pulpe est très âcre et très amer donc non comestible (Soule, 2011). Les feuilles et les jeunes pousses sont très appréciées par les dromadaires et les chèvres. Les rameaux servent d'enclos pour le bétail et le bois souvent creux, jaunâtre, résistant aux termites, sert à faire des poteaux, des pieds de lit, des manches d'outils, ou du bois de feu et de charbon. L'espèce passe essentiellement pour une plante médicinale qui jouit d'une très grande notoriété surtout à cause de son emploi unanime et son efficacité singulière contre l'énurésie, l'incontinence urinaire et d'autres problèmes urinaires tels que l'hématurie, l'oligurie, l'anurie ou la dysurie. Par ailleurs, on lui reconnaît les mêmes propriétés thérapeutiques que les autres jujubiers i.e. anti-infectieuse, antidiabétique, anticancéreuse, hypotensive, antivenimeuse et fortifiante.

IV.3.6. *Ziziphus abyssinica* A. Rich.



Planche 6. *Ziziphus abyssinica* A. Rich., A : feuilles et fleurs, B : fruits (http://www.eastafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=47&id=1685).

Ziziphus abyssinica A. Rich. est une espèce répandue, disséminée et assez commune des zones sèches de l'Afrique tropicale, du Sénégal au Cameroun. Elle est retrouvée dans les savanes soudaniennes à guinéennes, sur divers sols et surtout sur les montagnes. Arbuste de 4 à 6 m de haut à cime étalée, à branches retombantes et à épines peu développées, les feuilles, largement ovales, sont grandes (4 à 5 cm de long) très asymétriques à la base et denticulées sur les bords (Planche 6A). Les fruits sont des drupes globuleuses assez grosses et comestibles, glabres et plus ou moins brillantes, brun-pourpre à maturité, contenant un gros noyau noyé dans une pulpe plus ou moins farineuse localement consommée en période de disette dans certains pays comme le Niger (Planche 6B). Les racines sont utilisées en cas de douleurs, de gingivite, de gastrite, de coliques et de dysenterie. Les feuilles sont consommées par bétail et les branches servent de clôtures et d'enclos. Son bois est utilisé pour fabriquer des poteaux de case ou de hutte, comme bois de feu et charbon. Nyaberi *et al.* (2010) ont montré que *Z. abyssinica* peut être efficacement utilisé comme produit de conservation en raison de ses constituants phytochimiques et des propriétés antibactériennes et antioxydantes.

IV.3.7. *Ziziphus sphaerocarpa* Tul.



Planche 7. Aspect morphologique de *Ziziphus sphaerocarpa* Tul., A : arbre adulte, B : fruits. (<http://tropical.forumactif.com/t25-Ziziphus-sphaerocarpa>).

Ziziphus sphaerocarpa Tul. est une espèce de jujubier qui n'est pas très connue comme étant originaire d'Afrique, sauf peut-être dans la partie de l'extrême Nord-Est du continent où elle

peut y avoir été introduite comme une plante cultivée (Chevalier, 1947). Par contre, elle est très présente en Guadeloupe où les populations la considèrent comme héritage de leurs ancêtres. C'est un arbre épineux qui a su s'adapter sur tous les sols de la Guadeloupe, particulièrement en bord de mer (Planche 7A). Le fruit, à grosseur d'une olive, également connu sous le nom de "pomme-surette ", représente l'un des fruits les plus consommés (Planche 7B). La pulpe, jaune verdâtre ou presque blanche, est acide et très rafraîchissante. En Guadeloupe, au lieu d'avoir un rhum issu de la fermentation de la canne à sucre, de l'alcool peut être obtenu à partir de la pomme surette (alcool de surette d'Azincourt). Zozio *et al.* (2014) ont étudié la variabilité qualitative de la pomme-surette au cours du processus de maturation des fruits. Cependant, cette espèce reste encore très peu documentée contrairement aux autres espèces de jujubier. Elle n'est pas présente au Sénégal.

IV.4. Domestication de *Ziziphus mauritiana* Lam.

Espèce à usages multiples, *Z. mauritiana* figure parmi les espèces prioritaires du programme du Centre International pour la Recherche en Agroforesterie (ICRAF) au Sahel. Compte tenu des différents rôles socio-économiques, cette espèce a bénéficié d'efforts significatifs de domestication pour en évaluer les ressources génétiques et développer des techniques appropriées pour sa culture dans les zones soudano-sahéliennes de l'Afrique de l'Ouest. L'espèce est toujours à l'état sauvage, sauf quelques sujets issus de cultivars en provenance d'Inde et de la Thaïlande, introduits récemment au Sahel. Afin d'augmenter la productivité de *Z. mauritiana* au Sahel, l'ICRAF et ses partenaires ont introduit de nouvelles accessions dans la zone sahélienne à partir du Brésil, de l'Inde et de la Thaïlande. En Asie, la domestication de *Z. mauritiana* est en cours depuis des siècles, plus de 300 cultivars ont été enregistrés (Azam Ali *et al.*, 2006). Les activités de domestication de l'espèce en Afrique de l'Ouest sont récentes et deux stratégies ont été appliquées: (i) introduction de cultivars en provenance d'Asie, (ii) essai et sélection des variétés locales. La plupart de ces accessions (Gola, Umran, Kaithli, Sotubata, etc.) sont diffusées en milieu paysan. Au Sénégal, un programme de valorisation et de domestication de *Z. mauritiana* est engagé depuis une dizaine d'années soutenu par le Fonds National de la Recherche Agricole et Agroalimentaire (FNRAA). Ce programme est bâti selon deux axes principaux : la sélection et l'amélioration des jujubiers locaux et l'introduction de variétés indiennes (Danthu *et al.*, 2002). Ce second axe repose sur le constat qu'en Inde, *Z. mauritiana* est l'objet d'un très ancien processus de sélection et d'amélioration

génétique qui a abouti à la création de variétés à très haut potentiel de production dont le volume des fruits est dix à vingt fois supérieur à ceux récoltés dans les peuplements sauvages. Certaines variétés indiennes telles que Gola, Seb (à maturité précoce) ou Umran (plus tardive) et thaïlandaises de jujubiers domestiqués produisent des fruits de la taille d'une cerise et s'adaptent bien aux conditions pédoclimatiques d'Afrique sahélienne (Vashishtha, 1997). Au Burkina Faso, des travaux ont montré que le rendement en fruits de trois variétés indiennes (Gola, Seb et Umran) était beaucoup plus important comparé à celui d'une variété locale (Ouédraogo *et al.*, 2006) après deux saisons de fructification. Introduite au Sénégal par le Centre National de Recherches Forestières (CNRF), la variété Gola a été multipliée par micro-greffage sur porte greffe local (Touré, 2001). Dans des systèmes agroforestiers, *Z. mauritiana* peut être exploité en banque fourragère, haie-vive et brise-vent. Le jujubier local ne fructifie qu'après 24 mois de plantation avec des rythmes de fructification très irréguliers. Non seulement il est caractérisé par une faible productivité, mais aussi par une production de fruits de qualité médiocre (la pulpe représente 1% du poids du fruit).

CHAPITRE II

REPONSES A L'INOCULATION AVEC DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES DE DIFFERENTES ESPECES DE *ZIZIPHUS* ET DE PROVENANCES DE *Z. MAURITIANA* EN SERRE

Ce chapitre a fait en partie l'objet d'un article publié dans *Fruits – the International Journal of Tropical and Subtropical Horticulture*

Babacar Thioye, Sergio Mania de Faria, Aboubacry Kane, Cheikh Ndiaye, Ould Ahmedou Soule, Dioumacor Fall, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ (2017) **Growth response of different species of *Ziziphus* to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi.** *Fruits* 72: 174–181.

CHAPITRE II. REPONSES A L'INOCULATION AVEC DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES DE DIFFERENTES ESPECES DE *ZIZIPHUS* ET DE PROVENANCES DE *Z. MAURITIANA* EN SERRE

I. Introduction

Le jujubier s'adapte très bien aux conditions environnementales chaudes et sèches comme nous l'avons largement énuméré dans la revue bibliographique. Il pousse dans les régions tropicales et subtropicales les plus sèches du monde. Ceci explique qu'il est très répandu dans les zones arides et semi arides de l'Afrique (Burkina Faso, Cameroun, Mali, Niger, Sénégal...) et de l'Asie du sud (Inde, Pakistan...). En raison de son adaptation aux conditions climatiques difficiles, le jujubier joue un rôle important dans la sécurité alimentaire des populations locales (Depommier, 1988). Toutefois, la taxonomie des espèces de jujubier est très complexe et le nombre d'espèces pourrait se situer entre 86 et 170 (Azam-Ali *et al.*, 2006). Les deux espèces majeures couramment utilisées dans les systèmes agroforestiers sont : *Ziziphus mauritiana* Lam., (Jujube d'Inde) connu sous le nom de « Ber » et *Ziziphus jujuba* Mill. (Jujube de Chine) (Azam-Ali *et al.*, 2006). Beaucoup d'autres espèces de *Ziziphus* sont sous utilisées en arboriculture en raison de leurs intérêts en termes de fruits, de bois de chauffage, de fourrage et de pharmacopée (Soule, 2011). Compte tenu des données de la littérature et mis à part l'espèce *Z. mauritiana*, le statut mycorhizien des autres espèces de *Ziziphus* reste inconnu.

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) constituent une composante clef dans les relations plante – sol (van der Heijden *et al.*, 1998 ; Smith & Read, 2008). Ils améliorent l'absorption du phosphore (Bolan, 1991 ; Duponnois *et al.*, 2005), de l'azote (Barea *et al.*, 1991) et de micronutriments (ex. Cu, Zn) et par voie de conséquence la biomasse de la plante (Bürkert & Robson, 1994). Ces effets bénéfiques pourraient varier considérablement entre espèces, provenances et cultivars d'une espèce de plante (Lesueur *et al.*, 2005 ; Plenchette *et al.*, 2005 ; Sousa *et al.*, 2013). La plupart des arbres fruitiers étudiés ont une large distribution notamment en zone sahélienne qui reçoit très peu de précipitations. Dans de telles situations, les arbres fruitiers s'adaptent à ces conditions grâce en partie aux CMA (Mathur *et al.*, 2000 ; Guissou *et al.*, 2001 ; Fitter *et al.*, 2011 ; Smith & Smith 2011). Des travaux ont montré que le jujubier est, parmi 13 arbres fruitiers, celui qui répond mieux à l'inoculation avec deux CMA (*Rhizophagus irregularis* IR27 et *Rhizophagus intraradices*) (Guissou *et al.*, 1998b ; Bâ *et al.*, 2000). Ces données sur la dépendance mycorhizienne (DM) et la nutrition minérale des

fruitiers ont été obtenues sur une provenance (Bâ *et al.*, 2000, 2001 ; Guissou *et al.*, 1998b, 2009 ; Sidibé *et al.*, 2012). Guissou *et al.* (2016) ont montré que la DM des fruitiers peut varier sensiblement selon les espèces et leur provenance. Chez le jujubier, des DM significativement élevées ont été observées avec le champignon *R. irregularis* IR27 chez deux provenances au Sénégal (Bandia et Columba) et une provenance du Burkina Faso (Léri) (Guissou *et al.*, 2016).

Afin d'étudier et de mieux comprendre la variabilité de la réponse à l'inoculation de 7 espèces de *Ziziphus* et de 6 provenances de *Ziziphus mauritiana* Lam., deux expériences ont été réalisées avec des plants de jujubiers (espèces et provenances) inoculés avec trois CMA (*Rhizophagus irregularis*, *Funneliformis mosseae* et *Rhizoglyphus intraradices*) en condition de sol stérilisé.

II. Matériel et méthodes

II.1. Préparation du sol

Un sol sableux prélevé dans la localité de Sangalkam (environ 30 km à l'Est de Dakar) a été utilisé pour étudier la dépendance mycorhizienne de 7 espèces de *Ziziphus* et de 6 provenances de *Z. mauritiana*. Le sol de Sangalkam est caractérisé par sa pauvreté en P assimilable et en N (cf. annexe 1) (Bâ *et al.*, 1999). Il a été tamisé (maille de 2 mm), puis stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 4 heures et distribué dans des gaines en plastique (1,5 kg de sol/sachet).

II.2. Matériel fongique

Trois souches de champignons mycorhiziens à arbuscules ont été utilisées: *Rhizophagus irregularis* isolat IR27 (syn. *Glomus aggregatum* IR27 ; Bâ *et al.*, 1996), *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson et Gerd.) C. Walker et A. Schüssler (Redecker *et al.*, 2013) et *Rhizoglyphus intraradices* (N.C. Schenck et G.S. Sm.) Sieverd, G.A. Silva et Oehl (Sieverding *et al.*, 2014). Les souches de CMA proviennent toutes de la collection du Laboratoire Commun de Microbiologie (Dakar, Senegal). L'inoculum de chaque CMA est composé d'un mélange de sable (substrat de culture), de fragments de racines mycorhizées (système racinaire du maïs), de spores et d'hyphes du CMA. Le nombre de propagules viables dans chaque inoculum a été déterminé par la Méthode du MPN « Most Probable Number »

(Adelman & Morton, 1986). L'inoculation consiste à enfouir dans le sol stérilisé 20 g de ce mélange (inoculum) lors de la transplantation. La densité de propagules de *R. irregularis* IR27, de *F. mosseae* et de *R. intraradices* a été respectivement évaluée à 1635 [763 ; 3483], 1023 [577 ; 2177] et 1347 [629 ; 2870] propagules viables par 20 g d'inoculum. Les plants non inoculés ont reçu la même quantité d'inoculum stérilisée à 120°C pendant 4h et 10 ml d'extrait de l'inoculum filtré afin d'équilibrer la composition microbienne entre les plants inoculés et les témoins non inoculés.

II.3. Matériel végétal

Les semences des 7 espèces de *Ziziphus* (*Z. mauritiana* Lam., *Z. lotus* (L.) Lam., *Z. spina-christi* (L.) Desf., *Z. mucronata* Willd, *Z. amphibia* A. Chev., *Z. abyssinica* A. Rich. et *Z. sphaerocarpa* Tul.) (Tableau 1) et celles des 6 provenances de *Z. mauritiana* (Sénégal, Mali, Mauritanie, Burkina Faso, Niger et Inde) (Tableau 2) ont été traitées dans une solution d'eau de javel NaClO 1% pendant 15 min. Elles ont été ensuite rincées abondamment à l'eau distillée stérile et semées directement dans des sachets en plastique (24 cm x 7,5 cm) à raison de 3 graines/sachet. Les plants ont été arrosés à l'eau de robinet. Les essais ont été conduits en serre au centre de recherche de Bel Air IRD/ISRA (14°44'N, 17°30'O) à la température et à la lumière du jour (température maximale jour/nuit de 30°C/25°C, humidité relative de 75%, photopériode d'environ 14h).

Tableau 1. Origines des semences des différentes espèces de *Ziziphus*.

| <i>Ziziphus</i> spp. | Pays de provenance | Sites de récolte | Longitude | Latitude |
|-------------------------|--------------------|------------------|-----------|-----------|
| <i>Z. mauritiana</i> | Mauritanie | Bouguedra | 08° 97' O | 32° 25' N |
| <i>Z. lotus</i> | Mauritanie | Atar | 13° 05' O | 20° 50' N |
| <i>Z. spina-christi</i> | Mauritanie | Maghama | 12° 85' O | 15° 54' N |
| <i>Z. mucronata</i> | Mauritanie | Maghama | 12° 85' O | 15° 54' N |
| <i>Z. amphibia</i> | Mauritanie | Bouguedra | 08° 97' O | 32° 25' N |
| <i>Z. abyssinica</i> | Burkina Faso | Dindéresso | 04° 25' O | 11° 13' N |
| <i>Z. sphaerocarpa</i> | Guadeloupe | Bois Jolan | 61° 36' O | 16° 23' N |

Tableau 2. Origines des différentes provenances de semences de *Z. mauritiana*.

| Provenances | Pays de provenance | Sites de récolte | Longitude | Latitude |
|----------------------|--------------------|------------------|-----------|-----------|
| <i>Z. mauritiana</i> | Sénégal | Tasset | 16° 52' O | 14° 36' N |
| <i>Z. mauritiana</i> | Mali | Ségou | 06° 16' O | 13° 27' N |
| <i>Z. mauritiana</i> | Mauritanie | Bouguedra | 08° 97' O | 32° 25' N |
| <i>Z. mauritiana</i> | Burkina Faso | Dori | 00° 03' O | 14° 03' N |
| <i>Z. mauritiana</i> | Niger | Sadoré | 02° 16' O | 13° 13' N |
| <i>Z. mauritiana</i> | Inde | Sangalkam | 17° 13' O | 14° 46' N |

➤ **Expérience 1 : Dépendance mycorhizienne de 7 espèces de *Ziziphus***

L'expérience a été conduite suivant un dispositif factoriel à 2 facteurs (*Ziziphus* spp. x CMA) où le facteur « *Ziziphus* spp. » est à 7 niveaux et le facteur « CMA » à 4 niveaux (3 CMA et 1 témoin). Ce dispositif comporte 28 traitements avec 10 répétitions par traitement, soit un total de 280 plants (Figure 9).

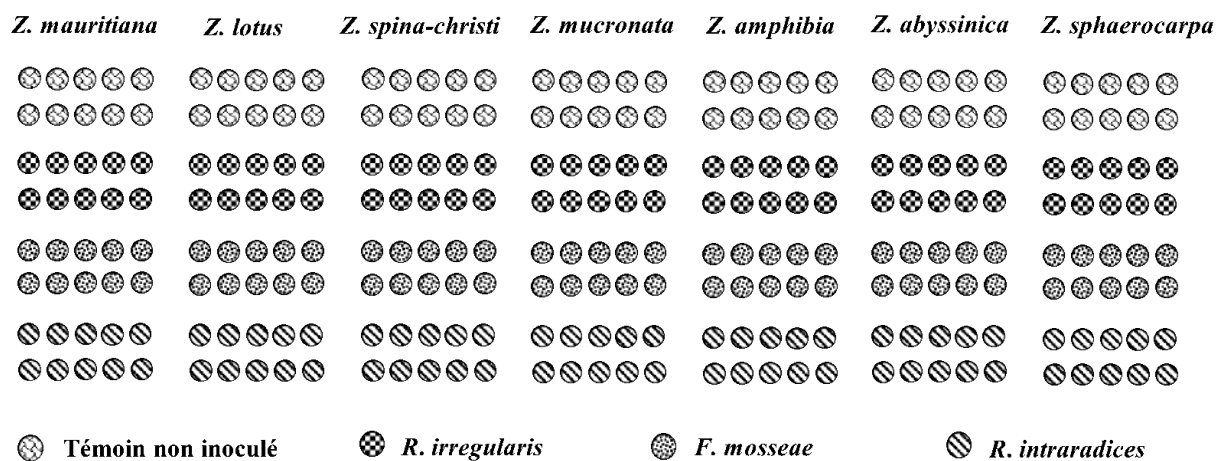


Figure 9. Dispositif expérimental mis en place pour étudier les réponses à l'inoculation des 7 espèces de *Ziziphus*.

➤ **Expérience 2 : Dépendance mycorhizienne de 6 provenances de *Z. mauritiana***

L'expérience a été conduite suivant un dispositif factoriel à 2 facteurs (Provenance x CMA) où le facteur « Provenance » est à 6 niveaux et le facteur « CMA » à 4 niveaux (3 CMA et 1 témoin). Ce dispositif comporte 24 traitements avec 10 répétitions par traitement, soit un total de 240 plants (Figure 10).

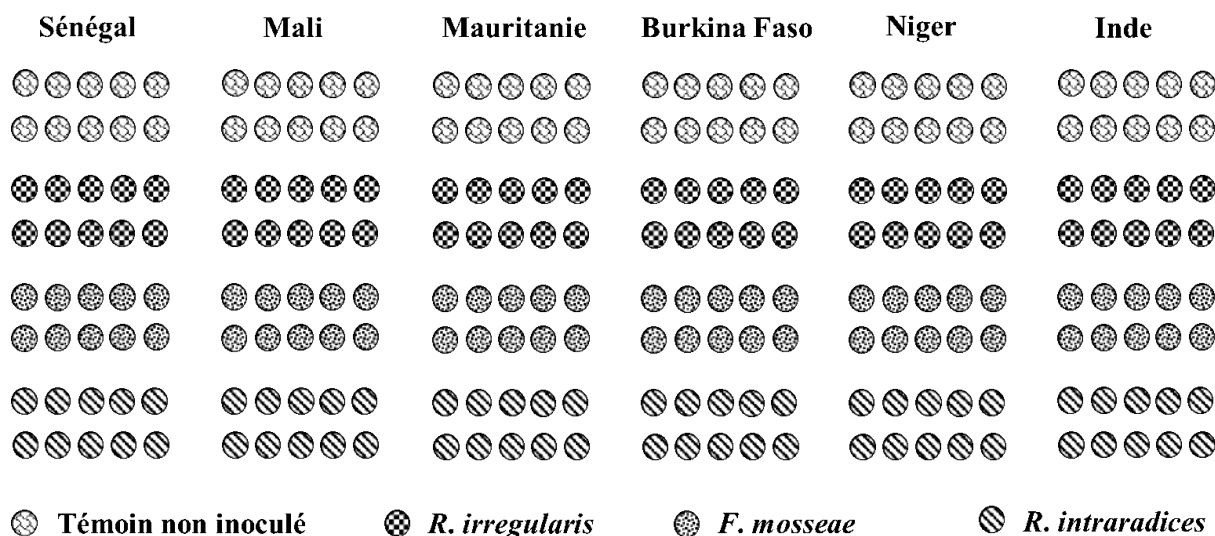


Figure 10. Dispositif expérimental mis en place pour étudier les réponses à l'inoculation des 6 provenances de *Z. mauritiana*.

II.4. Mesure de la hauteur, de la biomasse totale et de la dépendance mycorhizienne

Après 4 mois de croissance en serre, nous avons mesuré pour chaque expérience, la hauteur de la tige principale, les biomasses sèches (aérienne, racinaire et totale) et le rapport de la biomasse sèche des racines/biomasse sèche aérienne des plants. Les poids secs (séchage à l'étuve pendant 3 jours à 70°C) des biomasses produites pour chaque traitement ont été mesurés. La dépendance mycorhizienne (DM) de chaque plant a été déterminée selon la formule proposée par Plenchette *et al.* (1983) : $DM (\%) = 100 \times [(biomasse\ sèche\ des\ plants\ inoculés - biomasse\ sèche\ des\ plants\ non-inoculés) / (biomasse\ sèche\ des\ plants\ inoculés)]$.

II.5. Evaluation du taux de mycorhization des plants inoculés

Le système racinaire de chaque plant a été soigneusement lavé à l'eau distillée pour séparer les racines des plants du substrat de culture. Pour évaluer l'intensité de mycorhization des plants, une partie des racines a été traitée avec du KOH à 10 % (w/v) et incubée dans un bain-marie à 80°C pendant 30 mn. Les racines ont été ensuite rincées plusieurs fois à l'eau de robinet puis elles ont été colorées au Bleu de Trypan à 0,05% à 90°C pendant 30 min (Phillips & Hayman, 1970). Les racines colorées ont été découpées en fragments d'environ 1 cm de longueur et pour chaque plant, l'intensité de mycorhization a été évaluée sur 100 fragments de racines latérales examinés au microscope (x 40) selon la méthode de Trouvelot *et al.* (1986).

II.6. Dosage des teneurs en P et en K des feuilles

Pour chaque plant de jujubier (mycorhizé et non mycorhizé), la partie aérienne (feuilles), séchée à l'étude (70°C pendant 3 jours), a été finement broyée pour déterminer la concentration en phosphore (P) et en potassium (K) dans les feuilles. Pour le dosage du P total, la minéralisation de la poudre végétale a été effectuée par calorimétrie au spectrophotomètre à 660 nm. Le K total a été déterminé par absorption atomique au spectrophotomètre à partir de la solution obtenue après minéralisation de la poudre végétale pour le dosage du P. Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire d'Agriculture et de Chimie de Rio de Janeiro (Brésil).

II.7. Mesure de la longueur des hyphes

La longueur des hyphes extramatricielles a été déterminée après extraction et filtration des hyphes sur des membranes filtres quadrillées par la technique du « Gridline intersection method » (Newman, 1966). Pour ce faire, 2 g de sol de chaque traitement mycorhizé ont été mis dans un tamis de 50 µm et aspergés à l'aide d'une pissette contenant 500 ml d'eau distillée. Le lessivât a été récupéré dans un erlenmeyer et agité à pendant 30 secondes. Trente millilitres (30 ml) ont été prélevés et filtrés à travers une membrane millipore de 1,2 µm de diamètre suivant la méthode décrite par Jakobsen et Rosendahl (1990). Une solution de Bleu de Trypan a ensuite été mise sur le filtre pendant 5 minutes afin de colorer les hyphes. Le filtre rincé à l'eau est mis à sécher sur une lame. Trois répétitions ont été réalisées par traitement. Les filtres séchés ont été montés entre lame et lamelle dans du glycérol 50 % et

observés au microscope optique (Olympus BH4) au grossissement x100 pour le comptage des intersections entre les hyphes mycorhiziennes et le quadrillage de la membrane filtre. La longueur des hyphes (H) a été calculée suivant la formule $H = \pi NA/2L$ où : N est le nombre d'intersections entre les hyphes et le quadrillage de la membrane filtre, A est la surface totale du filtre et L est la longueur totale des lignes de la membrane filtre. Les résultats obtenus ont été exprimés en cm.g^{-1} de sol.

II.8. Analyses statistiques des données

Les variables mesurées dans chaque expérience ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (espèce ou provenance x CMA). Les données de DM et de l'intensité de mycorhization ont été transformées en arc sinus avant d'être soumises à l'ANOVA. Les moyennes de chaque variable ont été comparées en utilisant le test de Tukey (HSD) au seuil de significativité ($P < 0,05$) avec le logiciel XLSTAT (version 2010). Le coefficient de corrélation de Pearson entre les variables dépendantes a été évalué avec le même logiciel.

III. Résultats

III.1. Effet de l'inoculation avec les CMA sur l'intensité de mycorhization et la longueur des hyphes chez les 7 espèces de *Ziziphus*

Les deux facteurs étudiés (*Ziziphus* spp. et CMA) et leur interaction ont un effet significatif ($P < 0,05$) sur tous les paramètres mesurés (Tableau 3). Les résultats montrent que l'intensité de mycorhization varie suivant les espèces de *Ziziphus* et de CMA. En effet, la souche *R. irregularis* IR27 colonise mieux les espèces *Z. lotus*, *Z. amphibia* et *Z. abyssinica* comparée aux deux autres CMA. L'intensité de mycorhization est significativement plus élevée chez les plants de *Z. spina-christi*, *Z. mucronata*, *Z. mauritiana* et *Z. sphaerocarpa* inoculés avec *R. irregularis* IR27 et *R. intraradices*. Les plus faibles intensités de mycorhization des plants sont obtenues avec le champignon *F. mosseae*. La production d'hyphes par les CMA montre quelques variations suivant les espèces de *Ziziphus* (Tableau 3). En effet, la longueur totale des hyphes extramatriciennes dans les échantillons de sol rhizosphérique à partir des traitements inoculés est significativement plus élevée chez les espèces de *Ziziphus* inoculées avec *R. intraradices* sauf *Z. abyssinica*. Quelle que soit l'espèce de *Ziziphus*, la production

d'hyphes augmente selon l'ordre suivant: *F. mosseae*, *R. irregularis* et *R. intraradices* (Tableau 3).

III.2. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la croissance et la dépendance mycorhizienne des 7 espèces de *Ziziphus*

Les résultats montrent que la croissance des plants est plus faible chez les espèces non-inoculées comparée à celles inoculées (Tableau 3). En effet, l'inoculation avec les CMA augmente significativement la hauteur des plants de *Ziziphus* sauf ceux de *Z. lotus*. L'inoculation avec *R. irregularis* a un effet positif sur la production de biomasse de tous plants sauf ceux de *Z. mucronata* alors que l'inoculation avec *R. intraradices* augmente uniquement la biomasse totale des plants de *Z. mauritiana*, *Z. lotus*, *Z. amphibia* et *Z. sphaerocarpa*. Quant à la souche *F. mosseae*, les valeurs de la biomasse totale sont plus élevées chez *Z. mauritiana*, *Z. mucronata*, *Z. amphibia* et *Z. sphaerocarpa* comparativement aux témoins non inoculés (Tableau 3). Le plus faible effet de l'inoculation sur la biomasse totale des plants de *Ziziphus* a été observé avec la souche *F. mosseae*. Les ratios BR/BA des plants inoculés et ceux non inoculés sont similaires sauf pour les espèces *Z. spina-christi* et *Z. sphaerocarpa*. Ce ratio augmente significativement et uniquement chez les plants de *Z. amphibia* inoculés avec *R. irregularis* et *F. mosseae*.

Les résultats de la dépendance mycorhizienne des espèces de *Ziziphus* montrent que leur réponse à l'inoculation diffère entre espèce de *Ziziphus* suivant le champignon inoculé (Tableau 3). Quelle que soit la combinaison *Ziziphus*/CMA, l'espèce *Z. sphaerocarpa* montre les valeurs de DM les plus élevées avec *R. irregularis* sauf pour *Z. sphaerocarpa* inoculé avec *R. intraradices* et *Z. amphibia* inoculé avec *R. irregularis* (Tableau 3). Les valeurs de DM obtenues chez toutes les espèces de *Ziziphus* varient de 68,81 à 78,65%. L'espèce *Z. amphibia*, inoculée avec *F. mosseae*, montre la plus faible valeur de DM (30,5%). Cependant, les valeurs de DM suivent un ordre décroissant suivant le CMA inoculé: *R. irregularis*, *R. intraradices* et *F. mosseae* (Tableau 3). La DM est significativement corrélée avec la longueur des hyphes ($r = 0,902$; $P < 0,0001$) et avec l'intensité de mycorhization ($r = 0,908$; $P < 0,0001$) (Tableau 5).

III.3. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la nutrition minérale des 7 espèces de *Ziziphus*

L'analyse de variance a révélé que les concentrations en P et en K varient suivant l'espèce de *Ziziphus* et le CMA inoculé (Tableau 4). Les combinaisons *Ziziphus*/CMA telles que *Z. sphaerocarpa*-*R. irregularis*, *Z. abyssinica*-*R. irregularis* et *Z. abyssinica*-*R. intraradices* ont montré les concentrations en K les plus élevées dans les feuilles alors que les combinaisons *Z. abyssinica*-*R. irregularis* et *Z. lotus*-*R. intraradices* ont montré les concentrations les plus élevées en P. Pour toutes les espèces de *Ziziphus*, les souches *R. irregularis* et *R. intraradices* ont respectivement fourni plus de K et de P au niveau des feuilles (Tableau 4). La concentration en P est significativement corrélée à la longueur des hyphes ($r = 0,908$; $P < 0,0001$), l'intensité de mycorhization ($r = 0,841$; $P < 0,0001$) et la DM ($r = 0,822$; $P < 0,0001$), contrairement à la concentration en K qui n'est corrélée à aucune de ces variables (Tableau 5).

Tableau 3. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la croissance, la dépendance mycorhizienne, la mycorhization et la longueur de hyphes chez les 7 espèces de *Ziziphus*.

| <i>Ziziphus</i> spp. avec ou sans CMA | Hauteur (cm) | Biomasse aérienne (BA) (g) | Biomasse racinaire (BR) (g) | Ratio BR/BA | Biomasse totale sèche (g) | Dépendance mycorhizienne (%) | Longueur hyphes (cm.g ⁻¹) | Intensité de mycorhization (%) |
|---------------------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|---------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Z. mauritiana</i> | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 31,66±3,34 a | 0,58±0,03 b-e | 1,06±0,31 a-d | 1,85±0,72 b-f | 1,64±0,31 abc | 71,73±1,07 bcd | 46,62±0,77 ef | 78,20±16,29 ab |
| <i>F. mosseae</i> | 26,11±4,63 a-e | 0,57±0,06 b-f | 0,91±0,19 b-f | 1,59±0,29 d-g | 1,48±0,24 bcd | 69,33±0,66 de | 34,10±1,51 i | 46,09±14,46 ghi |
| <i>R. intraradices</i> | 28,00±4,06 a-d | 0,55±0,08 c-g | 1,01±0,10 a-e | 1,85±0,38 b-f | 1,56±0,14 a-d | 70,30±1,22 de | 63,14±1,94 a | 73,78±18,15 bc |
| Témoin | 13,33±1,13 hi | 0,14±0,02 lm | 0,31±0,14 ijk | 2,24±0,62 a-d | 0,45±0,16 h-k | - | - | - |
| <i>Z. lotus</i> | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 12,44±1,50 hi | 0,33±0,14 h-l | 0,38±0,12 h-k | 1,18±0,26 e-j | 0,71±0,25 g-j | 45,29±1,80 g | 41,94±1,79 g | 67,05±15,26 cd |
| <i>F. mosseae</i> | 13,55±1,13 hi | 0,31±0,13 i-l | 0,15±0,04 k | 0,50±0,32 j | 0,46±0,15 h-k | 68,22±1,58 de | 40,38±2,70 hi | 49,12±9,67 fghi |
| <i>R. intraradices</i> | 14,00±1,87 hi | 0,43±0,20 e-j | 0,30±0,08 ijk | 0,67±0,41 h-j | 0,73±0,24 g-j | 55,74±1,46 f | 55,46±1,06 bc | 53,40±8,96 fg |
| Témoin | 11,00±1,22 i | 0,08±0,01 m | 0,13±0,03 k | 1,61±0,31 c-g | 0,21±0,03 k | - | - | - |
| <i>Z. spina-christi</i> | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 24,11±6,16 b-f | 0,57±0,15 b-f | 1,06±0,26 a-d | 1,85±0,29 b-f | 1,64±0,40 abc | 69,66±1,06 de | 40,38±3,29 hi | 85,49±8,52 a |
| <i>F. mosseae</i> | 25,00±4,10 b-f | 0,42±0,08 e-j | 0,83±0,17 b-g | 1,96±0,67 b-e | 1,25±0,54 c-f | 57,52±1,38 f | 42,54±0,49 fg | 73,55±2,42 bc |
| <i>R. intraradices</i> | 23,66±4,49 c-g | 0,44±0,07 e-j | 0,68±0,22 e-h | 1,57±0,40 d-g | 1,12±0,24 d-g | 46,14±1,55 g | 61,80±1,25 a | 84,96±4,87 a |
| Témoin | 11,55±1,93 i | 0,21±0,03 klm | 0,63±0,03 f-i | 2,98±0,45 a | 0,85±0,06 e-h | - | - | - |
| <i>Z. mucronata</i> | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 18,11±2,52 gh | 0,17±0,02 klm | 0,11±0,03 k | 1,62±0,18 c-g | 0,29±0,04 jk | 68,88±1,43 de | 52,78±0,47 bc | 76,95±4,50 b |
| <i>F. mosseae</i> | 23,00±4,59 d-g | 0,56±0,05 c-g | 0,28±0,05 jk | 0,50±0,07 j | 0,84±0,09 e-i | 45,40±0,90 g | 44,25±1,14 efg | 51,67±5,47 fgh |
| <i>R. intraradices</i> | 20,66±4,55 efg | 0,36±0,07 g-k | 0,26±0,15 jk | 0,85±0,45 g-j | 0,63±0,17 h-k | 55,02±1,43 f | 61,37±1,13 a | 74,37±6,02 bc |
| Témoin | 11,77±1,39 i | 0,08±0,01 m | 0,11±0,01 k | 1,39±0,21 e-i | 0,20±0,03 k | - | - | - |

Tableau 3. (suite)

| <i>Ziziphus</i> spp. avec ou sans CMA | Hauteur (cm) | Biomasse aérienne (BA) (g) | Biomasse racinaire (BR) (g) | Ratio BR/BA | Biomasse totale sèche (g) | Dépendance mycorhizienne (%) | Longueur hyphes (cm.g ⁻¹) | Intensité de mycorhization (%) |
|---------------------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Z. amphibia</i> | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 29,22±3,10 abc | 0,71±0,09 bcd | 1,16±0,06 ab | 1,63±0,13 c-g | 1,87±0,15 ab | 74,57±2,65 abc | 32,81±2,05 i | 79,84±14,45 ab |
| <i>F. mosseae</i> | 24,22±3,64 b-f | 0,54±0,14 c-g | 0,76±0,15 d-g | 1,40±0,30 e-h | 1,30±0,23 cde | 30,50±0,75 h | 40,38±0,59 gh | 44,02±3,76 hi |
| <i>R. intraradices</i> | 28,00±4,18 a-d | 0,70±0,10 bcd | 0,84±0,03 b-g | 1,20±0,14 e-j | 1,55±0,12 a-d | 67,21±2,16 e | 54,28±0,74 bc | 46,93±11,86 ghi |
| Témoin | 11,44±1,81 i | 0,25±0,02 j-m | 0,12±0,03 k | 0,48±0,13 j | 0,37±0,04 ijk | - | - | - |
| <i>Z. abyssinica</i> | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 20,22±3,52 fg | 0,53±0,03 d-h | 1,31±0,30 a | 2,46±0,80 ab | 1,84±0,31 ab | 70,55±1,30 cde | 56,83±0,65 b | 67,46±6,96 cd |
| <i>F. mosseae</i> | 20,33±2,29 efg | 0,37±0,10 f-k | 1,05±0,36 a-d | 2,83±0,40 a | 1,42±0,44 bcd | 44,14±1,26 g | 40,38±1,09 i | 43,69±8,63 i |
| <i>R. intraradices</i> | 20,33±3,04 efg | 0,46±0,08 e-i | 1,12±0,21 abc | 2,43±0,65 ab | 1,58±0,21 a-d | 68,15±2,25 de | 52,29±1,92 c | 56,20±4,94 ef |
| Témoin | 12,88±1,76 hi | 0,36±0,11 g-k | 0,84±0,29 b-g | 2,33± 0,40 a-d | 1,20±0,38 c-f | - | - | - |
| <i>Z. sphaerocarpa</i> | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 29,66±1,58 ab | 0,99±0,19 a | 1,00±0,20 a-e | 1,01±0,41 f-j | 1,99±0,33 a | 78,65±1,65 a | 51,40±1,54 cd | 66,89±10,31 cd |
| <i>F. mosseae</i> | 24,55±3,53 b-f | 0,74±0,07 bc | 0,78±0,15 c-g | 1,05±0,23 f-j | 1,53±0,14 a-d | 68,81±1,66 de | 47,55±0,90 de | 64,33±9,90 d |
| <i>R. intraradices</i> | 29,22±3,52 abc | 0,77±0,15 b | 1,02±0,20 a-e | 1,32±0,27 e-i | 1,79±0,32 ab | 74,96±1,99 ab | 53,60±2,31 bc | 62,50±8,60 de |
| Témoin | 13,88±2,80 hi | 0,27±0,03 i-m | 0,55±0,20 g-j | 2,37±1,10 a-d | 0,82±0,45 f-i | - | - | - |
| Facteurs testés | | | | | | | | |
| CMA | *** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | *** |
| <i>Ziziphus</i> spp. | *** | ** | * | * | ** | *** | *** | ** |
| CMA× <i>Ziziphus</i> spp. | *** | *** | ** | NS | *** | *** | *** | *** |

Dans chacune des colonnes, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P<0,05$) selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$.

Tableau 4. Effet de l'inoculation avec les CMA sur les teneurs en P et K des 7 espèces de *Ziziphus*.

| <i>Ziziphus</i> spp. avec ou sans CMA | K (%) | P (%) |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|
| <i>Z. mauritiana</i> | | |
| <i>R. irregularis</i> | 08,11 ± 0,15 klm | 2,64 ± 0,04 cd |
| <i>F. mosseae</i> | 07,33 ± 0,32 lmn | 1,93 ± 0,04 i |
| <i>R. intraradices</i> | 06,52 ± 0,15 no | 2,54 ± 0,12 cde |
| Témoin | 05,48 ± 0,02 o | 0,70 ± 0,03 k |
| <i>Z. lotus</i> | | |
| <i>R. irregularis</i> | 10,97 ± 0,17 fgh | 1,95 ± 0,03 hi |
| <i>F. mosseae</i> | 11,34 ± 0,66 fg | 2,32 ± 0,09 efg |
| <i>R. intraradices</i> | 12,15 ± 0,43 ef | 2,96 ± 0,12 ab |
| Témoin | 08,48 ± 0,02 j-m | 0,83 ± 0,03 k |
| <i>Z. spina-christi</i> | | |
| <i>R. irregularis</i> | 08,61 ± 0,12 jkl | 2,32 ± 0,05 efg |
| <i>F. mosseae</i> | 07,96 ± 0,02 klm | 2,12 ± 0,03 f-i |
| <i>R. intraradices</i> | 09,73 ± 0,45 hij | 2,38 ± 0,04 def |
| Témoin | 07,14 ± 0,36 mn | 0,84 ± 0,04 k |
| <i>Z. mucronata</i> | | |
| <i>R. irregularis</i> | 12,71 ± 0,20 de | 2,62 ± 0,10 cd |
| <i>F. mosseae</i> | 10,89 ± 0,22 fgh | 2,15 ± 0,11 f-i |
| <i>R. intraradices</i> | 12,94 ± 0,14 cde | 2,23 ± 0,13 fgh |
| Témoin | 10,48 ± 0,02 gh | 0,64 ± 0,04 k |
| <i>Z. amphibia</i> | | |
| <i>R. irregularis</i> | 09,73 ± 0,30 hij | 2,21 ± 0,10 f-i |
| <i>F. mosseae</i> | 11,15 ± 0,27 fg | 2,17 ± 0,09 f-i |
| <i>R. intraradices</i> | 08,61 ± 0,54 jkl | 2,15 ± 0,15 f-i |
| Témoin | 08,81 ± 0,56 ijk | 0,68 ± 0,04 k |
| <i>Z. abyssinica</i> | | |
| <i>R. irregularis</i> | 15,18 ± 0,21 ab | 3,18 ± 0,03 a |
| <i>F. mosseae</i> | 13,75 ± 0,83 cd | 2,04 ± 0,04 ghi |
| <i>R. intraradices</i> | 15,36 ± 0,45 ab | 2,29 ± 0,08 efg |
| Témoin | 10,51 ± 0,40 gh | 0,86 ± 0,02 k |
| <i>Z. sphaerocarpa</i> | | |
| <i>R. irregularis</i> | 16,28 ± 0,12 a | 2,77 ± 0,10 bc |
| <i>F. mosseae</i> | 13,73 ± 0,24 cd | 2,80 ± 0,03 bc |
| <i>R. intraradices</i> | 14,15 ± 0,37 bc | 2,54 ± 0,03 cde |
| Témoin | 10,12 ± 0,07 ghi | 1,30 ± 0,07 j |
| Facteurs testés | | |
| CMA | *** | *** |
| <i>Ziziphus</i> spp. | ** | *** |
| CMA × <i>Ziziphus</i> spp. | *** | *** |

Dans chacune des colonnes, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Tukey (HSD); NS: non significatif; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Tableau 5. Coefficients de corrélation (r) entre la longueur des hyphes, l'intensité de mycorhization, la dépendance mycorhizienne, le ratio BR/BA et les teneurs en P et en K des feuilles des espèces de *Ziziphus*.

| | K | P | LH | IM | DM | Ratio BR/BA |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| K | 1 | | | | | |
| P | 0,365 | 1 | | | | |
| LH | 0,268 | 0,908* | 1 | | | |
| IM | 0,145 | 0,841* | 0,938* | 1 | | |
| DM | 0,166 | 0,822* | 0,902* | 0,908* | 1 | |
| Ratio BR/BA | -0,051 | -0,256 | -0,300 | -0,236 | -0,236 | 1 |

LH : Longueur des hyphes ; IM : Intensité de mycorhization ; DM : Dépendance mycorhizienne ; BR : Biomasse racinaire ; BA : Biomasse aérienne ; * : significatif à $P < 0,001$ selon les coefficients de corrélation de Pearson.

III.4. Effet de l'inoculation avec les CMA sur l'intensité de mycorhization et la longueur des hyphes chez les 6 provenances de *Z. mauritiana*

En serre, *Z. mauritiana* se montre très réceptive aux CMA. En effet, le taux de mycorhization est très important et dépasse généralement les 70% (Tableau 6). Cependant, les différents inocula ne présentent pas le même comportement quant aux valeurs de l'intensité de mycorhization. En effet, l'inoculum avec *R. irregularis* s'est montré le plus efficace sur toutes les provenances tandis que *F. mosseae* présente les valeurs les plus faibles. Les résultats montrent que quelle que soit la provenance de *Z. mauritiana*, le champignon *R. irregularis* présente le taux de mycorhization le plus élevé. Il est de 80% chez la provenance Inde alors que les provenances Sénégal, Mali, Mauritanie et Burkina Faso présentent des taux de mycorhization comparables avec *R. irregularis* (Tableau 6). Les plus faibles taux de mycorhization sont notés chez la provenance Niger avec *R. irregularis* (55%), *R. intraradices* (51%) et *F. mosseae* (44%). Les valeurs de la longueur des hyphes de CMA sont nettement plus élevées chez toutes les provenances de *Z. mauritiana* inoculées avec le champignon *R. intraradices* sauf pour la provenance Inde (Tableau 6). La plus grande valeur de la longueur

des hyphes (65 cm.g^{-1}) est notée chez la provenance Burkina Faso alors que *F. mosseae* présente les plus faibles longueurs d'hyphes (38 cm.g^{-1} au plus) chez toutes les provenances.

III.5. Effet de l'inoculation avec des CMA sur la croissance et la dépendance mycorhizienne des 6 provenances de *Z. mauritiana*

Les effets des différents CMA sur la croissance et la dépendance mycorhizienne (DM) chez les provenances de *Z. mauritiana* sont présentés dans le tableau 6. Les deux facteurs étudiés (provenance et CMA) et leur interaction ont un effet significatif ($P < 0,05$) sur tous les paramètres de croissance et la DM. L'effet de l'inoculation avec les CMA augmente significativement la croissance en hauteur et la biomasse des plants inoculés comparé aux témoins non inoculés. A part la provenance Inde, les plants des autres provenances de *Z. mauritiana* se comportent quasiment de la même façon avec *R. irregularis*. En effet, les provenances Sénégal, Mauritanie, Mali, Burkina Faso et Niger inoculées avec *R. irregularis* présentent des valeurs comparables en termes de hauteur, de biomasse totale et de DM (Tableau 6). La meilleure stimulation a été obtenue lorsque *Z. mauritiana* est en association avec *R. irregularis* quelle que soit la provenance. Néanmoins, la meilleure croissance des plants a été observée chez la provenance Inde en association avec *R. irregularis*, *F. mosseae* ou *R. intraradices*. Les ratios BR/BA des plants inoculés et ceux des non inoculés sont quasiment similaires pour toutes les provenances de *Z. mauritiana*. Ce ratio n'augmente pas avec l'inoculation des 3 CMA et il n'est corrélé à aucune variable (Tableau 8).

Les résultats montrent que la DM la plus élevée (68,80%) a été observée chez la provenance Burkina Faso inoculée avec *R. irregularis* alors que la plus faible DM a été notée chez la provenance Niger inoculée avec *F. mosseae*. La DM des provenances de *Z. mauritiana* est significativement corrélée à la longueur des hyphes ($r = 0,617$; $P < 0,001$) et à l'intensité de mycorhization ($r = 0,831$; $P < 0,001$) (Tableau 8).

III.6. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la nutrition minérale des 6 provenances de *Z. mauritiana*

Les effets des CMA sur les concentrations en K et P dans les feuilles des plants de *Z. mauritiana* sont consignés dans le tableau 7. Les résultats montrent un effet positif des CMA sur les concentrations en K et P dans les feuilles de *Z. mauritiana*. Quelle que soit la

provenance, les concentrations en K et P dans les feuilles de *Z. mauritiana* inoculés avec *R. irregularis* diffèrent significativement des plants non inoculés. Les plants inoculés avec *R. intraradices* et *F. mosseae* des provenances Sénégal, Mali, Niger et Mauritanie ont des concentrations en K comparables à celles des témoins. Par contre chez la provenance Inde, la mycorhization avec *R. irregularis* ou *R. intraradices* augmente significativement la concentration en K comparativement aux témoins (Tableau 7). La concentration en P est significativement corrélée à la longueur des hyphes ($r = 0,655$; $P < 0,001$), à l'intensité de mycorhization ($r = 0,758$; $P < 0,001$) et à la DM ($r = 0,548$; $P < 0,001$), contrairement à la concentration en K qui n'est corrélée à aucune de ces variables citées (Tableau 8).

Tableau 6. Effet de l'inoculation avec les CMA sur la croissance, la dépendance mycorhizienne, la mycorhization et la longueur de hyphes chez les 6 provenances de *Z. mauritiana*.

| Provenance de <i>Z. mauritiana</i> avec ou sans CMA | Hauteur (cm) | Biomasse aérienne (BA) (g) | Biomasse racinaire (BR) (g) | Ratio BR/BA | Biomasse totale sèche (g) | Dépendance mycorhizienne (%) | Longueur hyphes (cm.g ⁻¹) | Intensité de mycorhization (%) |
|---|-----------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Sénégal | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 32,44±3,85 bcde | 0,61±0,04 bcd | 1,24±0,11 abc | 2,03±0,20 cde | 1,85±0,14 abcd | 54,49±2,74 cd | 39,89±0,60 fgh | 76,47±1,05 b |
| <i>F. mosseae</i> | 26,33±4,79 e-h | 0,51±0,11 d-h | 1,04±0,13 a-f | 2,04±0,43 cde | 1,54±0,21 b-g | 47,40±1,57 ef | 38,38±1,48 gh | 57,08±1,17 de |
| <i>R. intraradices</i> | 27,88±3,77 defg | 0,57±0,06 cdef | 1,06±0,08 a-f | 1,85±0,16 def | 1,63±0,14 a-f | 50,84±1,25 de | 59,18±2,03 b | 64,00±2,08 c |
| Témoin | 16,00±0,70 j | 0,20±0,03 jkl | 0,50±0,09 g-k | 2,50±0,25 bcd | 0,70±0,13 jk | - | - | - |
| Mali | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 29,27±4,88 b-f | 0,60±0,08 bcde | 1,39±0,21 a | 2,31±0,79 bcde | 1,99±0,23 ab | 61,32±1,68 b | 42,65±0,74 fg | 65,63±1,49 c |
| <i>F. mosseae</i> | 22,88±6,66 f-j | 0,38±0,10 f-j | 1,21±0,32 abcd | 3,18±0,54 ab | 1,21±0,38 e-j | 36,58±1,72 gh | 35,88±1,94 hi | 55,50±1,63 ef |
| <i>R. intraradices</i> | 26,66±4,52 defg | 0,45±0,06 d-i | 1,03±0,15 a-f | 2,28±0,30 bcde | 1,48±0,20 c-g | 39,44±1,68 g | 52,14±2,41 cd | 55,19±1,16 f |
| Témoin | 17,33±1,00 j | 0,16±0,02 l | 0,60±0,09 f-k | 3,75±0,62 a | 0,76±0,10 jk | - | - | - |
| Mauritanie | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 28,55±2,64 c-g | 0,48±0,03 d-h | 1,17±0,30 a-e | 2,43±0,69 bcde | 1,66±0,30 a-f | 50,29±1,23 de | 46,40±1,30 ef | 76,33±2,51 b |
| <i>F. mosseae</i> | 25,33±3,20 e-i | 0,44±0,06 d-i | 0,68±0,19 d-j | 1,54±0,30 ef | 1,13±0,24 f-j | 36,78±1,01 gh | 32,71±1,17 ij | 58,69±1,28 de |
| <i>R. intraradices</i> | 22,44±4,06 f-j | 0,49±0,08 d-h | 0,82±0,10 b-i | 1,67±0,37 ef | 1,31±0,14 e-i | 22,69±2,24 i | 60,51±1,97 b | 68,38±0,70 c |
| Témoin | 17,00±0,86 j | 0,21±0,01 ijkl | 0,66±0,09 e-k | 3,14±0,52 ab | 0,87±0,09 ijk | - | - | - |
| Burkina Faso | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 33,77±4,07 abcd | 0,62±0,18 bc | 1,28±0,44 ab | 2,06±0,79 cde | 1,90±0,56 abc | 68,80±1,47 a | 48,02±2,80 de | 68,69±1,17 c |
| <i>F. mosseae</i> | 28,11±3,96 defg | 0,40±0,10 fghi | 0,64±0,32 d-j | 1,60±0,41 ef | 1,04±0,39 hijk | 42,52±0,88 f | 33,51±1,13 ij | 55,88±1,47 ef |
| <i>R. intraradices</i> | 26,55±5,02 d-h | 0,55±0,08 c-g | 1,21±0,15 abcd | 2,20±0,22 bcde | 1,76±0,22 a-e | 57,85±0,98 c | 65,42±1,66 a | 70,52±1,70 d |
| Témoin | 19,10±2,10 hij | 0,20±0,09 jkl | 0,39±0,13 k | 1,95±0,94 def | 0,60±0,20 k | - | - | - |

Tableau 6. (suite)

| Provenance de <i>Z. mauritiana</i> avec ou sans CMA | Hauteur (cm) | Biomasse aérienne (BA) (g) | Biomasse racinaire (BR) (g) | Ratio BR/BA | Biomasse totale sèche (g) | Dépendance mycorhizienne (%) | Longueur hyphes (cm.g ⁻¹) | Intensité de mycorhization (%) |
|---|-----------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Niger | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 27,78±3,1 defg | 0,48±0,09 d-h | 1,17±0,30 a-e | 2,43±0,52 bcde | 1,65±0,37 a-f | 49,26±0,99 de | 51,18±2,00 cd | 55,91±1,96 ef |
| <i>F. mosseae</i> | 26,13±1,83 e-i | 0,36±0,07 g-k | 0,81±0,20 b-i | 2,25±0,39 bcde | 1,17±0,24 g-k | 39,06±1,13 g | 31,12±1,44 jk | 44,50±2,97 h |
| <i>R. intraradices</i> | 22,69±3,17 f-j | 0,46±0,11 dh | 0,95±0,16 b-h | 2,06±0,26 cde | 1,41±0,26 d-h | 14,58±1,46 j | 56,58±1,27 bc | 51,04±0,96 g |
| Témoin | 18,77±2,77 ij | 0,26±0,06 hijk | 0,74±0,11 c-j | 2,84±0,65 abc | 1,00±0,14 hijk | - | - | - |
| Inde | | | | | | | | |
| <i>R. irregularis</i> | 40,33±5,80 a | 0,99±0,18 a | 1,29±0,30 ab | 1,30±0,40 f | 2,28±0,43 a | 64,27±2,24 ab | 44,22±1,66 fg | 80,16±2,01 a |
| <i>F. mosseae</i> | 35,33±5,17 ab | 0,55±0,14 c-g | 1,20±0,08 abcd | 2,18±0,22 bcde | 1,75±0,14 a-e | 46,86±1,84 ef | 30,10±2,45 k | 65,05±0,91 b |
| <i>R. intraradices</i> | 34,77±9,01 abc | 0,77±0,21 b | 1,03±0,15 a-f | 1,33±0,28 f | 1,80±0,32 abcd | 40,98±1,23 fg | 46,73±0,97 ef | 69,63±2,20 b |
| Témoin | 20,55±5,24 ghij | 0,40±0,21 fghi | 0,66±0,22 ek | 1,65±1,13 ef | 1,06±0,41 hijk | - | - | - |
| Facteurs testés | | | | | | | | |
| CMA | *** | *** | ** | ** | *** | *** | *** | *** |
| Provenance | *** | * | *** | NS | ** | *** | *** | NS |
| CMA × Provenance | *** | ** | ** | NS | ** | *** | *** | ** |

Dans chacune des colonnes, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Tableau 7. Effet de l'inoculation avec les CMA sur les concentrations en P et K des feuilles des 6 provenances de *Z. mauritiana*.

| Provenance de <i>Z. mauritiana</i> avec ou sans CMA | K (%) | P (%) |
|--|--------------------|----------------|
| Sénégal | | |
| <i>R. irregularis</i> | 09,43 ± 0,69 cd | 3,06 ± 0,05 bc |
| <i>F. mosseae</i> | 06,06 ± 0,21 ij | 1,79 ± 0,09 jk |
| <i>R. intraradices</i> | 06,44 ± 0,06 hij | 2,42 ± 0,05 fg |
| Témoin | 05,72 ± 0,05 j | 1,67 ± 0,01 k |
| Mali | | |
| <i>R. irregularis</i> | 08,47 ± 0,15 de | 3,22 ± 0,02 b |
| <i>F. mosseae</i> | 08,21 ± 0,14 def | 2,21 ± 0,05 hi |
| <i>R. intraradices</i> | 07,01 ± 0,20 fgghi | 2,70 ± 0,03 de |
| Témoin | 06,11 ± 0,06 ij | 1,69 ± 0,02 k |
| Mauritanie | | |
| <i>R. irregularis</i> | 08,18 ± 0,22 def | 2,95 ± 0,08 cd |
| <i>F. mosseae</i> | 06,36 ± 0,27 hij | 1,84 ± 0,03 jk |
| <i>R. intraradices</i> | 06,73 ± 0,58 ghij | 2,52 ± 0,01 ef |
| Témoin | 05,48 ± 0,02 j | 0,95 ± 0,03 m |
| Burkina Faso | | |
| <i>R. irregularis</i> | 11,13 ± 0,99 b | 3,17 ± 0,17 bc |
| <i>F. mosseae</i> | 08,31 ± 0,31 de | 2,15 ± 0,08 i |
| <i>R. intraradices</i> | 09,31 ± 0,49 cd | 2,23 ± 0,05 hi |
| Témoin | 07,76 ± 0,06 efg | 0,64 ± 0,01 n |
| Niger | | |
| <i>R. irregularis</i> | 08,41 ± 0,40 de | 2,99 ± 0,09 cd |
| <i>F. mosseae</i> | 07,45 ± 0,16 efg | 2,12 ± 0,02 i |
| <i>R. intraradices</i> | 07,22 ± 0,02 e-i | 2,21 ± 0,03 hi |
| Témoin | 06,32 ± 0,25 hij | 1,16 ± 0,03 l |
| Inde | | |
| <i>R. irregularis</i> | 13,58 ± 0,39 a | 3,97 ± 0,06 a |
| <i>F. mosseae</i> | 10,62 ± 0,18 bc | 2,32 ± 0,01 gh |
| <i>R. intraradices</i> | 12,84 ± 0,50 a | 3,04 ± 0,06 bc |
| Témoin | 09,95 ± 0,25 bc | 1,91 ± 0,07 j |
| CMA | ** | *** |
| Provenance | *** | ** |
| CMA × Provenance | ** | *** |

Dans chacune des colonnes, les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Tukey (HSD); NS: non significatif; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Tableau 8. Coefficients de corrélation (r) entre la longueur des hyphes, l'intensité de mycorhization, la dépendance mycorhizienne, le ratio BR/BA et les teneurs en P et en K des feuilles des provenances de *Z. mauritiana*.

| | K | P | LH | IM | DM | Ratio BR/BA |
|----------------|-------|--------|--------|--------|-------|----------------|
| K | 1 | | | | | |
| P | 0,084 | 1 | | | | |
| LH | 0,001 | 0,655* | 1 | | | |
| IM | 0,066 | 0,758* | 0,688* | 1 | | |
| DM | 0,060 | 0,548* | 0,617* | 0,831* | 1 | |
| Ratio BR/BA | 0,216 | 0,274 | 0,165 | 0,203 | 0,141 | 1 |

LH : Longueur des hyphes ; IM : Intensité de mycorhization ; DM : Dépendance mycorhizienne ; BR : Biomasse racinaire ; BA : Biomasse aérienne ; * significatif à $P < 0,001$ selon les coefficients de corrélation de Pearson.

IV. Discussion

Nos résultats montrent que l'inoculation avec les CMA améliore significativement la croissance et la nutrition minérale aussi bien des espèces de *Ziziphus* que des provenances *Z. mauritiana*. Des 3 CMA testés, seuls *R. irregularis* et *R. intraradices* sont efficaces sur tous les paramètres mesurés chez les espèces de *Ziziphus* tandis que seul *R. irregularis* a été le plus efficace chez les provenances de *Z. mauritiana*. Nos résultats confirment des études antérieures qui ont montré que les plants de *Z. mauritiana* donnent les meilleures réponses à l'inoculation en termes de production de biomasse notamment avec *R. irregularis* (Guissou *et al.*, 1998b ; Bâ *et al.*, 2000, 2001 ; Guissou, 2009 ; Sidibé *et al.*, 2012 ; Guissou *et al.*, 2016). Même si le champignon *F. mosseae* présente les plus faibles taux de mycorhization chez les jujubiers, son association avec *Z. spina-christi* est quand même intéressante en termes de colonisation racinaire (73,55%). Ce champignon couramment utilisé en Afrique de l'Ouest a été cependant efficace chez des acacias (Colonna *et al.*, 1991 ; Ducouso *et al.*, 1992). Mais, comme l'ont montré Bagyaraj (1992) et Ingleby *et al.* (1997), le niveau du taux de mycorhization n'est pas nécessairement fonction du nombre de propagules viables dans l'inoculum. De ce fait, nos résultats montrent que les jujubiers pourraient être tout simplement moins réceptifs à *F. mosseae*. En revanche, le taux de mycorhization le plus élevé trouvé dans les racines des plants inoculés est à peu près de l'ordre de 80 % pour toutes les provenances de *Z. mauritiana*. Cette valeur est similaire à celles présentées par d'autres auteurs comme étant de bons indicateurs de l'efficacité de l'inoculation (Guissou *et al.*, 1998 ; Bâ *et al.*, 2000, 2001 ; Guissou, 2009 ; Sidibé *et al.*, 2012 ; Guissou *et al.*, 2016). De plus, Bâ *et al.* (2001), Guissou (2009) et Sidibé *et al.* (2012) ont constaté que la pauvreté des sols en propagules mycorhiziennes pourrait avoir un effet négatif sur la croissance de *Z. mauritiana*.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à d'autres espèces de *Ziziphus* et à différentes provenances de *Z. mauritiana*, et avons montré pour la première fois, l'efficacité de trois CMA (*R. irregularis*, *R. intraradices* et *F. mosseae*) sur 7 espèces de *Ziziphus* (y compris *Z. mauritiana*) et sur 6 provenances de *Z. mauritiana* dans des conditions en serre. En moyenne, toutes les espèces de *Ziziphus* et provenances de *Z. mauritiana* sont colonisées dans les mêmes proportions et dans l'ordre décroissant avec *R. irregularis* (74,55% et 70,53% respectivement pour les espèces et provenances), *R. intraradices* (64,59% et 63,12%) et *F. mosseae* (53,21% et 56,11%). On constate également que l'effet de l'inoculation avec *R. irregularis* sur le taux de mycorhization des plants par chaque CMA est comparable. Il existe une forte corrélation positive entre les taux de mycorhization et la DM quelles que soient les

espèces de *Ziziphus* ($r = 0,908$, $P < 0,0001$) et la provenance de *Z. mauritiana* ($r = 0,831$, $P < 0,0001$). En effet, la DM des espèces de *Ziziphus* avec *F. mosseae* est de 54,84% alors que les DM les plus élevées, obtenues avec *R. irregularis* et *R. intraradices*, ont respectivement atteint 68,47% et 62,49%. Pour les provenances de *Z. mauritiana*, la DM la plus élevée est observée chez la provenance du Burkina Faso fortement colonisée (68,80%). Ces résultats sont en accord avec ceux de Tawaraya (2003).

Les différences observées dans la réponse à l'infection mycorhizienne des jujubiers pourraient être dues à des différences dans le développement du réseau d'hyphes extra-matriciels. Dans notre étude, la production des hyphes a augmenté de manière significative en fonction des espèces de CMA dans l'ordre décroissant *R. intraradices*, *R. irregularis* et *F. mosseae*. Il existe en effet une corrélation fortement significative ($r = 0,902$, $P < 0,001$) entre le développement des hyphes extra-matriciels et la DM. Les résultats de notre étude sont en accord avec ceux de Yao *et al.* (2001) qui ont montré que la DM de trois cultivars de *Triticum aestivum* était déterminée par le développement des hyphes extramatricielles. L'inoculation mycorhizienne induit également une diminution significative des ratios BR/BA en particulier chez *Z. sphaerocarpa* et *Z. spina-christi* par rapport aux plants non mycorhizés. De plus, il y a une corrélation négative entre le BR/BA et la longueur des hyphes ($r = -0,300$, $P < 0,014$), la colonisation mycorhizienne ($r = -0,236$, $P < 0,184$) et la DM ($r = -0,236$, $P < 0,184$). Ces résultats sont à rapprocher avec ceux obtenus chez l'arganier (Nouaim & Chaussod, 1994) et pourraient être expliqués par une plus grande efficacité du système racinaire grâce aux mycorhizes en raison du développement des hyphes.

L'absorption de nutriments est considérée comme un facteur souvent important associé à l'amélioration de la croissance de différentes espèces de plantes (Mathur & Vyas, 1999 ; Klironomos, 2003 ; Tawaraya, 2003). Dans notre étude, l'inoculation avec les CMA augmente de manière significative les teneurs en P et en K des *Ziziphus* spp. et des provenances de *Z. mauritiana*. L'absorption des éléments minéraux est plus élevée dans les plants mycorhizés comparé à ceux non mycorhizés. Par conséquent, l'amélioration de la biomasse sèche totale des *Ziziphus* spp. pourrait être attribuée à l'amélioration de l'absorption des éléments minéraux par les CMA. Nos résultats montrent que les jujubiers diffèrent dans leur capacité d'absorption en K et en P suivant l'espèce de CMA. *Z. sphaerocarpa* et *Z. abyssinica* en symbiose avec *R. irregularis* accumulent plus de K et de P que les autres combinaisons *Ziziphus*/CMA alors que quelle que soit la provenance de *Z. mauritiana*, on obtient le même résultat chez les plants

inoculés avec *R. irregularis*. On peut ainsi dire que les jujubiers inoculés avec *R. irregularis* bénéficient plus de la mycorhization avec de fortes valeurs de DM probablement à cause de sa forte absorption en P et en K dans les feuilles. Des résultats comparables ont été également obtenus chez des provenances de *Z. mauritiana* (Guissou *et al.*, 1998b ; Bâ *et al.*, 2001 ; Guissou 2009 ; Sidibé *et al.*, 2012 ; Guissou *et al.*, 2016). Chez les *Ziziphus* spp., l'amélioration de l'état nutritionnel en P et K des plants est plus marquée avec *R. irregularis* et *R. intraradices* consécutivement à un meilleur taux de colonisation mycorhizienne avec *R. intraradices* et *R. irregularis*. Nos résultats confirment les résultats de Koide & Mosse (2004) qui ont montré qu'il existe une relation évidente entre le degré de colonisation par les CMA du système racinaire d'une plante et la capacité de la plante à bénéficier de manière significative de cette symbiose. Des études ont également démontré que lorsque le sol est faible en P, la DM des arbres fruitiers diffèrent fortement avec les CMA (Guissou *et al.*, 1998b ; Bâ *et al.*, 2000 ; Guissou *et al.*, 2016). Le P est un élément critique pour la croissance des plantes et représente environ 0,2% du poids sec, mais il reste l'un des éléments nutritifs les plus difficiles à acquérir pour les plantes (Smith *et al.*, 2011). Mieux, il a été bien établi que la DM est souvent attribuée à une augmentation de l'absorption de P par les CMA (Tawaraya, 2003 ; Smith & Smith, 2012).

L'absorption du phosphore a probablement plus contribué que celle du potassium (Guissou *et al.*, 1998b) car une corrélation positive a été observée entre la concentration en P et la DM des jujubiers alors qu'il n'y a pas eu de corrélation significative entre la DM et la concentration en K. Ce résultat suggère que le potassium a peu contribué à la production de biomasse des plants de jujubiers. Dans notre étude, ces paramètres nutritionnels pourraient bien contribuer à améliorer la disponibilité des éléments minéraux pour les *Ziziphus* spp. et, par conséquent, augmenter la production de la biomasse. Il a été démontré que la production d'hyphes extramatriciels pourrait jouer un rôle-clé dans l'absorption et le transport de P (Jakobsen & Rosendahl, 1990). Nos résultats montrent que la longueur totale des hyphes dans les échantillons de sol provenant des traitements inoculés est significativement plus élevée avec *R. intraradices*. De plus, il y a une corrélation significative entre la DM et la longueur des hyphes ($r = 0,822$, $P < 0,001$). Ce résultat est également obtenu chez les provenances de *Z. mauritiana*. Nos données sur la longueur des hyphes montrent clairement que l'efficacité du champignon dépend de l'espèce de *Ziziphus* associée. Dans notre étude comme dans d'autres, la longueur des hyphes diffère suivant le CMA (Jakobsen *et al.*, 1992 ; Pearson & Jakobsen, 1993). Il a été démontré que les réseaux d'hyphes développés par les CMA peuvent influencer

la croissance des plantes, l'absorption des éléments nutritifs ainsi que les interactions entre plantes (Smith & Read, 2008). Notre étude montre que la longueur des hyphes diminue significativement suivant les espèces et selon l'ordre décroissant *Rhizophagus intraradices*, *Rhizoglyphus irregularis* et *Funneliformis mosseae*. Le champignon *R. intraradices* a produit plus d'hyphes et a également mobilisé plus de P que les autres champignons. De plus, une corrélation significative ($r = 0,908$, $P < 0,001$) entre la longueur des hyphes et la concentration en P dans les feuilles de *Ziziphus* spp. a été observée. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Smith *et al.* (2000) qui ont constaté que *Medicago truncatula* en association avec *Scutellospora calospora* se développe mieux qu'avec *Gigaspora caledonium*. Ceci était dû au développement des hyphes extramatricielles. Nos résultats confortent les travaux de Guissou *et al.* (2016) qui suggèrent de prendre en compte la DM des provenances de *Z. mauritiana* comme critère de sélection pour la production fruitière en vergers.

V. Conclusion

Notre étude met en évidence pour la première fois le statut mycorhizien de 7 espèces de *Ziziphus* (y compris *Z. mauritiana*) en condition de sol stérilisé. Nos résultats montrent que l'inoculation avec les CMA améliore la croissance des jujubiers (espèces et provenances) en augmentant de manière significative la production de biomasse et l'absorption des minéraux en particulier le P. Les différences de DM obtenues aussi bien chez les espèces de *Ziziphus* que les provenances de *Z. mauritiana* sont dues au développement du réseau d'hyphes extramatricielles qui augmentent l'absorption du P.

Le champignon *R. irregularis* s'avère le meilleur CMA en termes d'efficacité sur le développement des plants toutes espèces de *Ziziphus* et toutes provenances de *Z. mauritiana* confondues. D'un point de vue pratique, ce champignon pourrait constituer un biofertilisant efficace dans la production de plants de jujubiers en pépinière et en plantation dans les systèmes agroforestiers.

CHAPITRE III

IMPACT DE L'INOCULATION AVEC *R. IRREGULARIS* IR27 SUR LA CROISSANCE, LA SURVIE ET LA PRODUCTION FRUITIERE DE *Z. MAURITIANA*

Cette partie des résultats a fait l'objet :

1) D'une communication orale à la **5^{ème} édition des Doctoriales de l'ED-SEV** :

Babacar Thioye. **Effet de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance et la nutrition du jujubier sur le tracé du projet Grande Muraille Verte**. 16-17 juin 2014, UCAD, Dakar, Sénégal.

2) D'une communication orale au **Congrès International AFRINOM 3** :

Babacar Thioye, Aboubacry Kane, Cheikh Ndiaye, Mor Bâ, Abdala Diédhiou, Dioumacor Fall, Hervé Sanguin, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ. **Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and rock phosphate fertilization on growth and nutrition of *Ziziphus mauritiana* Lam. on the route of the Great Green Wall**. 15-17 October 2014, Marrakesh, Maroc.

3) D'un résumé dans un **journal de vulgarisation CONFLUENS** :

Babacar Thioye, Aboubacry Kane, Dioumacor Fall, Cheikh Ndiaye, Mor Bâ, Hervé Sanguin, Robin Duponnois, Abdala G. Diédhiou, Sergio Mania de Faria, Samba N. Sylla, Amadou M. Bâ. **Amélioration de la croissance et de la nutrition du jujubier (*Ziziphus mauritiana* Lam.) par l'inoculation mycorhizienne et la fertilisation phosphatée sur le tracé du projet Grande Muraille Verte au Sénégal**. Numéro spécial 1 "Solutions aux Changements Climatiques. P.7.

4) D'un poster au **5th International EcoSummit 2016** :

Babacar Thioye, Dirk Redecker, Diederik van Tuinen, Aboubacry Kane, Dioumacor Fall, Hervé Sanguin, Diaminatou Sanogo, Robin Duponnois, Samba N. Sylla, Amadou Bâ. **Analysis of persistence and effectiveness of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* isolate IR27 inoculated on jujube trees (*Ziziphus mauritiana* Lam.) in the field, using the RPB1 gene marker and measurement of fruit yield**. 29 August - 1 September 2016, Montpellier, France.

CHAPITRE III. IMPACT DE L'INOCULATION AVEC *R. IRREGULARIS* IR27 SUR LA CROISSANCE, LA SURVIE ET LA PRODUCTION FRUITIERE DE *Z. MAURITIANA*

I. Introduction

L'espèce *Z. mauritiana* Lam., communément appelée jujubier apparaît comme une essence de reboisement à fort impact dans les zones sahélienne et soudano-sahélienne (Depommier, 1988). Elle est très recherchée par les populations surtout pour ses fruits, son bois et son fourrage d'appoint en saison sèche (Ouédraogo *et al.*, 2006). Au Sénégal, les producteurs sont intéressés par les variétés indiennes de jujubiers en raison de leur fructification précoce, du goût et de la taille des fruits (Danthu *et al.*, 2004). Dans la zone nord-ouest du pays, au Ferlo, plus précisément à Amally (une localité située sur le tracé de la GMV), l'agence nationale (ANGMV) développe avec des groupements féminins des activités rémunératrices liées à l'arboriculture fruitière (ex. *Z. mauritiana* variété Gola) et au maraîchage dans des jardins polyvalents irrigués par un système goutte à goutte grâce à la proximité d'un forage. Des systèmes de production traditionnels, basés sur une agriculture pluviale d'arachide, de mil et de niébé sont également développés dans le sud du Bassin arachidier, au centre-est du pays plus précisément dans le village de Keur Mangari, caractérisée par une dégradation des ressources forestières. Toutefois, dans cette zone, la culture du jujubier en jardins familiaux est une activité génératrice de revenus. Même si des techniques de propagation végétative de certains cultivars du jujubier sont bien maîtrisées, des techniques sylvicoles appropriées à l'arboriculture fruitière nécessitent une application pour les agriculteurs locaux (Danthu *et al.*, 2004). En outre, il a été signalé que 90% des vergers dans les régions tropicales arides étaient déficitaires en phosphore (P) et que l'approvisionnement en eau était le principal facteur déterminant la productivité et la qualité du jujube dans les zones sèches (Pareek, 2001).

Les CMA constituent une composante clef dans les relations plante – sol (Smith & Read, 2008 ; van der Heijden *et al.*, 1998a). Bien qu'ils ne soient pas spécifiques, leurs effets sur les plantes peuvent varier selon les espèces et les isolats (Klironomos, 2003). Des études antérieures ont montré que parmi les 11 fruitiers forestiers sahéliens testés, le jujubier s'est avéré le plus dépendant des mycorhizes à arbuscules de *Rhizophagus irregularis* isolat IR27 (syn. *Glomus aggregatum* IR27 ; Bâ *et al.*, 1996) pour sa croissance et sa nutrition minérale (Guissou *et al.*, 1998 ; Bâ *et al.*, 2000 ; Bâ *et al.*, 2001 ; Sidibé *et al.*, 2012 ; Guissou *et al.*, 2016). Cependant, le rôle de ce CMA dans l'amélioration de la croissance et de la production

fruitière du jujubier reste encore peu connu *in situ*. Par ailleurs, des études ont montré que le jujubier inoculé avec *R. irregularis* IR27 mobilise efficacement le phosphore (P) des phosphates naturels (PN) ouest africains (Bâ *et al.*, 2001). Ouédraogo *et al.*, (2006) ont également montré une amélioration de la production de fruits de la variété Gola par le PN du Burkina Faso (Kodjari 25% P₂O₅) en conditions d'irrigation. Jusqu'à présent, le succès de l'inoculation du jujubier avec des CMA est basé sur des plants inoculés en conditions de pépinière, tandis que le suivi de ces derniers après transplantation connaît encore très peu d'attention (Ræbild, 2012 ; Alguacil *et al.*, 2011). Dans ce chapitre, nous essayons d'évaluer l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la croissance de *Z. mauritiana* en serre puis, sa survie et sa production fruitière après plantation.

Ce travail a d'abord été réalisé en serre avec des plants de deux provenances de *Z. mauritiana*, Gola (variété indienne sélectionnée pour ses fruits de grosse taille) et Tasset (provenance locale à fruits de petite taille), inoculés ou non avec *R. irregularis* IR27 et fertilisés ou non avec du PN en condition de sol stérilisé. Au bout de 4 mois, la croissance en hauteur des plants, le diamètre au collet, la biomasse totale, les teneurs en phosphore, en azote et en potassium des feuilles et l'intensité de mycorhization des plants ont été déterminés. Puis les plants ont été transplantés dans deux vergers situés dans les localités d'Amally et de Keur Mangari respectivement au Ferlo et dans le bassin arachidier aux conditions climatiques contrastées. Ce travail a fait l'objet d'un suivi régulier dans chaque site d'étude pour mesurer la croissance, le taux de survie et la production fruitière de *Z. mauritiana* après plantation.

II. Matériel et méthodes

II.1. Production de plants de jujubiers en serre

L'expérience a été réalisée sur un sol de Sangalkam stérilisé à 120°C à l'autoclave pendant 4h. Deux provenances de *Z. mauritiana*, Gola (originnaire d'Inde et à cycle court) et Tasset (région de Thiès et à cycle long) ont été utilisées. Les graines de *Z. mauritiana* utilisées dans cette expérience ont été fournies par le Centre National de Recherches Forestières (CNRF) de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA). Les graines ont été concassées afin de briser l'endocarpe et extraire l'amande. L'endocarpe comprend deux loges contenant chacune une graine (Figure 11). Les graines ont été traitées dans une solution d'eau de javel NaClO 1% pendant 15 min, rincées plusieurs fois avec de l'eau stérile puis trempées dans le dernier

bain d'eau pendant 30 min avant d'être semées dans des sachets noirs en plastique à raison de 3 graines/sachet contenant 1,5 kg du sol sableux de Sangalkam.



Figure 11. Graines de jujubier : a) provenance Tasset, b) provenance Gola.

L'inoculum du champignon *Rhizophagus irregularis* IR27 (syn. *Glomus aggregatum* isolat IR27 ; Bâ *et al.*, 1996) a été apporté à une quantité de 20 g (mélange de sable, de fragments de racines mycorhizées, de spores et d'hyphes) contenant 1635 propagules actives déterminées par la méthode MPN (Adelman & Morton, 1986). Du phosphate naturel (PN) de Matam (30% de P_2O_5) fourni par la Société des Etudes et de Réalisation des Phosphates de Matam (SERP) a été apporté à une dose de 20 g/plant (équivalent à 1,73 g P/kg de sol/plant). Les plants ont été mis en place en serre selon un dispositif expérimental à 3 facteurs : 2 niveaux pour le facteur provenance (Gola et Tasset), 2 niveaux pour le facteur inoculation (inoculé et non inoculé) et 2 niveaux pour le facteur phosphate naturel (fertilisé et non fertilisé). Au total, 8 ($2 \times 2 \times 2$) traitements (Gola, Gola+PN, Gola+Ri, Gola+Ri+PN, Tasset, Tasset+Ri, Tasset+PN, Tasset+Ri+PN) ont été comparés avec 30 répétitions par traitement (Dispositif expérimental 1, Figure 12). Ce dispositif expérimental concerne le site d'étude d'Amally où le PN de Matam a été apporté pour corriger la carence en P biodisponible du sol. La même expérience a été reproduite en serre sans le PN selon un dispositif expérimental à 2 facteurs (provenance et inoculation) avec 4 (2×2) traitements (Gola, Gola+Ri, Tasset, Tasset+Ri) et 50 répétitions par traitement (Dispositif expérimental 2, Figure 13). Ce dispositif expérimental concerne le

site d'étude de Keur Mangari. Les traitements témoins de chaque dispositif ont reçu 10 ml d'extrait de l'inoculum filtré.

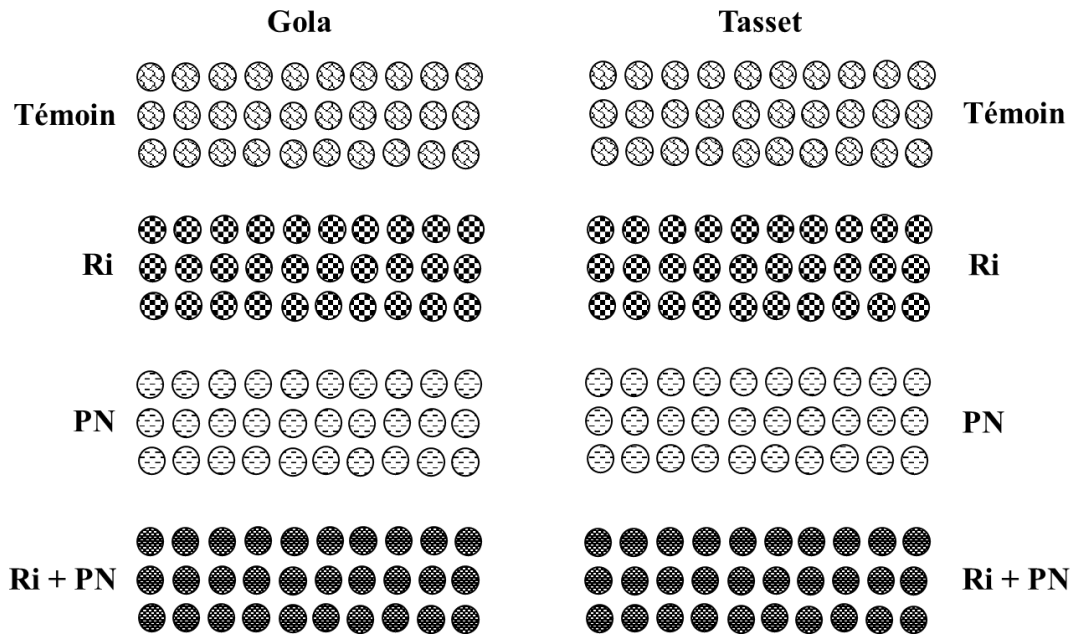


Figure 12. Dispositif expérimental 1 en pépinière.

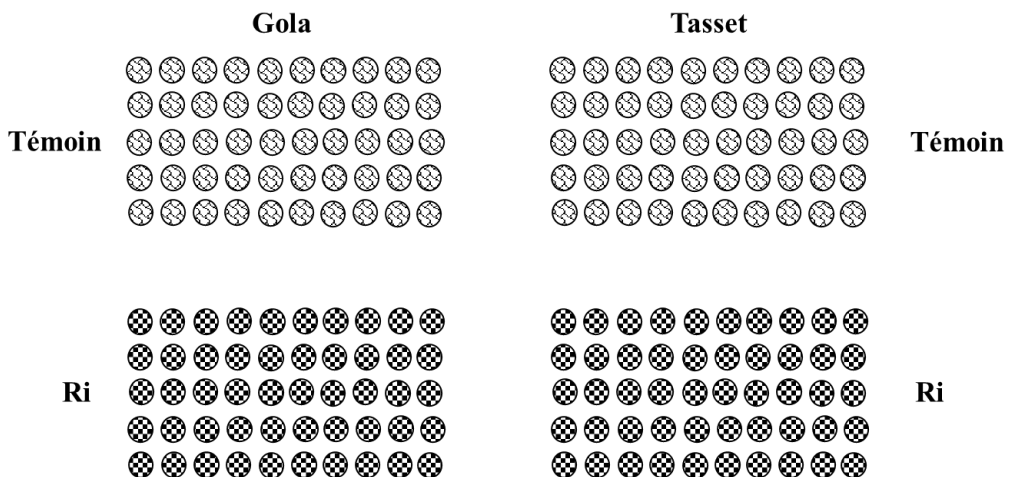


Figure 13. Dispositif expérimental 2 en pépinière.

II.2. Evaluation des paramètres de croissance, de mycorhization et de nutrition minérale

Après 4 mois de croissance en serre, la hauteur de la tige principale, le diamètre au collet et la biomasse totale (séchage à l'étuve pendant 3 jours à 70°C) des plants ont été mesurés (Figure 14). L'intensité de mycorhization des plants a été évaluée dans les conditions décrites dans le chapitre 2. L'analyse des teneurs en phosphore (P), en azote (N) et en potassium (K) dans les feuilles de chaque plant a été réalisée au Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA) du centre de Bel Air (Dakar). Les teneurs en P et en N ont été déterminées respectivement par la réaction au Bleu de molybdène et la méthode Kjeldahl. Le K total a été déterminé par absorption atomique au spectrophotomètre à partir de la solution obtenue après minéralisation de la poudre végétale pour le dosage de P et de N.



Figure 14. Plants de *Z. mauritiana* utilisés pour la mesure des paramètres de croissance.

II.3. Sites d'étude

Afin d'évaluer l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la croissance, le taux de survie et la production fruitière de *Z. mauritiana* en plantation, les jujubiers âgés de 4 mois en serre ont été transplantés dans des vergers situés dans deux localités (Amally et Keur Mangari) aux conditions climatiques contrastées (Figure 15).

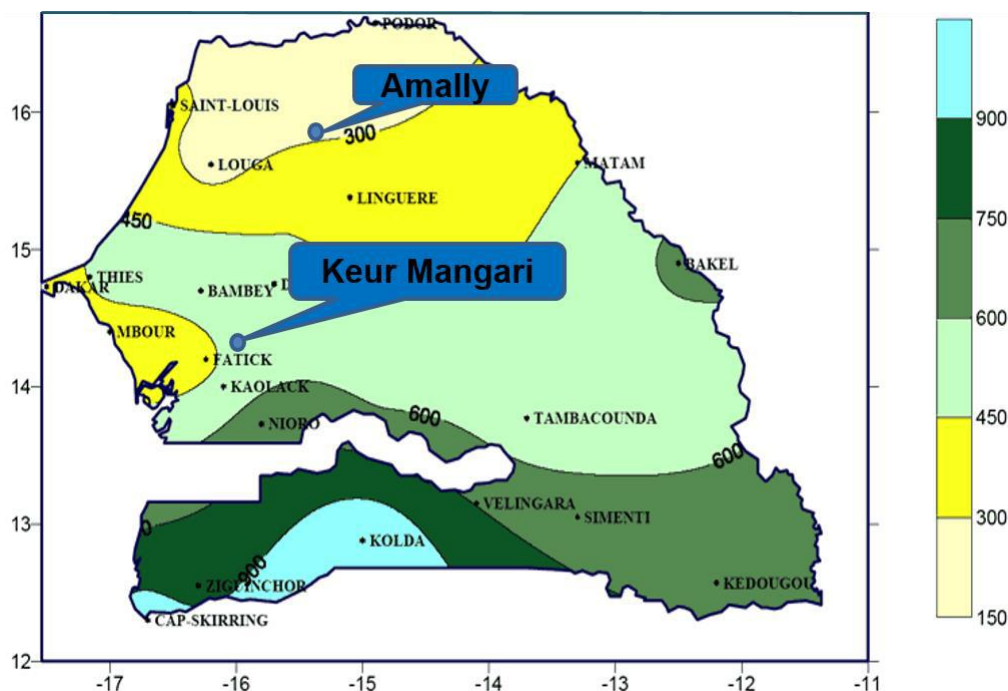


Figure 15. Localisation géographique des sites d'étude et distribution de la pluviométrie annuelle (mm) au Sénégal (ANACIM 2012).

II.3.1. Amally

Le village d'Amally (15°59'N, 15°19'O) se trouve dans la communauté rurale de Tessékéré, du département de Linguère, situé dans la région de Louga, zone sylvo-pastorale au nord du Sénégal où passe le tracé du projet GMV (Figures 15 et 16). La zone sylvo-pastorale se caractérise par un déficit hydrique (< 400 mm de pluie en moyenne par an) avec une très grande irrégularité du régime des précipitations (la saison pluviale dure 1 à 2 mois). Le village d'Amally, zone importante de transhumance du bétail, est alimenté en eau par un forage situé à 3 km. Les sols sont ferrugineux tropicaux, de texture sableuse, plus ou moins lessivés et pauvres en matière organique, entraînant souvent une production primaire très faible (Guèye,

2000). Cette zone est constituée de peuplements naturels épars de balanites, d'acacias et de jujubiers qui sont les espèces prioritaires de reboisement du projet de la GMV. Dans cette zone, la vente des jujubes par les villageois, en particulier par les femmes, peut représenter jusqu'à 50% des revenus.

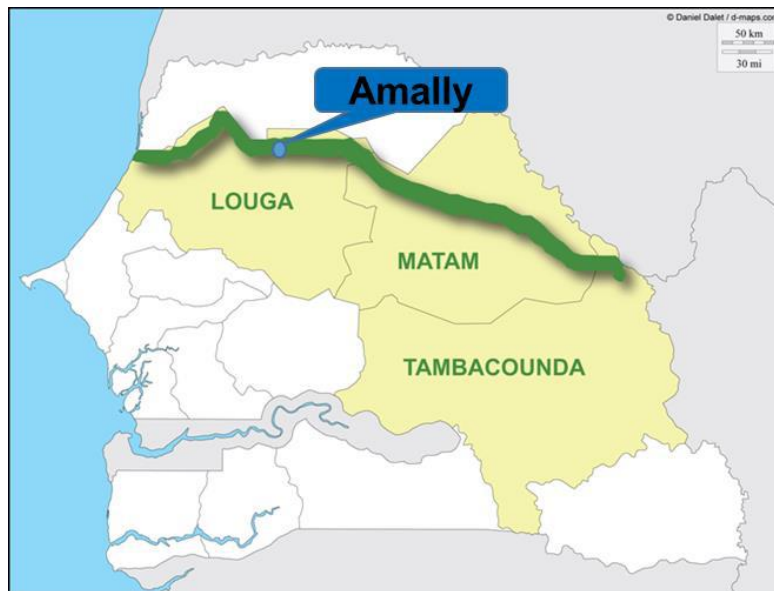


Figure 16. Tracé de la GMV au Sénégal et situation du site d'étude d'Amally (ANGMV 2009)

II.3.2. Keur Mangari

Le village de Keur Mangari (14°27'N, 16°38'O) se trouve dans l'arrondissement de Tattaguine et à 15 km de la commune de Fatick au centre-ouest du Sénégal (Figure 15). Cette zone contraste avec Amally notamment sur le plan climatique car la pluviométrie moyenne annuelle oscille entre 450 et 600 mm. Les sols sont ferrugineux tropicaux contenant 6 à 9% d'argile et des peuplements épars de jujubiers, d'anacardiens et de baobabs sont également présents. Dans cette zone, l'agriculture familiale basée sur la culture pluviale d'arachide, de mil et de niébé et l'arboriculture fruitière (ex. le jujubier) y sont développées dans des vergers de producteurs privés.

II.4. Caractérisation des sols des sites d'étude

II.4.1. Caractéristiques chimiques des sols

Pour chaque site d'étude, des échantillons de sol rhizosphérique (horizons 0-30 cm) ont été prélevés (quadra de 0,5 x 0,5 m) à l'aide d'une pellette (10 points de prélèvement par parcelle regroupés en un échantillon moyen/parcelle). Les échantillons de sols ont été ensachés et conservés en chambre froide à 4°C jusqu'à leur utilisation. Ils ont été analysés au Laboratoire d'Agriculture et de Chimie de Rio de Janeiro (Brésil) (Tableau 9).

Tableau 9. Composition chimique des sols des sites d'étude.

| Echantillons de sol | C % | Al mg | N total % | K total ppm | P assim. ppm | Ca total mg | Mg total mg | pH |
|---------------------|------|-------|-----------|-------------|--------------|-------------|-------------|------|
| Amally | 0,12 | 0,00 | 0,04 | 69,84 | 6,37 | 0,80 | 0,34 | 6,41 |
| Keur Mangari | 0,14 | 0,04 | 0,02 | 19,62 | 26,93 | 0,52 | 0,17 | 5,43 |

P assim : P assimilable ; chaque valeur représente la moyenne de 4 répétitions par site.

II.4.2. Potentiel mycorhizien des sols

Le potentiel mycorhizien des sols permet d'apprécier le nombre le plus probable de propagules (MPN, Most Probable Number) fongiques dans un sol selon la méthode décrite par Fischer et Yates (1970). Pour chaque site, tous les échantillons de sol sous couvert ont été mélangés en un échantillon moyen. Ce dernier a été dilué avec du sol stérilisé de Sangalkam (120°C, 4h à l'autoclave) dans les proportions indiquées au tableau 10.

Tableau 10. Dilution des échantillons de sol avec du sol stérilisé de Sangalkam.

| Niveau de dilution | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------------|-----|----|-------|-------|-------|------|
| Sol de Sangalkam (g) | 0 | 75 | 93,75 | 98,44 | 99,61 | 99,9 |
| Sol échantillonné (g) | 100 | 25 | 6,25 | 1,56 | 0,39 | 0,1 |

Pour chaque dilution de sol, 100 g de sol ont été placés dans un pot de 4,5 cm de diamètre et de 7,5 cm de haut. Cinq répétitions ont été effectuées pour chaque dilution (Figure 17). Une graine de maïs (*Zea mays*), pré-germée dans de l'eau gélosée, est semée dans chaque pot. Les pots ont été placés en serre à la température du jour comprise entre 25 °C et 30 °C. Les plants ont été arrosés trois fois par semaine avec de l'eau du robinet. Après 45 jours, l'intégralité du système racinaire de chaque plant a été colorée (Phillips & Hayman, 1970) puis examinée au microscope (grossissement x400) pour détecter la présence ou l'absence de colonisation mycorhizienne. Le système racinaire est considéré comme colonisé lorsqu'on y observe au moins la présence d'une structure mycorhizienne (vésicule, arbuscule ou hyphe interne). Le MPN a été calculé avec la formule suivante : $\log_{10} \text{MPN} = x \log a - K$. La valeur de K est déduite dans la table proposée par W.L Stevens (Fisher & Yates, 1963). La valeur « x » représente la moyenne des plantes mycorhizées et la constante « a » représente le nombre de dilution. Les résultats sont mentionnés dans le tableau 11.

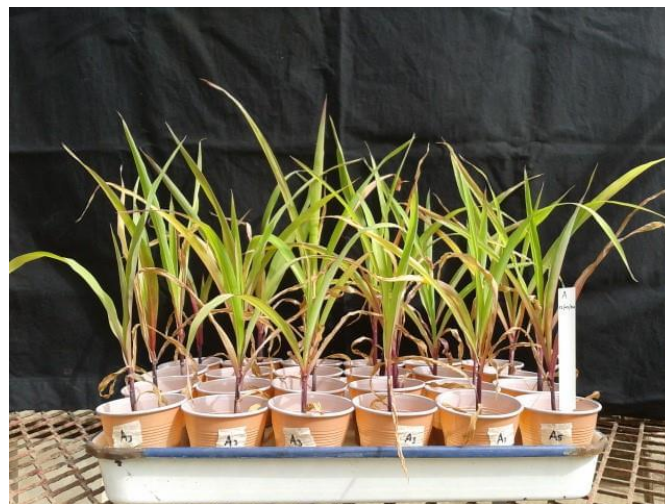


Figure 17. Plants de maïs après 45 jours de croissance en serre.

Tableau 11. Potentiels mycorhiziens des sols des sites d'étude.

| Origines des sols | Nombre moyen de propagules viables (100 g de sol sec) | Intervalles de confiance (seuil de 5%) |
|----------------------------------|---|--|
| Jardin polyvalent à Amally (GMV) | 01,06 | 0,73 - 1,14 |
| Verger à Keur Mangari (Fatick) | 23,87 | 11,19 - 50,81 |

II.5. Dispositifs expérimentaux

II.5.1. Amally

Un dispositif expérimental a été mis en place dans un jardin polyvalent de 5 ha, doté d'un système de goutte à goutte alimenté par un forage. Il est constitué de 4 blocs rectangulaires complètement randomisés d'une superficie de 0,25 ha chacun (Figure 18). Dans chaque bloc, 8 traitements (Gola, Gola+PN, Gola+Ri, Gola+Ri+PN, Tasset, Tasset+PN, Tasset+Ri et Tasset+Ri+PN) ont été répartis de manière aléatoire avec 6 répétitions par traitement. Les espacements entre les lignes et intra-lignes étaient de 8 m. L'arrosage des jujubiers a été réalisé au goutte-à-goutte trois fois par semaine durant les 3 premiers mois puis deux fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérience.

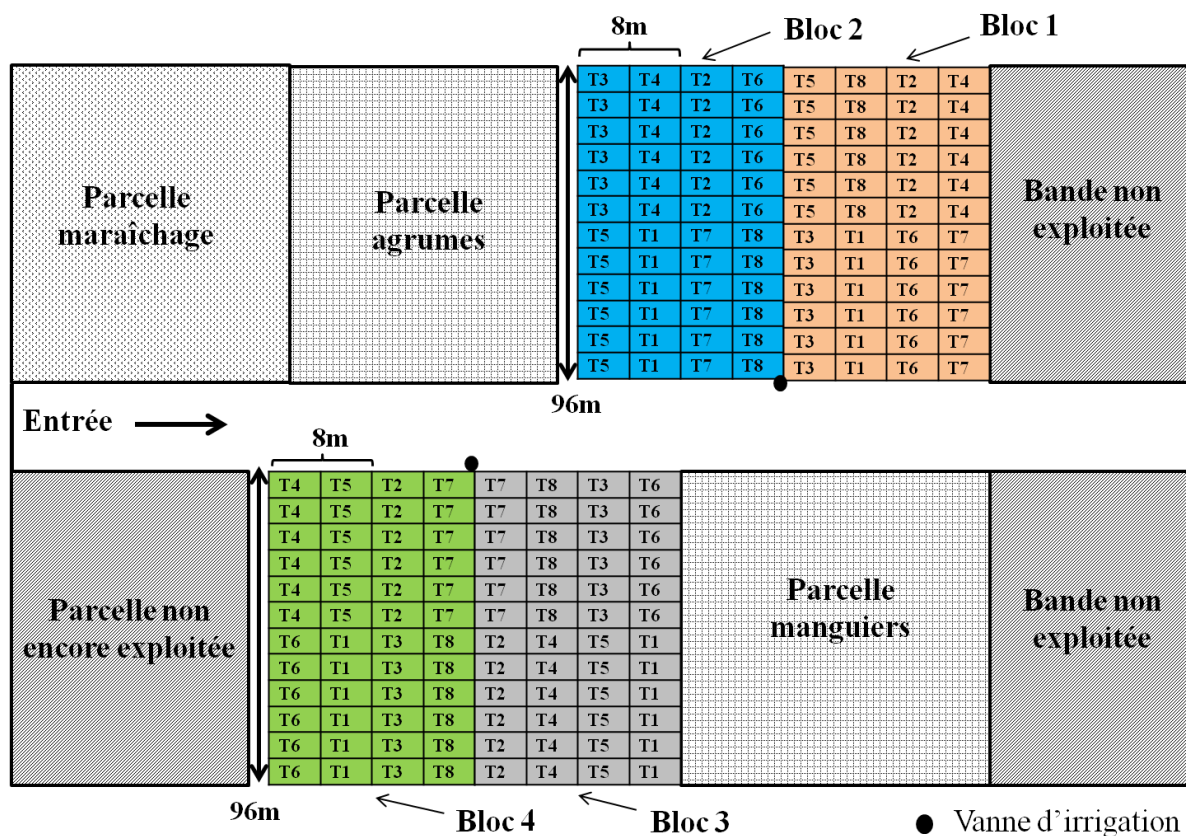


Figure 18. Dispositif expérimental de la plantation des jujubiers à Amally.

II.5.2. Keur Mangari

Le dispositif expérimental a été mis en place dans un verger de 5,5 ha clôturé et alimenté en eau par deux puits chez un producteur de fruits. Il est constitué de 4 blocs complets entièrement randomisés dans lesquels quatre traitements (Gola, Gola+Ri, Tasset et Tasset+Ri) ont été répartis de manière aléatoire avec 10 répétitions par traitement/bloc (Figure 19). Il n'y a pas eu de traitements fertilisés dans ce dispositif expérimental de Keur Mangari en raison de la teneur élevée en P assimilable (Tableau 9). Les espacements entre les lignes et intra-lignes étaient de 5 m. L'arrosage des jujubiers a été réalisé avec l'eau des puits trois fois par semaine durant les 3 mois premiers mois puis deux fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérience.

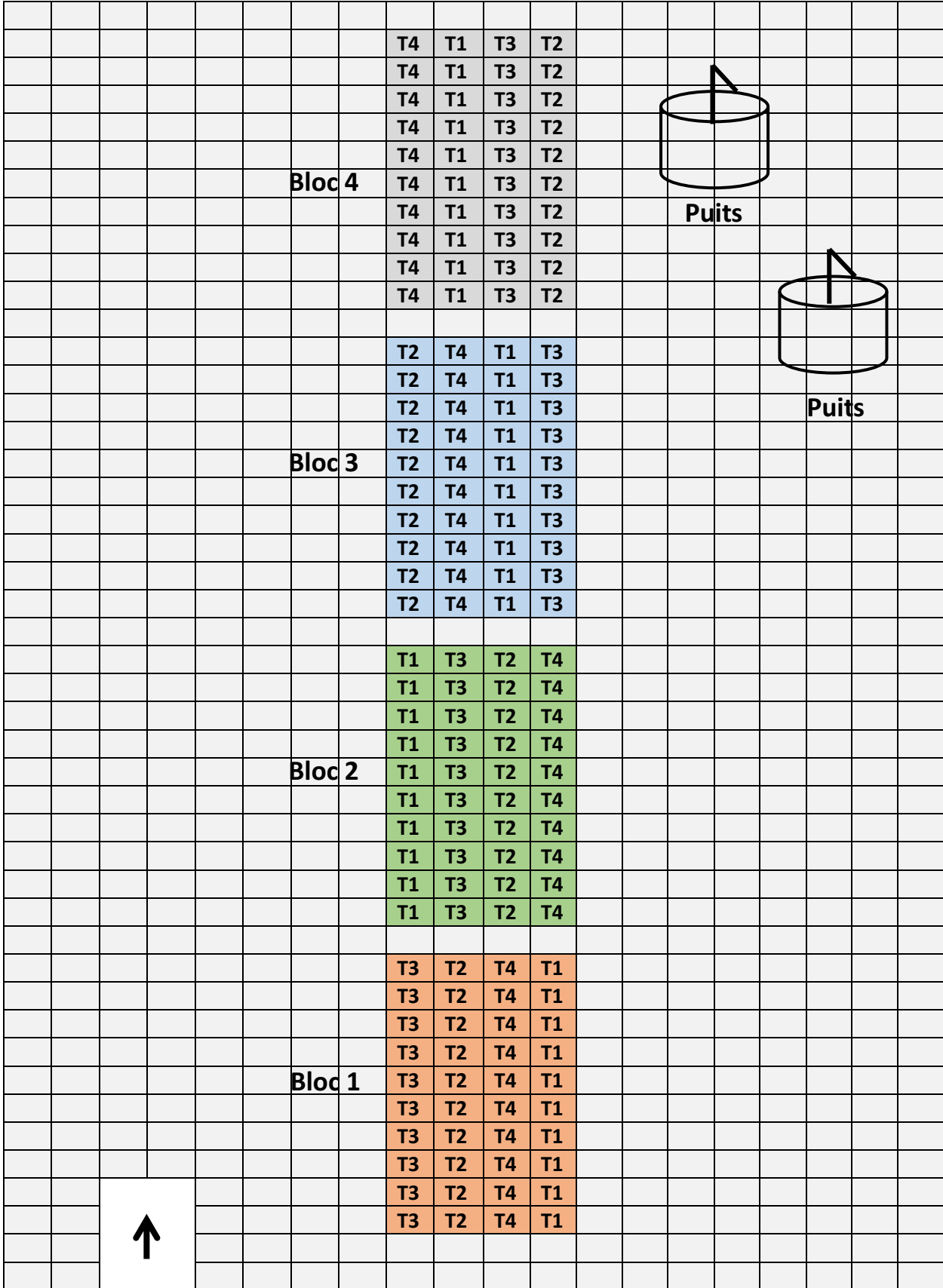


Figure 19. Dispositif expérimental de la plantation des jujubiers à Keur Mangari.

II.6. Evaluation des paramètres de croissance et de l'intensité de mycorhization

Pour chaque site d'étude, nous avons mesuré en plantation la hauteur de la tige principale, le diamètre au collet et le taux de survie des plantes. Les diamètres du houppier ont été mesurés à partir de 12 mois plantation. Pour évaluer l'intensité de mycorhization des plantes après plantation, des racines ont été échantillonnées sur 5 plants de chaque traitement par bloc. La coloration des racines a été effectuée dans les conditions décrites au chapitre précédent.

II.7. Evaluation de la production fruitière

La production fruitière des jujubiers en plantation a été évaluée durant deux saisons de fructification (2014 et 2015). Etant donné que les jujubiers n'étaient pas au même stade de maturité, les fruits mûrs de chaque arbre ont été récoltés tous les 15 jours jusqu'à la fin de la fructification. Le nombre, le diamètre et le poids frais moyen des jujubes ont été déterminés pour chaque arbre.

II.8. Analyses statistiques des données

Les variables mesurées ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs (provenance et inoculation) pour Keur Mangari et à 3 facteurs (provenance, inoculation et fertilisation) pour Amally. Les données de l'intensité de mycorhization ont été transformées en arc sinus avant d'être soumises à l'analyse ANOVA. Les moyennes de chaque variable ont été comparées en utilisant le test de Tukey (HSD) au seuil de probabilité de 5% avec le logiciel XLSTAT (version 2010). Le coefficient de corrélation de Pearson entre les variables dépendantes mesurées après plantation a été déterminé avec le même logiciel.

III. Résultats

III.1. Effet de l'inoculation sur la croissance, le taux de mycorhization et la nutrition minérale de *Z. mauritiana* en serre

III.1.1. Effet sur la croissance

Après 4 mois de croissance en serre, les résultats statistiques ont montré que les facteurs, inoculation et provenance, ont un effet significatif ($P < 0,001$) sur les paramètres de croissance des jujubiers (Tableau 4). L'interaction des trois facteurs (provenance, inoculation et fertilisation) n'a pas eu d'effet significatif sur la croissance des jujubiers. Quelle que soit la provenance de *Z. mauritiana*, l'inoculation avec *R. irregularis* a significativement augmenté la hauteur, le diamètre au collet et la biomasse totale des plants de *Z. mauritiana* comparés aux témoins non inoculés (Figure 20). Par contre, le phosphate naturel seul ou avec *R. irregularis* n'a pas eu d'effet sur les paramètres de croissance. Les plants Gola ont mieux poussé que ceux de Tasset.

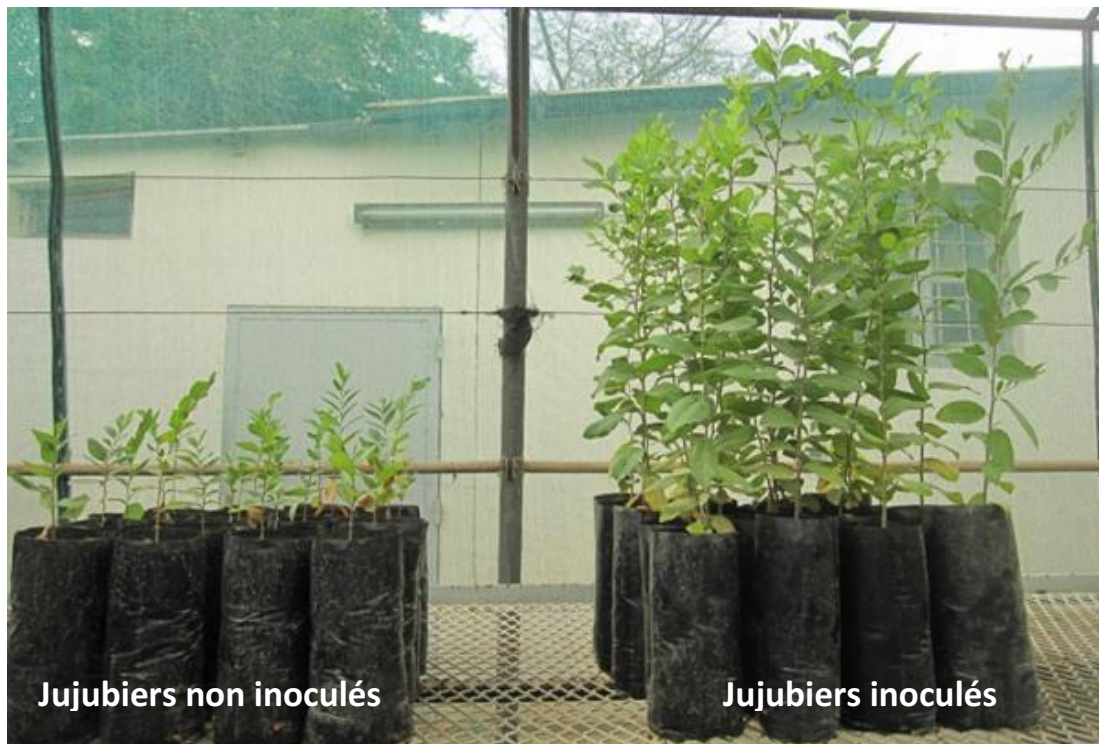


Figure 20. Effet de l'inoculation sur la croissance en hauteur de *Z. mauritiana* (Gola) après 4 mois en pépinière.

III.1.2. Effet sur le taux de mycorhization

Aucune infection mycorhizienne n'a été observée dans les racines des plants non inoculés et/ou fertilisés (Tableau 12). L'intensité de mycorhization a été plus élevée chez les plants inoculés avec *R. irregularis* comparés aux plants non inoculés et/ou fertilisés. L'intensité de mycorhization est à peu près la même chez les deux provenances de *Z. mauritiana*.

III.1.3. Effet sur la nutrition minérale

La nutrition minérale des plants de jujubiers a été significativement améliorée ($P < 0,001$) par l'inoculation avec *R. irregularis* (Tableau 12). Les résultats de l'ANOVA ont montré que l'effet de la fertilisation n'a été significatif que sur la teneur en N alors que les facteurs (provenance et inoculation) ont eu un effet significatif sur les teneurs en P, en N et en K.

Tableau 12. Effet de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance, la mycorhization et la nutrition minérale des jujubiers après 4 mois de croissance en serre.

| Traitement | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (mm) | Biomasse totale sèche (g) | Intensité de mycorhization (%) | N (%) | P (%) | K (%) |
|-------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-------------|--------------|----------------|
| Gola | 19,7 ± 2,3 c | 2,8 ± 0,4 cd | 1,4 ± 0,1 cd | - | 1,3 ± 0,1 b | 1,3 ± 0,7 d | 08,4 ± 1,0 d |
| Gola + PN | 22,6 ± 3,4 c | 3,2 ± 0,3 c | 1,6 ± 0,2 c | - | 2,4 ± 0,4 a | 1,5 ± 0,6 cd | 10,0 ± 2,1 bcd |
| Gola + Ri | 54,3 ± 4,6 a | 4,8 ± 0,6 a | 3,6 ± 0,5 a | 78,9 ± 8,1 a | 2,4 ± 0,2 a | 2,7 ± 0,2 a | 14,6 ± 0,9 a |
| Gola + Ri + PN | 50,2 ± 6,7 a | 4,5 ± 0,4 ab | 3,5 ± 0,5 a | 61,4 ± 7,9 b | 2,5 ± 0,4 a | 2,6 ± 0,1 ab | 14,3 ± 0,5 a |
| Tasset | 13,9 ± 2,7 d | 2,5 ± 0,3 c | 1,3 ± 0,1 d | - | 1,3 ± 0,1 b | 1,2 ± 0,1 d | 09,4 ± 0,7 cd |
| Tasset + PN | 17,8 ± 2,0 cd | 3,1 ± 0,4 c | 1,3 ± 0,1 cd | - | 1,6 ± 0,3 b | 1,2 ± 0,2 d | 08,7 ± 1,1 d |
| Tasset + Ri | 35,9 ± 4,9 b | 4,1 ± 0,9 b | 2,6 ± 0,5 b | 75,8 ± 9,6 a | 2,1 ± 0,1 a | 2,1 ± 0,1 bc | 11,0 ± 0,6 bc |
| Tasset + Ri + PN | 37,7 ± 4,5 b | 4,1 ± 0,8 b | 2,7 ± 0,5 b | 48,7 ± 6,5 c | 2,1 ± 0,1 a | 2,3 ± 0,1 ab | 11,3 ± 0,4 b |
| Facteurs testés | | | | | | | |
| Provenance (P) | *** | ** | *** | NS | ** | * | ** |
| Inoculation (I) | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| Fertilisation (F) | NS | NS | NS | NS | ** | NS | NS |
| (P) × (I) × (F) | NS | NS | NS | *** | NS | NS | NS |

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Ri: *Rhizophagus irregularis*; PN: Phosphate Naturel.

III.2. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance, la survie et la mycorhization de *Z. mauritiana* en plantation à Amally

La plantation de jujubier dans le jardin polyvalent d'Amally a fait l'objet d'un suivi régulier pour déterminer les paramètres de croissance des plantes (Figure 21). Après 3 mois de plantation, l'inoculation a augmenté de manière significative ($P < 0,001$) la hauteur et le diamètre au collet des plants inoculés quelle que soit la provenance (Tableau 13). Par contre, le taux de survie des plants n'a pas été significativement affecté par les trois facteurs (provenance, inoculation et fertilisation). Après 8 et 13 mois de plantation, seul le facteur inoculation a un effet significatif ($P < 0,001$) sur le taux de survie des jujubiers et les paramètres de croissance (Tableau 14). Les résultats ont montré 41,6% de survie chez Gola non inoculée contre 70,8% chez Gola+Ri et 45,8% de survie chez Tasset non inoculée contre 75% de survie chez Tasset+Ri (Tableau 14). Le PN n'a pas eu d'effet significatif sur la survie et la croissance des plants.

Les résultats ont montré a un effet significatif ($P < 0,001$) de l'inoculation avec *R. irregularis* sur la colonisation racinaire des jujubiers après 13 mois de plantation (Tableau 14). En effet, l'intensité de mycorhization des jujubiers a été plus élevée chez les plantes Gola et Tasset inoculées comparée aux témoins non inoculés et/ou aux traitements fertilisés. L'intensité de mycorhization a atteint 59,8% pour Gola+Ri et 50% pour Gola+Ri+PN contre 56,4% pour Tasset+Ri et 46,4% pour Tasset+Ri+PN.

III.3. Corrélation entre les paramètres mesurés après 13 mois de plantation à Amally

Une corrélation positive a été observée entre les paramètres de croissance et l'intensité de mycorhization des jujubiers à Amally (Tableau 15). En effet, la hauteur a été positivement corrélée au diamètre au collet ($r = 0,682$; $P < 0,001$) et au diamètre du houppier ($r = 0,597$; $P < 0,001$). L'intensité de mycorhization a été positivement corrélée ($r = 0,714$; $P < 0,001$) au diamètre au collet ($r = 0,771$; $P < 0,001$) et au diamètre du houppier ($r = 0,676$; $P < 0,001$).

Tableau 13. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance et la survie des jujubiers après 3 et 8 mois en plantation à Amally.

| Traitement | 3 mois après plantation | | | 8 mois après plantation | | |
|-------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (mm) | Taux de survie (%) | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (mm) | Taux de survie (%) |
| Gola | 24,5 ± 1,4 de | 07,2 ± 1,4 de | 83,3 ± 8,1 ab | 29,1 ± 2,1 cd | 13,8 ± 3,5 de | 50,0 ± 11 cd |
| Gola + PN | 27,2 ± 1,3 cd | 08,0 ± 1,7 cd | 95,8 ± 1,4 a | 31,4 ± 12 c | 16,5 ± 3,9 abcd | 66,6 ± 8,1 bc |
| Gola + Ri | 59,9 ± 7,3 a | 09,3 ± 1,9 ab | 91,6 ± 2,2 ab | 66,3 ± 13 a | 16,9 ± 2,6 abc | 83,3 ± 8,1 ab |
| Gola + Ri + PN | 55,6 ± 5,2 ab | 10,2 ± 1,8 a | 95,8 ± 1,4 a | 63,4 ± 11 a | 19,3 ± 2,9 a | 91,6 ± 2,2 a |
| Tasset | 18,9 ± 2,1 de | 06,7 ± 1,4 e | 79,1 ± 11 ab | 22,7 ± 4,6 d | 13,1 ± 6,1 bcde | 62,5 ± 9,4 bcd |
| Tasset + PN | 20,4 ± 2,7 e | 07,2 ± 1,2 de | 75,0 ± 14 b | 26,1 ± 5,3 cd | 12,8 ± 2,1 e | 41,6 ± 10,0 d |
| Tasset + Ri | 40,1 ± 4,3 bc | 09,2 ± 2,4 ab | 83,3 ± 8,2 ab | 51,2 ± 4,1 b | 17,6 ± 5,1 ab | 91,6 ± 5,8 a |
| Tasset + Ri + PN | 42,1 ± 7,1 bc | 08,6 ± 2,3 bc | 83,3 ± 8,1 ab | 53,1 ± 3,8 ab | 16,7 ± 2,9 cde | 70,8 ± 16,0 abc |
| Facteurs testés | | | | | | |
| Provenance (P) | ** | *** | NS | ** | * | NS |
| Inoculation (I) | *** | *** | NS | *** | *** | *** |
| Fertilisation (F) | NS | NS | NS | NS | NS | NS |
| (P) × (I) × (F) | NS | NS | NS | NS | NS | NS |

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Ri: *Rhizophagus irregularis*; PN: Phosphate Naturel.

Tableau 14. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance, le taux de survie et la mycorhization des jujubiers après 13 mois en plantation à Amally.

| Traitement | 13 mois après plantation | | | | |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (mm) | Diamètre du houppier (cm) | Taux de survie (%) | Intensité de mycorhization (%) |
| Gola | 38,5 ± 8,7 d | 17,9 ± 3,6 bc | 62,47 ± 13,6 b | 41,6 ± 10 d | 21,4 ± 6,2 c |
| Gola + PN | 39,2 ± 11 d | 21,8 ± 5,1 ab | 63,17 ± 23,3 b | 54,1 ± 10 c | 21,8 ± 8,8 c |
| Gola + Ri | 81,2 ± 13 a | 20,6 ± 2,8 abc | 88,28 ± 14,0 a | 70,8 ± 6,4 ab | 59,8 ± 4,3 a |
| Gola + Ri + PN | 79,5 ± 15 ab | 24,8 ± 4,1 a | 94,90 ± 19,3 a | 66,6 ± 8,1 abc | 50,0 ± 9,0 ab |
| Tasset | 34,6 ± 10 d | 18,1 ± 4,8 bc | 59,76 ± 21,4 b | 45,8 ± 10 d | 26,0 ± 2,5 c |
| Tasset + PN | 37,6 ± 8,8 d | 15,3 ± 2,8 c | 61,11 ± 17,1 b | 41,6 ± 10 d | 21,0 ± 6,1 c |
| Tasset + Ri | 74,9 ± 11 c | 20,9 ± 4,6 abc | 83,72 ± 23,3 a | 75,0 ± 4,2 a | 56,4 ± 6,3 ab |
| Tasset +Ri + PN | 77,2 ± 8,5 abc | 19,7 ± 2,6 abc | 85,36 ± 14,0 a | 62,5 ± 9,4 bc | 46,4 ± 8,6 b |
| Facteurs testés | | | | | |
| Provenance (P) | NS | NS | NS | NS | NS |
| Inoculation (I) | ** | * | * | ** | *** |
| Fertilisation (F) | NS | NS | NS | NS | NS |
| (P) × (I) × (F) | NS | NS | NS | NS | NS |

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Ri: *Rhizopagus irregularis*; PN: Phosphate Naturel.

Tableau 15. Coefficients de corrélation (r) entre les paramètres de croissance et l'intensité de mycorhization des jujubiers en plantation à Amally.

| | Hauteur | Diamètre au collet | Diamètre du houppier | Intensité de mycorhization |
|----------------------------|---------|--------------------|----------------------|----------------------------|
| Hauteur | 1 | | | |
| Diamètre du collet | 0,682* | 1 | | |
| Diamètre du houppier | 0,597* | 0,641* | 1 | |
| Intensité de mycorhization | 0,714* | 0,771* | 0,676* | 1 |

(*) Coefficients de corrélation de Pearson significatifs au seuil de $P < 0,001$.



Figure 21. *Ziziphus mauritiana* âgé de 13 mois en plantation à Amally.

III.4. Impact de l'inoculation sur la croissance, la survie et la mycorhization de *Z. mauritiana* en plantation à Keur Mangari

Après 4 mois de plantation, les résultats ont montré un effet significatif ($P < 0,001$) de l'inoculation avec *R. irregularis* sur la croissance des jujubiers chez les deux provenances (Tableau 16). L'interaction entre les deux facteurs (provenance et inoculation) a eu un effet significatif sur la hauteur ($P < 0,01$) et le diamètre au collet ($P < 0,05$).

Au bout de 8 mois de plantation, l'effet significatif ($P < 0,001$) de l'inoculation avec *R. irregularis* s'est maintenu sur les paramètres de croissance et sur le taux de survie des jujubiers. La hauteur, le diamètre au collet et le taux de survie des jujubiers inoculés ont été significativement plus développés que ceux des non inoculés (Tableau 16).

Après 12 mois de plantation, le diamètre du houppier des jujubiers a été significativement augmenté par l'inoculation (Tableau 17). Chez les jujubiers inoculés, le diamètre du houppier moyen a atteint 1,44 m pour Gola et 1,35 m pour Tasset. La hauteur, le diamètre au collet et le taux de survie des jujubiers inoculés ont toujours été supérieurs aux témoins.

Au bout de 18 mois de plantation, l'effet de l'inoculation sur le taux de survie a commencé à se stabiliser. En effet, les taux de survie des jujubiers restent les mêmes que ceux obtenus au bout de 12 mois de plantation. Néanmoins l'effet positif de l'inoculation s'est toujours maintenu sur les paramètres de croissance des jujubiers (Figure 22).

Après 24 mois de plantation, la colonisation racinaire des jujubiers a été mesurée. Les résultats ont montré que l'intensité de mycorhization a été significativement plus élevée ($P < 0,001$) chez les jujubiers inoculés comparés aux témoins faiblement colonisés (Tableau 18). A cette période, l'effet positif de l'inoculation s'est maintenu sur les paramètres de croissance des jujubiers.

Au bout de 30 mois de plantation, la croissance des jujubiers a toujours été améliorée par l'inoculation. A cette période, les jujubiers inoculés ont atteint une hauteur moyenne de 2,50 m et un diamètre du houppier moyen de 2,72 pour Gola et 2,81 m pour Tasset (Tableau 18). L'inoculation a toujours un effet significatif ($P < 0,001$) sur l'intensité de mycorhization des jujubiers quelle que soit la provenance.

III.5. Corrélation entre les paramètres mesurés après 30 mois de plantation à Keur Mangari

Une corrélation positive a été observée entre les paramètres de croissance et l'intensité de mycorhization (Tableau 19) des jujubiers à Keur Mangari. En effet, l'intensité de mycorhization a été fortement corrélée à la hauteur ($r = 0,892$; $P < 0,001$), au diamètre au collet ($r = 0,746$; $P < 0,001$) et au diamètre du houppier ($r = 0,898$; $P < 0,001$). L'intensité de mycorhization a été corrélée au poids total de fruits/arbre ($r = 0,522$; $P < 0,05$) et au nombre total de fruits/arbre ($r = 0,485$; $P < 0,05$). Par contre, aucune corrélation n'a été observée entre le nombre total de fruits et les paramètres de croissance.



Figure 22. *Ziziphus mauritiana* âgés de 18 mois en plantation à Keur Mangari.

Tableau 16. Impact de l'inoculation sur la croissance et le taux de survie des jujubiers après 4 et 8 mois en plantation à Keur Mangari.

| Traitement | 4 mois après plantation | | | 8 mois après plantation | | |
|-----------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
| | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (mm) | Taux de survie (%) | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (cm) | Taux de survie (%) |
| Gola | 37,7 ± 9,6 c | 3,4 ± 0,8 b | 92,5 ± 13,8 a | 58,8 ± 10,1 b | 6,3 ± 1,8 b | 65 ± 17,5 b |
| Gola + Ri | 72,4 ± 9,3 a | 4,9 ± 0,7 a | 95 ± 9,5 a | 86,7 ± 10,8 a | 7,2 ± 2,3 ab | 82,5 ± 19,5 a |
| Tasset | 34,0 ± 7,8 c | 3,8 ± 1,0 b | 92,5 ± 13,8 a | 51,0 ± 7,3 b | 6,1 ± 1,6 b | 75 ± 18,8 ab |
| Tasset + Ri | 55,6 ± 9,8 b | 4,4 ± 0,7 a | 100 ± 0,0 a | 81,4 ± 6,2 a | 8,1 ± 2,5 a | 90 ± 8 a |
| Facteurs testés | | | | | | |
| Provenance (P) | *** | NS | NS | ** | NS | ** |
| Inoculation (I) | *** | *** | NS | *** | *** | NS |
| (P) × (I) | ** | * | NS | NS | NS | * |

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Ri: *Rhizophagus irregularis*.

Tableau 17. Impact de l'inoculation sur la croissance et le taux de survie des jujubiers après 12 et 18 mois en plantation à Keur Mangari.

| Traitement | 12 mois après plantation | | | | 18 mois après plantation | | | |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (mm) | Diamètre du houppier (cm) | Taux de survie (%) | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (mm) | Diamètre du houppier (cm) | Taux de survie (%) |
| Gola | 80,2 ± 11,6 c | 8,1 ± 2,0 b | 97,1 ± 8,2 b | 65 ± 15,5 b | 117,5 ± 14,1 b | 15,1 ± 1,4 b | 118,3 ± 12,7 b | 65 ± 15,5 b |
| Gola + Ri | 125,0 ± 14,8 a | 10,1 ± 1,6 a | 144,3 ± 14,2 a | 80 ± 19,5 a | 175,0 ± 16,0 a | 19,7 ± 1,9 a | 177,3 ± 18,5 a | 80 ± 19,5 a |
| Tasset | 67,8 ± 7,2 d | 7,5 ± 1,5 b | 83,6 ± 7,3 c | 65 ± 12 b | 93,1 ± 8,1 c | 11,6 ± 1,7 c | 99,2 ± 9,2 c | 65 ± 12 b |
| Tasset + Ri | 112,3 ± 11,6 b | 10,5 ± 2,4 a | 135,4 ± 11,5 a | 83 ± 18,8 a | 166,1 ± 9,6 a | 18,8 ± 1,9 a | 169,2 ± 12,9 a | 83 ± 18,8 a |
| Facteurs testés | | | | | | | | |
| Provenance (P) | *** | NS | *** | NS | *** | *** | ** | NS |
| Inoculation (I) | *** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | ** |
| (P) × (I) | NS | NS | NS | NS | * | ** | NS | NS |

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Ri: *Rhizophagus irregularis*.

Tableau 18. Impact de l'inoculation sur la croissance et la mycorhization des jujubiers après 24 et 30 mois en plantation à Keur Mangari.

| Traitement | 24 mois après plantation | | | | 30 mois après plantation | | | |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (mm) | Diamètre du houppier (cm) | Intensité de mycorhization (%) | Hauteur (cm) | Diamètre au collet (mm) | Diamètre du houppier (cm) | Intensité de mycorhization (%) |
| Gola | 164,1 ± 7,0 b | 25,3 ± 2,0 b | 160,0 ± 14,7 b | 19,0 ± 5,1 b | 199,3 ± 8,2 b | 38,4 ± 2,6 b | 212,8 ± 9,6 b | 29,3 ± 2,6 b |
| Gola + Ri | 228,0 ± 13,4 a | 31,1 ± 2,0 a | 233,8 ± 13,7 a | 45,3 ± 8,8 a | 254,8 ± 12,0 a | 43,7 ± 2,3 a | 272,6 ± 10,1 a | 40,3 ± 4,8 a |
| Tasset | 137,2 ± 6,8 c | 20,9 ± 1,6 c | 131,5 ± 8,8 c | 22,6 ± 3,8 b | 185,2 ± 10,0 b | 31,0 ± 1,4 c | 192,8 ± 7,7 c | 24,6 ± 3,1 b |
| Tasset + Ri | 218,0 ± 11,5 a | 30,6 ± 2,0 a | 232,0 ± 14,2 a | 46,1 ± 5,6 a | 252,5 ± 13,8 a | 43,3 ± 2,8 a | 281,4 ± 10,5 a | 42,1 ± 5,6 a |
| Facteurs testés | | | | | | | | |
| Provenance (P) | ** | *** | ** | NS | * | *** | NS | NS |
| Inoculation (I) | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| (P) × (I) | * | *** | * | NS | NS | *** | *** | NS |

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P < 0,05$) selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Ri: *Rhizophagus irregularis*.

Tableau 19. Coefficients de corrélation (r) entre les paramètres de croissance, l'intensité de mycorhization et la production fruitière des jujubiers en plantation à Keur Mangari.

| | Hauteur | Diamètre au collet | Diamètre du houppier | Intensité de myco. | Nombre total de fruits | Poids total de fruits |
|------------------------|----------|--------------------|----------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|
| Hauteur | 1 | | | | | |
| Diamètre du collet | 0,802*** | 1 | | | | |
| Diamètre du houppier | 0,951*** | 0,792*** | 1 | | | |
| Intensité de myco. | 0,892*** | 0,746*** | 0,898*** | 1 | | |
| Nombre total de fruits | 0,394 | 0,087 | 0,440 | 0,485* | 1 | |
| Poids total de fruits | 0,687** | 0,539* | 0,640** | 0,522* | 0,174 | 1 |

(*) Les coefficients de corrélation de Pearson sont significatifs aux seuils de $P < 0,05$, (**) $P < 0,01$ et (***) $P < 0,001$.

III.6. Impact de l'inoculation sur la production fruitière de *Z. mauritiana* à Keur Mangari

En 2014, les résultats de la 1^{ère} saison de fructification des jujubiers ont montré que les deux facteurs (inoculation et provenance) et leur interaction ont un effet significatif sur le nombre total de fruits et le poids total de fruits frais (Tableau 20). En effet, le nombre total de fruits a été significativement plus élevé chez Tasset inoculée (298 fruits/arbre) comparé aux autres traitements (Figure 23B). Par contre, la production moyenne de fruits en poids frais a été significativement plus importante chez Gola inoculée (670 g/arbre) comparé aux autres traitements (Figure 23A). L'inoculation a augmenté le diamètre moyen des jujubes de Tasset mais n'a pas eu d'effet significatif sur le diamètre moyen des jujubes de Gola.

En 2015, les résultats de la 2nd saison de fructification des jujubiers sont similaires à ceux observés lors de la 1^{ère} saison de fructification. L'effet des deux facteurs a été significatif sur

le poids total de fruits frais et le nombre total de fruits par arbre (Tableau 20). Le nombre total de fruits a été significativement plus élevé chez Tasset inoculée avec 556 jujubes/arbre comparé aux autres traitements alors que la production moyenne de jujubes a été deux fois plus importante chez Gola inoculée (1044 g/arbre) comparé aux autres traitements. La taille moyenne des jujubes a été plus élevée chez Tasset inoculée comparée au témoin non inoculé alors que le diamètre moyen du jujube n'a pas augmenté par l'inoculation chez Gola.



Figure 23. Branches portant des fruits de jujubiers (A : Gola ; B : Tasset) observés après 18 mois en plantation.

Tableau 20. Impact de l'inoculation sur la production fruitière des jujubiers évalué en 2014 (18 mois en plantation) et en 2015 (30 mois en plantation) à Keur Mangari.

| Traitement | Nombre total de fruits frais/arbre | | Poids total de fruits frais/arbre (g) | | Diamètre du jujube (cm) | |
|-----------------|------------------------------------|------------|---------------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | 2014 | 2015 | 2014 | 2015 | 2014 | 2015 |
| Tasset | 161 ± 14 b | 385 ± 13 b | 239 ± 12 c | 278 ± 13 b | 1,25 ± 0,2 c | 1,3 ± 0,1 c |
| Tasset + Ri | 298 ± 17 a | 556 ± 17 a | 328 ± 14 b | 434 ± 18 b | 1,82 ± 0,3 b | 1,8 ± 0,3 b |
| Gola | 119 ± 08 c | 258 ± 15 c | 344 ± 11 b | 467 ± 12 b | 3,47 ± 0,1 a | 3,5 ± 0,2 a |
| Gola + Ri | 165 ± 12 b | 317 ± 13 b | 670 ± 16 a | 1044 ± 15 a | 3,54 ± 0,1 a | 3,6 ± 0,1 a |
| Facteurs testés | | | | | | |
| Provenance (P) | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| Inoculation (I) | *** | ** | *** | *** | * | ** |
| (P) × (I) | * | NS | *** | ** | NS | NS |

Dans chaque colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Ri: *Rhizophagus irregularis*.

IV. Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué l'impact de l'inoculation sur la croissance, la survie et la production fruitière de *Z. mauritiana*. En serre, nos résultats ont montré que l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 améliore la croissance et la nutrition minérale des plants des provenances de *Z. mauritiana*. Ces résultats concordent avec d'autres études qui ont préalablement montré que cette souche fongique favorisait la croissance du jujubier (Guissou *et al.*, 1998 ; Bâ *et al.*, 2000, 2001 ; Guissou, 2009 ; Sidibé *et al.*, 2012 ; Guissou *et al.*, 2016). Guissou (2009) a montré que l'absence de l'inoculation avec les CMA est un facteur qui pourrait limiter la croissance et le développement des plantes en pépinière. Bâ *et al.*, (2000) ont montré que le jujubier est fortement dépendant de *R. irregularis* IR27. Dans ces études, les auteurs ont montré une forte stimulation de la biomasse totale d'espèces fruitières en présence de *R. irregularis* IR27. Nos résultats confirment l'efficacité de la souche sélectionnée, *R. irregularis* IR27 sur la mycorhization contrôlée des plants de jujubiers.

Le phosphate naturel en présence ou non de CMA n'a pas eu d'effet positif sur la croissance et la nutrition minérale des jujubiers en serre. L'effet de l'inoculation sur l'absorption du P a été nettement supérieur à celui des témoins non inoculés. Ceci confirme que les jujubiers inoculés mobilisent mieux le phosphore que les jujubiers non inoculés (Bâ *et al.*, 1997 ; Guissou *et al.*, 1998a). Pour expliquer ce résultat, l'hypothèse la plus couramment admise est que les plantes mycorhizées ont une plus grande capacité d'absorption du P que les plantes non mycorhizées grâce au réseau d'hyphes extramatricielles qu'elles développent et qui leur permet d'explorer un volume de sol plus important (Bolan, 1991). Plusieurs études ont démontré sans équivoque que les plantes colonisées par les CMA sont beaucoup plus efficaces pour absorber le P du sol que les plantes non inoculées (Fitter, 1988 ; Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988 ; Asmah, 1995 ; Subramanian *et al.*, 1997). Nos résultats ont également montré que l'absorption en N et en K a été plus importante chez les plantes mycorhizées comparée à celles non mycorhizées. Les teneurs élevées en N et en K sont également fréquentes chez les plantes mycorhizées (Willis *et al.*, 2013). Ceci conforte nos résultats obtenus sur l'absorption en N et en K des jujubiers qui a été significativement améliorée par l'inoculation. Le taux de mycorhization élevé observé chez les plants inoculés a favorisé l'augmentation significative de la hauteur, du diamètre au collet et de la biomasse totale. Ces résultats confortent les conclusions de Koide & Mosse (2004) qui ont montré l'existence d'une relation évidente entre le degré auquel un système racinaire d'une plante est

colonisé par des CMA et le potentiel pour la plante de bénéficier de manière significative de cette symbiose.

En plantation, le taux de mycorhization des jujubiers évalué après 13 mois à Amally, a été significativement plus élevé dans les jujubiers inoculés et dépasse les 50%. Le même effet a été obtenu chez les plants inoculés à Keur Mangari mais avec un taux de mycorhization de 45% après 24 mois de plantation et 40% après 30 mois de plantation. Ce résultat suggère que *R. irregularis* est compétitif vis-à-vis des CMA indigènes. Des études ont montré que ce champignon peut s'établir avec succès après son introduction dans une communauté de CMA indigènes (Badri *et al.*, 2016 ; Kölh *et al.*, 2016). Dans les systèmes agroforestiers, il est bien connu que les arbres à forts taux d'infection mycorhizienne peuvent être utilisés pour reconstituer le potentiel mycorhizien des sols (Goldbold & Sharrock, 2003). Dans certains cas, l'augmentation de la croissance des plantes pourrait être due aux effets produits par l'interaction entre différentes espèces de CMA (Alguacil *et al.*, 2011). Souvent, les souches de CMA indigènes peuvent fort bien convenir pour assurer une mycorhization efficace sans avoir à utiliser la technologie impliquant l'introduction d'inoculum exotique. On croit souvent que les souches locales sont plus adaptées comme inoculum mais notre étude montre bien que la souche *R. irregularis* IR27 sélectionnée, est d'une grande efficacité sur les jujubiers en plantation. Ceci est confirmé par les corrélations positives et significatives ($P < 0,001$) observées entre l'intensité de mycorhization et les paramètres de croissance en plantation dans les deux sites d'étude.

L'analyse des données a révélé un effet significatif de l'inoculation sur la croissance et la survie des jujubiers à Amally et à Keur Mangari. Après 3, 8 et 13 mois en plantation, l'inoculation avec *R. irregularis* a significativement amélioré la croissance et la survie des jujubiers dans le jardin polyvalent d'Amally. Cet effet positif de l'inoculation a été également observé sur la croissance et le taux de survie des jujubiers à Keur Mangari jusqu'à 30 mois de plantation. Pringle et Bever (2008) ont rapporté des corrélations entre les effets des CMA observés sur les plantes en condition de pépinière et en plantation. Il a été établi que la réussite de l'inoculation au champ est liée à la dépendance mycorhizienne des plantes, à la compétitivité du champignon, à la teneur en P du sol et au potentiel mycorhizogène du sol (Fortin *et al.*, 2015). Etant donné que le jujubier est fortement dépendant de *R. irregularis* IR27 et que les potentiels mycorhiziens des sols de plantation sont très faibles (1,06 propagules/100 g de sol à Amally et 23,87 propagules/100g de sol à Keur Mangari), ceci peut expliquer la réussite de l'inoculation. La compétitivité de *R. irregularis* serait donc liée aux

faibles potentiels mycorhiziens des sols de plantation. De ce point de vue, il a été démontré que le succès de l'inoculation avec un CMA exotique dans les sols agricoles dépendrait de nombreux facteurs tels que la compatibilité des espèces, la disponibilité de niche d'habitat pour le CMA et la concurrence vis-à-vis des champignons naturels (Verbruggen *et al.*, 2013). Des auteurs ont montré la nécessité d'inoculer avec des CMA pour améliorer la croissance des plantes dans les sols dégradés (Estaun *et al.*, 1997 ; Duponnois *et al.*, 2005). Des travaux antérieurs ont également montré que les CMA sont indispensables dans l'agriculture durable, car ils améliorent la nutrition hydrique et l'absorption minérale des plantes et augmentent la résistance à la sécheresse de la plante hôte (Mathur & Vyas, 1999). Tous ces avantages fournis par les CMA au profit des plantes pourraient expliquer l'amélioration significative de la survie des jujubiers au champ. Notre étude montre ainsi l'intérêt majeur d'utiliser les techniques de mycorhization contrôlée dans l'amélioration de la croissance et de la vigueur des jujubiers après transplantation. L'effet de l'inoculation a permis un taux de survie de 75 % après 8 et 13 mois à Amally alors qu'à Keur Mangari les jujubiers inoculés ont montré un taux de survie de 83% après 18 et 30 mois de plantation. La souche *R. irregularis* semble donc bien adaptée aux conditions du milieu de nos deux sites d'étude. Duponnois *et al.* (2005) ont montré que plus les plants inoculés sont robustes par rapport à ceux non-inoculés, plus ils pourraient survivre en montrant une grande capacité de résistance aux conditions environnementales. Malgré les différences climatiques entre nos deux sites expérimentaux, les effets de l'inoculation sont quasiment les mêmes après plantation. Nos résultats semblent confirmer une importance mineure des facteurs environnementaux sur l'efficacité de la mycorhization (Sensoy *et al.*, 2007 ; Gosling *et al.*, 2006).

La fertilisation phosphatée avec le PN n'a pas eu un effet significatif sur la croissance et le taux de survie des jujubiers après plantation notamment sur le site d'Amally. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que le PN soit très peu soluble et que son effet pourrait se manifester sur le long-terme.

Nos résultats ont également montré une amélioration significative de la production fruitière des jujubiers inoculés après 18 mois et 30 mois de plantation à Keur Mangari. Cette augmentation serait due à la pauvreté du sol du verger en phosphore et dans ce cas de figure, l'inoculation serait un facteur important qui contribue à la production fruitière du jujubier. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs sur des cultures de légumes (Makus, 2004 ; Elahi *et al.*, 2010 ; Conversa *et al.*, 2013 ; Douds *et al.*, 2016). Ces résultats confirment l'effet bénéfique de l'inoculation avec des CMA en termes de production accrue de fruits. En

termes de poids total de fruits frais par arbre, la provenance Gola inoculée a été plus productive que la provenance locale Tasset. Les valeurs de la production moyenne de fruits par arbre dans la présente étude (670 g/arbre en 2014 et 1044 g/arbre en 2015) étaient inférieures aux valeurs rapportées dans la littérature pour les arbres adultes (Bakhshi & Singh, 1974 ; Pareek, 2001, Tewari, 2002). Ce résultat peut être dû au jeune âge de nos jujubiers en plantation (2 ans). Selon Pareek (2001), la productivité du jujubier est maximale à l'âge de 10 ans. Dans les conditions d'irrigation, le rendement en fruits par arbre varie de 80 à 200 kg selon la variété et la pratique de gestion (Bakhshi & Singh, 1974). La provenance Tasset inoculée est plus productive en termes de nombre total de fruits frais/arbre que celle Gola inoculée. Ceci pourrait s'expliquer par une faible pression du poids des fruits sur les rameaux chez Tasset contrairement Gola. Nous avons également noté des décalages des périodes de maturité entre les deux provenances étudiées (résultats non présentés). En effet, les quantités de fruits récoltées ont été notées en fonction du temps et il s'est avéré que la maturité des fruits a été plus avancée chez Gola contrairement à Tasset. Selon Vashishtha (1997), Gola fait partie à des variétés indiennes précoces, qui à priori, s'adapte le mieux aux conditions pédoclimatiques d'Afrique tropicale. Par ailleurs, Tewari (2002) ont montré que l'irrigation et la fertilisation auraient un effet bénéfique sur la croissance et la grosseur des fruits du jujubier des cultivars indiens Gola et Seb. Des études antérieures ont également montré que le PN du Burkina Faso (Kodjari 25% P₂O₅) en condition irriguée améliorerait la production de fruits de la variété indienne Gola (Ouédraogo *et al.*, 2006). De telles améliorations sont compatibles avec le fait que l'eau soit un facteur limitant important dans le Sahel ainsi que le manque inhérent de phosphore dans les sols de cette zone (Pareek, 2001). Or, dans notre étude, le principal facteur susceptible d'expliquer l'augmentation de la production de fruits chez les jujubiers est l'inoculation avec *R. irregularis*.

V. Conclusion

Cette étude a clairement montré que la mycorhization contrôlée avec la souche sélectionnée *R. irregularis* IR27 améliore la croissance, la survie et la production fruitière des jujubiers en plantation. D'un point de vue pratique, l'inoculation avec *R. irregularis* serait une bonne option pour les forestiers et les producteurs privés dans l'amélioration de la productivité des espèces fruitières en zone aride et semi-aride. Cette étude contribue à une meilleure compréhension de l'écologie de la souche *R. irregularis* IR27 et de son impact sur la microflore indigène. D'un point de vue agronomique, les résultats de cette étude soulignent

l'importance du choix de la souche sélectionnée qui est non seulement efficace sur la croissance des jujubiers mais compétitive vis-à-vis des CMA natifs. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'impact de l'inoculation en tant que pratique culturale sur les communautés de CMA natifs des sols de plantation.

CHAPITRE IV

IMPACT DE L'INOCULATION SUR LA DIVERSITE DES COMMUNAUTES DE CMA NATIFS ASSOCIES A *Z. MAURITIANA* EN PLANTATION

Cette partie des résultats a fait l'objet :

1) D'une communication orale à la 7^{ème} édition du *Printemps de Baillarguet* :

Babacar Thioye. **Stratégie d'ingénierie écologique basée sur la mycorhization de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Jujubier) sur le tracé du projet Grande Muraille Verte: impact sur la diversité native des communautés mycorhiziennes.** 04-05 juin 2015 à Montpellier, France.

2) D'une communication orale à l'*Atelier Régional en Bioinformatique SENE BIO2015* :

Babacar Thioye, Hervé Sanguin, Aboubacry Kane, Abdala Diédhiou, Cheikh Ndiaye, Mor Bâ, Dioumacor Fall, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ. **La Grande Muraille Verte vue au travers de NTS.** 16-20 novembre 2015 à Dakar, Sénégal.

3) D'une communication orale aux *11^{ème} rencontres de Phytopathologie-Mycologie* :

Babacar Thioye, Hervé Sanguin, Aboubacry Kane, Cheikh Ndiaye, Sergio de Faria, Abdala Diédhiou, Dioumacor Fall, Mor Bâ, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ. **Etude des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules associées au jujubier (*Ziziphus mauritiana* Lam.) sur le tracé du projet Grande Muraille Verte au Sénégal: impact de l'inoculation, de la fertilisation phosphatée et de la provenance de l'hôte.** 25-29 janvier 2016 - Aussois, France.

4) D'un article en préparation dans *Mycorrhiza* :

Impact of mycorrhizal-based ecological engineering strategies on *Ziziphus mauritiana* Lam. and its native mycorrhizal community on the route of the Great Green Wall (Senegal).

CHAPITRE IV. IMPACT DE L'INOCULATION SUR LA DIVERSITE DES COMMUNAUTES DE CMA NATIFS ASSOCIES A *Z. MAURITIANA* EN PLANTATION

I. Introduction

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) jouent un rôle majeur dans la productivité végétale via l'amélioration de la nutrition minérale des plantes et de leur protection contre certains agents pathogènes (Smith & Read, 2008). Les effets bénéfiques des CMA contribuent à de nombreux services écosystémiques cruciaux pour la durabilité des agroécosystèmes (Gianinazzi *et al.*, 2010). Pour ces raisons, les CMA sont des acteurs de choix dans la formulation de biofertilisants pour le développement d'agriculture durable (Gianinazzi *et al.*, 2010 ; Berruti *et al.*, 2016). Néanmoins, l'introduction de CMA exotiques est considérée comme une perturbation biotique pouvant altérer la structure des communautés de CMA natifs (Rodriguez & Sanders, 2015). Par conséquent, il a été suggéré que les effets bénéfiques observés suite à une inoculation avec des CMA, pouvaient être attribués soit (i) à un effet direct du champignon inoculé ou (ii) indirect par un changement des communautés de CMA natifs. Dans les précédents chapitres, nous avons pu montrer que l'inoculation avec la souche *R. irregularis* IR27 avait un effet positif sur la croissance, la survie et la production fruitière de deux provenances de jujubiers en plantation. Ces effets bénéfiques seraient dus soit à la souche *R. irregularis* IR27 soit à une modification de la diversité et de la structure des communautés de CMA natifs.

L'analyse de la diversité des CMA au sein des agroécosystèmes connaît actuellement un nouvel essor grâce au développement des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) (Öpik *et al.*, 2009). Les NGS permettent une vision relativement exhaustive des communautés de CMA grâce à une très grande profondeur de séquençage et l'analyse d'un très grand nombre d'échantillons pour récupérer même les taxons rares (Hart *et al.*, 2015). Afin de caractériser la diversité et la structure des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation, le compartiment racinaire a été privilégié (Öpik *et al.*, 2006). En effet, l'analyse des CMA au sein des agroécosystèmes peut révéler des différences significatives entre les compartiments sol et racine (Saks *et al.*, 2014 ; Varela-Cervero *et al.*, 2015). La caractérisation taxonomique des CMA a été basée sur la sélection d'une sous-région de la petite sous unité (SSU) de l'ARN ribosomique 18S. Ce marqueur moléculaire est le plus largement utilisé dans les études moléculaires des CMA au sein de l'environnement

(Öpik *et al.*, 2010 ; Davison *et al.*, 2015). Le couple d'amorces NS31/AML2, validé dans plusieurs études environnementales utilisant les NGS (Davison *et al.*, 2012 ; Öpik *et al.*, 2013), a été sélectionné pour notre étude. Ce couple d'amorces présente deux avantages majeurs : (i) il cible spécifiquement le gène de l'ARNr 18S de l'ensemble des Glomérormycètes, (ii) il permet la synthèse d'un fragment d'ADN d'environ 550 paires de base (pb) relativement adapté pour les NGS. Davison *et al.* (2015) ont démontré que les conditions environnementales locales et les configurations spatiales des écosystèmes déterminent la composition des communautés de CMA. Toutefois, la diversité moléculaire des CMA dans les écosystèmes sahéliens reste encore très peu étudiée.

Le travail réalisé ici s'attache à évaluer l'impact de l'inoculation sur la diversité des communautés de CMA natifs associés aux jujubiers en plantation.

II. Matériel et méthodes

II.1. Echantillonnage des racines de *Z. mauritiana*

Les prélèvements de racines ont été effectués au niveau des plantations de jujubiers sur deux localités différentes (Amally et Keur Mangari) (Figure 24). Les plantations de jujubiers comprenaient une variété introduite (Gola) à cycle court originaire de l'Inde et une provenance locale (Tasset, région de Thiès) à cycle long. A Amally, le dispositif expérimental était composé de 8 traitements (Gola, Gola+PN, Gola+Ri, Gola+Ri+PN, Tasset, Tasset+PN, Tasset+Ri et Tasset+Ri+PN) répartis en quatre blocs entièrement randomisés avec 6 répétitions par traitement et par bloc. A Keur Mangari, le dispositif expérimental était constitué de quatre blocs entièrement randomisés dans lesquels 4 traitements (Gola, Gola+Ri, Tasset et Tasset+Ri) ont été répartis de manière aléatoire avec 10 répétitions par traitement et par bloc. Pour chaque traitement, un échantillon de racines a été constitué par bloc, correspondant à un pool de racines de 3 plants prélevé à une profondeur de 5-10 cm, soit un total de 32 échantillons prélevés à Amally et 16 échantillons prélevés à Keur Mangari. Au total, 48 échantillons ont été prélevés et conservés à température ambiante dans des sachets contenant du silicagel pour prévenir toute humidité jusqu'aux analyses moléculaires des communautés de CMA.



Figure 24. Prélèvement de racines au niveau des plantations de jujubiers.

II.2. Caractérisation moléculaire des CMA associés aux racines de *Z. mauritiana*

II.2.1. Extraction d'ADN total de racines

Les fragments de racines ont été broyés à l'azote liquide dans un mortier à l'aide d'un pilon jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les extractions d'ADN ont été réalisées avec le Kit d'extraction FastDNA[®] SPIN (MP biomedical, Europe) selon le protocole décrit par le fournisseur. Les fragments de racines broyés ont été pesés, et 40 mg ont été placés dans des tubes Lysing Matrix 2 ml. Le broyat a été mis en suspension dans 800 µl de solution de lyse CLS-VF et 200 µl de tampon de précipitation PPS. La suspension a été vigoureusement homogénéisée à l'aide de l'instrument FastPrep-24 homogenizer (MP biomedical Europe, Illkirch, France) à une puissance de 6.0 pendant 40 s, incubée à température ambiante pendant 12 à 15h et centrifugée à $14\ 000 \times g$ pendant 10 min à 20°C. Ces étapes correspondent à la lyse cellulaire, la dénaturation des protéines et la précipitation des débris racinaires et

cellulaires. Le surnageant a été ensuite transféré dans un tube 2 ml puis un volume de 800 µl de solution Binding Matrix contenant des billes fixatrices d'ADN a été ajouté. L'ensemble a été mélangé par agitation pendant 5 min. Un volume de 800 µl du mélange a été transféré dans une colonne SPIN et centrifugé à $14\ 000 \times g$ pendant 1 min à 20°C. L'opération a été répétée avec le reste du mélange. Au cours de ces étapes l'ADN extrait est fixé sur les billes et retenu par un filtre placé dans la colonne et le filtrat (contenant les composés utilisés pour la lyse) éliminé. Un volume de 500 µl du tampon de lavage SEWS-M a été ajouté et mélangé jusqu'à la re-suspension des billes dans le tampon de lavage (obtention d'un mélange blanchâtre). Le mélange a été centrifugé à $14\ 000 \times g$ pendant 1 min à 20°C. La colonne a été finalement séchée par une centrifugation supplémentaire à $14\ 000 \times g$ pendant 2 min à 20°C. La colonne a été placée dans un nouveau tube 2 ml, et l'ADN a été re-suspendu dans 100 µl de tampon d'éluion DES (détachement de l'ADN jusqu'alors fixé à des billes). La suspension a été incubée à 55°C à l'aide d'une plaque chauffante pendant 5 min puis la colonne a été centrifugée à $14\ 000 \times g$ pendant 1 min. L'ADN en suspension est alors contenu dans un tube 2 ml. La présence et la pureté de l'extrait d'ADN ont été ensuite évaluées à l'aide d'un Nanodrop (détection par spectrophotométrie) et quantifiées à l'aide de la technologie Qubit (détection par fluorométrie). La qualité de l'ADN a été vérifiée sur gel d'agarose 1,5%. L'ADN a été finalement conservé à -20°C jusqu'à son utilisation dans les étapes d'amplification génique.

II.2.2. Amplification de la région 18S de l'ADNr par PCR

L'amplification génique par PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel de 25 µl contenant pour chaque échantillon : 14,05 µl H₂O ultrapure stérile ; 5 µl tampon 5X (MgCl₂) ; 2 µl dNTPs (2,5 mM) ; 0,625 µl de l'amorce NS31 (20 µM) ; 0,625 µl de l'amorce AML2 (20 µM) ; 0,5 µl tampon BSA (10mg/ml) ; 0,2 µl GoTaq (1U total) ; 2 µl ADN. Le programme était le suivant : dénaturation initiale (94°C, 3min) suivie de 30 cycles de dénaturation (94°C, 30 s), d'hybridation (58°C, 90 s) et d'élongation (72°C, 80 s) et une élongation finale (72°C, 10 min). Les produits PCR ont été contrôlés par migration électrophorétique (100 V durant 30 minutes) sur gel d'agarose 1% réalisé dans du tampon TAE 1X [solution stock TAE 50X : 242 g de Tris Base, 57,1 ml Acide Acétique glacial, 100 mL EDTA à 0,5M, pH 8, qsp 1 L]. Le gel a été ensuite mélangé avec une goutte de solution de bromure d'éthidium (BET, 0,5 mg/L, Sigma) pour révéler les amplicons aux UV et les photographier par un appareil Gel Doc 1000 (BIORAD).

II.2.3. Purification des produits PCR et dosage au Nanodrop

Après la PCR, les produits d'amplification (pools de PCR : $2 \times 25\mu\text{l}$) ont été purifiés à l'aide du kit GFX PCR DNA (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) selon le protocole défini par le fournisseur. Un volume de $500 \mu\text{l}$ de tampon de capture type 3 a été ajouté dans $100 \mu\text{l}$ du produit PCR. Puis le mélange a été abondamment mélangé. C'est l'étape de préparation à la fixation du produit PCR. Le mélange a été centrifugé brièvement afin de récupérer le liquide collé au rebord du tube. Puis le mélange a été transféré dans une colonne GFX MicroSpin associée d'un tube collecteur. La colonne a été centrifugée à $16\,000 \times g$ pendant 30 s. Le filtrat a été jeté et la colonne a été remise dans le tube collecteur (l'ADN est alors fixé sur un filtre contenu dans la colonne). Un volume de $500 \mu\text{l}$ de tampon de lavage de type 1 a été ajouté dans la colonne. Puis la colonne a été centrifugée à $16\,000 \times g$ pendant 30 s. Le tube collecteur a été jeté et la colonne a été transférée dans un nouveau tube $1,5 \text{ ml}$. Un volume de 10 à $50 \mu\text{l}$ de tampon d'éluion de type 4 a été ajouté au centre de la membrane de la colonne. La colonne a été incubée à température ambiante pendant 1 min avant d'être centrifugée à $16\,000 \times g$ pendant 30 s pour récupérer le culot d'ADN purifié. L'ADN purifié a ensuite été quantifié afin de déterminer sa concentration et sa pureté selon 2 méthodes : (i) dosage spectrophotométrique à l'aide d'un Nanodrop (NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer, Thermo scientific) et (ii) dosage fluorométrique à l'aide de la technologie Qubit (Qubit Fluorometric quantitation, Life technologies). Les échantillons ont été ajustés à une concentration optimale de $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ pour le séquençage.

II.2.4. Séquençage massif du 18S avec la technologie Illumina MiSeq

Tous les échantillons purifiés ont été envoyés au laboratoire MR DNA (Molecular Research LP, Texas, Etats Unis) afin d'effectuer le séquençage des produits PCR (amplicons) à l'aide de la technologie Illumina MiSeq ($2 \times 300 \text{ pb}$). Avant le séquençage, une PCR d'émulsion a été effectuée afin d'ajouter une clé d'indentification (« tag », séquence de 8 nucléotides) en 5' du brin sens de l'amplicon. De plus, deux adaptateurs A et B (séquences d'amorçage) ont été ajoutés à la suite des amorces NS31 et AML2, respectivement, afin de réaliser le séquençage bi-directionnel des amplicons.

II.3. Traitement bio-informatique des données

Les données de séquençage illumina MiSeq ont été analysées en utilisant le logiciel Mothur (http://www.mothur.org/wiki/Main_Page) selon une démarche qualité établie par Kozich *et al.* (2013). Deux types de fichiers ont été obtenus, R1 et R2, correspondant respectivement au séquençage à partir de NS31 et AML2. La variabilité de taille des amplicons n'a cependant pas permis un assemblage satisfaisant des deux brins d'ADN séquencés. Les séquences obtenues avec NS31 ont été sélectionnées pour la suite du traitement en raison d'une meilleure qualité de séquençage. La fonction *trim.seqs()* a été utilisée pour éliminer les séquences de faible qualité (erreur de séquençage, séquences courtes). Pour chaque séquence, seules les régions présentant une qualité de séquençage moyen $Q > 30$ sur une longueur de 50 pb ont été conservées. Toutes les séquences présentant plus d'une erreur dans les amorces, au moins une base ambiguë, des homopolymères dépassant 8 bp, et une taille < 150 pb ont été supprimées du jeu de données. Afin d'augmenter la qualité du jeu de données, des étapes de pré-regroupement des séquences basées sur leur similarité [fonction *pre.cluster()*, regroupement des séquences présentant 1 pb de différence pour 100 pb] (Huse *et al.*, 2010), de détection des chimères [fonction *chimera.uchime()*, algorithme UCHIME ; Edgar *et al.*, 2011] et d'élimination des séquences non spécifiques (hors Glomérormycètes) ont été appliquées. L'élimination des séquences non Glomérormycètes a été effectuée à l'aide de la méthode de classification bayésienne de RDP (Ribosomal Data Project) implémenté dans Mothur [fonction *classify.seqs()*] et de la comparaison avec des séquences de références d'Eukaryotes provenant de la base de données SILVA (<http://www.arb-silva.de>). Afin de décomplexifier le jeu de donnée, les séquences ont été regroupées sur la base de leur similarité nucléotidique avec l'utilisation successive de la fonction *dist.seqs()*, permettant de calculer la matrice de distance entre les séquences, et la fonction *cluster()* avec la méthode *average* pour regrouper les séquences en groupe de similarité (Unité Taxonomique Opérationnelle, OTU). Un seuil de 97% de similarité a été adopté pour la constitution des OTU en raison de sa validation dans de nombreuses études environnementales (Buée *et al.*, 2009 ; Amend *et al.*, 2010 ; Tedersoo *et al.*, 2010 ; Bahram *et al.*, 2012). Finalement, le jeu de données a été normalisé avec la fonction *sub.sample()*, consistant à un sous-échantillonnage aléatoire des séquences. Cette étape permet d'obtenir un nombre de séquences équivalent entre chaque échantillon augmentant ainsi la fiabilité des tests statistiques effectués pour estimer la diversité alpha et bêta (Gihring *et al.*, 2012). Les séquences représentatives de chaque OTU ont été sélectionnées pour effectuer une analyse phylogénétique et améliorer l'assignation

taxonomique des séquences. L'analyse phylogénétique a été effectuée par comparaison avec des séquences de références de Gloméromycètes provenant de Krüger *et al.* (2012), ainsi que des séquences Gloméromycètes provenant de la base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). L'ensemble des séquences a été aligné à l'aide du logiciel MEGA version 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Les indices de diversité (Shannon, inverse Simpson) et de richesse (nombre d'OTU ou Sobs, Chao1) ont été déterminés avec le logiciel Mothur.

II.4. Analyses statistiques

Les données de la diversité alpha (richesse et diversité spécifique) ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (provenance et inoculation) et à 3 facteurs (provenance, inoculation et fertilisation). Les moyennes de chaque variable ont été comparées en utilisant le test de Tukey (HSD) au seuil de significativité de 5% avec le logiciel R. L'effet des facteurs et de leur interaction sur la structure des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* a été évalué par analyse de variance multivariée par permutation (PERMANOVA) (Anderson, 2001), intégrée dans la fonction *adonis()* du package "vegan" installé au sein du logiciel R. La PERMANOVA a été effectuée à partir d'une matrice de dissimilarité de Bray-Curtis. Pour chaque traitement, l'abondance relative des séquences (en pourcentage) de chaque espèce de CMA a été déterminée. Les OTU indicatrices d'une condition donnée (provenance, inoculation et fertilisation) ont été déterminées à l'aide de la fonction *multipatt()* du package "indicspecies" (De Cáceres *et al.*, 2010) installé au sein du logiciel R. L'analyse repose sur une analyse de corrélation basée sur le coefficient d'association 'phi' de Pearson (Tichy & Chytrý, 2006) et tenant compte de l'abondance et de la fréquence des OTU au sein des échantillons.

III. Résultats

III.1. Caractérisation moléculaire des CMA associés aux racines de jujubiers

Les conditions d'amplifications PCR du gène 18S à partir de l'ADN extrait des échantillons de racines ont nécessité plusieurs phases d'optimisation (quantité de racines, purification, quantité d'ADN). Ainsi, sur les 48 échantillons de racines traités, 47 ont donné des amplifications positives et analysés par séquençage avec le couple d'amorces NS31/AML2 spécifiques aux Gloméromycètes. L'amplification s'est traduite par l'obtention d'une seule

bande de 550 pb quel que soit l'échantillon de racines traité (Figure 25). Ce résultat confirme la spécificité de ces amorces pour la séquence nucléotidique étudiée.

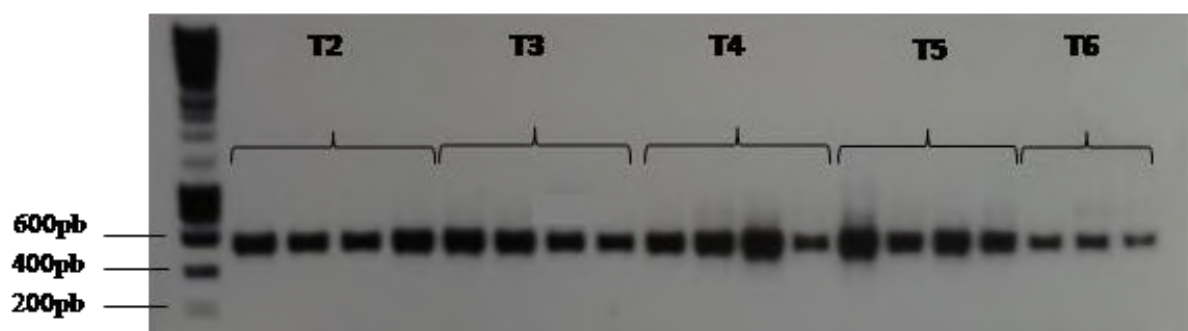


Figure 25. Amplification du gène 18S à partir des échantillons d'ADN extraits des racines de jujubiers (T2=Tasset+Ri+PN ; T3=Tasset ; T4=Tasset+PN ; T5=Gola+Ri ; T6=Gola+Ri+PN).

III.2. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la diversité alpha des communautés de CMA natifs à Amally

Les résultats de l'ANOVA sur l'impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la diversité- α des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation à Amally sont traduits dans le tableau 21. Les facteurs inoculation et provenance ont eu un effet significatif ($P < 0,001$) sur la richesse des communautés de CMA. La fertilisation a significativement affecté ($P < 0,05$) le nombre d'OTU et les indices de Shannon et d'Invsimpson. L'inoculation a également eu un effet significatif ($P < 0,05$) sur la diversité des communautés de CMA. Aucune interaction significative entre les trois facteurs n'a été observée sur les indices de richesse et de diversité. Par contre l'interaction entre l'inoculation et la fertilisation a été significative sur la richesse et la diversité. Les résultats du test de comparaison des moyennes (Tukey HSD) des indices de richesse et de diversité de chaque traitement sont représentés dans les figures 26 et 27. Les résultats montrent que l'inoculation et la fertilisation phosphatée diminuent la richesse et la diversité des communautés de CMA. En effet, les valeurs les plus faibles en termes de nombre d'OTU et d'indice Chao1 ont été retrouvées chez les traitements inoculés et fertilisés comparés aux témoins non inoculés quelle que soit la provenance de jujubiers (Figure 26). L'indice de Shannon a significativement ($P < 0,05$) diminué avec l'inoculation et la fertilisation particulièrement chez Tasset. L'indice d'Invsimpson n'a pas varié avec l'inoculation et la fertilisation chez la provenance Gola alors que les traitements

inoculés et fertilisés chez la provenance Tasset ont connu une baisse significative ($P < 0,05$) de l'indice d'InvSimpson (Figure 27).

Tableau 21. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la diversité alpha des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation à Amally.

| Facteurs testés | Nombre d'OTU (Richesse) | Chao1 (Richesse) | Shannon (Diversité) | InvSimpson (Diversité) |
|-------------------|----------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------|
| Provenance (P) | * | ** | NS | NS |
| Inoculation (I) | *** | *** | * | NS |
| Fertilisation (F) | * | NS | * | ** |
| (P) × (I) | NS | NS | NS | NS |
| (P) × (F) | NS | *** | NS | NS |
| (I) × (F) | *** | *** | * | * |
| (P) × (I) × (F) | NS | NS | NS | NS |

ANAOVA selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

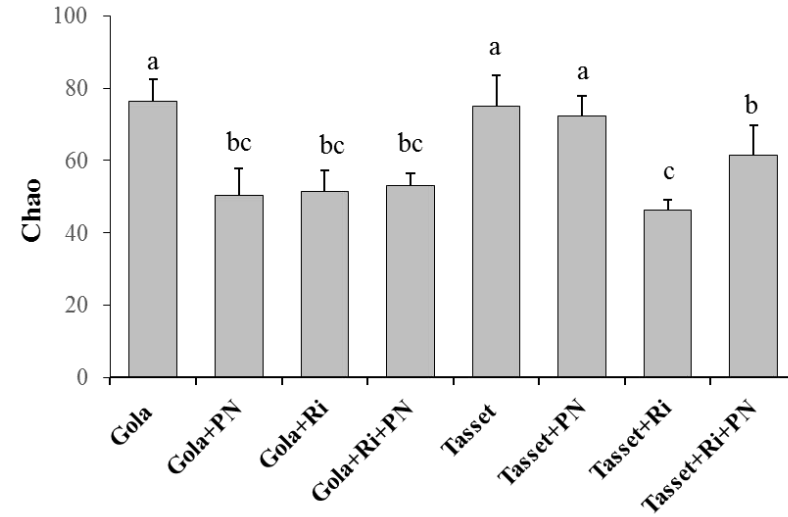
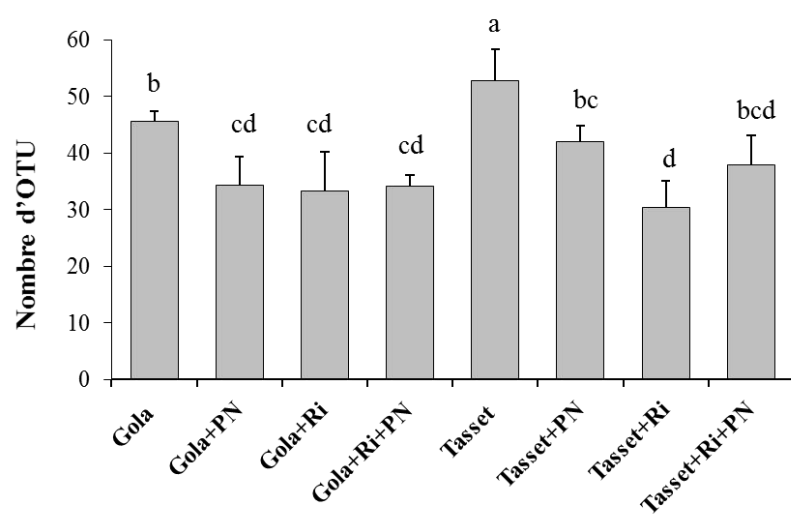


Figure 26. Richesse des communautés de CMA en fonction de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée. ANOVA (Tukey HSD, $P < 0,05$).

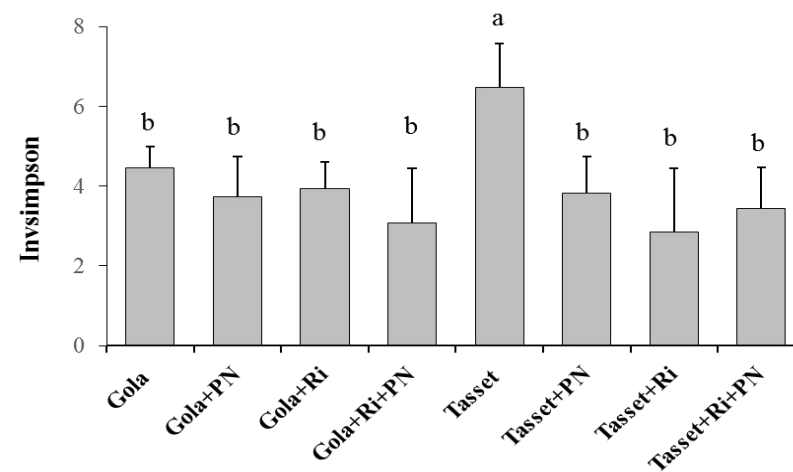
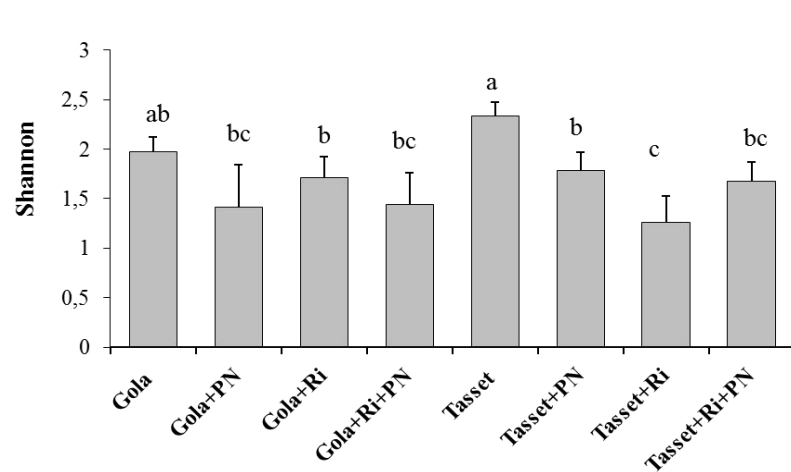


Figure 27. Diversité des communautés de CMA en fonction de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée. ANOVA (Tukey HSD, $P < 0,05$).

III.3. Impact de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la bêta-diversité des communautés de CMA natifs en plantation à Amally

III.3.1. Composition taxonomique des communautés de CMA

Le jeu de données final a été composé de 172556 séquences d'une longueur moyenne de 274 pb. Pour une comparaison fiable entre les échantillons, une normalisation du nombre de séquences par échantillon a été effectuée (2350 séquences/échantillon), ce qui a conduit à un sous-échantillonnage de 70500 séquences d'une longueur moyenne de 223 pb. Les 70500 séquences obtenues après sous-échantillonnage ont été regroupées dans 427 OTU sur l'ensemble des échantillons de racines traités. Au niveau taxonomique, l'analyse des données a montré que les communautés de CMA associés aux jujubiers appartenaient à 4 ordres : Glomérales (77,30%), Paraglomérales (3,54%), Diversisporales (13,12%) et Archaeosporales (6,02%). Huit familles de Gloméromycètes ont été détectées dans les racines des jujubiers en plantation. La majorité des OTU appartenaient à la famille des *Glomeraceae* (93,11%) suivie de *Diversisporaceae* (3,49%), *Paraglomeraceae* (2,76%), *Acaulosporaceae* (0,08%), *Claroideoglomeraceae* (0,01%), *Gigasporaceae* (0,01%), *Pacisporaceae* (<0,01%) et *Geosiphonaceae* (<0,01%). Les affiliations taxonomiques ont révélé 16 genres avec une dominance de *Rhizophagus* (25%) suivi de *Glomus* (19%), *Incertea_sedis* (17%), *Redeckera* (14%), *Sclerocystis* (8%), *Septoglomus* (5%), *Paraglomus* (4%). Environ 56% des genres de CMA ont été affiliés à moins de 8% des OTU.

III.3.2. Structure des communautés de CMA

Les résultats de la PERMANOVA ont montré que seul le facteur inoculation a eu un effet significatif ($F=2,087$, $P<0,05$) sur la structure des communautés de CMA associés aux jujubiers en plantation (Tableau 22). L'interaction entre les trois facteurs (provenance, inoculation et fertilisation) a également eu un effet significatif ($F=2,399$, $P<0,05$) sur la structure. L'abondance relative des communautés de CMA est représentée sur les figures 28 et 29. Les jujubiers (inoculés, fertilisés et témoins) ont été généralement colonisés par les mêmes familles de CMA à des proportions relativement égales à l'exception des *Claroideoglomeraceae* (1%) qui ont été uniquement présentes dans le traitement Tasset+PN et des *Pacisporaceae* (2%) uniquement présentes dans le traitement Gola+Ri+PN (Figure 28). En effet, les *Glomeraceae* ont révélé les abondances les plus élevées (71 à 79%) suivies des *Diversisporaceae* (11 à 16%), des *Paraglomeraceae* (3 à 5%) et des *Gigasporaceae* (2 à 5%).

Quelle que soit la provenance de jujubiers, le genre *Rhizophagus* a été le plus abondant (21 à 28%) suivi de *Glomus* (17 à 23%), *Incertae_sedis* (13 à 20%), *Redeckera* (11 à 16%) et *Sclerocystis* (6 à 13%) (Figure 29). Les abondances relatives des OTU entre les inoculés et fertilisés et les non inoculés ont été généralement les mêmes. Toutefois, au niveau de la provenance Tasset, *Rhizophagus* a été très plus abondant chez les jujubiers inoculés (27%) comparés aux témoins non inoculés (21%).

Tableau 22. Impact des facteurs (provenance, inoculation et fertilisation) et de leur interaction sur la structure des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation à Amally.

| Facteurs testés | <i>df</i> | SS | <i>F</i> model | <i>R</i> ² | <i>P</i> |
|--|-----------|-------|----------------|-----------------------|----------|
| Provenance | 1 | 0,349 | 1,496 | 0,046 | 0,155 |
| Inoculation | 1 | 0,487 | 2,087 | 0,065 | 0,032* |
| Fertilisation | 1 | 0,218 | 0,935 | 0,029 | 0,505 |
| Provenance × Inoculation | 1 | 0,173 | 0,743 | 0,023 | 0,664 |
| Provenance × Fertilisation | 1 | 0,373 | 1,604 | 0,051 | 0,133 |
| Inoculation × Fertilisation | 1 | 0,178 | 0,762 | 0,023 | 0,648 |
| Provenance × Inoculation × Fertilisation | 1 | 0,560 | 2,399 | 0,074 | 0,023* |
| Résidus | 22 | 5,139 | | 0,686 | |
| Total | 29 | 7,481 | | 1 | |

Test PERMANOVA basé sur la distance de Bray-Curtis (**P* < 0,05). *df*= degré de liberté ; SS= somme des carrés ; *F* model= *F* statistique; *R*²= coefficient de détermination.

Abondance relative %

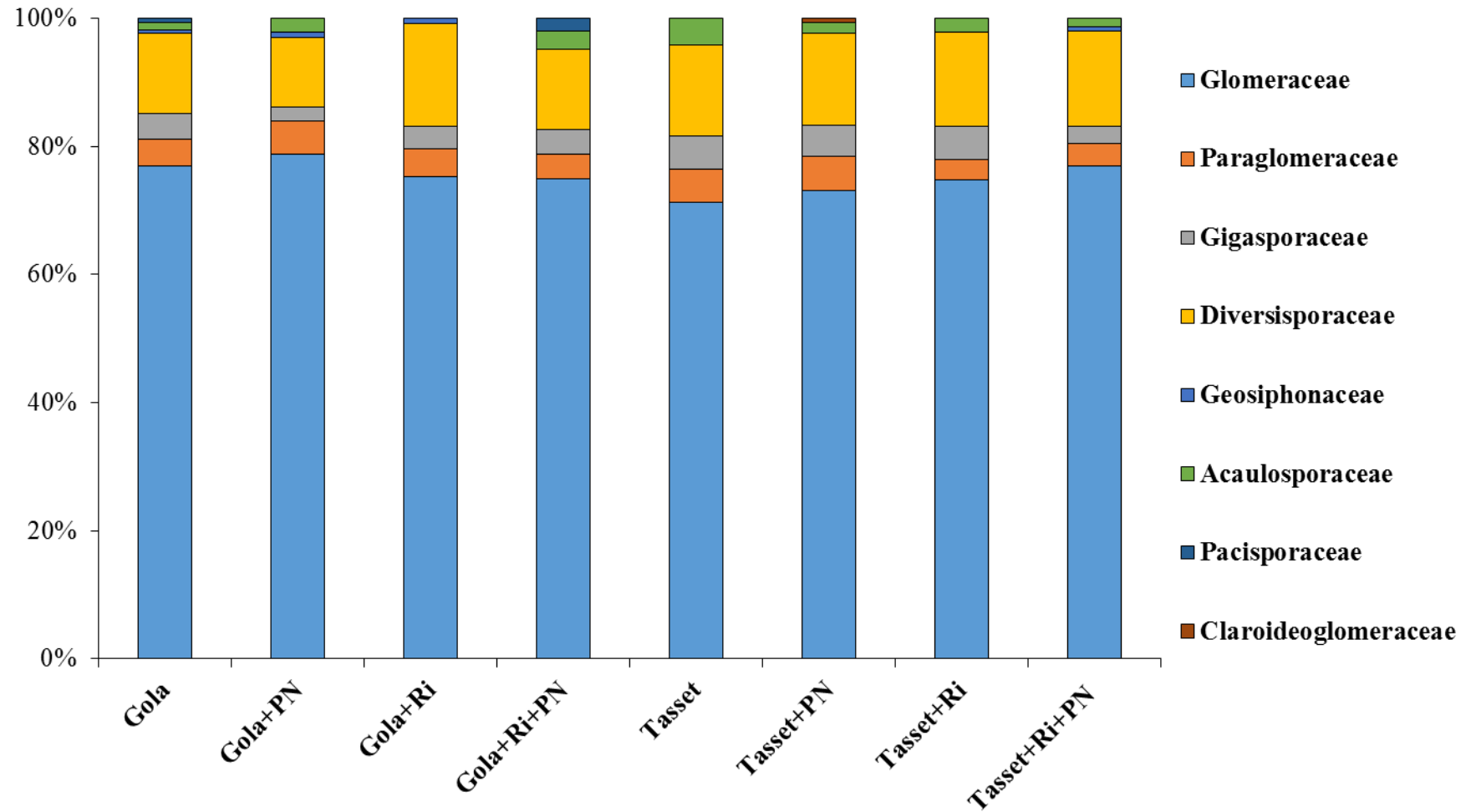


Figure 28. Abondance relative des familles de CMA détectées dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation à Amally.

Abondance relative %

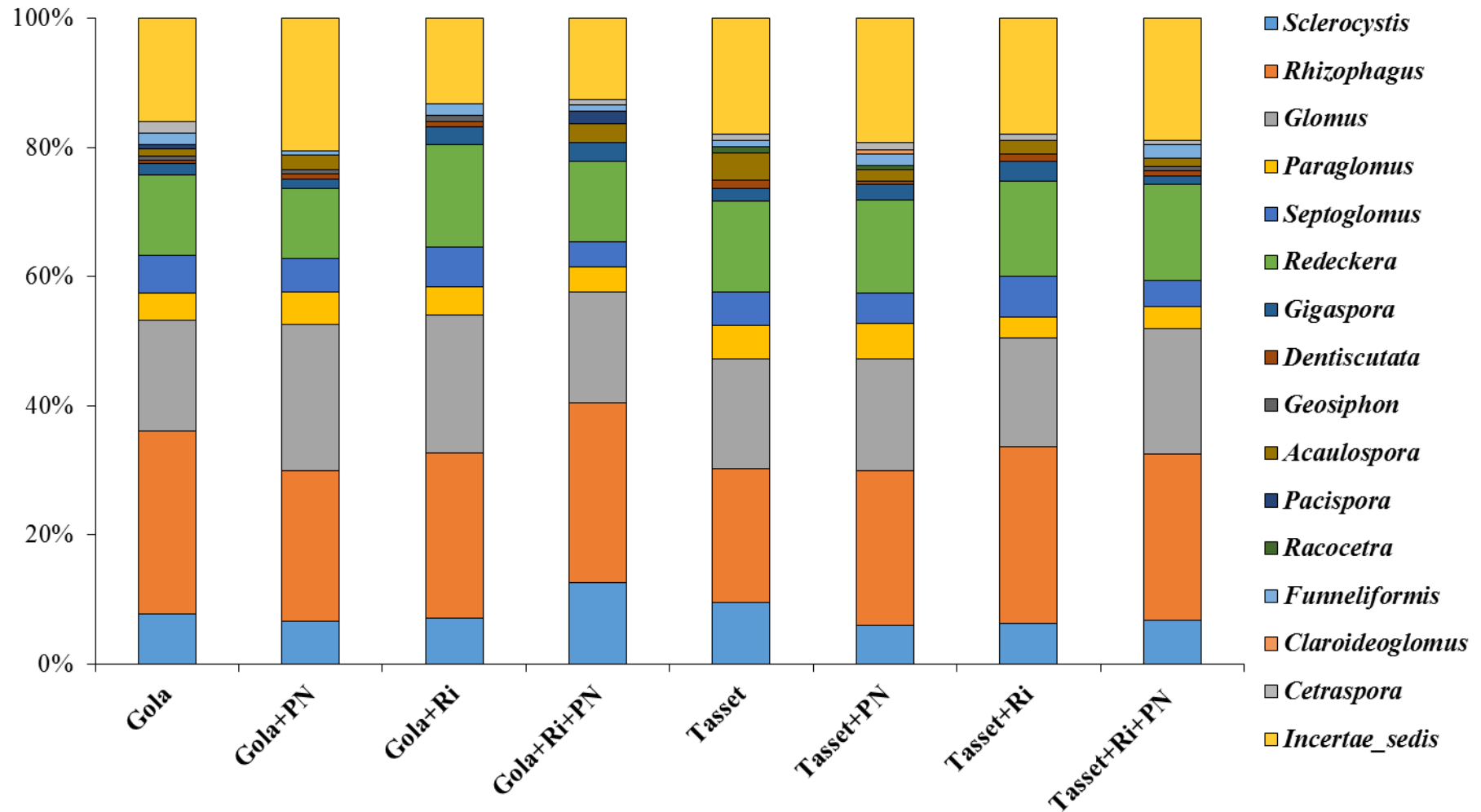


Figure 29. Abondance relative des genres de CMA détectés dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation à Amally.

III.3.3. OTU indicatrices de la provenance, de l'inoculation et de la fertilisation

L'analyse des espèces indicatrices a identifié 14 OTU indicatrices de CMA et a montré une différence en termes d'abondance relative entre les trois facteurs étudiés (Tableau 23). De toutes les OTU indicatrices retrouvées, la famille des *Glomeraceae* a enregistré le plus grand nombre (9 OTU indicatrices). Parmi les 14 OTU identifiées, 5 OTU (1 de *Glomus*, 2 d'*Incertae_sedis*, 1 de *Redeckera* et 1 d'*Acaulospora*) ont été indicatrices de la provenance Tasset alors que seule 1 OTU (*Rhizophagus*) a été indicatrice de la provenance Gola. Chez les traitements inoculés, seule 1 OTU (*Rhizophagus*) a été indicatrice alors que les traitements non inoculés ont enregistré 6 OTU indicatrices (1 de *Glomus*, 1 de *Rhizophagus*, 1 de *Septoglomus*, 1 d'*Acaulospora* et 2 de *Paraglomus*). La même OTU indicatrice chez les traitements non inoculés (*Septoglomus*) a été observée chez les traitements non fertilisés alors qu'aucune OTU n'a été indicatrice des traitements fertilisés.

Tableau 23. OTU indicatrices des facteurs provenance, inoculation et fertilisation au niveau des plantations à Amally.

| Affiliation taxonomique ¹ | Provenance | | Inoculation | | | | Fertilisation | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|----------------------|-------------|---------|---------|----------|---------------|---------|-----------|---------|---------------|---------|
| | Tasset | | Gola | | Inoculé | | Non-inoculé | | Fertilisé | | Non-fertilisé | |
| | phi ² | P-value ³ | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value |
| Glomeraceae (8) | | | | | | | | | | | | |
| <i>Glomus</i> | 0,282 | 0,025* | | | | | | | | | | |
| <i>Glomus</i> | | | | | | | 0,417 | 0,004** | | | | |
| <i>Incertae sedis</i> | 0,348 | 0,032* | | | | | | | | | | |
| <i>Incertae sedis</i> | 0,276 | 0,002** | | | | | | | | | | |
| <i>Rhizophagus</i> | | | 0,427 | 0,019* | | | | | | | | |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | 0,474 | 0,001*** | | | | | | |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | | | 0,417 | 0,012* | | | | |
| <i>Septoglomus</i> | | | | | | | 0,339 | 0,027* | | | 0,380 | 0,008** |
| Diversisporaceae (1) | | | | | | | | | | | | |
| <i>Redeckera</i> | 0,307 | 0,005** | | | | | | | | | | |
| Acaulosporaceae (2) | | | | | | | | | | | | |
| <i>Acaulospora</i> | 0,447 | 0,035* | | | | | | | | | | |
| <i>Acaulospora</i> | | | | | | | 0,324 | 0,011* | | | | |
| Paraglomeraceae (2) | | | | | | | | | | | | |
| <i>Paraglomus</i> | | | | | | | 0,420 | 0,004** | | | | |

Tableau 3. (suite)

| Affiliation taxonomique ¹ | Provenance | | Inoculation | | | | Fertilisation | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|----------------------|-------------|---------|----------------|---------|--------------------|---------|------------------|---------|----------------------|---------|
| | Tasset | | Gola | | Inoculé | | Non-inoculé | | Fertilisé | | Non-fertilisé | |
| | phi ² | P-value ³ | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value |
| <i>Paraglomus</i> | | | | | | | 0,238 | 0,036* | | | | |

¹L'affiliation taxonomique est basée sur le consensus le plus proche et sur la méthode Wang utilisée dans Mothur (fonction Classify.seqs). Les séquences de référence de CMA dans Krüger *et al.* (2012) ont été utilisées. Le nombre total d'OTU indicatrices de chaque famille de CMA est indiqué entre-parenthèses. ²Les OTU indicatrices ont été obtenues par le coefficient d'association de Pearson (phi) (Tichy & Chytrý, 2006) en utilisant la fonction *multipatt* du package *indicspecies* du logiciel R (De Caceres *et al.*, 2010). L'effet de chaque facteur a été analysé séparément.

³Niveau de significativité: '***' $P < 0,001$; '**' $P < 0,01$; '*' $P < 0,05$.

III.4. Impact de l'inoculation sur la diversité alpha des communautés de CMA natifs en plantation à Keur Mangari

Les résultats de l'ANOVA sur l'impact de l'inoculation sur la diversité- α de la communauté de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation à Keur Mangari sont représentés dans le tableau 24. Les facteurs inoculation et provenance et leur interaction n'ont pas eu un effet significatif sur la richesse et la diversité des communautés de CMA. En effet, le nombre d'OTU, l'indice de Chao1, de Shannon et d'Invsimpson n'ont pas varié avec l'inoculation quelle que soit la provenance.

Tableau 24. Impact de l'inoculation sur la diversité- α des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation à Keur Mangari.

| Traitements | Nombre d'OTU (Richesse) | Chao1 (Richesse) | Shannon (Diversité) | Invsimpson (Diversité) |
|--------------------------|----------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------|
| Gola | 178 ± 15 a | 255 ± 28 a | 1,9 ± 0,3 a | 4,2 ± 1,2 a |
| Gola + Ri | 153 ± 17 a | 235 ± 19 a | 1,7 ± 0,4 a | 4,5 ± 1,3 a |
| Tasset | 160 ± 16 a | 224 ± 26 a | 1,9 ± 0,4 a | 4,5 ± 1,9 a |
| Tasset + Ri | 168 ± 12 a | 229 ± 24 a | 1,9 ± 0,2 a | 4,4 ± 1,6 a |
| Facteurs testés | | | | |
| Provenance | NS | NS | NS | NS |
| Inoculation | NS | NS | NS | NS |
| Provenance × Inoculation | NS | NS | NS | NS |

ANOVA selon le test de Tukey HSD; NS: non significatif.

III.5. Impact de l'inoculation sur la bêta-diversité des communautés de CMA natifs en plantation à Keur Mangari

III.5.1. Composition taxonomique des communautés de CMA

Le jeu de données final a été composé de 939198 séquences d'une longueur moyenne de 200 pb. Une normalisation du nombre de séquences par échantillon a été effectuée (38806 séquences/échantillon), ce qui a conduit à un sous-échantillonnage de 543284 séquences d'une longueur moyenne de 200 pb. Les 543284 séquences obtenues après sous-échantillonnage ont été regroupées dans 994 OTU sur l'ensemble des échantillons de racines traités. L'analyse des données a montré qu'au niveau taxonomique, les communautés de CMA associés aux jujubiers en plantation à Keur Mangari appartenaient à 4 ordres : Glomérales (87%), Paraglomérales (2%), Diversisporales (10%) et Archaeosporales (1%). Neuf familles de Glomérromycètes ont été détectées dans les racines des jujubiers en plantation. La famille des *Glomeraceae* a été majoritaire (88%) suivie des *Diversisporaceae* (5%), *Gigasporaceae* (3%), *Paraglomeraceae* (2%), *Acaulosporaceae* (1%), *Archaeosporaceae* (<1%), *Claroideoglomeraceae* (<1%), *Geosiphonaceae* (<0,01%) et *Ambisporaceae* (<1%). Les affiliations taxonomiques ont révélé 19 genres avec une prédominance de *Rhizophagus* (58%) suivi de *Glomus* (17%), *Sclerocystis* (11%), *Redeckera* (5%), *Gigaspora* (2%), *Paraglomus* (2%). Environ 75% des genres de CMA ont été affiliés à moins de 4% des OTU.

III.5.2. Structure des communautés de CMA

Les résultats de la PERMANOVA ont montré que les deux facteurs étudiés (inoculation et jujubier) et leur interaction n'ont pas eu un effet significatif sur la structure des communautés de CMA associés aux jujubiers en plantation (Tableau 25). L'abondance relative des communautés de CMA est représentée sur les figures 30 et 31. Dans les plantations à Keur Mangari, les jujubiers (inoculés et témoins) ont été quasiment colonisés par les mêmes familles de CMA à des proportions relativement égales. Les *Claroideoglomeraceae* et les *Geosiphonaceae* ont été présentes chez tous les traitements sauf Gola inoculé. Quel que soit le traitement, les *Glomeraceae* ont été largement majoritaires avec les abondances les plus élevées (85 à 91%) suivies des *Diversisporaceae* (4 à 6%), *Gigasporaceae* (2 à 5%) et *Paraglomeraceae* (1 à 2%) (Figure 30). L'abondance relative de *Rhizophagus*, le plus abondant dans les traitements de jujubiers, a diminué avec l'inoculation particulièrement chez Gola (Figure 31). Par contre, l'abondance relative de *Glomus* et de

Sclerocystis a augmenté avec l'inoculation chez Gola. *Rhizophagus*, *Glomus*, *Sclerocystis*, *Gigaspora*, *Redeckera* et *Paraglomus* ont été présents dans tous les traitements de jujubiers. *Claroideoglomus*, *Racocetra* et *Geosiphon* ont été absents uniquement chez Gola non inoculé alors que *Archaeospora* et *Septoglomus* l'ont été que chez Tasset non inoculé. *Diversispora* a été seulement présent dans les traitements Gola inoculés et témoins avec une abondance relative très faible (1%).

Tableau 25. Impact des facteurs (provenance et inoculation) et de leur interaction sur la structure des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation à Keur Mangari.

| Facteurs testés | <i>df</i> | SS | <i>F</i> model | <i>R</i> ² | <i>P</i> value |
|--------------------------|-----------|-------|----------------|-----------------------|----------------|
| Provenance | 1 | 0,244 | 1,077 | 0,078 | 0,395 NS |
| Inoculation | 1 | 0,296 | 1,306 | 0,095 | 0,213 NS |
| Provenance × Inoculation | 1 | 0,296 | 1,306 | 0,095 | 0,223 NS |
| Residuals | 10 | 2,266 | | 0,730 | |
| Total | 13 | 3,102 | | 1,000 | |

Test PERMANOVA basé sur la distance de Bray-Curtis. NS: non significatif ($P > 0,05$). *df*= degré de liberté ; SS= somme des carrés ; *F* model= *F* statistique; *R*²= coefficient de détermination.

Abondance relative %

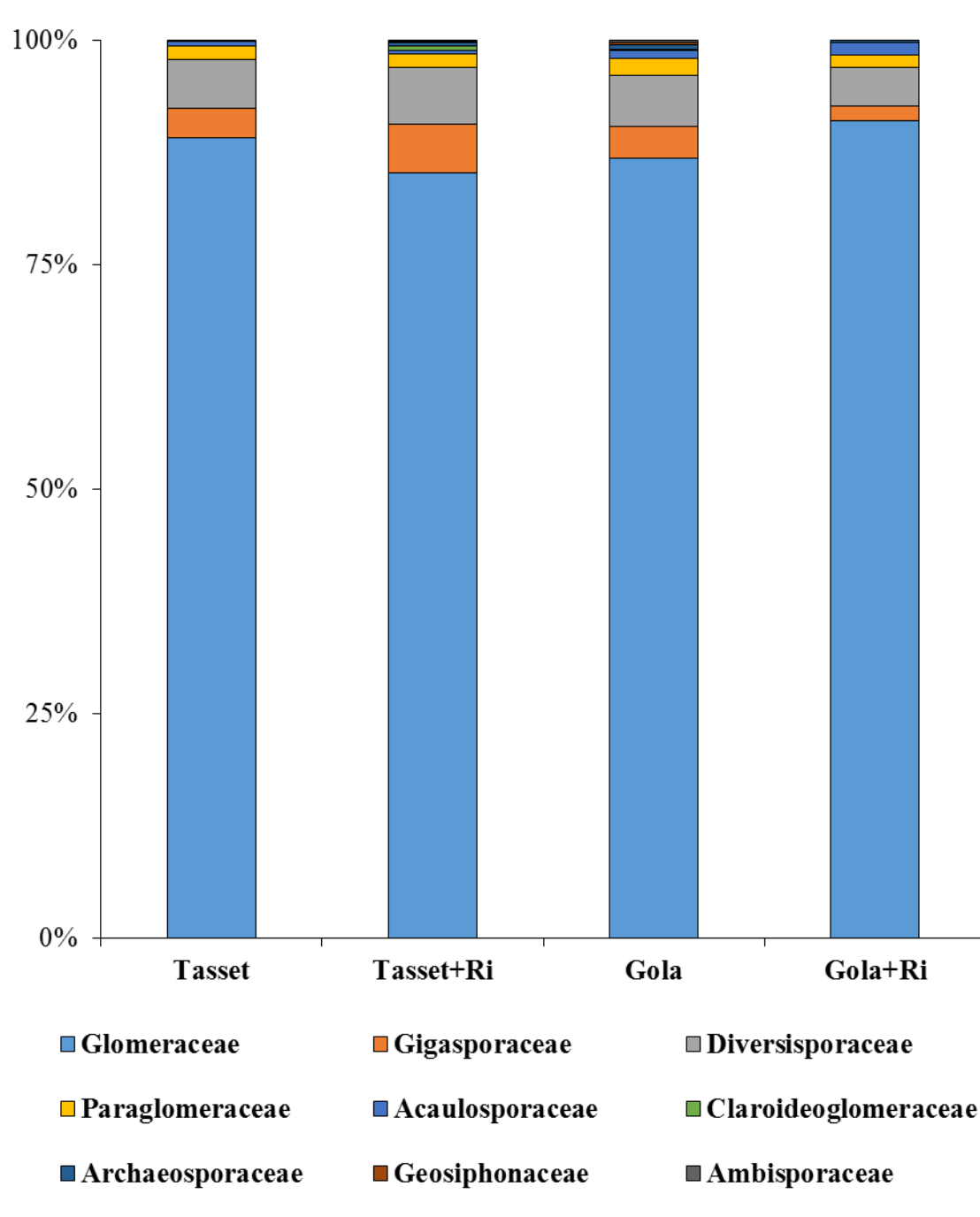


Figure 30. Abondance relative des familles de CMA détectées dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation à Keur Mangari.

Abondance relative %

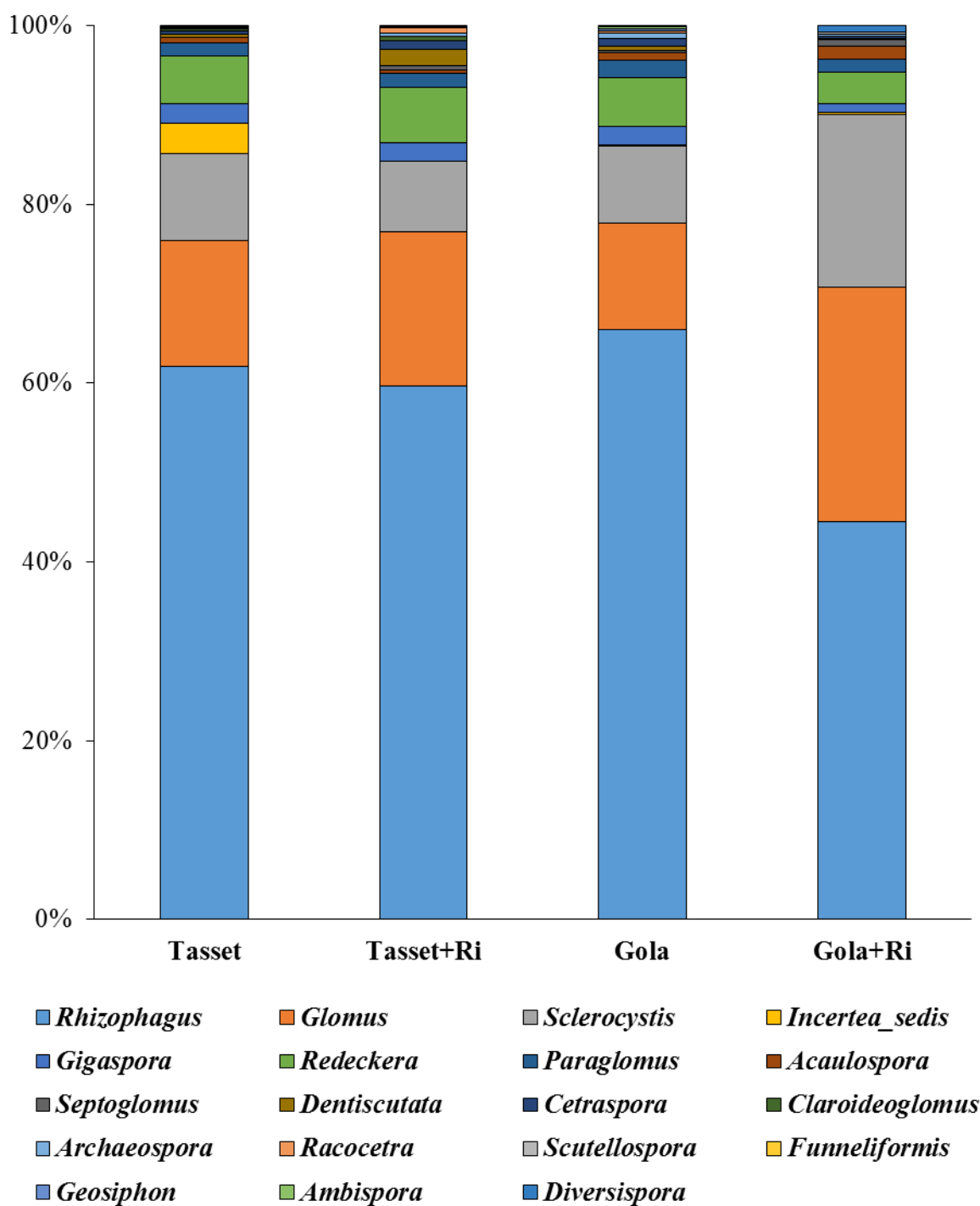


Figure 31. Abondance relative des genres de CMA détectés dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation à Keur Mangari.

III.5.3. OTU indicatrices de la provenance et de l'inoculation à Keur Mangari

Au niveau des plantations de Keur Mangari, l'analyse des espèces indicatrices a identifié 23 OTU indicatrices de CMA (Tableau 26). Sur les 23 OTU, 21 ont été indicatrices de la famille des *Glomeraceae*, 1 de *Paraglomeraceae* et 1 de *Diversisporaceae*. Une seule OTU (*Paraglomus*) a été indicatrice de la provenance Tasset alors que 10 OTU ont été indicatrices de Gola (3 de *Glomus*, 2 d'*Incertae_sedis*, 3 de *Rhizophagus* et 2 de *Sclerocystis*). Aucune OTU n'a été indicatrice des traitements inoculés alors que 12 OTU (2 de *Glomus*, 8 de *Rhizophagus*, 1 de *Sclerocystis* et 1 de *Redeckera*) ont été indicatrices des traitements non inoculés.

Tableau 26. OTU indicatrices des facteurs provenance et inoculation au niveau des plantations de Keur Mangari.

| Affiliation taxonomique ¹ | Provenance | | | | Inoculation | | | |
|---|------------------|----------------------|-------|----------|-------------|---------|-------------|---------|
| | Tasset | | Gola | | Inoculé | | Non-inoculé | |
| | phi ² | P-value ³ | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value |
| Glomeraceae (21) | | | | | | | | |
| <i>Incertae_sedis</i> | | | 0,830 | 0,001*** | | | | |
| <i>Incertae_sedis</i> | | | 0,733 | 0,001*** | | | | |
| <i>Incertae_sedis</i> | | | 0,626 | 0,019* | | | | |
| <i>Glomus</i> | | | 0,603 | 0,015* | | | | |
| <i>Glomus</i> | | | 0,494 | 0,028* | | | | |
| <i>Glomus</i> | | | | | | | 0,568 | 0,021* |
| <i>Glomus</i> | | | | | | | 0,280 | 0,020* |
| <i>Rhizophagus</i> | | | 0,574 | 0,033* | | | | |
| <i>Rhizophagus</i> | | | 0,505 | 0,021* | | | | |
| <i>Rhizophagus</i> | | | 0,486 | 0,050* | | | | |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | | | 0,593 | 0,028* |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | | | 0,583 | 0,034* |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | | | 0,567 | 0,034* |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | | | 0,498 | 0,044* |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | | | 0,472 | 0,047* |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | | | 0,277 | 0,027* |

Tableau 6. (suite)

| Affiliation taxonomique ¹ | Provenance | | Inoculation | | | | | |
|--------------------------------------|------------------|----------------------|-------------|---------|---------|---------|-------------|---------|
| | Tasset | | Gola | | Inoculé | | Non-inoculé | |
| | phi ² | P-value ³ | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | | | 0,264 | 0,044* |
| <i>Rhizophagus</i> | | | | | | | 0,263 | 0,040* |
| <i>Sclerocystis</i> | | | 0,619 | 0,018* | | | | |
| <i>Sclerocystis</i> | | | 0,296 | 0,012* | | | | |
| <i>Sclerocystis</i> | | | | | | | 0,574 | 0,034* |
| Paraglomeraceae (1) | | | | | | | | |
| <i>Paraglomus</i> | 0,338 | 0,035* | | | | | | |
| Diversisporaceae (1) | | | | | | | | |
| <i>Redeckera</i> | | | | | | | 0,502 | 0,019* |

¹L'affiliation taxonomique est basée sur le consensus le plus proche et sur la méthode Wang utilisée dans Mothur (fonction Classify.seqs). Les séquences de référence de CMA dans Krüger *et al.* (2012) ont été utilisées. Le nombre total d'OTU indicatrices de chaque famille de CMA est indiqué entre-parenthèses. ²Les OTU indicatrices ont été obtenues par le coefficient d'association de Pearson (phi) (Tichy & Chytrý, 2006) en utilisant la fonction *multipatt* du package *indicspecies* du logiciel R (De Cáceres *et al.*, 2010). L'effet de chaque facteur a été analysé séparément.

³Niveau de significativité: '***' $P < 0,001$; '**' $P < 0,01$; '*' $P < 0,05$.

IV. Discussion

Dans cette étude, nous avons évalué l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* sur la diversité des communautés de CMA natifs associés à *Z. mauritiana* dans des vergers où la teneur en P disponible dans le sol variait de 6,37 ppm (Amally) à 26,93 ppm (Keur Mangari). Dans les plantations du jardin polyvalent d'Amally, nos résultats ont révélé un impact significatif de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la diversité des communautés de CMA. En effet, l'inoculation et la fertilisation phosphatée ont significativement diminué la richesse et la diversité des communautés de CMA natifs particulièrement chez la provenance Tasset. Cette observation peut s'expliquer par la pré-colonisation des jujubiers inoculés par *R. irregularis* induisant une faible colonisation par les espèces natives de CMA en plantation. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux qui ont révélé une influence du type d'utilisation des terres sur la diversité des CMA, à partir de l'analyse des spores (Oehl *et al.*, 2003) ou de l'analyse de données moléculaires (Helgason *et al.*, 1998). La plupart de ces études ont montré une diminution de la diversité des CMA dans leur habitat naturel. Or, il est bien connu que la richesse des espèces de CMA contribue grandement au maintien de la diversité des espèces végétales et du fonctionnement des écosystèmes (van der Heijden *et al.*, 1998). Dans les jujubiers inoculés, nous avons constaté une diminution significative de la richesse des CMA exprimée par le nombre d'OTU et l'indice de Chao1. Ce résultat n'est pas surprenant car il a été démontré que les pratiques agricoles ont une incidence négative sur la richesse des CMA (Schnoor *et al.*, 2011). Donc, si une diminution de la diversité des CMA est susceptible d'être considérée comme un impact environnemental négatif, nous ne comprenons toujours pas quels aspects de la diversité des CMA (richesse, équitabilité) favorisent la croissance des plantes. Cependant, des travaux ont montré que la diversité des CMA peut être augmentée par certaines pratiques culturales (Oehl *et al.*, 2003 ; Jansa *et al.*, 2006).

Dans les plantations de jujubiers à Keur Mangari, nos résultats ont montré que l'inoculation n'a pas eu un effet significatif sur la diversité des communautés de CMA. En effet, la richesse et la diversité observées chez les jujubiers inoculés étaient similaires à celles des jujubiers non inoculés. Ces résultats suggèrent que l'inoculation avec *R. irregularis* peut conserver la diversité des CMA natifs en plantation à Keur Mangari. Dans la littérature, on sait encore très peu de chose sur l'impact potentiel de l'inoculation avec un CMA exotique sur les communautés indigènes de CMA dans les sols agricoles. Contrairement à nos observations,

Douds *et al.* (2011) et Mummey *et al.* (2009) ont montré que l'inoculation mycorhizienne modifiait les communautés naturelles de CMA.

L'ajout du phosphate naturel dans le système de culture à Amally apparaît comme un facteur homogénéisant de la richesse des CMA. Ce phénomène pourrait s'expliquer, dans le cas de la nutrition phosphatée de la plante, par une pression de sélection moindre sur les CMA performants lors d'apport supplémentaire de phosphate naturel. En effet, on peut supposer que dans ce cas la compétition pour les ressources nutritives est diminuée et que la coexistence de différents groupes de CMA, présentant potentiellement des efficacités symbiotiques variables, est facilitée. D'autres études ont considéré la fertilisation comme un facteur majeur pouvant influencer les communautés de CMA (Sieverding, 1990 ; Wang *et al.*, 2011). En outre, une étude récente utilisant le pyroséquençage comme technologie de séquençage massif, a montré une influence de la fertilisation azotée sur les communautés de CMA au champ (Lin *et al.*, 2012). Ces auteurs ont montré que la fertilisation phosphatée à long terme additionnée à une fertilisation azotée diminuait la richesse et la diversité des communautés de CMA. Il a été établi que la seule variable chimique étroitement liée à la richesse et à la diversité des communautés de CMA est la teneur en P disponible dans le sol (Lin *et al.*, 2012). Par conséquent, l'absorption en P par la fertilisation pourrait réduire la symbiose mycorhizienne en augmentant ainsi la compétition pour le P des espèces de CMA, ce qui conduit potentiellement à une plus faible richesse. En effet, la compétition peut être suffisamment forte pour exclure certaines espèces de CMA des racines de la plante hôte (Hepper *et al.*, 1988).

Le séquençage Illumina MiSeq de l'ADN des CMA à partir des racines de jujubiers en plantation nous a permis de détecter au total 16 genres répartis en 8 familles à Amally et 19 genres répartis en 9 familles à Keur Mangari. Ces résultats montrent qu'il existe une grande diversité de CMA associés au jujubier et confirment la possibilité d'amplifier plusieurs groupes de CMA avec les amorces NS31-AML2 (Lee *et al.*, 2008). Des travaux ont montré que parmi 6 paires d'amorces spécifiques aux Glomérormycètes testées, seul le couple NS31/AML2 correspondait parfaitement à toutes les séquences de Glomérormycètes en montrant le plus grand nombre de lectures en termes de spécificité et de taux de couverture (van Geel *et al.*, 2014). Le couple NS31-AML2 est clairement capable d'amplifier les Ambisporaceae et les Gigasporaceae (van Geel *et al.*, 2014), même si elles ne forment pas une plus grande partie des communautés dans notre étude. Sur ce point, la comparaison des résultats entre différentes études est difficile, car on utilise différents gènes cibles (ou régions

de ceux-ci) et des combinaisons d'amorces, avec des spécificités et des efficacités potentiellement différentes.

La famille des *Glomeraceae* a été la plus abondante dans les racines de jujubiers (93% à Amally et 88% à Keur Mangari). Au Sénégal, plusieurs études ont montré la prédominance des *Glomeraceae* dans les écosystèmes (Manga *et al.*, 2007 ; Sène *et al.*, 2012; Ndoye *et al.*, 2012). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que les *Glomeraceae* ont une aptitude à développer très vite un réseau d'hyphes ou à sporuler rapidement. Les *Glomeraceae* peuvent former rapidement des anastomoses entre les différentes branches mycéliennes du même génotype ou de génotype voisin. Cela confère à ses espèces la capacité à rétablir un réseau interconnecté après une rupture mécanique des hyphes (Voets *et al.*, 2006 ; de la Providencia *et al.*, 2005). Plusieurs études réalisées à partir des spores de CMA du sol ont montré la prédominance des espèces du genre *Glomus* dans la plupart des écosystèmes, au Sénégal (Manga *et al.*, 2007 ; Sène *et al.*, 2012 ; Ndoye *et al.*, 2012), en Chine (Zhao & Zhao, 2007 ; Wang *et al.*, 2008) au Burkina Faso (Bâ *et al.*, 1996) et en Europe Centrale (Oehl *et al.*, 2003). Or nos résultats ont clairement montré que le genre *Rhizophagus* était le plus abondant dans les racines de jujubiers en plantations (25% à Amally et 58% à Keur Mangari). Ceci marque une forte abondance de ce genre dans les racines de jujubier et concorde avec la préférence de ce taxon pour les milieux arides et semi-arides. Grâce au séquençage Illumina MiSeq, notre étude a permis de détecter plusieurs taxons rares de CMA comme *Racocetra*, *Cetraspora*, *Geosiphon*, *Dentiscutata* *Pacispora*, *Incertae_sedis* et *Archaeospora* dans la zone aride (Amally) et semi-aride (Keur Mangari) du Sénégal. Nos résultats soulignent que ces zones sont parmi les écosystèmes qui peuvent encore abriter un grand nombre de CMA non décrits (Öpik *et al.*, 2013).

Aucun impact de l'inoculation sur la structure des communautés de CMA natifs n'a été observé à Keur Mangari alors que dans le site d'Amally seul l'inoculation impacte la structure des communautés. Ce résultat pourrait s'expliquer par les conditions environnementales contrastées entre les deux sites. Les jujubiers inoculés et fertilisés comparés aux témoins ont montré quasiment la même composition de CMA dans les racines à Amally. De même les jujubiers inoculés et les témoins des plantations de Keur Mangari ont été quasiment colonisés par les mêmes familles de CMA à des proportions relativement similaires. Ces résultats montrent que la souche inoculée, *R. irregularis* IR27 ne modifie pas la composition des communautés de CMA. Par ailleurs, on sait peu de choses sur l'écologie du genre *Claroideoglossum* qui a été récemment séparé de la famille des *Glomeraceae* (Schüßler &

Walker, 2010) et qui n'a été trouvé que chez les jujubiers fertilisés de la provenance Tasset à Amally. L'unique présence des *Claroideoglomeraceae* chez Tasset fertilisé et des *Pacisporaceae* dans chez Gola inoculé et fertilisé à Amally pourrait s'expliquer par le fait que ces deux familles contiennent des taxons relativement rares car leurs abondances relatives étaient très faibles (1%). Par contre à Keur Mangari, *Claroideoglomeraceae* et *Geosiphonaceae* ont été présentes chez tous les traitements sauf Gola inoculé mais avec une abondance relative négligeable (1%) qui traduit également les taxons rares. Des études ont montré qu'une modification de la communauté mycorhizienne affecterait la réponse de la plante, car l'identité des champignons qui colonisent une racine végétale est importante et que les CMA varient dans leur capacité à fournir des éléments nutritifs aux espèces végétales (Ravnskov & Jakobsen 1995 ; Smith *et al.*, 2000). Les expériences dans lesquelles les CMA sont appliqués aux champs agricoles concernent à la fois l'abondance et la composition des CMA, ce qui rend souvent difficile de discerner indépendamment leurs effets. Un des phénomènes qui peuvent affecter fortement la composition des communautés de CMA c'est les effets prioritaires (Verbruggen *et al.*, 2013) c'est-à-dire le processus par lequel les espèces initialement présentes dans une communauté détermine la composition éventuelle de la communauté. Nos résultats sont contradictoires avec ceux de Mummey *et al.* (2009) qui ont constaté que lorsque des plantes déjà colonisées par un CMA particulier ont été introduites dans une communauté native de CMA, la diversité et la composition éventuelles de la communauté résultante seraient largement modifiées par rapport aux plantes non inoculées.

Très peu d'articles ont utilisé des modèles statistiques rigoureux pour identifier les espèces indicatrices comme nous l'avons fait dans cette étude. L'analyse des espèces indicatrices au niveau des plantations de jujubier a montré que les *Glomeraceae* enregistraient le plus grand nombre d'OTU indicatrices quel que soit le site. Ces résultats renforcent la prédominance des *Glomeraceae* dans les racines de jujubiers. Aucune OTU n'a été indicatrice des traitements inoculés à Keur Mangari alors qu'à Amally, seule 1 OTU (*Rhizophagus*) a été indicatrice des traitements inoculés. Ces observations suggèrent que l'inoculation favorise le maintien des communautés de CMA à Keur Mangari alors qu'elle impacte la diversité et la structure à Amally. Certaines OTU étaient préférentiellement associées à Tasset (5 OTU à Amally et 1 OTU à Keur Mangari), tandis que d'autres étaient préférentiellement associées à Gola (1 OTU à Amally et 10 OTU à Keur Mangari). Ces résultats peuvent être liés à la provenance du jujubier ou à des caractères génétiques de la plante.

V. Conclusion

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* sur la diversité des communautés de CMA natifs associés à *Z. mauritiana* en plantation. L'utilisation du séquençage Illumina MiSeq a permis de révéler une large gamme de CMA associés aux jujubiers en plantation. Dans les deux sites, la famille des *Glomeraceae* a été la plus abondante particulièrement le genre *Rhizophagus*. L'inoculation diminue la diversité des communautés de CMA natifs à Amally contrairement au site de Keur Mangari où l'inoculation n'a pas eu d'impact sur la diversité des communautés de CMA. Du point de vue de la structure des communautés de CMA, un effet significatif de l'inoculation a été observé sur le site d'Amally contrairement au site de Keur Mangari où l'inoculation n'a pas eu d'impact sur la structure des communautés de CMA.

Cette étude montre ainsi que l'inoculation avec la souche exotique *R. irregularis* IR27 a un impact limité sur les communautés de CMA natifs associés au jujubier, dépendant des conditions environnementales. Cependant, il s'avère important d'évaluer à plus long terme l'impact de la souche *R. irregularis* IR27 et son devenir dans les racines de jujubiers inoculés en plantation avec une large gamme de conditions environnementales.

CHAPITRE V

PERSISTANCE DE *R. IRREGULARIS* IR27 DANS LES RACINES DE *Z.* *MAURITIANA* EN PLANTATION

Cette partie des résultats a fait l'objet :

1) D'un poster au **5th International EcoSummit** :

Babacar Thioye, Dirk Redecker, Diederik van Tuinen, Aboubacry Kane, Dioumacor Fall, Hervé Sanguin, Diaminatou Sanogo, Robin Duponnois, Samba N. Sylla, Amadou Bâ. **Analysis of persistence and effectiveness of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* isolate IR27 inoculated on jujube trees (*Ziziphus mauritiana* Lam.) in the field, using the *RPB1* gene marker and measurement of fruit yield.** 29 August - 1 September 2016, Montpellier, France

2) D'un article en préparation dans ***Frontiers in Microbiology*** :

Thioye B, Redecker D, Sanguin H, van Tuinen D, Kane A, Mahé F, de Faria SM, Fall D, Sanogo D, Ndiaye C, Duponnois R, Sylla SN, Bâ AM. **Analyse of persistence and effectiveness of *Rhizophagus irregularis* IR27 on growth and fruit production of *Ziziphus mauritiana* Lam. and its native mycorrhizal community.**

CHAPITRE V. PERSISTANCE DE *R. IRREGULARIS* IR27 DANS LES RACINES DE *Z. MAURITIANA* EN PLANTATION

I. Introduction

L'inoculation avec les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) est de plus en plus utilisée comme outil de bio-fertilisation pour l'agriculture et l'horticulture dans les agroécosystèmes (Gianinazzi *et al.*, 2010 ; Berruti *et al.*, 2016). Cependant, il a été difficile de prouver l'efficacité de cette technologie en termes de succès au champ, c'est-à-dire la compétitivité des souches exotiques vis-à-vis des CMA indigènes. Dans le passé, le suivi de l'inoculation des CMA et de leur effet ne pouvait être évalué que par des mesures microscopiques au niveau des racines (vésicules, arbuscules, hyphes), dans le sol (propagules, spores, mycélium) et par des analyses biométriques et nutritionnelles des plantes hôtes inoculées (McGonigle, 1988). Ni les différentes espèces de CMA ni les différents isolats de la même espèce ne pouvaient être distingués au microscope à travers les hyphes, les vésicules ou les arbuscules formés dans les racines. Au cours des 15 dernières années, l'avènement des outils moléculaires a permis de faire du traçage hautement spécifique des CMA dans n'importe quel type d'échantillon environnemental (Redecker *et al.*, 2000 ; Krüger *et al.*, 2009) soit par séquençage (Öpik *et al.*, 2009 ; Pellegrino *et al.*, 2012) soit par empreinte génétique moléculaire (Vandenkoornhuysse *et al.*, 2003 ; Gollock *et al.*, 2004) ou une combinaison des deux (Börstler *et al.*, 2010). Il est bien établi que la communauté mycorhizienne indigène est l'un des facteurs biologiques essentiels du sol déterminant le succès de l'inoculation MA (Köhl *et al.*, 2016). Malgré plusieurs études sur l'inoculation avec les CMA, seules quelques, utilisant des outils moléculaires, ont été faites pour montrer si une souche exotique peut coloniser avec succès des plantes hôtes et persister dans le sol malgré la présence de CMA indigènes (Farmer *et al.*, 2007 ; Pellegrino *et al.*, 2012 ; Sýkorová *et al.*, 2012).

Rhizophagus irregularis est devenue l'espèce modèle chez les CMA car elle peut être facilement utilisée en culture in vitro (Bécard & Fortin, 1988) et son genome a été récemment séquencé (Tisserant *et al.*, 2013). Des études ont montré que *R. irregularis* est largement distribué à l'échelle mondiale (Öpik *et al.*, 2006) et s'adapte bien aux sols ayant subis des pratiques agricoles intensives (Bâ *et al.*, 1996 ; Dalpé *et al.*, 2000 ; Oehl *et al.*, 2004). Chez les Gloméromycètes, cette espèce est la seule où des marqueurs moléculaires développés ont permis de faire des analyses de structure de populations dans les racines de plantes colonisées

au champ (Börstler *et al.*, 2008). De récentes études basées sur le développement de marqueurs moléculaires (gène *mtLSU*) ont permis de mettre en évidence une grande diversité intraspécifique chez *R. irregularis*. Le gène *RPBI* codant pour une sous-unité de l'ARN polymérase II a été également proposé pour l'étude de suivi de souche chez les CMA. En effet, ce marqueur a pour avantage de ne pas présenter de polymorphisme au sein des isolats de CMA, facilitant ainsi la distinction d'espèces proches (Redecker & Raab, 2006). Ce n'est très récemment que des mélanges d'amorces *RPBI* spécifiques aux Glomérormycètes permettant d'amplifier tous les CMA testés avec une très haute spécificité ont été développés par Stockinger *et al.* (2014).

Bien qu'un effet positif de l'inoculation avec la souche *R. irregularis* IR27 ait été observé sur la croissance et la production fruitière des jujubiers, deux questions se posent en plantation : quel est le devenir de la souche inoculée dans les racines de jujubiers après plantation? Quelle est l'abondance de la colonisation racinaire de *R. irregularis* IR27 par rapport à la population de *R. irregularis* associés à *Z. mauritiana* en plantation? Afin d'évaluer la persistance *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation, le gène *RPBI* en tant que marqueur moléculaire, couplé à une approche basée sur la quantification en temps réel ou qPCR, ont été utilisés.

II. Matériel et méthodes

II.1. Echantillonnage des racines de *Z. mauritiana* en plantation

Les prélèvements de racines de *Z. mauritiana* ont été effectués après 13 mois de plantation à Amally et 24 mois de plantation à Keur Mangari. Pour chaque traitement en plantation, un échantillon composite (un pool de racines de 3 plants) a été prélevé dans chaque bloc. Soit un total de 32 échantillons prélevés dans les essais de jujubiers à Amally (dispositif expérimental avec 8 traitements et 4 blocs) et 16 échantillons prélevés dans les essais de jujubiers à Keur Mangari (dispositif expérimental avec 4 traitements et 4 blocs). Les échantillons de racines ont été conservés à sec dans du silicagel à température ambiante jusqu'à leur utilisation pour les analyses moléculaires.

II.2. Caractérisation moléculaire de *R. irregularis* IR27

II.2.1. Extraction de spores

La méthode utilisée est basée sur celle du tamisage humide décrite par Gerdemann & Nicolson (1963). Un échantillon de 100 g de l'inoculum de la souche *R. irregularis* IR27 a été mélangé avec 1 L d'eau de robinet dans un bêcher. Ce mélange a été agité pendant 1 minute puis laissé à décanter pendant 30 s. Le surnageant a été filtré sur un jeu de tamis superposés à mailles de diamètre décroissantes (500 µm, 200 µm, 100 µm, 50 µm). Les spores retenues par les tamis de 200 µm et 50 µm ont été récupérées dans de l'eau distillée puis triées manuellement sous une loupe binoculaire. Les spores ont été conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation pour l'extraction d'ADN.

II.2.2. Extraction d'ADN de spores

Environ 7 à 10 spores de *R. irregularis* ont été prélevées avec le moins d'eau possible et mises dans un tube Eppendorf 1,5 ml. Les spores ont été écrasées avec 3 µl de tampon GoTaq Flexi 1X (Promega) à l'aide d'une pointe de cône. Le tube, bien fermé, a été placé dans un bloc chauffant à 95°C pendant 2 min puis rapidement centrifugé avec une centrifugeuse de paillasse. Avec cet extrait d'ADN, 1 µl a été prélevé pour faire la PCR.

II.2.3. Amplification du gène *RPB1* et séquençage

L'amplification par PCR gigogne a été réalisée avec les amorces RPB1-Ac, RPB1-DR1730r, RPB1-DR160FA et RPB1-1210r (Tableau 27). Les amorces choisies ici ont déjà été testées et utilisées par Stockinger *et al.* (2014). La 1^{ère} PCR a été réalisée avec RPB1-Ac et RPB1-DR1730r dans un mélange réactionnel de 20 µl contenant pour chaque échantillon : 12,4 µl H₂O ultrapure stérile ; 4 µl Buffer HF Phusion 5X ; 0,4 µl dNTPs (40 mM) ; 1 µl RPB1-Ac (10 µM) ; 1 µl RPB1-DR1730r (10 µM) ; 0,2 µl Taq Phusion (5U/µl) (Promega) ; 1 µl ADN, suivant le programme ci-dessous :

| | | | | | | | | | | |
|-------------|-------------|---|----|-------------|---|----|-------------|---|-----|------------|
| 30'' à 98°C | 10'' à 98°C | } | 3X | 10'' à 98°C | } | 3X | 10'' à 98°C | } | 16X | 10' à 72°C |
| | 30'' à 63°C | | | 30'' à 61°C | | | 30'' à 58°C | | | ->16°C |
| | 1' à 72°C | | | 1' à 72°C | | | 1' à 72°C | | | |

Les produits de la PCR1 ont été dilués 100 fois et utilisés en guise d'ADN. La 2nd PCR a été réalisée avec RPB1-1210r et RPB1-DR160FA dans un mélange réactionnel de 50 µl contenant pour chaque échantillon : 31 µl H₂O ultrapure stérile ; 10 µl Buffer HF Phusion 5X ; 1 µl dNTPs (40 mM) ; 2,5 µl RPB1-1210r (10 µM) ; 2,5 µl RPB1-DR160FA (10 µM) ; 0,5 µl Taq Phusion (5U/µl) ; 2,5 µl PCR1 suivant le programme ci-dessous :

| | | | | |
|-------------|-------------|---|-----|------------|
| 30'' à 98°C | 10'' à 98°C | } | 35X | 10' à 72°C |
| | 20'' à 60°C | | | ->16°C |
| | 1' à 72°C | | | |

Les produits PCR ont été contrôlés par migration électrophorétique (100 V durant 30 min) sur un gel d'agarose (Sigma) à 1,2 % réalisé dans du tampon TAE 1X [solution stock TAE 50X : 242 g de Tris Base, 57,1 ml Acide Acétique glacial, 100 ml EDTA à 0,5M, pH 8, qsp 1 L]. Le gel a été ensuite coloré dans un bain de bromure d'éthidium pendant 15 min puis décoloré dans un bain de H₂O pendant 15 min. Les amplicons ont été révélés aux UV et photographiés par un appareil Gel Doc 1000 (BIORAD). Les produits d'amplification ont été envoyés pour le séquençage à l'entreprise Genoscreen (France).

Tableau 27. Liste des amorces utilisées.

| Amorce | Sequences (5' – > 3') | Organisme cible | Tm (°C) | Référence |
|--------------|---------------------------------|----------------------------|---------|----------------------------------|
| RPB1-Ac | GARTGYCCDGGDCAYTTYGG | Gloméromycètes | 60,0 | Stockinger <i>et al.</i> (2014) |
| RPB1-DR1730r | CAAATTGTCCGAATTTATACCT | Gloméromycètes | 63,0 | Stockinger <i>et al.</i> (2014) |
| RPB1-1210r | GACCCATCATTGACATTTTRTG | Gloméromycètes | 55,6 | Stockinger <i>et al.</i> (2014) |
| RPB1-DR160FA | CCSAGTATTCAAATGGAYGG | <i>Rhizophagus</i> | 60,0 | Stockinger <i>et al.</i> (2014) |
| LR1 | GCATATCAATAAGCGGAGGA | Eucaryotes | 58,0 | van Tuinen <i>et al.</i> (1998b) |
| NDL22 | TGGTCCGTGTTTCAAGACG | Eucaryotes | 60,0 | van Tuinen <i>et al.</i> (1998b) |
| FLR3 | TTGAAAGGGAAACGATTGAAGT | Gloméromycètes | 58,0 | Gollotte <i>et al.</i> (2004) |
| FLR4 | TACGTCAACATCCTTAACGAA | Gloméromycètes | 54,0 | Gollotte <i>et al.</i> (2004) |
| RPB_GA-F | GCTTTATTACAGGTACTIONTATTCGTCTAC | <i>R. irregularis</i> IR27 | 60,7 | Cette étude |
| RPB_DvT922 | CATCTACTGATATATTCGGATCTCC | Gloméromycètes | 59,7 | Cette étude |
| RPB_826F | GTAAAGAAGGACGTCTTCGTGG | <i>Rhizophagus</i> | 60,3 | Cette étude |

II.2.4. Analyses phylogénétiques de la séquence *RPB1* de *R. irregularis* IR27

Une analyse par Blast a été effectuée pour comparer la séquence *RPB1* de la souche IR27 obtenue aux séquences *RPB1* présentes dans la base de données de NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Un arbre phylogénétique (méthode du Maximum de Parcimonie, programme MEGA5) a été construit à partir de ces séquences pour déterminer le positionnement de la séquence *R. irregularis* IR27 vis-à-vis des séquences de référence.

II.2.5. Construction d'amorce spécifique à *R. irregularis* IR27

Toutes les séquences du gène *RPB1* de *R. irregularis* disponibles dans la base de données de NCBI et la séquence *RPB1* obtenue de la souche IR27 (688 pb) ont été assemblées à l'aide du logiciel Sequencher® 5.4.1. Ce programme d'assemblage de séquences a permis de mettre ensemble des séquences qui avaient au minimum 95% de similarité sur 30 pb. Pour détecter la souche IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation, il était nécessaire de développer un couple d'amorces spécifiques à la souche IR27. Pour ce faire nous avons comparé la séquence *RPB1* de la souche IR27, à celles d'autres *Rhizophagus* (Figure 32) avec le logiciel JalView (Waterhouse *et al.*, 2009). Ainsi un couple d'amorces RPB_GA-F (5'-GCTTTATTACAGGTA CTTATTCGTCTAC-3') et RPB_DvT922 (5'-CATCTACTGATATATTCGGATCTCC-3') donnant un produit d'amplification de 286 pb a été dessiné, et leur spécificité a été testée *in silico* à l'aide du logiciel Amplify4 v1.0 (<http://engels.genetics.wisc.edu/amplify/>, © Bill Engels, 2015).

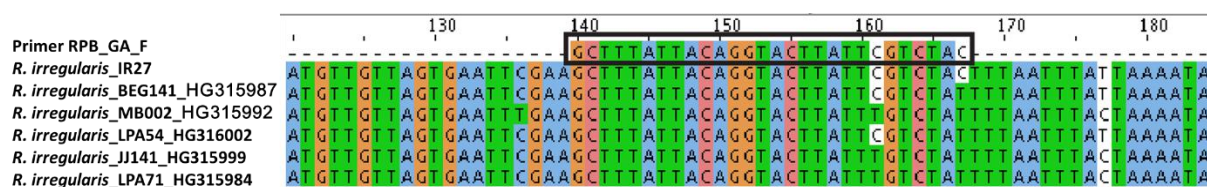


Figure 32. Alignement des séquences *RPB1* de *R. irregularis* disponibles dans GenBank et de la séquence *RPB1* obtenue à partir de *R. irregularis* IR27. L'alignement est visualisé suivant l'orientation 5'-3' de l'amorce RPB_GA_F.

II.3. Traçage moléculaire de *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana*

II.3.1. Extraction d'ADN total des racines

Pour chaque échantillon, les racines ont été placées dans un mortier et broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un pilon. Le Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, France) a été utilisé pour extraire l'ADN des échantillons de poudre racinaire (50 mg à 100 mg de broyat/échantillon), en suivant le protocole décrit par le fournisseur. La première élution a été réalisée dans 70 µl de tampon d'élution et la seconde élution dans 100 µl. Le restant du broyat a été conservé à -80°C dans des tubes Eppendorf 1,5 ml.

II.3.2. PCR de vérification de l'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des racines de jujubier a été vérifiée par PCR classique avec les amorces LR1 et NDL22 (Tableau 27 ; van Tuinen *et al.*, 1998b) spécifiques aux Eucaryotes. La PCR a été réalisée dans un mélange réactionnel de 20 µl contenant pour chaque échantillon : 12,5 µl H₂O ultrapure stérile ; 4 µl Buffer GoTaq 5X ; 0,4 µl dNTPs (40 mM) ; 1 µl LR1 (10 µM) ; 1 µl NDL22 (10 µM) ; 0,1 µl GoTaq (5U/µl) ; 1 µl ADN de racine suivant le programme ci-dessous :

| | | | |
|-----------|-------------|-------|------------|
| 2' à 95°C | 30'' à 95°C | } 35X | 10' à 72°C |
| | 45'' à 58°C | | ->16°C |
| | 1' à 72°C | | |

II.3.3. Détection des CMA dans les racines

Les produits d'amplification obtenus avec LR1 et NDL22 ont été dilués 100 fois puis utilisés en guise d'ADN pour détecter tous les CMA associés aux racines de *Z. mauritiana* avec les amorces FLR3 et FLR4 (Tableau 27 ; Golotte *et al.*, 2004) spécifiques aux Glomérormycètes. La PCR a été utilisée dans un mélange réactionnel de 50 µl contenant pour chaque échantillon : 31 µl H₂O ultrapure stérile ; 10 µl Buffer HF Phusion 5X ; 1 µl dNTPs (40 mM) ; 2,5 µl FLR3 (10 µM) ; 2,5 µl FLR4 (10 µM) ; 0,5 µl Taq Phusion (5U/µl) ; 2,5 µl PCR (LR1/NDL22) suivant le programme ci-dessous :

| | | | |
|-----------|-------------|-------|------------|
| 2' à 95°C | 30'' à 95°C | } 35X | 10' à 72°C |
| | 45'' à 58°C | | ->16°C |
| | 1' à 72°C | | |

II.3.4. Détection de *R. irregularis* IR27 dans les racines

Afin de détecter la souche inoculée dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation, l'ADN de chaque échantillon de racines a été amplifié par PCR gigogne avec RPB1-Ac et RPB1-1730r (PCR1) puis RPB_GA-F et RPB_DvT922 (PCR2). Seule la présence ou l'absence de *R. irregularis* IR27 dans les échantillons de racines a été évaluée. La PCR1 a été réalisée dans un mélange réactionnel de 20 µl dans les conditions suivantes :

$$\left. \begin{array}{l} 30'' \text{ à } 98^{\circ}\text{C} \\ 10'' \text{ à } 98^{\circ}\text{C} \\ 30'' \text{ à } 63^{\circ}\text{C} \\ 1' \text{ à } 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right\} 3\text{X} \quad \left. \begin{array}{l} 10'' \text{ à } 98^{\circ}\text{C} \\ 30'' \text{ à } 61^{\circ}\text{C} \\ 1' \text{ à } 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right\} 3\text{X} \quad \left. \begin{array}{l} 10'' \text{ à } 98^{\circ}\text{C} \\ 30'' \text{ à } 58^{\circ}\text{C} \\ 1' \text{ à } 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right\} 16\text{X} \quad \begin{array}{l} 10' \text{ à } 72^{\circ}\text{C} \\ \rightarrow 16^{\circ}\text{C} \end{array}$$

Les produits de la PCR1 ont été dilués 100 fois et utilisés en guise d'ADN pour la seconde PCR. La PCR2 a été réalisée dans un mélange réactionnel de 50 µl les amorces spécifiques RPB_GA-F et RPB_DvT922 dans les conditions suivantes :

$$\left. \begin{array}{l} 30'' \text{ à } 98^{\circ}\text{C} \\ 10'' \text{ à } 98^{\circ}\text{C} \\ 20'' \text{ à } 60^{\circ}\text{C} \\ 1' \text{ à } 72^{\circ}\text{C} \end{array} \right\} 35\text{X} \quad \begin{array}{l} 10' \text{ à } 72^{\circ}\text{C} \\ \rightarrow 16^{\circ}\text{C} \end{array}$$

II.3.5. Quantification de la colonisation racinaire de *R. irregularis* IR27

La technique d'amplification par qPCR basée sur le SYBR®Green a été utilisée en suivant les conditions d'application du Kit ABSolute™ QPCR SYBR®Green ROX Mix (2007, Thermo Fisher Scientific, France). La Thermo-Start™ Taq DNA Polymerase est l'enzyme requise dans ce kit pour l'amplification des séquences d'ADN cibles. La technique de qPCR a été utilisée car elle permet de mesurer avec précision la quantité absolue d'acides nucléiques (ADN) présente à un instant t dans un échantillon grâce à un marqueur fluorescent, le SYBR®Green. Deux étapes majeures ont été nécessaires pour le calibrage des réactions de qPCR: le test d'efficacité des amorces et la quantification des ADN cibles dans les échantillons.

- Efficacité des amorces

L'efficacité de 2 couples d'amorces du gène *RPB1* (RPB_826F/RPB_1210r pour les *Rhizophagus* et RPB_GA-F/RPB_DvT922 pour *R. irregularis* IR27) a été analysée en qPCR en utilisant l'ADN de la souche *R. irregularis* IR27. Afin d'évaluer l'efficacité des couples d'amorces et de définir la condition de dilution optimale, sept dilutions successives d'ADN de l'échantillon « modèle » ont été réalisées (1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64) et utilisées en

qPCR avec les différents couples d'amorces et deux répliquats pour chaque gène. Les séquences des couples d'amorces utilisés pour chaque gène sont présentées dans le tableau 1. Une dilution (1/20) pour chaque amorce spécifique a été testée. Les plaques de 96 puits ont été utilisées. Chaque puits contenait un volume réactionnel final de 15 µL (7,5 µL 2X ABsolute qPCR SYBR Green ROX mix + 5,5 µL amorces sens et anti-sens + 2 µL ADN). Toutes les analyses en qPCR ont été faites avec l'appareil Applied Biosystems® StepOne™ Real-Time PCR Systems, en utilisant le programme ci-dessous :

- Nombre de cycles : 40

- Programme pour chaque cycle : 95°C / 15 min, 95°C / 15 s, 60°C / 30 s, 72°C / 30 s, 77°C / 30s, 95°C / 15 s, 60°C / 1min et 95°C / 15 s.

- Quantification de l'abondance de *R. irregularis* IR27

La dernière étape de la qPCR permet d'évaluer la quantité d'ADN du gène d'intérêt (amplicons du *RPB1*) de la souche IR27 pour chaque échantillon. Seuls les échantillons des traitements inoculés ont été pris en compte. La dilution 1:2 pour chaque échantillon d'ADN (produit PCR avec RPB1-Ac et RPB1-1730r à 15 cycles) et une dilution (1/20) pour chaque amorce spécifique ont été retenues avec deux répétitions techniques. La spécificité de chaque réaction qPCR est vérifiée pour chaque échantillon par visualisation des courbes de fusion, correspondant à la variation de la fluorescence en fonction de la température et validant la présence d'une amplification unique. La moyenne des valeurs de Ct (« Cycle Threshold » ou Cycle seuil représentant la valeur à laquelle la quantité d'ADN permet à la sonde fluorescente de dépasser le seuil) de chaque échantillon a été comparée. Afin d'évaluer la colonisation racinaire par *R. irregularis* IR27 par rapport à la population de *Rhizophagus* associés aux racines de *Z. mauritiana*, la moyenne des valeurs Ct du gène RPB_IR27 a été soustraite de la moyenne des valeurs Ct correspondantes du gène RPB_*Rhizophagus*. Ceci est appelé la valeur Delta Ct (ΔCt). L'intensité de la colonisation racinaire des jujubiers inoculés avec *R. irregularis* IR27 a été calculée par $2^{-\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) pour chaque échantillon.

III. Résultats

III.1. Caractérisation moléculaire de *R. irregularis* IR27

Les extraits d'ADN de spores de *R. irregularis* IR27 ont tous donné des amplifications positives avec les amorces RPB1-1210r et RPB1-DR160FA. Les résultats de séquençage du gène nous a permis d'identifier la souche IR27 comme étant un *Rhizophagus irregularis*, en raison du niveau de similarité (99%) avec des séquences *RPB1* de référence (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>). La séquence *RPB1* de *R. irregularis* obtenue au cours de cette étude a été alignée avec des séquences *RPB1* de références présentes dans NCBI. L'analyse phylogénétique basée sur la méthode de Maximum de Parcimonie a révélé l'appartenance de la souche IR27 au groupe des *Rhizophagus irregularis* (Figure 33).

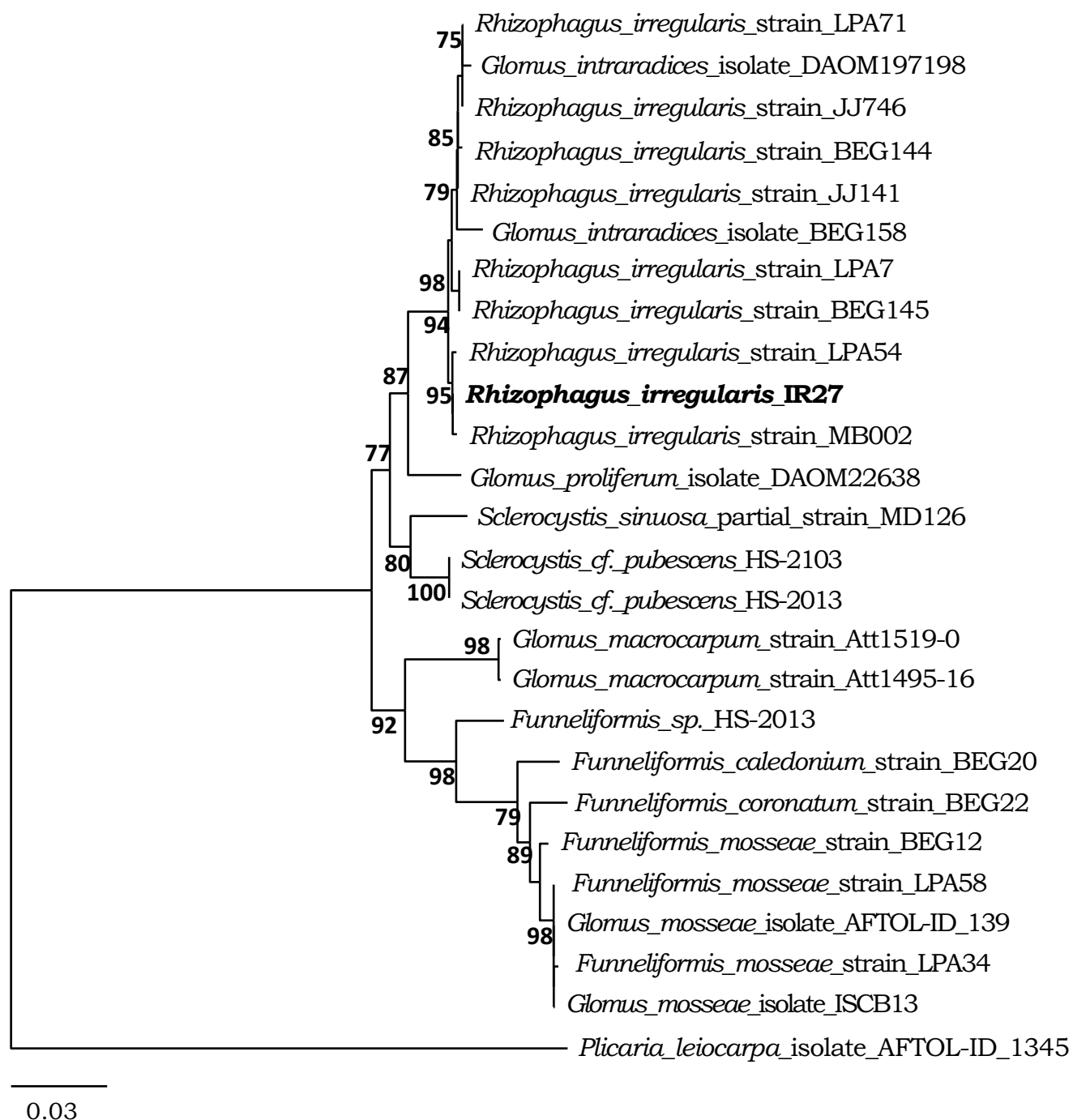


Figure 33. Arbre phylogénétique de la souche inoculée *R. irregularis* IR27 (en gras) avec des séquences de références du gène *RPBI* de la base de données NCBI (Stockinger *et al.*, 2014).

III.2. Persistence de *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana*

Pour vérifier la réussite de l'extraction, l'ADN total des racines a été amplifié avec le couple d'amorces LR1/DNL22 spécifiques aux Eucaryotes. Ainsi, tous les échantillons de racines de *Z. mauritiana* traités ont donné des amplifications positives par PCR gigogne (Figure 34). En effet, l'amplification a révélé des bandes intenses à 600-750 pb chez tous les échantillons. La taille des bandes à 600 pb représente les amplifications de l'ADN de la plante et celle à 750 pb représente les amplifications de l'ADN des champignons.

Afin de vérifier la colonisation racinaire des échantillons de racines par les CMA, les extraits d'ADN ont été amplifiés par PCR gigogne avec le couple d'amorces FLR3/FLR4 spécifiques aux Glomérormycètes. Les résultats ont montré des amplifications positives à une taille de 400 pb chez que tous les échantillons de racines traités (Figure 35).

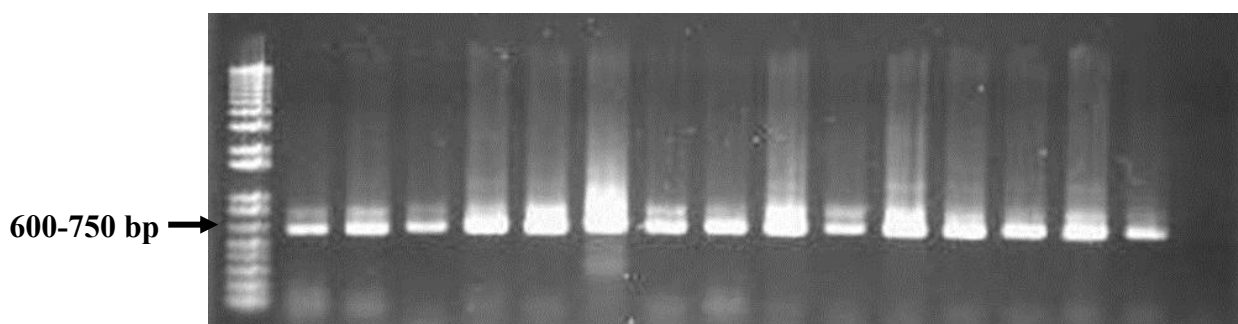


Figure 34. Amplification des Eucaryotes dans les racines de *Z. mauritiana* avec le couple d'amorces spécifiques LR1/NDL22 (van Tuinen *et al.*, 1998b).

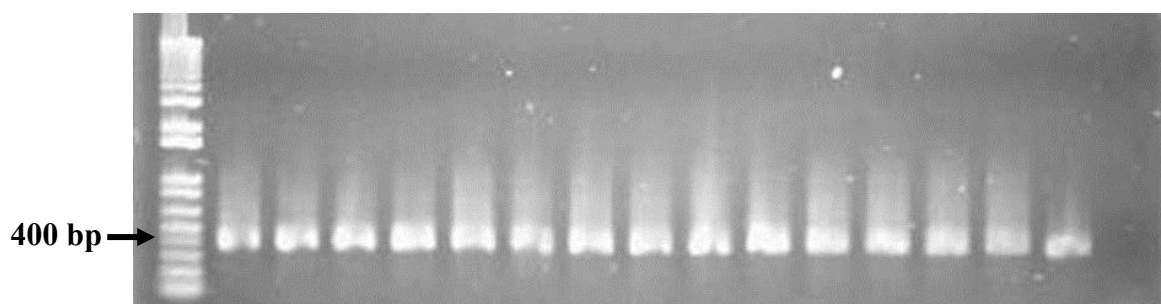


Figure 35. Amplification des Glomérormycètes dans les racines de *Z. mauritiana* avec le couple d'amorces spécifiques FLR3/FLR4 (Gollotte *et al.*, 2004).

Nous avons testé la spécificité des amorces RPB_GA-F et RPB_DvT922 sur des racines provenant des jujubiers inoculés par *R. irregularis* IR27 et des témoins non-inoculés. L'amplification positive obtenue avec les amorces FLR3 et FLR4 (Figure 35) a permis de confirmer que tous les échantillons de racines de *Z. mauritiana* étaient colonisés par des Gloméromycètes. Par contre la réaction positive avec les amorces spécifiques à la souche *R. irregularis* IR27, obtenue exclusivement avec les racines provenant des jujubiers inoculés, a permis de confirmer leur spécificité, ainsi que la persistance de cette souche dans les plantations à Keur Mangari (Figure 36) et à Amally (Figures 37 et 38).

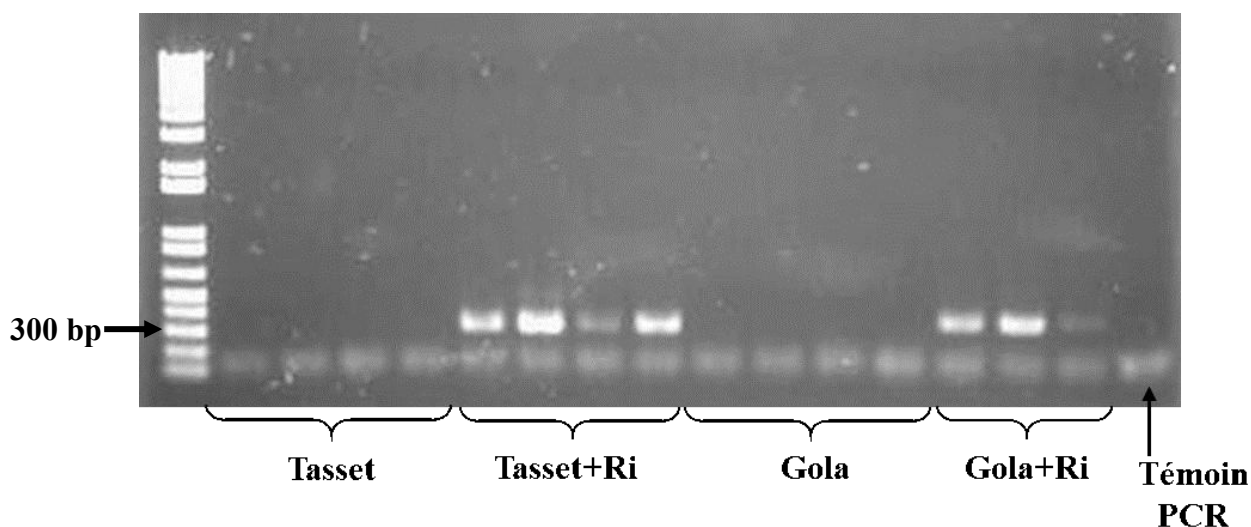


Figure 36. Amplification de la souche inoculée *R. irregularis* IR27 avec le couple d'amorces spécifiques RPB_GA-F/RPB_DvT922 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation à Keur Mangari.

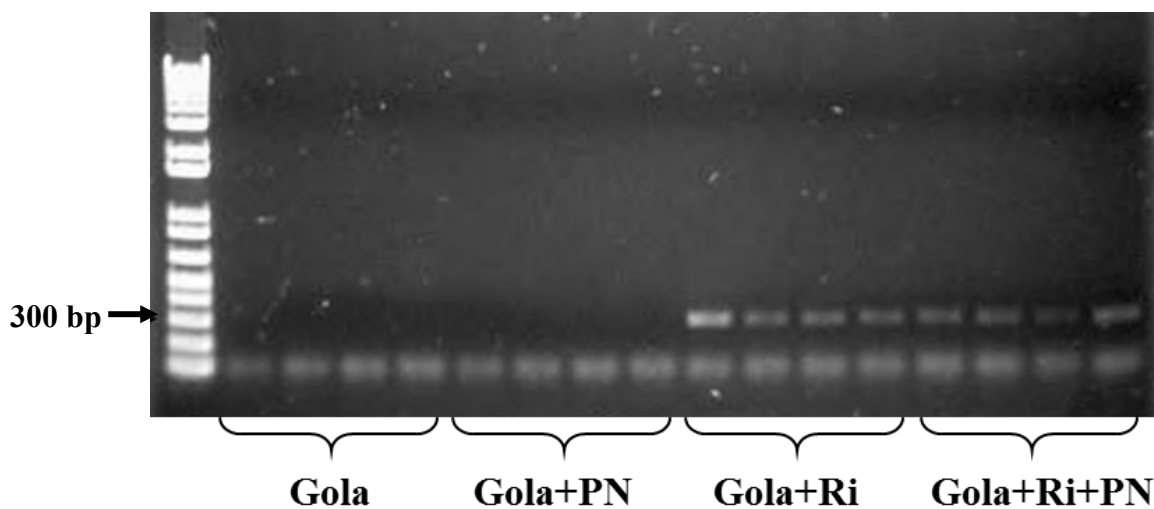


Figure 37. Amplification de la souche inoculée *R. irregularis* IR27 avec le couple d'amorces spécifiques RPB_GA-F/RPB_DvT922 dans les racines de la provenance Gola en plantation à Amally.

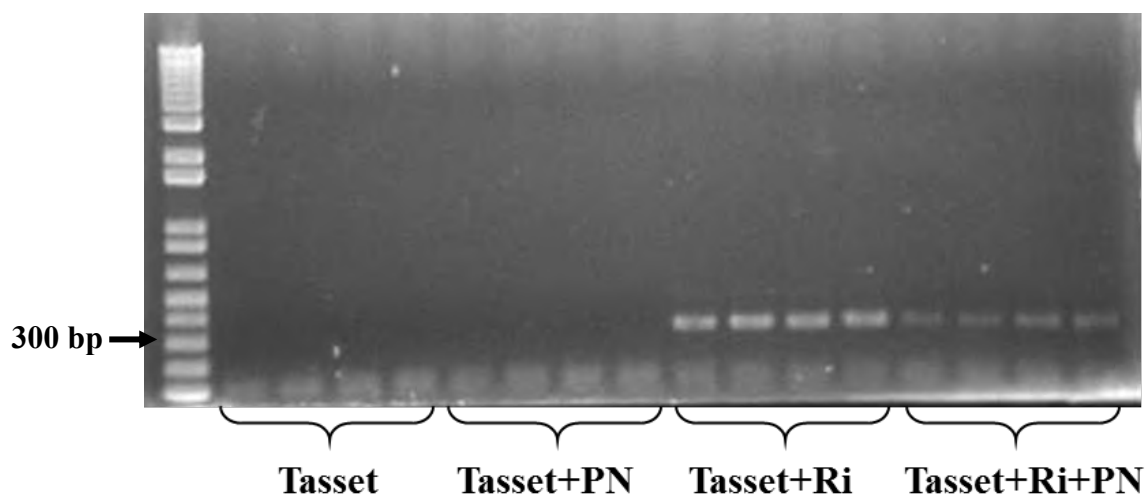


Figure 38. Amplification de la souche inoculée *R. irregularis* IR27 avec le couple d'amorces spécifiques RPB_GA-F/RPB_DvT922 dans les racines de la provenance Tasset en plantation à Amally.

III.3. Quantification de la colonisation racinaire par *R. irregularis*

La souche *R. irregularis* IR27 a été spécifiquement tracée dans les racines de jujubiers inoculés en plantation. Après 24 mois de plantation à Keur Mangari, les résultats de la qPCR ont montré que *R. irregularis* IR27 représentait en moyenne 12% pour Gola et 15% pour Tasset de l'intensité de la colonisation racinaire par rapport à la population indigène de *R. irregularis* (Figure 39). Après 13 mois de plantation à Amally, *R. irregularis* IR27 représentait en moyenne 11% pour Gola (Figure 40) et 13% pour Tasset de l'intensité de la colonisation racinaire des jujubiers inoculés (Figure 41).

Colonisation racinaire (%)

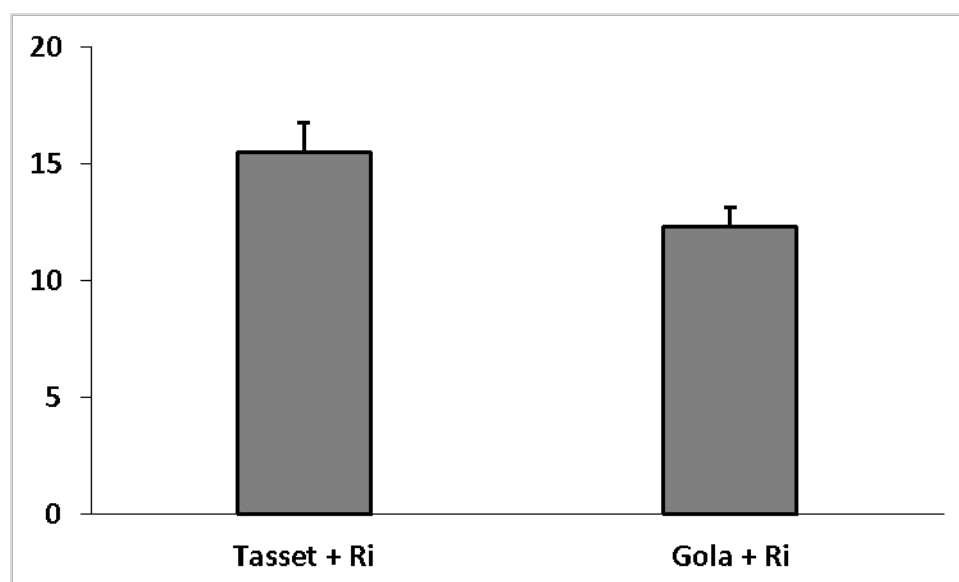


Figure 39. Quantification par qPCR de l'intensité de la colonisation racinaire des jujubiers inoculés avec *R. irregularis* IR27 par rapport à la population indigène de *R. irregularis* après 24 mois de plantation à Keur Mangari.

Colonisation racinaire (%)

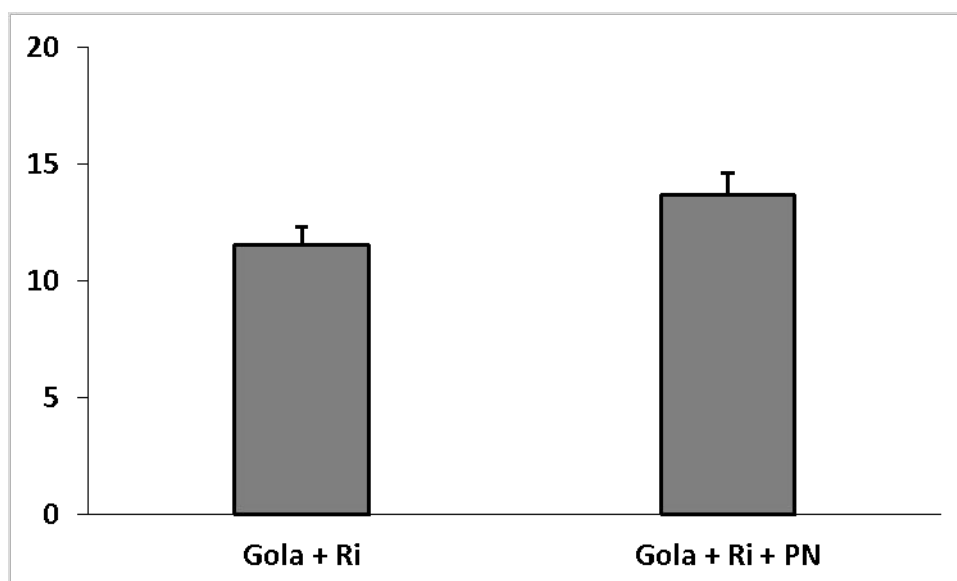


Figure 40. Quantification par qPCR de l'intensité de la colonisation racinaire des jujubiers (Gola) inoculés avec *R. irregularis* IR27 par rapport à la population indigène de *R. irregularis* après 13 mois de plantation à Amally.

Colonisation racinaire (%)

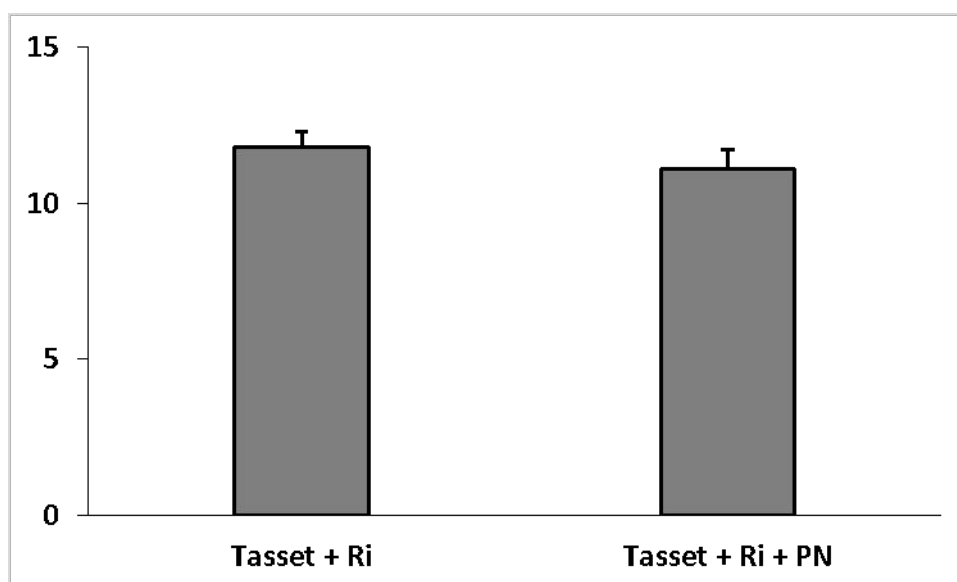


Figure 41. Quantification par qPCR de l'intensité de la colonisation racinaire des jujubiers (Tasset) inoculés avec *R. irregularis* IR27 par rapport à la population de *R. irregularis* après 13 mois de plantation à Amally.

IV. Discussion

La persistance de la souche inoculée *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* a été évaluée à 13 mois après plantation à Amally et à 24 mois après plantation à Keur Mangari grâce à l'approche moléculaire basée sur le gène *RPB1*. Tous les échantillons de racines traités (inoculés et non inoculés) ont donné des amplifications positives avec le couple d'amorces FLR3/FLR4 spécifiques aux Gloméromycètes. Ce résultat indique que les racines de *Z. mauritiana* prélevées des deux sites de plantations ont été toutes bien colonisées par des CMA. Ces mêmes amorces FLR3/FLR4 ont donné des amplifications positives à 400 pb dans d'autres études de suivi de CMA inoculés au champ (Farmer *et al.*, 2007 ; Gollote *et al.*, 2004).

La présence de *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* inoculées a été confirmée par le couple d'amorces spécifiques RPB_GA-F / RPB_DvT922. Quel que soit le site d'étude, *R. irregularis* IR27 a été détecté uniquement dans les échantillons de racines inoculés montrant la persistance de cette souche au niveau des plantations. Ceci concorde avec les résultats de Farmer *et al.* (2007) qui ont montré la persistance d'une espèce de CMA, *Glomus etunicatum*, dans tous les échantillons de racines de patate douce prélevés de parcelles inoculées. Nos résultats sont également similaires à ceux de Sýkorová, *et al.* (2012) qui ont montré la persistance d'une souche inoculée *R. irregularis* BEG140 dans les racines de *Phalaris arundinacea* au champ avec une autre approche moléculaire basée sur le gène mtLSU. Il a été bien établi que la persistance d'un inoculum de CMA introduit dans un sol doit être considérée comme une condition préalable pour la réussite des pratiques d'inoculation (Pellegrino *et al.*, 2011). Dans la littérature, aucune étude à long terme n'a été réalisée dans les agro-écosystèmes au Sénégal pour évaluer la persistance d'une souche de CMA inoculée sur les racines d'une plante. Cette étude démontre pour la première fois la faisabilité de suivre une souche de CMA inoculée dans les racines d'une plante avec le gène *RPB1*. L'utilité de cette approche moléculaire est démontrée par son potentiel à détecter *R. irregularis* IR27 colonisant efficacement les racines jusqu'à 2 années de plantation à Keur Mangari. Plusieurs techniques moléculaires basées sur l'analyse de l'ADN génomique ont été appliquées pour discriminer les populations de CMA dans les racines de plantes et dans le sol (Jeffries *et al.*, 2003). Des études ont montré l'utilité de la PCR gigogne basée sur l'ADNr du gène LSU pour discriminer les différents CMA dans des racines d'oignon et de poireau colorées au bleu de trypan (van Tuinen *et al.*, 1998a). Cette approche par PCR gigogne a été également utilisée pour suivre de près les communautés de CMA dans des sols ou des racines

mycorhizées (Kjøller & Rosendahl, 2000 ; Jacquot *et al.*, 2000 ; Renker *et al.*, 2003 ; Turnau *et al.*, 2001). De études antérieures ont également montré que parmi les différents marqueurs moléculaires testés sur *R. irregularis* (Croll *et al.*, 2008, Koch *et al.*, 2004 ; Raab *et al.*, 2005), seul le gène mtLSU pouvait être utilisé pour caractériser et distinguer différents haplotypes de ce champignon au champ (Börstler *et al.*, 2008, 2010). Toutefois, en raison du manque de polymorphisme et de la rareté des données avec le gène mtLSU, la détection spécifique d'isolât d'autres espèces de CMA comme par exemple *Funneliformis mosseae* dans les racines n'est actuellement pas réalisable (Thiéry *et al.*, 2010). Or les résultats de notre étude prouvent clairement que le gène *RPBI* est un bon marqueur moléculaire capable de tracer spécifiquement *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation. C'est la première fois qu'une amorce spécifique à une souche ait été développée avec le gène *RPBI*. Stockinger *et al.* (2014) ont développé un mélange d'amorces *RPBI* spécifiques aux Glomérômycètes et donc capables d'amplifier tous les CMA au champ. Cependant, ce mélange d'amorces ne peut pas être utilisé pour tracer spécifiquement une souche de CMA.

Dans nos deux sites de plantation, les résultats ont montré que *R. irregularis* IR27 peut efficacement rivaliser avec les CMA natifs et est bien adapté aux conditions des deux milieux. Cette présence de *R. irregularis* IR27 dans les deux sites d'études indique sa compatibilité avec un large éventail de conditions de sol variant en pH (6,41 à Amally et 5,43 à Keur Mangari) et en disponibilité de phosphore (6,37 ppm à Amally et 26,93 ppm à Keur Mangari). Verbruggen *et al.* (2013) ont montré que la compatibilité d'un CMA avec l'environnement (conditions du sol et plante hôte) est non seulement un facteur déterminant dans l'efficacité d'un inoculum au champ mais aussi une caractéristique importante pour une application commerciale. Toutefois, Sýkorová *et al.* (2007) ont montré la difficulté de vérifier le succès de l'inoculation au champ si des souches locales des espèces inoculées sont déjà présentes dans le sol de plantation. Par ailleurs, la quantité de l'inoculum à apporter est un aspect très important susceptible d'affecter fortement la réussite de l'inoculation. L'étude de suivi pluriannuel de Pellegrino *et al.* (2012) a montré de fortes preuves de persistance d'au moins un des deux isolats de *Funneliformis mosseae* utilisés. Cependant, la quantité d'inoculum appliqué dans leur étude était à peu près équivalente à la densité des populations de CMA indigènes. Or, si une telle dose est une exigence pour la réussite de l'inoculation et la persistance des CMA inoculés au champ, cela réduirait sérieusement la faisabilité des approches d'inoculation. Par exemple, la quantité d'inoculum appliquée dans l'étude de Pellegrino *et al.* (2012) augmenterait jusqu'à des taux d'application de 7 tonnes par hectare de

sol. L'analyse du potentiel mycorhizien des sols de nos parcelles expérimentales effectuée avant la transplantation des jujubiers inoculés et non inoculés avait révélé 1,06 propagules/100 g de sol à Amally et 23,87 propagules/100 g de sol à Keur Mangari. La souche inoculée *R. irregularis* IR27 avait donc tendance à rivaliser avec les souches indigènes. De plus, nos résultats par PCR gigogne n'ont pas révélé une présence de *R. irregularis* IR27 dans les échantillons de racines non inoculés. Ce qui suppose l'absence de cette souche dans les sols de plantation.

Les résultats de la qPCR ont montré que *R. irregularis* IR27 représentait 11 à 13% après 13 mois de plantation à Amally et 12 à 15% après 24 mois de plantation à Keur Mangari par rapport à la population indigène de *R. irregularis*. Ces proportions représentent l'intensité de la colonisation racinaire par *R. irregularis* IR27, qui diffère de l'efficacité de la mycorhization. Des études antérieures ont montré que la qPCR est un outil très sensible et très utile pour suivre les changements au sein des communautés de CMA (Alkan *et al.*, 2006 ; Jansa *et al.*, 2008). De nombreuses études ont précédemment exploré la quantification moléculaire de CMA à partir de l'ADN nucléaire ribosomique (Alkan *et al.*, 2004 ; Filion *et al.*, 2003 ; Gamper *et al.*, 2008). Krak *et al.* (2012) sont parvenus à décrire la quantification des CMA en utilisant des marqueurs de l'ADN mitochondrial. Dans notre étude, nous avons quand même testé en premier une quantification directe de l'ADN mais les résultats ont donné un seuil très faible (24 cycles). Ce qui nous a obligé de passer par une PCR gigogne pour faire la qPCR d'où l'inconvénient du gène *RPBI* pour la quantification moléculaire. Il serait intéressant aussi de connaître la proportion de *R. irregularis* IR27 par rapport aux autres CMA natifs en plantation. Ceci n'est possible qu'en comparant le gène LSU avec le gène *RPBI*. Or, jusqu'à présent, il n'y pas encore un rapport direct entre le gène LSU et le gène *RPBI* même si l'idéal aurait été d'avoir une amorce *RPBI* capable de prendre en compte tous les CMA (cocktail d'amorces), ce qui n'est pas encore possible.

Les résultats de cette étude montrent que *R. irregularis* IR27 s'installe et s'adapte bien à la fois dans deux localités géographiquement différentes. Notre étude apporte des connaissances supplémentaires en montrant un caractère non envahissant de la souche *R. irregularis* IR27 étant donné qu'elle est remplacée par des espèces locales et ne détruit pas la communauté native de CMA en plantation. Il est maintenant reconnu que les invasions par les espèces exotiques constituent une menace très grave pour la biodiversité par la mise en danger, et voire même l'extinction des espèces natives (Pimentel *et al.*, 2000 ; Cabin *et al.*, 2002 ; CBD,

2006 ; Meiners, 2007). Donc pour une utilisation raisonnable d'un inoculum de CMA, il faut (i) qu'il soit très efficace et (ii) qu'il ne soit pas très persistant.

V. Conclusion

L'objectif de cette étude consistait à évaluer la persistance de la souche inoculée *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation. L'approche moléculaire basée sur le gène *RPB1* nous a permis de détecter la souche inoculée et de quantifier son intensité de colonisation racinaire par rapport à la population indigène de *R. irregularis*. Les résultats ont montré que le couple d'amorces RPB_GA-F / RPB_DvT922 est bien spécifique à *R. irregularis* IR27. Quel que soit le site d'étude, la PCR gigogne indique que *R. irregularis* IR27 est toujours présent dans les racines de *Z. mauritiana* inoculés et absent dans les racines des témoins non inoculés. Cette étude montre clairement que *R. irregularis* IR27 persiste dans les jujubiers inoculés après plantation bien que plusieurs genres de *Rhizophagus* indigènes coexistent dans les racines. Mais cette persistance n'est pas aussi forte car les résultats de la qPCR ont montré que l'intensité de la colonisation racinaire de *R. irregularis* IR27 représente 11 à 13% après 13 mois de plantation à Amally et 12 à 15% après 24 mois de plantation à Keur Mangari.

Cette approche moléculaire permettant de suivre une souche de CMA inoculée dans le long terme, a aujourd'hui le potentiel de contribuer considérablement au développement de la technologie de l'inoculation mycorhizienne. A partir de nos résultats, les futurs utilisateurs de la souche *R. irregularis* IR27 pourront évaluer sa persistance dans les racines d'autres plantes après plantation. En même temps, nos résultats sont d'une importance capitale pour l'écologie mycorhizienne car nous venons de démontrer pour la première fois avec le marqueur moléculaire *RPB1* qu'un isolat de CMA inoculé est capable de persister jusqu'à deux années de plantation dans des vergers au Sénégal. Cette étude permet donc de mieux contribuer à la sélection d'isolats performants en vue d'applications agronomiques dans l'amélioration du fonctionnement des agro-écosystèmes arides et semi-arides.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

1. La dépendance mycorhizienne varie en fonction des CMA, de la provenance et de l'espèce de jujubier

Dans les conditions arides et semi-arides, les arbres fruitiers dépendent largement des CMA pour leur croissance et leur nutrition minérale (Guissou *et al.*, 1998b ; Mathur *et al.*, 2000 ; Guissou *et al.*, 2001 ; Fitter *et al.*, 2011 ; Smith *et al.*, 2011). Il a été démontré que parmi 13 arbres fruitiers, *Z. mauritiana* répondait mieux à l'inoculation avec *Rhizophagus irregularis* (syn. *Glomus aggregatum* IR27) (Guissou *et al.*, 1998b ; Bâ *et al.*, 2000). Ces résultats ont été obtenus sur une provenance de l'espèce *Z. mauritiana*. Notre étude porte sur les réponses à l'inoculation avec trois souches de CMA (*R. irregularis*, *R. intraradices* et *F. mosseae*) de 7 espèces de *Ziziphus* et de 6 provenances de *Z. mauritiana* en conditions contrôlées. Nos résultats montrent que l'inoculation avec les CMA améliore significativement la croissance des jujubiers (espèces et provenances). En effet, *R. irregularis* et *R. intraradices* sont efficaces sur tous les paramètres mesurés chez les espèces de *Ziziphus* tandis que *R. irregularis* paraît le plus efficace chez les provenances de *Z. mauritiana*. Ces résultats confirment ceux obtenus par Guissou *et al.* (1998b), Bâ *et al.* (2000, 2001), Guissou (2009), Sidibé *et al.* (2012) et Guissou *et al.* (2016). Il est bien établi que la réponse des plantes à l'inoculation avec des CMA peut varier en fonction de l'espèce, de la provenance, de la variété ou du génotype (Maherali & Klironomos, 2007 ; Bever *et al.*, 2009 ; Hoeksema *et al.*, 2010 ; Reinhart *et al.*, 2012).

Dans notre étude, les jujubiers, toutes espèces et provenances confondues, ont montré différents niveaux de dépendance mycorhizienne. La DM la plus faible chez les espèces de *Ziziphus* est obtenue avec *F. mosseae* (54,84%) alors que les DM avec *R. irregularis* et *R. intraradices*, ont respectivement atteint 68,47% et 62,49%. Chez les provenances de *Z. mauritiana*, la DM la plus élevée est observée chez la provenance du Burkina Faso fortement colonisée (68,80%). Des études ont montré que des valeurs élevées de DM sont souvent observées chez *Z. mauritiana* et varient selon les espèces de CMA utilisées comme inoculum (Mathur & Vyas, 2000 ; Smith *et al.*, 2000 ; Urcelay & Diaz, 2003). Néanmoins, nos résultats démontrent, pour la première fois, que la DM des jujubiers varie en fonction des espèces de *Ziziphus* et de la provenance de *Z. mauritiana*. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Klironomos *et al.* (2003) qui ont montré que la réponse de la croissance des plantes aux CMA dépend du partenaire végétal et du partenaire fongique.

Quelle que soient la provenance de *Z. mauritiana* et l'espèce de *Ziziphus*, la production des hyphes a augmenté de manière significative en fonction des espèces de CMA dans l'ordre décroissant suivant : *R. intraradices*, *R. irregularis* et *F. mosseae*. Les différences observées dans la réponse à l'infection mycorhizienne des jujubiers résulteraient des différences dans le développement du réseau d'hyphes extra-matriciels. Ces résultats corroborent ceux de Smith *et al.* (2000) qui ont montré que des plants de *Medicago trunculata* inoculés avec *Scutellospora calospora* poussaient mieux que ceux inoculés avec *Gigaspora caledonium* qui développait un réseau d'hyphes moins important. Nos résultats indiquent également une corrélation significative entre la DM et la longueur des hyphes aussi bien chez les espèces de *Ziziphus* que les provenances de *Z. mauritiana*, ce qui suggère que l'efficacité du champignon dépend de l'espèce de *Ziziphus* associée.

Chez toutes les provenances et espèces de *Ziziphus*, l'inoculation avec les CMA a significativement amélioré l'absorption en P et en K comparativement aux témoins non inoculés. Ces résultats sont en accord avec les travaux publiés sur l'augmentation des nutriments observée chez les plantes mycorhizées (Fitter *et al.*, 2011 ; Smith *et al.*, 2011 ; Jiang *et al.*, 2013) en partie à cause de l'existence d'un réseau d'hyphes extramatricielles capable d'explorer un volume de sol plus important (Simard *et al.*, 2002 ; Marulanda *et al.*, 2003 ; Schnepf *et al.*, 2008). Toutefois, les jujubiers diffèrent dans leur capacité d'absorption en K et P suivant l'espèce de CMA. *Z. sphaerocarpa* et *Z. abyssinica* en symbiose avec *R. irregularis* accumulent plus de K et de P que les autres combinaisons *Ziziphus*/CMA alors qu'on obtient le même résultat quelle que soit la provenance de *Z. mauritiana* inoculée avec *R. irregularis*. Nos résultats suggèrent que l'amélioration de l'absorption des éléments minéraux par les CMA, plus élevée dans les plants mycorhizés comparée à ceux non mycorhizés, serait à l'origine de l'amélioration de la biomasse sèche totale des *Ziziphus* spp. On obtient le même résultat chez les plants inoculés avec *R. irregularis* quelle que soit la provenance de *Z. mauritiana*. Nous pouvons ainsi conclure que les jujubiers en particulier *Z. mauritiana* (espèce et provenances) inoculés avec *R. irregularis* dépendent fortement des mycorhizes pour leur croissance et nutrition en P et en K.

2. *Rhizophagus irregularis* IR27 est un champignon compétitif et efficace pour la croissance, la survie et la production fruitière de *Z. mauritiana* en plantation

Compte tenu des résultats précédents, nous avons choisi le couple *Z. mauritiana* /*R. irregularis* IR27 pour étudier l'impact de l'inoculation sur la production de jujubes. Dans

cette étude, l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la croissance, la survie et la production fruitière de deux provenances de *Z. mauritiana* (Gola et Tasset) a été évalué. Nos résultats ont montré un effet positif de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la croissance des deux provenances de *Z. mauritiana* en serre. Tous les paramètres de croissance mesurés étaient plus élevés chez les plants inoculés comparés à ceux non inoculés quelle que soit la provenance. Nos résultats confirment des études antérieures qui indiquent que l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 augmente la croissance et la biomasse totale des plants de *Z. mauritiana* en conditions contrôlées (Guissou *et al.*, 1998 ; Bâ *et al.*, 2000 ; Bâ *et al.*, 2001 ; Guissou *et al.*, 2009 ; Sidibé *et al.*, 2012 ; Guissou *et al.*, 2016). Ici, nous avons montré pour la première fois l'efficacité de l'inoculum de *R. irregularis* sur la production de jujubes chez *Z. mauritiana* en milieu réel. Le fait que les plants de *Z. mauritiana* aient été inoculés avec *R. irregularis* sur sol stérilisé en serre puis transplantés au champ confère au champignon introduit un avantage compétitif par rapport aux CMA natifs dont le potentiel en propagules viables était relativement bas dans les sols de plantation (Verbruggen *et al.*, 2013). En effet, à la sortie de la serre, les plants étaient vigoureux et bien colonisés par *R. irregularis* par rapport aux témoins non inoculés quelle que soit la provenance. Cependant, à ce stade, l'inoculation a été plus bénéfique pour Gola que pour Tasset.

Après transplantation, l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 a augmenté les paramètres de croissance et le taux de survie des deux provenances de *Z. mauritiana* après 3, 8 et 13 mois à Amally et après 4, 8, 12, 18, 24 et 30 mois de plantation à Keur Mangari. Nos résultats montrent que les différences de croissance entre les plantes inoculées et non inoculées en serre se sont maintenues malgré la compétition entre *R. irregularis* et les CMA natifs en plantation. Le taux de mycorhization des jujubiers estimé, après 13 et 24 mois de plantation respectivement à Amally et à Keur Mangari, était significativement plus élevé chez les traitements inoculés comparés aux non inoculés quelle que soit la provenance. Ceci montre la grande capacité du champignon *R. irregularis* à compétition face aux CMA indigènes (Lekberg & Koide 2005 ; Köhl *et al.*, 2016) et pourrait expliquer son efficacité sur les jujubiers après 13 et 30 mois de plantation respectivement à Amally et Keur Mangari. L'augmentation de la croissance des jujubiers avec la souche *R. irregularis* IR27 est en accord avec des études qui ont montré que d'autres souches de ce champignon peuvent s'établir avec succès sur des plantes de prairies malgré la présence des communautés de CMA indigènes (Badri *et al.*, 2016 ; Köhl *et al.*, 2016). Nos résultats sont également en accord avec ceux de Köhl *et al.* (2016) qui ont montré que la souche exotique *R. irregulare* BEG21 (également appelé *R.*

irregularis) améliorerait la croissance du trèfle quelles que soient la disponibilité du sol en P et l'abondance des propagules de CMA indigènes. Cette espèce est considérée comme un CMA compétitif et efficace avec une large distribution dans les écosystèmes naturels ou anthropisés (Badri *et al.*, 2016 ; Kölh *et al.*, 2016). C'est pourquoi cette espèce fait l'objet d'une production d'inoculum à grande échelle à des fins de commercialisation (Badri *et al.*, 2016). D'autres espèces de CMA exotiques peuvent également jouer un rôle similaire. Par exemple, Pellegrino *et al.* (2012) ont montré que l'inoculation avec deux souches exotiques de *Funneliformis mosseae* IMAI et AZ225C a augmenté la production de biomasse de *Medicago sativa* au champ.

La compétitivité de *R. irregularis* serait en partie liée aux faibles potentiels mycorhiziens des sols de plantation. De ce point de vue, il a été démontré que le succès de l'inoculation avec un CMA exotique dans les sols agricoles dépendait de nombreux facteurs tels que la compatibilité des espèces, la disponibilité de niche d'habitat pour le CMA et la compétitivité vis-à-vis des champignons natifs (Verbruggen *et al.*, 2013). Cependant, la quantité d'inoculum appliquée dans cette étude était supérieure à celle trouvée dans les sols de plantation, ce qui indique que la dose d'inoculum pourrait également être une exigence pour le succès de l'établissement et de la persistance de *R. irregularis*.

Nos résultats suggèrent également une contribution de l'inoculation avec *R. irregularis* dans l'amélioration de la production fruitière de *Z. mauritiana* après 18 et 30 mois de plantation à Keur Mangari. Nos résultats montrent que la provenance Gola inoculée est plus productive en jujubes que la provenance locale inoculée. L'augmentation de la production fruitière obtenue pendant deux saisons de fructification serait due à la pauvreté des sols en P. Dans ce contexte, l'inoculation serait un facteur important qui contribue à la production fruitière du jujubier. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux suite à l'inoculation mycorhizienne sur des cultures de légumes (Douds *et al.*, 2007 ; Regvar *et al.*, 2003 ; Salvioli *et al.*, 2012 ; Baum *et al.*, 2015). Contrairement à nos observations, Loján *et al.* (2016) n'avaient pas trouvé d'augmentation significative de la croissance ou du rendement de *Solanum tuberosum* inoculé avec *R. irregularis*. Ouédraogo *et al.* (2006) ont indiqué que Gola répondait positivement à l'irrigation et à la fertilisation avec du phosphate naturel dans un sol pauvre en P. Ces auteurs avaient également montré une production de fruits plus élevée chez Gola comparée à la variété locale. Ces résultats sont semblables aux nôtres, bien que dans ces études, les facteurs étudiés étaient l'irrigation et la fertilisation phosphatée avec du PN. Les valeurs de la production fruitière du jujubier obtenues dans notre étude ont été inférieures à celles trouvées

dans la littérature (Pareek, 2001 ; Tewari, 2002 ; Ouédraogo *et al.*, 2006). Ce constat peut être dû au jeune âge de nos arbres (18 et 30 mois).

D'un point de vue agronomique, les résultats de cette étude soulignent la pertinence du choix de la souche sélectionnée, *R. irregularis* IR27, pour augmenter la production fruitière du jujubier au moins pendant deux saisons de fructification.

3. L'inoculation de *Z. mauritiana* avec *Rhizophagus irregularis* IR27 a un impact limité sur les communautés de CMA natifs en plantation

Dans cette étude nous avons évalué l'impact de l'inoculation et de la provenance de jujubier sur la diversité des communautés de CMA natifs des sols en plantation dans deux sites d'études. Le séquençage avec la technologie Illumina MiSeq du gène 18S ciblant spécifiquement les Gloméromycètes a permis de révéler des communautés de CMA natifs très diversifiées dans les racines des deux provenances de *Z. mauritiana*. Les résultats ont montré que la majorité des séquences obtenues en plantation dans les deux sites sont affiliées à des *Glomeraceae* (>85%), notamment le genre *Rhizophagus* qui a été le plus abondant (25% à Amally et 58% à Keur Mangari). Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où les *Glomeraceae* sont en général les plus abondants parmi les Gloméromycètes dans nos agroécosystèmes (Manga *et al.*, 2007 ; Sène *et al.*, 2012 ; Ndoye *et al.*, 2012). Des taxons rares de CMA comme *Racocetra*, *Cetraspora*, *Geosiphon*, *Dentiscutata* *Pacispora*, *Incertae_sedis* et *Archaeospora* ont également été détectés dans nos deux sites d'études. Nos deux zones d'étude ont révélé des OTU non encore identifiés, ce qui suggère qu'elles comporteraient un grand nombre de CMA non décrits (Öpik *et al.*, 2013).

L'une des préoccupations majeures de l'inoculation avec un CMA exotique est la possibilité de modifier la structure et la composition des communautés de CMA indigènes (Rodriguez & Sanders, 2015). Toutefois, nos résultats montrent un impact négatif de l'inoculation sur la richesse et la diversité des communautés de CMA ($P < 0,05$) sur le site d'Amally contrairement au site de Keur Mangari où l'inoculation n'a pas eu d'impact sur la richesse et la diversité des communautés de CMA. L'analyse PERMANOVA n'a pas révélé d'effet significatif du facteur inoculation sur la structure des communautés de CMA natifs à Keur Mangari alors que dans le site d'Amally seule l'inoculation impacte la structure des communautés. Cette étude montre que l'inoculation avec la souche exotique *R. irregularis* IR27 a un impact limité sur les communautés de CMA natifs du jujubier en particulier dans le site de Keur Mangari. Ce résultat pourrait s'expliquer d'une part par les conditions environnementales contrastées entre

les deux sites (P en particulier) et d'autre part par les différences de potentiels mycorhiziens des sols. Dans la littérature, on sait encore très peu de chose sur l'impact potentiel de l'inoculation avec un CMA exotique sur les communautés autochtones de CMA dans les sols agricoles. Contrairement à nos observations, des études ont montré que l'inoculation mycorhizienne diminuait la diversité des communautés naturelles de CMA (Douds *et al.*, 2011; Mummey *et al.*, 2009). D'autres études ont montré une augmentation de la diversité des communautés de CMA indigènes après inoculation (Alguacil *et al.*, 2011). Nos résultats ont également montré que les jujubiers inoculés et les témoins non inoculés partagent les mêmes espèces de CMA quel que soit le site. Ce résultat montre que l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 ne modifie pas la composition des communautés de CMA natifs de nos sites de plantation. Cette étude contribue donc à une meilleure compréhension de l'écologie de la souche *R. irregularis* IR27 et de son impact sur la microflore fongique symbiotique de deux agroécosystèmes.

4. Le gène *RPB1* est un marqueur moléculaire spécifique pour détecter et quantifier *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation

La persistance de *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* a été évaluée après 13 et 24 mois de plantation respectivement à Amally et à Keur Mangari. Nos résultats ont montré des amplifications positives par PCR gigogne avec le couple d'amorces RPB_GA-F / RPB_DvT922 exclusivement dans les racines des jujubiers inoculés quel que soit le site. Ce résultat suggère que le couple d'amorces RPB_GA-F / RPB_DvT922 construites à partir de la séquence d'ADN de spores est spécifique à *R. irregularis* IR27. De nombreuses études ont utilisé des marqueurs ribosomiques tels que les gènes SSU ou LSU pour identifier des espèces de CMA en milieu naturel (Helgason *et al.*, 1998 ; Öpik *et al.*, 2010 ; Krüger *et al.*, 2012 ; Öpik *et al.*, 2014 ; Hart *et al.*, 2015). Cependant, ces marqueurs ribosomiques ne sont pas appropriés pour discriminer les isolats d'une espèce de CMA donnée. Dans la littérature, très peu d'études ont été faites sur le traçage moléculaire d'une souche exotique inoculée au champ. Alguacil *et al.* (2011) ont montré la persistance de trois souches natives de CMA (*Glomus* sp., *G. intraradices* et un mixte des deux CMA) inoculées dans les racines d'*O. europaea* après 14 mois de plantation. Des auteurs sont également parvenus à identifier des CMA inoculés parmi des communautés indigènes (Farmer *et al.*, 2007 ; Douds *et al.*, 2011 ; Antunes *et al.*, 2009 ; Koch *et al.*, 2011 ; Sýkorová *et al.*, 2012 ; Köhl *et al.*, 2016). Toutes les études faites sur l'identification de souches de *R. irregularis* en conditions naturelles ont

utilisé l'ADN mitochondrial (*mtLSU*) comme marqueur moléculaire (Börstler *et al.*, 2008, 2010 ; Sýkorová *et al.*, 2012 ; Peyret-Guzzon *et al.*, 2016 ; Badri *et al.*, 2016). Notre étude montre bien que le couple d'amorces RPB_GA.F / RPB_DvT922 est bien adapté et pertinent pour détecter *R. irregularis* IR27 dans les racines de jujubiers inoculés. C'est la première fois que le gène *RPB1* est utilisé pour discriminer un isolat de *R. irregularis* des populations indigènes de *R. irregularis* dans des agroécosystèmes. Pour quantifier un CMA par qPCR, la plupart des études ont fait recours à l'ADN ribosomique comme marqueur moléculaire (Gamper *et al.*, 2008 ; Köhl *et al.*, 2016). Les résultats de la qPCR montrent que *R. irregularis* IR27 a représenté environ 12% à 15% à Keur Mangari et 11 à 13% à Amally des populations indigènes de *R. irregularis* dans la colonisation racinaire des jujubiers. Ces résultats montrent bien que *R. irregularis* IR27 a persisté malgré tout dans les racines de *Z. mauritiana*.

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était d'améliorer la croissance et la production fruitière du jujubier (*Z. mauritiana* Lam.) par l'inoculation mycorhizienne dans des vergers au Sénégal. La première partie de ce travail consistait à connaître les réponses à l'inoculation avec des champignons mycorhiziens à arbuscules de différentes espèces de *Ziziphus* et de provenances de *Z. mauritiana* en pépinière. Les résultats obtenus ont montré que l'inoculation avec les CMA améliore la croissance des jujubiers (espèces et provenances) en augmentant de manière significative la production de biomasse et l'absorption des minéraux en particulier le P. Ces résultats ont également révélé que la DM des jujubiers, serait liée au développement du réseau d'hyphes extramatricielles qui augmentent l'absorption du P. Le champignon *R. irregularis* IR27 s'est avéré le meilleur CMA en termes d'efficacité sur le développement des plants toutes espèces de *Ziziphus* et toutes provenances de *Z. mauritiana* confondues. Il est important de noter que c'est la première fois que le statut mycorhizien des espèces de *Ziziphus* (excepté *Z. mauritiana*) en condition de sol stérilisé a été étudié.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons évalué l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la croissance, la survie et la production fruitière de *Z. mauritiana*. Il s'agissait tout d'abord d'évaluer l'effet de l'inoculation après quatre mois de croissance en serre puis de faire un suivi régulier de la croissance et de la survie des plants de *Z. mauritiana* en milieu réel. Nos résultats ont montré que la mycorhization contrôlée avec la souche sélectionnée *R. irregularis* IR27 améliorait la croissance, la survie et la production fruitière des jujubiers en plantation. A partir de ces résultats, il s'avère possible de développer la mycorhization contrôlée du jujubier en zone soudano-sahélienne pouvant à terme générer des revenus pour les populations locales. D'un point de vue pratique, l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 serait une bonne option pour les forestiers et les producteurs privés dans l'amélioration de la productivité des espèces fruitières en zone aride et semi-aride. Cette étude contribue à une meilleure compréhension de l'écologie de la souche *R. irregularis* IR27 et de son impact sur la microflore fongique symbiotique indigène. D'un point de vue agronomique, nos résultats soulignent l'importance du choix de la souche sélectionnée qui est non seulement efficace sur la croissance des jujubiers mais compétitive vis-à-vis des CMA natifs.

L'objectif de la troisième partie de ce travail consistait à évaluer l'impact de l'inoculation sur la diversité des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation. L'utilisation du séquençage Illumina MiSeq du gène 18S a permis de révéler une large gamme de CMA qui s'associent au jujubier. Une prédominance de la famille des *Glomeraceae* a été observée dans

les racines de jujubiers avec 93% à Amally et 88% à Keur Mangari particulièrement le genre *Rhizophagus*. Les résultats obtenus ont montré que l'inoculation diminue significativement la richesse et la diversité des communautés de CMA natifs particulièrement chez la provenance Tasset à Amally alors qu'à Keur Mangari, l'inoculation n'impacte pas la richesse et la diversité des CMA natifs. Du point de vue de la structure des communautés de CMA, l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 ne modifie pas la composition des communautés de CMA en plantation. Les résultats suggèrent que l'inoculation avec la souche exotique *R. irregularis* IR27 a un impact limité sur les communautés de CMA natifs du jujubier en particulier à Keur Mangari.

La dernière partie de cette thèse avait pour objectif d'explorer la persistance du champignon inoculé *R. irregularis* IR27 dans les racines de jujubiers en plantation. Les résultats ont montré que le couple d'amorces RPB_GA-F / RPB_DvT922 est bien spécifique à *R. irregularis* IR27. Quel que soit le site d'étude, la PCR gigogne indique que *R. irregularis* IR27 est toujours présent dans les racines de jujubiers inoculés et absent dans les témoins non inoculés. Cette étude montre clairement que la souche inoculée *R. irregularis* IR27 persiste dans les jujubiers inoculés après plantation bien que plusieurs souches de *R. irregularis* indigènes coexistent dans les racines. Mais cette persistance n'est pas aussi forte car les résultats de la qPCR ont montré que l'intensité de la colonisation racinaire par *R. irregularis* IR27 a représenté 11 à 13% après 13 mois de plantation à Amally et 12 à 15% après 24 mois de plantation à Keur Mangari. L'approche moléculaire basée sur le gène *RPB1* s'est révélée pertinente pour évaluer la technologie de l'inoculation mycorhizienne sur un pas de temps relativement long. Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois que le marqueur moléculaire *RPB1* permet de détecter un isolat de CMA jusqu'à deux années de plantation dans des vergers au Sénégal.

Cette thèse souligne l'importance de sélectionner une souche de CMA efficace et appropriée pour augmenter la production fruitière du jujubier. Cependant, il s'avère important (i) de comparer la souche fongique introduite avec des souches locales potentiellement plus adaptées aux conditions locales, (ii) d'évaluer à plus long terme l'impact de la souche *R. irregularis* IR27 et son devenir dans les racines de jujubiers inoculés en plantation dans une large gamme de conditions environnementales, (iii) d'évaluer l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la production fruitière d'autres espèces d'intérêt dans d'autres agroécosystèmes et (iv) de développer les NGS sur d'autres sites d'études du tracé de la GMV

pour mieux appréhender l'impact de l'inoculation sur les communautés de CMA natifs des agro-écosystèmes en milieux arides et semi-arides.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adelman MJ, Morton JB (1986)** Infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: Influence of host-soil diluent combinations on MPN estimates and percentage colonization. *Soil Biol Biochem* 18: 7-13. doi:10.1016/0038-0717(86)90106-9.
- Ahiabor BD, Birata H (1994)** Characteristic responses of three tropical legumes to inoculation of two species of VAM fungi in Andosol with different fertilities. *Mycorrhiza* 5: 63-70.
- Al-Karaki GN (2000)** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* 10: 51-54.
- Alguacil MM, Torrecillas E, Kohler J, Roldan A (2011)** A molecular approach to ascertain the success of “in situ” AM fungi inoculation in the revegetation of a semiarid, degraded land. *Sci Total Environ* 409: 2874-80.
- Alkan N, Gadkar V, Coburn J, Yarden O, Kapulnik Y (2004)** Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real-time polymerase chain reaction. *New Phytol.* 161: 877-885.
- Alkan N, Gadkar V, Yarden O, Kapulnik Y (2006)** Analysis of quantitative interactions between two species of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4192-4199.
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD (2010)** Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 19: 5555-5565.
- Anderson MJ (2001)** A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26: 32-46.
- Arndt SK, Kayser O (2001)** *Ziziphus* - a medicinal plant genus with tradition and future potential [in German]. In *Zeitschrift für Phytotherapie*, 22:91.
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2007)** How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New phytologist* 173: 808-16.
- Asmah AE (1995)** Effect of phosphorous source and rate of application on VAM fungal infection and growth of maize (*Zea mays* L.) *Mycorrhiza* 5: 223-228.
- Assogbadjo AE (2006)** Importance socio-économique et étude de la variabilité écologique, morphologique, génétique et biochimique du baobab (*Adansonia digitata* L.) au Bénin. Thèse de doctorat, Ghent University (Belgium), Ghent, 239 pp.
- Aubreville A (1950)** Flore forestière soudano-guinéenne. AO.F., Cameroun AEF. Paris, Soc. Ed. Geogr. Maritime et colon. 523p.
- Auge RM (2001)** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- Awodoyin RO, Olubode OS, Ogbu JU, Balogun RB, Nwawuisi JU, Orji KO (2015)** Indigenous fruit trees of tropical Africa: status, opportunity for development and biodiversity management. *Agri Sci* 6: 31-41. doi:10.4236/as.2015.61004.
- Azam-Ali S, Bonkougou E, Bowe C, deKock C, Godara A, Williams JT (2006)** Ber and other jujubes. In: Williams JT, Smith RW, Haq N, Dunsiger Z (eds) International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK, 302 pp.

- Azcon R, Barea JM (1997)** Mycorrhizal dependency of a representative plant species in mediterranean shrublands (*Lavandula spica* L.) as a key factor to its use for revegetation strategies in desertification-threatened areas. *Applied Soil Ecology* 7: 83-92.
- Azcon-Aguilar C, Palenzuela J, Roldan A, Bautista S, Vallejo R, Barea JM (2003)** Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology* 14: 165-175.
- Bâ AM, Dalpé Y, Guissou T (1996)** Les Glomales d'*Acacia holosericea* et d'*Acacia mangium*. Bois et Forêt des Tropiques 250: 5-18.
- Bâ AM, Sanon KB, Duponnois R, Dexheimer J (1999)** Growth responses of *Azelia africana* Sm. seedlings to ectomycorrhizal inoculation in a nutrient-deficient soil. *Mycorrhiza* 9: 91-95.
- Bâ AM, Plenchette C, Danthu P, Duponnois R, Guissou T (2000)** Functional compatibility of arbuscular mycorrhizae with thirteen tropical fruit trees in Senegal. *Agroforest. Syst.* 95: 95-105.
- Bâ AM, Guissou T, Duponnois R, Plenchette C, Danthu P, Sacko O, Sidibé D, Sylla K, Windou B (2001)** Mycorrhization contrôlée et fertilisation phosphatée: Application à la domestication du jujubier. *Fruits* 56: 261-269.
- Bâ AM, Danthu P, Duponnois R, Soleviev P (2003)** Domestication of jujube fruit trees (*Zizyphus mauritiana* Lam.). In : Dris R, Niskanen R, Jain SM (eds) Crop Management and Postharvest Handling of Horticultural Crops, vol. 3, chap. 9, Crop fertilization, nutrition and growth, Science Publishers, Inc., pp 255–279.
- Bâ AM, Duponnois R, Diabaté M, Dreyfus B (2011)** Les champignons ectomycorhiziens des arbres forestiers en Afrique de l'ouest. IRD Editions.
- Badri A, Stefani FOP, Lachance G, Roy-Arcand L, Beudet D, Vialle A, Hijri M (2016)** Molecular diagnostic toolkit for *Rhizophagus irregularis* isolate DAOM-197198 using quantitative PCR assay targeting the mitochondrial genome. *Mycorrhiza*. doi:10.1007/s00572-016-0708-1.
- Bagyaraj DJ (1992)** Vesicular-arbuscular mycorrhiza. Application in agriculture. *Methods in Microbiology* 24: 359-373.
- Bahram M, Pölme S, Kõljalg U, Zarre S, Tedersoo L (2012)** Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytol.* 193: 465-73.
- Bajwa GS, Sandhu HS, Bal JS (1988)** Effect of pruning severity on growth and bearing of ber. *Indian J. Hortic.* 22: 203–206.
- Barea JM, El-Atrach F, Azcon R (1991)** The role of VA mycorrhizas in improving plant N acquisition from soil as assessed with ¹⁵N. In: Flitton C (ed) The Use of Stable Isotopes in Plant Nutrition, Soil Fertility and Environmental Studies. Joint IAEA, FAO Division, Vienna, pp 677-808.
- Baum C, El-Tohamy W, Gruda N (2015)** Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Scientia Horticulturae* 187: 131–141.
- Baumer M (1995)** Arbres, arbrustes et arbrisseaux en Afrique occidentale Enda-Editions, Série Etudes et Recherches N° 168-170, 260 pp.

- Baylis GTS (1975)** The magnoloid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In: Sanders FE, Mosse B, Linker PE (eds) Endomycorrhiza. Academic, London, pp 373–389
- Bécard G, Fortin JA (1988)** Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, Roux C (2004)** Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Canadian Journal of Botany*: 1186-1197.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, et al. (2008)** Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456: 53-9.
- Berruti A, Lumini E, Balestrini R, Bianciotto V (2016)** Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. *Front. Microbiol.* 6:1559. doi: 10.3389/fmicb.2015.01559.
- Bever JD, Richardson SC, Lawrence BM, Holmes J, Watson M (2009)** Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters* 12: 13–21.
- Bolan NS (1991)** A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil*, vol. 134, pp. 189-207.
- Bonfante Paola, Genre A (2010)** Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications* 1: 48.
- Bonkougou EG, Djimde M, Ayuk ET, Zoungrana I, Tchoundjeu Z (1998)** Taking stock of agroforestry in the sahel-harvesting results for the future, in : Icrat (Ed.), End of phase report 1989–1996, Nairobi, Kenya, pp.1–58.
- Borriello R, Lumini E, Girlanda M, Bonfante P, Bianciotto V (2012)** Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biology and Fertility of Soils* 48: 911-922.
- Börstler B, Renker C, Kahmen A, Buscot F (2006)** Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity. *Biology and Fertility of Soils* 42: 286-298.
- Börstler B, Raab PA, Thiéry O, Morton JB, Redecker D (2008)** Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *New Phytol.* 180: 452-465.
- Börstler B, Thiéry O, Sýkorová Z, Berner A, Redecker D (2010)** Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology* 19: 1497-1511.
- Bouffaud ML, Bragalini C, Berruti A, Peyret-Guzzon M, Voyron S, Stockinger H, van Tuinen D, Lumini E, Wipf D, Plassart P, Lemanceau P, Bianciotto V, Redecker D, Girlanda M (2016)** Arbuscular mycorrhizal fungal community differences among European long-term observatories. *Mycorrhiza* 1–13. doi: 10.1007/s00572-016-0753-9.
- Brundrett M (1991)** Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research* 21: 171-313.

- Brundett M, Melville L, Peterson RL (1994)** Practical methods in mycorrhiza research. Mycological publication, Waterloo, Canada, 161 p.
- Brundrett M (2009)** Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320: 37-77.
- Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F (2009)** 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184: 449–456.
- Bürkert B, Robson A (1994)** ⁶⁵Zn uptake in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a root free sandy soil. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1117-1124.
- Cabin RJ, Weller SG, Lorence DH, Cordell S, Hadway LJ, Montgomery R, Goo D, Urakami A (2002)** Effects of light, alien grass and native species additions on Hawaiian dry forest restoration. *Ecological Applications* 12: 1595-1610.
- Campos-Soriano L, García-Martínez J, Segundo BS (2011)** The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leaves and confers resistance to pathogen infection. *Molecular Plant Pathology* 13: 579–592.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al (2010)** QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335-336.
- CBD [Convention on Biological Diversity] (2006)** Invasive Alien Species. Convention on Biological Diversity. Site Web: <http://www.biodiv.org/programmes/cross-cutting/alien/>.
- Chang DN (1996)** The use of arbuscular mycorrhiza (AM) fungi for horticultural crops. Technical-Bull. Food Fertil. Tech. Center 144, 7 pp.
- Chaudhary VB, Lau MK, Johnson NC (2008)** Macroecology of microbes - biogeography of the Glomeromycota. In: Varma A (ed) *Mycorrhiza: genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*. Springer-Verlag, Berlin, pp 529–562.
- Chevalier A (1947)** Les jujubiers ou *Ziziphus* de l'ancien monde et l'utilisation de leurs fruits [in French]. *Revue Internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale* (Paris), 27: 470-483.
- Chevalier A (1952)** Les jujubiers ou *Ziziphus* du Sahara [in French]. *Revue Internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale* (Paris), 32: 574-577.
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH (1995)** Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizae from a natural community. *New Phytol.* 130: 259–265.
- Clapp JP, Rodriguez A, Dodd JC (2002)** Glomales rRNA gene diversity-all that glistens is not necessarily glomalean? *Mycorrhiza* 12: 269-270.
- Clark RB (1997)** Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and Soil* 192: 15-22.
- Colonna JP, Thoen D, Ducouso M, Badji S (1991)** Comparative effects of *Glomus mosseae* and P fertilizer on foliar mineral composition of *Acacia senegal* seedlings inoculated with *Rhizobium*. *Mycorrhiza* 1: 35-38.

- Conversa G, Lazzizzera C, Bonasia A, Elia A (2013)** Yield and phosphorus uptake of a processing tomato crop grown at different phosphorus levels in a calcareous soil as affected by mycorrhizal inoculation under field conditions. *Biol. Fertil. Soils* 49: 691–703.
- Croll D, Wille L, Gamper HA, Mathimaran N, Lammers PJ, Corradi N, Sanders IR (2008)** Genetic diversity and host plant preferences revealed by simple sequence repeat and mitochondrial markers in a population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* 178: 672–687. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02381.x
- Dalpé Y, Diop T, Plenchette C, Gueye M (2000)** Biodiversity of Glomales with soil depth under *Faidherbia albida* in Senegal. *Mycorrhiza* 10: 125-129.
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001)** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Letters* 36: 203-209
- Danthu P, Soloviev P, Touré MA, Gaye A (2002)** Propagation végétative d'une variété améliorée de jujubier (*Ziziphus mauritiana* Lam.) introduite au Sénégal. *Bois et Fruits des Tropiques* 272: 93–96.
- Danthu P, Touré MA, Soloviev P, Sagna P (2004)** Vegetative propagation of *Ziziphus mauritiana* var. Gola by micrografting and its potential for dissemination in the Sahelian Zone. *Agroforestry System* 60: 247–253.
- Davies Jr FT, Potter JR, Linderman RG (1992)** Mycorrhiza and repeated drought exposure affect resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *Journal Plant Physiology* 139: 289-294.
- Davies Jr FT, Svenson SE, Cole JC, Phavaphutanon L, Durray SA, Olalde Portugal V, Meier CE (1996)** Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiology* 16: 985-993.
- Davison J, Opik M, Zobel M, Vasar M, Metsis M, Moora M (2012)** Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary throughout the growing season. *PloS One* 7: e41938.
- Davison J, Moora M, Öpik M, Adholeya A, Ainsaar L, Bâ A, Burla S, Diedhiou AG, Hiiesalu I, Jairus T, Johnson NC, Kane A, Koorem K, Kochar M, Ndiaye C, Pärtel M, Reier Ü, Saks Ü, Singh R, Vasar M, Zobel M (2015)** Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349: 970-973. doi: 10.1126/science.aab1161.
- De Caceres, M, Legendre P, Moretti M (2010)** Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos* 119: 1674–1684.
- De Caluwé E, Halamova K, Van Damme P (2010)** *Tamarindus indica* L. A Review of Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology, 38.
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernández F, Delmas NS, Declerck S (2005)** Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytol.* 165: 161-271.
- Depommier D (1988)** *Ziziphus mauritiana* Lam., culture et utilisation en pays Kapsiki (Nord-Cameroun). *Bois For. Trop.* 218: 57–63.
- Dia A, Niang AM (2010)** Projet Majeur de la Grande Muraille Verte de l'Afrique : Concepts et mise en œuvre. JOUVE (Éd.), pp. 11– 28.

- Diagana B (2003)** Land Degradation in Sub-Saharan Africa: What Explains the Widespread Adoption of Unsustainable Farming Practices? TOA project draft discussion paper.
- Diallo BO, Sanon J, Some DM, Cao TV, Asimi S (2000)** Rapport d'activité final. Projet FAC no 94/CD/78/BKA Volet 1: Amélioration génétique des ligneux soudano-sahéliens. INERA, Ouagadougou.
- Dickson S, Smith SE, Smith FA (1999)** Characterization of two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Allium porum* : colonization, plant growth and phosphate uptake. *New Phytol* 163-172.
- Diop AT, Gueye M, Dreyfus BL, Plenchette C, Strullu DG (1994)** Indigenous arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Acacia albida* Del. in different areas of Senegal. *Applied & Environmental Microbiology* 60: 3433-3436.
- Diop AT, Wade TK, Diallo A, Diouf M, Guèye M (2003)** *Solanum* cultivar responses to arbuscular mycorrhizal fungi: growth and mineral status. *African Journal of Biotechnology* 11: 429-433.
- Diouf D, Duponnois R, Ba AT, Neyra M, Lesueur D (2005)** Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* spp. improves salt tolerance in greenhouse conditions. *Functional plant biology* 32: 1143-1152.
- Djimdé M (1997)** *Ziziphus mauritiana* a live hedge species. Atelier pan africain sur *Ziziphus mauritiana*. ICRISATIICRAF Bamako, 18pp.
- Douds DD, Nagahashi G, Reider C, Hepperly P (2007)** Inoculation with AM fungi increases the yield of potatoes in a high P soil. *Biological Agriculture and Horticulture* 25: 67-78.
- Douds DD, Lee J, McKeever L, Zeigler-Ulsh C, Ganser Steven (2016)** Utilization of inoculum of AM fungi produced on-farm increases the yield of *Solanum lycopersicum*: A summary of 7 years of field trials on a conventional vegetable farm with high soil phosphorus. *Sci Hort* 207: 89-96.
- Ducouso M, Colonna JP, Badji S, Tohen D (1992)** Influence de l'azote et du phosphore sur l'établissement de la symbiose quadripartite: *Acacia holosericea/Bradyrhizobium* sp./*Glomus mosseae/Pisolithus* sp. In : Riedacker A, Dreyer E, Pafadnam C, Joly H, Bory G (éds), Physiologie des Arbres et Arbustes en zone arides et semi-arides. Groupe d'Etude de l'Arbre. Paris, pp. 215-228.
- Dumbrell AJ, Nelson M, Helgason T, Dytham C, Fitter AH (2010)** Idiosyncrasy and overdominance in the structure of natural communities of arbuscular mycorrhizal fungi: is there a role for stochastic processes? *J Ecol* 98: 419-428.
- Duponnois R, Plenchette C, Bâ AM (2001)** Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *G. aggregatum* in Senegal. *European Journal of Soil Biology* 37: 181-186.
- Duponnois R, Colombet A, Hien V, Thioulouse J (2005)** The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1460-1468.
- Duponnois R, Ouahmane L, Kane A, Thioulouse J, Hafidi M, Boumezzough A, Prin Y, Baudoin E, Galiana A, Dreyfus B (2011) Nurse shrubs increased the early growth of *Cupressus* seedlings by enhancing belowground mutualism and soil microbial activity. *Soil Biol. Biochem.* 43: 2160-2168.

- Echairi A, Nouaïm R, Chaussod R (2008)** Intérêt de la mycorhization contrôlée pour la production de plants d'arganier (*Argania spinosa*) en conditions de pépinière. *Sécheresse* 19: 277-281.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011)** UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200.
- Elahi FE, Aminuzzaman FM, Mridha MA, Begum B, Harun AK (2010)** AMF inoculation reduced arsenic toxicity and increased growth, nutrient uptake and chlorophyll content of tomato grown in arsenic amended soil. *Adv. Environ. Biol* 4: 194–200.
- Elsen A, Baimey H, Swennen R, De Waele D (2003)** Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza-nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.) differing in nematode susceptibility. *Plant and Soil* 256: 303-313.
- Estaun, V, Save R, Biel C (1997)** AM inoculation as a biological tool to improve plant revegetation of a disturbed soil with *Rosmarinus officinalis* under semi-arid conditions. *Applied Soil Ecology* 6: 223–229.
- Farmer MJ, Li X, Feng G, Zhao B, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D (2007)** Molecular monitoring of field-inoculated AMF to evaluate persistence in sweet potato crops in China. *Applied Soil Ecology* 35: 599–609.
- Filion M, St-Arnaud M, Fortin JA (1999)** Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytol.* 141: 525-533.
- Filion M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare SH (2003)** Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 53: 67–76.
- Fischer R.A, Yates F (1970)** Statistical tables for biological, agricultural and medical research, 6th edition. Hafner Publ. comp. Davien.
- Fitter AH (1988)** Water relations of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by VA mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought. *J. Expt. Bot.* 39 : 595–603.
- Fitter AH, Young JPW (2002)** Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology* 11: 1555–1564.
- Fitter AH, Helgason T, Hodge A (2011)** Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: implications for sustainable agriculture. *Trends Cell. Biol.* 25: 68-72.
- Fortin JA, Plenchette C, Piché Y (2008)** Les mycorhizes. La nouvelle révolution verte. MultiMondes Quae. (Eds.), Quebecs, 131 pp.
- Fortin JA, Plenchette C, Piché Y (2015)** Les mycorhizes. L'essor de la nouvelle révolution verte. Les Editions MultiMondes Inc, 163 pp.
- Franken P, Gianinazzi-Pearson V (1996)** Construction of genomic phage libraries of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Scutellospora castanea* and isolation of ribosomal RNA genes. *Mycorrhiza* 6: 167–173. doi:10.1007/s005720050122.
- Gamper HA, Young JPW, Jones DL, Hodge A (2008)** Real-time PCR and microscopy: are the two methods measuring the same unit of arbuscular mycorrhizal fungal abundance? *Fungal Genet. Biol.* 45: 581–596.
- Garbaye J (1991)** Utilisation des mycorhizes en sylviculture, in : Lavoisier (Éd.), Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées, Paris, France, pp. 197–248.

- Garbaje J (2013)** Une association entre les plantes et les champignons, Editions QUAE, 280 pp.
- Gehrig H, Schüßler A, Kluge M (1996)** Geosiphon pyriforme, a fungus forming endocytobiosis with Nostoc (Cyanobacteria) is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *Journal of Molecular Evolution* 43: 71-81.
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG (2005)** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell* 17: 3489-3499.
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963)** Spore of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- Gerdemann JW, Trappe JM (1974)** The Endogonaceae in the Pacific Northwest.
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Trouvelot A (1990)** Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. In: *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth* (JM Whipps, B Lumsden, eds), Cambridge University Press, Cambridge, UK, 41-54.
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010)** Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519-30. doi: 10.1007/s00572-010-0333-3.
- Gihring, TM, Green SJ, Schadt, CW (2012)** Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environ Microbiol* 14: 285-290.
- Giovannetti M, Gianinazzi-Pearson V (1994)** Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 98: 705-715.
- Giri B, Kapoor R, Mukerji KG (2003)** Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biology and Fertility of Soils* 38: 170-175.
- Goldbold DL, Sharrock R (2003)** Mycorrhizas. In: Schroth G, Sinclair FL (eds) *Trees, crops and soil fertility: concepts and research methods*. CAB international, Wallingford, pp 271-287.
- Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D (2004)** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14: 111-117.
- Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD (2006)** Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agric. Ecosyst. Environ.* 113: 17-35.
- Guèye S (2000)** Etude sur les ressources forestières et les plantations forestières du Sénégal. Période: 1992-99. FAO. 11 pages.
- Guissou T, Bâ AM, Guinko S, Duponnois R, Planchette C (1998a)** Influence des phosphates naturels et des mycorhizes à vésicules et à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale de *Zizyphus mauritiana* Lam. dans un sol à pH alcalin. *Ann. Sci. For.* 55: 925-931.
- Guissou T, Bâ AM, Ouadba JM, Guinko S, Duponnois R (1998b)** Responses of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth., *Tamarindus indica* L. and *Zizyphus mauritiana* Lam. to arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus deficient soil. *Biology Fertility of Soils* 26: 194-198.

- Guisso T, Bâ AM, Plenchette C, Guinko S, Duponnois R (2001)** Effets des mycorhizes à arbuscules sur la tolérance à un stress hydrique chez quatre arbres fruitiers *Balanites aegyptiaca* (L.) Del., *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth., *Tamarindus indica* L. et *Ziziphus mauritiana* Lam. *Sécheresse* 12: 121–127.
- Guisso T (2009)** Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to growth and nutrient uptake by jujube and tamarind seedlings in a phosphate (P)-deficient soil. *Afr J Microbiol Res* 3: 297–304.
- Guisso T, Sanon KB, Babana A, Bâ AM (2016)** Effect of arbuscular mycorrhizae on growth and mineral nutrition of greenhouse propagated fruit trees from diverse geographic provenances. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 20: 417-426.
- Hart M, Aleklett K, Chagnon P-L, Egan C, Ghignone S, Helgason T et al. (2015)** Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 207: 235-247.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998)** Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394:431.
- Helgason T, Fitter AH, Young JPW(1999)** Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular Ecology* 8: 659-666.
- Helgason T, Merryweather JW, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter AH (2002)** Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of cooccurring fungi and plants from temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371–384.
- Helgason T, Merryweather JW, Young JPW, Alastair HF (2007)** Specificity and resilience in the arbuscular mycorrhizal fungi of a natural woodland community. *Journal of Ecology* 95: 623-630.
- Hempel S, Renker C, Buscot F (2007)** Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* 9: 1930-1938.
- Hepper CM, Azcon-Aguilar C, Rosendahl S, Sen R (1988)** Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.). *New Phytol* 93: 401-413.
- Hetrick BAD, Wilson GWT, Todd TC (1996)** Mycorrhizal response in wheat cultivars: relationship to phosphorus. *Can. J. Bot.* 74: 19-25.
- Hijri I, Sykorova Z, Oehl F, Ineichen K, Mader P, Wiemken A, Redecker D (2006)** Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Mol. Ecol.* 15: 2277-2289.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H (2007)** Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139-46.
- Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC et al. (2010)** A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* 13: 394–407.
- Hutchinson J, Dalziel JM (1958)** Flora of West Tropical Africa. Crown Agents, London.
- Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML (2010)** Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* 12: 1889-1898.

- Ingleby K, Diagne O, Deans JD, Lindley DK, Neyra M, Ducouso M (1997)** Distribution of roots, arbuscular mycorrhizal colonization and spores around fast-growing tree species in Senegal. *Forest Ecology and Management* 90: 19-27.
- Jacquot E, van Tuinen D, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2000)** Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in planta and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. *Plant Soil* 226: 179-188.
- Jacquot-Plumey E, van Tuinen D, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (2001)** 25S rDNA-based molecular monitoring of glomalean fungi in sewage sludge-treated field plots. *Environ. Microbiol* 3: 525-531.
- Jaizme-Vega MC, Azcón R (1995)** Responses of some tropical and subtropical cultures to endomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 5: 213-217.
- Jakobsen I, Rosendahl L (1990)** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol* 115: 77-83. doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00924.x.
- Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD (1992)** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol* 120: 371-380. doi:10.1111/j.1469-8137.1992.tb01077.x.
- James TY, Kauff F, Schoch C, et al. (2006)** Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Janos DP (1980)** Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica* 12: 56-64.
- Jansa J, Wiemken A, Frossard E (2006)** The effects of agricultural practices on arbuscular mycorrhizal fungi. *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.* 266: 89-115. doi:10.1144/GSL.SP.2006.266.01.01.
- Jansa J, Smith FA, Smith SE (2008)** Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytol* 177: 779-789.
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM (2003)** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils* 37: 1-16.
- Jiang W, Guangqian G, Ding Y (2013)** Influence of arbuscular mycorrhizal function growth and mineral element absorption of *Chenglu* hybrid bamboo seedlings. *Pak. J. Bot.* 45: 303-310.
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997)** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol* 135: 575-585.
- Jumpponen A, Jones K, Blair J (2010)** Vertical distribution of fungal communities in tallgrass prairie soil. *Mycologia* 102: 1027-1041.
- Kivlin SN, Hawkes CV (2011)** Differentiating between effects of invasion and diversity: impacts of aboveground plant communities on belowground fungal communities. *New Phytol* 189: 526-535.
- Kjøller R, Rosendahl S (2000)** Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (single stranded conformation polymorphism). *Plant Soil* 226: 189-196. doi:10.1023/A:1026499923717.

- Kjøller R, Rosendahl S (2001)** Molecular diversity of glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field grown peas. *Mycol. Res.* 105: 1027-1032. doi:10.1016/S09537562(08)61964-4.
- Klironomos JN (2003)** Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84: 2292-2301. doi:10.1890/02-0413.
- Koch AM, Kuhn G, Fontanillas P, Fumagalli L, Goudet I, Sanders IR (2004)** High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2369-2374.
- Köhl L, Lukasiewicz CE, van der Heijden MGA (2016)** Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant, Cell and Environment* 39: 136–146.
- Koide RT (1991)** Density-dependent response to mycorrhizal infection in *Abutilon theophrasti*. *Medic. Oecologia* 85: 389-395.
- Koide RT, Mosse B (2004)** A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14: 145–163. doi:10.1007/s00572-004-0307-4.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD (2013)** Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79: 5112–5120.
- Krak K, Janoušková M, Čaklová P, Vosátka M, Štorchová H (2012)** Intraradical dynamics of two coexisting isolates of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* sensu lato as estimated by Real-Time PCR of mitochondrial DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3630-3637. doi:10.1128/AEM.00035-12.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schübler A (2009)** DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 183: 212-223.
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüssler A (2012)** Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New phytologist* 193: 970–84.
- Leake J, Johnson D, Donnelly D, Muckle G, Boddy L, Read D (2004)** Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Journal of Botany* 1045: 1016–1045.
- Leakey RRB, Simons AJ (1998)** The domestication and commercialization of indigenous trees in agroforestry for the alleviation of poverty. *Agroforest. Syst.* 38: 165–176.
- Leakey RRB (1999)** Potential for novel food products from agroforestry trees: a review. *Food Chem.* 66: 1-14.
- Lee J, Lee S, Young JPW (2008)** Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol* 65: 339–349.
- Lesueur D, Duponnois R (2005)** Relations between rhizobial nodulation and root colonization of *Acacia crassicarpa* provenances by an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices* Schenck & Smith or an ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius* Coker & Couch. *Ann. For. Sci.* 62: 467-474.

- Li XL, Marschner H, George E (1991)** Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant and Soil* 136: 49-57.
- Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J, Chu H (2012)** Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in north China revealed by 454 pyrosequencing. *Environmental Science and Technology* 46: 5764-5771.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ (2007)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant Journal* 50: 529-44.
- Liu Y, He L, An L, Helgason T, Feng H (2009)** Arbuscular mycorrhizal dynamics in a chronosequence of *Caragana korshinskii* plantations. *FEMS Microbiology Ecology* 67: 81-92.
- Liu Y, He J, Shi G, An L, Öpik M, Feng H (2011)** Diverse communities of arbuscular mycorrhizal fungi inhabit sites with very high altitude in Tibet Plateau. *FEMS Microbiology Ecology* 7: 355-365.
- Lloyd-MacGilp SA, Chambers SM, Dodd JC, Fitter AH, Walker C, Young JPW (1996)** Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. *New Phytol* 133: 103-111. doi:10.1111/j.1469-8137.1996.tb04346.x.
- Loján P, Senés-Guerrero C, Suárez JP, Kromann P, Schübler A, Declerck S (2016)** Potato field-inoculation in Ecuador with *Rhizophagus irregularis*: no impact on growth performance and associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Symbiosis*. doi: 10.1007/s13199-016-0471-2.
- Long EO, Dawid IB (1980)** Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49: 727-764.
- Maherali H, Klironomos JN (2007)** Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316: 1746-1748
- Makus DJ (2004)** Mycorrhizal inoculation of tomato and onion transplant improves earliness. *Acta Hort.* 631: 175-281.
- Manga AGB (2005)** Biodiversité des champignons mycorrhiziens arbusculaires d'*Acacia seyal* Del. et évaluation de leurs potentialités symbiotiques en milieu salé. Thèse de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 118pp.
- Manga A, Diop TA, van Tuinen D, Neyra M (2007)** Variabilité génétique des champignons mycorrhiziens associés à *Acacia seyal* en zone semi-aride du Sénégal. *Sécheresse* 18: 129-133.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE et al. (2005)** Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
- Marulanda A, Azcon R, Luiz-Lozano JM (2003)** Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiol. Plant.* 119: 526-533.

- Mathur N, Vyas A (1999)** Improved biomass production, nutrient uptake and establishment of in vitro raised *Ziziphus mauritiana* by VA mycorrhiza. *J Plant Physiol* 155: 129–132. doi: 10.1016/S0176-1617(99)80153-9.
- Mathur N, Vyas A (2000)** Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* Lam. under water stress. *J Arid Environ* 45: 191-195. doi: 10.1006/jare.2000.0644.
- Maydell DJ Von (1990)** Arbres et arbustes du Sahel. Leurs caractéristiques et leurs utilisations" Version française GTZ, Eschbom. 531 p.
- McGonigle TP (1988)** A numerical analysis of published field trials with vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. *Functional Ecology* 2: 473-478.
- Meiners SJ (2007)** Apparent competition: an impact of exotic shrub invasion on tree regeneration. *Biological Invasions* 9: 849-855.
- Merryweather J, Fitter AH (1998)** The arbuscular mycorrhizal fungi of Hyacinthoides non-scripta: I. Diversity of fungal taxa. *New Phytol* 138: 117-129.
- Miller DD, Domoto PA, Walker C (1985)** Colonization and efficacy of different endomycorrhizal fungi with Apple seedlings at two phosphorus levels. *New Phytol* 100: 393-402.
- Monzon A, Azcón R (1996)** Relevance of mycorrhizal fungal origin and host plant genotype to inducing growth and nutrient uptake in *Medicago* species. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 60: 9-15.
- Morton JB, Benny J (1990)** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an amediation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Morton JB, Bentivenga SP, Bever JD (1995)** Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Can J Bot* 73: S25-S32.
- Morton JB, Redecker D (2001)** Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195.
- Morton JB, Msiska Z (2009)** Phylogenies from genetic and morphological characters do not support a revision of Gigasporaceae (Glomeromycota) into four families and five genera. *Mycorrhiza* 20: 483-496. doi: 10.1007/s00572-010-0303-9.
- Mummey DL, Rillig MC, Holben WE (2005)** Neighboring plant influences on arbuscular mycorrhizal fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis. *Plant and Soil* 271: 83-90.
- Mummey DL, Antunes PM, Rillig MC (2009)** Arbuscular mycorrhizal fungi preinoculant identity determines community composition in roots. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 1173–1179.
- Ndoye F, Kane A, Mangaptché ELN, Bakhoun N, Sanon A, Diouf D, Sy MO, Baudoin E, Noba K, Prin Y (2012)** Changes in land use system and environmental factors affect arbuscular mycorrhizal fungal density and diversity, and enzyme activities in rhizospheric soils of *Acacia senegal* (L.) Willd. *ISRN Ecology*: 13.

- Németh T, Magyar M, Csatho P, Osztoics E, Baczo G, Hollo S et al (2002)** Long-term field evaluation of phosphate rock and superphosphate use strategies in acid soils of Hungary: two comparative field trials. *Nutr Cycl Agroecosyst* 63: 81–89. doi: 10.1023/A:1020529001629.
- Newman EI (1966)** A method of estimating the total length of a root in a sample. *J Appl Ecol* 3: 139-145. doi:10.2307/2401670.
- Newman EI, Reddell P (1987)** The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytol* 106: 745–751.
- Nouaim R, Chaussod R (1994)** Mycorrhizal dependency of micropropagated argan tree (*Argania spinosa*): I. Growth and biomass production. *Agroforest Syst* 27: 53–65.
- Nyaberi MO, Onyango CA, Mathooko FM, Maina JM, Makobe M, Mwaura F (2010)** Evaluation of phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of edible fruit extracts of *Ziziphus abyssinica* A. Rich. *Journal of Animal & Plant Sciences* 2: 623-629.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A (2003)** Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Applied and environmental microbiology* 69: 2816-2824.
- Oehl F, Sieverding E, Mäder P, Dubois D, Ineichen K, Boller T, Wiemken A (2004)** Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138: 574-583.
- Oehl F, de Souza FA, Sieverding E (2008)** Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. *Mycotaxon* 106: 311-360.
- Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Karl Stahr K, Bösch R, van der Heijden M, Sieverding E (2010)** Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 724-738.
- Oehl F, da Silva GA, Goto BT, Maia LC, Sieverding E (2011a)** Glomeromycota: two new classes and a new order. *Mycotaxon* 116: 365-379.
- Oehl F, da Silva GA, Goto BT, Sieverding E (2011b)** Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116: 75-120.
- Oehl F, da Silva GA, Sanchez-Castro I, Goto BT, Maia LC, Vieira HEE, Barea JM, Sieverding E, Palenzuela J (2011c)** Revision of Glomeromycetes with entrophosporoid and glomoid spore formation with three new genera. *Mycotaxon* 117: 297-316.
- Okafor JC (1991)** Amélioration des essences forestières donnant des produits comestibles. *Unasylva* 165: 17-23.
- Oliveira RS, Boyer LR, Carvalho MF, Jeffries P, Vosátka M, Castro PML, Dodd JC (2010)** Genetic, phenotypic and functional variation within a *Glomus geosporum* isolate cultivated with or without the stress of a highly alkaline anthropogenic sediment. *Appl. Soil Ecol.* 45: 39-48.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Kõljalg U, Zobel M, Sen R (2003)** Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytol.* 160: 581-593.

- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M (2006)** Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778-790.
- Öpik M, Metsis M, Daniell TJ, Zobel M, Moora M (2009)** Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytol* 184: 424-437.
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier Ü, Zobel M (2010)** The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol* 188: 223-241. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x.
- Öpik M, Zobel M, Cantero J, Davison J, Facelli J, Hiiesalu I, Jairus T, Kalwij J, Koorem K, Leal M, Liira J, Metsis M, Neshataeva V, Paal J, Phosri C, Põlme S, Reier U, Saks U, Schimann H, Thiéry O, Vasar M, Moora M (2013)** Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23: 411-430.
- Öpik M, Davison J, Moora M, Zobel M (2014)** DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botanique* 92: 135-147.
- Ouahmane L, Hafidi M, Plenchette C, Kisa M, Boumezouch A, Thioulouse J, Duponnois R (2006a)** *Lavandula* species as accompanying plants in *Cupressus* replanting strategies: effect on plant growth, mycorrhizal soil infectivity and soil microbial catabolic diversity. *Applied Soil Ecology* 34: 190-199.
- Ouahmane L, Hafidi M, Kisa M, Boumezouch A, Thioulouse J, Plenchette C, Duponnois R (2006b)** Some Mediterranean plant species (*Lavandula* spp. and *Thymus satureioides*) act as “plant nurses” for the early growth of *Cupressus atlantica*. *Plant Ecology* 185: 123-134.
- Ouédraogo M, Nikiéma A (1997)** Domestication de *Ziziphus mauritiana* Lam. Etude de l'aire de distribution au Burkina Faso et mise au point de quelques techniques de propagation. Paper presented at the Pan-African workshop on *Ziziphus mauritiana*, 16 – 20 June 1997, Bamako, Mali.
- Ouédraogo SJ, Bayala J, Dembélé C, Kaboré A, Kaya B, Niang A, Somé AN (2006)** Establishing jujube trees in sub-Saharan Africa: response of introduced and local cultivars to rock phosphate and water supply in Burkina Faso, West Africa. *Agrofor Syst* 68: 69-80.
- Ozer P, Hountondji YC, Niang AJ, Karimoune S, Laminou MO, Salmon M (2010)** Désertification au Sahel: Historique et perspectives. *Bulletin de la Société Géographique de Liège* 54: 69-84.
- Pareek OP (2001)** Ber. International Centre for Underutilised Crops. Southampton, UK.
- Pearson JN, Jakobsen I (1993)** The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants measured by dual labelling with ³²P and ³³P. *New Phytol* 124: 489-494. doi:10.1111/j.1469-8137.1993.tb03840.x.
- Pellegrino E, Bedini S, Avio L, Bonari E, Giovannetti M (2011)** Field inoculation effectiveness of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in a Mediterranean agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 367-376.

- Pellegrino E, Turrini A, Gamper HA, Cafà G, Bonari E, Young JPW, Giovannetti M (2012)** Establishment, persistence and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants in the field revealed using molecular genetic tracing and measurement of yield components. *New Phytol* 194: 810-822.
- Phillips JM, Hayman DS (1970)** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55: 158–161.
- Pimentel D, McNair S, Janecka J, Wightman J, Simmonds C, O’Connell C, Wong E, Russel L, Zern J, Aquino T, Tsomondo T (2002)** Economic and environmental threats of alien plant, animal and microbe invasions. in: Pimentel D (ed), CRC Press, London 307-329.
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V (1983)** Growth response of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil* 70: 199–209.
- Plenchette C, Clermont-Dauphin C, Maynard JM, Fortin JA (2005)** Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Canadian Journal of Plant Sciences* 85: 31-40.
- Pringle A, Bever JD (2008)** Analogous effects of arbuscular mycorrhizal fungi in the laboratory and a North Carolina field. *New Phytol* 180: 162–175.
- Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ (2011)** Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics* 12: 38.
- Raab P, Brennwald A, Redecker D (2005)** Mitochondrial large ribosomal subunit sequences are homogeneous within isolates of *Glomus* (arbuscular mycorrhizal fungi, Glomeromycota). *Mycological Research* 109: 1315-1322.
- Ræbild A (2012)** Improved management of fruit trees in West African parklands. *Agrofor. Syst* 85: 425–430.
- Ravnskov S, Jakobsen I (1995)** Functional compatibility in arbuscular mycorrhizas measured as hyphal P transport to the plant. *New Phytol* 129: 611–618.
- Redecker D, Thierfelder H, Walker C, Werner D (1997)** Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1756–1761.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000a)** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.
- Redecker D (2000b)** Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80.
- Redecker D, Raab P (2006)** Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98: 885-895.
- Redecker D, Schübler A, Stockinger H, Stuermer SL, Morton JB, Walker C (2013)** An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23: 515-531.
- Regvar M, Vogel-Mikus K, Severkar T (2003)** Effect of AMF inoculum from field isolates on the yield of green pepper, parsley, carrot, and tomato. *Folia Geobotanica* 38: 223–234.

- Reinhart KO, Wilson GWT, Rinella MJ (2012)** Predicting plant responses to mycorrhizae: integrating evolutionary history and plant traits. *Ecology Letters* 15: 689–695.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp HC-P (1994)** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 91: 11841–3.
- Renker C, Heinrichs J, Kaldorf M, Buscot F (2003)** Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza* 13: 191–198.
- Rodriguez A, Sanders IR (2015)** The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *International Society for Microbial Ecology* 9: 1053-1061.
- Rosendahl S, Dodd JC, Walker C (1994)** Taxonomy and phylogeny of the glomales. In: Impact of arbuscular mycorrhizae on sustainable agriculture and natural ecosystems. Edited by S. Gianinazzi and Schuepp H.
- Rosendahl S (2008)** Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 178: 253-266.
- Ruiz-Lozano JM, Azcon R, Gomez M (1995)** Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 456-460.
- Ruiz-Lozano JM (2003)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13: 309-317.
- Saks Ü, Davison J, Opik M, Vasar M, Moora M, Zobel M (2014)** Root-colonizing and soil-borne communities of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate forest understorey. *Botany-Botanique* 92: 277–285.
- Salvioli A, Zouari I, Chalot M, Bonfante P (2012)** The arbuscular mycorrhizal status has an impact on the transcriptome profile and amino acid composition of tomato fruit. *BMC Plant Biology* 12 : 44.
- Sanders IR, Alt M, Groppe K, Boller T, Wiemken A (1995)** Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol* 130: 419-427.
- Sanders IR (2004)** Plant and arbuscular mycorrhizal fungal diversity — are we looking at the relevant levels of diversity and are we using the right techniques? *New Phytol.* 164: 415-418. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01208.x.
- Sannazzaro AI, Echeverria M, Alberto EO, Ruiz OA, Menéndez AB (2007)** Modulation of polygamie balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 39-46.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, et al. (2009)** Introducing mothur: open-source, platform independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75: 7537-7541.
- Schnepf A, Roose T, Schweiger P (2008)** Impact of growth and uptake patterns of arbuscular mycorrhizal fungi on plant phosphorus uptake: a modelling study. *Plant Soil* 312: 85-99.

- Schnoor TK, Lekberg Y, Rosendahl S, Olsson PA (2011)** Mechanical soil disturbance as a determinant of arbuscular mycorrhizal fungal communities in semi-natural grassland. *Mycorrhiza* 21: 211-220.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, et al. (2012)** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 6241–6246.
- Schreiner RP (2005)** Mycorrhizae and mineral acquisition in grapevines. In: Christensen, L. P., Smart D (eds) Proceedings of the Soil Environment and Vine Mineral Nutrition Symposium. JP Christensen and DR Smart (Eds.). pp 49–60.
- Schüßler A (1999)** Glomales SSU rRNA gene diversity. *New Phytol* 144: 205-207.
- Schüßler A, Gehrig H, Schwarzott D, Walker C (2001a)** Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research* 105: 5-15.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001b)** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1414-1421.
- Schüßler A, Walker C (2010)** The Glomeromycota: a species list with new families and genera. Edinburgh & Kew, UK: The Royal Botanic Garden; Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon, USA: Oregon State University. URL: <http://www.amfphylogeny.com>. ISBN-13: 9781466388048; ISBN-10: 1466388048.
- Schwarzott D, Schüßler A (2001)** A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification and cloning AM fungal spores. *Mycorrhiza* 10: 203-207.
- Sène G, Thiao M, Manga A, Kane A, Samba-Mbaye R, Samba Mbaye M, Khasa D, Sylla SN (2012)** Arbuscular mycorrhizal soil infectivity and spores distribution across plantations of tropical, subtropical, and exotic tree species: a case study from the forest reserve of Bandia, Senegal. *African Journal of Ecology* 50: 218-232.
- Sensoy S, Demir S, Turkmen O, Erdinc C, Savur OB (2007)** Responses of some different pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Sci Hort* 113: 92–95.
- Shendure J, Ji H (2008)** Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26:1135-45.
- Sidibé D, Sanou H, Teklehaimanot Z, Mahamadi D, Kone S (2012)** The use of mycorrhizal inoculation in the domestication of *Ziziphus mauritiana* and *Tamarindus indica* in Mali (West Africa). *Agrofor Syst* 85: 519-528. doi:10.1007/s10457-0129486-8.
- Sieverding E (1991)** Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ). Eschborn, Germany, 371 pp.
- Sieverding E (1990)** Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 29: 369-390.
- Sieverding E, da Silva GA, Berndt R, Oehl F (2014)** *Rhizoglossus*, a new genus of the Glomeraceae. *Mycotaxon* 129: 373-386. doi: <http://dx.doi.org/10.5248/129.373>.
- Simard SW, Jones MD, Durall DM (2002)** Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In: van der Heijden MGA & Sanders IR, eds. *Mycorrhizal ecology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.

- Simon L, Lalonde M, Bruns TH (1992)** Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular arbuscular Endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 291-295.
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993a)** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67–69. doi:10.1038/363067a0.
- Simon L, Lévesque RC, Lalonde M (1993b)** Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4211–4215.
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V (1988)** Physiological interactions between symbionts in AM plants. *Annual review of plant biology* 39: 221–244.
- Smith SE, Read DJ (1997)** Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, second edition, Oxford, UK.
- Smith FA, Jakobsen I, Smith SE (2000)** Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytol* 147: 57-366. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00695.x.
- Smith SE, Read DJ (2008)** Mycorrhizal Symbiosis, 3rd edn. Academic Press, London.
- Smith SE, Read DJ (2010)** Mycorrhizal symbiosis. London: Academic Press, Access Online via Elsevier.
- Smith SE, Smith FA (2011)** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology* 62: 227-50.
- Smith SE, Jakobsen I, Grønlund M, Smith FA (2011)** Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol* 156: 1050-1057. doi:10.1104/pp.111.174581.
- Smith SE, Smith FA (2012)** Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104: 1-13. doi: 10.3852/11-229.
- Soloviev P, Gaye A (2002)** Optimisation du greffage pour trois espèces fruitières de cueillette des zones sahélo-soudaniennes: *Balanites aegyptiaca*, *Detarium senegalense* et *Tamarindus indica*. *Tropicultura* 22: 199–203.
- Soule A (2011)** Plantes ligneuses de Mauritanie: caractéristiques et usages. Fondation MON-3, 211 pp.
- Sousa CS et al. (2013)** Arbuscular mycorrhizal fungi within agroforestry and traditional land use systems in semi-arid Northeast Brazil. *Acta Scientiarum Agron.* 35: 307-314.
- Stewart AC, Osborne B, Read TD (2009)** A bacterial annotation pipeline for any genomics lab. *Bioinformatics* 25: 962-963.
- Stockinger H, Walker C, Schüßler A (2009)** ‘*Glomus intraradices* DAOM197198’, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytol* 183: 1176–1187.
- Stockinger H, Krüger M, Schüßler A (2010)** DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 187: 461-474. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x.

- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Koegel S, Bouffaud M-L, Redecker D (2014)** The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLoS One* 9:e107783.
- Strullu DG (1991)** Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. Techniques et Documentation Lavoisier. Paris. 242 pp.
- Subramanian KS, Charest C, Dwyer LM, Hamilton RI (1997)** Effects of mycorrhizas on leaf water potential, sugar and P contents during and after recovery of maize. *Can. J. Bot.* 75: 1582-1591.
- Sýkorová Z, Wiemken A, Redecker D (2007)** Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5426-5434.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011)** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739
- Tanabe Y, Saikawa M, Watanabe MM, Sugiyama J (2004)** Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 alpha and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 438-449.
- Tawaraya K (2003)** Arbuscular mycorrhizal dependency of different plant species and cultivars. *Soil Sc Plant Nut* 49: 655-668. doi:10.1080/00380768.2003.10410323.
- Tedersoo L, Nilsson RH, Abarenkov K, Jairus T, Sadam A, Saar I, Bahram M, Bechem E, Chuyong G, Koljalg U (2010)** 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytol* 188: 291-301.
- Tewari JC (2002)** Jujube: A Multipurpose Tree Crops for Solving Multiple Problems of Arid Lands. Central Arid Zone Research Institute. Jodhpur, India.
- Thiéry O, Börstler B, Ineichen K, Redecker D (2010)** Evolutionary dynamics of introns and homing endonuclease ORFs in a region of the large subunit of the mitochondrial rRNA in *Glomus* species (arbuscular mycorrhizal fungi, Glomeromycota). *Mol Phylogenet Evol* 55: 599-610. doi:10.1016/j.ympev.2010.02.013
- Thygesen K, Larsen J, Bodker L (2004)** Arbuscular mycorrhizal fungi reduce development of pea root-rot caused by *Aphanomyces euteiches* using oospores as pathogen inoculum. *European Journal of Plant Pathology* 110: 411-419.
- Tichý L, Chytrý M (2006)** Statistical determination of diagnostic species for site groups of unequal size. *J. Veg. Sci.* 17: 809-818.
- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, Kohler A, Symeonidi A, Balestrini R, et al. (2013)** Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 110: 0117–20122. doi:10.1073/pnas.1313452110
- Touré MA (2001)** Rajeunissement et micropropagation de *Ziziphus mauritiana* var. Gala par microbouturage et microgreffage in vitro. Mem. DEA; Unive. Chikh Anta Diop - Dakar, 60pp.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986)** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une

- signification fonctionnelle. In: Gianinazi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) Physiology and genetics aspects of mycorrhizae. INRA, Paris, pp 217-221.
- Turnau K, Ryszka P, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D (2001)** Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 10: 169-174.
- Urcelay C, Diaz S (2003)** The mycorrhizal dependence of subordinates determines the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant diversity. *Ecology Letters* 6: 388-391.
- Vandenkoornhuysen P, Husband R, Daniell TJ, Watson IJ, Duck JM, Fitter AH, Young JPW (2002)** Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology* 11: 1555-1564.
- Vandenkoornhuysen P, Ridgway KP, Watson IJ, Fitter AH, Young JPW (2003)** Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12: 3085-3095.
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998)** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- van Geel M, Busschaert P, Honnay O, Lievens B (2014)** Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing. *Journal of Microbiological Methods* 106: 93-100.
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V (1998a)** Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol. Ecol.* 7: 103-111.
- van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson V (1998b)** PCR in studies of AM fungi: from primers to application. In: Varma, A.K. (Ed.), *Mycorrhiza Manual*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 387-400.
- Varela-Cervero S, Vasar M, Davison J, Barea JM, Öpik M, Azcón-Aguilar C (2015)** The composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities differs among the roots, spores and extraradical mycelia associated with five Mediterranean plant species. *Environmental Microbiology*. 2882-2895 doi:10.1111/1462-2920.12810.
- Vashishtha BB (1997)** *Ziziphus* for drylands - a perennial crop solving perennial problems. *Agroforestry Today* 9: 10-12.
- Verbruggen E, van der Heijden MGA, Rillig MC, Kiers ET (2013)** Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytol* 1997: 1104-1109.
- Voets L, de la Providencia IE, Declerck S (2006)** Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytol* 172: 185-188. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01873.x. PMID:16995906.
- Walker C, Sanders FE (1986)** Taxonomic concepts in the endogonaceae. III: The separation of *Scutellospora* gen. Nov. From *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon XXXII* 17: 169-182.
- Walker C, Trappe JM (1993)** Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycological Research* 97: 339-344.

- Walker C, Vestberg M, Demircik F, Stockinger H, Saito M, Sawaki H, Nishmura I, Schüßler A (2007)** Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov, Ambisporaceae fam. nov, and emendation of Archaeospora and Archaeosporaceae. *Mycological Research* 111: 137-153.
- Wang FY, Liu RJ, Lin XG, Zhou JM (2004)** Arbuscular mycorrhizal status of wild plants in saline-alkaline soils of the Yellow River Delta. *Mycorrhiza* 14: 133-137.
- Wang B, Qiu YL (2006)** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.
- Wang YY, Vestberg M, Walker C, Hurme T, Zhang X, Lindström K (2008)** Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of mainland China. *Mycorrhiza* 18: 59-68.
- Wang FY, Hu JL, Lin XG, Qin SW, Wang JH (2011)** Arbuscular mycorrhizal fungal community structure and diversity in response to long-term fertilization: a field case from China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 67-74.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton G J (2009)** Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Whipps JM (2004)** Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82: 1198-1227.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A. D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds) PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic, San Diego, pp 315-322.
- Willis A, Rodrigues BF, Harris PJC (2013)** The ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Crit. Rev. Plant Sci.* 32: 1-20.
- Woese CR, Fox GE (1977)** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5088-5090.
- Wubet T, Weiß M, Kottke I, Teketay D, Oberwinkler F (2006)** Phylogenetic analysis of nuclear small subunit rDNA sequences suggests that the endangered African Pencil Cedar, *Juniperus procera*, is associated with distinct members of Glomeraceae. *Mycological Research* 110: 1059-1069.
- Xiang D, Verbruggen E, Hu Y, Veresoglou SD, Rillig MC, Zhou W, Xu T, Li H, Hao Z, Chen Y, Chen B (2014)** Land use influences arbuscular mycorrhizal fungal communities in the farming-pastoral ecotone of northern China. *New Phytol* 204: 968-978.
- Yao Q, Li XL, Feng G, Christie P (2001)** Influence of extramatrical hyphae on mycorrhizal dependency of wheat genotypes. *Commun Soil Sci Plant Anal* 32: 3307-3317.
- Zhao D, Zhao Z (2007)** Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hot-dry valley of the Jinsha River, southwest China. *Applied soil ecology* 37: 118-128.
- Zozio S, Servent A, Casal G, Mbégué-A-Mbégué D, Ravion S, Pallet D, Abel H (2014)** Changes in antioxidant activity during the ripening of jujube (*Ziziphus mauritiana* Lamk). *Food Chemistry* 150: 448-456.

Zuccarini P, Okurowska P (2008) Effects of mycorrhizal colonization and fertilization on growth and photosynthesis of sweet basil under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 31: 497-513.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1. Caractéristiques physico-chimiques du sol de Sangalkam (Bâ *et al.*, 1999).

| Composants | Teneurs |
|-----------------------|-----------|
| pH (H ₂ O) | 6,0 |
| Argile | 5,8 % |
| Limon | 5,4 % |
| Sable | 88,8 % |
| Matière organique | 0,6 % |
| Carbone total | 0,3 % |
| Azote total | 0,02 % |
| Rapport C/N | 14 |
| Potassium total | 333,5 ppm |
| Calcium total | 1,03 ppm |
| Magnésium total | 0,3 ppm |
| Phosphore total | 41,4 ppm |
| Phosphore assimilable | 2,1 ppm |

Annexe 2. Liste des publications

➤ Articles publiés

1. **Babacar Thioye**, Sergio Mania de Faria, Aboubacry Kane, Cheikh Ndiaye, Ould Ahmedou Soule, Dioumacor Fall, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ (2017) **Growth response of different species of *Ziziphus* to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi.** *Fruits - the International Journal of Tropical and Subtropical Horticulture* 72:174–181.

2. Fatoumata Fall, Diégane Diouf, Dioumacor Fall, Niokhor Bakhom, **Babacar Thioye**, Aboubacry Kane, Cheikh Ndiaye, Ibrahima Ndoeye, Amadou Mustapha Bâ (2017) **Growth and physiological responses of *Sporobolus robustus* kunth seedlings to salt stress.** *Arid Land Research and Management* 31–46. <http://dx.doi.org/10.1080/15324982.2016.1246491>



Growth response of different species of *Ziziphus* to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi

B. Thioye^{1,2,3,6,*}, S. Mania de Faria⁴, A. Kane^{1,2}, C. Ndiaye², A. Ould Soule², D. Fall⁵, R. Duponnois³, S.N. Sylla^{1,2} and A.M. Bâ^{3,6}

¹Département de Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop, BP 5005, Dakar, Senegal

²Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, BP 1386, Bel-Air Dakar, Senegal

³Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR113 INRA/AGRO-M/CIRAD/IRD/UM2-TA10/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, France

⁴Embrapa Agrobiologia, Km 7 BR 465 Seropedica, Rio de Janeiro, Cep 23890 000, Brazil

⁵Centre National de Recherches Forestières (CNRF), BP 2312, Dakar-Hann, Senegal

⁶Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, Faculté des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles, BP 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

*Ecole Normale Supérieure de Nouakchott, BP 990, Mauritania

Summary

Introduction – Many species of *Ziziphus* are underutilized crops despite their potential interests in agroforestry systems. Except for *Ziziphus mauritiana*, the effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on growth and mineral nutrition of *Ziziphus* spp. is not known. The aim of our study was to evaluate the mycorrhizal dependency (MD) of *Ziziphus* spp. in greenhouse conditions. **Materials and methods** – Three isolates of AMF were used: *Rhizophagus irregularis* isolate IR27, *Funneliformis mosseae* isolate DAOM227131 and *Rhizoglyphus intraradices* isolate DAOM197198, on seven species of *Ziziphus*: *Z. mauritiana*, *Z. lotus*, *Z. spina-christi*, *Z. mucronata*, *Z. amphibia*, *Z. abyssinica* and *Z. sphaerocarpa*. Plants were grown in nursery receiving 20 g portions of a crude inoculum of AMF. The experiment was set up as a 4 × 7 factorial design consisting of three AMF, one control (disinfected soil without inoculum) and seven *Ziziphus* spp. **Results and discussion** – Inoculation by AMF significantly improved growth and mineral nutrition of *Ziziphus* spp., particularly the P nutrition. Mycorrhizal dependency values of *Ziziphus* spp. declined with AMF in the following order *R. irregularis* (69.51%), *R. intraradices* (63.58%) and *F. mosseae* (52.45%). Total length of AMF hyphae in soil samples from inoculated treatments was significantly higher in all *Ziziphus* spp. with *R. intraradices* combinations. The differences of MD among the tested *Ziziphus* spp. seem to be due to differences in the development of hyphal length in the soil and in P uptake by the external hyphae. **Conclusion** – *Rhizophagus irregularis* constitutes a promising tool for the production of higher quality nursery stock with expected improved performance of *Ziziphus* spp. in agroforestry systems.

Keywords

Senegal, jujube, *Ziziphus* spp., mycorrhizal dependency, tree nursery, mineral nutrition, hyphal length, agroforestry system

Significance of this study

What is already known on this subject?

- The effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is well and widely known for the growth and mineral nutrition of *Z. mauritiana* seedlings.

What are the new findings?

- Mycorrhiza inoculation, particularly with *R. irregularis* isolate IR27, promoted seven species of *Ziziphus* (including *Z. mauritiana*) growth by enhancing significantly biomass production and nutrient uptake under greenhouse conditions.

What is the expected impact on horticulture?

- *Rhizophagus irregularis* isolate IR27 constitutes a promising tool for the production of higher quality nursery stock with potential improved field performance of species of *Ziziphus* in agroforestry systems.

Résumé

Réponse à l'inoculation de différentes espèces de *Ziziphus* avec des champignons mycorrhiziens à arbuscules.

Introduction – Plusieurs espèces de *Ziziphus* sont sous-utilisées malgré leur intérêt potentiel dans les systèmes agroforestiers. L'efficacité des champignons mycorrhiziens à arbuscules (CMA) sur la croissance et la nutrition minérale de *Ziziphus* spp. n'est pas connue à l'exception de *Ziziphus mauritiana*. L'objectif de notre étude était d'évaluer la dépendance mycorrhizienne (DM) de *Ziziphus* spp. en serre. **Matériel et méthodes** – Trois souches de CMA ont été utilisées: *Rhizophagus irregularis* isolat IR27, *Funneliformis mosseae* isolat DAOM227131 et *Rhizoglyphus intraradices* isolat DAOM197198, sur sept espèces de *Ziziphus*: *Z. mauritiana*, *Z. lotus*, *Z. spina-christi*, *Z. mucronata*, *Z. amphibia*, *Z. abyssinica* et *Z. sphaerocarpa*. Les plants cultivés en pépinière ont reçu une portion de 20 g d'inoculum de CMA. L'expérience a été mise en place suivant un dispositif de type factoriel 4 × 7

* Corresponding author: babacarthioye@yahoo.fr.

Annexe 3. Liste des communications

➤ Communications orales

1. **Babacar Thioye**, Hervé Sanguin, Aboubacry Kane, Frédéric Mahé, Cheikh Ndiaye, Diaminatou Sanogo, Dioumacor Fall, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ. **Impact of inoculation with *Rhizophagus irregularis* IR27 on native arbuscular mycorrhizal fungal communities associated to *Ziziphus mauritiana* Lam. in agroecosystems.** Conférence Intensification Durable. 24-26 avril 2017, Dakar, Sénégal.
2. **Babacar Thioye**, Hervé Sanguin, Aboubacry Kane, Cheikh Ndiaye, Sergio de Faria, Abdala Diédhiou, Dioumacor Fall, Mor Bâ, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ. **Etude des communautés de champignons mycorrhiziens à arbuscules associées au jujubier (*Zizyphus mauritiana* Lam.) sur le tracé du projet Grande Muraille Verte au Sénégal: impact de l'inoculation, de la fertilisation phosphatée et de la provenance de l'hôte.** Colloque Journées Jean Chevaugeon, 11èmes Rencontres de Phytopathologie-Mycologie. 25-29 janvier 2016, Aussois, France.
3. **Babacar Thioye**, Hervé Sanguin, Dirk Redecker, Aboubacry Kane, Diederik van Tuinen, Frédéric Mahé, Cheikh Ndiaye, Dioumacor Fall, Sergio de Faria, Diaminatou Sanogo, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ. **Persistence de *Rhizophagus irregularis* IR27 et son impact sur les communautés mycorrhiziennes et la production fruitière du jujubier (*Ziziphus mauritiana* Lam.) en plantation.** Colloque IAVAO/IESOL/LAPSE « Biodiversité et processus écologique au service d'une agriculture durable en Afrique de l'Ouest », 10-11 Mai 2016, Dakar, Sénégal.
4. **Babacar Thioye**, Hervé Sanguin, Aboubacry Kane, Abdala Diédhiou, Cheikh Ndiaye, Mor Bâ, Dioumacor Fall, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ. **La Grande Muraille Verte vue au travers de NTS.** Atelier régional en Bioinformatique SENE BIO2015 "Traitement des données issues des nouvelles technologies de séquençage (NTS), application en microbiologie environnementale" 16-20 novembre 2015, Dakar, Sénégal.
5. Babacar Thioye. **Stratégie d'ingénierie écologique basée sur la mycorhization de *Zizyphus mauritiana* (Jujubier) sur le tracé du projet Grande Muraille Verte: Impact sur la diversité native des communautés mycorrhiziennes.** 7^{ème} Edition du Printemps de Baillarguet 04-05 juin 2015 à Montpellier, France.

6. **Babacar Thioye**, Aboubacry Kane, Cheikh Ndiaye, Mor Bâ, Abdala Diédhiou, Dioumacor Fall, Hervé Sanguin, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ. **Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and rock phosphate fertilization on growth and nutrition of *Zizyphus mauritiana* Lam. on the route of the Great Green Wall.** International Congress on Mycorrhizae. 15-17 October 2014, Marrakesh-Morocco.

7. Babacar Thioye. **Effet de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance et la nutrition du jujubier sur le tracé du projet Grande Muraille Verte.** 5^{ème} Edition Doctoriales ED-SEV "Insertion Professionnelle du Docteur" 16-17 juin 2014, UCADII, Dakar, Sénégal.

8. **Babacar Thioye**, Aboubacry Kane, Abdala Diédhiou, Cheikh Ndiaye, Mor Bâ, Dioumacor Fall, Hervé Sanguin, Robin Duponnois, Samba Ndao Sylla, Amadou Bâ. **Effet de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance et la nutrition du jujubier sur le tracé du projet Grande Muraille Verte.** 2^{ème} journées du LAPSE 18-19 février 2014, UCADII, Dakar, Sénégal.



Impact of inoculation with *Rhizophagus irregularis* IR27 on native arbuscular mycorrhizal fungal communities associated to *Ziziphus mauritiana* Lam. in agroecosystems

**Babacar Thioye^{1,2,4}, Hervé Sanguin², Aboubacry Kane¹, Frédéric Mahé²,
Cheikh Ndiaye¹, Diaminatou Sanogo³, Dioumacor Fall³,
Robin Duponnois², Samba N. Sylla¹, Amadou Bâ^{2,4}**

¹Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM) IRD/ISRA/UCAD, Sénégal
²Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), France
³Centre National de Recherches Forestières, Sénégal
⁴Université des Antilles, Guadeloupe, France

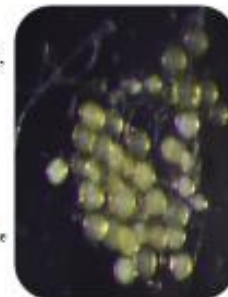
Sustainable Intensification Conference (CID2017)
Biodiversity and ecological engineering for sustainable intensification of agriculture
Dakar, Senegal, 2017 April 24th to 26th



Etude des communautés de champignons mycorrhiziens à arbuscules associées au jujubier (*Zizyphus mauritiana*) sur le tracé du projet Grande Muraille Verte au Sénégal: impact de l'inoculation, de la fertilisation phosphatée et de la provenance de l'hôte



**Babacar Thioye^(1,2,6), Hervé Sanguin⁽²⁾, Aboubacry Kane⁽¹⁾,
Cheikh Ndiaye⁽¹⁾, Abdala Diédhiou⁽¹⁾, Sergio de Faria⁽³⁾,
Dioumacor Fall^(1,4), Mor Bâ⁽⁵⁾, Robin Duponnois⁽²⁾,
Samba Ndao Sylla⁽¹⁾, Amadou Bâ^(2,6)**



(1) Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM) IRD/UCAD/ISRA, Dakar, Sénégal
(2) CIRAD Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Montpellier, France
(3) Embrapa Agrobiologia, Seropédica Rio de Janeiro, Brésil
(4) Centre National de Recherches Forestières (CNRF), ISRA, Dakar, Sénégal
(5) Agence Nationale de la Grande Muraille Verte, Dakar, Sénégal
(6) Université des Antilles, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France



Journées Jean Chevaugnon
11èmes Rencontres de Phytopathologie-Mycologie
25-29 janvier 2016 - Aussois, Savoie (France)



Persistance de *Rhizophagus irregularis* IR27 et son impact sur les communautés mycorhiziennes et la production fruitière du jujubier (*Ziziphus mauritiana* Lam.) en plantation

Thioye B^{1,2,3}, Sanguin H², Redecker D³, Kane A¹, Diederik VT³, Mayé F², Ndiaye C¹, Dioumacor F^{1,4}, De Faria S⁵, Sanogo D⁴, Duponnois R², Sylla SN¹, Bâ AM²

⁽¹⁾ LCM UCAD/IRD/ISRA, Dakar, Sénégal, ⁽²⁾ LSTM IRD/CIRAD/UM/INRA/Sup-Agro, Montpellier, France, ⁽³⁾ Université de Bourgogne/UMR1347 Agroécologie/INRA, Dijon, France, ⁽⁴⁾ DRPF/ISRA, Dakar, Sénégal, ⁽⁵⁾ EMBRAPA, Rio de Janeiro, Brésil

Colloque IAVAO/IESOL/LAPSE «Biodiversité et processus écologique au service d'une agriculture durable en Afrique de l'Ouest», 10-11 Mai 2016, Dakar (Sénégal)



La Grande Muraille Verte vue au travers des NTS

Babacar Thioye ^(1,2), Hervé Sanguin ⁽²⁾, Aboubacry Kane ⁽¹⁾, Abdala Diédhiou ⁽¹⁾, Cheikh Ndiaye ⁽¹⁾, Mor Bâ ⁽³⁾, Dioumacor Fall ^(1,4), Robin Duponnois ⁽²⁾, Samba Sylla ⁽¹⁾, Amadou Bâ ⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM) IRD/UCAD/ISRA, Dakar, Sénégal
⁽²⁾ Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), Montpellier, France
⁽³⁾ Agence Nationale de la Grande Muraille Verte, Dakar, Sénégal
⁽⁴⁾ Centre National de Recherches Forestières (CNRF), ISRA, Dakar, Sénégal

Stratégie d'ingénierie écologique basée sur la mycorhization de *Zizyphus mauritiana* (Jujubier) sur le tracé du projet Grande Muraille Verte: Impact sur la diversité native des communautés mycorhiziennes



Babacar Thioye
Doctorant UAG/UCAD



Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and rock phosphate fertilization on growth and nutrition of *Zizyphus mauritiana* Lam. on the route of the Great Green Wall

Babacar Thioye^{1,4}, Aboubacry Kane¹, Cheikh Ndiaye¹, Mor Bâ², Abdala G. Diédhiou¹, Dioumacor Fall³, Hervé Sanguin⁴, Robin Duponnois⁴, Samba N. Sylla¹, Amadou M. Bâ⁴

¹ Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/UCAD/ISRA, Centre de Recherche de Bel Air, BP 1386, Dakar, Sénégal

² Agence Nationale de la Grande Muraille Verte, N° 10623 Bis Sacré-cœur3, Dakar, Sénégal

³ Centre National de Recherches Forestières (CNRF/ISRA) BP 2312, Dakar, Sénégal

⁴ Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (UMR LSTM), F-34398, Montpellier, France



Effet de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance et la nutrition du jujubier sur le tracé du projet Grande Muraille Verte

Babacar Thioye

Directeur de thèse: Pr Samba Ndao Sylla (UCAD)

Co-directeur de thèse: Pr Amadou Bâ (UAG)

5^{ème} Edition Doctoriales ED-SEV

Thème: Insertion Professionnelle du Docteur

16-17 juin 2014

Université Cheikh Anta Diop, Dakar (Sénégal)

LCM



Effet de l'inoculation et de la fertilisation phosphatée sur la croissance et la production fruitière du jujubier sur le tracé du projet Grande Muraille Verte

**Babacar Thioye⁽¹⁾, Aboubacry Kane⁽¹⁾, Abdala Diédhiou⁽¹⁾, Cheikh Ndiaye⁽¹⁾, Mor Bâ⁽²⁾,
Dioumacor Fall⁽⁴⁾, Hervé Sanguin⁽³⁾, Amadou Bâ⁽³⁾**

⁽¹⁾ Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM) IRD/UCAD/ISRA, Dakar, Sénégal

⁽²⁾ Agence Nationale de la Grande Muraille Verte, Dakar, Sénégal

⁽³⁾ Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), Montpellier, France

⁽⁴⁾ Centre National de Recherches Forestières (CNRF), ISRA, Dakar, Sénégal

2^{èmes} journées du LAPSE

18-19 Février 2014

Université Cheikh Anta Diop, Dakar (Sénégal)



LCM

➤ **Communication affichée (Poster)**

Babacar Thioye, Dirk Redecker, Diederik van Tuinen, Aboubacry Kane, Dioumacor Fall, Hervé Sanguin, Diaminatou Sanogo, Robin Duponnois, Samba N. Sylla, Amadou Bâ (2016). Analysis of persistence and effectiveness of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* isolate IR27 inoculated on jujube trees (*Ziziphus mauritiana* Lam.) in the field, using the RPB1 gene marker and measurement of fruit yield. 5th International EcoSummit 2016, Ecological Sustainability: Engineering Change 29 August - 1 September 2016, Montpellier, France.

Babacar Thioly^{1,2,3,4}, Dirk Redecker³, Diederik van Tuinen⁴, Aboubacry Kane¹, Cheikh Ndiaye¹, Dioumacor Fall⁵, Hervé Sanguin², Diaminatou Sanogo⁵, Robin Duponnois², Samba Ndao Sylla¹, Amadou Bâ^{2,6}

¹Laboratoire Commun de Microbiologie IRD-ISRA/UCAD, Laboratoire mixte international Adaptation des Plantes et microorganismes associés aux Stress environnementaux (LAPSE), Sénégal; ²Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), France; ³Université de Bourgogne/UMRI1347 Agroécologie, France; ⁴INRA/UMRI1347 Agroécologie, France; ⁵Centre National de Recherches Forestières, Sénégal; ⁶Laboratoire de biologie et physiologie végétales, Université des Antilles, Guadeloupe, France



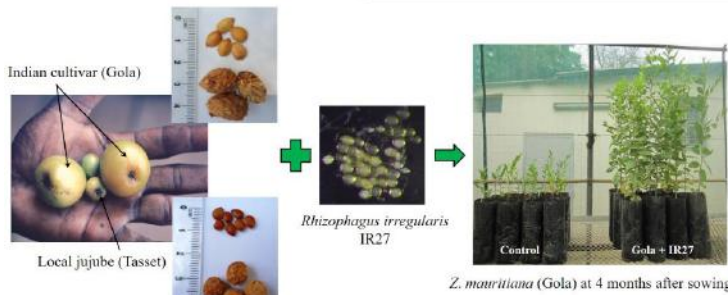
Ziziphus mauritiana Lam.

Ziziphus mauritiana Lam., commonly named jujube, is a multipurpose fruit tree well adapted and commonly used (eg. fruits, fodder) by local inhabitants in Sahelian and Sudanian areas in West Africa [1]. West African farmers are interested by Indian cultivars because of their precocity in fruiting, the larger size of their fruits and their taste [2, 3]. Furthermore, the orchards in its zone were found to be deficient in P, one of the most important soil factors determining productivity and quality of jujube fruits. Until now, the success of mycorrhizal plants has been based on plants inoculated with the *Rhizophagus irregularis* isolate IR27 under nursery conditions, while AMF inoculation has received little attention in the field [4]. The aim of our study was to evaluate the persistence and effectiveness of the *R. irregularis* isolate IR27 on growth and fruit yield of two provenances of jujube (Tasset from Senegal and Gola from India) in nursery and field conditions.



Jujubes

Experiment in greenhouse conditions



Effect of inoculation with *R. irregularis* IR27 on growth and mycorrhizal colonization of *Z. mauritiana* provenances at 4 months after sowing

| Treatment | Height (cm) | Collar diameter (mm) | Total dry biomass (g) | Mycorrhizal infection (%) |
|-----------|--------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| Tasset | 15.2 ± 1.1 d | 1.7 ± 0.2 c | 0.9 ± 0.2 c | - |
| Tasset+Ri | 33.6 ± 3.2 b | 3.2 ± 0.3 b | 1.3 ± 0.4 b | 64.4 ± 6.1 b |
| Gola | 23.4 ± 1.2 c | 2.1 ± 0.1 e | 1.7 ± 0.2 b | - |
| Gola+Ri | 48.2 ± 2.2 a | 4.2 ± 0.4 a | 2.6 ± 0.5 a | 70.2 ± 9.3 a |

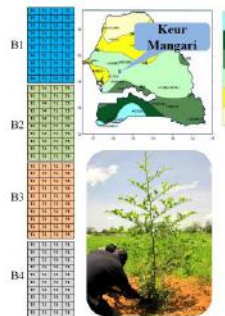
Provenance (P) *** * *** ns
Inoculation (I) *** *** *** ***
(P) × (I) *** ** *** ns

Significant levels: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns=not significant, according Tukey's HSD

Mycorrhizal treatments of plants had significantly-greater growth than non-inoculated. Gola provenance inoculated grew better than Tasset provenance inoculated.

Experiment in field conditions

Study site and experimental design



Effect of inoculation with *R. irregularis* IR27 on growth, rate of survival and mycorrhizal colonization of *Z. mauritiana* provenances 24 months after transplanting

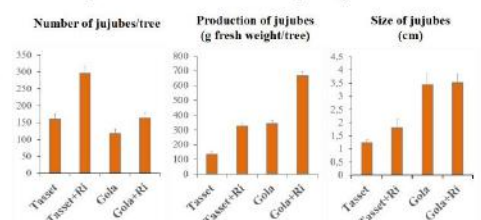
| Treatment | Height (cm) | Crown diameter (cm) | Mycorrhizal infection (%) | Rate of survival (%) |
|-----------|----------------|---------------------|---------------------------|----------------------|
| Tasset | 127.7 ± 07.9 c | 128.8 ± 10.0 c | 22.6 ± 3.8 b | 63.2 ± 10.0 b |
| Tasset+Ri | 309.7 ± 13.2 a | 280.1 ± 17.8 a | 46.1 ± 5.6 a | 82.5 ± 4.2 a |
| Gola | 159.4 ± 20.1 b | 168.3 ± 17.5 b | 19.0 ± 5.1 b | 55.0 ± 9.1 c |
| Gola+Ri | 284.5 ± 20.8 a | 295.3 ± 15.4 a | 45.3 ± 8.8 a | 80.0 ± 6.4 a |

Provenance (P) ** *** ns ns
Inoculation (I) *** *** *** *
(P) × (I) ** ** ns =

Significant levels: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns=not significant, according Tukey's HSD

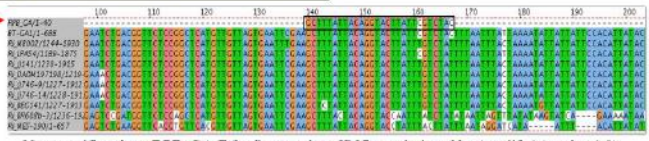
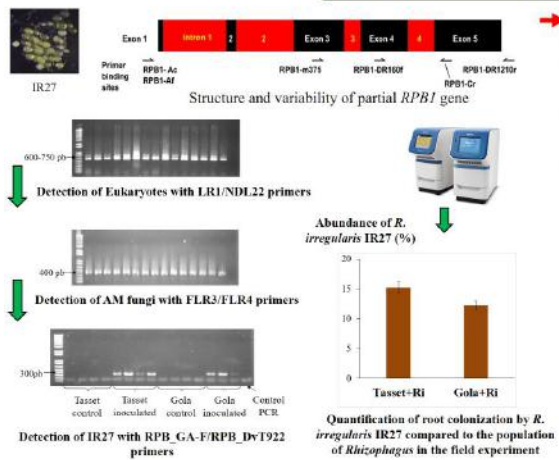
Positive effects of inoculation with *R. irregularis* IR27 on growth, mycorrhizal infection and rate of survival of the two provenances of jujube trees.

Effect of inoculation with *R. irregularis* IR27 on fruit production of *Z. mauritiana* provenances 18 months after transplanting



Positive effects of inoculation with *R. irregularis* IR27 on fruit production of the two provenances of jujube trees

Tracing the inoculated *R. irregularis* IR27 in *Z. mauritiana* roots



New specific primer RPB_GA-F for *R. irregularis* IR27 was designed by Amplify4 (version 1.0)

R. irregularis IR27 was specifically traced in inoculated roots by qPCR and still accounted for 12 to 15 % of the root colonization by *Rhizophagus*, 24 months after planting. Thus, RPB_GA-F/RPB_DvT922 primer is well suitable for tracking and quantification of *R. irregularis* IR27 in *Rhizophagus* communities associated to *Z. mauritiana* roots in the field. Overall, the results demonstrate that the ecological engineering strategy based on the use of *R. irregularis* IR27 is beneficial to jujube tree growth and fruit production in orchard. We have also shown that *R. irregularis* IR27, although still present 24 months after inoculation, is replaced by local species, and is not destroying the local mycorrhizal fungal community.

References
 [1] Chakrabarti H. (1991) Acclimatization des espèces forestières d'origine des régions tempérées. *Arborvitae* 64(9):17-25.
 [2] Makhadmeh B.B. (1997) *Ziziphus* for drylands - a potential crop for arid regions. *Agrochimica* 14(3): 9-12.
 [3] Drotts P., Sjöström M., Sjöström P., Sjöström P. (2004) Vegetative propagation of *Ziziphus mauritiana* var. *cordata* by stemcutting and its potential for dissemination in the Sahelian zone. *Agrochimica* 17(2):217-223.
 [4] Goussot J., Sanguin H., Buisson A. (in press) 2016) Effects of arbuscular mycorrhizae on growth and nutrient status of *Populus euphratica* L. in a semi-arid environment. *Biological Invasions*. *Agrochimica*, 2016: 417-436.

Acknowledgements
 LAPSE: Laboratoire d'Adaptation des Plantes et microorganismes associés aux Stress Environnementaux
 5th International EcoSummit Ecological Sustainability-Engineering
 August 29 - September 1 2016 Montpellier, France

Annexe 4. Films scientifiques

➤ Participation à la réalisation d'un Film de Sonia RUSPINI. « REPARER LA NATURE : l'EAU ». Sciences et vie Tv/ Produit par AB productions France - 2017.

➤ Participation à la réalisation d'un Film de Anne RIZZO et Thomas SIPP avec Paul STAMETS, Meg PINZA, Howard SPROUSE, Mikako SASA, Guillaume BECARD, Amadou BA, Mark FRICKER, Lynne BODDY et Jack WORD, Thom O'DELL, Soren KOFOOD, Esben Peter FRIIS, Alexandra HAOUY, Robin DUPONNOIS, Cheikh NDIAYE, Mame Khoudia CISSE, Diégane DIOUF, Fatoumata FALL, Haro HADOU, Mariama NGOM, Seynabou SENE, **Babacar THIOYE**, Momar BA, Aboubacry KANE, Luke HEATON, Nick JONES, Melanie SAVOURY, Jennifer HISCOX, George CLARKSON, Argyries CHOIMES, Joseph R SHIPCOTT. « LES CHAMPIGNONS pourront-ils sauver le monde? ». ARTE France / LES FILMS D'ICI / CNRS Images - 2013.

➤ Article en préparation dans *Frontiers in Microbiology*

Persistence and effectiveness of *Rhizophagus irregularis* isolate IR27 on the fruit production of jujube trees in a semiarid field condition

Babacar Thioue^{1,2,*}, Dirk Redecker³, Hervé Sanguin², Diederik van Tuinen³, Aboubacry Kane¹, Frédéric Mahé², Sergio de Faria Mania⁴, Dioumacor Fall⁵, Diaminatou Sanogo⁵, Cheikh Ndiaye¹, Robin Duponnois², Samba Ndao Sylla¹, Amadou Mustapha Bâ^{2,6}

¹Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, BP 5005 Dakar, Sénégal; ²Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes UMR113 INRA/AGRO-M/CIRAD/IRD/UM2-TA10/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, France; ³Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France; ⁴Embrapa Agrobiologia Km 7 BR 465 Seropedica Rio de Janeiro, Cep 23890 000, Brazil; ⁵Centre National de Recherches Forestières (CNRF), BP 2312, Dakar-Hann, Sénégal; ⁶Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, Faculté des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles, BP 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play a major as biofertilizer for sustainable agriculture. Nevertheless, it is still poorly documented whether inoculated AMF can successfully establish in field soils with exotic AMF and improve plant growth and productivity. Here, we inoculated two cultivars of provenances (Tasset and Gola) of the fruit tree *Ziziphus mauritiana* (jujube) with the exotic AM fungus *Rhizophagus irregularis* isolate IR27. There were four treatments to compare (Tasset non-inoculated, Tasset inoculated, Gola non-inoculated and Gola inoculated). All inoculated seedlings vs non-inoculated seedlings showed a significant increase in growth at the end of the nursery stage and these differences remained after 18 months on jujube growth in the field. Molecular analysis of AMF community based on MiSeq Illumina sequencing of 18S rRNA gene, revealed no significant effect of provenance and inoculation factors and their interactions on richness, diversity and abundance of native AM fungal communities whatever the inoculated treatments. The inoculant *R. irregularis* IR27 was specifically traced and discriminated from native *R. irregularis* isolates in roots by using qPCR assay targeting a fragment of the RNA polymerase II gene (*RPB1*) and still accounted for 12% to 15 % of the root colonization. Fruit production was significantly increased in inoculated jujubes compared with non-inoculated controls. Success and sustained positive effects of inoculation with *R. irregularis* IR27 hold promise for the role that AM fungal inoculum could play within fruit production of jujubes cultivated in semi-arid field conditions.

Keywords : *Ziziphus mauritiana* ; Glomeromycota ; qPCR ; MiSeq sequencing ; Ecological engineering ; Senegal

* Corresponding author: babacarthioye@yahoo.fr

1. Introduction

Indigenous fruit trees are an important biological resource in many agroecosystems all over the world (Awodoyin et al. 2015). They are important to rural people in the Sahelian and Sudanian zones in West Africa, both as a source of food and as a source of income (Tchoundjeu et al. 2008). They provide high-quality products (e.g. fruits, medicine, fuel, fodder, fibers), that provide food security, health and income-generating values for the farmers (Bonkougou et al. 1998). The species *Ziziphus mauritiana* Lam., commonly called jujube, is one of the most-sought indigenous fruit trees. The farmers are mainly interested in the fruit pulp, which is consumed fresh or dry, and also prepared into a juice (Ouédraogo et al. 2006). However, the fruits from local cultivars are small-sized, whereas farmers are more interested by domesticated Indian cultivars which produce early, large and tasty fruits. Although jujube cultivars with high potential for fruit production have been identified, little work has been done to bring them into improved management and domestication (Bâ et al. 2003). Domestication of fruit trees could be achieved through a combination of approaches including selection and multiplication of quality planting material, fertilization, irrigation, pruning, and controlled mycorrhization (Guissou et al. 1998; Ouédraogo et al. 2006; Bâ et al. 2003).

One of the most important plant-microbe mutualisms is the association formed between plant roots and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi of the phylum *Glomeromycota* (Schüssler et al. 2011; Hart et al. 2015). This common and widespread symbiosis involves 80% of land plants including many important crops and at least 250 morphologically defined AM fungal species. The latter provide mineral nutrients to plants in exchange for plant-synthesized carbon compounds. They can also contribute to soil aggregate formation and protect host plants against abiotic and biotic stresses. Based on their supportive function in plant nutrition, AM fungi are promoted as biofertilizers for sustainable agriculture (Verbruggen et al. 2013). Responses of jujube to inoculation differ with respect to functional compatibility with different AM fungi, measured as mycorrhizal formation, root colonization, nutrient absorption and morphological properties of the root (Guissou et al. 1998; Bâ et al. 2000; Bâ et al. 2001). One AMF species, *Rhizophagus irregularis*, isolate IR27 (syn. *Glomus aggregatum* IR27), was one of the AM fungi providing high growth and mineral nutrition benefits for jujube seedlings under controlled nursery conditions (Bâ et al. 1996 ; Guissou et al. 1998; Bâ et al. 2000; Bâ et al. 2001; Guissou et al. 2016). Mycorrhizal dependency (MD) of jujube as

defined by Plenchette et al. (1983), can reach a maximum of 78%. As consequence of this, Bâ et al. (2001) suggested that the absence of AM inoculation on *Z. mauritiana* seedlings in nursery soil could lead to higher mortality of outplanted jujube trees in the field. Thus, jujubes inoculated with *R. irregularis* utilized more soluble P from rock phosphate (RP) than non-AM jujubes (Bâ et al. 2001) in P deficiency soils, one of the limiting factors for the establishment of tree plantations in West Africa (Friesen et al. 1997). The majority of the published papers on jujube demonstrate the benefits of inoculation with *R. irregularis* isolate IR27 in terms of growth and P acquisition in sterile nursery soils and compare the growth of colonized jujubes with AM fungi and non-colonized jujubes, a situation rarely occurring in field conditions, since most plants are colonized to some extent by AM fungi (Köhl et al. 2016).

The questions of how the exotic AM fungal species would modify the indigenous AM fungal community and persist in roots of inoculated plants are still poorly understood in field conditions (Alguacil et al. 2011; Pellegrino et al. 2011; Pellegrino et al. 2012; Köhl et al. 2016). There are few experiments that have verified the field performance of plants inoculated with exotic AM fungi. Pellegrino et al. (2012) suggest that only increases in crop yield and fungal persistence among indigenous AM community could justify inoculation with exotic AM fungi, given its cost of production. Another concern of inoculation with exotic AM fungi is the possibility to alter the structure and dynamic of indigenous AM fungal community (Rodriguez & Sanders 2015). Some studies demonstrated a decrease in the diversity of the indigenous AM fungal community after inoculation, whereas other studies did not (Pellegrino et al. 2012). Thanks to the development of molecular tools, it is possible to evaluate the impact of inoculation with exotic AMF on indigenous AM fungal communities. The development of molecular techniques permits to analyze the diversity of AM fungi distributed among plant roots (Hart et al. 2015). Next generation sequencing (NGS) approaches are useful to reveal AM fungal communities with sufficient depth to recover even rare fungal taxa (Taib et al. 2013; Hart et al. 2015). Many ecological studies have used ribosomal operon markers such as SSU rRNA gene targets for species identification of AM fungi in community surveys (Helgason et al. 1998; Öpik et al. 2010; Krüger et al. 2012; Öpik et al. 2014; Hart et al. 2015; Thiery et al. 2016). However, ribosomal operon markers are not appropriate to discriminate between isolates from a given AM fungal species. This is the case for *R. irregularis*, an ubiquitous AM fungus widely distributed in natural soils and utilized as biofertilizer inoculant in agricultural soils (Peyret-Guzzon et al. 2016; Köhl et al. 2016; Badri et al. 2016). Earlier studies have shown that some molecular markers such as mitochondrial

large ribosomal subunit (*mtLSU*) and the largest subunit of RNA polymerase II (*RPB1*) genes are useful to identify intraspecific genotypes of *R. irregularis* in colonized roots in the field (Stockinger et al. 2014; Peyret-Guzzon et al. 2016; Badri et al. 2016). Furthermore, these molecular markers enable highly specific and sensitive tracing of *R. irregularis* in any type of agriculturally managed field soil (Stockinger et al. 2014; Badri et al. 2016). To detect and quantify the abundance of *R. irregularis* in colonized roots, quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) is a relatively robust method and yields precise results using these molecular markers (Badri et al. 2016).

To our knowledge, there are few experiments done to verify the success and effectiveness of inoculating *R. irregularis* in the field despite the interests of this AM fungus in natural and agricultural soils (Pellegrino et al. 2012; Stockinger et al. 2014; Peyret-Guzzon et al. 2016; Köhl et al. 2016; Badri et al. 2016). The aim of this present study was to verify whether inoculated the *R. irregularis* isolate IR27 establishes functional symbioses and whether it contributes to fruit production of jujube trees. We specifically addressed the following unresolved questions regarding the inoculated jujube plants with the exotic *R. irregularis* isolate IR27 when transplanted to a semiarid field condition: (i) does *R. irregularis* contribute to increase fruit production of jujube trees? (ii) does inoculation of *R. irregularis* alter the composition and structure of the native AM fungal community? (iii) can *R. irregularis* be distinguished from different *R. irregularis* isolates among native AM fungal community after planting?

2. Materials and methods

2.1. Experiment in greenhouse conditions

2.1.1 Fungal and plant material

The soil used in the experiment was collected from Sangalkam (Senegal). It was a sandy soil with 88.8% sand, 5.8% silt, 5.4% clay, 0.6% organic matter, 0.3% total C, 0.02% total N, C/N ratio 14, 333.5 ppm total K, 41.4 ppm total P, 2.1 ppm P-Bray 1, Ca 1.03, Mg 0.3, pH (of a soil/water mixture, ratio 1:2) 6.0 and pH (of a soil/KCl mixture, ratio 1:2) 4.6 (Bâ et al. 1999). The soil was passed through a 2 mm sieve, sterilized for 4 hours in an autoclave at 180°C to eliminate native AM fungi, and transferred into plastic bags (1.5 kg of soil per plastic bag).

One isolate of AM fungus was used: *Rhizophagus irregularis* isolate IR27 (syn. *Glomus aggregatum* IR27 Schenck & Smith; Bâ et al. 1996). The AM fungal inoculum was provided by the LCM laboratory (IRD, Dakar, Senegal, certified ISO 9001, version 2000). It was propagated on maize (*Zea mays* L.) for 3 months on sterilized sandy soil under greenhouse conditions. Mycorrhizal inoculation of the soil was achieved by placing 20 g portions of a crude inoculum of AMF consisting of sand, spores, hyphae and colonized maize root fragments below the seeds during transplanting. The inoculum density of *R. irregularis* IR27 was calibrated by the most probable number method (Adelman & Morton 1986) as 1635 [763 ; 3483] infective propagules per 20 g of inoculum. Non-inoculated controls also received 20 g of autoclaved crude inoculum of AMF with a 10 ml water extract of the inoculum by filtration (Whatman No.1 filter paper) as controls to balance composition of the microbial community between inoculated and non-inoculated plants (Guissou et al. 1998).

Two cultivars of jujube seeds provenances (Tasset from Senegal and Gola from India) were provided by the CNRF/ISRA, Senegal. They were surface-sterilized with 1% NaOCl for 15 min, washed several times and soaked in sterile distilled water for 30 min before being planted in the soil as three per plastic bag. The seedlings were thinned to one plant per plastic bag 7 days after emergence. Plants were watered with tap water without fertilizer application and grown during 4 months (from April to July, 2013) under natural light regimen (35°C day, 27°C night, relative humidity 75% and 14 h photoperiod) during the period of growth in a greenhouse located at research center ISRA/IRD, Bel Air, Senegal (14°44'N, 17°30'W).

2.1.2 Experiment setup and plant growth

The experiment was set up as a 2x2 factorial design consisting of two jujube provenances, one AM fungus and non-inoculated control. There were four treatments (Tasset non-inoculated, Tasset inoculated, Gola non-inoculated and Gola inoculated) arranged in a completely randomized design with 50 replicates per treatment combination. A total of 100 seedlings were inoculated with *R. irregularis* and another 100 seedlings were not inoculated.

Four months after sowing, ten replicates per treatment were randomly harvested to measure height, collar diameter and dry weight of shoots and roots (48 h at 70° C). For AM root infection measurement, a part of fresh fine roots was collected from the root system of each seedling. Root were gently washed under tap water, bleached (KOH, 10%) at 80°C for 30

min, rinsed three times with tap water and stained in 0.05% Trypan blue at 80°C for 35 min following the method of Phillips and Hayman (1970). Percentage of root length colonized by the AM fungus was assessed at x40 magnification using 100 fragments of lateral roots (approximately 1 cm length) on microscopic slides. Mycorrhizal root colonization was evaluated by using the method of Trouvelot et al. (1986).

2.2 Experiment in field conditions

2.2.1 Experiment setup and plant growth

The remaining inoculated and non-inoculated seedlings from the nursery were transplanted to an orchard (14°27'N, 16°38'W) during the wet season (4 months) in order to compare the outplanting performance of the seedlings of the two provenances of jujubes inoculated with *R. irregularis* with those non-inoculated. Plantations were established using a fully randomized block design with two treatment levels for each provenance of jujubes (non-inoculated plants and inoculated plants), four blocks, and ten replicates per treatment and block. The distance between plants was 5 m in a row with spacing between rows of 3 m. All competing ground vegetation is regularly removed. Deep wells provide water in the orchard (3L per plant/week) during the dry season. The orchard is near the village of Keur Mangari in the rural community of Tattaguine at 15 km from Fatick city, located in the western center, Senegal. The orchard contains planted trees such as mango, cashew, citrus, orange and vegetable crops as salad, carrot and onion. The climate is semi-arid, with mean annual rainfalls varying from 450 to 600 mm. The soil was sandy with 0.14% total C, 0.04 mg Al, 0.02% total N, C/N ratio 14, 19.62 ppm total K, 26.9 ppm P-Bray 1, Ca 0.52, Mg 0.17, and pH (of a soil/water mixture, ratio 1:2) 5.43. The mycorrhizal soil infectivity was determined by the MPN method as 23.87 [11.9 ; 50.81] infective propagules per 100 g of soil.

2.2.2 Quantitative evaluation

Measurements were performed on ten plants for each treatment and block. They consisted to assess height and collar diameter of the main stem, crown diameter and rate of survival at 4, 8, 12 and 18 months after transplanting. Mycorrhizal colonization and fruit production were assessed at 18 months after transplanting. For each tree, mature fruits were harvested per

week during 2 months. The mean number, diameter and fresh weight of fruits were evaluated for each tree. Sub-samples of 20 fruits per treatment and per block were used to evaluate the mean diameter of fruits. Approximately 500 mg (fresh weight) of fine roots were randomly collected on three plants per treatment and per block. One part of the roots was preserved in ethanol 90% to determine the percentage of AM fungal colonization (see experiment in greenhouse conditions) and the other part dried in Silica-gel until DNA extraction.

2.2.3 Molecular and bioinformatics analysis of AM fungal community composition and structure

Roots collected at 18 months after planting were used for DNA extraction and MiSeq Illumina Sequencing. Forty milligrammes (dry weight) of roots per sample (16 samples in total) were ground in a 1.5 mL tube using a pestle in liquid nitrogen and extracted using a FastPrep-24 homogenizer (MP biomedical Europe, Illkirch, France) and the FastDNA® SPIN kit (MP biomedical, Europe) according to manufacturer's instructions. DNA extracts were then loaded onto PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) Micro Bio-Spin® Columns (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and eluted by centrifugation to improve DNA purity and avoid PCR inhibitors. Two replicates were done per root sample. DNA integrity was checked on 1.5% agarose gel and DNA quantification was done by using QuantiT™ PicoGreen® dsDNA assay kit (Invitrogen, St. Aubin, France).

Molecular diversity of AMF (*Glomeromycota*) from plant DNA was determined by 18S rRNA gene amplification using the primers NS31 and AML2 (Davison et al. 2012 ; Öpik et al. 2013). PCR round was carried out in a final volume of 50 µl with NS31 and AML2 primers (0.6 µM each), 20 ng DNA (2 extracted DNA replicates per sample), 200 µM of each dNTP, 200 ng/ml BSA, GoTaq® DNA Polymerase (2 units) and 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Charbonnières, France), with the following cycling conditions: 94°C for 3 min; 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 90 s, 72°C for 80 s; a final elongation step at 72°C for 10 min. After PCR, the amplification products (pools of PCR: 2 × 50µl) were purified by using illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) following manufacturer's guidelines. Then, DNA concentration was adjusted to 10 ng/µl. Samples were sequenced on a MiSeq Illumina sequencer by Molecular Research LP (MR DNA, TX, USA).

Paired Illumina MiSeq reads were assembled with vsearch v1.11.1 using the command `fastq_mergepairs` and the option `fastq_allowmergestagger`. Demultiplexing and primer clipping was performed with cutadapt v1.9, forcing a full length match for sample tags and allowing a 2/3rd-of-the-length partial match for forward and reverse primers. Only reads containing both primers were retained. For each trimmed read, the expected error was estimated with vsearch's command `fastq_filter` and the option `eeout`. Each sample was then dereplicated, i.e. strictly identical reads were merged, using vsearch's command `derep_fulllength`, and converted to FASTA format. To prepare clustering, samples were pooled and submitted to another round of dereplication with vsearch. The files containing expected error estimations were also dereplicated to retain only the lowest expected error for each unique sequence. Clustering was performed with swarm v2.1.8, using a local threshold of one difference and the `fastidious` option. OTU representative sequences were then searched for chimeras with vsearch's command `uchime_denovo`. In parallel, representative sequences received taxonomical assignments using the stampa pipeline (<https://github.com/frederic-mahe/stampa>) and the PR2 database (gb203) for 18S sequences. Briefly, the stampa pipeline requires the reference sequences to be trimmed with cutadapt, using the same primers than the ones used for the amplification of the environmental sequences. Using vsearch's exact global pairwise comparisons, each environmental sequence is compared to all reference sequences and is assigned to the closest hit. Clustering results, expected error values, taxonomic assignments and chimera detection results were used to build a raw OTUs table (File S1). Up to that point, were eliminated reads that could not be merged, reads without tags or primers, reads shorter than 32 nucleotides and reads with uncalled bases ("N"). To create the "cleaned" OTU table, additional filters were applied to retain: non-chimeric OTUs, OTUs with an expected error divided by length below 0.0002 and OTUs containing more than 3 reads. For each OTU, a reference sequence was selected for phylogenetic assignment with 18S rDNA sequences of the Glomeromycota from Krüger et al. (2012) which were selected regarding their similarity scores, ie. > 97% (BLASTN program) with at least one sequence obtained in the current study. All sequences were aligned using Muscle implemented in MEGA version 5.05 (Tamura et al. 2011). 18S rDNA sequences of the Glomeromycota were additionally compared with a broader nucleotide database (Genbank database, BLASTN program).

Diversity (Shannon, inverse Simpson), richness (number of OTUs, Chao1) and evenness indexes (Shannon index-based measure) were calculated using the vegan package (Oksanen et al. 2013) in the R program. The relative read abundance (as percentage) represented the

proportion of reads of each AMF species (in each treatment) from the total amount of reads for that treatment has been determinate.

2.2.4 Development of specific primers for the detection of R. irregularis IR27

Soil samples from inoculum of *R. irregularis* IR27 were stored at 4°C until spore extraction. Spores from of *R. irregularis* IR27 were extracted from 100 g of soil using the wet sieving and decanting methods (Gerdemann and Nicholson, 1963). They were collected from the sieves with 200 and 50 µm pore sizes and observed under a dissecting microscope to verify the morphological identity of *R. irregularis* IR27. DNA extraction of 7–10 spores of *R. irregularis* IR27 was performed as described in Redecker et al. (1997). Spores were crushed with a pipette tip in 3 µl of 1X GoTaq Flexi Reaction Buffer (Promega, Fitchburg, USA), heated to 95°C, incubated for 2 min then used directly as PCR template. PCR nested reactions were performed on spores DNA. The first PCR was performed using 0.02 U/µl Phusion polymerase (Thermo-Scientific, Illkirch, France), 1 µl DNA, 1X Phusion HF Buffer, 10 µM of each primer (RPB1-Ac and RPB1-DR1730r) Stockinger et al. (2014), 10 mM of each dNTPs in a final volume of 20 µl. Amplification was performed in an Eppendorf Mastercycler epGradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). For the second reaction, products of the first PCR were diluted 1:100 and used as templates using the primers pair RPB1-DR160FA and RPB1-1210r (Stockinger et al. 2014). Two microliters of diluted PCR products from the first reaction was used together with 0.02 U/µL Phusion polymerase, 1X Phusion HF Buffer, 10 µM of each primer, 40 mM of dNTPs in a volume of 50 µL. Cycling parameters were 30 s at 98 °C, 35 cycles of 10 s at 98 °C, 20 s at 60 °C and 1 min at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C. Success of amplification was checked on 1.2 % agarose gel and sequencing was performed by Genoscreen (France). The BLAST sequence analysis tool was performed to compare the RPB1 sequence of *R. irregularis* IR27 with RPB1 sequences from GenBank (Stockinger et al. (2014). Phylogenetic analyses using database reference sequences were performed using maximum likelihood (ML) method in Mega6 software. The species *Plicaria leiocarpa* was chosen as outgroup for the reference tree.

All RPB1 sequences of *R. irregularis* available in GenBank and the RPB1 sequence obtained from *R. irregularis* IR27 (688 bp) were assembled (95% similarity) and edited using the program Sequencher 5.4.1. To detect *R. irregularis* IR27 in roots of jujube trees it was necessary to design a specific primer pair for this AM fungus. For this, the RPB1 sequence of *R. irregularis* IR27 was compared to the others *Rhizophagus* (Fig. 3) using JalView software

(Waterhouse et al. 2009). For *R. irregularis* IR27, the primer pair RPB_GA_F (5'-GCT_TTA_TTA_CAG_GTA_CTT_ATT_CGT_CTA_C-3') / RPB_DvT922 (5'-CAT_CTA_CTG_ATA_TAT_TCG_GAT_CTC_C-3') was designed with 286 bp in length and their specificity was tested *in silico* using Amplify4 v1.0 software.

2.2.5 Tracing and quantification of *R. irregularis* IR27

Root samples (80-100 mg) of jujube trees collected at 18 months after planting were ground in liquid nitrogen, and DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA extraction was verified by PCR using the Eukaryotes specific primer pair LR1-ND122 (van Tuinen et al. 1998). PCR was performed in a final volume of 20 µl using 5 U/µl GoTaq® DNA Polymerase, 1 µl DNA, 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega), 10 µM of each primer (LR1 and ND122), 10 mM of each dNTPs. Cycling parameters were 2 min at 95 °C, 35 cycles of 30 s at 95 °C, 45 s at 58 °C and 1 min at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C.

To detect *Glomeromycota* in roots of *Z. mauritiana*, amplification products obtained using the primer pair LR1-ND122 were diluted 1:100 and served as template for a second reaction using the *Glomeromycota* specific primer FLR3-FLR4 (Gollotte et al. 2004). PCR conditions were as above and amplification products were checked in 1.2% agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 2 mM EDTA pH 8.0).

To detect *R. irregularis* IR27 in roots of *Z. mauritiana*, the DNA extracts were screened using nested PCRs with the specific primers of *R. irregularis* IR27. The first PCR was performed using 0.02 U/µl Phusion polymerase (Thermo-Scientific, Illkirch, France), 1 µl DNA, 1X Phusion HF Buffer, 10 µM of each primer (RPB1-Ac and RPB1-DR1730r), 10 mM of each dNTPs in a final volume of 20 µl. Amplification was performed as above and products of the first PCR were diluted 1:100 and used as templates for the second reaction using the primer pair RPB_GA_F and RPB_DvT922. Two microliters of diluted PCR products from the first reaction was used together with 0.02 U/µL Phusion polymerase, 1X Phusion HF Buffer, 10 µM of each primer, 40 mM of dNTPs in a volume of 50 µL. Cycling parameters were 30 s at 98 °C, 35 cycles of 10 s at 98 °C, 20 s at 60 °C and 1 min at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C. PCR products were checked on 1.2% agarose gel and only the presence or absence of detection of *R. irregularis* IR27 in roots system was scored in each sample.

PCR amplification by SYBR_Green qPCR was performed using the Kit ABSolute™ QPCR SYBR® Green ROX Mix (2007, Thermo Fisher Scientific, France) with Thermo-Start™ Taq DNA Polymerase according to the manufacturer's instructions. Two major steps were required for the calibration of qPCR reactions: testing primer efficiency and target DNA quantification. The efficiency of two primers pair RPB_826F/RPB_1210r for *Rhizophagus* (RPB_MA gene) and RPB_GA-F/RPB_DvT922 for *R. irregularis* IR27 (RPB_IR27 gene) was tested by qPCR using DNA of *R. irregularis* IR27. Seven successive dilutions of DNA dilutions were performed (1:1; 1:2; 1:4; 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) and used in qPCR with two replicates per DNA sample. A dilution 1:20 for each specific primer was tested. All qPCR assays are performed on an Applied Biosystems® StepOne™ Real-Time PCR Systems (96 wells) in 15 µL reaction volume containing 7.5 µL 2X ABSolute qPCR SYBR Green ROX mix, 5.5 µL primer and 2 µL DNA. The following thermal program is applied: a single cycle of DNA polymerase activation for 15 min at 95°C followed by 40 amplification cycles of 15 s at 95°C (denaturing step), 30 s at 60°C, 30 s at 72°C, 30s at 77°C (annealing-extension step). Subsequently, melting temperature analysis of the obtained amplification products is performed by gradually increasing the temperature from 77 to 95°C for 15 s, then 1 min at 60°C and 15 s at 95°C.

To quantify root colonization by *R. irregularis* IR27, only samples of inoculated treatments were taken into account. Amplification products obtained with RPB1-Ac/RPB1-1730r by 15 cycles and diluted 1:20 were served as template for quantitative PCR using specific primers (dilution 1:20) with two replicates per DNA sample. One of criteria routinely taken into account when assessing the outputs of PCR amplification by SYBR Green qPCR analysis was the threshold cycle value (C_T). The C_T value of qPCR amplification represents the time-point at which a PCR reaction reaches a prior-set threshold level for the reaction. This threshold level takes into account fluctuations in the background level during early reaction steps and the start of measurable exponential amplification (Tse & Capeau, 2003). The threshold limit setting is performed in automatic mode, according to the StepOne™ software version 2.3. Data from qPCR were presented as $2^{-\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) and normalized to an internal control. So in this case the $2^{-\Delta CT}$ is appropriate where $\Delta C_T = (C_T \text{ RPB_IR27} - C_T \text{ RPB-MA})$.

2.3 Statistical analysis

Mycorrhizal infection percentages were arcsine transformed to normalize the distribution of data before statistical analysis. A three-way analysis of variance (inoculation x provenance x block) was performed on all data at each month after planting. Mean values were compared using Tukey test (Honestly significant differences, HSD) at the significance levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$) with XLSTAT (version 2010, Addinsoft) software. The effects of three factors and their interactions were performed on the AM fungal community composition and structure using a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA, Anderson 2001) and the function Adonis from the “vegan” package in the R program and the Bray-Curtis distance measure. Diversity (Shannon, inverse Simpson) and richness (number of OTUs, Chao1) were calculated using the vegan package (Oksanen et al. 2013) in the R program. The relative read abundance (as percentage) represented the proportion of reads of each AMF species (in each treatment) from the total amount of reads for that treatment has been determinate. The indicator species analyses was performed to determine which OTU possessed significantly different abundance between *Z. mauritiana* provenance and inoculation treatments using the Pearson’s phi coefficient of association (Tichy & Chytrý, 2006) and the *multipatt* function from R package “indicspecies” (De Caceres et al. 2010) based on relative abundance of each OTU sample.

3. Results

3.1 Plant growth and root colonization in greenhouse conditions

In greenhouse conditions, inoculation with *R. irregularis* IR27 increased plant growth significantly, compared with non-inoculated controls (Table S1). Height, collar diameter and total dry biomass of plants were found to be significantly superior ($P < 0.05$) to non-inoculated controls four months after inoculation (Table S1). The interaction between provenance and inoculation had a significant effect ($P < 0.05$) on all parameters. In inoculated plants, the percentage of mycorrhizal infection with *R. irregularis* IR27 ranged from 64.47% to 70.19%. No AM infections were observed in the non-inoculated controls.

3.2 Growth, survival and root colonization after planting

The positive effect of mycorrhizal inoculation in greenhouse was recorded for growth parameters and survival of *Z. mauritiana* plants after planting. Non-inoculated *Z. mauritiana*

plants displayed the lowest growth compared to the inoculated plants. After 4, 8 and 12 months, inoculation with *R. irregularis* IR27 had significantly enhanced height, collar diameter and rate of survival as compared with non-inoculated controls (Table S2).

At 18 months after planting, inoculation with *R. irregularis* IR27 increased overall growth, survival and mycorrhizal colonization significantly. Rate of survival ranged from 80 to 83%, compared with the controls (Table 1). In the mycorrhizal treatments, the highest values of height (175 cm), collar diameter (19.7 mm) and crown diameter (177.3 cm) were recorded for Gola while the highest value of rate of survival (83%) was recorded for Tasset. Inoculation with *R. irregularis* IR27 had a significant effect on mycorrhizal infection of *Z. mauritiana* plants. In fact, colonization of roots by AM fungi remained significantly higher in the plants inoculated with *R. irregularis* ranged from 45.3 to 46.1%. In the non-inoculated controls, AM infections reached 22%. The block factor and its interaction with provenance and inoculation factors were not significant for growth parameters (results not shown).

3.3 Fruit production

The analysis of the fruit production data revealed only a significant effects of provenance and inoculation factors ($P < 0.001$) and their interaction on fruit production measured as number, diameter and fresh weight of jujubes (Table 2). Inoculated Tasset gave the highest number of jujubes (298 per tree), whereas the highest fresh weight of jujubes was from inoculated Gola (670 g per tree). Only Tasset showed a significant difference on diameter of jujubes between inoculated (1.82 cm) and non-inoculated treatments (1.25 cm).

3.4 Phylogenetic analysis of AMF sequences

Overall, 939198 sequences with an average length of 200 bp passed the initial quality assessment. Then, 543284 sequences were retrieved after removal of chimera and non Glomeromycota sequences and alignment denoising step. In order to perform reliable comparison between samples, a normalization of sequence number (number of sequence per sample set to 38806) was applied. The clustering of final data revealed 994 AMF OTUs detected in a total of 16 root samples. The majority of OTUs belonged to the Glomeraceae (88%), whereas only few belonged to the Diversisporaceae (5%), Gigasporaceae (3%), Paraglomeraceae (2%), Acaulosporaceae (1%), Archaeosporaceae (<1%), Claroideoglomeraceae (<1%), Geosiphonaceae (<1%) and Ambisporaceae (<1%). AMF sequences from the nine detected AMF families were all found in both Tasset and Gola

treatments except Claroideoglomeraceae and Geosiphonaceae only missed in Gola inoculated (Fig. S1). Phylogenetic assignment of mycorrhizal OTUs revealed 19 genus with a predominance of *Rhizophagus* (58%), *Glomus* (17%), *Sclerocystis* (11%), *Redeckera* (5%), *Gigaspora* (2%) and *Paraglomus* (2%).

3.5 Impact of inoculation on AMF richness, diversity and community composition

There were no significant effect of provenance and inoculation on richness and diversity indexes. In fact, no significant difference on number of OTUs, Chao1, Shannon and Invsimpson indexes were observed between inoculated and non-inoculated treatments for each provenance (Table 3). Inoculated treatments were similar to non-inoculated controls in having the same levels of richness and diversity.

The results from the PERMANOVA showed that inoculation with *R. irregularis* IR27 had no significant effect on the root-colonizing AMF community composition (Table 4). Interaction of provenance and inoculation had also no significant effect. To compare AMF community composition in each treatment, the relative abundance of OTU was determined. The results showed that inoculated and non-inoculated plants were colonized by the same AMF at different proportions (Fig. 1). Indicator species analysis identified 23 AMF OTUs with different relative abundance between provenance and inoculation treatments (Table 5). Among all of these indicator OTUs found, 21 were from the Glomeraceae, one from the Paraglomeraceae and one from the Diversisporaceae. Only one OTU from *Paraglomus* was an indicator of Tasset *Paraglomus* while 10 indicator OTUs (three from *Glomus*, two from *Incertae sedis*, three from *Rhizophagus* and two from *Sclerocystis*) were significant ($P > 0.05$) for Gola. There was no indicator OTU for inoculated treatments while 12 indicators OTUs (two from *Glomus*, eight from *Rhizophagus*, one from *Sclerocystis* and one from *Redeckera*) were significant for non-inoculated samples.

3.6 Molecular characterization and tracing of *R. irregularis* IR27 in *Z. mauritiana* roots

In the phylogenetic analysis with some reference RPBI sequences of Glomeromycota from NCBI where *Plicaria leiocarpa* was used as outgroup, the RPBI sequence of *R. irregularis* IR27 clustered in the *Rhizophagus irregularis* group (Fig. 2). On the basis of the sequences polymorphism observed between *R. irregularis* IR27 and the sequences available of the most

similar isolates, an *R. irregularis* IR27 specific primer (RPB_GA_F) was designed (Fig. 3). The specificity of this primer was evaluated on DNA extracted from field collected *Z. mauritiana* roots. The specific primer (RPB_GA_F) in combination with RPB_DvT922, gave rise to given the expected amplification product only on DNA extracted from *Z. mauritiana* roots which had previously been inoculated with that fungal isolate (Fig. 4). This finding confirmed that this primer pair could be used on field collected root samples to monitor the persistence of *R. irregularis* IR27.

3.7 Quantification of R. irregularis IR27

Persistence of *R. irregularis* IR27 was molecularly monitored on field-collected *Z. mauritiana* roots 18 months after plantation by qPCR using the *R. irregularis* IR27 specific primer pair. When compared by qPCR to the colonization of *Rhizophagus irregularis*, *R. irregularis* IR27 accounted for 12% (Gola) to 15% (Tasset) of that root colonization 18 months after planting (Fig. 5). In non inoculated plants, *R. irregularis* IR27 could not be detected (data not shown).

Table 1 Effect of inoculation with *R. irregularis* IR27 on growth, rate of survival and mycorrhizal infection of *Z. mauritiana* provenances at 18 months after transplanting. Data values represent means \pm standard errors (n=10).

| Treatment | Height (cm) | Collar diameter (mm) | Crown diameter (cm) | Rate of survival (%) | Mycorrhizal infection (%) |
|------------------|------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Tasset | 93.1 \pm 08 c | 11.6 \pm 1.7 c | 99.2 \pm 09.2 c | 65 \pm 12 b | 22.6 \pm 3.8 b |
| Tasset + Ri | 166.0 \pm 09 a | 18.8 \pm 1.9 a | 169.2 \pm 12.9 a | 83 \pm 18 a | 46.1 \pm 5.6 a |
| Gola | 117.5 \pm 14 b | 15.1 \pm 1.4 b | 118.3 \pm 14.7 b | 65 \pm 15 b | 19.0 \pm 5.1 b |
| Gola + Ri | 175.0 \pm 16 a | 19.7 \pm 1.9 a | 177.3 \pm 13.7 a | 80 \pm 19 a | 45.3 \pm 8.8 a |
| Factors tested | | | | | |
| Provenance (P) | ** | *** | ** | NS | NS |
| Inoculation (I) | *** | *** | *** | ** | *** |
| (P) \times (I) | * | *** | * | NS | NS |

Means in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's HSD. Significant levels: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS=Not significant; Ri: *Rhizophagus irregularis*.

Table 2 Effect of inoculation with *R. irregularis* IR27 on number of jujubes, production of jujubes and diameter of jujube at 18 months after planting.

| Treatment | Number of jujubes/tree | Production of jujubes (g fresh weight/tree) | Diameter of jujube (cm) |
|-----------------|------------------------|---|-------------------------|
| Tasset | 161 ± 14 b | 239 ± 12 c | 1.25 ± 0.2 c |
| Tasset + Ri | 298 ± 17 a | 328 ± 14 b | 1.82 ± 0.3 b |
| Gola | 119 ± 08 c | 344 ± 11 b | 3.47 ± 0.1 a |
| Gola + Ri | 165 ± 12 b | 670 ± 16 a | 3.54 ± 0.1 a |
| Factors tested | | | |
| Provenance (P) | *** | *** | *** |
| Inoculation (I) | *** | *** | * |
| (P) × (I) | * | *** | NS |

Means in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's HSD. Significant levels: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS=Not significant; Ri: *Rhizophagus irregularis*.

Table 3 Effect of mycorrhizal inoculation on richness and diversity indexes of AMF community.

| Treatment | Number of OTUs | Chao1 | Shannon | Invsimpson |
|-----------------|----------------|------------|-------------|-------------|
| Gola | 178 ± 15 a | 255 ± 28 a | 1.9 ± 0.3 a | 4.2 ± 1.2 a |
| Gola + Ri | 153 ± 17 a | 235 ± 19 a | 1.7 ± 0.4 a | 4.5 ± 1.3 a |
| Tasset | 160 ± 16 a | 224 ± 26 a | 1.9 ± 0.4 a | 4.5 ± 1.9 a |
| Tasset + Ri | 168 ± 12 a | 229 ± 24 a | 1.9 ± 0.2 a | 4.4 ± 1.6 a |
| Factors tested | | | | |
| Provenance (P) | NS | NS | NS | NS |
| Inoculation (I) | NS | NS | NS | NS |
| (P) × (I) | NS | NS | NS | NS |

Means in the same column followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) according to Tukey's HSD. NS=Not significant; Ri: *Rhizophagus irregularis*.

Table 4 Non-parametric PERMANOVA on Bray-Curtis distance to test effect of provenance and inoculation on OTUs abundance of AMF associated to *Z. mauritiana* roots.

| Effects | <i>df</i> | SS | MS | <i>F</i> model | <i>R</i> ² | <i>P</i> value |
|--------------------------|-----------|-------|-------|----------------|-----------------------|----------------|
| Provenance | 1 | 0.244 | 0.244 | 1.077 | 0.078 | 0.395 NS |
| Inoculation | 1 | 0.296 | 0.296 | 1.306 | 0.095 | 0.213 NS |
| Provenance × Inoculation | 1 | 0.296 | 0.296 | 1.306 | 0.095 | 0.223 NS |
| Residuals | 10 | 2.266 | 0.226 | | 0.730 | |
| Total | 13 | 3.102 | | | 1.000 | |

df = degrees of freedom ; SS = sum of squares ; MS = mean sum of squares ; *F* model = *F* statistics; *R*²= partial R-squared, based on 999 permutations. NS=Not significant.

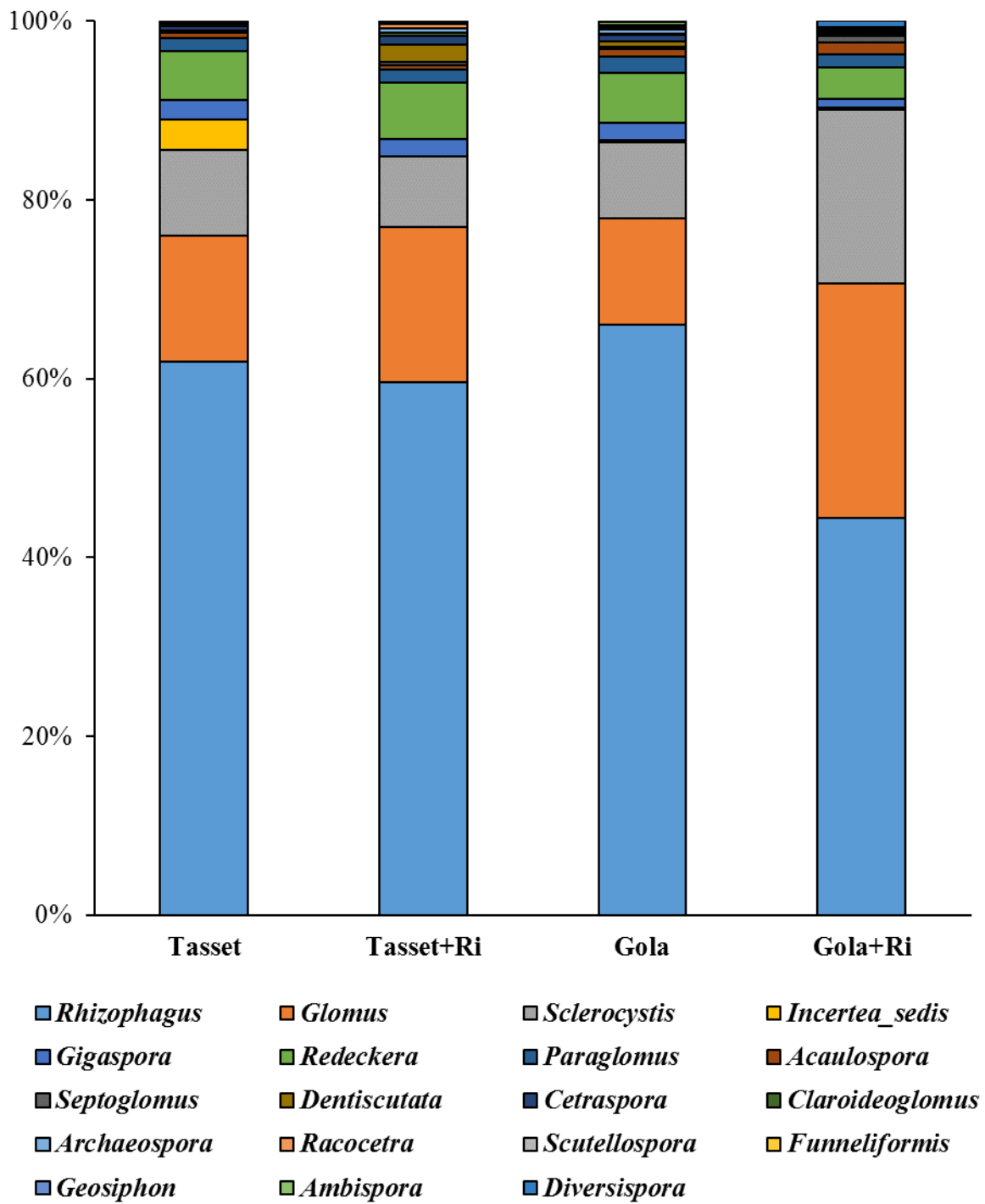


Figure 1 Relative abundance of sequences assigned to different AMF genera observed in *Z. mauritiana* roots at 18 months after transplanting.

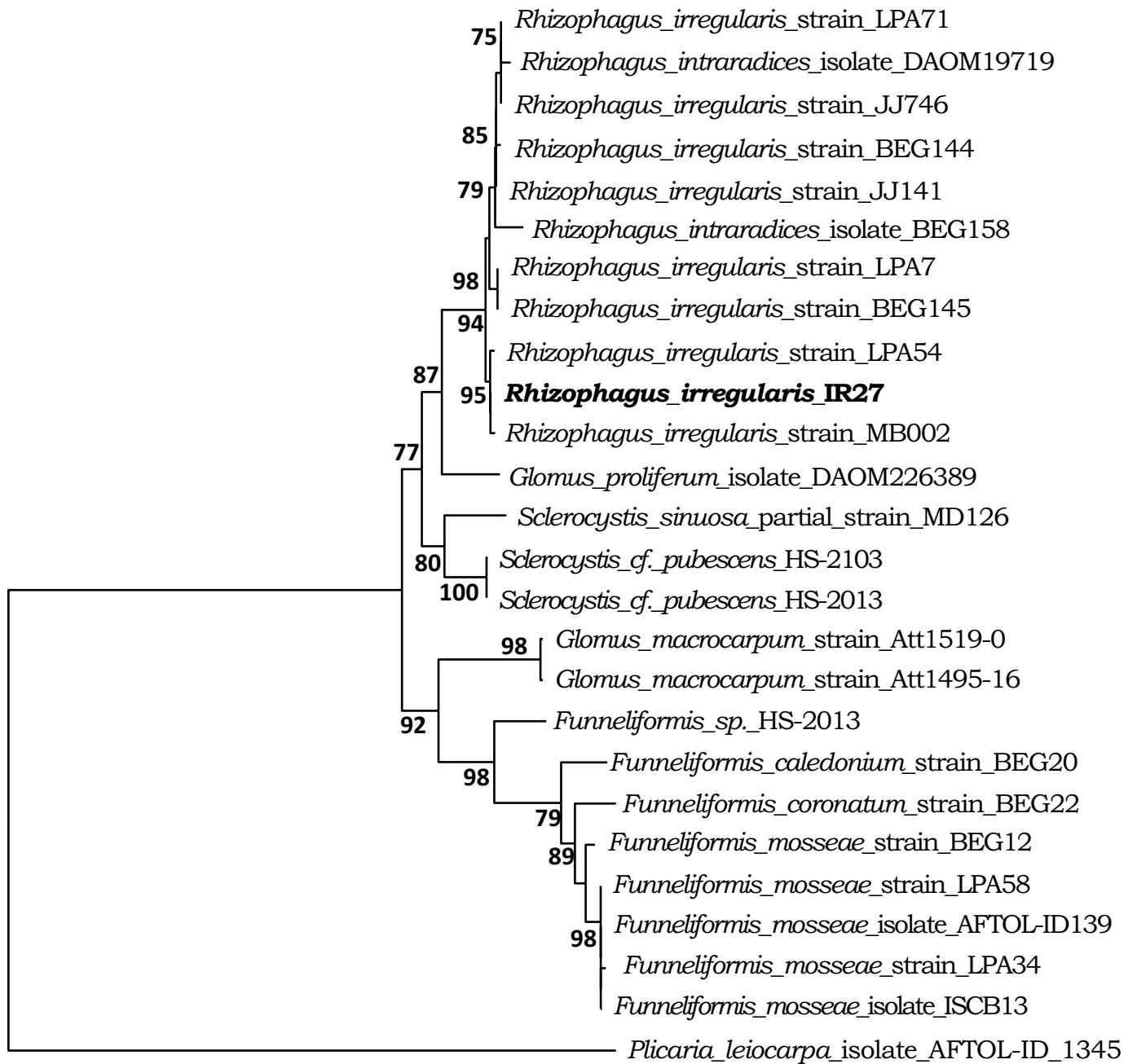
Table 5 Significant indicator OTUs for provenance and inoculation factors.

| Taxonomic affiliation ¹ | OTU | Provenance | | | | Inoculation | | | |
|------------------------------------|-----|------------------|----------------------|-------|----------|-------------|---------|----------------|---------|
| | | Tasset | | Gola | | Inoculated | | Non-inoculated | |
| | | phi ² | P-value ³ | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value |
| Glomeraceae (21) | | | | | | | | | |
| <i>Incertae_sedis</i> | 9 | | | 0.830 | 0.001*** | | | | |
| <i>Incertae_sedis</i> | 45 | | | 0.733 | 0.001*** | | | | |
| <i>Incertae_sedis</i> | 61 | | | 0.626 | 0.019* | | | | |
| <i>Glomus</i> | 28 | | | 0.603 | 0.015* | | | | |
| <i>Glomus</i> | 38 | | | 0.494 | 0.028* | | | | |
| <i>Glomus</i> | 7 | | | | | | | 0.568 | 0.021* |
| <i>Glomus</i> | 52 | | | | | | | 0.280 | 0.020* |
| <i>Rhizophagus</i> | 448 | | | 0.574 | 0.033* | | | | |
| <i>Rhizophagus</i> | 11 | | | 0.505 | 0.021* | | | | |
| <i>Rhizophagus</i> | 21 | | | 0.486 | 0.050* | | | | |
| <i>Rhizophagus</i> | 667 | | | | | | | 0.593 | 0.028* |
| <i>Rhizophagus</i> | 498 | | | | | | | 0.583 | 0.034* |
| <i>Rhizophagus</i> | 544 | | | | | | | 0.567 | 0.034* |
| <i>Rhizophagus</i> | 1 | | | | | | | 0.498 | 0.044* |
| <i>Rhizophagus</i> | 371 | | | | | | | 0.472 | 0.047* |
| <i>Rhizophagus</i> | 6 | | | | | | | 0.277 | 0.027* |

Table 5 (continued)

| Taxonomic affiliation ¹ | OTU | Provenance | | Inoculation | | | | | | |
|------------------------------------|-----|------------------|----------------------|-------------|---------|------------|---------|----------------|---------|--|
| | | Tasset | | Gola | | Inoculated | | Non-inoculated | | |
| | | phi ² | P-value ³ | phi | P-value | phi | P-value | phi | P-value | |
| <i>Rhizophagus</i> | 37 | | | | | | | 0.264 | 0.044* | |
| <i>Rhizophagus</i> | 16 | | | | | | | 0.263 | 0.040* | |
| <i>Sclerocystis</i> | 12 | | | 0.619 | 0.018* | | | | | |
| <i>Sclerocystis</i> | 33 | | | 0.296 | 0.012* | | | | | |
| <i>Sclerocystis</i> | 8 | | | | | | | 0.574 | 0.034* | |
| Paraglomeraceae (1) | | | | | | | | | | |
| <i>Paraglomus</i> | 122 | 0.338 | 0.035* | | | | | | | |
| Diversisporaceae (1) | | | | | | | | | | |
| <i>Redeckera</i> | 62 | | | | | | | 0.502 | 0.019* | |

¹Taxonomic affiliation was based on a k-nearest neighbor consensus and the Wang method used in Mothur (function Classify.seqs). Reference sequences were from Krüger *et al.* (2011). The total number of indicator OTUs for each family is indicated between brackets. ²Indicator OTUs were obtained using the Pearson's phi coefficient of association (Tichy and Chytry, 2006) using the multipatt function from R package indicpecies (De Caceres *et al.*, 2010). 'phi' indicate phi coefficient value. Treatment effects have been analysed separately. ³Significance code : '***' $P < 0.001$; '**' $P < 0.01$; '*' $P < 0.05$.



0.03

Figure 2 Maximum-likelihood phylogenetic tree of the RPB1 of *R. irregularis* IR27 (in bold) and reference sequences from GenBank (italics). Bootstrap support (BS) $\geq 75\%$ is shown. *Plicaria leiocarpa* isolate_AFTOL-ID_1345 was used as outgroup.

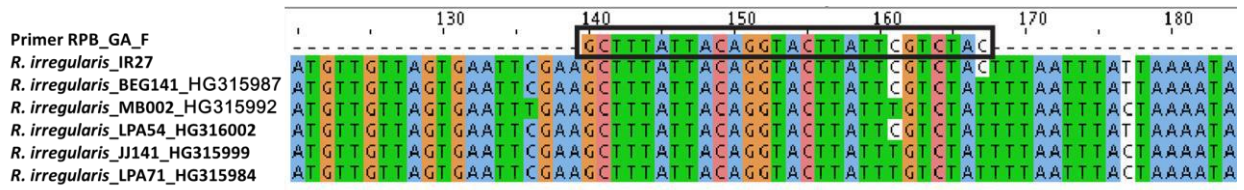


Figure 3 Alignment of RPB1 sequences of *R. irregularis* available in GenBank and the RPB1 sequence obtained from *R. irregularis* IR27. The alignment is shown in 5'–3' orientation of the priming site of primer RPB_GA_F.

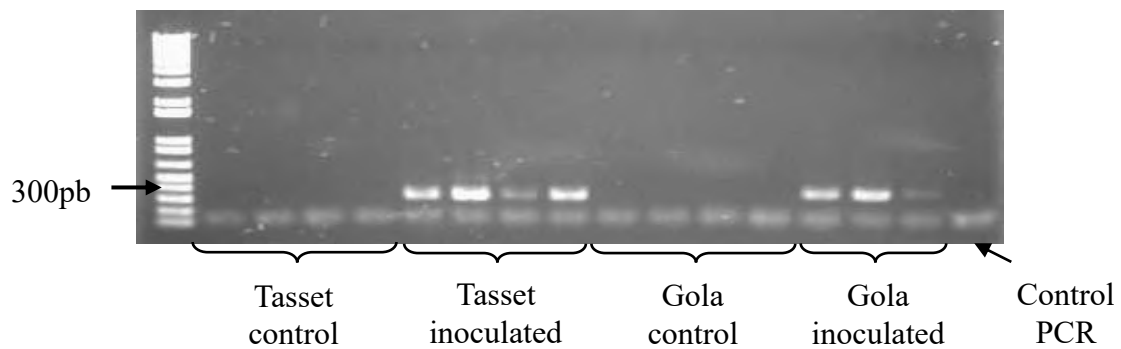


Figure 4 Detection of *R. irregularis* IR27 with RPB_GA-F/RPB_DvT922 primers in *Z. mauritiana* roots at 18 months after transplanting.

Abundance of *R. irregularis* IR27 (%)

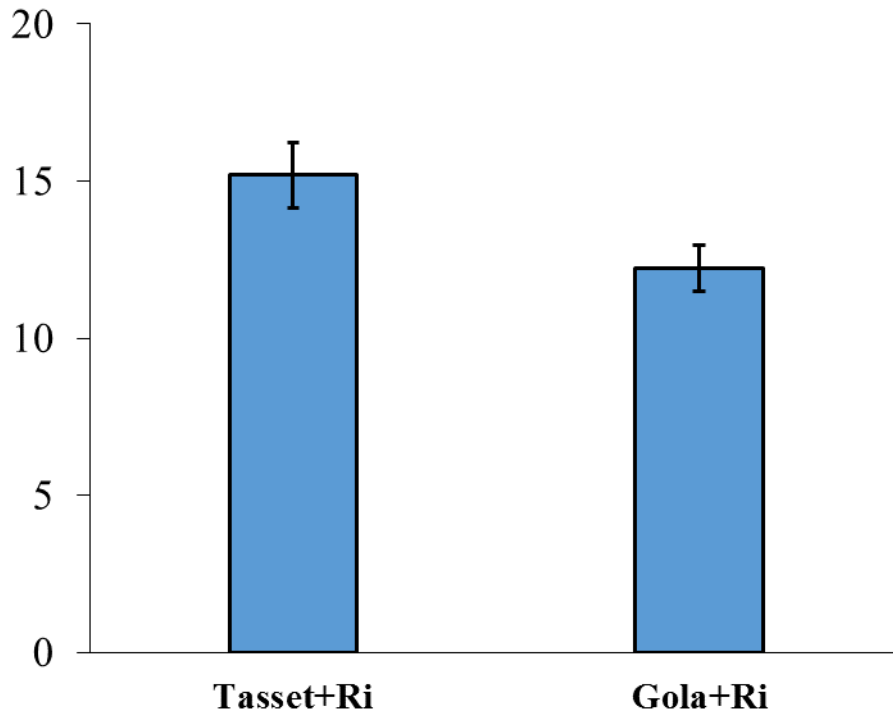


Figure 5 Quantification of root colonization by *R. irregularis* IR27 compared to other genotypes of *Rhizophagus irregularis* at 18 months after transplanting.

4. Discussion

In this study, inoculated seedlings showed a significant growth increase *vs* non-inoculated seedlings at the end of the nursery stage. These differences remained after 18 months of growth and fruit production in the field. No effects of inoculation and host plant variety and their interaction on native AM fungal composition and structure could be detected. *R. irregularis* IR27 competed effectively with native AMF to colonize jujube roots. However, it persisted in lower proportions than native *R. irregularis* on jujube roots.

4.1 Plant growth in greenhouse and field conditions

Our results showed positive effects of inoculation with *R. irregularis* IR27 on the growth of *Z. mauritiana* in greenhouse conditions. In fact, all growth parameters were higher in inoculated seedlings than in non-inoculated controls. However, Gola responded better to

inoculation than Tasset. This could be due to the fact that Gola was colonized better by *R. irregularis* than Tasset. Our findings confirm previous studies that indicate inoculation with *R. irregularis* isolate IR27 increase growth and biomass production of *Z. mauritiana* plants in outdoor greenhouse (Guissou et al. 1998; Bâ et al. 2000; Bâ et al. 2001; Guissou et al. 2009; Sidibé et al. 2012; Guissou et al. 2016). Here, we have extended these findings by reporting, for the first time, the effectiveness of *R. irregularis* as field inoculant. The fact that seedlings were inoculated before planting may enhance its competitiveness through their abundance and priority effects regarding the low infective propagules in the field soil (Verbruggen et al. 2013).

Mycorrhizal inoculation with *R. irregularis* IR27 increased growth parameters and survival rate in both provenances of jujube at 4, 8, 12 and 18 months after transplanting in the orchard. In contrast with data obtained in our previous greenhouse experiment, there was no difference between Gola and Tasset inoculated with *R. irregularis* in terms of growth and survival rates after planting. Furthermore, the differences in terms of growth and survival rates between inoculated and non-inoculated plants in greenhouse remained despite the competition between *R. irregularis* and native AM fungal isolates in the field. *Rhizophagus irregularis* was still effective after 18 months, suggesting its ability to persist in the soil. The fact that *R. irregularis* increased plant growth confirms other studies showing that it can successfully establish when being introduced in an existing AM fungal communities (Badri et al. 2016; Köhl et al. 2016). Our results are consistent with those of Köhl et al. (2016) who found that the exotic *R. irregulare* (named also *R. irregularis*) isolate BEG21 can improve growth of clover irrespective of initial soil P availability and AM fungal propagules abundance. This species was reported as an ubiquitous AM fungus occurred in a wide range of environments and considered as a good competitor (Badri et al. 2016; Köhl et al. 2016). Some other exotic AMF can also play similar role. For instance, Pellegrino et al. (2012) showed that field inoculation with two exotic *Funneliformis mosseae* isolates IMAI and AZ225C increased biomass production of *Medicago sativa*.

The positive results of inoculation were related to root colonization by the exotic *R. irregularis* IR27. Root colonization by this AM fungus, estimated at 18 months after planting, was significantly higher in treatments with inoculation as compared to the non-inoculated treatments whatever jujube provenance. Mycorrhizal colonization in inoculated plants was twice higher than in controls indicating the high ability of *R. irregularis* to compete with indigenous AMF. This may suggest that the inoculated *R. irregularis* was efficient in

colonizing jujube plants as compared to the indigenous AMF. Another possible explanation for the competitiveness of *R. irregularis* was related with the low infective propagules in the field soil. In this respect, it has been demonstrated that the inoculation success with exotic AMF in agricultural soils can be determined by many factors such as species compatibility, habitat niche availability for AMF and competition with native fungi (Verbruggen et al. 2013). However, the amount inoculum applied in this study was superior to the inoculum quantity found in the field soil. This indicates that doses of inoculum could also be a requirement for successfully establishment and persistence of exotic *R. irregularis*.

4.2 Field responses of jujubes as following fruit production

The present findings suggest a beneficial contribution of *R. irregularis* IR27 inoculation on enhancing fruit production of *Z. mauritiana* at 18 months after planting. Our results showed that inoculated Gola was more productive (670 g per tree) than to the inoculated local provenance (328 g per tree). These results support the findings of Pellegrino et al. (2012) who showed that field inoculation with inocula of non-native isolates of *Funneliformis mosseae* stimulated yield of *M. sativa*. The increased fruit production achieved in the present experiment may be due to the fact that the orchard was found to be deficient in P and, inoculation may be, in this context, an important factor contributing fruit production of jujubes. Our results are consistent with increase of crop yield following AM inoculation on vegetable crops (Douds et al. 2007; Regvar et al. 2003; Salvioli et al. 2012; Baum et al. 2015). However, our results are in contrast to those of Loján et al. (2016) who reported no significant increase of *Solanum tuberosum* plant growth or yield with *R. irregularis*. Ouédraogo et al. (2006) reported that Gola responded positively to irrigation and fertilization with rock phosphate in P-deficient soil by displaying the highest fruit production when compared to the local variety. These results are similar to ours, although in these previous studies the plants were irrigated and fertilized under field conditions. The values of fruit production in the present study were less than the values reported for jujube trees (Pareek 2001; Tewari 2002; Ouédraogo et al. 2006). This may be due to the young age of the trees in the present study (18 months).

4.3 AM fungal communities

Molecular analysis of AMF community revealed no significant effect of provenance and inoculation factors and their interactions on AMF richness, diversity and abundance of native

AM fungal communities whatever the inoculated treatments at 18 months after planting. This demonstrates that inoculation with *R. irregularis* IR27 does not destroy the local mycorrhizal fungal community. Other studies with contrasting results have found that AM fungal inoculation did alter natural AM fungal communities in field trials (Douds et al. 2011 ; Mummey et al. 2009). Alguacil et al. (2011) showed that the inoculation of *O. europaea* plants with different, native AM fungi increased the AMF diversity, changing the AMF community composition 14 months after planting. Studies that have focused on assessing AMF diversity associated with a variety of plant species have found that while there is little change in richness, the abundance of these taxa does change relative to the plant host (Dandan and Zhiwei 2007; Öpik et al. 2008; Pellegrino et al. 2012). While the present study found no differences in AMF species richness between inoculated and non-inoculated plants irrespective of jujube provenance, other studies have found larger differences in AMF richness across different plant species, suggesting that plant hosts may also affect presence or absence of AMF species (Martínez-García and Pugnaire 2011; Stover et al. 2012; Brundrett and Ashwath 2013), and not just relative abundance. Conversely, other studies have found little evidence for changes in AMF communities based on plant species (Davison et al. 2011; Alguacil et al. 2012; Lekberg et al. 2012), suggesting that diversity observed in the field may be based more on environmental factors rather than host effects.

Phylogenetic data allowed for a direct insight into the AMF community composition associated to *Z. mauritiana* roots in the orchard in this study. We detected 19 AMF genera, in particular *Rhizophagus*, *Glomus*, *Sclerocystis* and *Redeckera* in root samples. Sampling roots of individual plant species is the most common approach, as it enables detection of actively colonizing fungi (Öpik et al. 2009; Hart et al. 2015). In this study, the primer set NS31/AML2 was used, which targets the 18S region of the SSU ribosomal RNA gene. These primers are known to include most species in the Glomeromycota, including members of the Archaeosporaceae and Paraglomeraceae. The high abundance of *Rhizophagus* seen in this data set may result from traits associated with the Glomeraceae. AMF communities were dominated by Glomeraceae in root samples. This corroborates previous studies, mostly from arids regions, reported members of the Glomeraceae as the most prevalent in AMF communities from agricultural fields (Manga et al. 2007; Sène et al. 2012; Ndoye et al. 2012). This suggests that Glomeraceae possess specific strategies that allow them to adapt to disturbances caused by agricultural management. High abundance of *R. irregularis* across *Z. mauritiana* plants, proveds its known features as a fast-growing and largely abundant species, which readily sporulates and colonizes plant hosts (Oehl et al. 2003; Öpik et al. 2006; Smith

and Read 2008; Alguacil et al. 2009). It is interesting to note that *Rhizophagus irregularis* which was the dominant species of the genus found in this study, has been reported as tolerant to hyphal network disruption (Öpik et al. 2006).

4.4 Persistence and quantification of R. irregularis IR27 in jujube roots

Persistence of *R. irregularis* IR27 was monitored using molecular methods 18 months after plantation by nested-PCR in field-collected *Z. mauritiana* roots using the primer pair RPB_GA-F/RPB_DvT922. Our findings showed that PCR amplicons were exclusively obtained from the roots of plants inoculated with *R. irregularis* IR27. This demonstrates that the primer pair RPB_GA-F/RPB_DvT922 discriminates *R. irregularis* IR27 against all other AMF in this habitat. A nested PCR approach was nevertheless required, as RPB1 is present as single copy in the *Rhizophagus* genome (Tisserant et al., 2011). The tracing of inoculated strains and their potential impact on the native AMF communities has been rarely studied because it can be difficult to discriminate strains using a single molecular marker. In the literature, very little is still known about successful introductions of foreign AM fungi to natural communities and their possible effects in symbiosis with plants. This is mainly because tools have been lacking for reliable molecular genetic tracing at the strain level. Alguacil et al. (2011) showed a good percentage of persistence of three AMF isolates inoculated: *Glomus* sp. *G. intraradices* and a mixture of *Glomus* sp. and *G. intraradices* in *O. europaea* roots. Farmer et al. (2007), Douds et al. (2011), Antunes et al. (2009), Koch et al. (2011), Sýkorová et al. (2012) and Köhl et al. (2016) all attempted to trace AM fungal inoculants among members of complex natural AM fungal communities, with variable success. By using mitochondrial large subunit ribosomal DNA (mtLSU) marker *R. irregularis* strains introduced were identified under field conditions (Börstler et al. 2008, 2010; Peyret-Guzzon et al. 2016; Sýkorová et al. 2012). At 18 months, our results showed that *R. irregularis* IR27 still accounted for 12% and 15% in Gola and Tasset tree roots, respectively. Thus, RPB_GA_F/RPB_DvT922 primer is well suitable for quantifying *R. irregularis* IR27 in *Rhizophagus* communities associated to *Z. mauritiana* roots in the field. Hart et al. (2017) believe that commercial AMF inoculants represent a small genetic pool of fungi selected to be at once generalists and aggressive colonizers. These traits have potential to threaten local AMF communities, which may not be resistant to alien introductions. However, our study showed that *R. irregularis* IR27 is not an invasive species because root colonization range from 100% of Glomeromycota to 15% of *Rhizophagus irregularis* at 18 months after

planting. Until now, most of studies used the ribosomal DNA as a molecular marker in order to quantify AMF by qPCR. In this present study, the RPB1 gene has been demonstrated to be an appropriate marker for tracking and quantification of *R. irregularis* IR27 in *Z. mauritiana* roots.

5. Conclusion

Our study demonstrates that inoculation with *R. irregularis* IR27 is beneficial to jujube tree growth and fruit production in orchard. Our results indicate that *R. irregularis* IR27 is very competitive against indigenous AMF and its were specifically traced in inoculated *Z. mauritiana* roots. Thus, the RPB1 gene is well suitable for tracking and quantification of *R. irregularis* IR27 in *Rhizophagus* communities associated to *Z. mauritiana* roots in the field. We have also shown that *R. irregularis* IR27 is replaced by local species and is not destroying the local mycorrhizal fungal community. This study highlights the interest of inoculation based on an exotic AMF species as an ecological engineering strategy to improve the fruit production of *Z. mauritiana* in semi-arid field conditions.

Acknowledgement

This work was funded by the Africa-Brazil-France tripartite research program entitled “Fight against desertification in Africa”. Babacar Thioye received grants from the Institut de Recherche pour le Développement (IRD), the Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA) and the authors are grateful to French Embassy in Senegal (SCAC).

References

- Adelman MJ, Morton JB (1986)** Infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: Influence of host-soil diluent combinations on MPN estimates and percentage colonization. *Soil Biology and Biochemistry* 18:7–13. doi:10.1016/0038-0717(86)90106-9
- Alguacil MM, Roldán A, Torres MP (2009)** Complexity of semiarid gypsophilous shrub communities mediates the AMF biodiversity at the plant species level. *Microbial Ecology* 57: 718–727.
- Alguacil MM, Torrecillas E, Kohler J, Roldan A (2011)** A molecular approach to ascertain the success of “in situ” AM fungi inoculation in the revegetation of a semiarid, degraded land. *Science of the Total Environment* 409: 2874–80.

- Alguacil MM, Torrecillas E, Roldán A, Díaz G, Torres MP (2012)** Perennial plant species from semiarid gypsum soils support higher AMF diversity in roots than the annual *Bromus rubens*. *Soil Biology and Biochemistry* 49: 132–138.
- Anderson, M.J (2001)** A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26: 32-46.
- Antunes PM, Koch AM, Dunfield KE, Hart MM, Downing A, Rillig MC, Klironomos JN (2009)** Influence of commercial inoculation with *Glomus intraradices* on the structure and functioning of an AM fungal community from an agricultural site. *Plant Soil* 317: 257–266
- Awodoyin RO, Olubode OS, Ogbu JU, Balogun RB, Nwawuisi JU, Orji KO (2015)** Indigenous fruit trees of tropical Africa: status, opportunity for development and biodiversity management. *Agricultural Science* 6:31–41. doi:10.4236/as.2015.61004
- Bâ AM, Dalpé Y, Guissou T (1996)** Les Glomales d'*Acacia holosericea* et d'*Acaci mangium*. *Bois et Forêt des Tropiques* 250: 5-18.
- Bâ AM, Plenchette C, Danthu P, Duponnois R, Guissou T (2000)** Functional compatibility of arbuscular mycorrhizae with thirteen tropical fruit trees in Senegal. *Agroforestry Systems* 95: 95–105.
- Bâ AM, Guissou T, Duponnois R, Plenchette C, Danthu P, Sacko O, Sidibé D, Sylla K, Windou B (2001)** Mycorrhization contrôlée et fertilisation phosphatée: Application à la domestication du jujubier. *Fruits* 56: 261–269.
- Bâ AM, Danthu P, Duponnois R, Soleviev P (2003)** Domestication of jujube fruit trees (*Zizyphus mauritiana* Lam.). In : Dris R, Niskanen R, Jain SM (eds) Crop Management and Postharvest Handling of Horticultural Crops, vol. 3, chap. 9, Crop fertilization, nutrition and growth, Science Publishers, Inc., pp 255–279.
- Badri A, Stefani FOP, Lachance G, Roy-Arcand L, Beudet D, Vialle A, Hijri M (2016)** Molecular diagnostic toolkit for *Rhizophagus irregularis* isolate DAOM-197198 using quantitative PCR assay targeting the mitochondrial genome. *Mycorrhiza*. doi:10.1007/s00572-016-0708-1
- Baum C, El-Tohamy W, Gruda N (2015)** Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Scientia Horticulturae* 187: 131–141
- Bonkougou EG, Djimde M, Ayuk ET, Zoungrana I, Tchoundjeu Z (1998)** Taking stock of agroforestry in the sahel-harvesting results for the future, in : Icrat (Ed.), End of phase report 1989–1996, Nairobi, Kenya, pp.1–58.
- Börstler B, Raab PA, Thiéry O, Morton JB, Redecker D (2008)** Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *New Phytologist* 180: 452-465.
- Börstler B, Thiéry O, Sýkorová Z, Berner A, Redecker D (2010)** Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology* 19: 1497-1511.
- Brundrett M, Ashwath N (2013)** Glomeromycotan mycorrhizal fungi from tropical Australia III. Measuring diversity in natural and disturbed habitats. *Plant and Soil* 370: 419-433.

- Caravaca F, Alguacil MM, Barea JM, Roldán A (2005)** Survival of inocula and native AM fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 227-233.
- Cely MVT, de Oliveira AG, de Freitas VF, de Luca MB, Barazetti AR, dos Santos IMO, Gionco B, Garcia GV, Prete CEC, Andrade G (2016)** Inoculant of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (*Rhizophagus clarus*) Increase Yield of Soybean and Cotton under Field Conditions. *Frontiers in Microbiology* 7:720. doi: 10.3389/fmicb.2016.00720
- Dandan Z, Zhiwei Z (2007)** Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the hot-dry valley of the Jinsha river, southwest China. *Applied Soil Ecology* 37: 118-128.
- Davison J, Öpik M, Daniell TJ, Moora M, Zobel M (2011)** Arbuscular mycorrhizal fungal communities are not random assemblages. *FEMS Microbiology Ecology* 78: 103115.
- Davison J, Opik M, Zobel M, Vasar M, Metsis M, Moora M (2012)** Communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in forest soil are spatially heterogeneous but do not vary throughout the growing season. *PloS One* 7: e41938.
- De Caceres, M, Legendre P, Moretti M (2010)** Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos* 119: 1674–1684.
- Douds DD, Nagahashi G, Reider C, Hepperly P (2007)** Inoculation with AM fungi increases the yield of potatoes in a high P soil. *Biological Agriculture and Horticulture* 25: 67–78.
- Douds DD, Nagahashi G, Wilson DO, Moyer J (2011)** Monitoring the decline in AM fungus populations and efficacy during a long term bare fallow. *Plant Soil* 342: 319–326
- Farmer MJ, Li X, Feng G, Zhao B, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D (2007)** Molecular monitoring of field-inoculated AMF to evaluate persistence in sweet potato crops in China. *Applied Soil Ecology* 35: 599–609. doi:10.1016/j.apsoil.2006.09.012
- Friesen DK, Rao IM, Thomas RJ, Oberson A, Sanz JI (1997)** Phosphorus acquisition and cycling in crop and pasture systems in low fertility tropical soils. *Plant Soil* 196: 289–294.
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963)** Spores of mycorrhizal Endogone extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235–244.
- Giri B, Kapoor R, Mukerji KG (2005)** Effect of the arbuscular mycorrhizae *Glomus fasciculatum* and *G-macrocarpum* on the growth and nutrient content of *Cassia siamea* in a semi-arid Indian wasteland soil. *New Forests* 29: 63–73
- Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D (2004)** Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza* 14: 111–117.
- Guisso T, Bâ AM, Ouadba JM, Guinko S, Duponnois R (1998)** Responses of *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth., *Tamarindus indica* L. and *Zizyphus mauritiana* Lam. to arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus deficient soil. *Biology Fertility of Soils* 26: 194–198.

- Guisso T (2009)** Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to growth and nutrient uptake by jujube and tamarind seedlings in a phosphate (P)-deficient soil. *African Journal of Microbiology* 3: 297–304.
- Guisso T, Sanon KB, Babana A, Bâ AM (2016)** Effect of arbuscular mycorrhizae on growth and mineral nutrition of greenhouse propagated fruit trees from diverse geographic provenances. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 20: 417–426.
- Hart M, Aleklett K, Chagnon P-L, Egan C, Ghignone S, Helgason T et al. (2015)** Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 207: 235–247.
- Hart MM, Antunes PM, Abbott LK (2017)** Unknown risks to soil biodiversity from commercial fungal inoculants. *Nature ecology and evolution* 1: 0115–1. doi: 10.1038/s41559-017-0115
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998)** Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431–431.
- Koch AM, Antunes PM, Barto EK, Cipollini D, Mummey DL, Klironomos JN (2011)** The effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal and garlic mustard introductions on native AM fungal diversity. *Biological Invasions* 13: 1627–1639.
- Köhl L, Lukasiewicz CE, van der Heijden MGA (2016)** Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant, Cell and Environment* 39: 136–146.
- Koide RT (2000)** Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 147: 233–235.
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüssler A (2012)** Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193: 970–984.
- Lekberg Y, Schnoor T, Kjoller R, Gibbons SM, Hansen LH, Al-Sound WA, Sørensen SJ, Rosendahl S (2012)** 454-sequencing reveals stochastic local reassembly and high disturbance tolerance within arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* 100: 151–160.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402–408.
- Loján P, Senés-Guerrero C, Suárez JP, Kromann P, Schüßler A, Declerck S (2016)** Potato field-inoculation in Ecuador with *Rhizophagus irregularis*: no impact on growth performance and associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Symbiosis*. doi: 10.1007/s13199-016-0471-2
- Maherali H, Klironomos JN (2007)** Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316: 1746–1748.
- Manga A, Diop TA, van Tuinen D, Neyra M (2007)** Variabilité génétique des champignons mycorrhiziens associés à *Acacia seyal* en zone semi-aride du Sénégal. *Sécheresse* 18: 129–133.
- Martínez-García LB, Pugnaire FI (2011)** Arbuscular mycorrhizal fungi host preference and site effects in two plant species in a semiarid environment. *Applied Soil Ecology* 48: 313–317.

- Mummey DL, Antunes PM, Rillig MC (2009)** Arbuscular mycorrhizal fungi preinoculant identity determines community composition in roots. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 1173–1179.
- Ndoye F, Kane A, Mangaptché ELN, Bakhoun N, Sanon A, Diouf D, Sy MO, Baudoin E, Noba K, Prin Y (2012)** Changes in land use system and environmental factors affect arbuscular mycorrhizal fungal density and diversity, and enzyme activities in rhizospheric soils of *Acacia senegal* (L.) Willd. *ISRN Ecology*: 13.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A (2003)** Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Applied and environmental microbiology* 69: 2816–2824.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M (2006)** Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778–790.
- Öpik M, Moora M, Zobel M, Saks Ü, Wheatley R, Wright F, Daniell T (2008)** High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest. *New Phytologist* 179: 867–876
- Öpik M, Metsis M, Daniell TJ, Zobel M, Moora M (2009)** Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist* 184: 424–437.
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier Ü, Zobel M (2010)** The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist* 188: 223–241. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x.
- Öpik M, Zobel M, Cantero J, Davison J, Facelli J, Hiiesalu I, Jairus T, Kalwij J, Koorem K, Leal M, Liira J, Metsis M, Neshataeva V, Paal J, Phosri C, Pölme S, Reier U, Saks U, Schimann H, Thiéry O, Vasar M, Moora M (2013)** Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23: 411–430.
- Öpik M, Davison J, Moora M, Zobel M (2014)** DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botanique* 92: 135–147.
- Oksanen J, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, Minchin P, Simpson G, Solymos P, Stevens MHW (2013)** *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.0–10.
- Ouédraogo SJ, Bayala J, Dembélé C, Kaboré A, Kaya B, Niang A, Somé AN (2006)** Establishing jujube trees in sub-Saharan Africa: response of introduced and local cultivars to rock phosphate and water supply in Burkina Faso, West Africa. *Agroforestry Systems* 68: 69–80.
- Pareek OP (2001)** Ber. International Centre for Underutilised Crops. Southampton, UK.
- Pellegrino E, Bedini S, Avio L, Bonari E, Giovannetti M (2011)** Field inoculation effectiveness of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in a Mediterranean agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 367–376.
- Pellegrino E, Turrini A, Gamper HA, Cafà G, Bonari E, Young JPW, Giovannetti M (2012)** Establishment, persistence and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal

inoculants in the field revealed using molecular genetic tracing and measurement of yield components. *New Phytologist* 194: 810–822.

- Peyret-Guzzon M, Farcy P, Wipf D, Stockinger H, Redecker D (2016)** Arbuscular mycorrhizal fungal communities and *Rhizophagus irregularis* populations shift in response to short-term ploughing and fertilisation in a buffer strip. *Mycorrhiza* 26:33–46. doi 10.1007/s00572-015-0644-5
- Phillips JM, Hayman DS (1970)** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158–161.
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V (1983)** Growth response of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant Soil* 70: 199–209.
- Redecker D, Thierfelder H, Walker C, Werner D (1997)** Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *Applied and environmental microbiology* 63: 1756–1761.
- Regvar M, Vogel-Mikus K, Severkar T (2003)** Effect of AMF inoculum from field isolates on the yield of green pepper, parsley, carrot, and tomato. *Folia Geobotanica* 38: 223–234.
- Rodriguez A, Sanders IR (2015)** The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *International Society for Microbial Ecology* 9 : 1053–1061.
- Salvioli A, Zouari I, Chalot M, Bonfante P (2012)** The arbuscular mycorrhizal status has an impact on the transcriptome profile and aminoacid composition of tomato fruit. *BMC Plant Biology* 12 : 44.
- Sène G, Thiao M, Manga A, Kane A, Samba-Mbaye R, Mbaye MS, Khasa D, Sylla SN (2012)** Arbuscular mycorrhizal soil infectivity and spores distribution across plantations of tropical, subtropical and exotic tree species: a case study from the forest reserve of Bandia, Senegal. *African Journal of Ecology* 50: 218-232.
- Sidibé D, Sanou H, Teklehaimanot Z, Mahamadi D, Kone S (2012)** The use of mycorrhizal inoculation in the domestication of *Ziziphus mauritiana* and *Tamarindus indica* in Mali (West Africa). *Agroforestry Systems* 85:519–528.doi:10.1007/s10457-0129486-8.
- Smith FA, Jakobsen I, Smith SE (2000)** Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 147: 57–366. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00695.x.
- Smith SE, Read DJ (2008)** Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, Amsterdam, the Netherlands.
- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Koegel S, Bouffaud M-L, Redecker D (2014)** The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLoS One* 9:e107783.
- Stover HJ, Thorn GR, Bowles JM, Bernard MA, Jacobs CR (2012)** Arbuscular mycorrhizal fungi and vascular plant species abundance and community structure in tallgrass prairies with varying agricultural disturbance. *Applied Soil Ecology* 60: 61-70.

- Sýkorová Z, Börstler B, Zvolenská S, Fehrer J, Gryndler M, Vosátka M, Redecker D. (2012)** Long-term tracing of *Rhizophagus irregularis* isolate BEG140 inoculated on *Phalaris arundinacea* in a coal mine spoil bank, using mitochondrial large subunit rDNA markers. *Mycorrhiza* 22: 69–80.
- Taib N, Mangot JF, Domaizon I, Bronner G, Debroyas D (2013)** Phylogenetic affiliation of SSU rRNA genes generated by massively parallel sequencing: New insights into the freshwater protist diversity. *PLoS One*, 10.1371/journal.pone.0058950.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011)** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tchoundjeu Z, Atangana A, Asaah E, Tsobeng A, Facheux C (2008)** Domestication, utilisation, and marketing of indigenous fruit trees in West and Central Africa. In: Akinnifesi FK, Leakey RRB, Ajayi OC, Sileshi G, Tchoundjeu Z, Matakala P, Kwesiga FR (eds.) *Indigenous fruit trees in the tropics: domestication, utilization and commercialization*. CAB International, Wallingford, UK, in association with the World Agroforestry Centre, Nairobi, Kenya, pp. 137–170.
- Tewari JC (2002)** Jujube: A Multipurpose Tree Crops for Solving Multiple Problems of Arid Lands. Central Arid Zone Research Institute. Jodhpur, India.
- Thiéry O, Vasar M, Jairus T, Davison J, Roux C, Kivistik PA, Metspalu A, Milani L, Saks Ü, Moora M, Zobel M, Öpik M (2016)** Sequence variation in nuclear ribosomal small subunit, internal transcribed spacer and large subunit regions of *Rhizophagus irregularis* and *Gigaspora margarita* is high and isolate-dependent. *Molecular Ecology* 25:2816–2832 doi:10.1111/mec.13655.
- Tichý L, Chytrý M (2006)** Statistical determination of diagnostic species for site groups of unequal size. *Journal of Vegetation Science* 17: 809–818.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986)** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) *Physiology and genetics aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris, pp 217-221.
- Tse C, Capeau J (2003)** Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique* 61: 279–293.
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V (1998)** Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* 7: 879–887. doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x.
- Verbruggen E, van der Heijden MGA, Rillig MC, Kiers ET (2013)** Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytologist* 197: 1104–1109. doi: 10.1111/j.14698137.2012.04348.x
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton G J (2009)** Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Wulandari D, Saridi, Cheng W, Tawaraya K (2016)** Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation improves *Albizia saman* and *Paraserianthes falcataria* growth in post-opencast coal mine field in East Kalimantan, Indonesia. *Forest Ecology and Management* 376: 67–73

Résumé

Le jujubier (ou *Ziziphus mauritiana* Lam.) est un arbuste épineux à usages multiples (fruits, fourrage, bois de service) prioritaire pour le reboisement et l'arboriculture fruitière dans le Sahel. Dans ce contexte où les sols sont souvent dégradés et pauvres en minéraux (P en particulier), la mycorhization et la fertilisation phosphatée pourraient jouer un rôle important dans l'amélioration de la croissance et de la productivité des jujubiers.

L'objectif principal de ce travail était d'améliorer la croissance et la production fruitière de *Z. mauritiana* par l'inoculation mycorhizienne dans deux vergers au Sénégal. Il avait pour objectifs spécifiques (i) d'évaluer les réponses à l'inoculation avec des CMA de différentes espèces de *Ziziphus* et de provenances de *Z. mauritiana* en serre, (ii) d'évaluer l'impact de l'inoculation avec *R. irregularis* IR27 sur la croissance, la survie et la production fruitière de *Z. mauritiana*, (iii) d'évaluer l'impact de l'inoculation sur la diversité des communautés de CMA associés à *Z. mauritiana* en plantation et (iv) de déterminer la persistance de *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation.

Le champignon *R. irregularis* IR27 s'est avéré le plus efficace parmi les CMA testés. Le couple *Z. mauritiana* /*R. irregularis* IR27 a donc été choisi comme modèle pour étudier l'impact de l'inoculation sur la production fruitière de deux provenances, Gola (variété indienne sélectionnée pour ses fruits de grosse taille) et Tasset (provenance locale à fruits de petite taille) dans deux sites contrastés (Amally et Keur Mangari). Nos résultats ont montré un effet positif de l'inoculation sur la croissance, la survie et le taux de mycorhization de *Z. mauritiana* à 13 et 24 mois respectivement à Amally et à Keur Mangari. L'inoculation a également augmenté la production fruitière des jujubiers à 18 et 30 mois de plantation à Keur Mangari. Ces résultats montrent la grande capacité de *R. irregularis* IR27 à compétir face aux CMA indigènes. Le séquençage Illumina MiSeq du gène *18S* a permis de révéler un impact négatif de l'inoculation sur la diversité et la richesse des communautés de CMA natifs à Amally contrairement à Keur Mangari où l'inoculation n'a pas eu d'impact ni sur la diversité ni sur la richesse des CMA. Le gène *RPB1* s'est révélé pertinent comme marqueur pour détecter *R. irregularis* IR27 dans les racines de *Z. mauritiana* inoculés et évaluer par qPCR l'intensité de la colonisation racinaire des jujubiers par *R. irregularis* IR27 qui a représenté 11 à 13% à 13 mois de plantation à Amally et 12 à 15% à 24 mois de plantation à Keur Mangari. Cependant, il s'avère important d'évaluer à plus long terme l'impact de *R. irregularis* IR27 et son devenir dans les racines de *Z. mauritiana* en plantation sur plusieurs conditions environnementales.

Improved growth and fruit production of *Ziziphus mauritiana* Lam. by mycorrhizal inoculation in orchards in Senegal

Summary

The jujube (or *Ziziphus mauritiana* Lam.) is an important multipurpose species (e.g. fruits, fodder, wood) for reforestation and fruit farming in the Sahel. In this context where soils are often degraded and deficient in phosphorus, mycorrhization and phosphorus fertilization could play a major role on improvement of jujube growth and productivity.

The main objective of this work was to improve growth and fruit production of *Z. mauritiana* by mycorrhizal inoculation in two orchards at Senegal. This work aims (i) to evaluate the responses of different species of *Ziziphus* and provenances of *Z. mauritiana* to inoculation with AMF in greenhouse conditions, (ii) to assess the impact of inoculation with *R. irregularis* IR27 on growth, survival and fruit production of *Z. mauritiana*, (iii) to assess the impact of inoculation on diversity of native AMF communities associated to *Z. mauritiana* after planting and (iv) to determinate the persistence of *R. irregularis* IR27 in roots of *Z. mauritiana* after planting.

The fungus *R. irregularis* IR27 proved to be the most effective AMF tested in this work. The pair *Z. mauritiana* /*R. irregularis* IR27 has been chosen as model to study the impact of inoculation on fruit production of two provenances, Gola (Indian variety selected for its large size fruits) and Tasset (local cultivar with small-sized fruits) in two sites with contrasting rainfall (Amally and Keur Mangari). Our results showed a positive effect of inoculation on growth, survival and mycorrhizal colonization of *Z. mauritiana* plants at 13 and 24 months after planting at Amally and Keur Mangari respectively. Inoculation increased also fruit production of jujubes at 18 and 30 months after planting at Keur Mangari. These results indicated the high ability of *R. irregularis* to compete with indigenous AMF. The MiSeq Illumina sequencing of *18S rRNA* gene revealed a negative impact of inoculation on AMF richness and diversity at Amally, unlike at Keur Mangari where inoculation had no impact on AMF richness and diversity. The *RPB1* gene proved to be an appropriate marker to detect of *R. irregularis* IR27 in inoculated *Z. mauritiana* roots and to evaluate by qPCR the root colonization of *R. irregularis* IR27 which accounted for 11 to 13% at 13 months after planting at Amally and 12 to 15% at 24 months after planting at Keur Mangari. Therefore, it is important to assess at long-term the impact of *R. irregularis* IR27 and its persistence in inoculated *Z. mauritiana* roots in large environmental conditions.

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

MOT-CLES : *Ziziphus mauritiana*, *Rhizophagus irregularis* IR27, Mycorhization contrôlée, Arboriculture fruitière, Gène *18S*, Gène *RPB1*, Ingénierie écologique.

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