

Sommaire

Introduction Générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

1. Symbiose mycorhizienne.....	4
1.1. Définition et concepts	4
1.2. Historique.....	5
1.3. Le partenaire fongique.....	6
1.4. Le partenaire végétal.....	7
1.5. Les différents Types de symbioses mycorhiziennes.....	7
1.5.1. Symbiose ectomycorhizienne	7
1.5.2. Symbiose Mycorhizienne Arbusculaire (MA).....	8
1.5.2.1. L’histoire évolutive des endomycorhizes arbusculaires	10
1.5.2.2. Les plantes à endomycorhizes arbusculaires	11
1.5.2.3. Le partenaire fongique de la symbiose MA	12
1.5.2.4. L’établissement de la symbiose MA	14
1.5.2.5. Taxonomie des CMA.....	23
1.5.2.6. La spécificité des associations MA	25
1.5.2.7. Le rôle des CMA.....	26
<i>Rôle nutritionnel</i>	26
<i>Rôle protecteur</i>	28
<i>Rôle écologique</i>	28
2. Réhabilitation des sols dégradés au sein de l’écosystème méditerranéen semi-aride.....	31
3. Réhabilitation des sols dégradés par la gestion du Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM) du sol.....	33
4. Les espèces végétales d’intérêt.....	34
4.1. <i>Acacia saligna</i>	34
4.2. <i>Lotus creticus</i>	36
4.3. <i>Retama monosperma</i>	37
4.4. <i>Juniperus oxycedrus</i>	39

4.5. <i>Pistacia lentiscus</i>	41
--------------------------------------	----

Chapitre 2 : Statut mycorhizien des espèces végétales de l'écosystème de Terga

1. Introduction	43
2. Matériels et Méthodes	44
2.1.Site d'étude et échantillonnage.....	44
2.2.Analyse physicochimique des sols.....	46
<i>Analyse granulométrique</i>	46
<i>Mesure du pH</i>	46
<i>Dosage de l'azote total</i>	46
<i>Dosage du phosphore total</i>	46
<i>Dosage de la matière organique</i>	47
2.3.Observation et évaluation de la colonisation racinaire MA	47
2.4.Détermination du Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM).....	49
2.5.Estimation de la densité des spores.....	50
2.6.Identification morphologique des spores MA.....	51
2.7.Identification génotypiques des CMA	52
2.7.1. Extraction de l'ADN à partir des racines.....	52
2.7.2. Dosage et dilution de l'ADN	52
2.7.3. Amplification de L'ADN racinaire par la nested-PCR.....	53
2.7.4. Clonage de l'ADN fongique.....	58
<i>Purification des produits PCR</i>	58
<i>Ligation</i>	58
<i>Transformation par choc thermique des cellules ultracompétentes XL2-Blue</i>	59
<i>Extraction d'ADN du plasmide bactérien</i>	61
<i>Amplification du fragment "insert"</i>	61
2.7.5. Séquençage d'ADN et analyse.....	62
2.8.Analyses statistiques.....	62
3. Résultats	63
3.1.Caractéristiques botaniques du site d'étude.....	63
3.2.Analyse physicochimique.....	65
3.3.Colonisation racinaires MA.....	65

3.3.1. Mise en évidence de la colonisation racinaire MA	65
3.3.2. Estimation du taux de colonisation racinaire MA.....	67
3.4.Potentiel infectieux mycorhizogène des sols (PIM)	68
3.5.Estimation de la densité des spores MA	70
3.6.Diversité spécifique et répartition des espèces MA dans les formations végétales.....	71
3.6.1. Abondance relative des différents types de spores	71
3.6.2. Diversité spécifique des spores MA	78
3.7.Corrélation entre la densité des spores, colonisation racinaire et la fertilité des sols	84
3.8.Identification génotypique.....	84
3.8.1. Extraction et dosage de l'ADN	84
3.8.2. Amplification « PCR-nested » du fragment ADNr 18s.....	85
3.8.3. Amplification « PCR-nested » du fragment ADNr 25s.....	87
3.8.4. Clonage de l'ADN fongique.....	88
4. Discussion.....	92
5. Conclusion.....	100

Chapitre 3 : Influence des plantes d'intérêt sur la croissance et la mycorhization d'*A. saligna*

1. Introduction	101
2. Matériels et Méthodes.....	102
2.1.Dispositif expérimental	102
2.2.Paramètres mesurés	103
2.2.1. Etude de la croissance d' <i>A. saligna</i>	103
2.2.2. Estimation des taux de colonisations racinaire.....	103
2.2.3. Détermination de la diversité catabolique des communautés bactériennes	103
2.2.3.1.Détermination de la capacité de rétention d'eau du sol (CRE).....	104
2.2.3.2.Mesure du carbone dioxyde (CO ₂) absorbé.....	104
2.2.3.3.Préparation des plaques du système de microrespirométrie MicroResp...	105
2.2.4. L'identification génotypique des CMA	105

2.2.5. Analyse statistique.....	107
3. Résultats	107
3.1.Etude de la croissance d' <i>A. saligna</i>	107
3.1.1. Hauteur des plantes d' <i>A. saligna</i>	107
3.1.2. Biomasse aérienne et racinaire.....	107
3.2.Colonisation mycorhizienne racinaire des plantes d' <i>A. saligna</i>	110
3.3.Diversité catabolique microbienne	110
3.4.Identification géotypique.....	111
3.4.1. Extraction et dosage de l'ADN.....	111
3.4.2. Amplification « PCR-nested » du fragment ADNr 18s.....	113
3.4.3. Amplification « PCR-nested » du fragment ADNr 25s.....	114
3.4.4. Clonage de l'ADN fongique.....	114
4. Discussion.....	116
5. Conclusion.....	119
Conclusion générale et perspectives	120
Références bibliographiques	123
Annexes	147

Introduction Générale

Introduction générale

La biodiversité est soumise à des changements draconiens suite aux conditions environnementales et activités humaines. Sa restauration et sa préservation est une voie vers un développement durable car elle participe sous différentes formes au bien-être de la biosphère et en particulier de l'homme. Cependant il est nécessaire de préserver les ressources naturelles et de les gérer avec précaution et intelligence dans la mesure où il faut les valoriser sans les perdre.

Parmi les composantes de la biosphère, les formations végétales sont particulièrement sensibles à ces changements. Leur dégradation engendre des dysfonctionnements dans le biofonctionnement et la stabilité des écosystèmes terrestres (Tilman et Downing 1994 ; Tilman *et al.*, 1996). Ce dysfonctionnement écologique ne permet plus au couvert végétal d'assurer sa pérennisation et son développement. La capacité d'un écosystème à supporter diverses perturbations et à adopter différentes stratégies pour recouvrir certaines de ses propriétés originelles (fonctions, structure, composition, etc.) a été nommée « capacité de résilience (Peterson *et al.*, 1998). Cette capacité est fortement dépendante du degré d'établissement et de fonctionnement des symbioses mycorhiziennes (Barea *et al.*, 1997).

Les symbioses mycorhiziennes constituent un élément clé dans la dynamique et la productivité de l'écosystème mais également les processus assurant la coexistence des plantes (Janos, 1980 ; van der Heijden *et al.*, 1998). Les champignons mycorhiziens exercent également une pression sélective sur les microorganismes saprophytes du sol tant au niveau de leur diversité génétique que de leur diversité fonctionnelle (Marschner et Timonen 2005; Offre *et al.*, 2007) et constituent ainsi un complexe trophique associant le symbiote, la microflore mycorhizosphérique et la plante. Ils ont aussi un rôle significatif dans l'organisation spatiale et temporelle de l'évolution et de l'écosystème. En conséquence, les champignons mycorhiziens, peuvent être considérés comme des composantes clés dans les mécanismes biologiques assurant la capacité de résilience d'un écosystème et doivent être considérés au même titre que le choix de la plante dans les stratégies de réhabilitation des sols dégradés (Duponnois *et al.*, 2010).

Les écosystèmes naturels subissent de fortes contraintes lorsqu'ils sont le théâtre d'activités industrielles. C'est le cas en Algérie des carrières dont les ressources naturelles sont intensivement exploitées (granulats et sable) ce qui a conduit à des impacts négatifs sur l'environnement. La sablière de Terga, choisi comme site d'étude, est située au nord-ouest

algérien. Elle représente un cas très intéressant qui montre l'impact négatif des carrières sur l'environnement. Ces dernières années l'exploitation a dépassé la limite prescrite par le cahier des charges qui limite l'extraction à 3000 t/j (soit 2140 m³/j). Parmi les impacts négatifs de l'extraction du sable, la suppression du couvert végétal naturel et la dégradation des propriétés physicochimiques et biologiques du sol est aggravée du fait que la zone côtière de Terga est un écosystème méditerranéen semi-aride soumis à des perturbations climatiques (faibles précipitations, longues périodes de sécheresses).

Après toute exploitation de carrière, la remise en état est obligatoire et celle-ci comprend nécessairement la mise en place d'une couverture végétale. La fragilité de l'écosystème de la zone côtière de Terga limite la régénération de la végétation d'où la nécessité de l'intervention de l'homme par une stratégie de revégétalisation dans le cadre d'un développement durable.

Les plantes des dunes de sable des zones semi-arides sont des espèces qui sont adaptées à un milieu inhospitalier, caractérisé par un substrat sablonneux et pauvre en nutriments et qui sont tolérantes aux conditions de stress spécifiques tels les températures élevées durant la journée, des vents forts salés générant un mitraillage par des grains de sable et les embruns salés (Rodríguez-Echevarria et Freitas, 2006). Ces plantes indigènes sont les mieux adaptées à ces conditions qui limitent la survie d'autres espèces végétales et sont par excellence les outils à utiliser dans la réhabilitation de ces sols. De plus, la plupart des espèces végétales du milieu méditerranéen (Requena *et al.*, 1996, 1997) et des sols maritimes (Nicolson et Johnston 1979 ; Giovannetti et Nicolson 1983 ; Koske et Gemma 1997) sont mycorhizées ce qui contribue efficacement à l'établissement et au maintien des espèces végétales dans des conditions écologiques très contraignantes (Le Tacon *et al.*, 1987), en particulier dans les écosystèmes semi-arides (Carpenter et Allen, 1988).

Pour réhabiliter les sols dégradés et installer un couvert végétal permanent, une action serait d'augmenter le potentiel mycorhizien des sols par l'introduction de plantes natives et mycotrophes. Pour contribuer à restaurer la végétation de ces dunes littorales, des prospections édaphique, botanique et microbiologique de leurs sols sont nécessaires. En effet, l'étude microbiologique permet de comprendre la répartition de la flore microbienne, en particulier les champignons mycorhiziens arbusculaires. Par conséquent, l'objectif principal de ce travail est de comprendre les associations mycorhiziennes arbusculaires chez une végétation d'un écosystème littoral, méditerranéen semi-aride « sablière de Terga » et leur répartition dans le sol afin d'aboutir à une gestion durable de ces habitats.

Ce travail de thèse comprend trois parties :

- Chapitre 1 : Synthèse bibliographique inhérente au sujet.
- Chapitre 2 : Statut mycorhizien *in natura* des espèces végétales de l'écosystème de Terga : *Acacia saligna*, *Lotus creticus*, *Pistacia lentiscus*, *Retama monosperma* et *Juniperus oxycedrus*.
- Chapitre 3 : Influence des plantes d'intérêt sur la croissance et la mycorhization d'*A. saligna*.

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

1. Symbiose mycorhizienne

1.1.Définitions et concepts

Le terme **mycorhize** a été créé par Frank en 1885, pour désigner les relations symbiotiques entre les plantes et les champignons. Par la suite des définitions plus larges ont été données à cette union (par exemple Hawksworth *et al.*, 1995), mais sont de peu de valeur car ils n'excluent pas les associations pathogènes.

Les mycorhizes sont désormais considérées différer principalement des autres associations plantes-champignons parce qu'elles sont des associations intimes avec une interface spécialisée où les échanges des matières se produisent entre les cellules vivantes (Nehls *et al.*, 2001; Pfeffer *et al.*, 2001). Une nouvelle définition plus large, de mycorhizes qui embrasse toute la diversité des mycorhizes tout en excluant toutes les autres associations plantes-champignons est publiée par Brundrett (2004) : « *Une mycorhize est une association symbiotique entre un champignon et une racine d'une plante vivante, essentielle pour l'un ou les deux partenaires. Les mycorhizes sont principalement responsables du transfert d'éléments nutritifs. Elles se produisent dans un organe végétal spécialisé où le contact intime résulte du développement synchronisé des plantes-champignons* ».

Les mycorhizes constituent des partenaires essentiels dans la relation sol-plantes-microorganismes. En effet, certaines espèces végétales ne peuvent croître normalement sans leur symbiote fongique dont elles sont fortement dépendantes et avec qui elles ont co-évolué (Janos, 1980 ; Brundrett, 1991 ; Gobat *et al.*, 2003).

Toute plante contenant un champignon peut être désignée comme un «hôte», indépendamment du fait que l'association est bénéfique ou pas. De nombreux termes **symbiote**, **associé**, **mycobionte**, **habitant...** peuvent être utilisés pour désigner des champignons mycorhiziens dans les plantes et afin d'éviter toute confusion, le terme **endophyte** n'est pas employé pour ces derniers (Brundrett, 2004). Par ailleurs le terme neutre de «**colonisation**» pour décrire l'activité de champignon mycorhizien, est préférable à l'infection (ce qui implique la maladie) (Brundrett *et al.*, 1996;. Smith et Read, 1997). De même, selon Baker (1978) «**potentiel d'inoculum**» devrait être utilisé pour désigner l'activité fongique dans le sol, plutôt que l'infectiosité, comme c'est le cas avec d'autres champignons du sol.

La présence des mycorhizes entraîne l'apparition de nouveaux compartiments biologiques dans la rhizosphère. En modifiant la physiologie de la plante et donc la sécrétion des exsudats

racinaires, les mycorhizes induisent des modifications significatives dans la structure des communautés bactériennes au voisinage de ces racines: le terme **mycorhizosphère** a été utilisé pour désigner ce volume de sol sous influence des mycorhizes et l'**hyphosphère** désigne le sol conditionné par le réseau d'hyphes mycéliens des champignons mycorhiziens (**Fig. 1**) (Rambelli, 1973 ; Linderman, 1988).

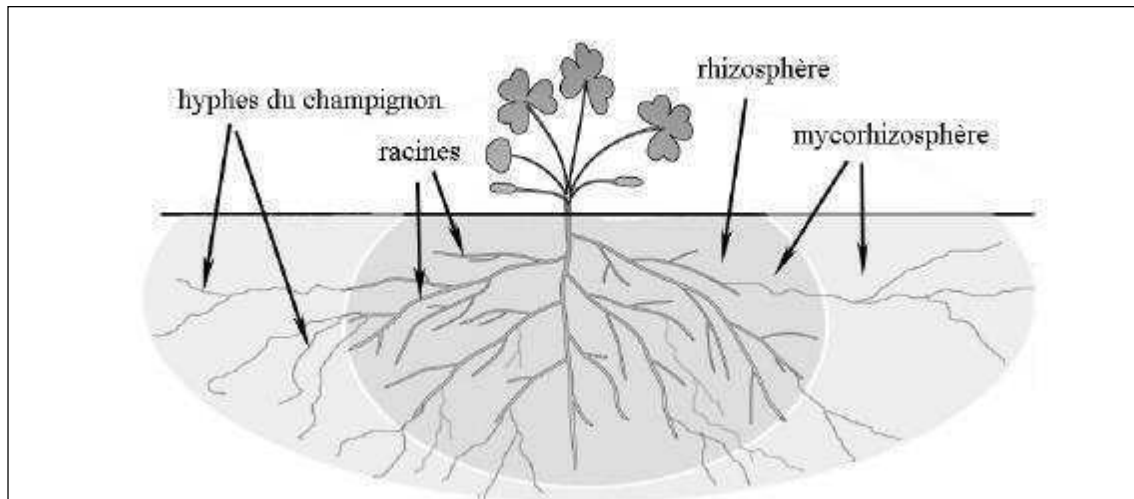


Figure 1 : Les différents compartiments de la mycorhizosphère (Gavériaux, 2012).

1.2.Historique

Les premières observations microscopiques de mycorhizes de différentes espèces d'arbres sont décrites dès 1840 par Theodor Hartig qui ne reconnaît pas la nature fongique des structures observées. En 1874, Bruchmann renouvelle sur des racines de pin ces premières observations et reconnaît la nature fongique du réseau qui entoure toutes les cellules des tissus externes de la racine. En 1883, Gibelli *in* Garbaye (2013) décrit et illustre avec précision cette association fongique chez le châtaignier, le chêne, le noisetier et le charme. Il considère que ces structures mixtes sont des associations parasitiques mais bénignes car ubiquistes.

Albert Bernard Frank était le premier à synthétiser toutes les observations de cette association en prenant d'abord acte de la présence systématique de filaments fongiques à la surface et à l'intérieur des racines des arbres observés, il a soumis ce fait à l'expérience, a démontré de façon causale le caractère obligatoire et bénéfique pour la plante de la présence des champignons et il a conclu que l'association était nécessaire au bon développement des jeunes arbres. Ensuite en 1885, Frank a introduit le terme de *mycorhize* (du Grecs *mukès* : champignon et *rhiza* : racine) pour désigner les organes mixtes racines-champignons. Il donna à cette association le statut de *symbiose* « *une mycorhize est le siège d'une symbiose mutualiste entre une plante et un*

champignon » et décrit les différents stades de la colonisation des racines des arbres par les champignons et du développement des mycorhizes.

En 1886, Robert Hartig approuve et défend la nouvelle théorie et fait définitivement adopter le nom de **Réseau de Hartig** en l'honneur de son père Theodor Hartig qui avait le premier décrit cette structures dès 1840. Par la suite, tout au long du XXe siècle, plusieurs chercheurs étudièrent d'autres types de mycorhizes (Garbaye, 2013).

1.3.Le partenaire fongique

Les champignons mycorhiziens, éléments de la population de microorganismes de la rhizosphère, sont hétérotrophes pour les substances carbonées de la plante qu'ils colonisent. Ils fournissent en retour de l'azote, du phosphore et d'autres substances minérales qu'ils sont capables de mobiliser grâce à leurs connexions hyphales avec le sol. Ces microorganismes symbiotiques vivent à l'intérieur des racines en formant des structures bien différenciées et en même temps présentent des prolongements mycéliens extra-racinaires qui se propagent dans le sol (Diem *et al.*, 1998).

Les champignons mycorhiziens sont des champignons qui appartiennent aux phylums Ascomycota, Basidiomycota et Glomeromycota du règne Mycota (Schußler *et al.*, 2001 ; Taylor et Alexander, 2005) (**Tab. 1**).

Tableau 1: Principales divisions actuelles du règne fongique (Gavériaux, 2012).

Chytridiomycota	Descendants actuels des plus anciens Mycota apparus sur terre ; ils ont des cellules mobiles munies d'un flagelle postérieur.
Entomophthoromycotina	Parasites (pf. saprophytes), présence de zoospores uniflagellées, avec une alternance de génération haploïde et diploïde.
Zoopagomycotina	Parasites de champignons ou d'amibes (autrefois dans les zygomycètes (quelques dizaines d'espèces).
Kickxellomycotina	Les hyphes possèdent au niveau de leurs cloisons des pores lenticulaires (ce sont des parasites ou des commensaux)
Mucormycotina	Correspondent à la plupart des espèces autrefois placées dans les zygomycètes.
Neocallimastigomycota	Organismes anaérobies (dépourvus de mitochondries), vivant dans le système digestif des grands mammifères herbivores.
Microsporidia	Plus de 1100 espèces, des parasites intracellulaires des animaux (y compris l'homme), posant de nombreux problèmes aux éleveurs.
Glomeromycota	Hyphes non cloisonnés, pas de reproduction sexuée, formation d'endomycorhizes vésiculo-arbusculaires.
Ascomycota	Hyphes septés, corps de Woronin au niveau des cloisons, présence d'une dicaryophase, production d'endospores dans des asques.
Basidiomycota	Hyphes septés, dolipores au niveau des cloisons, présence d'une dicaryophase, production d'exospores sur des basides

1.4. Le partenaire végétal

La quasi-totalité des végétaux terrestres actuels présente des associations avec des champignons. Les racines de plus de 80% des espèces de plantes vasculaires présentent ou sont susceptibles de présenter des partenaires fongiques non pathogènes. La symbiose mycorhizienne est donc un phénomène général chez les plantes à l'exception de quelques familles comme les Brassicaceae, les Caryophyllaceae, les Cyperaceae, les Juncaceae, les Chenopodiaceae et les Amaranthaceae qui présentent très peu d'associations mycorhiziennes (Strullu, 1991 ; Norman *et al.*, 1995).

1.5. Les différents Types de symbioses mycorhiziennes

En 1885, Le Tacon considéra cinq types d'associations mycorhiziennes selon les caractéristiques morphologiques. Smith et Read (1997), sur la base de leurs caractéristiques morphologiques et sur les partenaires fongiques et végétaux impliqués dans la symbiose, ont décrit sept types : les endomycorhizes à arbuscules, les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes, les mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes, éricoïdes et orchidoïdes. Ces associations symbiotiques sont récemment classées en huit types de mycorhizes (**Fig. 2**) (Garbaye, 2013). Les symbioses mycorhiziennes arbusculaires et ectomycorhiziennes sont les plus abondantes et les plus répandues (**Fig. 3**).

1.5.1. Symbiose ectomycorhizienne

Les ectomycorhizes (du grec *ecto* qui signifie à l'extérieur) sont ainsi nommées du fait de deux traits morphologiques caractéristiques. D'une part, les filaments du champignon forment un manchon feutré plus ou moins dense mais continu, appelé manteau, qui recouvre la surface de la racine ; d'autre part, le champignon ne franchit pas les parois des cellules et ne les pénètre pas. Le symbiote fongique est bien développé à l'extérieur de la racine et reste extérieur aux cellules de la plante hôte. Cette symbiose se caractérise donc par la présence d'un manteau fongique autour de chaque racine courte ainsi que d'un réseau d'hyphes intercellulaires pénétrant entre les cellules épidermiques et corticales « **réseau de Hartig** ».

Pas moins de 10 000 espèces de champignons, principalement des Basidiomycota et Ascomycota et de 8000 espèces de plantes peuvent être impliqués globalement dans cette symbiose (Taylor et Alexander, 2005). Bien que cela ne représente qu'une petite fraction du nombre total des plantes terrestres, ces espèces sont souvent des composantes dominantes des écosystèmes forestiers. Les espèces végétales impliquées sont généralement des arbres ou des arbustes des forêts de

montagne, froides, tempérées ou boréales, mais aussi elles comprennent les communautés des arbustes nain arctique-alpine, la végétation méditerranéenne et de nombreuses espèces dans les Dipterocarpaceae et les légumineuses (Caesalpinoideae) dans les forêts tropicales (Finlay, 2008).

1.5.2. Symbiose Mycorhizienne Arbusculaire (MA)

La symbiose mycorhizienne arbusculaire (MA) est une association symbiotique entre deux eucaryotes ; les Gloméromycètes et la plupart des espèces végétales. Des controverses divisent encore aujourd'hui certains auteurs sur l'appellation universelle de cette association mycorhizienne. Pour certains auteurs (Smith et Smith, 1997) l'appellation mycorhize à arbuscules n'est pas très appropriée car il est difficile d'observer les arbuscules à l'intérieur des racines colonisées par ces champignons alors que 80 % des champignons forment des vésicules. C'est pourquoi ils retiennent l'appellation de mycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA). Mais pour d'autres Morton et Benny (1990) et Allen (1996), les Gigasporineae ne forment pas de vésicules et presque tous les champignons de l'ordre des Glomales forment des arbuscules. Dans ce document, l'appellation mycorhizes à arbuscules (MA) sera retenue.

Enfin, nous nous intéressons plus particulièrement aux endomycorhizes à arbuscules qui constituent le type de mycorhizes le plus répandu et le plus ancien, qui auraient coévolué avec les plantes terrestres depuis au moins 460 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000) et qui sont maintenant incapables de survivre sans plante hôte d'où le qualificatif de symbiontes obligatoires (Brundrett, 2004).

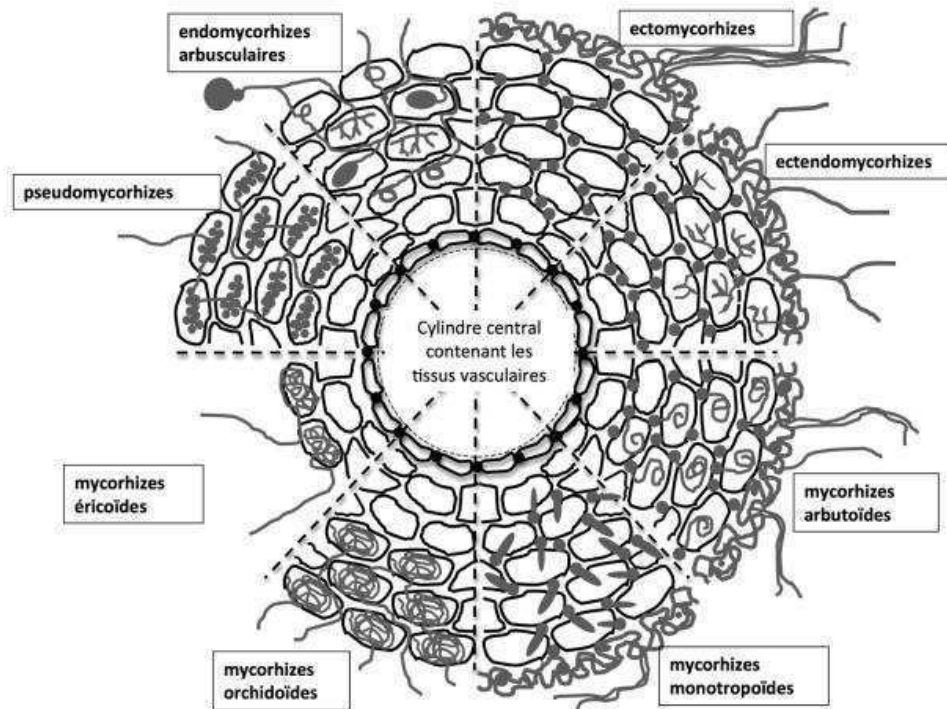


Figure 2 : Représentation schématique des sections transversales des huit types des mycorhizes (Garbaye, 2013).

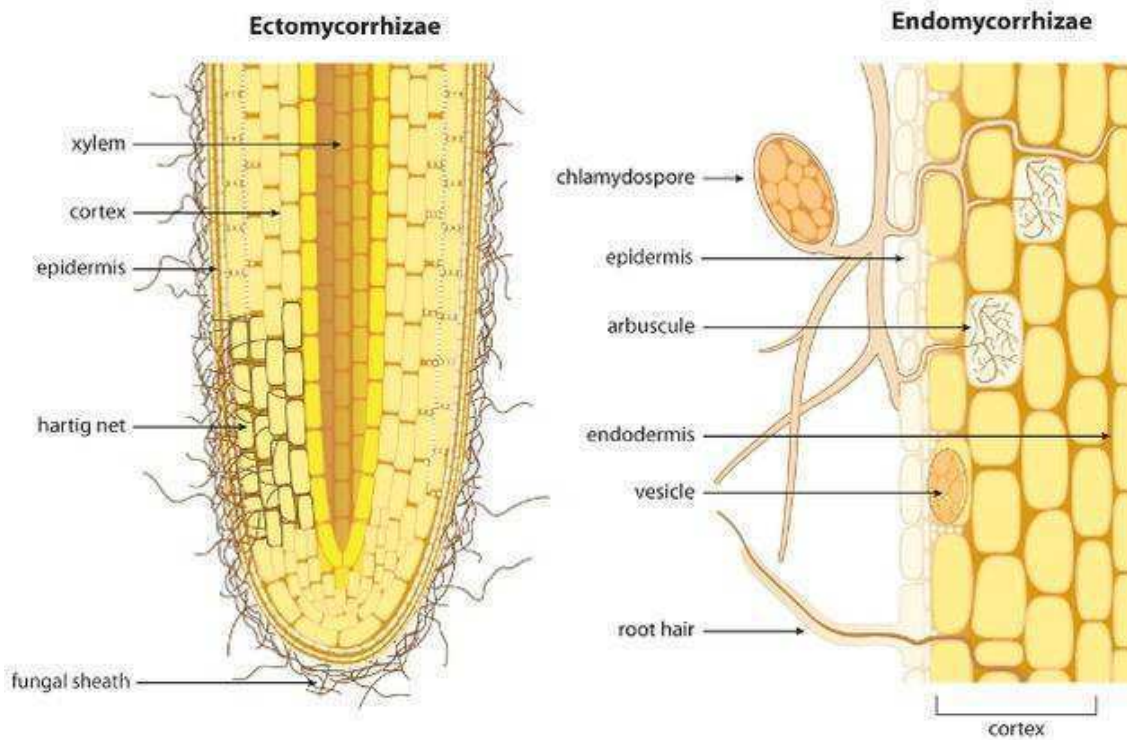


Figure 3 : Schéma montrant la différence entre les ectomycorhizes et les endomycorhizes des racines des plantes (Bonfante et Genre, 2010).

1.5.2.1. L'histoire évolutive des endomycorhizes arbusculaires

En 1975, Pirozynski et Malloch ont proposé qu'une symbiose mutuellement bénéfique entre les champignons et les plantes, avait aidé l'invasion initiale des plantes dans un environnement terrestre dur notamment après la découverte d'anciens fossiles en Rhynie (Écosse) dans des roches d'un écosystème fossilisé datant du Dévonien (345-395 millions d'années) qui abritait une flore avec des associations symbiotiques. Ces fossiles ont fourni beaucoup d'informations non seulement sur les plantes terrestres du Dévonien, mais aussi sur les champignons qui habitaient ce paleoecosystem (Taylor *et al.*, 1995 ; Krings *et al.*, 2007). Des hyphes aseptés, des vésicules et des spores ont été détectés dans les tissus du rhizome de *Nothia aphylla*, une plante vasculaire (Krings *et al.*, 2007), suggérant que les endophytes pourraient être liées aux champignons MA d'aujourd'hui qui existaient déjà il y a 400 millions d'années (Remy *et al.*, 1994).

Lorsque les premiers organismes photosynthétiques ont commencé à coloniser les terres émergées, les végétaux ont dû résoudre des problèmes posés par leur alimentation hydrique et minérale. Ils ont dû aussi faire face aux contraintes imposées par la lumière atmosphérique, plus riche en rayons ultraviolets que le milieu marin et aux écarts thermiques accrus en milieu terrestre. Les végétaux aquatiques ont été dans l'impossibilité de s'adapter simultanément à toutes ces contraintes par leur propre évolution (Le Tacon et Selosse, 1997). L'établissement de symbiose a permis d'apporter des solutions et d'effectuer un saut **macroévolutif**. Le plus grave problème rencontré par les plantes était l'acquisition des ions phosphates connus pour être très peu mobiles et forment des composés insolubles avec la plupart des cations dominants dans les sols (Fitter et Moyersoen, 1996). Par conséquent, la symbiose a été **un facteur clé** dans la colonisation des terres par les plantes (Pirozynski et Malloch, 1975).

Au cours de l'évolution, les végétaux vasculaires ont développé plusieurs types de mycorhizes impliquant différents champignons et différentes espèces végétales par rapport à la symbiose MA ancestrale.

Après la découverte des fossiles de l'Ordovicien où des spores et des hyphes ressemblant fortement aux champignons MA d'aujourd'hui ont été trouvés, Redecker *et al.* (2000) ont affirmé que les premiers Gloméromycètes datent de 460 millions d'années (**Tab. 2**).

1.5.2.2. Les plantes à endomycorhizes arbusculaires

Les endomycorhizes arbusculaires concernent l'immense majorité des espèces végétales terrestres, non seulement actuelles mais dès la colonisation des continents par les végétaux il y a plus de 400 millions d'années (**Tab. 2**). En effet, des endomycorhizes arbusculaires typiques, ainsi que des spores de Gloméromycètes représentant presque toute la gamme de diversité morphologique actuelle, ont été trouvées dès le Dévonien dans des fossiles d'ancêtres de prêles et de fourragères, puis de Cordaites, Gymnospermes ancestrales (Garbaye, 2013).

Tableau 2: Chronologie des principales étapes de l'évolution des organismes pluricellulaires dans la biosphère terrestre (Garbaye, 2013).

Temps avant présent et (durée) en millions d'années	Périodes ou systèmes géologiques	Plantes	Champignons	Symbioses plantes-champignons	Autres événements repères
2 à présent (2)	Quaternaire	Développement de l'agriculture par l'homme			Sixième extinction massive (en cours actuellement) Homme moderne
65 à 2 (63)	Tertiaire	Diversification des Angiospermes (plantes à fleurs)			Principaux genres actuels de lichens Premiers hominidés
140 à 65 (75)	Crétacé		Ascomycètes et Basidiomycètes déjà bien diversifiés	Premières ectomycorhizes	Cinquième extinction massive, dont la disparition des dinosaures
200 à 140 (60)	Jurassique	Apparition des Angiospermes (plantes à fleurs)			Premiers mammifères (marsupiaux) et premiers oiseaux
250 à 200 (50)	Trias		Principaux genres actuels de Gloméromycètes		Premiers dinosaures
290 à 250 (40)	Permien				Quatrième extinction massive
360 à 290 (30)	Carbonifère	Premières Gymnospermes (cordaites, cycas, conifères)			Premiers replis
410 à 360 (50)	Dévonien	Premières Ptéridophytes (fourragères et prêles géantes)	Premiers champignons à filaments cloisonnés		Premiers vertébrés terrestres Troisième extinction massive
440 à 410 (30)	Silurien	Premières Embryophytes (hépatiques, mousses)		Premières mycorhizes arbusculaires	Premiers insectes Premiers lichens
510 à 440 (70)	Ordovicien	Premières plantes terrestres	Premiers Gloméromycètes		Explosion de la biodiversité, puis deuxième extinction massive
550 à 510 (40)	Cambrien		Premiers champignons terrestres		Diversification des formes de vie, puis première extinction massive
Avant (550)	Précambrien	Algues vertes dans les océans et les eaux douces depuis au moins 500 millions d'années	Champignons aquatiques dans les océans et les eaux douces		La vie évolue dans les océans et les eaux douces depuis déjà deux ou trois milliard d'années

Vu la longue histoire de l'évolution des champignons MA et leur faible spécificité avec l'hôte (Bever *et al.*, 1996; Helgason *et al.*, 2007), il n'est pas surprenant que les Gloméromycètes vivent en association permanente avec les racines de la majorité des plantes (Angiospermes, Gymnospermes, Ptéridophytes et quelques Bryophytes) (Smith et Read, 1997).

La symbiose MA concerne l'immense majorité des plantes des zones arides et semi-arides, en particulier, toutes les plantes connues pour résister à la sécheresse, portent des endomycorhizes: acacias (Diem *et al.*, 1981), thuya de Berbérie (Díaz et Honrubia, 1993), arganier (Nouaim *et al.*, 1991), oléastre, caroubier, palmier dattier (Al-Whaibi, 2009).

1.5.2.3.Le partenaire fongique de la symbiose MA

Les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) sont les champignons les plus abondants dans les sols; ils constituent 5 à 50% de la biomasse microbienne des sols (Olsson *et al.*, 1999). La biomasse des hyphes mycorhiziens peut varier de 54 à 900 kg par hectare (Zhu et Miller, 2003).

Ces champignons du sol appartiennent à un nouveau phylum, Glomeromycota, qui a une origine ancestrale supposée au moins de 460 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000; Schußler *et al.*, 2001). En raison de cette ancienne association avec les plantes, les champignons MA ont peut-être perdu leur capacité à vivre et à compléter leur cycle de vie en l'absence du partenaire végétal (Brundrett, 2004). Cette symbiose a des conséquences importantes pour les échanges des éléments nutritifs dans le sol, étant donné que les champignons MA fournissent aux plantes hôtes des nutriments essentiels, tels que le phosphate, quand il est rare ou a une faible mobilité dans la solution du sol. À son tour, le carbone photosynthétique est transporté dans le sol par l'intermédiaire du transfert de sucre à partir de la racine à leurs champignons symbiotiques, qui transloquent plus tard ce carbone sous forme de lipides et de sucres dans le mycélium externe qui se propage dans le sol (Bago *et al.*, 2003). En échange des nutriments, la plante peut fournir au champignon jusqu'à 20% du produit de sa photosynthèse sous forme de carbohydrates (Bago *et al.*, 2000; Bago *et al.*, 2003 ; Harrison, 2005).

Les Gloméromycètes sont des biotrophes obligatoires, incapables de compléter leur cycle de vie sans symbiose (Bonfante et Bianciotto, 1995). Les spores fongiques MA (**Fig. 4**) sont la seule phase où le mycobionte est indépendant de la plante. Leur taille varie entre 20 à 1000 µm de diamètre (Brundrett *et al.*, 1996). Elles sont généralement de forme sphérique, mais chez certaines espèces elles peuvent présenter une ampoule basale ou être accompagnées d'une sorte

de sac annexe (Morton, 1988 ; Garbaye, 2013), avec une paroi chitineuse épaisse à plusieurs couches et contiennent des réserves nutritives lipidiques sous forme de gouttes huileuses et un très grand nombre de noyaux, jusqu'à 2000 par spore (Bécard et Pfeffer, 1993).

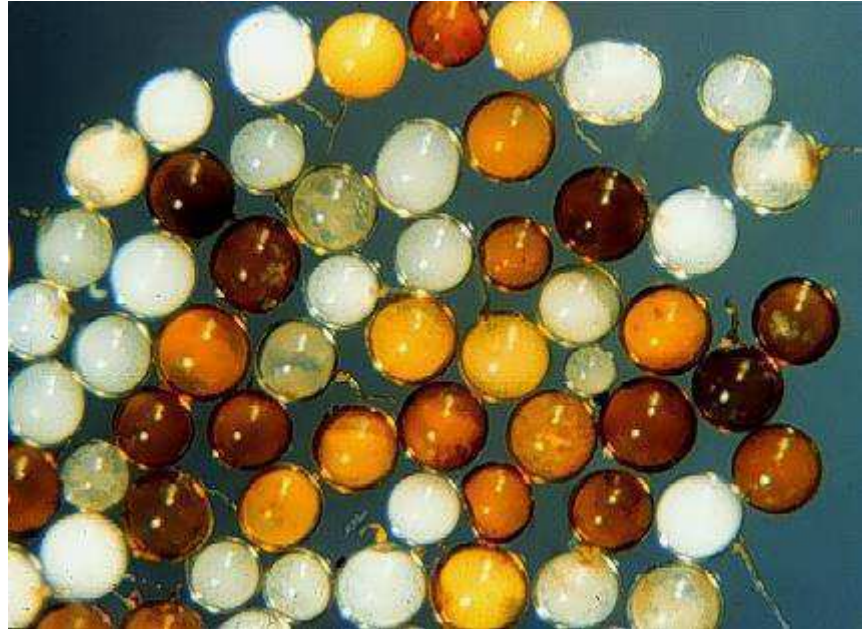


Figure 4: Un mélange des spores mycorhiziennes arbusculaires sous la loupe

(<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/gigasporaceae/gigaspora/decipiens>)

La classification classique des Gloméromycètes repose presque entièrement sur les caractères morphologiques des spores et la structure de leurs parois. Ces spores constituent l'organe de reproduction et de dissémination typique des champignons MA.

Les Gloméromycètes ont également un caractère très particulier qui les différencie des autres phylums du règne des Mycètes en particulier des Ascomycètes et des Basidiomycètes. Les hyphes ne sont pas cloisonnés, ils possèdent de très nombreux noyaux et la structure est dite siphonnée (c'est-à-dire une forme de tuyau) ou cœnocytique (formé de plusieurs cellules fusionnées). Un Gloméromycète est donc fondamentalement un réseau de filaments constituant une seule grande cellule, dans laquelle circulent les ressources nutritives et renferme des noyaux haploïdes contenant des informations génétiques différentes (Bago *et al.*, 1999 ; Garbaye, 2013).

Le mycélium extra-racinaire des Gloméromycètes colonise le sol et sécrète en abondance une *glycoprotéine* appelée **glomaline**. Cette substance joue un rôle important dans la stabilité et la fertilité des sols grâce à son caractère à la fois hydrophobe, stable, collant et complexant les métaux. A l'extrémité de l'hyphé du mycélium extra-racinaire, les spores sont produites dans le

sol en nombre variable, de quelques dizaines à 10.000 spores par 100 g de sol (Frioni *et al.*, 1999 ; Li et Zhao, 2005; Abbas *et al.*, 2006;Camprubí *et al.*, 2010). La richesse spécifique des spores peut atteindre une cinquantaine d'espèces de Gloméromycètes dans un site donné, mais elle est plus fréquemment de l'ordre de la dizaine (Garbaye, 2013).

1.5.2.4.L'établissement de la symbiose MA

L'établissement de la symbiose MA commence par la colonisation d'une racine compatible par des hyphes produits par les propagules fongiques MA du sol, les spores asexuées ou les racines mycorhizées. Même les racines mortes de plantes annuelles pourraient être une source d'inoculum, car elles protègent le champignon contre les risques environnementaux jusqu'au moment où de nouveaux hyphes peuvent se développer sur les racines et coloniser d'autres plantes (Requena *et al.*, 1996).

Les spores MA germent sous des conditions appropriées d'eau et de température et les hyphes se développent après environ 2-3 semaines. Plusieurs noyaux de spores se déplacent dans le mycélium et certains d'entre eux subissent une mitose (Bianciotto *et al.*, 1995). Pendant ce temps, les colonies fongiques s'étendent à quelques centimètres, montrant une caractéristique de croissance à dominance apicale marquée avec peu de ramification d'hyphes.

En absence d'une racine de l'hôte, la croissance des hyphes cesse après environ 2-4 semaines ; des hyphes de cloisonnement se produisent à partir du sommet (Mosse, 1988). Le cloisonnement est apical accompagné d'une vaste vacuolisation et la rétraction du protoplasme, y compris la plupart des noyaux, en direction de la spore (Logi *et al.*, 1998). La croissance de l'hyphe est limitée à quelques millimètres ce qui confirme le caractère strictement symbiotique des Gloméromycètes. Pendant cette **phase a-symbiotique (Fig. 5)**, le champignon vit essentiellement de ses réserves de triglycérides. La présence dans le milieu de germination-croissance de différentes sources de carbone et d'azote a peu d'effet sur la longueur ou l'extension de ce développement (Hepper, 1979).

En présence d'une racine, des signaux moléculaires s'établissent entre l'hyphe et la racine pour que chacun deux décèle la présence de l'autre et rentre en contact. Cette phase est appelée **phase pré-symbiotique (Fig. 5)** où les deux partenaires se préparent à l'association symbiotique. Pendant cette phase des molécules actives sont produites par les deux partenaires capables de modifier l'expression des gènes nécessaires à l'établissement des structures symbiotiques (Bécard *et al.*, 2004).

Étant donné que dans de nombreuses interactions plantes-microorganismes, le dialogue entre les partenaires est déclenché par la présence de substances phénoliques des végétaux, en particulier les flavonoïdes, considérés jusque là comme des molécules de signaux chez les végétaux pendant la formation de mycorhizes. Cependant, plusieurs travaux ont montré que les flavonoïdes exercent seulement un effet positif sur la germination des spores et la croissance des hyphes au cours de la phase a-symbiotique (Bécard et Piché, 1989; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Poulin *et al.*, 1997; Tsai et Phillips, 1991). Leur rôle se limite probablement à un effet stimulant sur la croissance fongique MA, facilitant ainsi la rencontre avec la racine hôte (Requena *et al.*, 2007).

Akiyama *et al.* (2005) ont réussi à isoler les composés actifs qui déclenchent la ramification des hyphes sur des spores germées. Le composé est un strigolactone, un apocaroténoïde à très forte activité biologique capable d'activer en quelques minutes et à des concentrations inférieures au nano-molaire, le métabolisme mitochondrial du partenaire fongique (Besserer *et al.*, 2006; Besserer *et al.*, 2008; Besserer *et al.*, 2009). L'instabilité des strigolactones fait qu'un gradient de concentration se forme autour de la racine de telle sorte que leur perception par le champignon est un indicateur fiable de la proximité d'une plante hôte (Parniske, 2005).

Les strigolactones étaient déjà connues pour activer la germination des graines de plantes parasites, la striga et l'orobanche. Ces végétaux sont des biotrophes obligatoires comme les champignons MA et doivent, pour leur survie, déceler la présence d'une plante hôte avec la meilleure efficacité possible (Bouwmeester *et al.*, 2007). Outre leurs rôles dans la rhizosphère, les strigolactones jouent aussi dans la plante le rôle d'hormones végétales, notamment impliquées dans le contrôle architectural de la partie aérienne (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

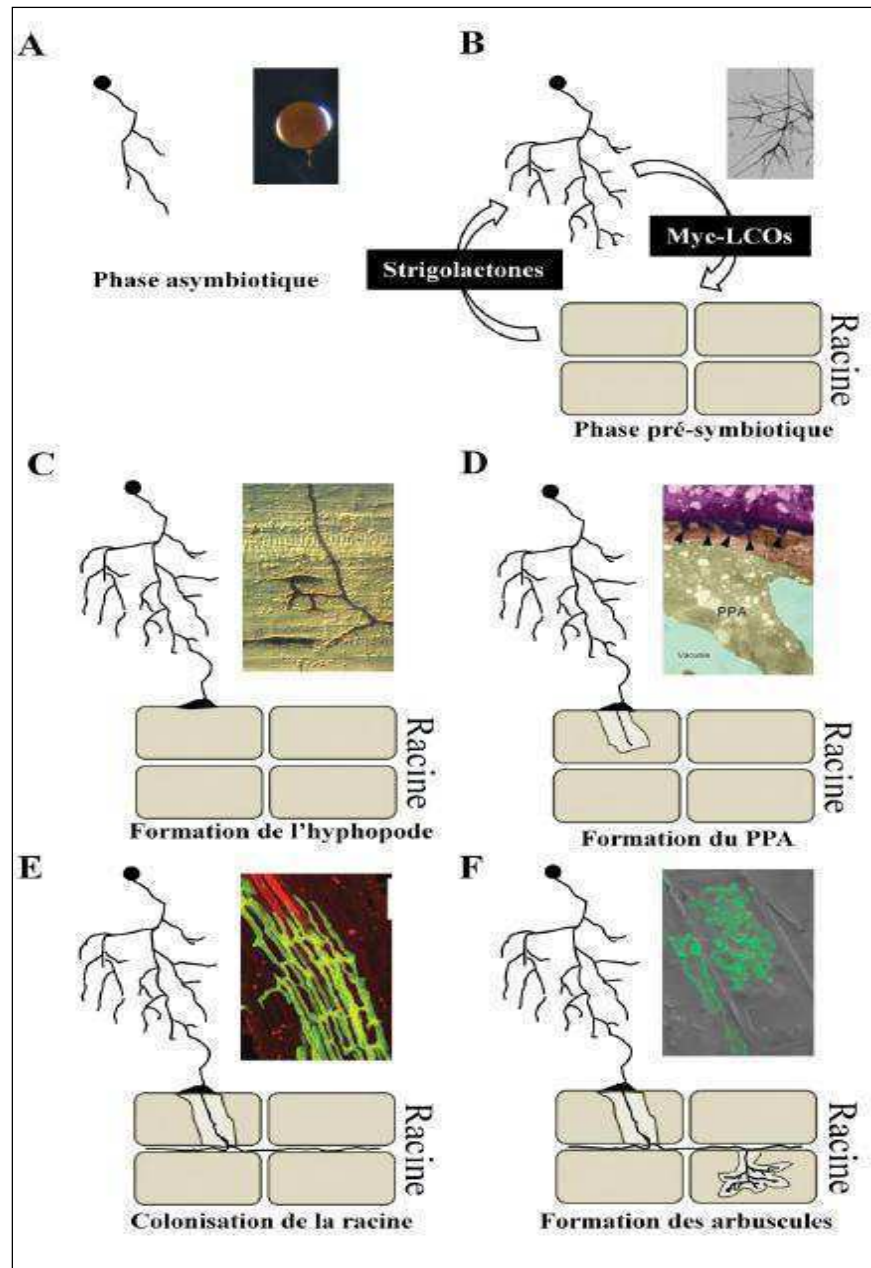


Figure 5 : Les différentes étapes de l'établissement de la symbiose endomycorhizienne à arbuscules.

(A) Durant la phase asymbiotique la spore germe et développe quelques hyphes primaires. (B) La phase pré-symbiotique voit les deux partenaires échanger des signaux, strigolactones et lipochitooligosaccharides (Myc-LCOs). En croissance activée le champignon entre alors en contact avec la racine de la plante et forme un hyphopode (C), puis s'immisce dans l'appareil de pré-pénétration (PPA) développé par la plante (D). Enfin le champignon colonise la racine de façon intercellulaire (E) et forme des structures intracellulaires hyper ramifiées, les arbuscules (F). Photographies (B) adaptée de Buée *et al.* (2000), (D) adaptée de Bonfante et Genre. (2010), (E), adaptée de Pumplin *et al.* (2009), (F) adaptée de Zhang *et al.* (2010).

Réciproquement, les champignons MA produisent des signaux diffusibles capables de modifier l'expression des gènes de la plante et de provoquer des réponses racinaires comme des variations

calciques cytosoliques ou la production de racines latérales (Weidmann *et al.*, 2004; Oláh *et al.*, 2005; Kosuta *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2010). Ils affectent également le métabolisme racinaire des sucres notamment avec un stockage plus important d'amidon dans certaines cellules du cortex (Gutjahr *et al.*, 2009). Récemment, une famille de lipochitoooligosaccharides, appelée Myc- LCOs ou facteur Myc, a été identifiée dans les exsudats du champignon MA *Rhizophagus irregularis*, molécules de même nature chimique que les facteurs Nod produits par les bactéries *Rhizobium* et connues pour le rôle indispensable qu'elles jouent dans la symbiose fixatrice d'azote (Maillet *et al.*, 2011). Des études génétiques ont établi que les Myc-LCOs déclenchent des voies de signalisations symbiotiques induisant les programmes génétiques de mycorhization (Fig. 6). Ces voies Myc partagent avec les voies de signalisation symbiotique rhizobienne au moins huit protéines impliquées dans la transduction du signal des facteurs Myc et Nod. C'est la "common symbiosis pathway" (CSP) (Bonfante et Genre, 2010) (Fig. 6).

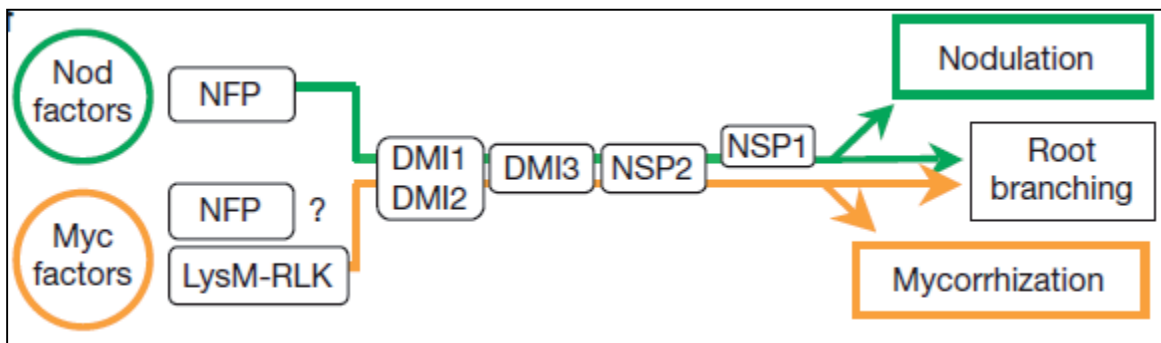


Figure 6 : La voie de signalisation « common symbiosis pathway » (Maillet *et al.*, 2011)

Les facteurs Nod et Myc sont perçus par des récepteurs. La perception des facteurs nod et des facteurs myc active une voie de signalisation faisant intervenir plusieurs protéines. La « common symbiosis pathway » (CSP), identifiée chez *Medicago truncatula*, est composée d'un récepteur putatif, DMI2, une kinase possédant des domaines riches en Leu-répétés. CSP est composé d'un canal à cations, DMI1. Pendant les remodelages intracellulaires qui précèdent l'infection, des oscillations calciques faibles sont induites dans les cellules corticales. Ces oscillations calciques deviennent plus importantes lors de l'entrée des deux symbiontes dans l'apoplasme (Chabaud *et al.*, 2011). Cette oscillation calcique est décodée par une kinase calcium / calmoduline-dépendante, codée par DMI3, localisée dans le noyau des poils absorbants de *M.truncatula*. Le facteur de transcription (NSP2) et d'autres protéines interviennent ensuite pour mettre en place les programmes symbiotiques. Les facteurs Nod et Myc induisent respectivement la nodulation et la mycorhization et une ramification racinaire.

Le dialogue moléculaire entre les deux partenaires a permis l'attachement de l'hyphe sur la surface de la racine. Quand les deux partenaires rentrent physiquement en contact, l'hyphe du champignon MA différencie un *appressorium* (appelé aussi *Hyphopodium*) en formant un renflement en forme de ventouse (Bonfante et Genre, 2010) (Fig. 7).

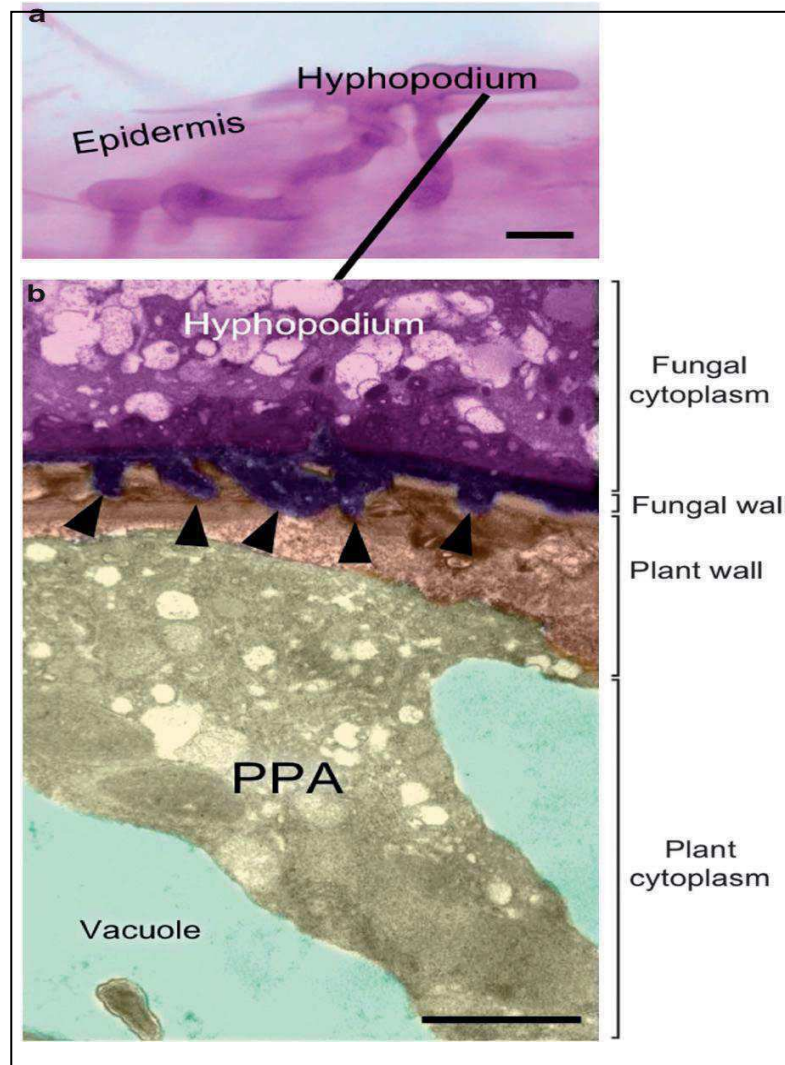


Figure 7 : L'adhésion du champignon MA à une racine par l'intermédiaire de sa structure d'attachement : l'hyphopodium (Bonfante et Genre, 2010).

(a) Photographie d'un *hyphopodium* de *Gigaspora gigantea* formé à la surface d'une racine de carotte. La racine mycorhizée a été colorée à l'aide de fuchsine acide (barre, 10µm). (b) photographie d'un *hyphopodium* ancré à la paroi d'une cellule épidermique observé par microscopie électronique à transmission. La paroi du champignon MA forment des protrusions (flèches) permettant ainsi l'adhésion (barre, 2µm).

L'hyphe perce la paroi de la cellule épidermique. Cette dernière réorganise son cytoplasme de manière à former une structure spécifique et indispensable à l'entrée de l'hyphe dans la racine, appelé « prepenetration apparatus » (PPA) (Genre *et al.*, 2005). La membrane cytoplasmique de la cellule épidermique s'invagine créant ainsi un tube dont l'orientation est prédéfinie par le noyau (Genre *et al.*, 2005; Genre *et al.*, 2008). Le cytosquelette et un ensemble d'organites comme le reticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et des vésicules interviennent activement dans la formation de ce tunnel (Genre *et al.*, 2008) (**Fig. 8**).

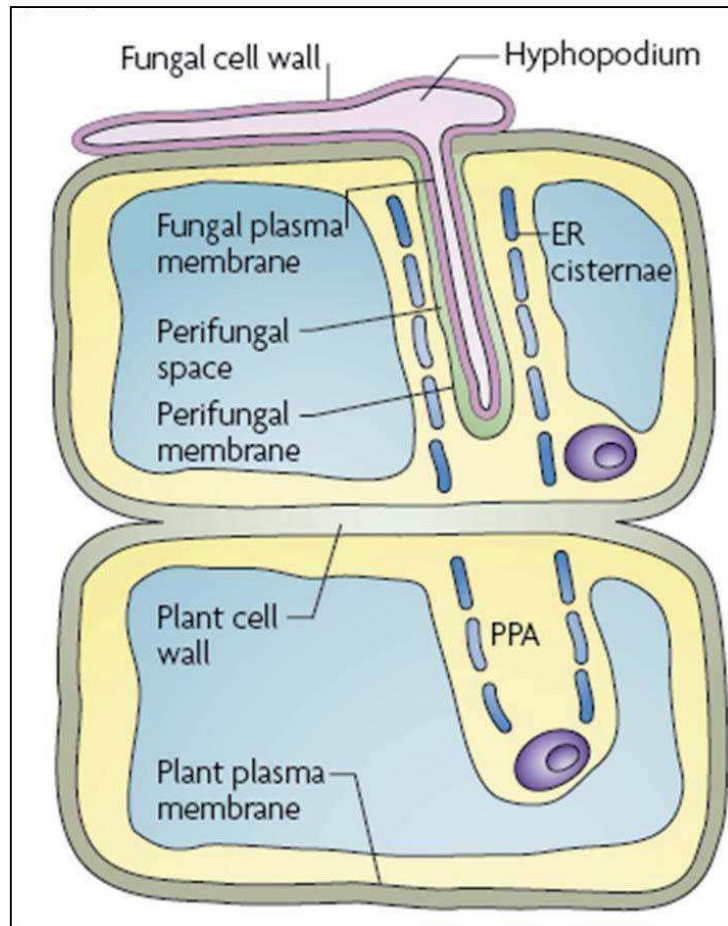


Figure 8 : Schéma détaillant la formation du « PrePenetration Apparatus » (PPA)
(Parniske, 2008).

L'hyphogamète traverse le PPA en direction de l'intérieur de la racine et forme une boucle ou une spirale dans une cellule de la deuxième assise du cortex. Le filament ressort de cette deuxième cellule, toujours vers le centre de la racine et ce n'est qu'à partir de la troisième assise de cellules corticales (**Fig. 9**) que le champignon différencie des structures symbiotiques fonctionnelles et morphologiquement distinctes : Des hyphes inter- et intracellulaires, des spirales et des arbuscules. On peut considérer que la formation des arbuscules dans le cortex racinaire marque le début de **la phase symbiotique (Fig. 5)**, phase pendant laquelle les échanges de nutriments entre les deux partenaires sont opérationnels (Bonfante et Genre, 2010).

Après la colonisation de la racine de la plante hôte, des filaments mycéliens se développent aussi sur plusieurs centimètres à l'extérieur de la racine, explorant le sol alentour, et pouvant porter une multitude de spores.

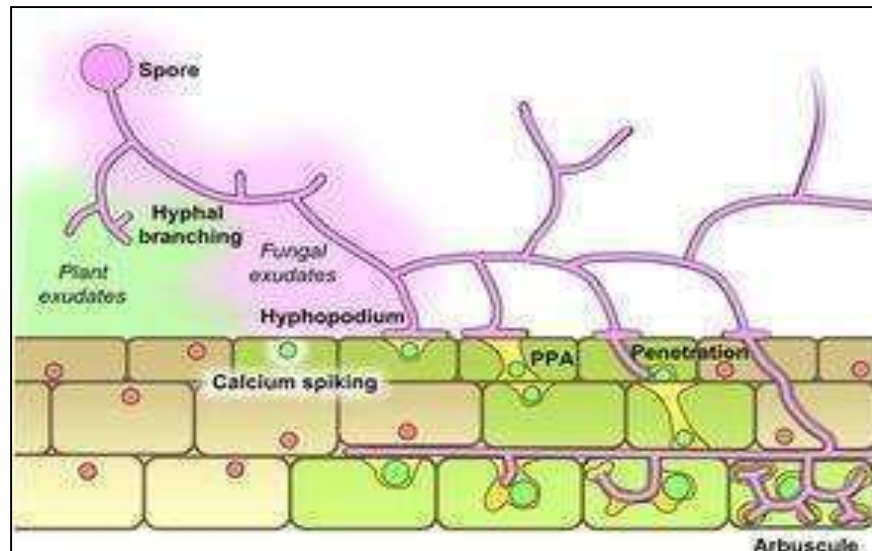


Figure 9 : Schéma résumant le processus de la colonisation racinaire par les Gloméromycètes (Bonfante et Genre, 2010).

Les arbuscules (du latin *arbusculum* : arbuste) sont des hyphes spécialisés (**Fig. 10**); le site principal d'échanges d'éléments entre les deux partenaires. Ces structures caractéristiques ont une durée de vie très limitée (1 à 4 jours) (Brundrett *et al.*, ; 1996 ;Strullu, 1991). Chez les genres *Glomus*, *Acaulospora* et *Entrophospora*, les arbuscules ont un aspect clair avec le bleu trypan ou le chlorazol E, alors que chez les Gigasporineae, les arbuscules sont de couleur foncée. Grâce à ces structures mycorrhiziennes, Gallaud (1905) a pu différencier les mycorhizes de type *Arum* (présence des arbuscules) et le type *Paris* (absence des arbuscules). Cependant, il ya beaucoup de mycorhizes de type *Paris* où les arbuscules sont complètement absents (**Fig.11**).

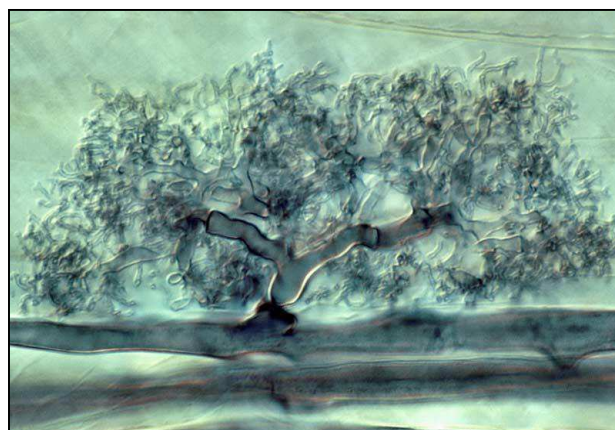


Figure 10: Arbuscule fongique de *Glomus*.
(De Mark Brundrett: <http://mycorrhizas.info/resource.html>)

Dans le type *Arum*, le filament mycélien se ramifie et s'étend rapidement dans la direction longitudinale de la racine en progressant entre les assises cellulaires (**Fig. 11**). Il émet des branches latérales qui pénètrent dans les cellules en traversant la paroi cellulosique et s'y ramifient très densément, en repoussant et invaginant la membrane. C'est le résultat de cette hyper-ramification, qui ressemble à un petit arbre (*arbuscule*), qui donne son nom à cette structure. Dans le type *Paris*, le filament mycélien ne chemine pas entre les cellules : il passe de l'une à l'autre en traversant les parois et s'enroule sur lui-même en faisant plusieurs spires à l'intérieur de chaque cellule (**Fig. 11**).

Il existe un troisième type de forme intermédiaire, qui présente la forme de progression du champignon de cellule en cellule comme dans le type *Paris*, sans hyphes intercellulaires et avec des spires intracellulaires, mais certaines de ces spires portent de petits arbuscules (**Fig. 11**) (Garbaye, 2013).

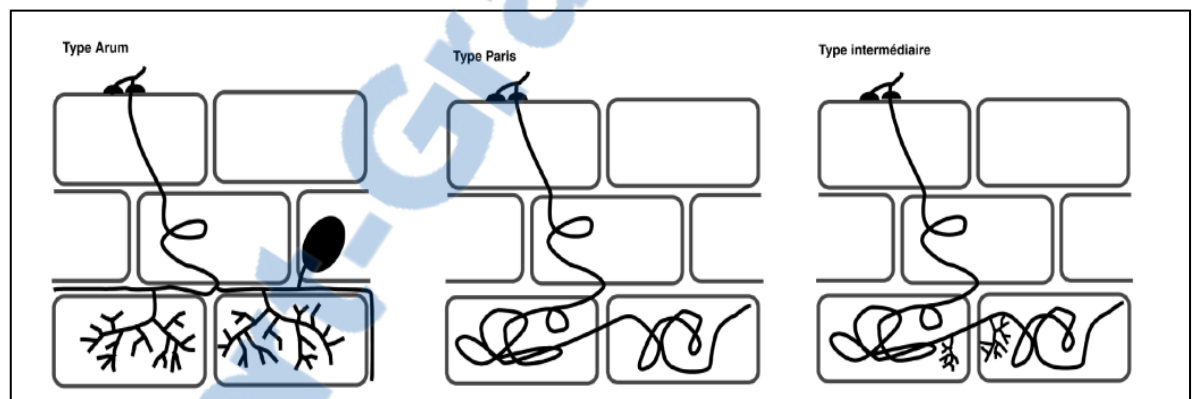


Figure 11 : Représentation schématique des trois principaux types de la colonisation du cortex racinaire par les Gloméromycètes formant des endomycorhizes arbusculaires. (Garbaye, 2013)

En plus des spires et des arbuscules, la plupart des Gloméromycètes forment aussi des vésicules (**Fig. 12**) à l'intérieur du cortex racinaire. Ce sont des renflements des hyphes de taille très variable (de 10 à 100 μm de diamètre). Elles peuvent être intra- ou intercellulaires. Ces structures sont très variables d'après leur taille et leur forme (Morton, 1985, 1988). Elles ont des formes largement globulaires ou ellipsoïdes chez *Glomus*; des formes irrégulières ou lobées chez *Acaulospora* et *Entrophospora*. Les vésicules de forme lobée (Gerdemann et Trappe, 1974) ou saucisse (Mc Gee, 1986) ont été décrites chez *Acaulospora laevis*, *Glomus arborensense* et *G. waarcupii*. Les fortes concentrations en lipides et glycolipides présents dans ces structures suggèrent qu'elles jouent un rôle de stockage des nutriments (Mosse, 1981).

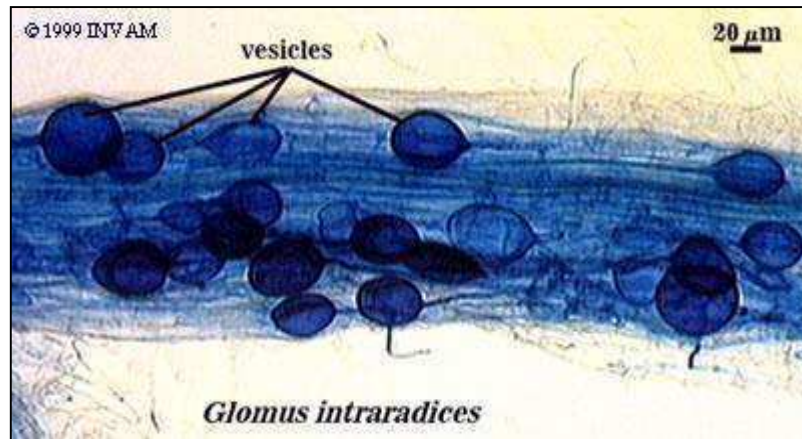


Figure 12: Vésicule fongique de *Glomus intraradices* (racine colorée au bleu de Trypan)
<http://biology.kenyon.edu/fennessy/SrexMarx/fonland.htm>.

Les espèces de Gloméromycètes appartenant aux genres *Gigaspora* et *Scutellospora* ne forment pas de vésicules, elles portent à la place des cellules auxiliaires sur le mycélium extra-racinaire (**Fig. 13**). Elles ont été considérées pendant longtemps comme des vésicules. Gerdemann et Trappe (1974) ont suggéré que ces cellules étaient des organes de stockage temporaire. Elles sont formées de groupes de 2 à 12 cellules situées à l'extrémité des hyphes externes chez les *Gigasporineae*. La forme et les types d'ornementations des *cellules auxiliaires* formées par *Gigaspora* et *Scutellospora* sont très importants en matière de différenciation à cause de la forte variabilité interspécifique existante (Koske et Walker, 1985; Morton et Benny, 1990).

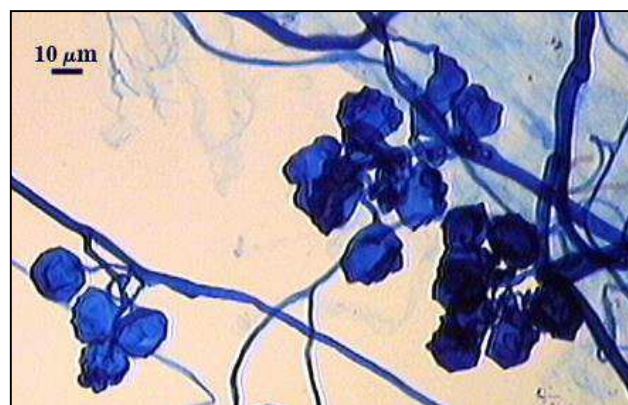


Figure 13 : Cellules auxiliaires chez *Scutellospora pellucida*
<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/gigasporaceae/cetraspora/pellucida>

1.5.2.5.Taxonomie des CMA

L'histoire de la taxonomie fongique des champignons MA a commencé par les travaux des frères Tulsane en 1945. Durant les 40 dernières années, la classification de ce groupe de champignons a subi des transformations considérables. Elle fut descriptive, basée sur des caractéristiques phénotypiques (Gerdemann et Trappe, 1974 ; Morton et Benny, 1990), puis sur l'analyse génétiques (Schüßler *et al.*, 2001 ; Schüßler et Walker , 2010) et enfin sur une analyse combinée entre les caractéristiques génétiques et phénotypiques (Oehl *et al.*, 2011).

L'analyse des petites sous unités (SSU) ARNr par Schüßler *et al.* (2001) a montré que les champignons MA peuvent être séparés dans un clade monophylétique, qui partage probablement un ancêtre commun avec le clade Ascomycota-Basidiomycota. Alors les CMA ont été retirés du phylum polyphylétique Zygomycota et placés dans leur propre phylum Glomeromycota. Actuellement la classification de Oehl *et al.* (2011) divise le phylum de Glomeromycota en 3 classes, 5 ordres, 14 familles et 29 genres pour environ 230 espèces (**Fig. 14**). Le genre *Glomus* est généralement le plus représenté en terme d'espèces, probablement à cause de sa capacité d'adaptation aux sols dégradés (Bâ *et al.*, 1996).

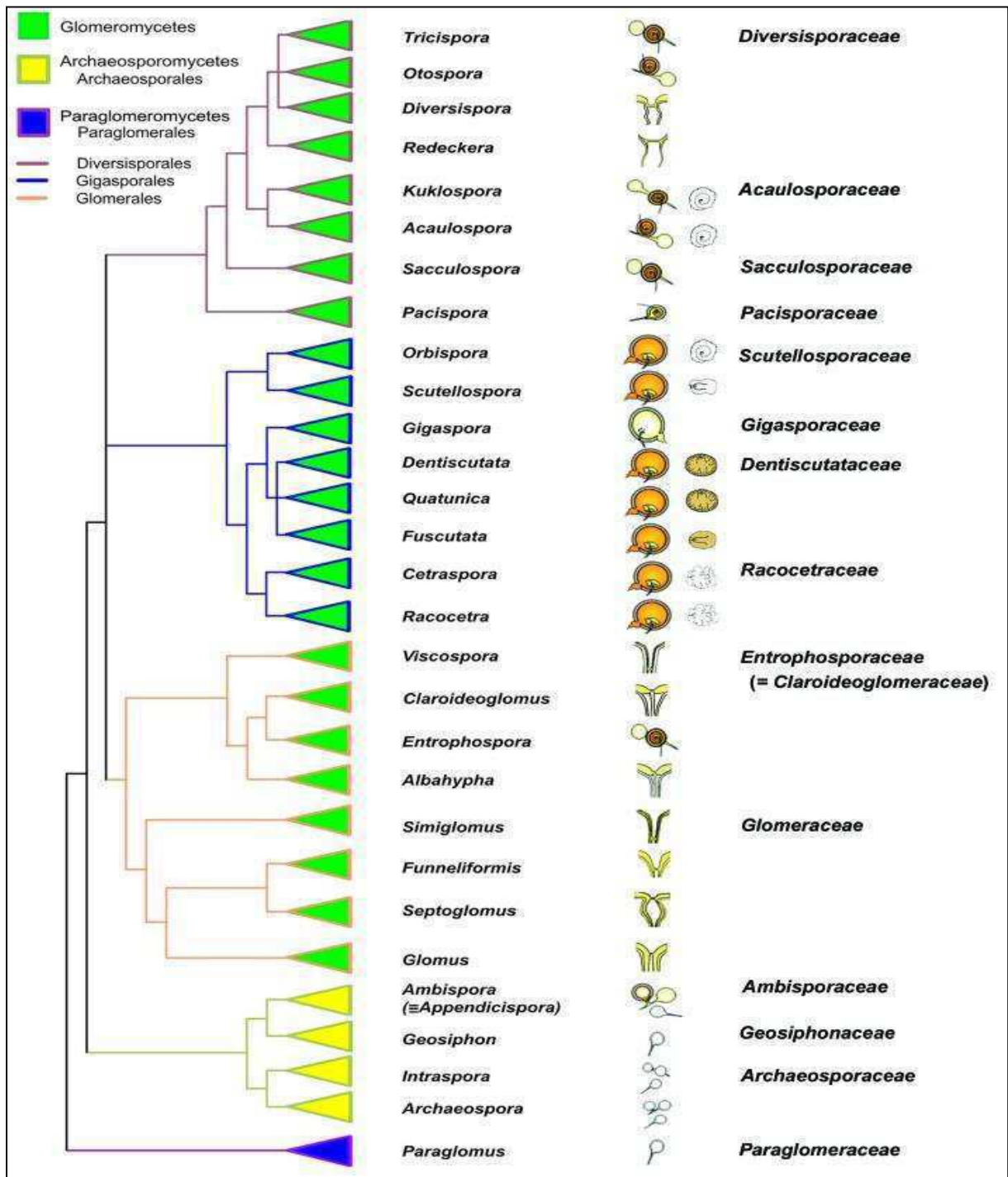


Figure 14: Arbre représentatif du phylum Glomeromycota sur la base moléculaire (SSU, la région ITS , partiel du LSU de gène l'ARNr, et le gène partiel β -tubuline) et des analyses morphologiques (Oehl *et al.*, 2011).

1.5.2.6.La spécificité des associations MA

On appelle *spécificité* d'une interaction entre deux organismes, la possibilité ou non qu'ont deux espèces données de contracter cette interaction. Dans le cas de la symbiose mycorhizienne, toutes les plantes ne s'associent pas avec n'importe quel champignon. Dans certains cas, des groupes bien limités de plantes ne forment des mycorhizes qu'avec un groupe également bien limité de champignons, comme par exemple les *Éricales* avec quelques genres seulement d'Ascomycètes. A l'inverse, la plupart des espèces de champignons endomycorhiziens arbusculaires semblent pouvoir coloniser les racines de pratiquement toutes les plantes susceptibles d'héberger des Gloméromycètes (Garbaye, 2013).

Dans le cas des mycorhizes arbusculaires, la classification classique basée sur la morphologie des spores a révélé un nombre limité d'espèces de Gloméromycètes, responsable de ce type très dominant de mycorhizes. Cependant, les travaux plus récents utilisant des marqueurs moléculaires, appliqués à de nombreux échantillons provenant de sites naturels variés et confrontés aux résultats de culture en pot, ont révélé que la diversité spécifique des symbiotes fongiques est en fait relativement grande et leur répartition entre les diverses espèces végétales riches en espèces, comme une prairie ou une forêt tropicale, même si toutes les espèces de plantes partagent de fait un petit nombre d'espèces de champignons endomycorhiziens, les intensités relatives de colonisation des racines sont extrêmement variables selon la combinaison d'espèces.

L'hypothèse selon laquelle probablement 200 000 espèces de plantes sont des hôtes potentiels d'environ 230 espèces CMA (Oehl *et al.*, 2011) indique une faible spécificité champignon-plante, en d'autres termes chaque espèce de champignons doit avoir de nombreux hôtes (Smith et Read 2008). En effet, les enquêtes moléculaires ont révélé qu'une seule plante peut être colonisée par pas moins de 20 espèces différentes de CMA (Fitter, 2005). Les premières conclusions qu'aucune spécificité absolue d'espèce n'existe en MA (Gerdemann, 1955) ont été soutenues par des études récentes (Smith et Read, 2008), cependant, il ne peut être exclu qu'une certaine spécificité existe dans les associations fongiques / végétales. Beaucoup de conclusions sur la spécificité ont été tirées des expériences de serre, représentant un système artificiel qui pourraient soutenir la plupart des espèces de CMA adaptées à ces conditions. En conclusion, jusqu'à présent, aucune spécificité d'hôte stricte de CMA n'a été observée en association avec les plantes vertes (Smith et Read, 2008 ; Garbaye, 2013).

Enfin, le statut symbiotique d'un individu végétal donné est toujours le résultat de la combinaison de quatre catégories de facteurs : la diversité des champignons potentiellement symbiotiques présents localement, leur compatibilité éventuelle avec la plante, leurs avantages respectifs dans la concurrence qu'ils se livrent ou les affinités qu'ils ont entre eux et les facteurs environnementaux favorables ou non à l'établissement de telle ou telle association particulière. Tout cela change naturellement sans cesse dans le temps en fonction des fluctuations des conditions environnementales. Le déterminisme de l'état mycorhizien réalisé est vraiment très complexe et difficile à prévoir (Garbaye, 2013).

1.5.2.7.Le rôle des champignons mycorhiziens arbusculaire CMA

Rôle nutritionnel

Le rôle de la symbiose mycorhizienne dans la croissance et la nutrition des plantes a été bien démontré (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Gianinazzi-Pearson, 1982 ; Strullu, 1991 ; Landeweert *et al.*, 2001). Dans la plupart des cas, l'effet bénéfique des mycorhizes est dû à une amélioration de la nutrition minérale de la plante-hôte. L'efficacité de systèmes racinaires mycorhizés est due principalement à une extension de la surface d'absorption et du volume de sol prospecté grâce aux hyphes fongiques. Sylvia (1986) a mesuré une moyenne de 12 mètres d'hyphes de champignons MA par gramme de sol dans une dune sub-tropicale et a estimé que la longueur d'hyphes qui se développent autour de la racine peut atteindre 200 à 1000 mètres pour un centimètre de racine.

Le rôle majeur des mycorhizes se situe au niveau de la mobilisation pour la plante d'éléments nutritifs très peu mobiles dans le sol tels que P, Zn et Cu (Lambert *et al.*, 1979; George *et al.*, 1994; George *et al.*, 1996; Ortas *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2002) mais principalement le phosphore (Lambers *et al.*, 2008). En fonction du pH du sol, cet élément se retrouve majoritairement piégé par le fer, l'aluminium ou le calcium sous des formes difficilement mobilisables pour les plantes (Hinsinger, 2001). L'amélioration de la nutrition phosphatée est essentiellement due à une absorption plus efficace des minéraux primaires grâce à une grande exploration du milieu par les hyphes extra-racinaires (Landeweert *et al.*, 2001). Les hyphes fongiques grâce à la production de diverses enzymes extracellulaires (phosphatase, phytase) sont susceptibles de libérer du phosphore à partir de composés complexes organiques et inorganiques du sol (Gobat *et al.*, 2003).

Comme pour le phosphore, il est probable que des racines mycorhizées puissent avoir accès à des sources importantes d'azote peu accessibles à des racines non mycorhizées (Nouaim et Chaussod, 1996 ; He *et al.*, 2003 ; Govindarajulu *et al.*, 2005). Les CMA accélèrent la décomposition et l'acquisition de l'azote directement à partir de matière organique (Hodge *et al.*, 2001) et sont fortement impliqués dans le transfert de l'azote d'une plante à une autre (He *et al.*, 2003). Par ailleurs, de nombreux travaux ont mis en évidence l'interaction entre la symbiose MA et la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses (Dianda, 1991 ; Salahedin *et al.*, 2013). La symbiose MA a un rôle indirect dans la fixation d'azote chez les légumineuses qui demande une nutrition phosphatée satisfaisante de la plante (assurée par les CMA) pour être pleinement efficace (Barea *et al.*, 1988).

Il a également été démontré que les associations mycorhiziennes pouvaient jouer un rôle significatif dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques végétales et mobiliser les nutriments au bénéfice de la plante hôte (Gobat *et al.*, 2003 ; Lambers *et al.*, 2008).

L'amélioration de la nutrition hydrique des plantes associées à des champignons mycorhiziens a aussi été observée (Augé, 2001). La sécheresse est l'un des facteurs limitant de la croissance et la productivité végétale dans l'écosystème semi-aride. Dans cette symbiose mutualiste, les plantes profitent, non seulement d'une nutrition minérale, mais aussi d'une résistance accrue à la sécheresse et les températures extrêmes (Smith et Read, 1997). Les plantes mycorrhizées montrent une forte résistance au stress hydrique et sont capables de se développer sur des sols pauvres en nutriments et notamment en phosphate (Parniske, 2008). Les CMA peuvent également tolérer le stress salin (Ruiz-Lozano *et al.*, 1996). Il a été reconnu que les mycorhizes peuvent être utilisées pour aider les plantes à survivre dans des milieux salins (Hildebrandt *et al.*, 2001 ; Wang et Liu, 2001). Selon certaines estimations, environ 50% des plantes vivant près des rivages possèdent des associations mycorhiziennes dans leurs systèmes racinaires (Cooke et Lefor, 1998). De même, plusieurs espèces MA établissent une association avec des plantes des marécages salés (Sengupta et Chaudhuri, 1990; Hoefnagels *et al.*, 1993; Hildebrandt *et al.*, 2001).

Des interactions synergiques ont été signalées entre les symbiotes mycorhiziens et d'autres microorganismes importants du sol appelé PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) tels que ceux impliqués dans les processus de cycle des éléments nutritifs (bactéries fixatrices d'azote, *Pseudomonas fluorescens*, bactéries solubilisatrices de phosphate,...) (Requena *et al.*,

1997 ; Founoune *et al.*, 2002 ; Johansson *et al.*, 2004 ; Artursson *et al.*, 2006), améliorant ainsi la croissance des plantes et le maintien de la productivité.

Rôle protecteur

Les mycorhizes arbusculaires font partie des écosystèmes complexes et ainsi les effets potentiels sur les interactions de CMA avec les facteurs biotiques par exemple les herbivores ou les agents pathogènes ont fait l'objet de nombreuses études (Graham, 2001 ; Bennett *et al.*, 2006). Les CMA tendent à réduire l'incidence des maladies racinaires et protègent les plantes hôtes de certains agents pathogènes (Liu *et al.*, 2007 ; Smith et Read, 2008) comme les nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne* chez l'Acacia (Duponnois et Cadet, 1994). La synthèse de Pozo et Azcon-Aguilar (2007) résume les données bibliographiques sur la protection induite par les mycorhizes arbusculaires contre le stress biotique et les mécanismes possibles impliqués, avec un accent particulier sur le rôle des réponses de défense des plantes et ils expliquent le spectre d'efficacité de la résistance induite par les mycorhizes.

Les CMA améliorent aussi la protection des plantes contre les polluants et les protègent contre les métaux lourds et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Leyval et Joner, 2001; Joner et Leyval, 2003).

Rôle écologique

L'établissement de la symbiose permet de favoriser la formation d'agrégats et améliorer ainsi la structure du sol (**Fig. 15**). La colonisation du sol par le mycélium extra-racinaire et la production par les hyphes mycorhiziens d'une glycoprotéine, la *glomaline*, engendrent une meilleure structuration du sol par la formation d'agrégats beaucoup plus stables (Lovelock *et al.*, 2004; Rillig et Mummey, 2006). Alguacil *et al.* (2005) ont montré que la vie microbienne activée par les CMA influence fortement la stabilité des agrégats dans une zone dégradée semi-aride.

Les associations mycorhiziennes jouent également un rôle clef dans le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes terrestres en intervenant fortement dans les relations plante-plante, améliorant ainsi la productivité et la biodiversité végétales (van der Heijden *et al.*, 1998; Gobat *et al.*, 2003 ; Hart *et al.*, 2003 ; Silvertown, 2004 ; Sanon *et al.*, 2006 ; Kisa *et al.*, 2007). Selon van der Heijden *et al.* (1998), la composition de la communauté des plantes ainsi que la biomasse totale dépend fortement de la composition et de la diversité de la communauté de champignons mycorhiziens.

Ils favorisent la coexistence entre plusieurs espèces végétales, grâce à la formation des liens mycéliens, par lequel le carbone, le phosphore et l'azote sont partagés entre différentes espèces de plantes (Simard et Durall, 2004). Des auteurs ont même suggéré une translocation de métabolites *via* un pont mycélien créé par le réseau d'hyphes connectant plusieurs plantes de la même et d'espèces différentes (Smith et Read, 1997 ; Robinson et Fitter, 1999 ; Gobat *et al.*, 2003 ; Yao *et al.*, 2003 ; Simard et Durall, 2004).

L'existence d'arbres adultes supportant déjà des structures mycorhiziennes a été décrite comme un moyen très efficace dans l'établissement des jeunes plants en favorisant notamment leur colonisation par les champignons mycorhiziens et donc leur survie (Newman, 1988 ; Simard et Durall, 2004). Par ailleurs, les associations mycorhiziennes sont fortement impliquées dans les successions végétales. Ainsi, sur certains sols pauvres aussi bien en éléments nutritifs qu'en propagules mycorhiziennes, les espèces végétales dépendant peu de cette symbiose vont s'installer. Par la suite, avec l'enrichissement du sol en structures mycorhiziennes, les espèces plus mycotrophes prennent la relève avec une forte corrélation positive entre les biodiversités fongique et végétale (van der Heijden *et al.*, 1998, Hart *et al.*, 2003). En revanche, il faut aussi noter que certaines espèces pionnières très mycotrophes s'installent en début de succession végétale sur des sols dégradés et favorisent par la suite le développement d'autres espèces végétales *via* un effet « plante nurse » (Azcon-Aguilar *et al.*, 2003 ; Duponnois *et al.*, 2013).

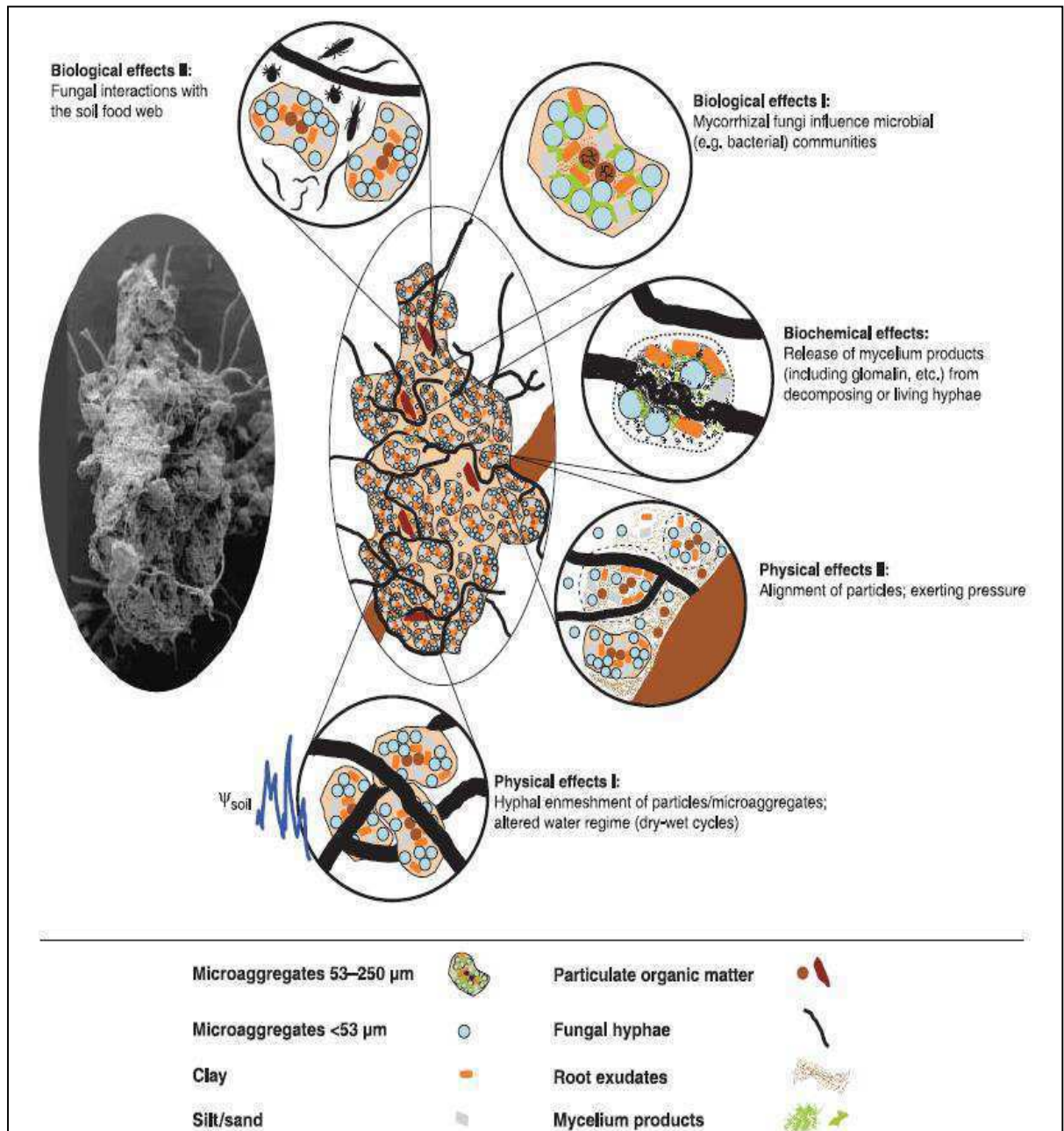


Figure 15 : Divers mécanismes influençant la formation ou la stabilisation des sols à l'échelle de macroagrégats et microagrégats (Rillig et Mummey, 2006)

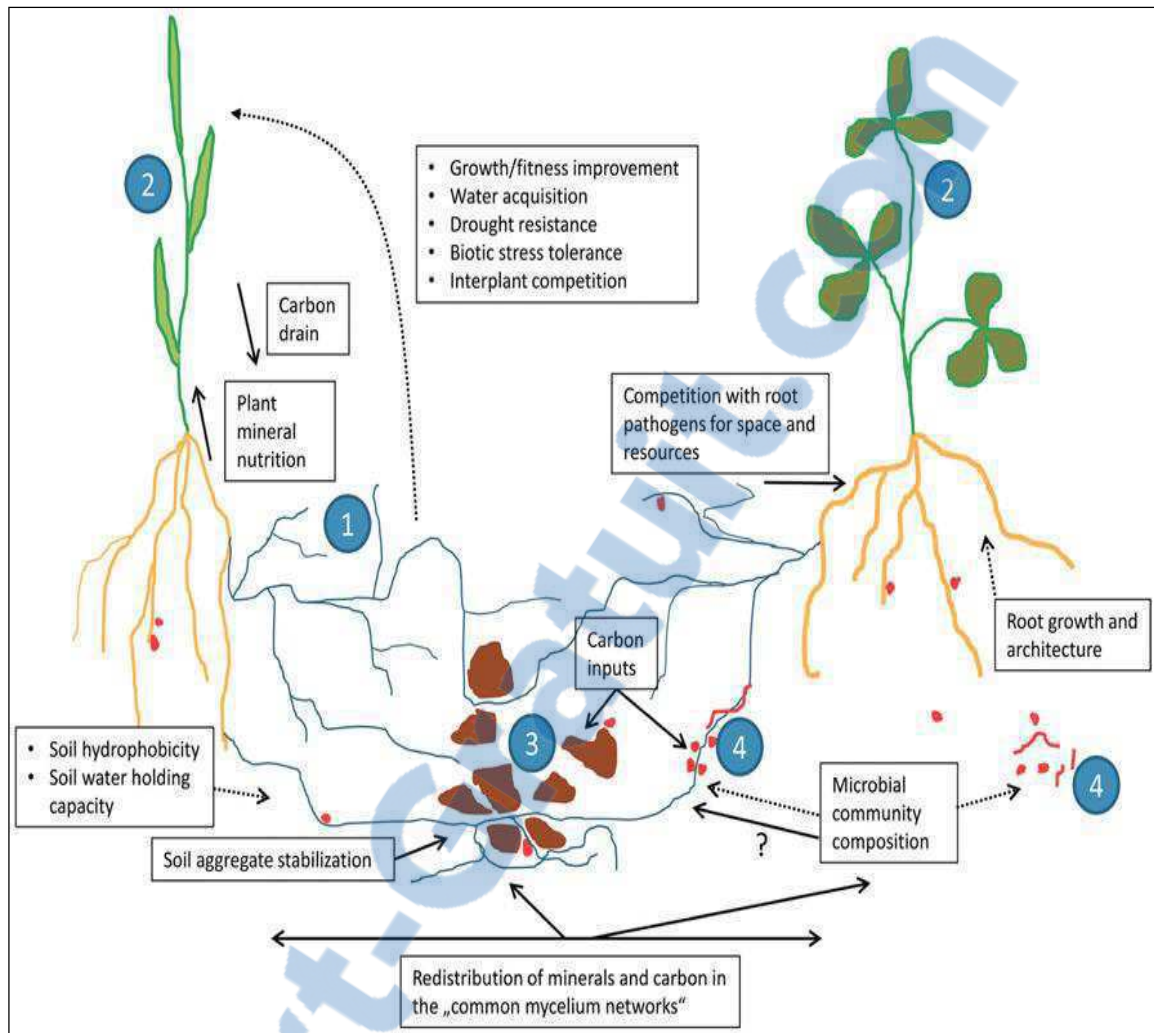


Figure 16 : Représentation schématique des différentes fonctions jouées par les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) (Jansa *et al.*, 2013).

(1) dans la physiologie et l'écologie de leurs plantes hôtes (2). Les hyphes mycorhiziens interconnectent les racines avec les particules de sol (3), fournissent des connexions directes de systèmes racinaires des différents individus végétaux (2), et d'interagir avec un certain nombre de microbes du sol (4). Les lignes pleines représentent les effets directs et les lignes pointillées représentent les effets indirects des champignons AM sur les plantes, le sol et les microorganismes de sol.

2. Réhabilitation des sols dégradés au sein de l'écosystème méditerranéen semi-aride

La réhabilitation vise à réparer, aussi rapidement que possible, les fonctions (résilience et productivité), endommagées ou tout simplement bloquées, d'un écosystème en le repositionnant sur une trajectoire favorable (la trajectoire naturelle ou une autre trajectoire à définir) (Aronson *et al.*, 1995). Plusieurs moyens peuvent être employés dans la réhabilitation d'un écosystème dégradé dont la réintroduction de matériel végétal et des micro-organismes associés et le retour vers son état originel avant la dégradation.

La réintroduction de matériel végétal peut être limitée à la mise en place d'un écosystème simplifié "synthétique", comportant un nombre réduit d'espèces et constituant une étape intermédiaire entre l'état dégradé et l'écosystème de référence. L'objectif majeur de la réhabilitation est de recréer des écosystèmes durables caractérisés par une succession dans les communautés animales et végétales et par la capacité de réparer eux-mêmes les méfaits dus à des perturbations modérées naturelles ou anthropiques. De même, la réhabilitation admet un retour au précédent niveau de flux d'énergie et cycles de nutriments ainsi que le rétablissement des conditions nécessaires à un bon fonctionnement hydrique du sol au niveau de la rhizosphère de l'écosystème (Aronson *et al.*, 1995).

Différentes stratégies de réhabilitation des sols dégradés ont été adoptées dans les zones méditerranéennes semi-arides, parmi elles l'utilisation des plantes nurses pour faciliter l'installation des espèces végétales introduites (Castro *et al.*, 2002 ; Gomez-Aparicio *et al.*, 2004). Plusieurs recherches ont montré le rôle des symbioses mycorhiziennes dans la réhabilitation des sols dégradés dans les zones semi-arides (Requena *et al.*, 1996 ; Azcon-Aguilar *et al.*, 2003 ; Duponnois *et al.*, 2007). Caravaca *et al.* (2003) ont montré que l'utilisation du potentiel mycorhizien natif comme une source d'inoculum MA peut être considérée comme une stratégie d'inoculation préférentielle pour garantir le rétablissement réussi des espèces d'arbustes indigènes (*Olea europaea* subsp. *sylvestris* L., *Pistacia lentiscus* L., *Retama sphaerocarpa* L. (Boissier) et *Rhamnus lycioides* L.) dans un sol dégradé semi-aride. Duponnois *et al.* (2007) ont restauré des forêts au Maroc par la mycorhization contrôlée de *Cupressus atlantica* et aussi par l'association cyprès-arbustes. Herrera *et al.* (1993) ont réhabilité un écosystème dégradé dans le sud d'Espagne par des légumineuses ligneuses inoculées par les CMA et les Rhizobia. Après un essai de quatre ans, ils ont pu conclure que seules les légumineuses natives ont pu s'installer, sous les conditions environnementales locales et que l'inoculation par les micro-organismes symbiotiques sélectionnés a une performance sur l'établissement des plantes hôtes, leur survie et leur croissance. Grâce à un essai de revégétalisation de quatorze mois d'un site dégradé méditerranéen semi-aride par *Ephedra fragilis*, *Rhamnus lycioides*, *Pistacia lentiscus* et *Retama sphaerocarpa*, Aguacil *et al.* (2011) ont montré qu'il faut augmenter le nombre d'espèces végétales dans les stratégies de revégétalisation ce qui augmenterait la diversité des CMA et donc la stabilité et le bon fonctionnement de l'écosystème.

3. Réhabilitation des sols dégradés par la gestion du Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM) du sol

Le **Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM)** d'un sol représente sa richesse en propagules mycorhiziennes sous forme de spores, de mycélium et de fragments de racines portant des structures mycorhiziennes susceptibles d'initier chez les plantes, la formation d'associations mycorhiziennes (Plenchette *et al.*, 1989).

Deux principales stratégies sont proposées pour la restauration d'un PIM acceptable dans un sol :

(i) **la gestion du potentiel mycorhizien endogène au travers d'espèces végétales très mycotrophes**: l'établissement d'espèces végétales natives, capables d'accroître le stock endogène de propagules mycorhiziennes (Duponnois *et al.*, 2001; Azcon-Aguilar *et al.*, 2003). En effet, il a été préalablement établi que le réseau d'hyphes en particulier, mis en place entre plantes constitue une source potentielle et efficace d'inoculum mycorhizien dans les systèmes sol - plantes (Requena *et al.*, 1996 ; 2001 ; Azcon-Aguilar *et al.*, 2003) et dans le cas des sols fortement perturbés et dégradés caractérisés par des PIM très bas, (ii) **l'inoculation préalable des plants par des symbiotes fongiques sélectionnés avant leur mise en terre (Inoculation contrôlée)**: cette technique permet d'améliorer la survie et la croissance des plantes par une meilleure nutrition hydrique et minérale, de reconstituer le PIM du sol, etc. (Herrera *et al.*, 1993 ; Estaun *et al.*, 1997 ; Duponnois *et al.*, 2005).

Cependant, la réponse d'une plante à la mycorhization dépendra d'un certain nombre de facteurs dont, la souche fongique présente (Plenchette *et al.*, 1982 ; 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 et Read, 1997). Même si la relation plante-champignon mycorhizien semble peu spécifique, de fortes variabilités existeraient dans la réponse à cette association en regard de la diversité des symbiotes (Douds et Millner, 1999 ; Daniell *et al.*, 2001 ; Vandenkoornhuysen *et al.*, 2002 ; Hart *et al.*, 2003). Certains auteurs pensent à une 'spécialisation' des souches fongiques dans les diverses fonctions des mycorhizes (Bever *et al.*, 1996 ; Hart *et al.*, 2003). Certaines espèces CMA sont plus bénéfiques pour une plante hôte que d'autres, en raison d'incompatibilité génétique et/ou physiologique entre une espèce CMA et son hôte (van der Heijden *et al.*, 1998 ; Hart *et al.*, 2003). À cet effet, la réponse à la mycorhization peut être variable entre cultivars ou écotypes de la même espèce végétale (Bever *et al.*, 1996).

4. Les espèces végétales d'intérêt

4.1. *Acacia saligna*

Acacia saligna est classé selon le taxon suivant (APG III, 2009)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous famille	Mimosoidae
Genre	<i>Acacia</i>
Espèce	<i>saligna</i> L. ou <i>cyanophylla</i>

Acacia saligna L. ou *Acacia cyanophylla* Lind. (Maslin, 1974) est un arbre ou arbuste à croissance rapide et usages multiples. C'est une espèce originaire de la région tempérée du sud-ouest d'Australie (Hopper et Maslin, 1978). Cet arbuste a été introduit dans de nombreux pays hors de son aire naturelle, notamment en Afrique du nord depuis plus d'un siècle pour servir, tout d'abord, à l'ornementation. Actuellement, il est utilisé à des fins diverses, telles que la lutte contre l'ensablement et l'érosion particulièrement dans les régions semi-arides.

Acacia saligna est utilisé avec succès pour la fixation des dunes dans différentes régions semi-arides notamment du littoral où il constitue des brise-vent efficaces. De plus sa propriété envahissante des zones littorales est due à une excellente adaptation au climat, une fructification abondante et une grande aptitude à drageonner. Il faut noter aussi qu'il présente de très faibles exigences nutritionnelles et un bon potentiel fixateur d'azote (Witkowski, 1991a, b).

Acacia saligna n'a pas d'exigences édaphiques particulières. Il se développe bien, sur les sols sablonneux profonds. Il tolère les sols salés et alcalins et a la réputation de bien résister aux embruns marins salés (Sheha, 1984). Il exige des précipitations annuelles de 300-1000 mm et peut même survivre à des précipitations annuelles inférieure à 200 mm (El Lakany, 1987). La température moyenne du mois le plus chaud est de 23 à 36 °C et la température du mois le plus froid est de 4 à 9 °C. *Acacia saligna* supporte des gelées très légères, mais non des températures inférieures à -4°C (Crompton, 1992).

C'est une légumineuse appartenant à la sous-famille des Mimosoïdeae, rustique, compétitive (Maslin, 1974 ; Hopper et Maslin 1978), fixatrice de l'azote atmosphérique (Nasr et Diem, 1987) et pouvant établir une symbiose avec un très grand nombre de souches de rhizobium (Thompson *et al.*, 1985) à croissance aussi bien lente que rapide (Nasr, 1985).

Boukhatem *et al.* (2012) ont montré que *A. saligna* est la plante hôte la plus prometteuse entre toutes les espèces d'*Acacia* étudiées vu sa capacité à noduler avec la plus grande diversité de taxons rhizobiens : à croissance rapide *Rhizobium*, *Ensifer* et *Mesorhizobium* et à croissance lente *Bradyrhizobium*, avec une prédominance de ceux à croissance lente (Marsudi *et al.*, 1999) ou dans des proportions égales (Amrani *et al.*, 2010),

Ducousso et Thoen (1991) ont étudié le statut mycorhizien de 48 espèces d'*Acacia* dont *A. saligna* qui présente une association symbiotique mycorhizienne arbusculaire. Plusieurs travaux ont montré que les champignons MA peuvent stimuler la croissance de certaines espèces d'*Acacia* (Johnson et Michelini, 1975 ; Cornet et Diem, 1982) particulièrement *A. saligna*. Nasr et Diem (1987) ont montré aussi qu'*A. saligna* répond positivement à l'inoculation par *Glomus mosseae* dans un sol déficient en phosphore. Les interactions entre le rhizobium et les champignons endomycorhiziens (Nasr et Diem 1987 ; De la Cruz *et al.*, 1988) ainsi que l'apport de phosphore (Vadez *et al.*, 1995) et de fer (Lesueur et Diem, 1997) stimulent la prolifération des nodules et la fixation de N₂ chez certaines espèces d'*Acacia*.



Figure 17 : *Acacia saligna*, espèce végétale présente dans l'écosystème de Terga (a), inflorescences et phyllodes (b).

4.2.Lotus creticus

Lotus creticus est classé selon le taxon suivant (APG III, 2009)

Règne	Plantae
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Rosidées
Clade	Fabidées
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Papilionoideae ou Faboideae
Tribu	Loteae
Genre	<i>Lotus</i>
Espèce	<i>creticus</i>

Lotus creticus (L.) est une légumineuse herbacée, fourragère, pastorale. C'est une espèce candidate pour la revégétalisation des zones restaurées sous des conditions méditerranéennes arides et semi-arides (Rejili *et al.*, 2009). C'est une plante vivace qui montre une tolérance considérable à la sécheresse, salinité et des conditions de vents abrasifs (Banon *et al.*, 2004 ; Striker *et al.*, 2005). Pour ces raisons, il est considéré comme une bonne alternative pour la revégétalisation des sols dans les environnements secs et salins (Belesky ,1999 ; Vignolio *et al.*, 2005; Escaray *et al.*, 2010). Cette espèce a été utilisée pour fixer les dunes côtières espagnoles dans le Parc Naturel de la Devesa de Valence de la Albufera (Escaray *et al.*, 2010) où elle joue un rôle important comme espèce pionnière en améliorant la structure du sol et fournir des symbiotes, inoculum pour plus de successions végétales. En outre, vu son port étalé *L. creticus* diminue les effets des vents violents méditerranéens, remplissant ainsi une fonction primordiale dans la protection des écosystèmes et leur préservation (Escaray *et al.*, 2010).

Mesorhizobium, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* et *Bradyrhizobium* sont des symbiotes de *Lotus* spp tels que *L. creticus*, *L. argenteus* et *L. roudairei* identifiés dans une région aride du sud de la Tunisie (Zakhia *et al.*, 2004) et représentent une source potentielle de la diversité des souches de rhizobiums bien adaptées aux sols secs.

La plupart des légumineuses herbacées forment des relations symbiotiques avec les champignons AM (Zaidi *et al.*, 2003). Une forte colonisation MA a été observée chez *L. creticus*, espèce dominante en Espagne, dans des dunes revégétalisées du littoral méditerranéen espagnol (Escaray *et al.*, 2010 ; Escaray *et al.*, 2012 ; Camprubí *et al.*, 2010). Ces résultats constituent un indice de la pertinence que la symbiose MA aurait sur le potentiel de certaines espèces de *Lotus* comme des plantes pionnières ou plantes nurses pour la restauration des plantes dans les écosystèmes indigènes.



Figure 18 : *Lotus creticus*, espèce végétale de l'écosystème de Terga.

4.3. *Retama monosperma*

Retama monosperma est classé selon le taxon suivant (APG III, 2009) :

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Sous-règne	Tracheobionta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Faboideae/ Papilionoideae
Tribu	Genisteae
Genre	<i>Retama</i>
Espèce	<i>monosperma</i>

Les rétames sont des plantes pérennes, ce sont des arbustes monoïques, pouvant atteindre jusqu'à 3 mètres de long, caractérisées par un tronc trapu et court, portant de nombreux rameaux dense, arqués, flexibles et retombants, fortement sillonnés et peu feuillus, les jeunes arbustes sont soyeux d'un vert argenté à gris argenté (Ozenda, 1958 ; Beniston, 1985 in Ighilhariz, 1990).

En Algérie, les rétames sont représentés par trois espèces ; *Retama monosperma* qui domine les dunes de littoral et *R. retam* et *R. sphaerocarpa* dans les zones arides et semi-arides.

Les rétames sont caractérisés par une large distribution géographique, originaires du nord-ouest Africain et probablement des îles Canaries (Zohary, 1959 in Ighilhariz, 1990). *Retama monosperma* se localise au sud de l'Europe, sur les pourtours du bassin méditerranéen, et le long de la côte de l'Espagne (Andalousie), Portugal, Italie et dans le désert sud asiatique (Zohary, 1959 ; Beniston, 1985 ; Quezel et Santa, 1962 in Ighilhariz, 1990). En Algérie les rétames occupent une surface considérable du nord vers le sud (Thomas, 1968 ; Stocker, 1974). *Retama monosperma* est un arbuste de 2 à 4m à fleurs blanches qui colonise de larges étendues sur le littoral oranais, le littoral algérois, et le long du littoral de la région de Jijel.



Figure 19 : *Retama monosperma*, espèce végétale de l'écosystème de Terga (a), inflorescences (b).

Les rétames sont des espèces fixatrices de dunes, grâce à leur système racinaire très développé et leurs associations symbiotiques mycorhiziennes. Hatimi et Tahrouch (2007) ont montré que *R. monosperma* s'associe avec les CMA et les Rhizobiums. Par ailleurs, les Papilionoideae (dont *R.*

monosperma fait partie) sont généralement colonisées par des CMA (Vasconcelos *et al.*, 1984; Grove et Le Tacon, 1993).

4.4. *Juniperus oxycedrus*

Juniperus oxycedrus est classé selon le taxon suivant (APG III, 2009) :

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Pinophyta
Classe	Pinopsida
Ordre	Pinales
Famille	Cupressaceae
Genre	<i>Juniperus</i>
Espèce	<i>oxycedrus</i>

Le genre *Juniperus* L. de la famille des Cupressaceae comprend environ 50 espèces avec une large distribution dans l'hémisphère nord et s'étend jusqu'à l'Afrique tropicale. Il est un important genre de plantes gymnospermes avec une présence remarquable dans la région méditerranéenne. *Juniperus oxycedrus* L. est une espèce typique de cette région où il représente un élément pionnier très dynamique, surtout en milieu forestier dégradé. Son aspect rappelle le genévrier commun mais il s'en distingue facilement par ses fruits brun rougeâtres et non bleuâtres. Comme le genévrier de Phénicie, il colonise également les dunes littorales où il est représenté par un type particulier à gros fruits (*J. macrocarpa*).

Juniperus oxycedrus est un arbuste dressé de 1-8 mètres, persistant des climats chauds, parfaitement adapté à la sécheresse, il tolère tous les sols bien drainés même calcaires. Cet arbuste à croissance lente ne nécessite aucun entretien et se montre tolérant à la pollution (Quezel et Gast, 1998).

Il fournit l'huile de cade par distillation de son bois et de ses racines, abondamment utilisées pour ses propriétés médicinales en dermatologie et cosmétologie, son huile essentielle est stimulante et vermifuge. Le bois a longtemps été utilisé en ébénisterie fine (Quezel et Gast, 1998).

Peu de travaux ont été réalisés sur le statut mycorhizien de *J. oxycedrus*. Cette espèce est associée symbiotiquement aux champignons MA (Caravaca *et al.*, 2006 ; Alguacil *et al.*, 2006 ; Sanguin *et al.*, 2013).



Figure 20 : *Juniperus oxycedrus*, espèce végétale de l'écosystème de Terga (a), fruits et feuilles (b).

4.5. *Pistacia lentiscus*

Pistacia lentiscus est classé selon le taxon suivant (APG III, 2009) :

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>lentiscus</i>

Pistacia lentiscus est une espèce appartenant à la famille des Anacardiaceae (syn. Pistaciaceae). En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia atlantica* (Quezel. et Santa., 1962).

Parmi les espèces du genre *Pistacia*, *Pistacia lentiscus* L. ou lentisque est un arbrisseau très commun dans notre pays (Mitcheh, 1986 ; Baudière *et al.*, 2002). Il est très commun dans le bassin méditerranéen, il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tout type de sols, bien qu'il préfère les terrains siliceux. En Algérie, le lentisque se trouve tout le long du tell et dans les zones forestières (More et White, 2005).

Plusieurs études ont montré que *P. lentiscus* forme une association symbiotique MA (Caravaca *et al.*, 2003 ; Ferrol *et al.*, 2004 ; Alguacil *et al.*, 2011) et forme des endomycorhizes de type *Paris* (Ferrol *et al.*, 2004). Ce type est communément trouvé dans les écosystèmes méditerranéens (Bedini *et al.*, 2000).



Figure 21 : *Pistacia lentiscus*, espèce végétale de l'écosystème de Terga (a), fruits (b).

Chapitre 2

Statut mycorhizien des espèces végétales de l'écosystème de Terga

1. Introduction

Les écosystèmes semi-arides comme les zones côtières méditerranéennes, sont fréquemment soumis à des perturbations d'origine naturelle et anthropique (Grove et Rackham, 2001). Ils subissent de fortes contraintes lorsqu'ils sont le théâtre d'activités industrielles comme dans les dunes littorales de Terga en Algérie après exploitation massive de sable. Ces contraintes aggravées par de faibles précipitations, de longues périodes de sécheresse et des vents violents provoquent la perte du couvert végétal ainsi qu'une dégradation des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques des sols (Albaladejo *et al.*, 1998 ; Requena *et al.*, 2001 ; Duponnois *et al.*, 2013).

Parmi les stratégies de revégétalisation réussies dans ces écosystèmes, celles basées sur la valorisation des symbioses mycorhiziennes sont largement adoptées (Requena *et al.*, 1996 ; Azcon-Aguilar *et al.*, 2003 ; Duponnois *et al.*, 2007). Deux stratégies sont généralement proposées en fonction du niveau de dégradation du milieu (Duponnois *et al.*, 2013) : (i) gestion du potentiel infectieux mycorhizogène *via* la mise en place des espèces végétales autochtones et mycotrophes (Azcon-Aguilar *et al.*, 2003 ; Ouahmane *et al.*, 2006a) et/ou (ii) l'inoculation préalable des plants *via* des souches fongiques performantes sélectionnées (Estaun *et al.*, 1997 ; Caravaca *et al.*, 2003).

Les champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) peuvent améliorer l'efficacité de l'absorption des nutriments par les plantes dans les sols à faible fertilité en augmentant la surface d'absorption et la mobilisation des sources d'éléments nutritifs (Smith et Read, 2008). Ils aident les plantes à tolérer le stress d'origine biotique (Yano-Melo *et al.*, 2003) ou abiotique (Mathur et Vyas, 2000 ; Declerck *et al.*, 2002). Ils influent sur la structure et l'activité des communautés microbiennes dans la mycorhizosphère (Marshener et Timonem, 2005 ; Dabire *et al.*, 2007) et favorisent également la coexistence entre les espèces végétales (Hart *et al.*, 2003). Dans un environnement pauvre en nutriments tels que les dunes de sable, les CMA contribuent non seulement à l'établissement des plantes mais aussi à la fixation des dunes en formant des agrégats de grains de sable (Koske et Polson, 1984 ; Caravaca *et al.*, 2002).

Bien que les CMA soient importants pour la persistance de la végétation dans l'écosystème méditerranéen semi-aride (Caravaca *et al.*, 2003, Duponnois *et al.*, 2007), la compréhension des associations mycorhiziennes chez les plantes dans ces dunes et leur répartition dans le sol est nécessaire pour la gestion durable de ces habitats (Requena *et al.*, 1996). Par conséquent,

l'objectif de ce travail est de sélectionner des espèces végétales susceptibles d'assurer le maintien de la symbiose mycorhizienne arbusculaire au sein de l'écosystème de Terga.

Il s'agit de :

- Déterminer le statut mycorhizien de quelques espèces végétales autochtones choisies *in natura*.
- Etablir un lien entre ces espèces végétales, les teneurs en éléments nutritifs du sol et le pouvoir infectieux mycorhizogène du sol.

2. Matériels et Méthodes

2.1.Site d'étude et échantillonnage

L'étude est menée dans de la zone côtière de Terga ; c'est un complexe dunaire à l'embouchure de l'Oued Maleh, dans la partie centrale du littoral Témouchentois, à l'ouest d'Oran environ 90 km (**Fig. 22**). Sa situation géographique lui confère un climat méditerranéen de type semi-aride caractérisé par des précipitations pluviométriques irrégulières allant de 300 à 350 mm d'eau par an. Cette zone fait l'objet d'extraction de sable depuis 1941 à nos jours.

Plusieurs sorties sur terrain sont réalisées afin d'effectuer un inventaire floristique des espèces végétales présentes sur le site. Cette prospection botanique a permis de sélectionner les espèces végétales qui présentent un intérêt pour notre étude. Il s'agit de cinq espèces végétales : *Acacia saligna*, *Retama monosperma*, *Lotus creticus*, *Juniperus oxycedrus* et *Pistacia lentiscus*.

La zone d'échantillonnage correspond à une zone préservée dans deux localisations à côté de la zone exploitée (**Fig. 23**) : (Une) sur une masse sableuse élevée et face à la mer (N40° 37' E0° 44'), et (Deux) à l'arrière de la dune (une) où s'allonge un plateau, caractérisé par une végétation naturelle plus dense (N41° 16' E2° 05'). Le premier échantillonnage a lieu au printemps (2011) et le deuxième en hiver (2012).

Pour chaque espèce végétale, dix individus sont choisis au hasard. Autour du pied de chaque plante sélectionnée un prélèvement de sol rhizosphérique est réalisé. Ces échantillons de sol sont tamisés (maille de 2mm), homogénéisés, séchés par étalement à température ambiante 2 à 3 jours puis conservés dans des sachets en plastique au réfrigérateur à 4 °C. Le contrôle correspond à un sol nu non végétalisé.

Un échantillonnage de racines fines des différentes espèces est également réalisé dans les mêmes points d'échantillonnage. Les racines sont lavées et séchées à température ambiante rapidement après leur récolte et conservées éventuellement à l'abri de l'humidité.



Figure 22: Localisation de la sablière de Terga (Turgot) (wilaya d'Aïn Témouchent, Algérie).



Figure 23 : Localisation des sites d'échantillonnage ; zone 1 (N40° 37' E0° 44') et zone 2 (N41° 16' E2° 05') dans la forêt native de Terga.

2.2. Analyse physicochimique des sols

Chaque type de sol est soumis à des analyses physico-chimiques (granulométrie, pH, matière organique, azote total et phosphore total).

Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique du sol consiste à classer les éléments du sol d'après leur grosseur et à déterminer le pourcentage de chaque fraction (sable, limon et argile) afin de définir la texture d'un sol.

Dans cette analyse (**Annexe 1**) le sol est tamisé (2 mm). La matière organique est éliminée par un oxydant énergique (H_2O_2). Les particules minérales sont ensuite dispersées à l'aide d'un dispersant alcalin (hexametaphosphate de sodium). Les particules grossières de diamètre supérieur à 2 mm sont séparées par tamisage, les particules moyennes et fines sont obtenues par la mesure de la vitesse de sédimentation (Rouiller *et al.*, 1994). La texture des sols prélevés est déterminée en se référant au triangle des textures (**Annexe 1**).

Mesure du pH

Le pH d'une suspension du sol dans l'eau est déterminé (Callot et Dupuis, 1980). Au 20 g de terre fine (séchée à l'air) y sont ajoutés 50 ml d'eau distillée (pour mesurer le pH_{eau}). Le contenu est agité pendant quelques minutes, puis laissé à reposer 2 heures. Le pH est ensuite mesuré à l'aide d'un pH-mètre après une brève agitation.

Dosage de l'azote total

L'azote total est mesuré par la méthode de Kjeldahl qui consiste en une digestion acide suivie d'une distillation. Le sol est traité par l'acide sulfurique (H_2SO_4) dans un rapport sol/solution 1/20 en présence d'un comprimé de catalyseur de sélénium. La distillation est faite par entraînement de la vapeur en présence de 40 ml de NaOH 1 N. Le distillat est recueilli dans un erlenmeyer qui contient 20 ml d'acide borique et 4 gouttes d'indicateur à base de rouge de méthyle. Le titrage est fait avec l'acide sulfurique (H_2SO_4) 10/N.

Dosage du phosphore total

Plusieurs méthodes permettent de doser le phosphore du sol. La méthode de Olsen (1954) est recommandée (Anderson et Ingram, 1993). Le phosphore est extrait par agitation avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium à pH 8,5. La solution alcaline d'hydrogénocarbonate

peut abaisser la concentration des ions calcium par précipitation sous forme de carbonate de calcium et celle des ions aluminium et ferrique par précipitation sous forme d'hydroxydes. La concentration des ions phosphate augmente en conséquence et le phosphore peut être extrait de l'échantillon de terre par la solution d'hydrogénocarbonate de sodium et par filtration (Lewis *et al.*, 1984).

Cette solution d'extraction à tendance à dissoudre les matières organiques, elle donne parfois des extraits colorés. Aussi avant de procéder à la formation du bleu de molybdène, on utilise du charbon actif pour adsorber les matières organiques solubles.

Dosage de la matière organique

La matière organique est dosée par la méthode d'Anne (1945) (**Annexe 1**). La teneur en matière organique (MO) totale du sol s'obtient généralement en dosant la teneur en carbone (C). On estime que le rapport matière organique/carbone (MO/C) est à peu près constant et égal à 1,72.

Le carbone de la matière organique est oxydé par un mélange de bichromate de potassium et d'acide sulfurique (H₂SO₄). On admet que l'oxygène consommé est proportionnel au carbone que l'on veut doser. L'excès de bichromate inutilisé dans la réaction est dosé par le sel de mohr.

2.3.Observation et évaluation de la colonisation racinaire MA

Les CMA ne font pas provoquer des changements morphologiques évidents aux racines; Cependant, ils produisent des arbuscules et des vésicules dans les racines. La mise en évidence des champignons MA dans les racines est réalisée grâce à une adaptation de la technique de Phillips et Hayman (1970). Cette technique d'éclaircissement et de coloration est souvent utilisée lorsqu'on a affaire à des endomycorhizes arbusculaires.

Les racines échantillonnées sont d'abord coupées en morceaux d'environ 1 cm, placées dans un bain de KOH (10%) afin d'éliminer les constituants intracellulaires. La durée dans le bain marie varie d'une espèce à l'autre ; 45 min pour *Retama monospema*, *Lotus creticus* et *Acacia saligna*, 2h 30 min pour *Juniperus oxycedrus* et *Pistacia lentiscus*. Après rinçage à l'eau, les racines sont plongées 5 min dans du HCl 3 % dans le but de blanchir et d'acidifier le matériel. Après un second rinçage à l'eau, les racines sont colorées par le bleu de Trypan à 0,05 % dans le lacto-glycérol à 90 °C pendant 15 min. Ce colorant est composé d'acide lactique, de glycérol, d'eau et de bleu de Trypan dans une proportion volumique de 50, 25, 25 et 0,05 %. Un très léger rinçage a suivi cette étape dans le but d'éliminer le surplus de colorant sans affecter la

coloration du champignon. Cette série de bains permet d'obtenir des racines pratiquement transparentes où seulement le mycélium du champignon et les parois des cellules de la racine qui possèdent une paroi secondaire se colorent en bleu.

Les racines sont ensuite conservées dans des boîtes de Pétri recouvertes de lacto-glycérol (25 % acide lactique, 25 % glycérol, 50 % eau) de manière à diluer le colorant non-fixé et empêcher le dessèchement. Les structures mycorhiziennes sont observées au microscope optique (Olympus SZ H10).

L'évaluation du pourcentage de racines colonisées par le champignon MA est réalisée selon la méthode de Trouvelot *et al.* (1986). Pour chaque fragment racinaire, on note l'infection mycorhizienne (**Fig. 24**). Les paramètres F %, M %, m %, a % et A % sont calculés d'après les formules suivantes:

Fréquence des mycorhizes dans le système racinaire (F)

$$F \% = (\text{nb de fragments mycorhizés} / \text{nb total de fragments}) * 100$$

Intensité de la colonisation mycorhizienne dans le système racinaire (M)

$$M \% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / (\text{nb total})$$

où n_5 = nombre de fragments classés 5 ; n_4 = nombre de fragments classés 4 ; etc.

Intensité de la colonisation mycorhizienne dans les fragments mycorhizés (m)

$$m \% = M \% * (\text{nb total}) / (\text{nb mycorhizés})$$

Abondance en arbuscules dans les parties mycorhizées des fragments racinaires (a)

$$a \% = (100m_{A3} + 50m_{A2} + 10m_{A1}) / 100$$

où m_{A3} , m_{A2} , m_{A1} = % de m, classés A3, A2, A1, respectivement, avec $m_{A3} = ((95n_5 A_3 + 70n_4 A_3 + 30n_3 A_3 + 5n_2 A_3 + n_1 A_3) / \text{nb myco}) * 100 / m$; etc...

Abondance en arbuscules dans le système racinaire (A)

$$A \% = a * (M \% / 100)$$

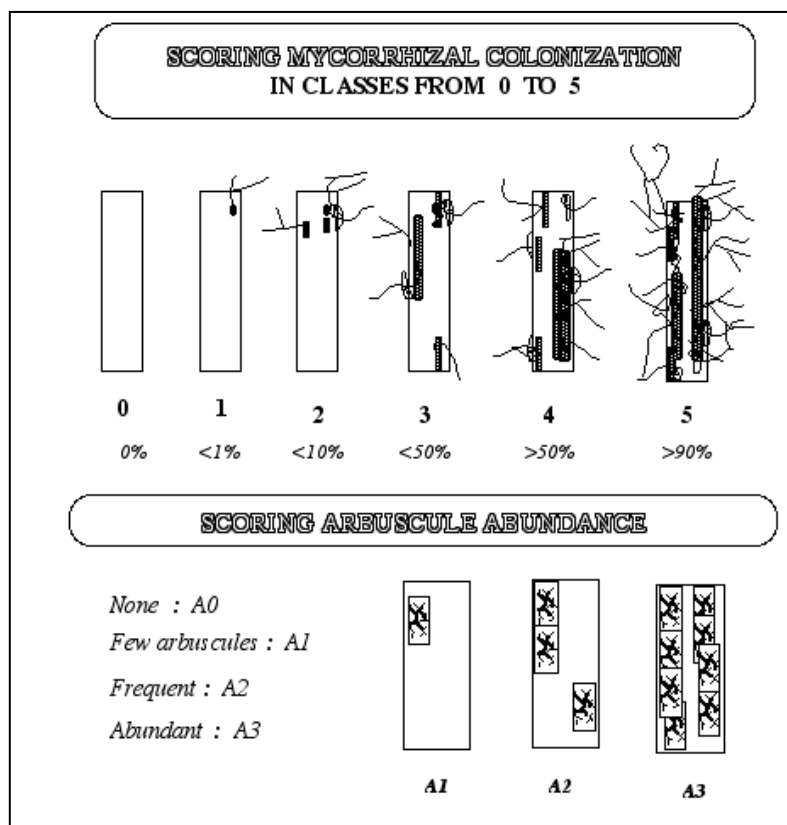


Figure 24 : Notations de la colonisation mycorhizienne et de la richesse en arbuscules (Trouvelot *et al.*, 1986).

2.4.Détermination du Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM)

Le Potentiel Infectieux Mycorhizogène ou PIM d'un sol représente sa capacité à initier la formation d'associations mycorhiziennes à partir d'une quantité d'inoculum présent dans ce sol sous forme de spores, de mycélium et de débris de racines portant des vésicules (Plenchette *et al.*, 1989).

La méthode utilisée pour évaluer le PIM a été décrite par Plenchette *et al.* (1989). Elle consiste à cultiver de jeunes plants mycotrophes sur une série de concentrations de sol naturel dilué avec le même sol stérilisé (**Tab. 3**). Pour cela, le sol utilisé est celui échantillonné sous les espèces d'intérêt et le sol nu du site d'étude. Six dilutions sont réalisées en triplicata. Les graines de sorgho (*Sorghum sudanense*), plante mycotrophe, sont mises à germer pendant deux jours dans des boîtes de Pétri sur papier filtre humide et transplantées dans des petits pots en plastique contenant 100 g de chacune des dilutions de sol à raison de dix graines par pot. La culture est menée pendant 2 semaines sous 16h de photopériode et 25 °C ± 1 et les plants sont arrosés tous les jours avec de l'eau distillée stérile.

Tableau 3 : Différentes quantités de sol non stérilisé et stérilisé utilisées lors des dilutions.

Les dilutions de sol	1	2	3	4	5	6
quantité de sol naturel (non stérilisé) (g)	3	6	12	24	48	100
quantité de sol stérilisé (g)	97	94	88	76	52	0

A la récolte, le système racinaire entier de chaque plante est soigneusement rincé à l'eau, puis préparé pour l'observation des structures mycorhiziennes selon la technique de Phillips et Haymann (1970). Chaque système racinaire montrant au moins un point d'infection (pénétration d'hyphes dans la racine) est considéré comme mycorhizé.

Ces résultats sont exprimés par le pourcentage de plantes mycorhizées par pot. Des régressions linéaires ($Y = aX + b$) sont calculées à partir de la relation pourcentage de plantes mycorhizées en fonction du logarithme de la quantité de sol non stérilisé (Duponnois *et al.*, 2001). Les résultats sont exprimés en Unités de Potentiel Infectieux Mycorhizogène (UPIM)/100g de sol. Une valeur indicatrice du PIM est donnée par le nombre d'unités de PIM (quantité de sol non stérilisé) requis pour mycorhizer 50 % d'une population de plantes (PIM₅₀) dans les conditions du test biologique.

2.5. Estimation de la densité des spores

Les spores du sol sont extraites par la méthode du tamisage humide décrite par Gerdermann et Nicolson (1963) suivie d'une centrifugation dans un milieu biphasique eau / saccharose (Daniels et Skipper, 1982). Pour chaque espèce végétale et sol nu, un échantillon composite des dix prélèvements est réalisé puis soumis à cinq extractions répétées. 100 g de chaque échantillon de sol sec est mis en suspension dans 500 ml d'eau de robinet, agité pendant 1 minute puis laissé à décanter pendant 30 s. Le surnageant est versé sur trois tamis superposés à mailles de diamètre décroissants (500 µm, 200 µm, 50 µm). L'opération est répétée trois fois. Les spores retenues par les tamis de 200 µm et 50 µm sont mélangées et mises en suspension dans de l'eau distillée.

La suspension sporale est centrifugée sur un gradient de saccharose afin de concentrer les spores et de réduire la présence des particules de sol et des fragments racinaires (Daniels et Skipper, 1982). Un gradient de densité est créé en injectant soigneusement au fond de chaque

tube à centrifuger, à l'aide d'une seringue, d'abord 1/4 d'une solution de saccharose à 20% puis 1/4 d'une solution de 60 % et enfin 1/2 de la suspension sporale. Les tubes sont centrifugés pendant 5min à 1400 rpm. Le surnageant est filtré à travers un tamis (50 µm) afin de récupérer les spores. Pour éliminer le saccharose, les spores sont ensuite rincées avec de l'eau distillée (refroidie à 4 °C) et mises en suspension dans l'eau distillée.

Le mélange de spores obtenues après extraction est observé à la loupe binoculaire. Les spores sont comptées. Le nombre moyen de spores est exprimé pour 100 g de sol sec. L'abondance relative des spores est déterminée comme suit :

$\left[\frac{\text{Nombre total de spores observées d'une espèce dans tout les sites}}{\text{nombre total de spores observées dans les sites}} \times 100 \right]. \text{ (Johnson } et al., 1991)$

2.6. Identification morphologique des spores MA

Les spores isolées à partir des échantillons de sol sont triées manuellement sous la loupe binoculaire suivant les caractères morphologiques comme la couleur, la forme et la taille. Dans chaque lot homogène, quelques spores sont montées entre lame et lamelle dans du polyvinylalcohollacto-glycerol (PVLG) et réactif de Melzer (**Annexe 2**) et observées au microscope photonique (Olympus SZ H10). A l'extrémité droite de la lame, quelques gouttes de solvant PVLG sont déposées pour l'observation de la morphologie externe des spores et à l'extrémité gauche, les spores déposées dans le PVLG + le réactif de Melzer vont servir à l'étude des couches membranaires. Sous le microscope, une pression est délicatement appliquée au-dessus de la lamelle contenant le solvant PVLG + le réactif de Melzer à l'aide de la pince, Jusqu'à éclatement des spores. Cet éclatement est suivi de la rupture des membranes internes des spores qui émergent. L'éclatement des spores est plus rapide lorsqu'elles sont montées dans ce solvant (<http://invam.wvu.edu/methods/vouchers/permanent-slides>).

L'identification est faite grâce aux caractéristiques des spores et des sporocarpes décrites sur le site officiel d'INVAM (<http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>), en se basant sur la taille des spores, la couleur, la structure de la paroi et l'attachement des hyphes.

2.7. Identification génotypiques des CMA

2.7.1. Extraction de l'ADN à partir des racines

Les racines des plantes d'intérêt sont nettoyées avec de l'eau de robinet et séchées à l'air libre. Les fragments racinaires sont broyés dans l'azote liquide. Les broyats racinaires obtenus sont conditionnés dans des tubes eppendorff à -20°C.

L'ADN est extrait à partir des broyats racinaires en utilisant le kit de centrifugation « FastDNA SPIN Kit » et en suivant les instructions du manuel (**Annexe 3**).

La qualité de l'ADN extrait est contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 0.8%. Le gel est visualisé sous la lumière UV (320nm). L'ADN est repéré par coloration au BET (un intercalant de L'ADN), ce qui permet de visualiser les bandes d'ADN sous les UV.

2.7.2. Dosage et dilution de l'ADN

Les extraits d'ADN obtenus sont dosés par fluorométrie en utilisant le kit PicoGreen « Kit Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen) ». Le principe de cette méthode repose sur l'utilisation d'une molécule fluorescente se fixant spécifiquement sur l'ADN double brin.

Des dilutions en tampon TE sont effectuées pour obtenir une gamme de concentration en ADN phage (ADN phage lambda à 2 µg/ml) comprise entre 0 et 1000 ng/ml (**Tab. 4**). 100µl de chaque dilution de standard d'ADN et 100 µl d'ADN de chaque échantillon sont distribués dans une plaque de 96 puits en plastique (Nunclon 96 flat transparent). Un volume de 100 µl de solution de PicoGreen dilué est additionné à l'ADN.

La mesure de la fluorescence des échantillons est effectuée par spectorofluométrie. Après une excitation à 480 nm, le maximum de fluorescence est lu à 520 nm. Une courbe étalon est réalisée à l'aide de l'ADN phage lambda de concentration connue. La concentration de l'échantillon d'ADN est alors déterminée par comparaison de la valeur de fluorescence obtenue avec les valeurs de fluorescence de la courbe étalon.

Tableau 4 : La gamme de concentration de l'ADN phage.

[ADN]/puits (ng/ml)	ADN phage (µl) (sol. diluée 2 µg/ml)	TE _{1X} (µl)
1000	100	0
700	70	30
500	50	50
350	35	65
200	20	80
150	15	85
100	10	90
50	5	95
10	1	99
5	0.5	99.5
0	0	100

Les échantillons d'ADN dosés sont ensuite dilués avec l'eau ultra pure « Mili Q » afin d'obtenir un échantillon représentatif de chaque traitement de 3 ng/µl. Les extraits d'ADN dilués sont destinés à la PCR.

2.7.3. Amplification de L'ADN racinaire par la nested-PCR

La technique utilisée est la « nested PCR » qui permet une meilleure spécificité. C'est une méthode d'amplification au cours de laquelle, le produit issu d'une première amplification est de nouveau amplifié au cours d'une deuxième fois à l'aide d'un second couple d'amorces (Douhan *et al.*, 2005).

Dans cette technique, 2 couples d'amorces différents sont successivement utilisés:

- un couple d'amorces externes : Ce couple d'amorces permet tout d'abord d'obtenir un premier fragment d'ADN amplifié, selon une PCR classique. Les amorces sont donc spécifiques des deux séquences bornant l'ADN à amplifier. Les fragments d'ADN obtenus servent alors de matrice pour une seconde PCR.
- un couple d'amorces internes : Ce couple d'amorces s'hybride à une partie située à l'intérieur (ou nichée) du fragment nucléotidique obtenu avec le 1er couple d'amorces et donnera des fragments de taille inférieure à ceux obtenus avec la 1ère PCR (**Fig. 25**).

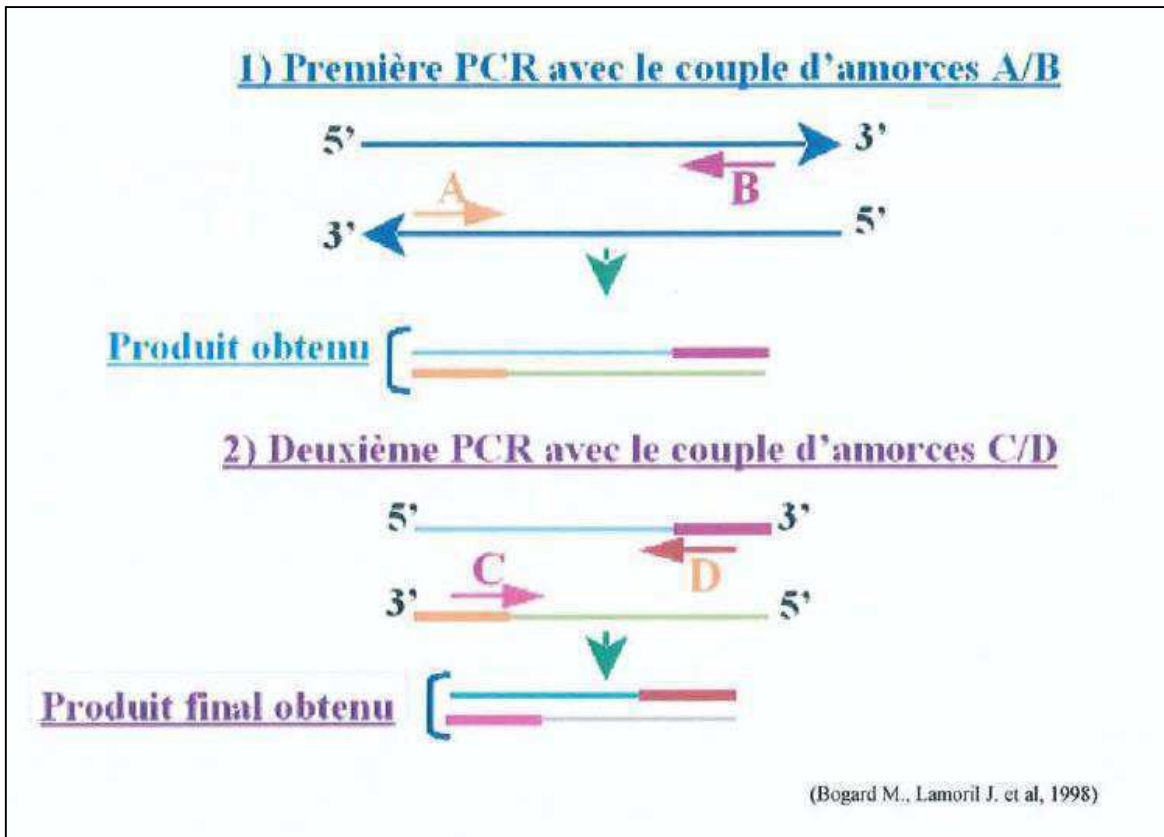


Figure 25 : Schéma expliquant la technique de nested-PCR.

Chaque extrait d'ADN est soumis à des réactions PCR nichées pour améliorer l'efficacité de l'amplification afin d'augmenter la quantité d'ADN disponible pour le clonage. Plusieurs couples d'amorces sont testés. En l'occurrence, l'amplification va concerner le gène ADNr 18S et le gène ADNr 25S (la petite sous unité SSU et la grande sous unité LSU). Ils sont utilisés comme des marqueurs moléculaires pour l'identification des champignons MA.

Un fragment de la petite sous unité (18S ADNr) est amplifié via une première PCR (step 1) en utilisant le couple d'amorces NS1/NS4 (**Tab. 5**) spécifique aux eucaryotes. Dans la PCR (step 2), deux couples d'amorces spécifiques aux Glomérormycètes sont testés AML1/AML2 et NS31/AML2 (**Tab. 5**). Les réactions d'amplification de l'ADN sont réalisées avec 2 µL d'extrait d'ADN pour un volume réactionnel de 25µl dont la composition est présentée en **Tableau 6**. Un contrôle négatif sans ADN pour s'assurer de la non contamination de l'ADN amplifié est inclus dans chaque réaction de PCR.

Le couple d'amorces LR1 et NDL22 (**Tab. 5**), ciblant les eucaryotes, est utilisé pour la première amplification PCR nichée (PCR step 1) d'un fragment de la grande sous unité (25S ADNr). Le couple d'amorces 28G1/28G2 (**Tab. 5**), ciblant les CAM, est utilisé pour la PCR step 2. Le

couple d'amorces LR1/FLR4 (**Tab. 5**), est également utilisé dans la PCR step 2. L'amorce FLR4 (Gollotte *et al.*, 2004) est situé dans le domaine D2 de la LSU ADNr des CMA. Les conditions d'amplification sont résumées dans le **tableau 7**. Un contrôle négatif sans ADN pour s'assurer de la non contamination de l'ADN amplifié est inclu dans chaque réaction de PCR.

Les produits d'amplification sont mis en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % (**Annexe 4**). Un marqueur de poids moléculaire 200 bp (Smart Ladder) a servi de contrôle de poids moléculaire. Le gel est observé sous lumière UV (320 nm) et photographié à l'aide du logiciel Infinity-Capt.

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées dans les Nested PCR

Amorce	Séquence (5' à 3')	Spécificité	Référence
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	Eucaryote	White <i>et al.</i> (1990).
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	Eucaryote	White <i>et al.</i> (1990).
AML1	ATCAACTTT CGATGGTAGGATAGA	CMA	Lee <i>et al.</i> (2008)
AML2	GAA CCC AAA CAC TTTGGT TTCC	CMA	Lee <i>et al.</i> (2008)
NS31	TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC	Eucaryote	Simon <i>et al.</i> (1992)
LR1	GCATATCAATAAGCGGAGGA	Eucaryote	van Tuinen <i>et al.</i> (1998)
NDL22	TGGTCCGTGTTTCAAGACG	Eucaryote	van Tuinen <i>et al.</i> (1998)
28G1	CATGGAGGGTGAGAATCCCG	CMA	Da Silva <i>et al.</i> (2006)
28G2	CCATTACGTCAACATCCTTAACG	CMA	Da Silva <i>et al.</i> (2006)
FLR4	TACGTCAACATCCTTAACGAA	CMA	Gollotte <i>et al.</i> (2004)

Tableau 6 : Les conditions d'amplification du fragment 18S ADNr

Couples d'amorces	Taille	Mix. PCR	Cycles
NS1/NS4	1150pb	(25 µl)	94° / 3' 94° / 30" 40° / 1' 72° / 1' 72° / 10' x 35
		tampon 5X 5 MgCl ₂ 1,5 mM	
		mix dNTPs 2,5mM 2 200 µM chaque	
		amorce 1 (20 µM) 0,625 0,5 µM	
		amorce 2 (20 µM) 0,625 0,5 µM	
		BSA (10 mg/ml) 1,5 600 ng/µl	
		<i>Taq</i> 0,3 1,5 U total	
		H ₂ O	
ADN racine 2 µl			
AML1/AML2	800pb	(25 µl)	94° / 3' 94° / 1" 50° / 1' 72° / 1' 72° / 10' x 25
		tampon 5X 5 MgCl ₂ 1,5 mM	
		mix dNTPs 2,5mM 2 200 µM chaque	
		amorce 1 (20 µM) 0,625 0,5 µM	
		amorce 2 (20 µM) 0,625 0,5 µM	
		BSA (10 mg/ml) 1,5 600 ng/µl	
		<i>Taq</i> 0,2 1,5 U total	
		H ₂ O	
PCR step1 2 µl			
NS31/AML2.	550pb	(25 µl)	94° / 3' 94° / 1' 50° / 1' 72° / 1' 72° / 10' x 25
		tampon 5X 5 MgCl ₂ 1,5 mM	
		mix dNTPs 2,5mM 2 200 µM chaque	
		amorce 1 (20 µM) 0,625 0,5 µM	
		amorce 2 (20 µM) 0,625 0,5 µM	
		BSA (10 mg/ml) 1,5 600 ng/µl	
		<i>Taq</i> 0,2 1,5 U total	
		H ₂ O	
PCR step1 2 µl			

Tableau 7 : Les conditions d'amplification du fragment 25S ADNr.

Couples d'amorces	Taille	Mix. PCR	Cycles		
LR1/NDL22	780pb	(25 µl)	93° / 5' 93° / 1' 58° / 1' x 35 72° / 1' 72° / 10'		
		tampon 5X		5	MgCl ₂ - 1.5 mM
		mix dNTPs 2.5 mM		2	200 µM chaque
		amorce 1 (20 µM)		0,625	0,5 µM
		amorce 2 (20 µM)		0,625	0,5 µM
		BSA (10 mg/ml)		1,5	600 ng/µl
		Taq		0,3	1,5 U total
		H ₂ O			
		ADN racine	2	µl	
28G1/28G2	580pb	(25 µl)	94° / 5' 94° / 45" 55° / 1' x 25 72° / 1' 72° / 10'		
		tampon 5X		5	MgCl ₂ 1.5 mM
		mix dNTPs 2.5mM		2	200 µM chaque
		amorce 1 (20 µM)		0,625	0,5 µM
		amorce 2 (20 µM)		0,625	0,5 µM
		BSA (10 mg/ml)		1,5	600 ng/µl
		<i>Taq</i>		0,2	1,5 U total
		H ₂ O			
		PCR step1	2	µl	
LR1/FLR4	750pb	(25 µl)	93° / 5' 93° / 1' 58° / 1' x 25 72° / 1' 72° / 10'		
		tampon 5X		5	MgCl ₂ 1.5 mM
		mix dNTPs 2.5mM		2	200 µM chaque
		amorce 1 (20 µM)		0,625	0,5 µM
		amorce 2 (20 µM)		0,625	0,5 µM
		BSA (10 mg/ml)		1,5	600 ng/µl
		<i>Taq</i>		0,2	1,5 U total
		H ₂ O			
		PCR step1	2	µl	

2.7.4. Clonage de l'ADN fongique

Purification des produits PCR

Après amplification, les fragments d'ADN fongique sont purifiés avant d'être clonés. Les purifications sont effectuées à l'aide du kit QIAquick gel extraction de Qiagen. Selon les résultats, les produits PCR step 2 du Fragment ADNr 25S amplifiés par les amorces 28G1/28G2 (580 pb) sont choisis pour le clonage.

Ligation

La ligation dans le plasmide pGEM-T (**Fig. 26**) est effectuée selon le Kit « pGEM®-T easy Vector Systems » (Promega).

Le mélange de gène d'intérêt (max de 3 µl de 1 produit PCR) et le vecteur pGEM-T easy vector (1 µl) est incubé en présence de 5 µl de tampon (2X rapid ligation buffer) et 1 µl de T4 DNA ligase. Le volume final est à 10 µl ajusté par l'eau ultrapure autoclavé. La ligation s'effectue à 4 °C pendant 1 nuit.

Pour un produit PCR de 400 pb, 20 ng purs contenus au maximum dans 3 µl sont incorporés au mélange. Le volume de produit PCR est calculé après le dosage des teneurs d'ADN au Nanodrop à $\lambda = 260\text{nm}$.

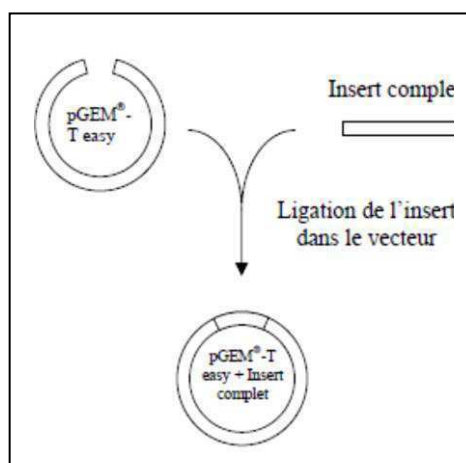


Figure 26: La ligation de l'insert dans le plasmide pGEM-T.

Transformation par choc thermique des cellules ultracompétentes XL2-Blue

Trois tubes de 100 µl de cellules compétentes sont nécessaires pour cloner les neuf échantillons de produits PCR step 2. Deux microlitres de β-mercaptoéthanol sont ajoutés à 100 µl de cellules compétentes (une fois les cellules décongelées) et mélangé lentement toutes les 2 minutes en laissant sur glace pendant 10 min.

Une suspension de 30 µl de cellules compétentes d'*Escherichia coli* XL2 Blue est additionnée à 3µl de produits de ligation, sur glace, puis mélangées doucement avec précaution avant d'être incubées 30 min sur glace. L'intégration du vecteur plasmidique dans les bactéries compétentes est effectuée par choc thermique : le mélange est incubé 35s à 42°C, puis remis 2 min dans la glace sans mélanger. Sous hotte à flux laminaire, 300 µl de milieu nutritif SOC (**Annexe 5**) à température ambiante est incorporé et laissé incuber sans agitation à 37 °C pendant au moins 1h.

L'étalement des bactéries est fait sur milieu LB additionné d'une solution d'Ampicilline, IPTG et X-gal (LB_{Amp} / Xgal / IPTG) (**Annexe 6**). L'ampicilline est incorporée (100 mg/l de LB final, soit 2 ml solution mère/l de LB) dans les flacons après l'autoclavage, avant de couler dans les boîtes de Pétri. L'incorporation du X-gal et l'IPTG dans le milieu est réalisée par étalement. 40 µl de chacune de ces 2 solutions mères sont étalés sur 30 ml de LB_{Amp}. solidifié en commençant par l'IPTG, séchage 5 min puis ajout de X-gal. Les cellules peuvent être étalées sur ces boîtes « imprégnées » dès qu'elles sont sèches.

l'IPTG, est un activateur de la transcription de l'opéron lactose et plus spécialement le gène de synthèse de la β-galactosidase et X-gal est un agent colorant qui devient bleu en présence de β-galactosidase. Cela nous permettra alors de voir si le gène a bien été inséré dans la bactérie car dans ce cas, la β-galactosidase n'est pas synthétisée et les colonies seront blanches. Au contraire, si l'insert n'a pas été inséré dans la bactérie, il y aura alors synthèse de β-galactosidase et les colonies seront bleues avec la présence de Xgal (**Fig. 27**).

Les étalements sur milieu LB_{Amp} / Xgal / IPTG sont effectués en trois répétitions et à trois concentrations (100 µl de cellules pures, 100 µl de cellules pures diluées 1/10^{ème}, 100 µl de cellules pures diluées 1/100^{ème}). Les boites sont incubées une nuit à 37 °C.

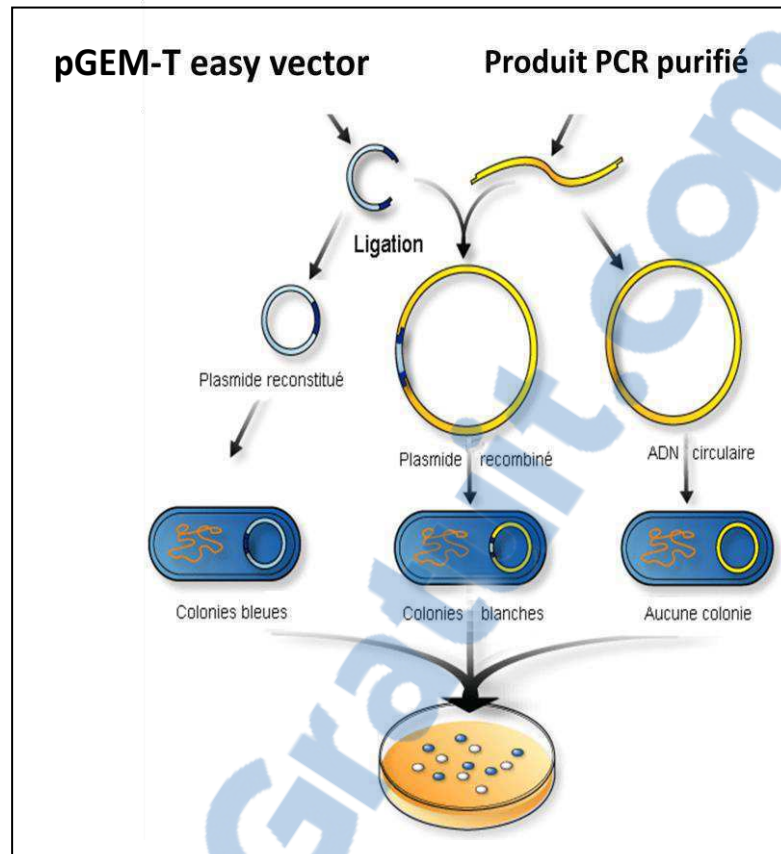


Figure 27 : Schéma de l'expérience du Clonage moléculaire (<http://therapie-genique-aragon-1s5.webnode.fr/la-therapie-genique/a3%29-clonage-du-g%C3%A8ne/>).

Les colonies blanches sont ensemencées (les clones positifs) sur une microplaque de 96 puits-PCR (conique) remplis avec de l'eau ultrapure autoclavée (30 μ l par puits) (**Fig. 28**). Les plaques contenant les suspensions bactériennes sont fermées avec film aluminium adhésif.

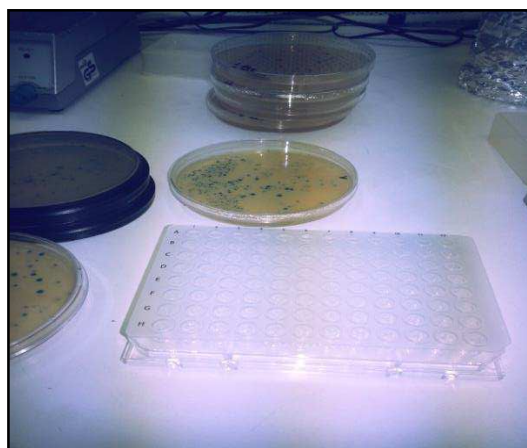


Figure 28 : Suspensions bactériennes avec les colonies blanches.

Extraction d'ADN du plasmide bactérien

L'extraction d'ADN plasmidique à partir de ces bactéries est effectuée par la lyse thermique sur thermocycleur (96 °C-2 min initiale puis 7 fois : 96 °C-1 min et 4 °C-10 sec). Les plaques sont ensuite centrifugées 10 min à 10 000 g. 25 µl de surnageant de chaque puits sont transférés dans une nouvelle microplaque PCR. L'ADN est conservé à -20 °C.

Amplification du fragment "insert"

L'amplification de l'ADN plasmidique est effectuée par PCR en utilisant les amorces M13 forward (M13F) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') et M13 reverse (M13R) (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), portées sur le plasmide et flanquant l'insert (**Fig. 29**).

Les PCR sont effectuées dans un volume final de 25 µl contenant 0.06 µl de Taq-ADN polymérase (0,3 U total), 5 µl de tampon 5X (MgCl₂ - 1.5 mM), 2 µl de dNTPs (2.5 mM), 0,625 µl d'amorces (20 µM), 15,69 µl d'eau milliQ stérile et 1 µl d'ADN clone. Le cycle d'amplification est le suivant : 5 min à 94 °C, puis 30 cycles composés de : 1min à 94 °C, 30 s à 55 °C et 1 min à 72 °C puis terminé à 10 min à 72 °C.

Cinq microlitres d'amplicons sont ensuite déposés sur gel d'agarose puis visualisés aux UV (320 nm) de façon à distinguer les vrais positifs (amplification de taille attendue) qui sont envoyés au séquençage.

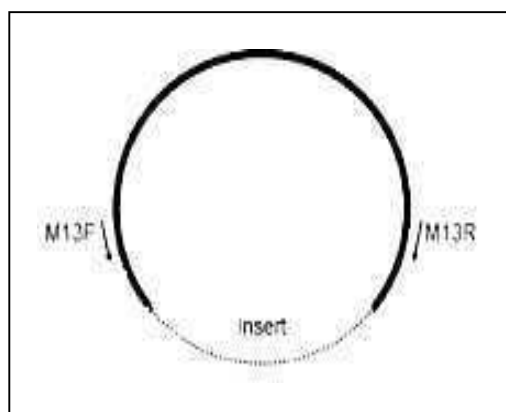


Figure 29: Les amorces M13F et M13R portées sur le plasmide.

2.7.5. Séquençage d'ADN et analyse

Le séquençage est réalisé sur les deux brins d'ADN d'intérêt à partir des amorces universelles M13R et M13F du plasmide hôte par la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) (Genoscreen Lille, France). Les séquences obtenues sont corrigées manuellement avec le logiciel Chromas pro® puis comparées par la méthode du Blast N avec les séquences de la banque d'ADN Genbank *via* le site Internet « <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> » pour connaître les séquences présentant les plus fortes homologues avec nos échantillons. La séquence ayant la plus forte homologie est ensuite mentionnée dans les résultats.

2.8. Analyses statistiques

Les données sont traitées avec une analyse de la variance (ANOVA) au seuil de 5% ($p < 0.05$) en utilisant le logiciel XL stat. La comparaison des moyennes est faite à l'aide du test de Tukey. Les coefficients de corrélation de Spearman sont calculés entre toutes les variables. L'abondance relative des spores est calculée (Johnson *et al.*, 1991).

La diversité spécifique est appréhendée à l'aide des indices de diversité de Shannon et Weiner (1949) :

$$H = - \sum Ni / N \log_2 (Ni / N)$$

Ni= effectif des individus du genre i dans une catégorie donnée.

N= effectif total des individus de tous les genres dans une catégorie donnée.

H= indice de diversité de Shannon en bit.

Et d'équitabilité de Piélou (1966) :

$$E = H / \log_2 S$$

H= Indice de diversité de Shannon.

S= nombre total des espèces.

3. Résultats

3.1. Caractéristiques botaniques du site d'étude

La zone préservée de la sablière de Terga est caractérisée par une biodiversité végétale importante (**Fig. 30**) composée d'arbres, d'arbustes et d'herbacées (**Tab. 8**) dont les espèces sélectionnées : *Acacia saligna*, *Lotus creticus*, *Pistacia lentiscus*, *Retama monosperma*, et *Juniperus oxycedrus*. La zone exploitée est totalement nue (**Fig. 31**).



Figure 30: La zone non exploitée de la sablière de Terga (2013).



Figure 31: La zone exploitée de la sablière de Terga (2013).

Tableau 8 : La flore des dunes de Terga.

Arbres	Arbustes	Herbacées
<i>Juniperus phoenicea</i>	<i>Calycotome villosa intermedia</i>	<i>Ammophila arenaria</i>
<i>Juniperus oxycedrus</i>	<i>Chamaerops humilis</i>	<i>Asparagus acutifolius</i>
<i>Acacia saligna</i>	<i>Cistus salviifolius</i>	<i>Bellis sylvestris</i>
<i>Tamarix sp</i>	<i>Cistus sericeus</i>	<i>Brassica fruticulosa glabberina</i>
	<i>Ephedra altissima</i>	<i>Calendula tomentosa</i>
	<i>Erica multiflora</i>	<i>Centaurea fragilis</i>
	<i>Genista cephalanta</i>	<i>Centaureum umbellatum</i>
	<i>Halimium halimifolium</i>	<i>Clematis cirrhosa</i>
	<i>Helianthemum organifolium</i>	<i>Crucianella maritima</i>
	<i>Helianthemum racemosum</i>	<i>Cyperus kalli</i>
	<i>Lonicera implexa</i>	<i>Daphne gnidium</i>
	<i>Lycium intricatum</i>	<i>Echinops spinosus</i>
	<i>Osyris lanceolata</i>	<i>Lagurus ovatus</i>
	<i>Phillyrea angustifolia media</i>	<i>Lavandula dentata</i>
	<i>Pistacia lentiscus</i>	<i>Limonium densiflorum</i>
	<i>Quercus coccifera</i>	<i>Lobularia maritima</i>
	<i>Retama monosperma bovei</i>	<i>Lotus creticus</i>
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Malcolmia arenaria</i>
		<i>Matthiola tricuspidata</i>
		<i>Medicago littoralis</i>
		<i>Micromeria inodora</i>
		<i>Ononis antennata</i>
		<i>Ononis variegata</i>
		<i>Orlaya maritime</i>
		<i>Pancratium maritimum</i>
		<i>Paronychia argentea</i>
		<i>Prasium majus</i>
		<i>Reichardia tingitana</i>
		<i>Rubia peregrine</i>
		<i>Rumex bucephaloflorus</i>
		<i>Senecio leucanthemifolius</i>
		<i>crassifolius</i>
		<i>Silene ramosissima</i>
		<i>Stipa tenacissima</i>
		<i>Serratula mucronata</i>
		<i>Urginea maritimum</i>

3.2. Analyse physicochimique

La lecture des résultats de la granulométrie (**Tab. 9**) et leur extrapolation sur le triangle des textures (**Annexe 1**) ont permis de conférer la texture sablonneuse aux cinq sols analysés. Les résultats de l'analyse chimique sont représentés dans le **tableau 9**. Le pH des échantillons de sol varie entre 8,13 et 8,87. Ces résultats montrent que tous les sols ont un pH alcalin. Quant à la matière organique, elle varie respectivement de 0,10 à 0,40 % dans les sols de *L. creticus* et *R. monosperma* et de 6,39 à 6,49 % dans les sols de *J. oxycedrus*, *P. lentiscus* et *A. saligna*. Les teneurs des cinq sols en azote total sont de 0,01 à 0,07 %. Ces pourcentages sont considérés faibles. La même chose pour le phosphore total qui varie de 0,031 à 0,037 %. Ces données physico-chimiques montrent que les sols de la sablière de Terga sont des sols sablonneux, alcalins et pauvres en éléments nutritifs.

Tableau 9 : Caractéristiques physico-chimiques des sols rhizosphériques et du sol nu

	Argile	Limon	Sable	pH	Matière organique %	Azote total %	Phosphore total %
<i>Acacia saligna</i>	3	5	92	8,87	6,49	0,05	0,037
<i>Lotus creticus</i>	2	4	94	8,13	0,40	0,01	0,031
<i>Retama monosperma</i>	2	4	94	8,37	0,10	0,03	0,033
<i>Pistacia lentiscus</i>	5	3	92	8,45	6,47	0,07	0,035
<i>Juniperus oxycedrus</i>	4	5	91	8,39	6,39	0,05	0,035

3.3. Colonisation racinaires MA

3.3.1. Mise en évidence de la colonisation racinaire MA

Les examens microscopiques des fragments de racines traitées selon la méthode de Phillips et Hayman (1970) et colorées au bleu Trypan révèlent la présence de différentes structures caractéristiques des CMA (des hyphes et des vésicules...) (**Fig. 32, 33**) chez toutes les espèces végétales prospectées. Les vésicules sont abondamment observées chez toutes les espèces comparées aux structures arbusculaires observées seulement chez *A. saligna* et *P. lentiscus*.

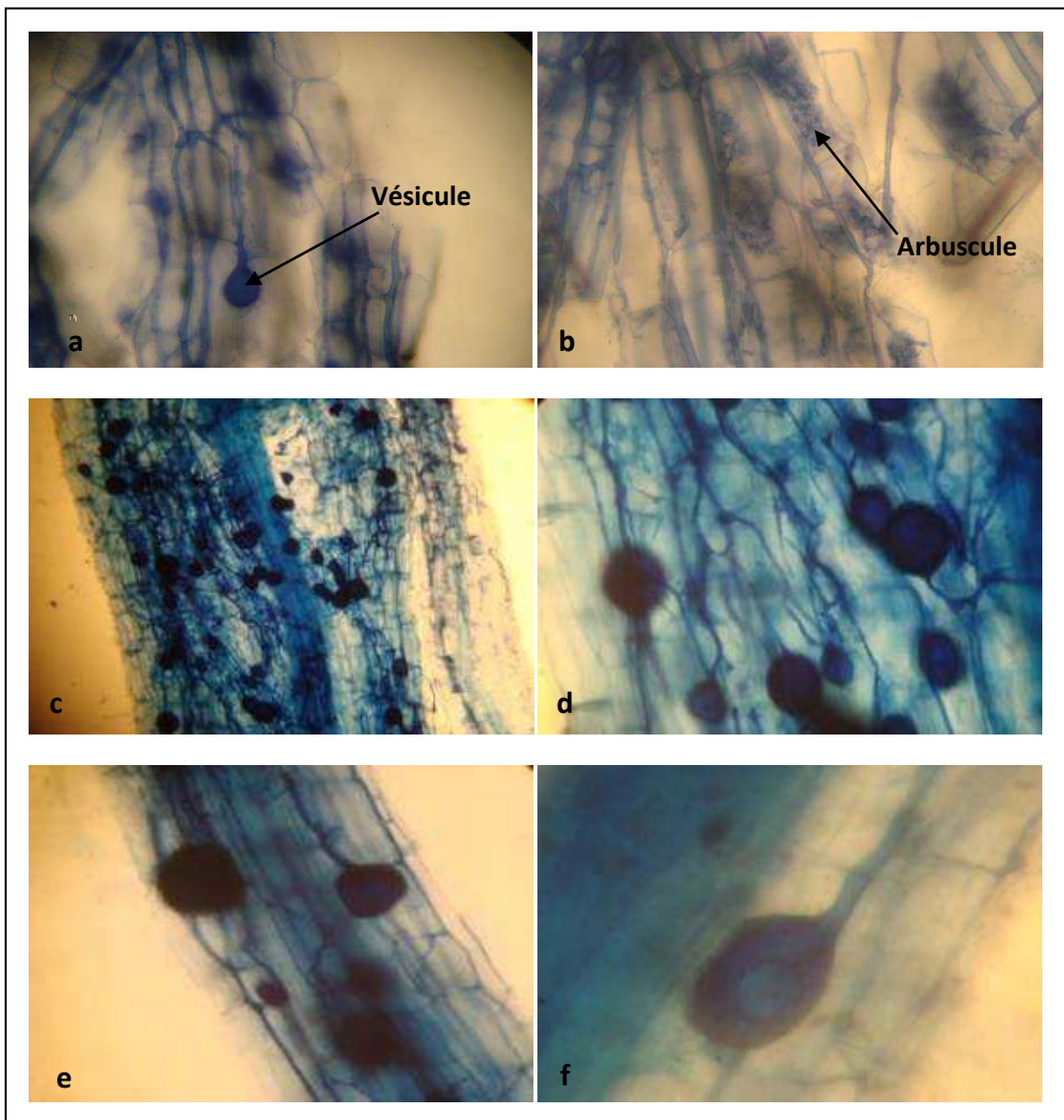


Figure 32: Structures mycorhiziennes arbusculaires observées dans les racines des plantes d'intérêt colorées au bleu de Trypan: Racines d'*A. saligna* (a,b), racines de *P. lentiscus* (c,d), racines de *L. creticus* (e, f).

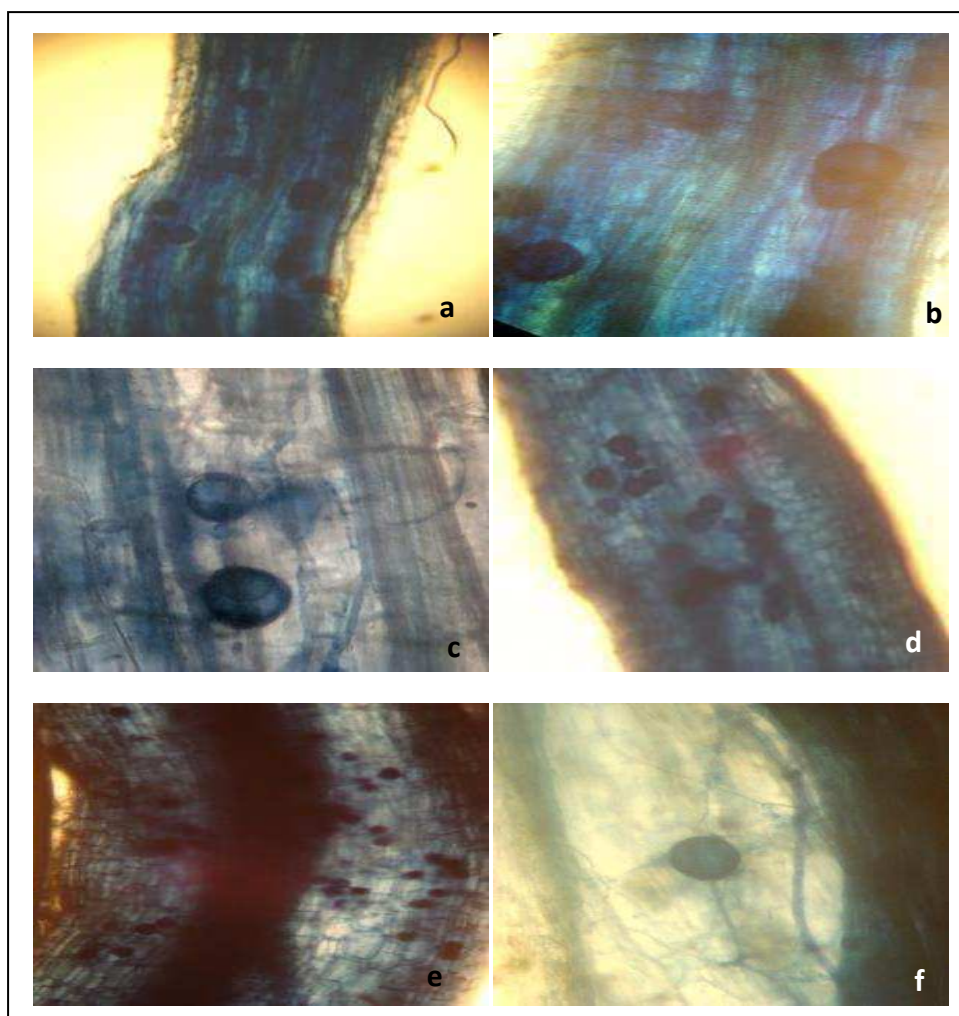


Figure 33: Structures mycorhiziennes arbusculaires observées dans les racines des plantes d'intérêt colorées au bleu de Trypan : racines de *R. monosperma* (a, b, c, d), racines de *J. oxycedrus* (e, f).

3.3.2. Estimation du taux de colonisation racinaire MA

La plupart des racines des plantes du site d'étude sont colonisées par des champignons MA avec un pourcentage variant de 54 % à 82,5 % selon les espèces végétales (**Tab. 10**). L'analyse de variance indique que les espèces végétales ont une influence hautement significative sur la colonisation MA ($F= 9.904$; $P< 0,0001$). La plus faible valeur de la fréquence de l'infection F% est observée chez *J. oxycedrus* (54 %), alors qu'elle ne diffère pas significativement pour les autres espèces (72 % à 82.5 %). Quant à l'intensité de la colonisation endomycorhizienne dans le système racinaire (M %), elle varie significativement de 14.8 % à 37.26 % alors que celle de la colonisation endomycorhizienne dans les fragments mycorhizés (m %) est supérieure à la précédente et varie significativement de 27.40 % à 46.57 %.

Tableau 10 : Les différents paramètres d'estimation du degré de colonisation des racines.

Espèce	F %	M %	m %	a %	A %
<i>A. saligna</i>	82,50 ^a	36,25 ^b	44,17 ^b	24,86	9,00
<i>R. monosperma</i>	80,00 ^a	27,30 ^d	34,12 ^d	0,00	0,00
<i>L. creticus</i>	72,00 ^a	28,40 ^c	39,44 ^c	0,00	0,00
<i>P. lentiscus</i>	80,00 ^a	37,26 ^a	46,57 ^a	5,09	1,90
<i>J. oxycedrus</i>	54,00 ^b	14,80 ^e	27,40 ^e	0,00	0,00

Pour chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $P < 0,05$

F%: Fréquence des mycorhizes dans le système racinaire.

M%: Intensité de la colonisation mycorhizienne dans le système racinaire.

m% : Intensité de la colonisation mycorhizienne dans les fragments mycorhizés.

a% : Abondance en arbuscules dans les parties mycorhizées des fragments racinaires

A% : Abondance en arbuscules dans le système racinaire.

3.4.Potentiel infectieux mycorhizogène des sols (PIM)

Après deux semaines de culture du sorgho (**Fig. 34**) dans les dilutions de sol, le système racinaire entier de chaque plantule est coloré au bleu de Trypan et observé au microscope optique (**Fig. 35**). Les pourcentages des plantules mycorhizées enregistrées dans le test biologique pour déterminer le potentiel infectieux mycorhizogène des sols sont donnés dans le **tableau 11**. Tous les traitements atteignent le niveau de 100 % de mycorhization dans la dilution de 100 % sauf pour le traitement de sol nu (23,33 %).



Figure 34: Des cultures de sorgho âgées de 15 jours (108 pots =6 sols× 6 dilutions× 3 répétitions).

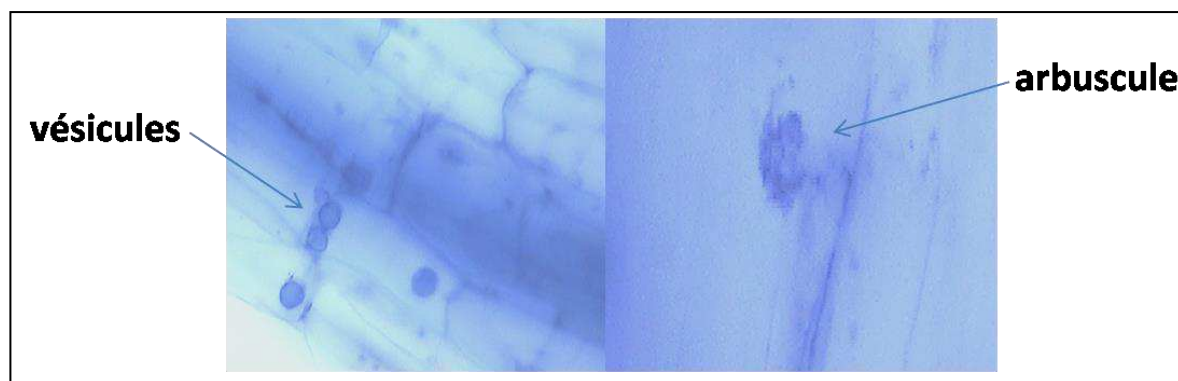


Figure 35: Observation microscopique des systèmes racinaires de sorgho colorés au bleu de Trypan.

Tableau 11: Les pourcentages de plantules mycorhizées du sorgho cultivées sur une gamme de dilutions de sol rhizosphérique.

Traitement Dilution %	Sol d' <i>A. saligna</i>	Sol de <i>R.</i> <i>monosperma</i>	Sol de <i>L. creticus</i>	Sol de <i>P. lentiscus</i>	Sol de <i>J. oxycedrus</i>	Sol nu
3	26,66	16,66	30	33,33	23,33	0
6	30	26,66	30	33,33	23,33	0
12	36,66	26,66	26,66	40	36,66	0
24	53,33	23,33	53,33	50	56,66	0
48	83,33	50	80	83,33	80	0
100	100	100	100	100	100	23,33

Ces résultats sont traités par le logiciel « XL stat » qui a donné pour chaque type de sol trois modèles de régression linéaire ($Y = aX + b$) (**Annexe 7**), calculées à partir de la relation pourcentage de plantes mycorhizées en fonction du logarithme de la quantité de sol non stérilisé. Le PIM_{50} est l'exponentiel de X à un Y égale à 0,5 dans les régressions linéaires (**Annexe 8**).

Le PIM_{50} caractérise la quantité de sol nécessaire pour mycorhizer 50% d'une population de plantes dans les conditions du test biologique. Il varie significativement en fonction du sol ($F=10,277$, $P<0,001$). Le test de Tukey a permis de distinguer trois groupes de sols par rapport au niveau de l'infectivité (**Tab. 12**). Une faible valeur de PIM_{50} correspond à un potentiel infectieux élevé. Pour le sol prélevé sous *A. saligna*, il faut seulement 16,22 g de sol rhizosphérique pour mycorhizer 50 % des plantes. Cette quantité de sol passe à 29,50 g pour le sol prélevé sous *R. monosperma* tandis qu'il faut plus que 100 g de sol nu non stérilisé pour

mycorhizer 50 % des plantes. Cette quantité est supérieure à la quantité de sol testé, soit 100 g. Cela signifie qu'il n'y a pas assez de propagules de champignons mycorhiziens dans 100 g de sol nu pour obtenir 50 % des plantules mycorhiziennes.

Le nombre des unités de PIM₅₀ par 100 g de sol est calculé en divisant 100 par la valeur du PIM₅₀. Plus le nombre des unités de PIM₅₀ est élevé plus le sol est riche en propagules mycorhizogènes. Ces valeurs appuient celles du PIM₅₀. Le potentiel infectieux mycorhizogène est important dans les sols d'*A. saligna*, *L. creticus* et *P. lentiscus*. et *J. oxycedrus* et moins important dans le sol de *R. monosperma*.

Tableau 12 : Le potentiel infectieux mycorhizogène chez les espèces végétales d'intérêt et dans le sol nu.

Origine du sol	R ²	PIM ₅₀	Nb des unités de PIM ₅₀
<i>Acacia saligna</i>	0,94	16,22 ^b	6,17 ^b
<i>Retama monosperma</i>	0,68	29,50 ^a	3,39 ^a
<i>Lotus creticus</i>	0,88	18,15 ^b	5,51 ^b
<i>Pistachia lentiscus</i>	0,88	18,09 ^b	5,53 ^b
<i>Juniperus oxycedrus</i>	0,94	19,74 ^b	5,07 ^b
Sol nu	-	>100 ^c	<1 ^c

Pour chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $P < 0,05$.

3.5. Estimation de la densité des spores MA

La densité moyenne des spores dans le sol (**Tab. 13**) varie très significativement d'une espèce végétale à une autre ($F=34,98$; $P < 0,0001$) avec un nombre total de spores important dans le cas de *R. monosperma* (123,6 spores/100 g de sol) et *J. oxycedrus* (111,6 spores/100 g de sol). Pour *A. saligna*, *L. creticus* et *P. lentiscus*, les valeurs respectives sont proches 65,5 ; 80,8 ; 76,6 spores/100 g de sol. Le sol nu est très pauvre en spores 12,16 spores/100 g de sol.

Les prélèvements effectués en hiver et au printemps (**Tab. 13**) montrent une corrélation négative ($r=-0,623$; $\alpha= 0,05$) et une variation très significative entre les deux saisons ($F=33,42$; $P < 0,0001$). Ainsi le nombre maximal de spores enregistré au printemps dans le sol rhizosphérique de *R. monosperma* est de 123,6 spores/100 g de sol, puis diminue pour atteindre

en hiver seulement 44,8 spores/100 g de sol. Les mêmes tendances sont également observées pour les autres espèces végétales.

Tableau 13: Densité de spores MA en fonction des saisons (nombre de spores/100 g de sol).

Origines des sols	Nombre de spore/100g de sol	
	Hiver	Printemps
<i>Acacia saligna</i>	36,33±4,16 ^a	67,33±8,02 ^b
<i>Lotus creticus</i>	32,33±11,01 ^a	76,33±14,36 ^b
<i>Retama monosperma</i>	45,00±11,53 ^a	123,33±27,53 ^a
<i>Pistacia lentiscus</i>	32,00±8,88 ^a	80,33±4,50 ^b
<i>Juniperus oxycedrus</i>	41,33±5,50 ^a	110,00±18,02 ^a
<i>sol nu</i>	12,00±1,00 ^b	12,33±3,05 ^c

Pour chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à $P < 0,05$

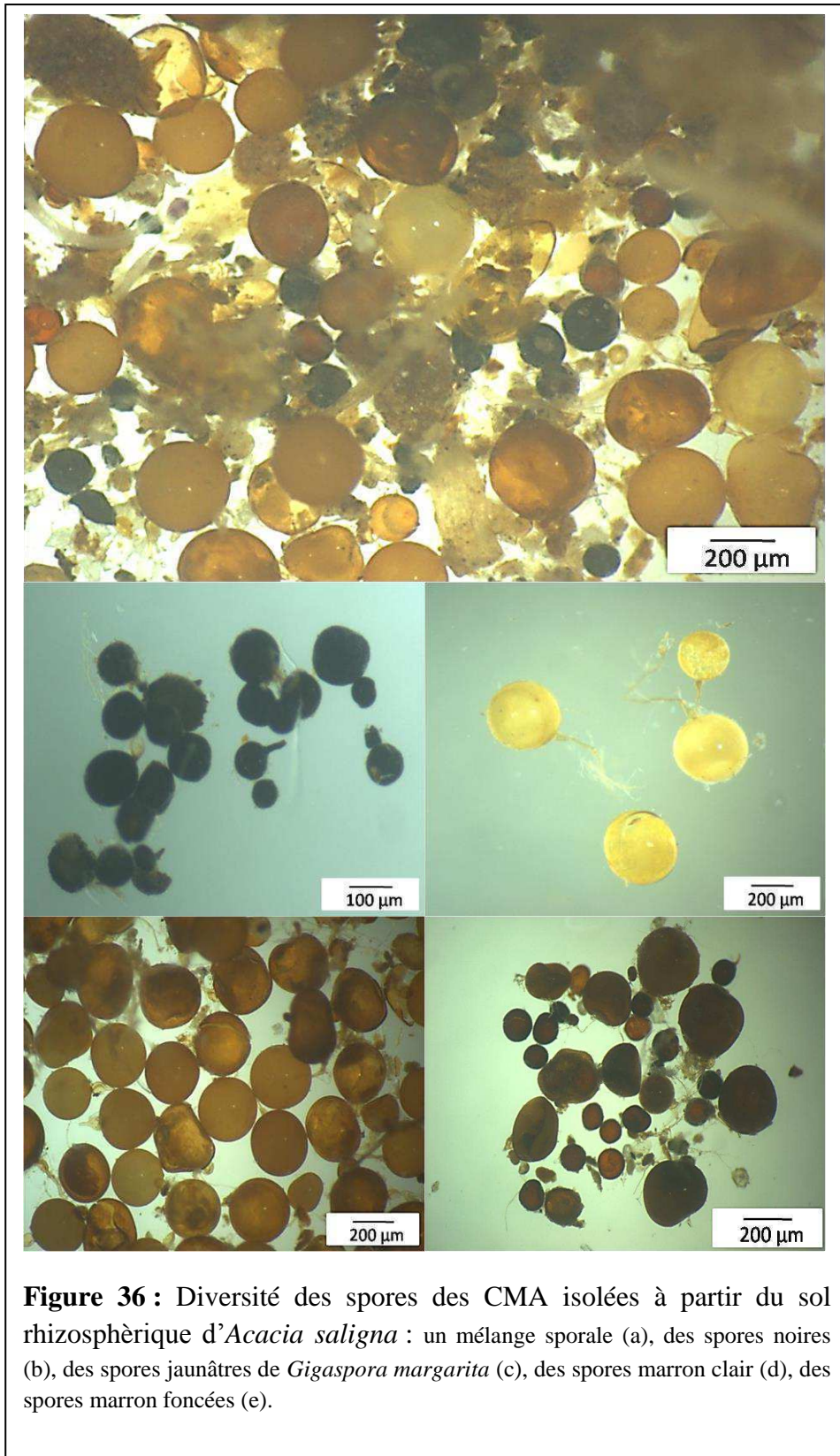
3.6. Diversité spécifique et répartition des espèces MA dans les formations végétales

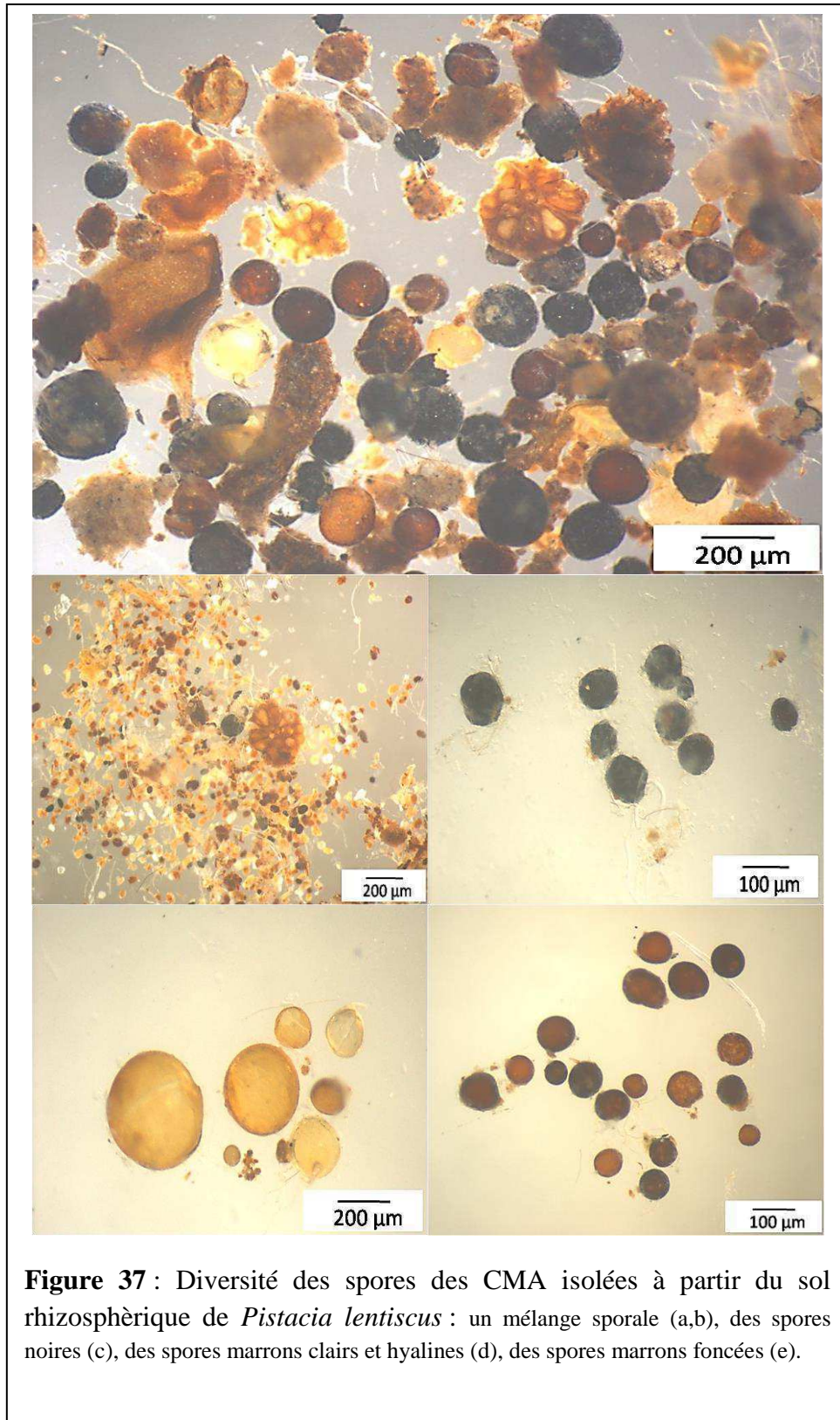
3.6.1. Abondance relative des différents types de spores

Les différents types de spores sont différenciés sur la base de leurs caractéristiques morphologiques à savoir la couleur et la taille ce qui a permis de distinguer treize morphotypes de spores dans les sols rhizosphériques et nus (**Fig. 36, 37, 38, 39, 40**). Il varie de 4 dans le sol nu à 11 dans le sol rhizosphérique. Il s'agit de spores de couleur noire, marron, marron foncé, orange, blanche et jaunâtre, de forme globuleuse, ovale ou irrégulière et de taille variable (**Tab. 14**). La plupart des morphotypes sont communs dans tous les sols et quelques-uns sont spécifiques. L'abondance relative des différents types de spores rencontrées dans les sols rhizosphériques des différentes espèces végétales d'intérêt est représentée dans le **tableau 14**.

Tableau 14: Caractéristiques morphologiques et abondance relative des spores

Caractéristiques des morphotypes	Diamètre des morphotypes de spores (µm)	Abondance relative des morphotypes de spores dans les sols rhizosphériques (%)					
		<i>A. saligna</i>	<i>L. creticus</i>	<i>R. monosperma</i>	<i>P. lentiscus</i>	<i>J. oxycedrus</i>	Sol nu
Noir	60-100	19	14	9	4	8	32
Noir	250-400	3	5	11	-	4	16
Marron clair	40-100	10	11	10	10	10	-
Marron clair	240-450	23	4	11	6	8	-
Marron foncé	40-100	8	7	13	4	16	3
Marron foncé	160-450	10	1	13	2	12	-
Crème à jaunâtre	240-400	6	-	6	-	2	-
Hyaline à jaune pâle	40-80	12	9	15	9	17	49
Marron paroi foncée	80-120	7	19	12	3	23	-
Orange	60-80	2	4	-	-	-	-
Marron ovale	20-30	-	-	-	29	-	-
Marron irrégulier	200-360	-	15	-	26	-	-
Jaune brun irrégulier	200-360	-	11	-	7	-	-





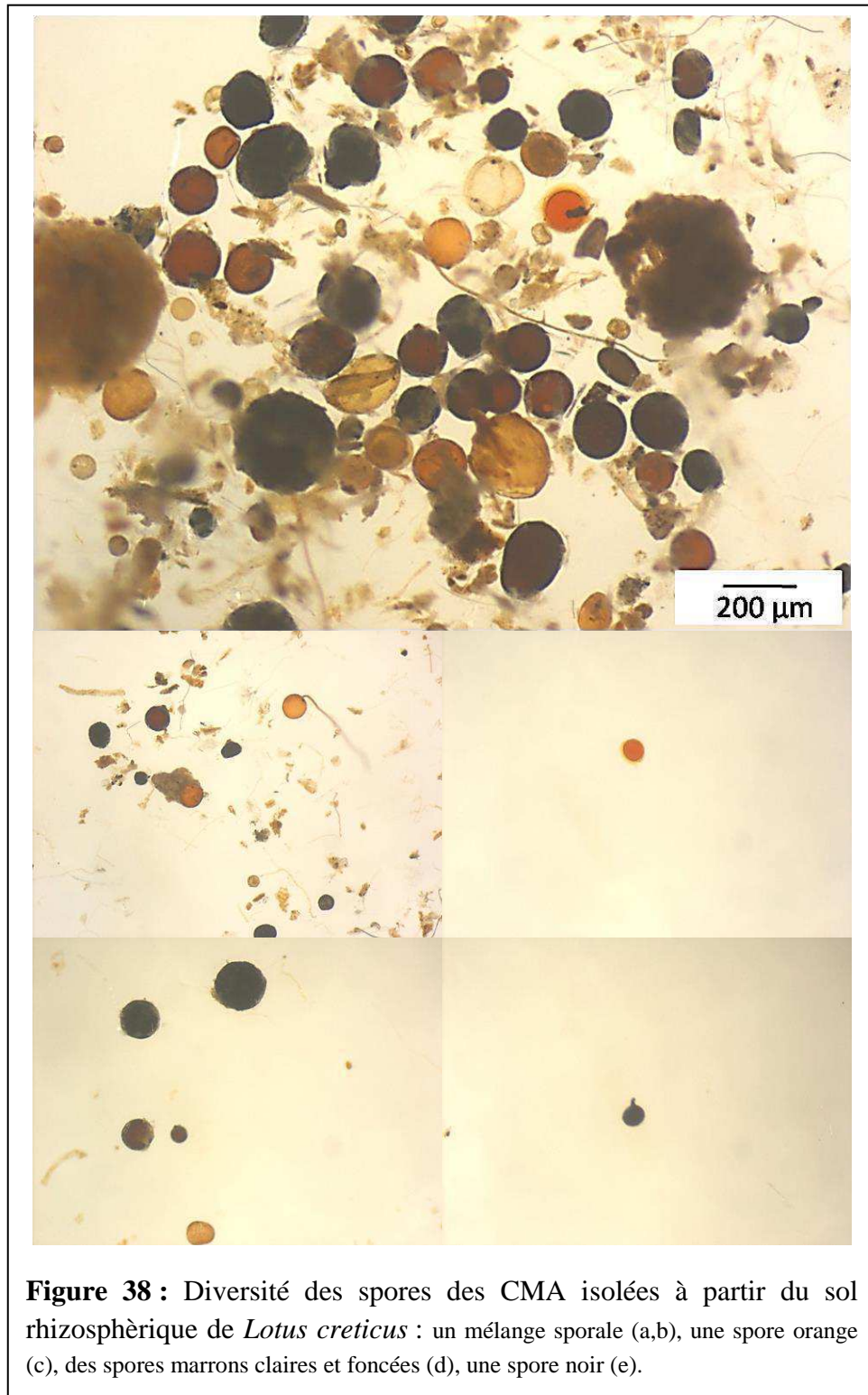


Figure 38 : Diversité des spores des CMA isolées à partir du sol rhizosphérique de *Lotus creticus* : un mélange sporale (a,b), une spore orange (c), des spores marrons claires et foncées (d), une spore noir (e).

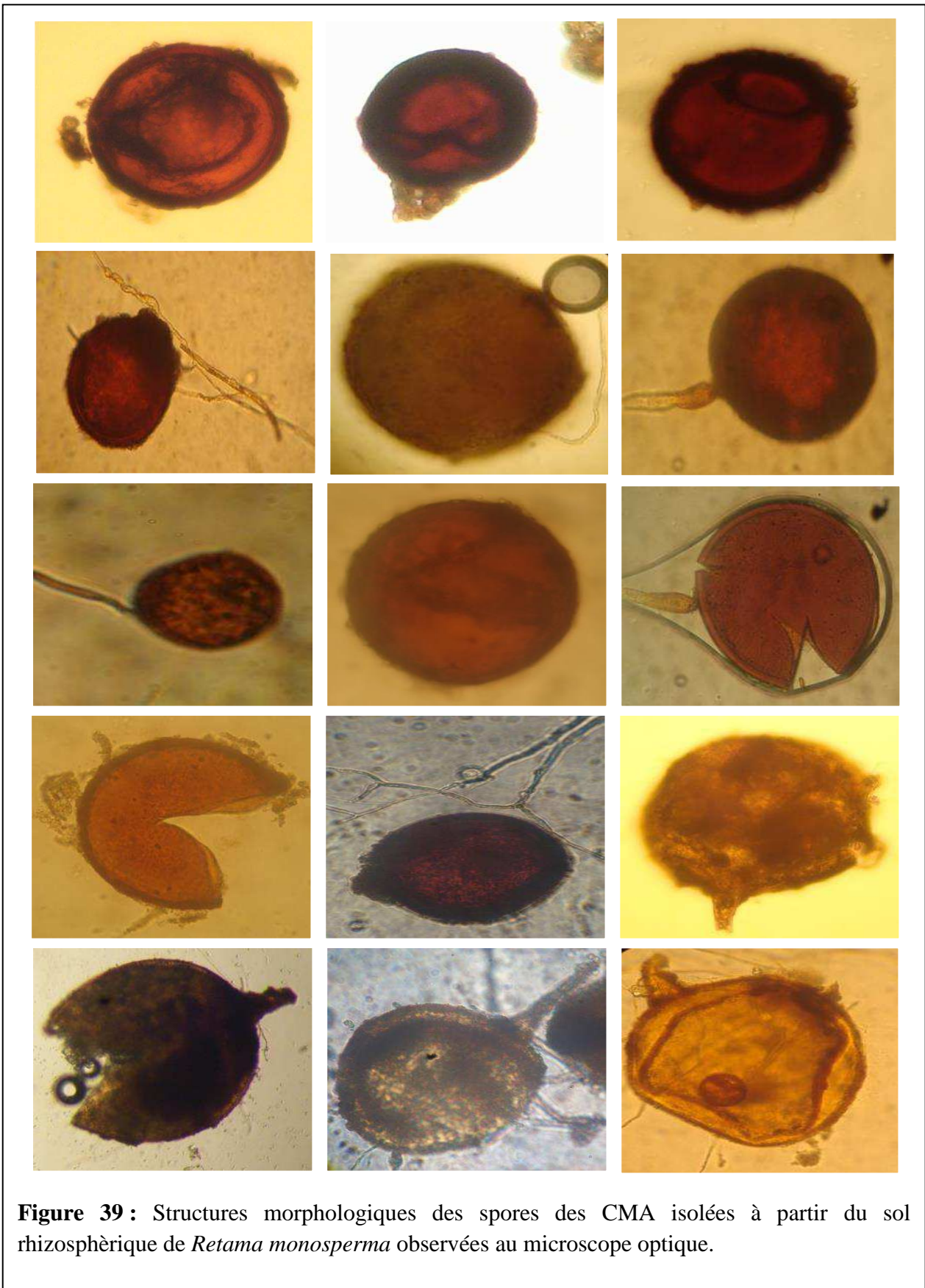


Figure 39 : Structures morphologiques des spores des CMA isolées à partir du sol rhizosphérique de *Retama monosperma* observées au microscope optique.



Figure 40 : Structures morphologiques des spores des CMA isolées à partir du sol rhizosphérique de *Juniperus oxycedrus* observées au microscope optique.

3.6.2. Diversité spécifique des spores MA

L'observation des spores traitées par le PVLG et le réactif de Melzer permet d'examiner des structures caractéristiques (hyphes suspenseurs, saccule, membranes) (**Fig. 41, 42, 43, 44, 45**). La présence de ces détails structuraux sur certaines spores permet de les classer en genre et même en espèce. Il est alors probable que ces spores appartiennent aux quatre genres (*Glomus*, *Scutellospora*, *Gigaspora* et *Acaulospora*) et trois familles (Glomaceae, Gigasporaceae, Acaulosporaceae).

- ***Glomus* « Tulasne and Tulasne (1845) »**

Les spores du genre *Glomus* sont le plus souvent en grappes (sporocarpe) et quelquefois solitaires. La présence de l'hyphe suspenseur qui relie la spore au mycélium est un élément caractéristique de ce genre (**Fig. 41**). C'est le genre le plus dominant chez toutes les espèces végétales étudiées. *Glomus* est observé parmi les spores de couleur noire, marron clair et foncé, hyaline et orange.

- ***Gigaspora* « Gerdemann et Trappe (1973) »**

Les spores du genre *Gigaspora*, dites « giant spore » selon l'étymologie du mot, sont des spores de grand diamètre. Ce sont des spores solitaires et l'hyphe suspenseur présente la morphologie de bulbe. Dans ce genre, les spores ne comportent aucune membrane interne flexible. Les tubes de germination formés sur la couche germinale sont rarement séparés de la membrane laminée. Toutes les espèces produisent des spores sans ornementation. Ce genre a été observé chez les spores de couleur crème à jaunâtre dont l'espèce *Gigaspora margarita* (**Fig.41**).

- ***Gigaspora margarita* Becker et Hall (1976)**

Spores solitaires, sphériques (240-400 μm), hyalines à l'état jeunes, d'apparence laiteuse et lisse au microscope stéréoscopique, jaunâtres avec la maturité, au contenu d'apparence granuleuse, formé de gouttelettes lipidiques, paroi 8-15 μm d'épaisseur, unique, hyaline, lisse. Hyphe suspenseur unique, bulbeux, généralement persistant, plus foncé que la spore de 23-34 μm de diamètre, souvent fermé d'une cloison à 20-30 μm de bulbe.

- ***Scutellospora* Walker et Sanders (1986)**

Les spores produites par les champignons appartenant à ce genre renferment toujours deux ou plusieurs membranes internes flexibles. Ces spores montrent une diversification en nombre et en type de membranes internes. La spore peut renfermer des couches membranaires de différentes épaisseurs: une couche coriace et une couche amorphe. La membrane interne

produit souvent une réaction de couleur rouge pourpre foncé en présence du Melzer. La germination des spores prend naissance sur le tube de germination à partir de la boucle de germination, de forme variable. Les cellules auxiliaires sont de types 'Knobby' et ont une surface lisse. Le genre *scutellospora* est observé parmi les spores grosses de couleur marron clair (Fig. 41).

- *Acaulospora* Gerdemann et Trappe (1973) emend. Berch (1985)

Ce sont des spores solitaires, sessiles ou quelques fois reliées à leurs saccules sporifères qui est une structure à paroi mince formée par le gonflement apical d'un hyphe. Les spores se différencient latéralement à l'hyphe porteur de saccule. Les spores de couleur marron et marron à contour foncé caractérisées par le saccule correspondent au genre *Acaulospora* (Fig. 41).

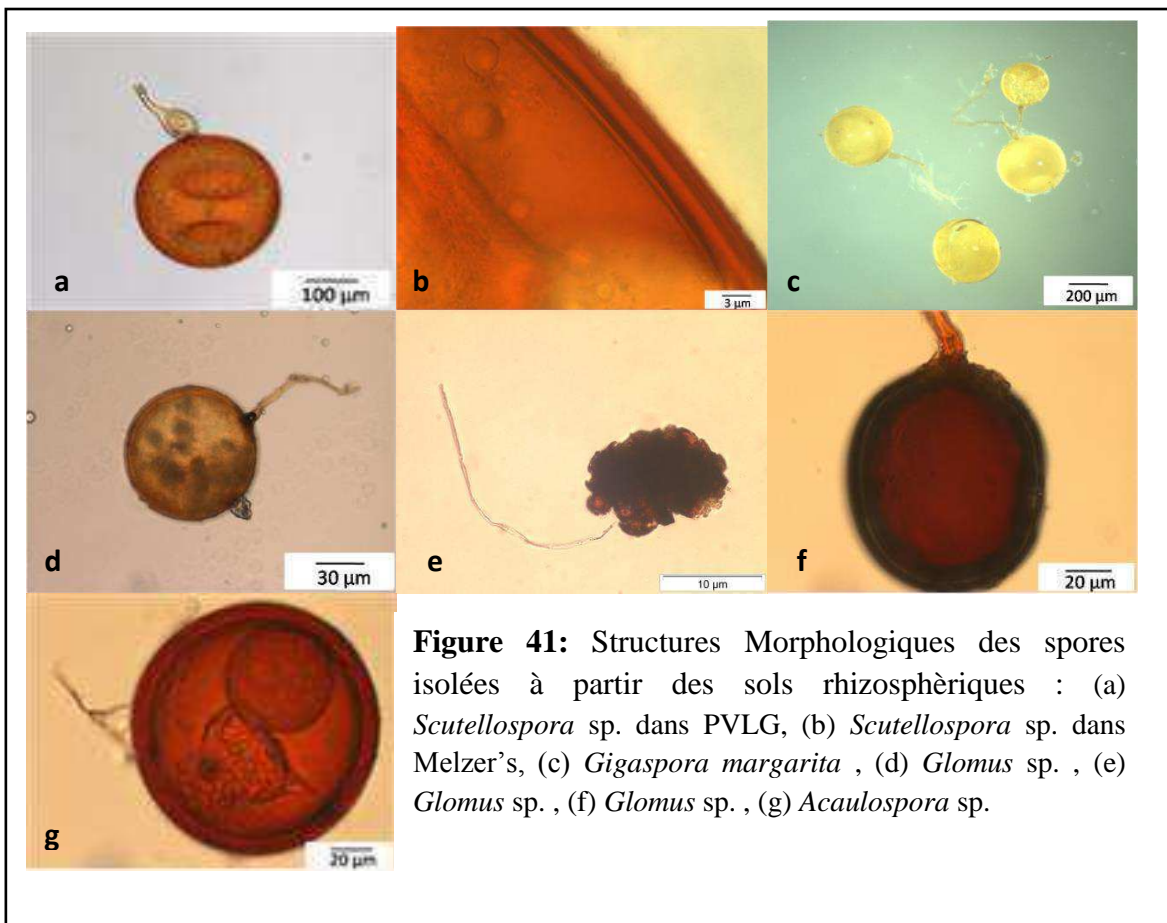


Figure 41: Structures Morphologiques des spores isolées à partir des sols rhizosphériques : (a) *Scutellospora* sp. dans PVLG, (b) *Scutellospora* sp. dans Melzer's, (c) *Gigaspora margarita* , (d) *Glomus* sp. , (e) *Glomus* sp. , (f) *Glomus* sp. , (g) *Acaulospora* sp.

L'indice de diversité de Shannon H et l'indice d'équitabilité E de Pielou sont des paramètres qui nous renseignent sur la diversité des CMA (**Tab. 15**). L'indice de diversité varie de 2,02 à 2,28 et suit le gradient *L. Creticus* > *R. monosperma* > *A. saligna* > *P. lentiscus* > *J. oxycedrus*. L'indice de l'équitabilité varie de 0,43 à 0,53 et suit le gradient *L. creticus* > *A. saligna* > *P. lentiscus* > *R. monosperma* > *J. oxycedrus*.

Tableau 15: Indice de diversité de Shannon et Wiener et Indice d'équitabilité de Pielou des différentes espèces végétales sur la base du comptage des spores.

Espèces	H (SHANNON)	E (PIELOU)
<i>Acacia saligna</i>	2,10	0,50
<i>Retama monosperma</i>	2,17	0,45
<i>Lotus creticus</i>	2,28	0,53
<i>Pistacia lentiscus</i>	2,05	0,47
<i>Juniperus oxycedrus</i>	2,02	0,43



Figure 42: Structures morphologiques des spores des CMA isolées à partir du sol rhizosphérique d'*Acacia saligna* observées au microscope optique dans du Polyvinillacto-glycerol (PVLG).

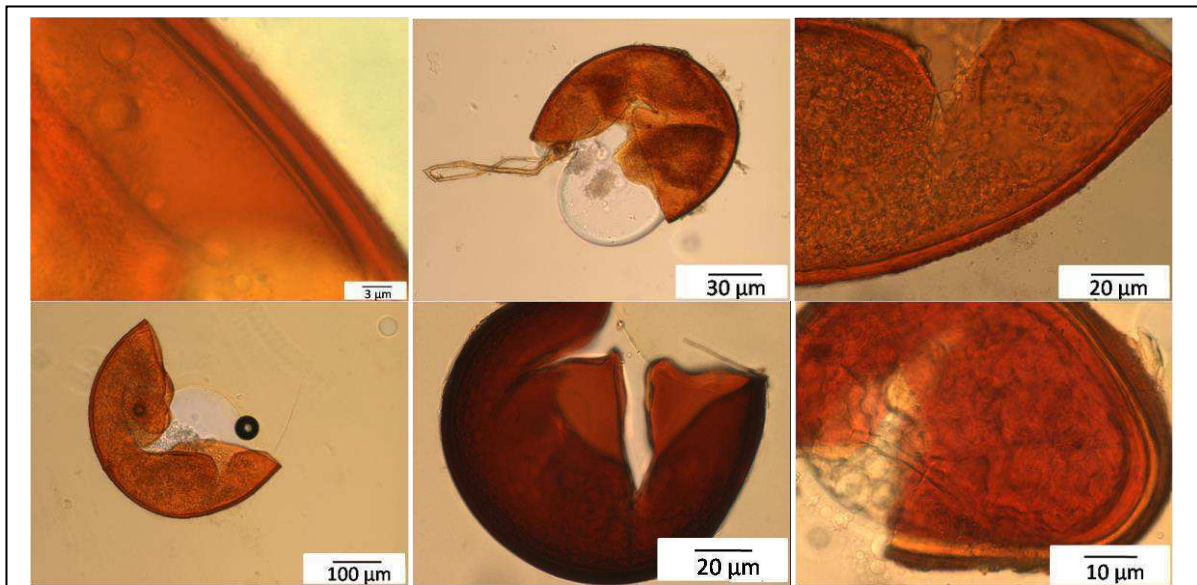


Figure 43: Structures morphologiques des spores des CMA isolées à partir du sol rhizosphérique d'*Acacia saligna* observées au microscope optique dans du PVLG + Melzer.

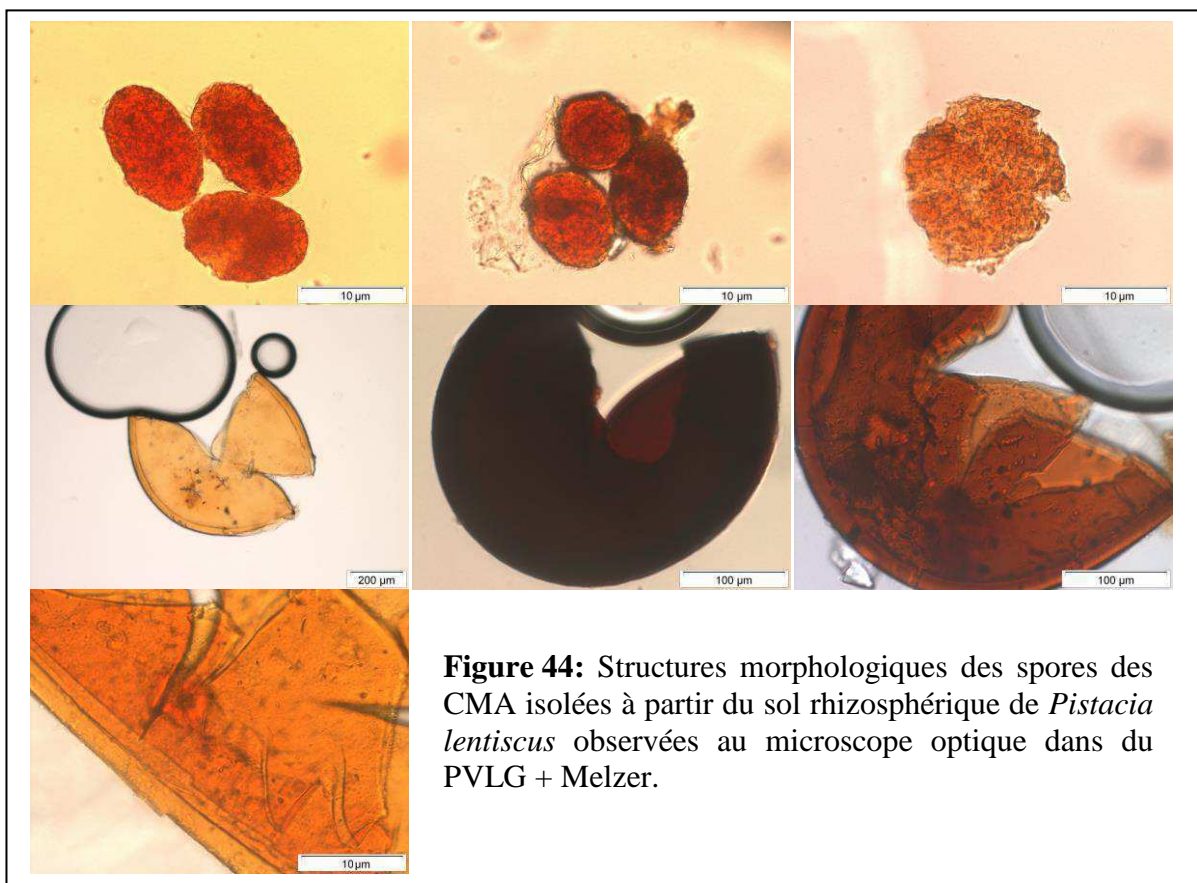


Figure 44: Structures morphologiques des spores des CMA isolées à partir du sol rhizosphérique de *Pistacia lentiscus* observées au microscope optique dans du PVLG + Melzer.

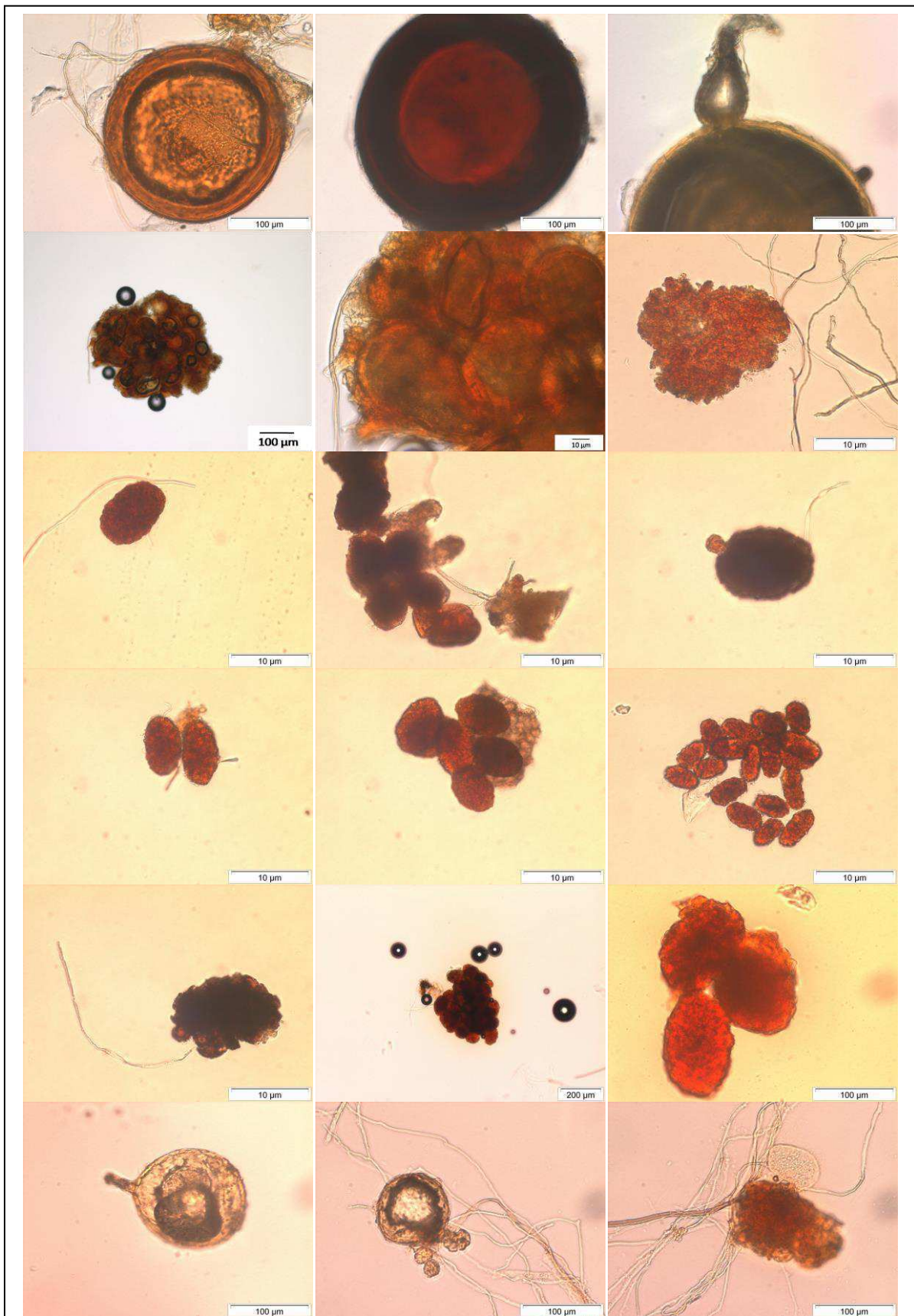


Figure 45: Structures morphologiques des spores des CMA isolées à partir du sol rhizosphérique de *Pistacia lentiscus* observées au microscope optique dans du Polyvinillacto-glycerol (PVLG)

3.7. Corrélation entre la densité des spores, colonisation racinaire et la fertilité des sols

Le **tableau 16** présente les corrélations entre la densité des spores, l'intensité de mycorhization (M %) et la fertilité des sols en azote total (N), phosphore total (P) et la matière organique (MO). Le coefficient de corrélation de Pearson est noté r .

Il existe une corrélation négative entre la densité des spores et la teneur en P et entre la densité des spores et M %.

Tableau 16: Coefficient de corrélation de Pearson (r) entre la densité des spores et l'intensité de mycorhization et la fertilité des sols.

Coefficient de corrélation de Pearson (r)	Matière organique %	Azote total %	Phosphore total %	Intensité de mycorhization (M %)	Nombre des unités de PIM ₅₀
Nombre de spore	-0,281	-0,091	-0,551	-0,570	-0,566
Intensité de mycorhization (M %)	0,107	0,261	0,262	1	0,290

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$

3.8. Identification génotypique

3.8.1. Extraction et dosage de l'ADN

La qualité d'ADN est contrôlée sur gel agarose. La visualisation des gels sous la lumière UV a permis d'observer des bandes d'ADN chez tous les échantillons (**Fig. 46**). Les échantillons de l'ADN dosés (**Tab. 17**) sont dilués avec l'eau ultra pure « Mili Q » afin d'obtenir un échantillon représentatif de chaque traitement de 3 ng/ μ l.

Tableau 17 : Les concentrations des échantillons d'ADN racinaire des espèces végétales d'intérêt.

ADN racinaire	<i>A. saligna</i>	<i>R. monosperma</i>	<i>P. lentiscus</i>	<i>L. creticus</i>	<i>J. oxycedrus</i>
Concentration (ng/ μ l)	27,3	72,5	59,6	55	81,8

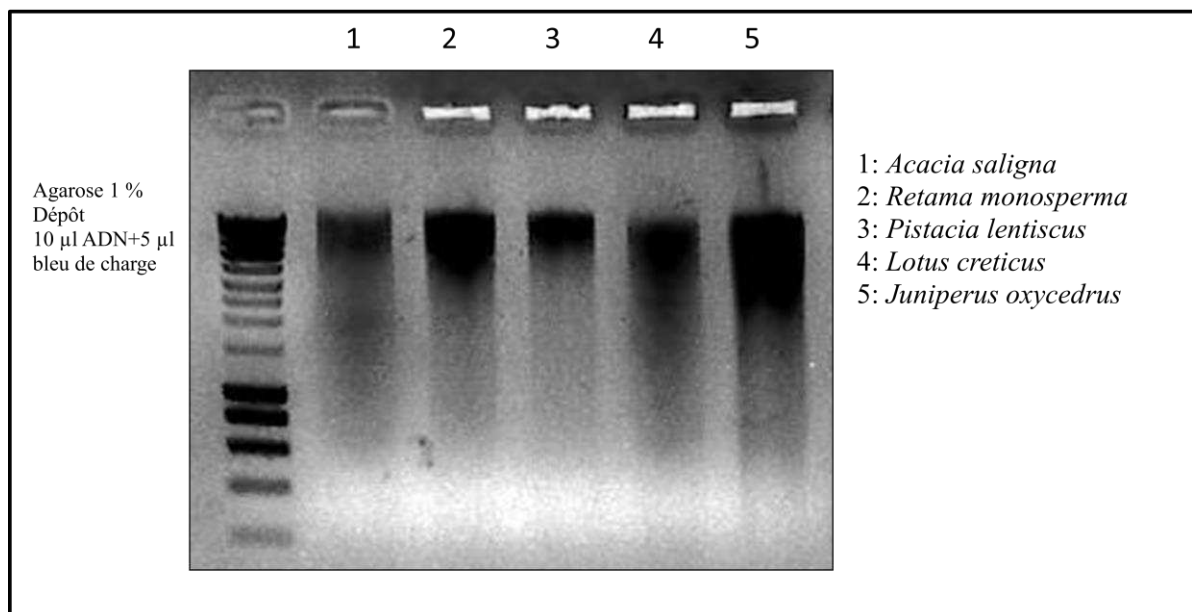


Figure 46: Electrophorèse d'ADN des racines des espèces végétales *in situ*

3.8.2. Amplification « PCR-nested » du fragment ADNr 18S

La PCR step 1 réalisée avec les amorces NS1/NS4 a permis d'amplifier un fragment d'environ 1150 pb seulement à partir des trois échantillons d'ADN racinaires qui correspondent aux espèces végétales *A. saligna*, *L. creticus* et *J. oxycedrus* (**Fig. 47**). En supposant que ces résultats sont dus à la faible concentration d'ADN des échantillons non amplifiés. Alors dans la PCR step 2 *template* PCR step 1 est dilué 20 fois pour les échantillons qui ont été bien amplifié et *template* PCR step 1 est laissé brute pour les échantillons qui n'ont pas été amplifié. Deux amplifications step 2 sont réalisées avec deux couples d'amorces différents.

La Première PCR step 2 réalisée avec le couple d'amorces AML1/AML2 seulement à partir des trois échantillons d'ADN racinaires correspondant aux espèces végétales d'*A. saligna*, *L. creticus* et *J. oxycedrus* (**Fig. 47**). La deuxième PCR step 2 réalisée avec le couples amorces NS31/AML2 a permis également d'amplifier un fragment d'environ 550 pb à partir de tout les échantillons des produits PCR step 1 (**Fig. 48**).

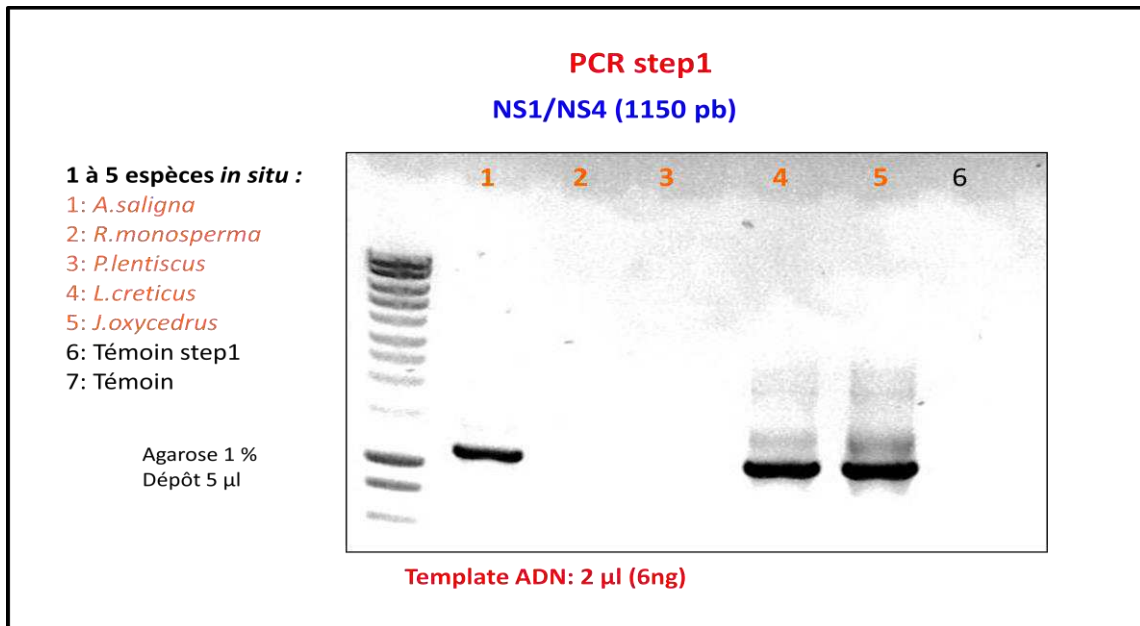


Figure 47: Amplification du Fragment ADNr 18S (PCR step1).

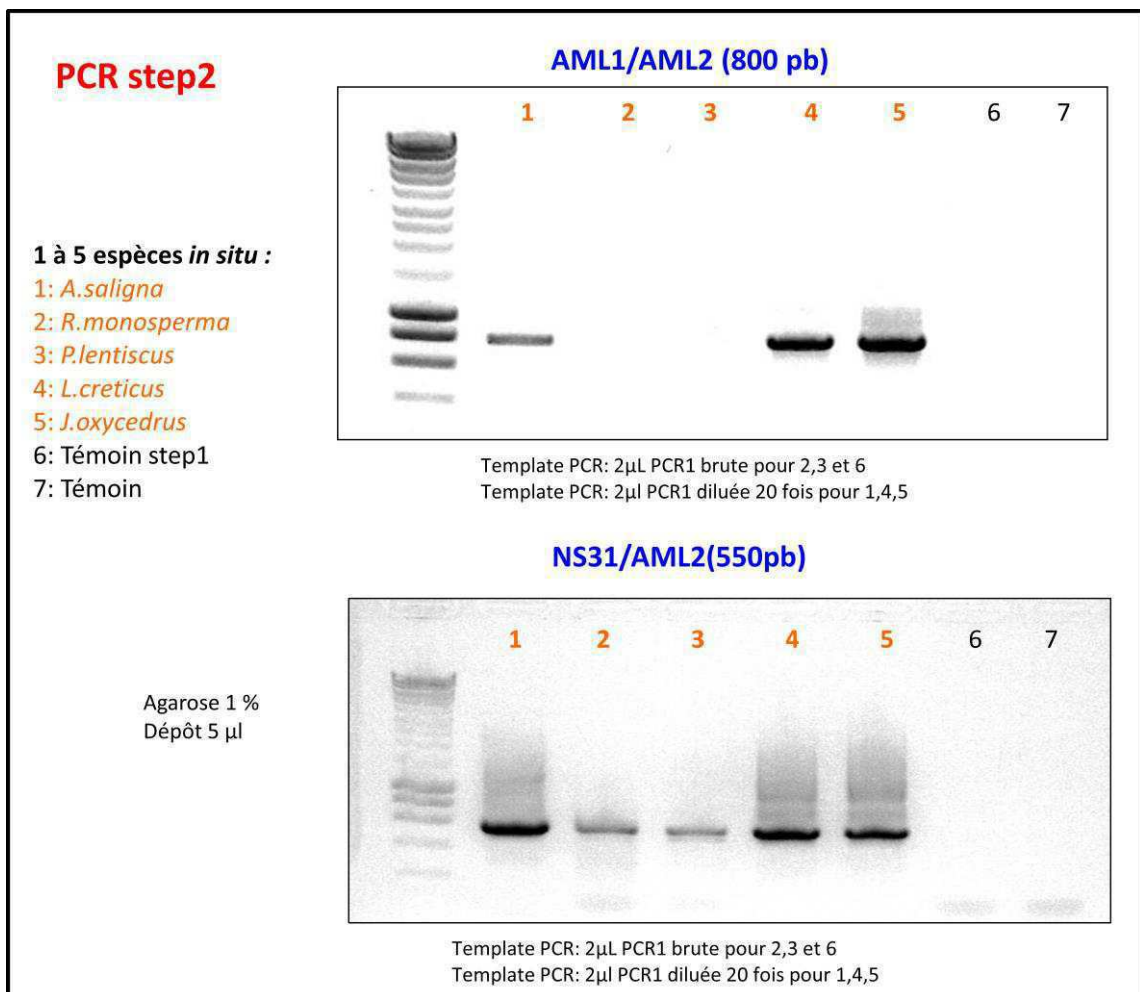


Figure 48: Amplification du Fragment ADNr 18S (PCR step2).

3.8.3. Amplification « PCR-nested » du fragment ADNr 25S

La PCR step 1 réalisée avec le couple d'amorces LR1/NDL22 a permis d'amplifier un fragment d'environ 780 pb à partir de tous les échantillons d'ADN racinaires des espèces végétales (**Fig. 49**).

En l'occurrence tous les produits PCR step 1 sont dilués 20 fois pour les utiliser comme *template* dans les deux PCR step 2. La Première PCR step 2 réalisée avec le couple d'amorces 28G1/28G2 a amplifié un fragment d'environ 580 pb à partir de tout les échantillons de PCR step 1 dilué, sauf pour un échantillon, où l'amplification a révélé deux bandes. La première bande se situe à environ de 580 pb et la deuxième un peu moins de cette taille (**Fig. 50**).

La deuxième PCR step 2 réalisée avec le couple d'amorces LR1/FLR4 a permis également d'amplifier un fragment d'environ 750 pb à partir de quatre échantillons du produit PCR step 1 qui correspond aux espèces végétales d'*A. saligna*, *L. creticus*, *R. monosperma* et *P. lentiscus* et elle a permis d'amplifier deux fragments d'environ 750 pb à partir de l'échantillon qui correspond à l'espèce végétale *J. oxycedrus* (**Fig. 50**).

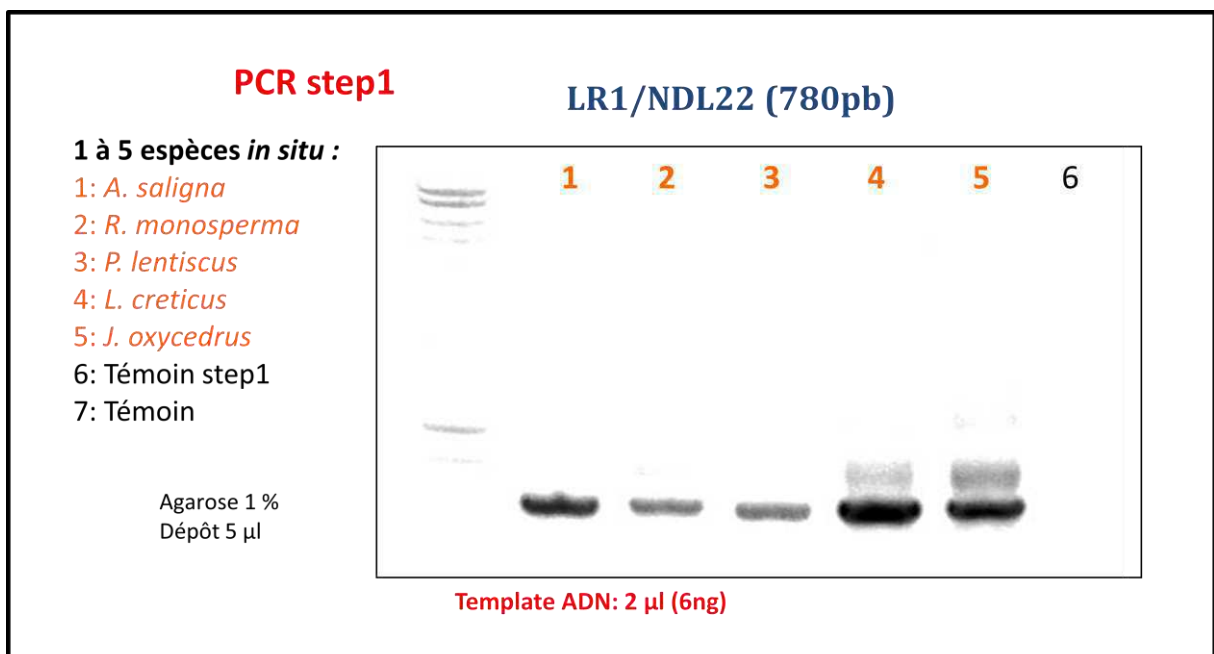


Figure 49: Amplification du Fragment ADNr 25S (PCR step1).

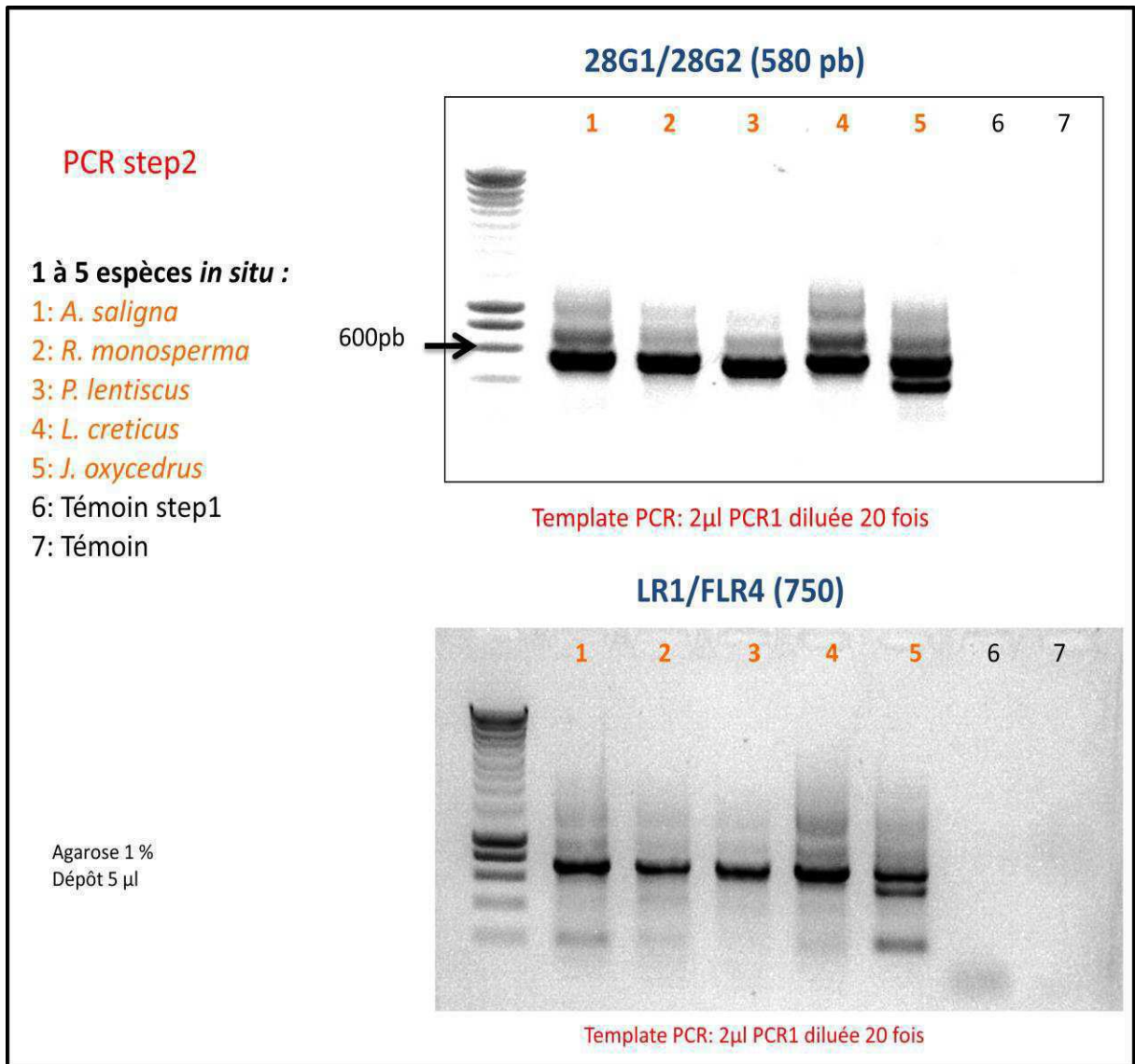


Figure 50: Amplification du Fragment ADNr 25S (PCR step2).

3.8.4. Clonage de l'ADN fongique

Après une analyse des résultats des nested PCR, les produits PCR step 2 du fragment ADNr 25S amplifiés par les amorces 28G1/28G2 (580pb) sont choisis pour le clonage. Ces produits PCR sont purifiés pour obtenir des fragments d'ADN fongique qui sont par la suite insérés dans des plasmides bactériens grâce à la technique de ligation et ensuite la transformation bactérienne qui permet d'insérer les plasmides dans des bactéries thermo-compétentes.

Après l'incubation des boîtes de Pétri (une nuit à 37 °C), des colonies blanches, lisses et brillantes dues au clonage et des colonies bleues apparaissent (**Fig. 51**). En effet, les colonies se développent et résistent à l'antibiotique ce qui signifie que le gène de résistance a bien été intégré par les bactéries. De plus, les colonies blanches signifient qu'il n'y a pas eu synthèse de β -galactosidase pour réagir avec le X-gal : l'insert s'est bien fixé au niveau de l'opéron lactose, ce qui empêche la lecture du gène codant pour la β -galactosidase. En revanche, les colonies bleues signifient que l'insert n'a pas été inséré dans la bactérie.

Les colonies blanches (clones positifs) (**Fig. 51**) sont ensemencées sur une microplaque de 96 puits-PCR (conique) remplis avec de l'eau ultra pure autoclavée. L'ADN plasmidique extrait à partir de ces bactéries est amplifié par PCR en utilisant les amorces M13 forward et M13 reverse. Les amplicons positifs (**Fig. 52, 53**) sont envoyés au séquençage.

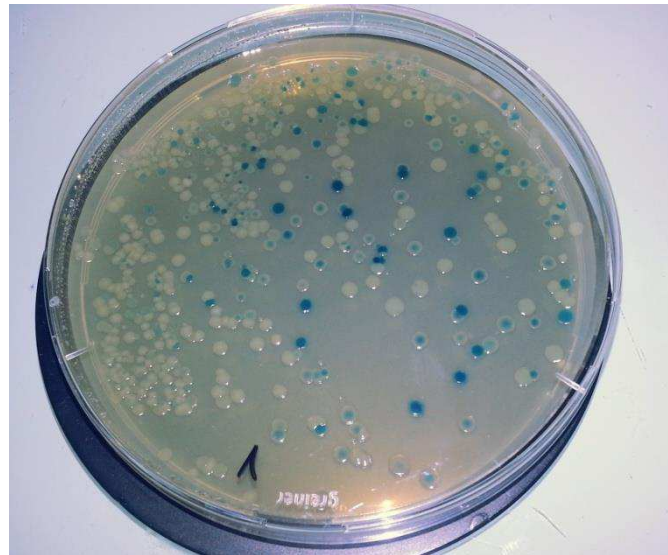


Figure 51: Des colonies blanches et des colonies bleues sur le milieu LB_{Amp} / Xgal / IPTG.

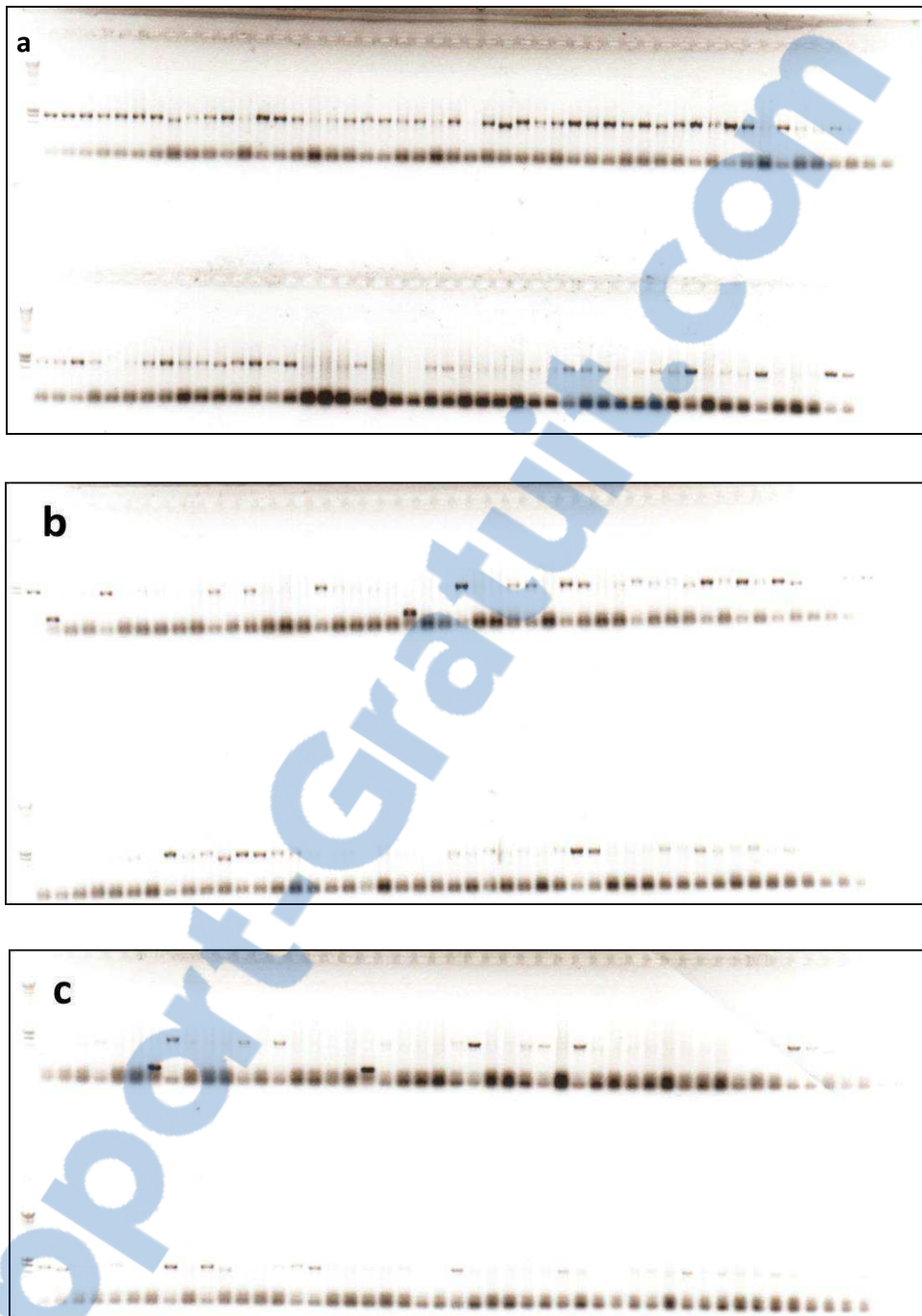


Figure 52: Amplification du fragment « insert » par les amorces (M13f/M13r) chez les espèces végétales *in situ*: (a) *Acacia saligna*, (b,c) *Retama monosperma*.

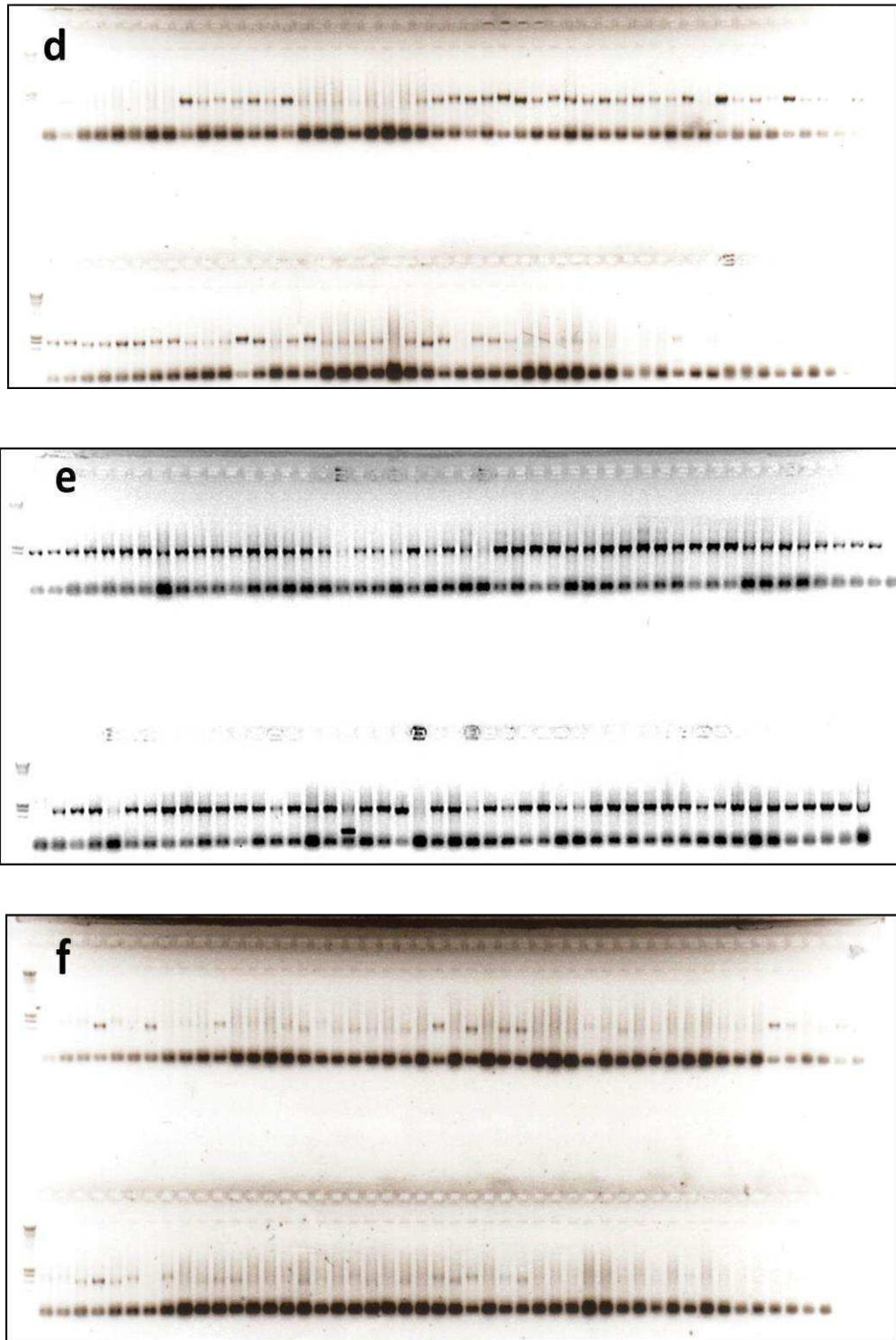


Figure 53: Amplification du fragment « insert » par les amorces (M13f/M13r) chez les espèces végétales *in situ*: (d) *Pistacia lentiscus*, (e) *Lotus creicus*, (f) *Juniperus oxycedrus*.

4. Discussion

La surexploitation des sables côtiers comme le cas de la sablière de Terga bouleverse l'écosystème côtier et renforce la dégradation du sol. Les sols des sites perturbés sont souvent faibles en nutriments et pauvres en bactéries fixatrices d'azote et champignons mycorhiziens habituellement associés aux racines rhizosphériques (Cooke et Lefor, 1990). Les espèces végétales méditerranéennes ont développé différentes stratégies afin de se développer sur des sols peu évolués avec une faible disponibilité en nutriments et en eau.

Les symbioses mycorhiziennes sont un outil prometteur pour améliorer le succès de la restauration dans les zones dégradées semi-arides (Duponnois *et al.*, 2001; Azcón-Aguilar *et al.*, 2003 ; Ouahmane *et al.*, 2006 a,b). Il est universellement reconnu que les champignons mycorhiziens contribuent efficacement à l'établissement et au maintien des espèces végétales dans des conditions écologiques très contraignantes (Le Tacon *et al.*, 1987), en particulier dans les écosystèmes semi-arides (Carpenter et Allen, 1988).

Peu de pays disposent d'inventaires forestiers nationaux. En Algérie, le seul inventaire remonte à 1982, les enquêtes plus récentes ont commencé à l'actualiser. La région méditerranéenne représente un des réservoirs essentiels à la biodiversité de la planète. Ainsi la flore méditerranéenne renferme 25 000 espèces de végétaux supérieurs, soit 10 % des espèces connues sur terre (la région méditerranéenne représentant 1,6 % des continents émergés). Boydak *et al.* (1997) ont cité les principaux types de végétation et quelques espèces ligneuses importantes du paysage méditerranéen. Les espèces végétales recensées dans la sablière de Terga font partie des éléments importants du maquis présents spontanément dans les régions forestières méditerranéennes.

Les spécificités géographiques de la région en font l'une des régions biogéographiques les plus originales du monde du point de vue de la biodiversité, mais aussi l'une des plus menacées. D'une manière générale, et en raison des contraintes hydriques, les espèces sempervirentes (à feuilles persistantes) y sont plus abondantes que les espèces décidues (à feuilles caduques), et les formations végétales sont caractérisées par la dominance d'arbres et de buissons ligneux avec de petites feuilles sclérophylles. La sempervirence et la sclérophyllie sont des attributs qui favorisent l'installation et le développement des espèces végétales dans les milieux arides, en limitant les processus d'évapotranspiration et en optimisant les processus de conservation de l'eau. Néanmoins, la sclérophyllie ne serait pas une adaptation propre aux espèces végétales

méditerranéennes, mais serait un héritage phylogénétique antérieur à la mise en place du climat méditerranéen au Pliocène (Herrera, 1992), qui se retrouve chez certaines formations végétales non méditerranéennes (Specht, 1979 ; Killick 1979 ; Verdù *et al.*, 2003).

Les caractéristiques physiologiques et fonctionnelles de la végétation des écosystèmes forestiers méditerranéens sont indissociables des contraintes climatiques. Les impacts directs du climat méditerranéen sur la végétation résultent essentiellement d'un double stress hydrique et thermique : d'une part, les sécheresses estivales limitent la disponibilité en eau, et d'autre part, les conditions hivernales freinent la croissance lorsque les disponibilités en eau ne sont plus limitantes (Rundel, 1995). La conjonction de ces deux situations limite la saison la plus favorable pour le fonctionnement et la croissance de la végétation à de courtes périodes au printemps et en automne, lorsque les précipitations sont les plus intenses. Le principal facteur de contrôle de ces écosystèmes est ainsi la disponibilité en eau, qui varie grandement dans le temps et l'espace (Joffre *et al.*, 2007).

Les sols sablonneux, comme le sont les sols du site d'étude, présentent une très faible capacité de rétention d'eau et une très forte perméabilité, ce qui ne favorise qu'un faible développement du couvert épigé (Kooijman *et al.*, 2005). À l'opposé, l'accroissement des concentrations de matière organique favorise la formation d'agrégats stables qui limitent l'érosion des sols et augmentent leur capacité de rétention en eau (Barthes et Roose, 2002).

Les sols des régions méditerranéennes sont en général peu profonds et manifestent un rapport étroit avec la roche mère dont ils proviennent (Zinke, 1973). Les sols du bassin méditerranéen, reposant principalement sur des substrats calcaires, ont un développement principalement contraint par le climat et les périodes de sécheresse estivale (Sardans et Penuelas, 2013). Ils sont caractérisés par une fertilité relativement faible en comparaison des sols des autres écosystèmes, liée à leur pauvreté en nutriments, à leur faible degré d'évolution, ainsi qu'à leur faible ressource en eau (Yaalon, 1997).

Les sols méditerranéens présentent en outre des index d'humification relativement faibles par rapport à des sols continentaux ou alpins (Simon *et al.*, 1994), en raison des faibles activités microbiennes et de la faible productivité végétale en saison estivale. L'azote et le phosphore sont en général limitants pour le fonctionnement des écosystèmes (Mayor et Roda, 1994 ; Sardans et Penuelas, 2013), en particulier dans les sols calcaires. Ils immobilisent en effet les phosphates en raison de leur précipitation avec le Ca^{2+} (Carreira et Latjha, 1997), ce qui accroît

le déficit en phosphore. Les faibles teneur et disponibilité en nutriments des sols méditerranéens se surimposent ainsi à leur xéricité (Specht, 1973 ; Carreira *et al.*, 1991).

Les champignons mycorhiziens à arbuscules ont une distribution géographique très large (Öpik *et al.*, 2006) et une présence quasi générale dans le règne végétal (Trappe, 1987). Les CMA sont présents dans la couche superficielle du sol où ils existent sous forme de spores et d'hyphes associés à la matrice du sol (Allen, 1991; Dalpé, 1992). Leur nombre diminue remarquablement au-delà de cette profondeur du fait de la raréfaction des racines (Bagyaraj, 1991; Smith et Smith, 1997).

Les CMA sont rencontrés chez les plantes terrestres des régions tropicales, tempérées, arctiques (Hayman, 1982), dans des milieux désertiques, humides, salés, arides et semi-arides (Strullu, 1991 ; Tao et Zhiwei, 2005) ou métallifères et même chez certaines plantes aquatiques (Bagyaraj, 1991). Différents travaux ont montré que la plupart des espèces végétales du milieu méditerranéen semi-aride (Requena *et al.*, 1996 ; Ferrol *et al.*, 2004; Maremmanni *et al.*, 2003) et des sols maritimes (Nicolson et Johnston, 1979 ; Koske et Gemma, 1997) sont mycorhizées. Dans l'écosystème de Terga, La présence de champignons endomycorhiziens arbusculaires est détectée dans les racines de toutes les espèces végétales étudiées (*A. saligna*, *L. creticus*, *R. monosperma*, *P. lentiscus* et *J. oxycedrus*). Ces associations symbiotiques sont affirmées par d'autres recherches (Reddell et Warren 1987 ; Ducouso et Thoen, 1991 ; Ferrol *et al.*, 2004 ; Caravaca *et al.*, 2006 ; Alguacil *et al.*, 2006; Hatimi et Tahrouch, 2007 ;Escaray *et al.*, 2010).

La plupart des légumineuses herbacées forment des relations symbiotiques avec les champignons MA (Zaidi *et al.*, 2003). *L. creticus*, une légumineuse herbacée dominante dans la dune de Terga, présente des racines fortement mycorhizées. Une forte colonisation MA a été observée chez cette espèce dominante en Espagne, dans une dune revégétalisée du littoral méditerranéen espagnol (Escaray *et al.*, 2010 ; Escaray *et al.*, 2012) et à Valence (Camprubí *et al.*, 2010). Il en est de même pour *R. monosperma* caractérisée comme une légumineuse mycotrophe (Hatimi et Tahrouch ; 2007). Par ailleurs, les Papilionoideae sont généralement colonisées par des CMA (Vasconcelos *et al.*, 1984; Grove et Le Tacon, 1993) et les Mimosoideae sont soit endomycorhiziennes arbusculaires (MA) ou ectomycorhiziennes (Grove et Le Tacon, 1993).

Les racines d'*A. saligna* prélevées de Terga sont également mycorhizées avec un taux de colonisation endomycorhizienne élevé. Ducouso et Thoen (1991) ont étudié le statut mycorhizien de 48 espèces d'*Acacia* dont *A. saligna* qui présente une association symbiotique

endomycorhizienne. *In vitro*, des plants d'*A. saligna* inoculés par des CMA ont un effet bénéfique sur la croissance (Reddell et Warren, 1987 ; Nasr et Diem, 1987).

Les mêmes observations pour *P. lentiscus* provenant de Terga dont les racines sont fortement mycorhizées. Ce phénomène est rapporté dans le cas de *P. lentiscus* par Caravaca *et al.* (2003) et Ferrol *et al.* (2004) et forme des endomycorhizes de *type Paris* (Ferrol *et al.*, 2004). Ce *type* est communément trouvé dans les écosystèmes méditerranéens (Bedini *et al.*, 2000). *J. oxycedrus*, comme les autres espèces étudiées est également associée au CMA (Caravaca *et al.*, 2006 ; Alguacil *et al.*, 2006).

L'intensité de mycorhization MA est importante et variable chez les espèces végétales analysées. Ces résultats sont similaires avec ceux rapportés par Requena *et al.* (1996) dans le sud d'Espagne. L'efficacité de la colonisation AM dépend des caractéristiques chimiques du sol (Pons et Gianinazzi-Pearson, 1984) concernant surtout le phosphore, le potassium, l'azote et le pH. Selon ces auteurs, les fortes concentrations de phosphore et le pH acide inhibent la germination de certaines espèces de spores alors que l'azote sous la forme de KNO_3 n'a aucun effet inhibiteur. Comparativement aux résultats de ces auteurs, les teneurs en phosphore des sols étudiés restent généralement faibles et le pH alcalin, ce qui pourrait être la cause d'une relative forte intensité de mycorhization.

Les différences notées dans la colonisation des racines indiquent que les espèces végétales étudiées dans les dunes de sable du littoral méditerranéen de Terga sont mycorhizées indépendamment du niveau de perturbation de leur substrat. Selon Diagne et Ingleby (2003), La colonisation ne dépend ni du climat, ni des formations végétales mais diminue avec les perturbations du sol.

Li et Zhao (2005) ont montré que la colonisation par des champignons mycorhiziens à arbuscules ainsi que l'abondance mycorhizienne de spores fongiques dans une région aride du sud-ouest de la Chine sont importantes. Sur 62 plantes représentant 33 familles, 100% des plantes étudiées étaient mycorhizées. Des situations similaires ont été observées dans d'autres écosystèmes influencés par la sécheresse (Mukerji et Kapoor, 1986; Stutz *et al.*, 2000). En revanche, dans la forêt tropicale humide de Xishuangbanna, sud-ouest de la Chine, des CMA sont détectés chez seulement 56% des plantes étudiées (Zhao *et al.*, 2001). Tawarayama *et al.* (2003) ont également constaté que 77 % des arbres cultivés en forêts de marécages tourbeux de Kalimantan centrale, en Indonésie sont mycorhizés. La comparaison des taux de colonisation

MA et l'intensité de l'infection dans les racines de ces différents écosystèmes suggère que les plantes cultivées dans les habitats semi-arides et arides seraient plus dépendantes au CMA.

Malgré les conditions défavorables, les sols dunaires peuvent abriter une microflore bactérienne et fongique riche et variée (Hatimi et Tahrouch 2007). Malgré l'absence totale de végétation dans le site exploité de Terga, pauvre en éléments nutritifs et en eau, des spores sont détectées. La densité de spores est connue pour sa variation considérable dans les différents écosystèmes. Les valeurs vont de quelques dizaines à 10.000 spores par 100 g de sol (Frioni *et al.*, 1999; Zhao et Li, 2005; Abbas *et al.*, 2006; Camprubí *et al.*, 2010).

Les densités des spores estimées dans les sols rhizosphériques à Terga peuvent être considérées relativement élevée comparées aux densités enregistrées dans des dunes littorales semi-arides (Hatimi et Tahrouch 2007; Camprubí *et al.*, 2010), mais restent relativement faibles comparées à celles enregistrées dans d'autres sols semi-arides (Ouahmane *et al.*, 2006b; Abbas *et al.*, 2006).

Les sols sablonneux sont pauvres en spores par rapport aux autres textures de sol. Cette diminution est liée en grande partie à la faible teneur en matière organique (Camprubí *et al.*, 2010) et parce qu'ils sont peu favorables à la formation des endomycorhizes, tandis que les sols riches en colloïdes la favorisent (Brundrett, 1991).

La densité de spores dans les sols rhizosphériques de *R. monosperma* et *J. oxycedrus* est nettement supérieure à la densité des spores dans les sols rhizosphériques d'*A. saligna*, *L. creticus* et *P. lentiscus*. Nicolson (1960) rapporte que les facteurs qui affectent la distribution des champignons MA dans les dunes de sable sont: l'espèce végétale, le degré de stabilité des dunes, la quantité de matière organique dans le sable et l'activité microbologique.

La perturbation du sol semble affecter la production des spores dans ces dunes. En effet *R. monosperma* et *J. oxycedrus* se situent dans une dune fixée protégée du vent et caractérisée par la présence d'un couvert végétal plus dense alors que les autres espèces colonisent des dunes soumises à de fortes perturbations climatiques et où le couvert végétal est moins important. Les résultats obtenus montrent que le comportement des CMA est différent dans les systèmes dunaires de Terga et que le nombre de spores est lié à la perturbation ou non du site. Ces observations sont rapportées par Koske (1975) qui montre que la densité des spores MA est plus élevée dans les vieilles dunes que dans les jeunes situées près de la mer et dans les dunes

mobiles. La perturbation des sols affecte gravement la communauté de champignons MA et leur capacité à se reproduire dans les systèmes de dunes de sable (Beena *et al.*, 2000).

La variation saisonnière de l'abondance des spores a été rapportée par plusieurs auteurs (Hayman, 1970; Sutton et Barron, 1972; Giovanetti, 1985; Hatimi et Tahrouch 2007). La densité de spores MA observée en fonction des saisons serait attribuée aux processus de la formation des spores, à leur germination et à leur dégradation (Smith, 1980). Nos résultats montrent qu'il y a une dynamique saisonnière avec une augmentation de la densité des spores au printemps observée également par Smith (1980).

Dans l'écosystème de Terga, la densité des spores est négativement corrélée aux taux de colonisation racinaire MA chez les différentes espèces végétales d'intérêt. Ceci peut être dû au fait que les spores ne sont pas les seules à pouvoir réinfecter les plantes; il y'a aussi les racines mycorhizées présentes dans le sol et les mycéliums extra-racinaires (Klironomos et Hart, 2002). Dans les zones arides, il se produit peu ou pas de sporulation mais les racines sont colonisées (Morton *et al.*, 1993). Plusieurs travaux ont montré qu'il n'existe pas de corrélation entre le nombre de spores et l'intensité d'infection des racines (Mukerji et Kapoor, 1986, Clapp *et al.*, 1995; Merryweather et Fitter, 1998). Cette corrélation entre la population de spores et l'infection des racines est positive dans des conditions souvent contrôlées (Jensen et Jakobsen, 1980). La faible relation entre la formation d'endomycorhizes et la densité des spores peut être due à la non viabilité, la dormance des spores (Jasper *et al.*, 1991) et à la sporulation discontinue de certains membres des Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001).

Cette étude confirme l'existence d'une riche diversité des champignons MA dans le sol sablonneux des dunes du littoral de Terga. Treize morphotypes de spores endomycorhiziennes appartenant à quatre genres *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora* et *Gigaspora*, sont trouvés dans le sol sablonneux des dunes du littoral de Terga.

Le gradient observé dans les valeurs de l'indice de diversité de Shannon indique que certaines espèces présentent de grands effectifs d'individus au détriment des autres. Plus l'indice H augmente, plus l'espèce végétale est favorable à toutes les espèces fongiques et qu'elle leur offre les mêmes chances de survie. Le sol de *L. creticus* est le plus riche en espèces MA confirmé déjà par Camprubí *et al.* (2010) qui ont noté une riche diversité des CMA chez *L. creticus* dans des dunes méditerranéennes espagnoles.

Les valeurs de l'indice d'équitabilité qui sont au milieu de l'intervalle] 0,1[, signifierait qu'il y a une distribution variable des espèces. Une valeur élevée de cet indice (tend vers 1) témoignerait d'une distribution équitable des espèces. A l'opposé, Une faible valeur c'est-à-dire proche de 0, signifierait qu'il y a dans le milieu plusieurs espèces rares et qu'il existe une disproportionnalité au niveau de la répartition des espèces ce qui traduit donc des formations végétales très sélectives.

Les champignons appartenant au genre *Glomus* sont prédominants dans les conditions d'échantillonnage et présentent également le plus grand nombre de morphotypes. Le genre *Glomus* est généralement le plus représenté en termes d'espèces dans les sols des écosystèmes semi-arides, probablement à cause de sa capacité d'adaptation aux sols dégradés (Bâ *et al.*, 1996). Selon Turrini *et al.* (2008), la diversité des champignons non *Glomus*, dans les écosystèmes fortement perturbés, est faible. Ceci peut être expliqué par la capacité des espèces de *Glomus* à initier un processus de colonisation à partir des spores, des racines infectées et des hyphes contrairement aux genres *Gigaspora* et *Scutellospora* qui ne sont capables d'initier de nouvelles infections racinaires qu'à partir de spores (Biermann et Linderman 1983).

Parmi les espèces de *Scutellospora* trouvées dans nos sols, quelques unes sont supposées être *Scutellospora persica*. Cette espèce a été retrouvée récemment sur des dunes de sable côtières méditerranéenne espagnole (Camprubí *et al.*, 2010) et aussi sur la côte nord-ouest de l'Italie (Turrini *et al.*, 2008) et avait été précédemment décrite dans d'autres dunes de sable (Koske et Walker, 1985; Blaszkowski et Tadych, 1997; Selvam et Mahadevan, 2002; Rodríguez-Echevarria et Freitas, 2006).

Les valeurs de PIM₅₀ dans les sols rhizosphériques de Terga sont proches de celles trouvées dans des sols cultivés en France (Plenchette, 1989) et supérieures à celles des sols de jachères au Sénégal (Duponnois *et al.*, 2001). Le sol de *R. monosperma* présente le potentiel infectieux mycorhizogène le plus faible, bien qu'il soit le plus riche en spores. Les sols dans les écosystèmes perturbés contiennent très peu de spores viables (Diop *et al.*, 1994) ce qui peut expliquer la corrélation négative trouvée entre les unités de PIM₅₀ et la densité des spores dans les sols de Terga. Les autres sols rhizosphériques ont un potentiel infectieux mycorhizogène important comparé au potentiel infectieux estimé dans les sols rhizosphériques des dunes méditerranéennes espagnoles (Camprubí *et al.*, 2010)

La densité des spores dans les sols rhizosphériques est corrélée négativement à la teneur en phosphore. Frioni *et al.* (1999) ont trouvé une corrélation négative entre la colonisation MA et la teneur en P. Les mycorhizes ont un rôle important dans la survie et la croissance des plantes dans les sols pauvres en nutriment notamment le phosphore (Smith et Read, 1997).

L'identification des CMA basée sur la morphologie des spores ne reflètent pas suffisamment la structure des communautés réellement actives dans les racines. C'est l'une des contraintes, car la sporulation est influencée par plusieurs facteurs physiologiques et environnementaux. En raison de ces difficultés, il y a un recours accru aux méthodes moléculaires.

Aussi, plusieurs couples d'amorces ont été essayées. Après une analyse des résultats des nested PCR, notre choix des amorces s'est porté sur le couple LR1/NDL22 pour step 1 et le couple d'amorces 28G1/28G2, amplifiant le fragment ADNr 25S. Le choix des amorces déterminera les résultats d'une étude de communauté et les conclusions qui pourront en être faites. Pour les sols cultivés, Hijri *et al.* (2006) ont trouvé une diversité de champignons MA plus élevée que celle trouvée précédemment par Helgason *et al.* (1998) et Daniell *et al.* (2001). Ces derniers utilisaient la paire d'amorce AM1-NS31, qui est réputée ne détecter que certains groupes de champignons MA comme la famille des Glomus groupe (A) (Redecker *et al.*, 2000). Hijri *et al.* (2006) avaient utilisé le « cocktail » d'amorces développées par Redecker *et al.* (2000) qui détecte une très large proportion de champignons MA.

Les colonies blanches et les colonies bleues apparaissant sur les boîtes de Pétri ont prouvé la réussite du clonage. Le clonage a permis d'isoler le fragment d'ADN (ADNr 25S limité par 28G1/28G2) du mélange puis de travailler sur celui-ci de manière plus aisée et réaliser son séquençage.

L'ensemble des résultats obtenus (fertilité des sols, colonisation racinaire, PIM, diversité et la densité des spores) suggère que *L. creticus*, *A. saligna* et *P. lentiscus* sont les espèces les plus adaptées à la réhabilitation des sols dégradés de Terga. Plusieurs études ont suggéré que les légumineuses ayant une dépendance mycorhizienne peuvent améliorer la restauration de la fertilité des sols perturbés et la biodiversité des CMA (Duponnois *et al.*, 2001). Ferrol *et al.* (2004) ont suggéré que le réseau mycélien MA du sol rhizosphérique de *P. lentiscus* pourrait être une source principale d'inoculum MA.

5. Conclusion

La zone préservée de la sablière de Terga est caractérisée par une biodiversité végétale importante dont les espèces sélectionnées : *Acacia saligna*, *Lotus creticus*, *Pistacia lentiscus*, *Retama monosperma* et *Juniperus oxycedrus*.

La présence de champignons mycorhiziens arbusculaires est détectée dans les racines de toutes les espèces végétales d'intérêt. L'intensité de mycorhization MA est importante et variable chez les espèces végétales. La densité de spores dans le sol rhizosphérique de *R. monosperma* et *J. oxycedrus* est nettement supérieure à la densité des spores dans ceux d'*A. saligna*, *L. creticus* et *P. lentiscus*. Une dynamique saisonnière avec une augmentation de la densité des spores au printemps est affirmée. La densité des spores est négativement corrélée aux taux de colonisation racinaire MA chez les différentes espèces végétales d'intérêt dans l'écosystème de Terga. Les sols rhizosphériques ont un potentiel infectieux mycorhizogène important. Le sol de *R. monosperma* présente le potentiel infectieux mycorhizogène le plus faible, bien qu'il soit le plus riche en spores.

Cette étude révèle l'existence d'une riche diversité de champignons AM dans les sols rhizosphériques de la végétation des dunes côtières méditerranéennes algériennes. Treize morphotypes de spores endomycorhiziennes appartenant à quatre genres *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora* et *Gigaspora*, sont trouvés dans le sol sablonneux des dunes du littoral de Terga avec la prédominance du genre *Glomus* dans nos conditions d'échantillonnage.

L'ensemble de ces résultats nous offre un élément de conclusion très important : La gestion du potentiel mycorhizien du sol par l'introduction d'*A. saligna*, *L. creticus* et *P. lentiscus* constitue une bonne stratégie de réhabilitation de l'écosystème de Terga. Ce sont des espèces végétales autochtones qui ont la capacité de promouvoir la symbiose mycorhizienne arbusculaire laquelle joue un rôle clé dans la productivité et la stabilité de l'écosystème. Elles peuvent être aussi une source importante d'inoculum MA pour la mycorhization contrôlée dans les écosystèmes semi-arides.

Chapitre 3

Influence des plantes d'intérêt sur la croissance et la mycorhization d'*A. saligna*

1. Introduction

La symbiose mycorhizienne joue un rôle important dans le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes intervenant significativement dans les interactions entre les plantes, améliorant ainsi la productivité et la biodiversité végétales (van der Heijden *et al.*, 1998; Gobat *et al.*, 2003 ; Hart *et al.*, 2003 ; Silvertown, 2004 ; Sanon *et al.*, 2006 ; Kisa *et al.*, 2007). Elle favorise la coexistence entre plusieurs espèces végétales grâce à la formation des liens mycéliens par lesquels le carbone, le phosphore et l'azote sont partagés entre les différentes espèces de plantes (Simard et Durall, 2004). Plusieurs auteurs ont même suggéré une translocation de métabolites *via* un pont mycélien créé par le réseau d'hyphes connectant plusieurs plantes de la même espèce ou d'espèces différentes (Smith et Read, 1997 ; Robinson et Fitter, 1999 ; Gobat *et al.*, 2003 ; Yao *et al.*, 2003 ; Simard et Durall, 2004).

Les légumineuses sont des plantes qui présentent un intérêt remarquable dans la réhabilitation des sols dégradés et la fixation des dunes du littoral grâce à la profondeur de leur système racinaire, à leur croissance rapide et surtout à leur capacité à s'associer avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium* fixateur d'azote atmosphérique (Thompson *et al.*, 1985) et des champignons mycorhiziens (Strullu, 1991 ; Norman *et al.*, 1995).

Comme espèce candidate, *Acacia saligna* Labill.-Wendl appelée encore *Acacia cyanophylla* Lindl (Maslin, 1974), Mimosaceae arbustive originaire du sud-ouest de l'Australie (Hopper et Maslin, 1978), a été introduite en Algérie depuis 1870 (El-Lakany, 1987). Grâce aux multiples usages de cette espèce (fertilisation des sols, fixation des dunes littorales, consolidation des ouvrages de conservation des eaux et du sol, brise-vent et plantations pastorales) et à sa capacité de pousser sur différents types de sols, *A. saligna* compte aujourd'hui parmi les essences forestières les plus employées dans les reboisements des zones arides et semi-arides.

Acacia saligna qui tolère la salinité et la sécheresse (Sheha, 1984 ; El Lakany, 1987) est utilisée en Algérie, principalement dans les zones côtières, pour la stabilisation des dunes (El-Lakany, 1987 ; Boukhatem *et al.*, 2012) et dans les projets de revégétalisation (Sekkour, 2008). De plus cette espèce qui a un pouvoir de régénération important, stabilise et fertilise les sols grâce à sa capacité de s'associer avec des microorganismes symbiotiques (rhizobium, champignons mycorhiziens arbusculaires) (Nasr et Diem, 1987 ; Amrani *et al.*, 2010 ; Boukhatem *et al.*, 2012).



C'est une espèce choisie pour réhabiliter les sols dégradés de la sablière de Terga après exploitation massive et anarchique (Ghodbani, 2008 ; Mansouri, 2011). Cette sablière a un climat méditerranéen avec des perturbations climatiques et édaphiques qui rendent difficile une restauration rapide de cet écosystème et nécessite ainsi une stratégie de revégétalisation performante.

Vu l'importance des symbioses mycorhiziennes dans la restauration de ces écosystèmes, la stratégie de revégétalisation adoptée est basée sur une meilleure exploitation du couple symbiotique *Acacia saligna*-CMA par l'utilisation d'autres espèces végétales adaptées aux conditions locales. Des espèces végétales endémiques subsistant dans ces sols dégradés, sont associées à *A. saligna* pour favoriser sa mycorhization naturelle et stimuler certaines communautés bactériennes liées aux cycles C-P-N, afin de les exploiter dans les scénarios de reboisement comme plantes compagnes à *A. saligna*. Dans ce contexte l'objectif de ce travail est de déterminer les principaux effets des espèces végétales d'intérêt (*Acacia saligna*, *Retama monosperma*, *Lotus creticus*, *Pistacia lentiscus* et *Juniperus oxycedrus*) sur la croissance et la mycorhization d'*A. saligna* dans des conditions expérimentales.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Dispositif expérimental

Les échantillons de sols rhizosphériques des plantes d'intérêt (*Acacia saligna*, *Lotus creticus*, *Retama monosperma*, *Pistacia lentiscus* et *Juniperus oxycedrus*) et le sol nu sont conditionnés dans des sachets noir en plastique de 1 dm³. Les graines d'*A. saligna* sont lavées à l'eau courante puis sont scarifiées avec de l'acide sulfurique (H₂SO₄ à 96 %) pendant 30 min. Elles sont ensuite rincées une dizaine de fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer les traces d'acide sulfurique puis mises à germer dans des boîtes de Pétri sur de l'eau gélosée (0.8 %) à 22 °C.

Après la germination, les plantules sont repiquées sur les différents sols préalablement préparés puis placées sous serre en blocs complets randomisés, avec 10 répétitions par traitement (**Fig. 54**). L'arrosage est effectué avec l'eau de robinet pendant les sept mois de croissance.

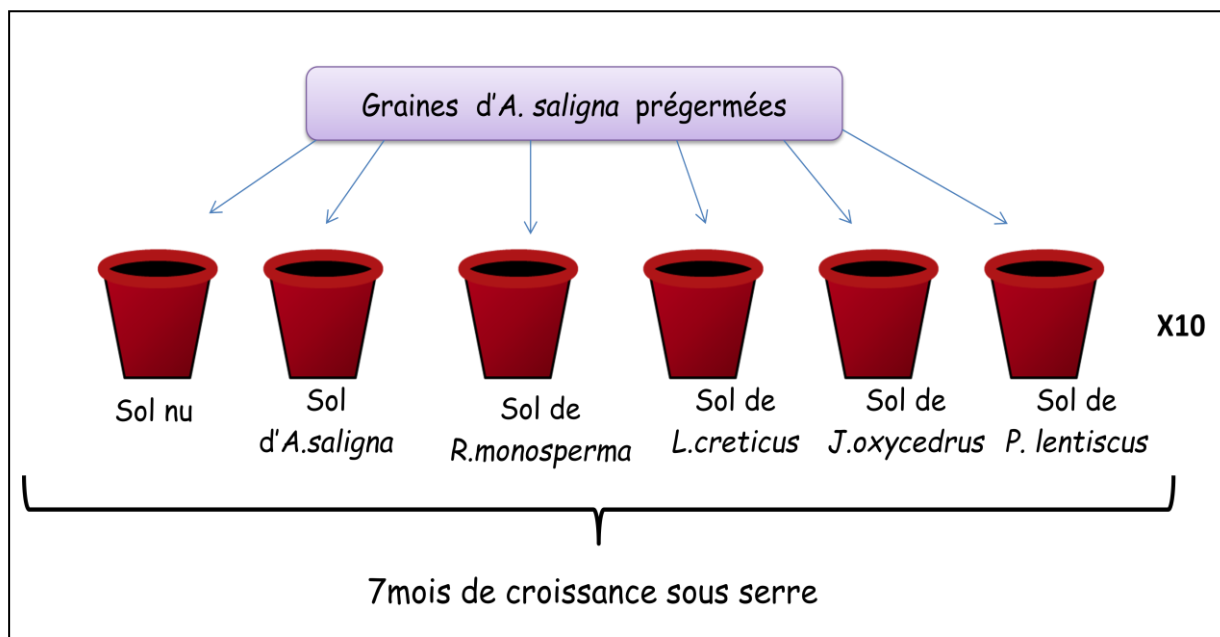


Figure 54: Culture d'*Acacia saligna* sous différents traitements.

2.2. Paramètres mesurés

2.2.1. Etude de la croissance d'*A. saligna*

La longueur des plantes est mesurée chaque deux semaines pendant les sept mois de culture. Après la récolte les plantes sont mises à sécher dans l'étuve à une température de 60 °C pendant une semaine pour déterminer le poids sec des tiges et des racines.

2.2.2. Estimation des taux de colonisations racinaire

Des racines fraîches sont recueillies le long du système racinaire de chaque plante pour évaluer la colonisation mycorhizienne. Les racines sont éclaircies avec du KOH à 10% pendant 30 min, rincées à l'eau distillée et colorées au bleu Trypan dans du lactophénol (Philips et Hayman, 1970). Les structures mycorhiziennes sont observées au microscope optique (Olympus SZ H10). Le taux de mycorhization est exprimé par la fréquence des mycorhizes dans le système racinaire [$F \% = (\text{nb de fragments mycorhizés} / \text{nb total de fragments}) * 100$] (Trouvelot *et al.*, 1986).

2.2.3. Détermination de la diversité catabolique des communautés bactériennes

La diversité catabolique microbienne du sol est déterminée d'après la méthode décrite par Campbell *et al.* (2003). Elle est basée sur une série de mesure de dégagement de CO₂ de sols amendés par différents substrats organiques. Les caractéristiques physiologiques des microorganismes en regard de ces divers substrats permettent de décrire une diversité

fonctionnelle microbienne en temps réel car elle est basée sur des mesures directes du catabolisme des substrats par les communautés microbiennes.

2.2.3.1. Détermination de la capacité de rétention d'eau du sol (CRE)

Un échantillon composite est constitué avec l'ensemble des six échantillons provenant des cultures d'*A. saligna* sous les différents traitements (10 g de chaque sol). Chaque 20 g de ce sol composite est mis dans un pot troué, qui se trouve dans un récipient remplis d'eau, pendant la nuit. Le matin, les pots contenant le sol humecté sont pesés. Des calculs sont réalisés pour obtenir la quantité d'eau retenue par le sol et qui présente CRE 100 % qui permet par la suite de calculer la quantité d'eau pour avoir 30 % de la capacité de rétention d'eau (CRE 30 %) (Annexe 9).

2.2.3.2. Mesure du dioxyde de carbone (CO₂) absorbé

Le système de microrespirométrie utilisé ici, dénommée MicroResp se compose de deux microplaques placées face à face, l'une de ces plaques dotée de 96 puits et d'une capacité de 1,2 ml, détient des échantillons de sol avec des sources de carbone supplémentaires et l'autre plaque est un système pour détecter le dioxyde de carbone libéré. Les deux plaques sont scellées ensemble avec un joint en silicone avec des trous d'interconnexion entre les deux plaques qui permettent de laisser un volume d'air suffisant dans les puits gélosés et donc faciliter l'entrée de CO₂. L'ensemble est maintenu fermement avec collier en métal (Fig. 55). Ce système est incubé pendant six heures à 28 °C puis sont tout de suite mesuré par le spectrophotomètre à plaques qui permet une lecture d'absorbance à 572 nm.



Figure 55: Le système de microrespirométrie MicroResp.

Les valeurs données par le lecteur de microplaques sont traitées par Excel et le logiciel XLstat pour estimer les profils cataboliques SIR (Substrate- Induced Respiration).

2.2.3.3. Préparation des plaques du système de microrespirométrie MicroResp

Microplaque 96 puits à fond rond 1.2 ml

Chaque puits de la microplaque est rempli avec un échantillon de sol. Les plaques sont pesées sans et avec le sol afin de déterminer la quantité moyenne de sol dans un puits qui nous permet par la suite de calculer CRE 30% de sol d'un seul puits. Les plaques sont humectées avec l'eau distillée stérile à CRE 30%, centrifugées à 800 tr/1 min et incubées à 28 °C pendant trois jours. Les plaques sont pesées à nouveau chaque jour. Une gamme de substrat organique est alors additionnée au sol en respectant l'ordre (**Tab. 18**).

Microplaques 96 puits à fond plat 200 µl

Une solution de gélose colorée est préparée à partir de deux solutions : un volume d'agar Noble dissous et deux volumes de solution d'indicateur coloré rouge crésol. La solution est chauffée à 65 °C puis remplie dans les microplaques. Chaque puits de la microplaque est rempli par 20 µl de gélose colorée. Après refroidissement, les microplaques sont stockées dans une boîte en plastique fermées de façon hermétique en présence de chaux sodée sèche et d'un flacon d'eau ouvert afin d'absorber le CO₂ ambiant et de freiner l'évaporation des puits gélosés et leur fendillement. Après deux à trois jours de stockage, une lecture d'absorbance à 572 nm est effectuée pour chaque plaque gélosée avec le spectrophotomètre à plaques.

2.2.4. L'identification génotypique des CMA

L'identification des CMA dans les racines est réalisée par clonage-séquençage comme précédemment décrit (chapitre 2). Les mêmes techniques utilisées pour l'étude moléculaire des CMA dans les racines des plantes d'intérêt (extraction d'ADN à partir des racines, dosage de d'ADN, nested PCR, clonage et séquençage) sont utilisées pour les racines d'*A. saligna* cultivé sous serre. Les mêmes conditions d'amplification, les mêmes amorces et le plasmide pGEM-T sont adoptés.

Tableau 18: Plan de microplaque des substrats organiques

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Mannose	Mannose	Mannose	Mannitol	Mannitol	Mannitol	D-Tréhalose	D-Tréhalose	D-Tréhalose	L-Arabinose	L-Arabinose	L-Arabinose
B	D-Xylose	D-Xylose	D-Xylose	D-Saccharose	D-Saccharose	D-Saccharose	D-Galactose	D-Galactose	D-Galactose	Inositol	Inositol	Inositol
C	D-Sorbitol	D-Sorbitol	D-Sorbitol	L-Rhamnose	L-Rhamnose	L-Rhamnose	Arabitol	Arabitol	Arabitol	mesoErythritol	mesoErythritol	mesoErythritol
D	Glucose	Glucose	glucose	Citrate	Citrate	Citrate	Maléate	Maléate	Maléate	Malate	Malate	Malate
E	Na-Gluconate	Na-Gluconate	Na-Gluconate	H2O	H2O	H2O	Oxalate	Oxalate	Oxalate	Kétoglutarate	Kétoglutarate	Kétoglutarate
F	Ascorbate	Ascorbate	Ascorbate	N-acetylGlucosamine	N-acetylGlucosamine	N-acetylGlucosamine	Glutamate	Glutamate	Glutamate	L-Asparagine	L-Asparagine	L-Asparagine
G	D,L Valine	D,L Valine	D,L Valine	L-Méthionine	L-Méthionine	L-Méthionine	L-Glutamine	L-Glutamine	L-Glutamine	L-Alanine	L-Alanine	L-Alanine
H	L-Sérine	L-Sérine	L-Sérine	L-Histidine	L-Histidine	L-Histidine	L-Proline	L-Proline	L-Proline	L-leucine	L-leucine	L-leucine

1.1.1. Analyse statistique

Les données sont traitées avec une analyse de la variance (ANOVA) au seuil de 5% ($p < 0.05$) en utilisant le logiciel XL stat. La comparaison des moyennes est faite à l'aide du test de Tukey. Les coefficients de corrélation de Spearman sont calculés entre toutes les variables. La diversité spécifique est appréhendée à l'aide des indices de diversité de Shannon et Weiner (1949) Et d'équitabilité de Piélou (1966) comme déjà décrit en chapitre2.

2. Résultats

2.1. Etude de la croissance d'*A. saligna*

Sous les mêmes conditions de culture, *A. saligna* présente un développement différent selon le substrat utilisé (**Fig. 56**). L'analyse de variance indique que les sols rhizosphériques ont une influence hautement significative sur la croissance des plantes d'*A. saligna* : sur la hauteur ($F=12,105$; $P < 0,0001$), sur la biomasse sèche racinaire ($F=13,540$; $< 0,0001$) et sèche aérienne ($F=14,618$; $< 0,0001$).

2.1.1. Hauteur des plantes d'*A. saligna*

Comparé au témoin, un développement important d'*A. saligna* est obtenu sur les substrats provenant de la rhizosphère de *P. lentiscus*, d'*A. saligna* et *L. creticus* avec respectivement des hauteur moyennes de $25,64 \pm 3,40$ cm, $24,57 \pm 2,51$ cm et $22,28 \pm 5,65$ cm. Les sols provenant de la rhizosphère de *J. oxycedrus* et *R. monosperma* n'ont pas permis un bon développement des plantes d'*A. saligna* avec des hauteurs moyennes respectives de $16,6 \pm 3,67$ cm et $8,14 \pm 7,73$ cm (**Fig. 57**).

2.1.2. Biomasse aérienne et racinaire

Les plantes d'*A. saligna* cultivées sur les sols d'*A. saligna* et *P. lentiscus* présentent une biomasse aérienne importante avec respectivement $1606 \pm 562,07$ mg et $1508,60 \pm 415,91$ mg et à un degrés moindre lorsque *A. saligna* est cultivé sur le sol provenant de la rhizosphère de *L. creticus* ($1017,20 \pm 545,81$ mg) (**Fig. 58**). Ces valeurs diffèrent significativement avec celles enregistrées dans le cas des substrats rhizosphériques de *J. oxycedrus* ($714,33 \pm 443,33$ mg) et de *R. monosperma* ($113,20 \pm 93,98$ mg)

Les biomasses racinaires (**Fig. 59**) les plus importantes sont notées chez les plantes d'*A. saligna* cultivées sur les sols de *P. lentiscus* ($1955,30 \pm 541,79$ mg), d'*A. saligna* ($1730,40 \pm 702,41$ mg) et de *L. creticus* ($1336,90 \pm 977,71$ mg). Comme précédemment, ces valeurs diffèrent significativement avec les hauteurs d'*A. saligna* cultivée dans les sols de *J. oxycedrus* ($689,33 \pm 522,92$ mg) et de *R. monosperma* ($157,10 \pm 91,59$ mg).

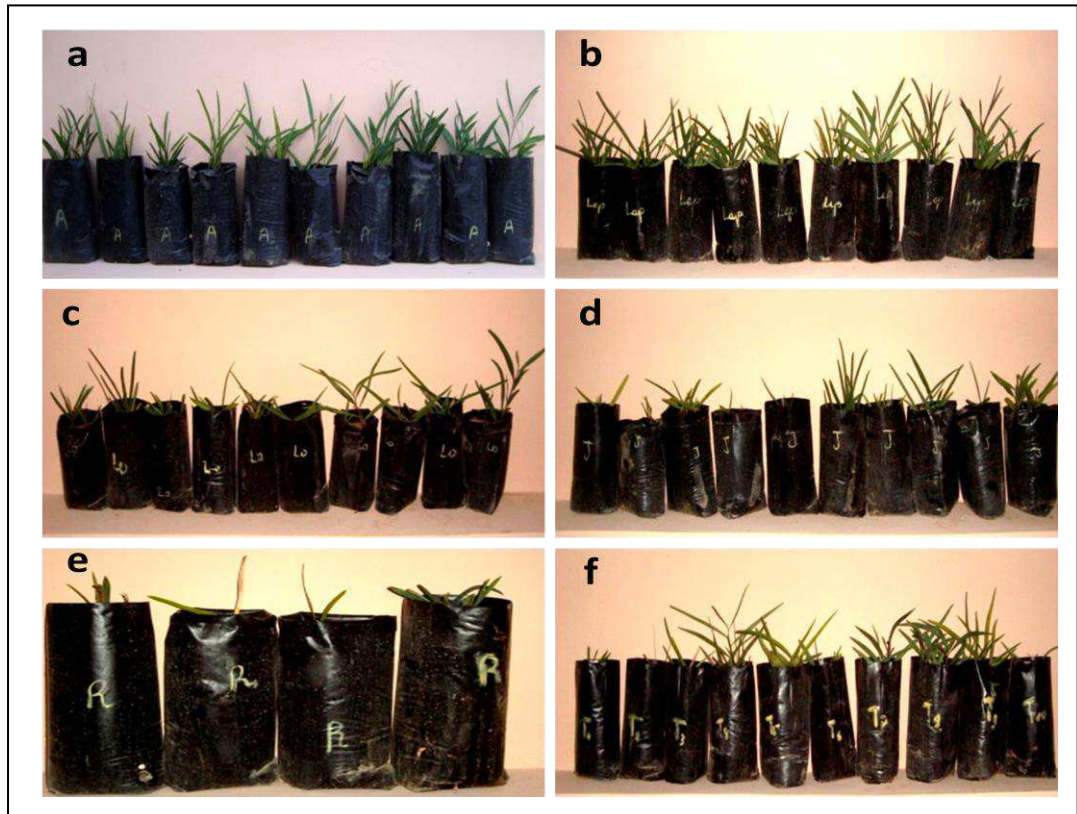
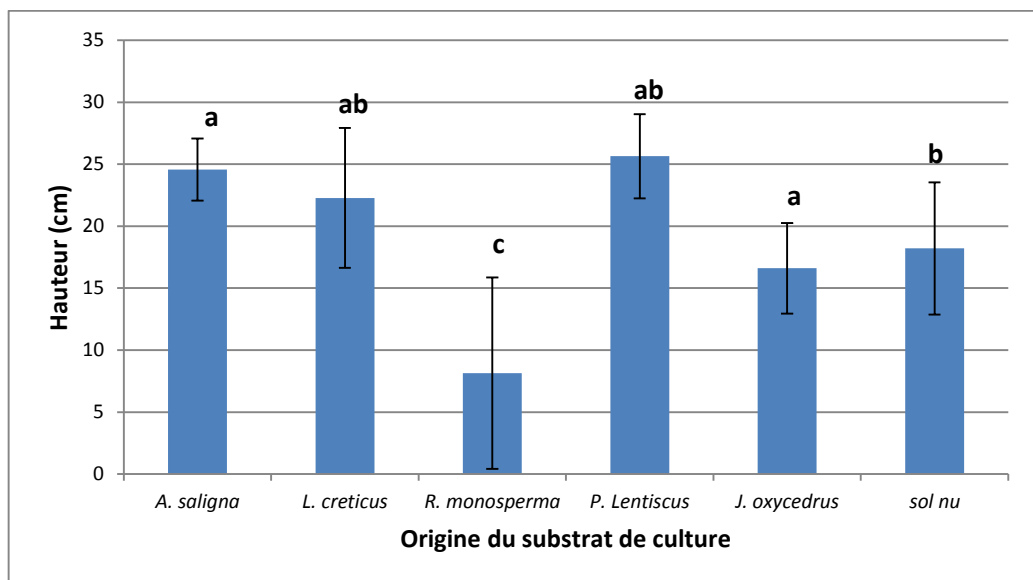
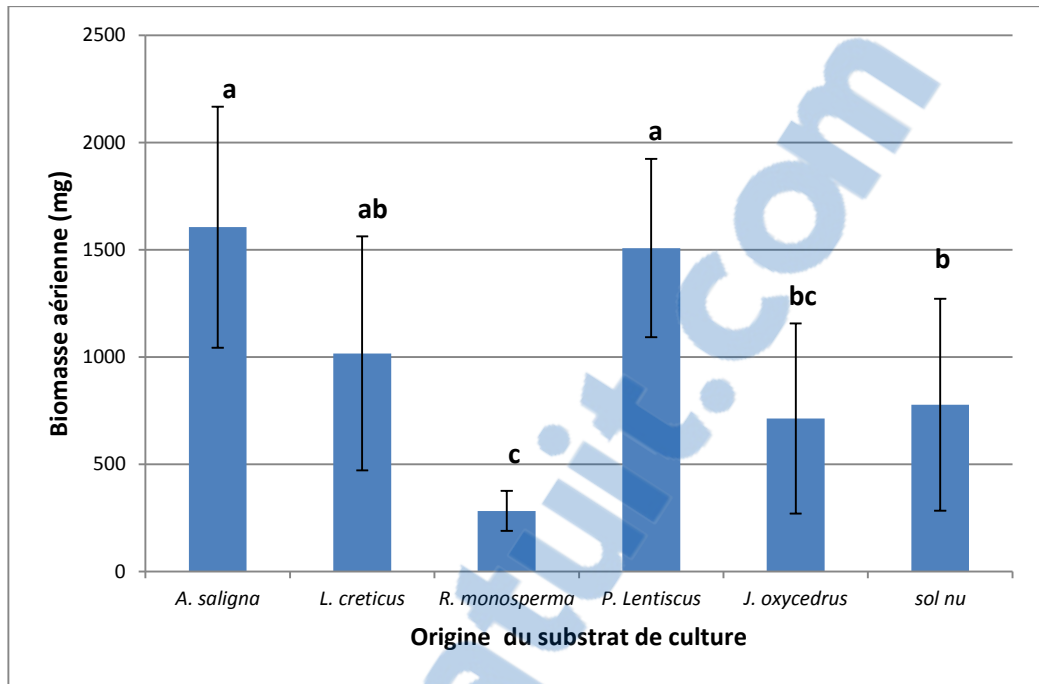


Figure 56: Les plantes d'*Acacia saligna* après sept mois de culture sur différents substrats de sol: (a) *Acacia saligna*, (b) *Pistacia lentiscus*, (c):*Lotus creticus*, (d):*Juniperus oxycedrus*, (e): *Retama monosperma*, et (f): sol nu).



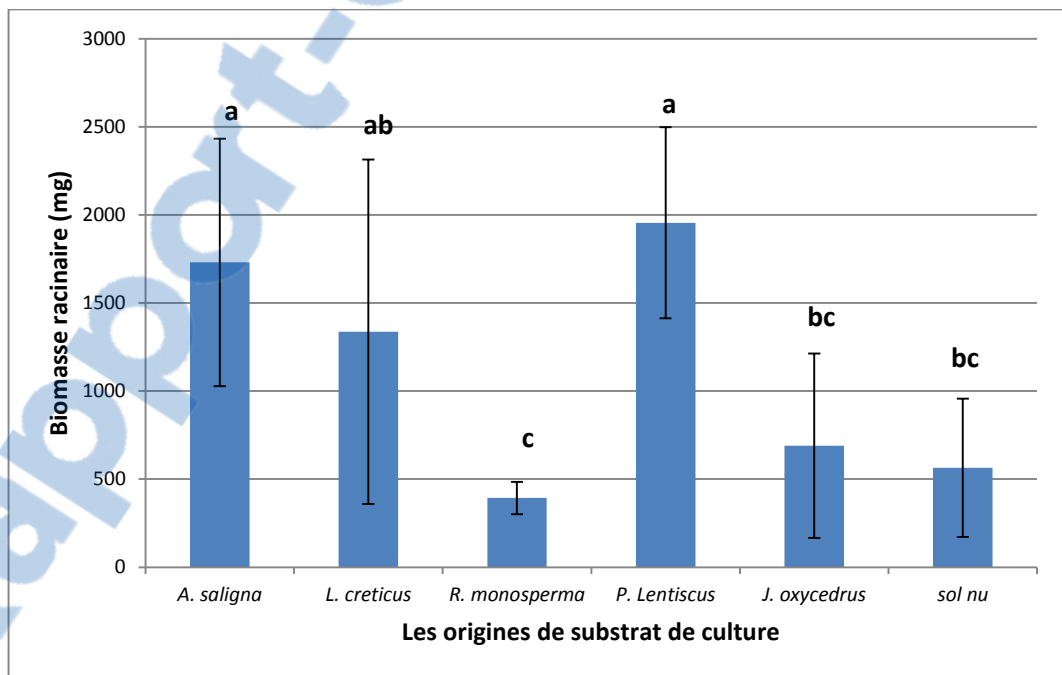
Les moyennes représentées par la même lettre ne sont significativement différentes à $\alpha < 0.05$ selon le test Tukey.

Figure 57 : La hauteur (cm) des plantes d'*Acacia saligna* après 7 mois de culture sous serre dans les différents sols rhizosphériques des espèces d'intérêt.



Les moyennes représentées par la même lettre ne sont significativement différentes à $\alpha < 0.05$ selon le test Tukey.

Figure 58: La biomasse sèche aérienne (mg) des plantes d'*Acacia saligna* après 7 mois de culture sous serre dans les sols rhizosphériques des espèces d'intérêt.



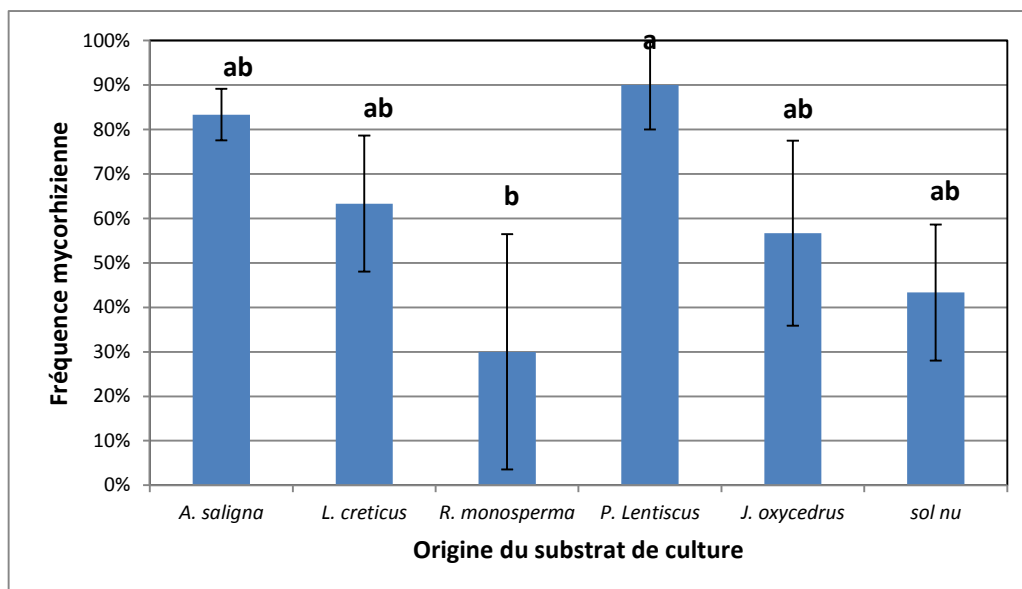
Les moyennes représentées par la même lettre ne sont significativement différentes à $\alpha < 0.05$ selon le test Tukey.

Figure 59: La biomasse sèche racinaire (mg) des plantes d'*Acacia saligna* après 7 mois de culture sous serre dans les sols rhizosphériques des espèces d'intérêt.

2.2. Colonisation mycorhizienne racinaire d'*A. saligna*

L'observation microscopique des racines d'*A. saligna* a montré que tous les sols abritent des champignons MA et des taux de colonisation MA racinaires différents (**Fig. 60**). Comparé au sol nu (43 %), un taux de colonisation racinaire MA élevé est observé lorsque les plantes sont cultivées sur le sol rhizosphérique de *P. lentiscus* (90 %) suivi du sol rhizosphérique d'*A. saligna* (83,33 %), celui de *L. creticus* (63,33 %) et *J. oxycedrus* (56,66 %). Un faible taux de colonisation est observé dans le cas du sol rhizosphérique de *R. monosperma* (30 %).

L'origine du sol influence significativement sur les taux de colonisation racinaire MA chez les plantes d'*A. saligna* ($F= 4,590$; $P < 0,017$). Néanmoins le potentiel mycorhizogène des sols est négativement corrélé au taux de colonisation ($r = -0,326$) ceci suggère que d'autres acteurs microbiologiques du sol interagissent d'où l'intérêt de mesurer l'activité catabolique des sols.



Les moyennes représentées par la même lettre ne sont significativement différentes à $\alpha < 0,05$ selon le test Tukey.

Figure 60: Taux de Mycorhization des plantes d'*Acacia saligna* cultivées durant 7 mois en serre sur les sols rhizosphériques des espèces d'intérêt.

2.3. Diversité catabolique microbienne

Les plaques remplies avec les échantillons de sol sont humectées avec l'eau distillée stérile à CRE 30 % qui correspond à 59 μl d'eau par puits et 27 μl pour la quantité moyenne de substrat organique (**Annexe 9**).

Après l'incubation du système, les microplaques gélosées sont mesurées par le spectrophotomètre à plaques. Les valeurs données par le lecteur de microplaques sont traitées et analysées pour estimer les profils cataboliques SIR (Substrate- Induced Respiration)

Les valeurs de l'indice de diversité de Shannon (H) indiquent que certains substrats carbonés sont plus consommés au détriment des autres. Plus l'indice H augmente plus le nombre de substrats consommés est augmenté. Cependant ce nombre reste faible vu que la richesse catabolique qui reflète le nombre des substrats catabolisés par la communauté microbienne de chaque sol ne dépasse pas la valeur 15 sur 32 substrats utilisées ce qui reste généralement faible (**Tab. 19**).

Les valeurs de l'indice d'équitabilité (E) sont comprises dans l'intervalle] 0 ,1[. L'équitabilité catabolique dans tous les traitements est élevée (tend vers 1) ce qui indique qu'il y a une très faible variabilité dans la consommation des substrats (**Tab. 19**).

Tableau 19 : Indice de Shannon (H), Richesse (R) et diversité cataboliques (E) de chaque type de sol.

Paramètres Espèces	Indice de Shannon H	Richesse catabolique R	Diversité catabolique E
<i>A. saligna</i>	2,09	11	0,87
<i>P. lentiscus</i>	1,05	4	0,76
<i>J. oxycedrus</i>	1,80	7	0,92
<i>R. monosperma</i>	1,39	5	0,86
<i>L. creticus</i>	1,90	9	0,86
Sol nu	2,27	15	0,84

2.4. Identification génotypique

2.4.1. Extraction et dosage de l'ADN

L'étude génotypique n'a concerné que trois échantillons : les racines d'*A. saligna* sous le sol d'*A. saligna*, sous le sol de *P. lentiscus* et sous le sol nu. La qualité de l'ADN est contrôlée sur gel d'agarose. La visualisation des gels sous la lumière UV a permis d'observer des bandes d'ADN chez tous les échantillons (**Fig. 61**). Les échantillons de l'ADN dosés (**Tab. 20**) sont

dilués avec l'eau ultra pure « Mili Q » afin d'obtenir un échantillon représentatif de chaque traitement de 3 ng/ μ l.

Tableau 20: Les concentrations des échantillons d'ADN racinaire d'*A. saligna* cultivée dans les sols d'*A. saligna*, *P. lentiscus* et sol nu.

ADN racinaire d' <i>A. saligna</i> dans les sols	<i>Acacia saligna</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>	Sol nu
Concentration (ng/ μ l)	23	37	45

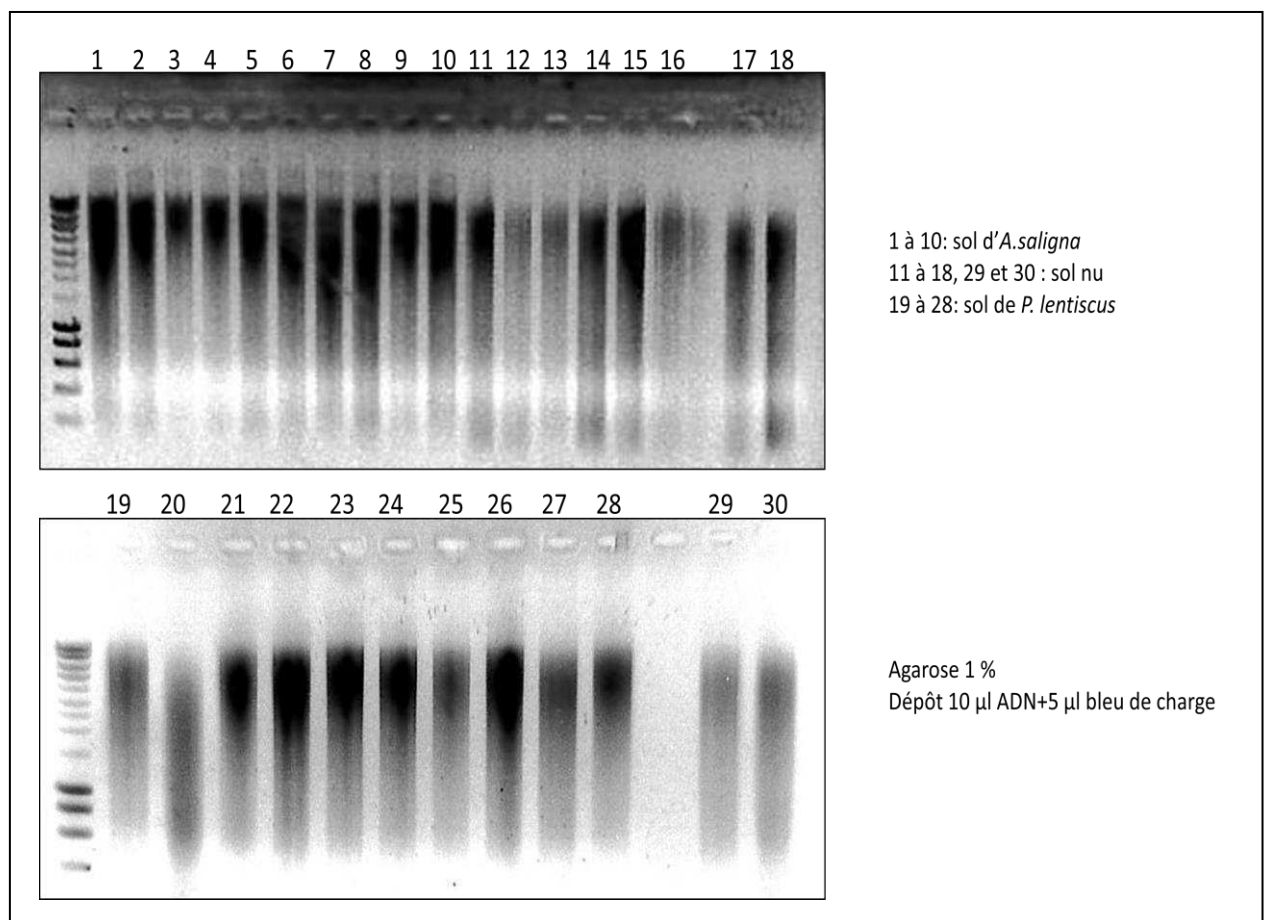


Figure 61: Electrophorèse d'ADN des racines d'*A. saligna* cultivée dans les sols d'*A. saligna*, *P. lentiscus* et sol nu

2.4.2. Amplification « PCR-nested » du fragment ADNr 18s

La PCR step 1 réalisée avec les amorces NS1/NS4 a permis d'amplifier un fragment d'environ 1150 pb chez les trois échantillons d'ADN racinaires d'*A. saligna*, *L. creticus* et sol nu (Fig. 62). Dans la PCR step 2 on a dilué *template* PCR step 1 vingt fois. La deuxième PCR step 2 réalisée avec le couples amorces NS31/AML2 a permis également d'amplifier un fragment d'environ 550 pb à partir de tout les échantillons du produits PCR step 1 (Fig. 63).

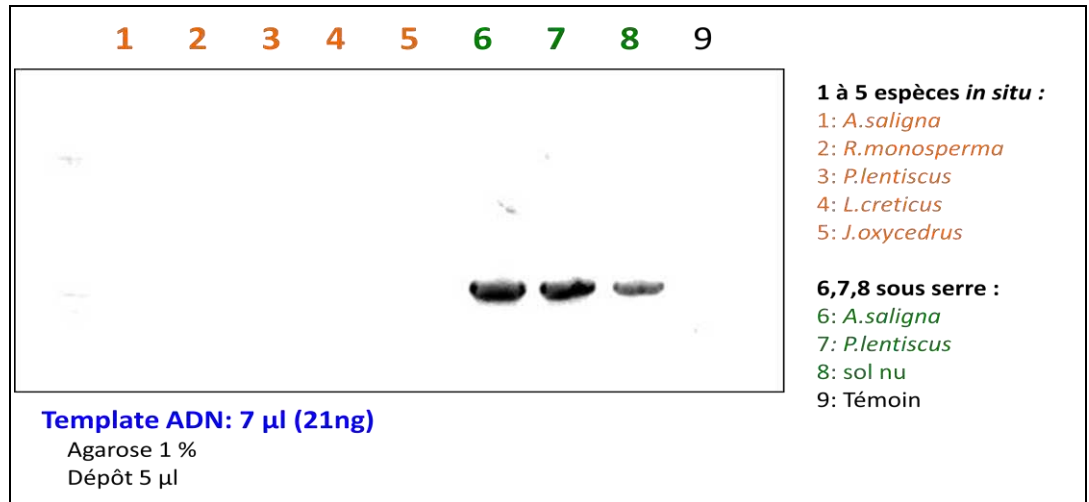


Figure 62: Amplification du Fragment ADNr 18S (PCR step 1) par les amorces NS1/NS4

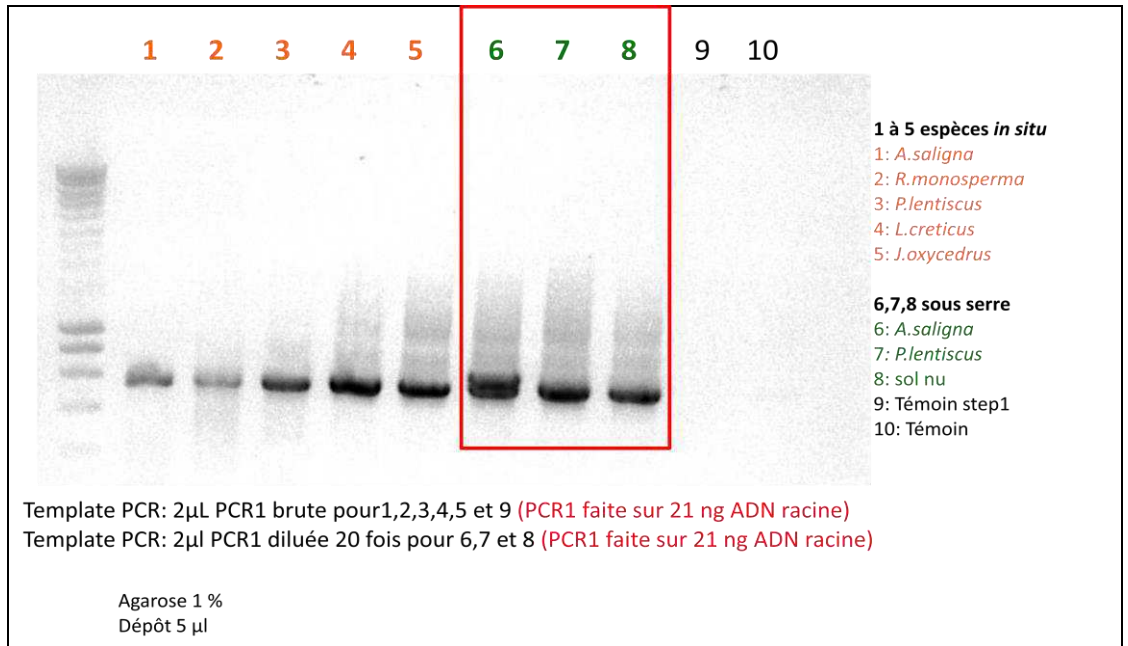


Figure 63: Amplification du Fragment ADNr 18S (PCR step 2) par les amorces NS31/AML2

2.4.3. Amplification « PCR-nested » du fragment ADNr 25s

La PCR step 1 réalisée avec le couple d'amorces LR1/NDL22 a permis d'amplifier un fragment d'environ 780 pb chez les trois échantillons d'ADN racinaires d'*A. saligna* sous les sols d'*A. saligna*, de *L. creticus* et du sol nu (**Fig. 64**).

Tous les produits PCR step 1 sont dilués 20 fois pour les utiliser comme *template* dans les deux PCR step 2. La Première PCR step 2 réalisé avec le couple d'amorces 28G1/28G2 a amplifié un fragment d'environ 580 pb à partir de tout les échantillons de PCR step 1 dilué (**Fig. 65**).

2.4.4. Clonage de l'ADN fongique

Après une analyse des résultats des nested PCR, les produits PCR step 2 du fragment ADNr 25S amplifiés par les amorces 28G1/28G2 (580pb) sont choisis pour le clonage. Les amplicons positifs (**Fig. 66**) sont envoyés au séquençage.

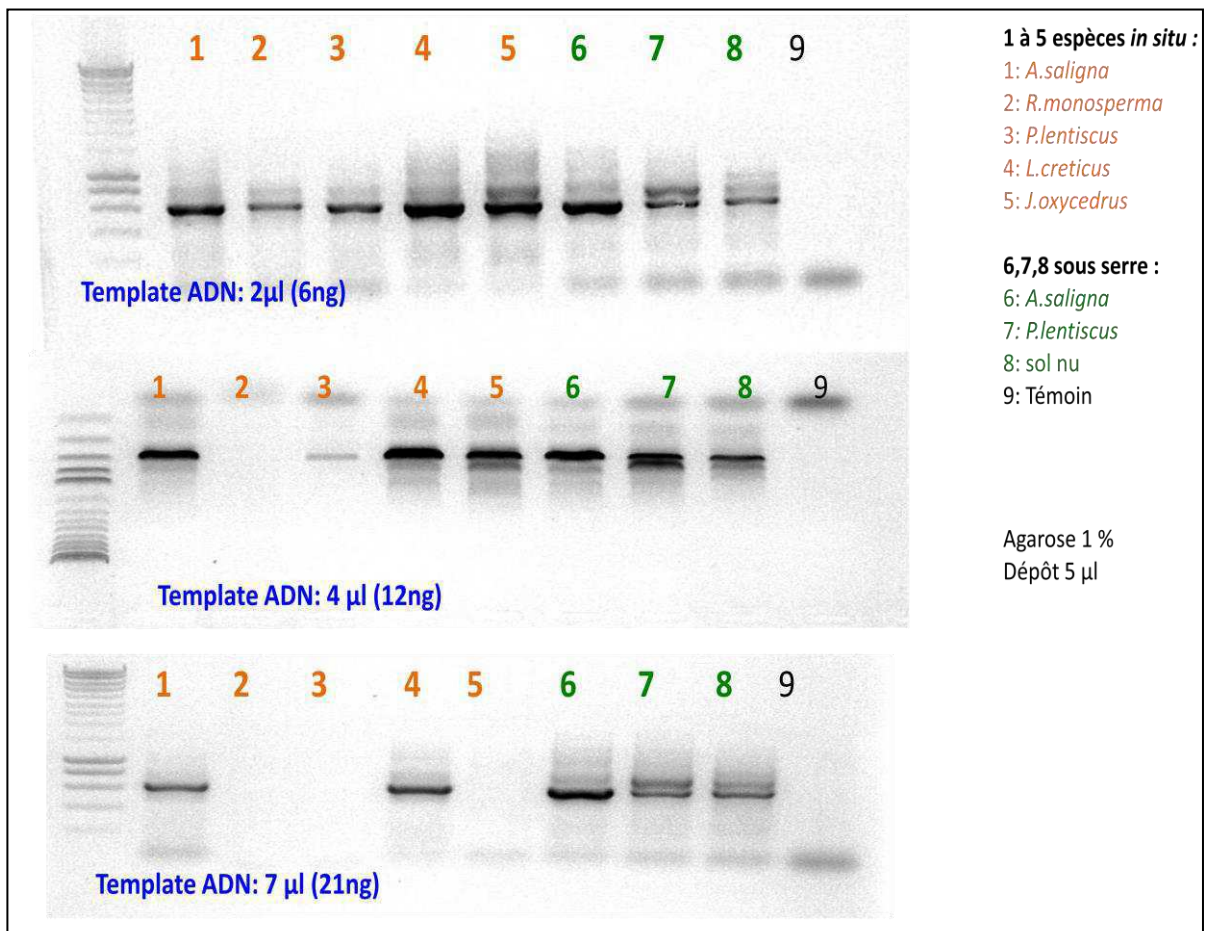


Figure 64: Amplification du Fragment ADNr 25S

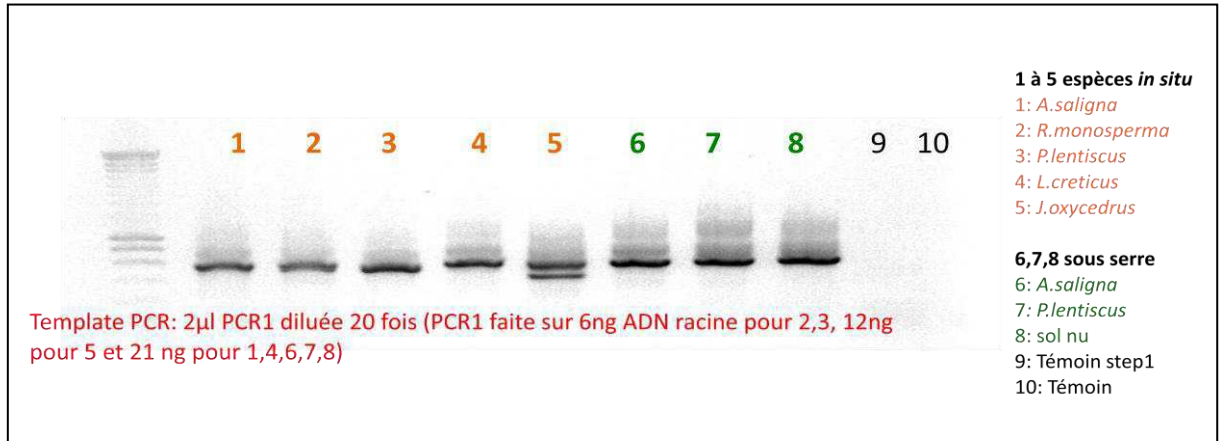


Figure 65: Amplification du Fragment ADNr 25S

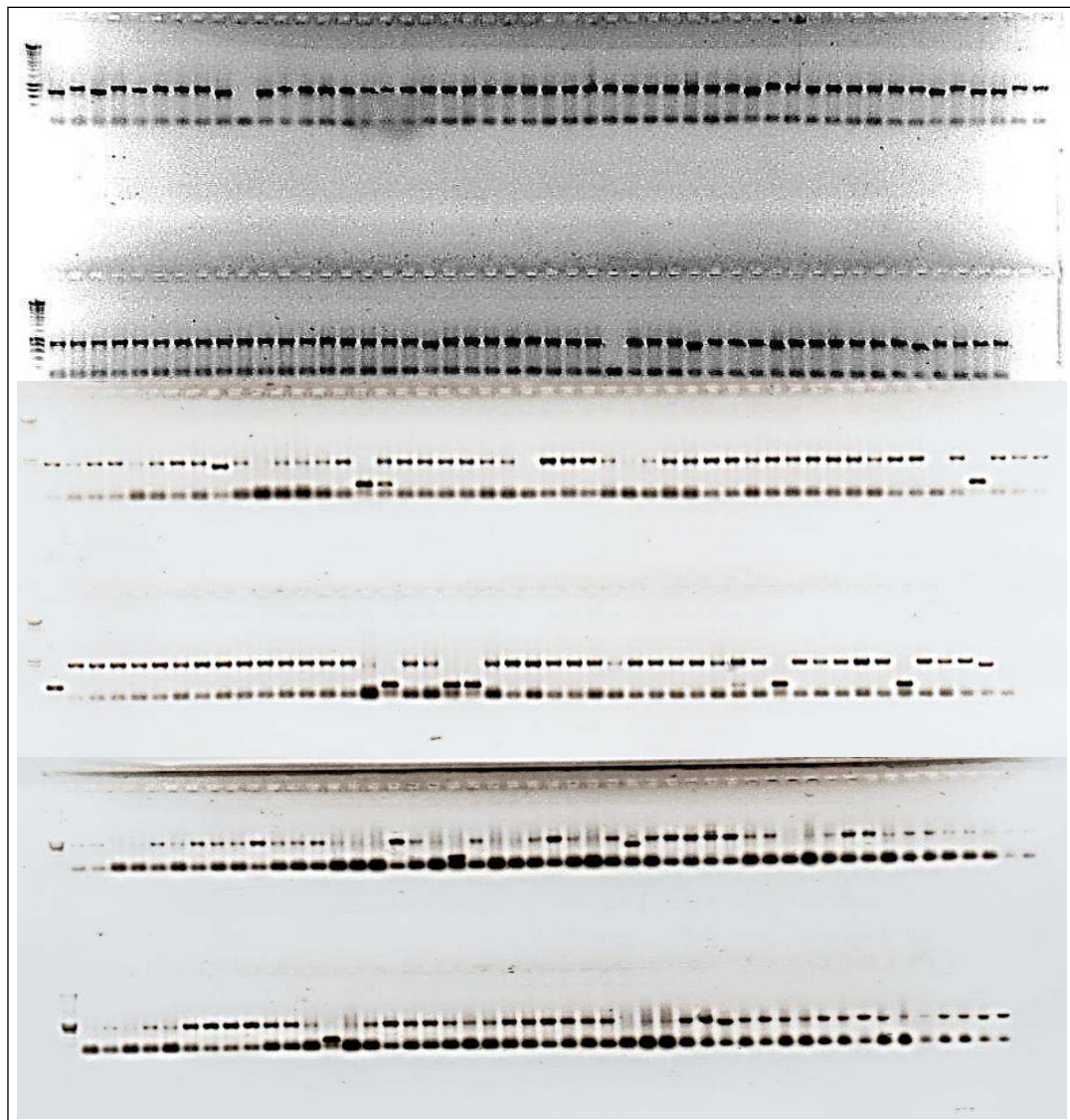


Figure 66: Amplification du fragment « insert » par les amorces (M13f/M13r) chez *A. saligna* sous serre : (a) sol d'*A. saligna*, (b) sol de *P. lentiscus*, (c) sol nu.

3. Discussion

Dans la sablière de Terga comme tous les écosystèmes méditerranéens semi-arides, les actions anthropiques telle l'extraction du sable provoque des dégradations au niveau de la strate végétale en modifiant sa structure, sa dynamique et sa diversité spécifique (Grove et Rackham, 2001). Dans cet environnement hostile, certaines plantes pionnières ou rudérales peuvent faciliter le développement d'autres espèces végétales (Bellingham *et al.*, 2001 ; Holl, 2002). Les interactions positives entre les plantes, ou la facilitation, se produisent quand une espèce végétale améliore la survie, la croissance d'une autre espèce. La facilitation a été examinée et discutée en détail par plusieurs auteurs (De Angelis *et al.*, 1986; Hunter et Aarssen 1988; Wilson et Agnew 1992; Bertness et Callaway 1994; Callaway 1995).

Les plantes ont différents types d'effets positifs sur d'autres plantes. Dans une revue de la facilitation plante-plante, Callaway (1995) décrit des mécanismes positifs directs tels que l'altération favorable de la lumière, la température, l'humidité du sol, les nutriments du sol, l'oxygénation du sol, ou le substrat et des mécanismes indirects tels que la protection contre les herbivores, les greffes racinaires, et les interactions avec les communautés microbiennes de la rhizosphère comme la symbiose mycorhizienne.

Le terme 'coexistence' a été utilisé par les écologistes pour décrire une association équilibrée d'espèces dans une communauté biotique (Hart *et al.*, 2003). Les interactions entre les espèces végétales peuvent être soit positives (facilitation de la régénération et de la croissance d'une plante par une autre (Ouahmane *et al.*, 2006 a,b ; Brooker *et al.*, 2008)), soit négatives comme la compétition pour la lumière et les nutriments, la production de substances allélopathiques (Donald, 1958 ; Stevens, 1986 ; Chesson, 2000 ; Bais *et al.*, 2002).

Dans les conditions expérimentales, les paramètres de croissance d'*A. saligna* ont montré l'effet de chaque sol rhizosphérique des espèces végétales d'intérêt (*Acacia saligna*, *Retama monosperma*, *Lotus creticus*, *Pistacia lentiscus* et *Juniperus oxycedrus*). La hauteur, la biomasse sèche aérienne et racinaire ont permis de conclure que la meilleure croissance des plantes d'*A. saligna* est obtenue dans les sols d'*A. saligna* et *P. lentiscus*. Bruno *et al.* (2003) ont montré que les arbustives pionnières facilitent la germination et la croissance juvénile des essences forestières, plus particulièrement dans les écosystèmes de type méditerranéen. Dans les écosystèmes arides et semi-arides, Ouahmane *et al.* (2006 a,b) ont observé que certaines espèces végétales pouvaient favoriser la survie et la croissance d'autres espèces en créant des

'îlots de fertilité'. Par ailleurs les plantes d'*A. saligna* présentent un bon développement dans le sol nu, la hauteur, la biomasse sèche aérienne et racinaire sont plus importants que ceux provenant du sol rhizosphérique de *R. monosperma*.

Les mêmes observations sont faites concernant les taux de colonisation mycorhizienne des racines d'*A. saligna*. Selon van der Heijden *et al.* (1998), la composition de la communauté des plantes ainsi que la biomasse totale dépend fortement de la composition et de la diversité de la communauté de champignons mycorhiziens. Les associations mycorhiziennes jouent un rôle clef dans le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes terrestres en intervenant fortement dans les relations plante - plante, améliorant ainsi la productivité et la biodiversité végétales (van der Heijden *et al.*, 1998; Gobat *et al.*, 2003 ; Hart *et al.*, 2003 ; Silvertown, 2004 ; Sanon *et al.*, 2006 ; Kisa *et al.*, 2007).

Les CMA favorisent la coexistence entre plusieurs espèces végétales, grâce à la formation des liens mycéliens, par lequel le carbone, le phosphore et l'azote sont partagés entre différentes espèces de plantes (Simard et Durall, 2004). Des auteurs ont même suggéré une translocation de métabolites *via* un pont mycélien créé par le réseau d'hyphes connectant plusieurs plantes de la même espèce ou d'espèces différentes (Smith et Read, 1997 ; Robinson et Fitter, 1999 ; Gobat *et al.*, 2003 ; Yao *et al.*, 2003 ; Simard et Durall, 2004).

La technique MicroRespTM (Campbell *et al.*, 2003) est utilisée pour étudier les activités cataboliques des micro-organismes contenus dans les sols des cultures d'*A. saligna*. L'intérêt de cette méthode est la miniaturisation des techniques de respirométrie, permettant d'obtenir pour un même bioessai des informations sur la respiration basale, la biomasse microbienne et la diversité catabolique (SIR : Substrat-Induced Respiration). Cette technique se rapproche de la technique BIOLOG (mesure de diversité fonctionnelle d'un extrait bactérien), mais a l'avantage de permettre l'étude de la diversité fonctionnelle d'un sol (Tlili *et al.*, 2011) dans sa globalité et non pas celle d'un extrait bactérien cultivé sur plusieurs jours avec les phénomènes de sélection comme dans les systèmes BIOLOG.

La diversité fonctionnelle des communautés microbiennes concerne de nombreuses activités notamment de transformation, décomposition de composés organiques et minéraux, stimulation de la croissance des plantes et des propriétés chimiques et physiques du sol (Wardle *et al.*, 1999). Elle est évaluée par la définition des profils cataboliques essentiellement impliquées dans les activités de décomposition (Degens *et al.*, 2000).

La richesse catabolique est généralement faible dans tous les sols des différents traitements du dispositif expérimental. Il y a aussi une très faible variabilité dans la consommation des substrats organiques qui montre une faible diversité et activité microbienne. La réduction de la diversité et de l'activité microbienne est bien démontrée dans les sols dégradés (Kennedy et Smith, 1995; Garcia *et al.*, 1997). La réduction de l'activité des champignons mycorhiziens est également souvent détectée dans les sols dégradés (Bethlenfalvai et Schuepp, 1994).

L'existence d'arbres adultes supportant déjà des structures mycorhiziennes a été décrite comme un moyen très efficace dans l'établissement des jeunes plants en favorisant notamment leur colonisation par les champignons mycorhiziens et donc leur survie (Newman, 1988 ; Simard et Durall, 2004). Par ailleurs, les associations mycorhiziennes sont fortement impliquées dans les successions végétales. Ainsi, sur certains sols pauvres aussi bien en éléments nutritifs qu'en propagules mycorhiziennes, les espèces végétales dépendant peu de cette symbiose vont s'installer. Par la suite, avec l'enrichissement du sol en structures mycorhiziennes, les espèces plus mycotrophes prennent la relève avec une forte corrélation positive entre les biodiversités fongique et végétale (van der Heijden *et al.*, 1998, Hart *et al.*, 2003). En revanche, il faut aussi noter que certaines espèces pionnières très mycotrophes s'installent en début de succession végétale sur des sols dégradés et favorisent par la suite le développement d'autres espèces végétales *via* un effet « plante nurse » (Azcon-Aguilar *et al.*, 2003 ; Duponnois *et al.*, 2013).

D'autres mécanismes de facilitation de la coexistence entre espèces végétales, n'impliquant pas forcément les microorganismes, ont également été observés (Callaway, 1995 ; Schenk et Mahall, 2002 ; Hauggaard-Nielsen et Jensen, 2005 ; Brooker *et al.*, 2008). En effet, certaines espèces végétales sont capables de favoriser la survie d'autres espèces *via* l'amélioration de la fertilité ou de l'humidité du sol, les rhizodépôts, l'attraction des insectes pollinisateurs, la création d'abris ou de microclimat, etc. (Callaway, 1995).

L'ensemble des résultats suggèrent que le sol *P. lentiscus* a montré l'effet le plus favorable et le plus intéressant sur la croissance et la mycorhization d'*A. saligna*. Par conséquent elle pourrait être la meilleure espèce végétale qui peut mieux coexister avec *A. saligna*. Ces deux espèces végétales sont des candidats prometteurs dans les stratégies de revégétalisation.

4. Conclusion

L'objectif de cette étude était de déterminer les principaux effets des espèces végétales d'intérêt sur la croissance et la mycorhization d'*A. saligna* dans des conditions expérimentales. Après une analyse des résultats obtenus, le sol de *P. lentiscus* a montré l'effet le plus favorable et le plus intéressant sur la croissance et la mycorhization d'*A. saligna*. Par conséquent l'espèce végétale endémique subsistant dans les sols dégradés de la sablière de Terga, qui peut être associée à *A. saligna* pour favoriser sa mycorhization naturelle et stimuler certaines communautés bactériennes liées aux cycles C-P-N, serait *P. lentiscus*.

Vu l'importance des symbioses mycorhiziennes dans la restauration des écosystèmes, la stratégie de revégétalisation suggérée est basée sur une meilleure exploitation du couple symbiotique *Acacia saligna*-CMA par l'utilisation de l'espèce végétale *P. lentiscus* qui est adaptée aux conditions locales, afin de les exploiter dans les scénarios de reboisement, comme plantes compagnes d'*A. saligna*. Cette gestion du couvert végétal, en associant plusieurs groupes fonctionnels de plantes, peut également être retenue dans les systèmes agroforestiers et améliorer ainsi la productivité de la culture associée.

Conclusion générale
et
perspectives

Conclusion générale et perspectives

En fin de cette thèse, il paraît important de dresser le bilan des résultats obtenus au cours de ce travail au regard des objectifs que nous nous étions fixés.

Notre objectif principal était la compréhension des associations mycorhiziennes arbusculaires chez une végétation d'un écosystème littoral, méditerranéen semi-aride « sablière de Terga » et leur répartition dans le sol afin d'aboutir à une gestion durable de ces habitats après exploitation.

Pour cela, nous avons effectué deux expérimentations complémentaires. La première est réalisée en milieu naturel et la seconde est réalisée sous serre.

Dans la première expérimentation, nous avons réalisé un inventaire floristique des espèces végétales présentes sur les dunes de Terga. Cette prospection botanique a permis de sélectionner les espèces végétales qui présentent un intérêt pour notre étude. Il s'agit de cinq espèces végétales : *Acacia saligna*, *Retama monosperma*, *Lotus creticus*, *Juniperus oxycedrus* et *Pistacia lentiscus*.

La présence de champignons mycorhiziens arbusculaires est détectée dans les racines de toutes les espèces végétales d'intérêt. L'intensité de mycorhization MA est importante et varie de 54 % à 82,5 % selon les espèces végétales.

La densité de spores dans le sol rhizosphérique de *R. monosperma* et *J. oxycedrus* est nettement supérieure à la densité des spores dans ceux d'*A. saligna*, *L. creticus* et *P. lentiscus*. Une dynamique saisonnière avec une augmentation de la densité des spores au printemps est affirmée. Dans l'écosystème de Terga la densité des spores est négativement corrélée aux taux de colonisation racinaire MA chez les différentes espèces végétales d'intérêt.

Les sols rhizosphériques ont un potentiel infectieux mycorhizogène important. Le sol de *R. monosperma* présente le potentiel infectieux mycorhizogène le plus faible, bien qu'il soit le plus riche en spores.

L'étude microscopique a permis de déterminer le statut mycorhizien des espèces végétales locales choisies et révéler l'existence d'une riche diversité de champignons AM dans les sols rhizosphériques de la végétation des dunes côtières de Terga. Treize morphotypes de spores endomycorhiziennes appartenant à quatre genres *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora* et

Gigaspora, sont trouvés dans le sol sablonneux des dunes du littoral de Terga avec la prédominance du genre *Glomus* dans nos conditions d'échantillonnage.

L'ensemble de ces résultats nous offre un élément de conclusion très important : La gestion du potentiel mycorhizien du sol par l'introduction d'*A. saligna*, *L. creticus* et *P. lentiscus* constitue une bonne stratégie de réhabilitation de l'écosystème de Terga. Ce sont des espèces végétales autochtones qui ont la capacité de promouvoir la symbiose mycorhizienne arbusculaire qui joue un rôle clé dans la productivité et la stabilité de l'écosystème. Elles peuvent être aussi une source importante d'inoculum MA pour la mycorhization contrôlée dans les écosystèmes semi-arides.

Les amplifications PCR nested ont prouvé une présence importante de Gloméromycètes dans les racines des plantes d'intérêt, qui nécessite une identification par l'analyse phylogénétique qui est en cours de réalisation. Le clonage a permis d'isoler le fragment d'ADN (ADNr 25S limité par 28G1/28G2) du mélange puis de travailler sur celui-ci de manière plus aisée et réaliser son séquençage.

Dans la deuxième expérimentation, les sols de la rhizosphère recueillis sous les espèces d'intérêt ont été testés pour leur influence sur la croissance et la mycorhization d'*Acacia saligna* afin de sélectionner des espèces végétales adaptées aux conditions locales susceptibles de promouvoir la croissance et la mycorhization d'*A. saligna*. Les paramètres de croissance (hauteur, biomasse aérienne et racinaire) ainsi que la colonisation racinaire mycorhizienne et l'activité catabolique des sols indiquent que les sols rhizosphériques ont une influence significative sur la croissance et la mycorhization d'*A. saligna*. Il se trouve que le sol de *P. lentiscus* a montré l'effet le plus favorable et le plus intéressant sur la croissance et la mycorhization d'*A. saligna*. Par conséquent elle pourrait être la meilleure espèce végétale qui pourrait le mieux coexister avec *A. saligna*. Ces deux espèces végétales sont des candidats prometteurs dans les stratégies de revégétalisation pour la régénération de la strate arbustive.

Vu l'importance des symbioses mycorhiziennes dans la restauration des écosystèmes, la stratégie de revégétalisation suggérée est basée sur une meilleure exploitation du couple symbiotique *Acacia saligna*-CMA par l'utilisation de l'espèce végétale *P. lentiscus* qui est adaptée aux conditions locales, afin de les exploiter dans les scénarios de reboisement, comme plantes compagnes à *A. saligna*.

Cette étude a permis d'obtenir des résultats qui nous interpellent davantage sur la nécessité d'une gestion harmonieuse des ressources naturelles dans les dunes côtières algériennes. Comme dans tout travail de recherche, des perspectives de recherche s'ouvrent : (1) l'identification moléculaire devrait être complétée par une analyse phylogénétique qui est en cours de réalisation. (2) Le dosage du phosphore assimilable par les plantes est nécessaire vu l'impact de la mycorhization dans l'assimilation du phosphore et l'amélioration de la qualité nutritionnelle de la plante. (3) En outre, il est nécessaire de prendre en considération les symbioses rhizobiennes chez les légumineuses. La symbiose rhizobienne, autant que la symbiose mycorhizienne, joue un rôle déterminant dans la structuration et la dynamique des écosystèmes végétaux (van der Heijden *et al.*, 2006). (4) Il serait intéressant de transférer l'expérimentation sur site afin de permettre une gestion des écosystèmes dégradés notamment le cas de la sablière de Terga dont des grandes surfaces exploitées restent à réhabiliter. L'expérience *in natura* permettra d'étudier le comportement de ces espèces en présence de tous les acteurs de l'écosystème qui sont négligés *in vitro*. (5) Il faudrait aussi réfléchir à introduire d'autres espèces végétales en associant des essences forestières à des plantes herbacées mycotrophes afin d'avoir un maximum d'espèces en restant toujours dans un cadre d'un écosystème natif aussi près que possible.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbas Y, Ducouso M, Abourough M, Azcon R, Duponnois R. 2006. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters woodlands in Morocco. *Ann ForSci* 63:285-291.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
- Albaladejo J, Martinez-Mena M, Roldan A, Castillo V. 1998. Soil degradation and desertification induced by vegetation removal in a semiarid environment. *Soil Use Manage.* 14:1-5.
- Alguacil M, Caravaca F, Roldán A. 2005. Changes in rhizosphere microbial activity mediated by native or allochthonous AM fungi in the reafforestation of a Mediterranean degraded environment. *Biol Fertil Soils* 41: 59-68.
- Alguacil M, Caravaca F, Dias-Vivancos P, Hernandez JA, Roldan A. 2006. Effect of arbuscular mycorrhizal and induced drought stress on antioxidant enzyme and nitrate reductase activities in *Juniperus oxycedrus* L. grown in a composted sewage sludge-amended semi- arid soil. *Plant Soil* 279: 209-218.
- Alguacil M, 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. *The Science of the Total Environment* 409: 2874-2880
- Allen M. 1991. *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press, Cambridge
- Allen M. 1996. The ecology of arbuscular mycorrhizas: a look back into the 20th century and a peek into the 21st. *Mycol Res* 100:769-782.
- Al-Whaibi M, H. 2009. Desert plants and mycorrhizae. *Journal of pure and applied Microbiology* 3(2): 457-466.
- Amrani A, Noureddine N, Bhatnagar T, Argandon M, Nieto J, Vargas C . 2010. Phenotypic and genotypic characterization of rhizobia associated with *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. In nurseries from Algeria. *Syst Appl Microbiol* 33: 44-51.
- Anderson JM, Ingram JSI. 1993. *Tropical Soil Biology and Fertility: a Handbook of Methods*. (Eds.), CAB International, Wallingford, UK.
- Anne. 1945. Le dosage rapide du carbone organique dans les sols. *Ann. Agron* 2:161-172.
- Aronson J, Floret C, Le Floc'h E, Ovalle C, Pontanier R. 1995. Restauration et réhabilitation des écosystèmes dégradés en zones arides et semi-arides. *in* Le vocabulaire et les concepts L'homme peut-il refaire ce qu'il a défait? R. Pontanier, A. M'Hiri, N. Akrimi, J. Aronson, E. Le Floc'h. John Libbey Eurotext, Paris 1995, pp. 11-29.
- Artursson V, Finlay R, Jansson J. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*. *Environmental Microbiology*. 8: 1-10.

- Augé R. 2001. Water relation drouth and vesicular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42.
- Azcon-Aguilar C, Palenzuela J, Roldan A, Bautist S, Vallejo R, Barea JM. 2003. Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrub lands. *Appl. Soil Ecol* 22: 29-37 .
- Ba M, Dalpe Y, Guissou T. 1996. Les glomales d'acacia holosericea et d'acacia mangium Bois et forêts des tropiques 250: 6-14.
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Piche Y. 1999. Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi, as revealed by in vivo two-photon microscopy. *Protoplasma* 209 : 77-89.
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124 (3): 949-958.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiol* 131: 1496-1507.
- Bagyaraj DJ. 1991. Ecology of vesicular arbuscular mycorrhiza *in* Hand book of Applied Mycology-Soil and Plants Vol.I, Eds. Arora, DK, Bharathi Rai, Mukerji K , Knudsen GR, Marcel Dekker Inc. New York, pp: 3-34.
- Bais HP, Walker TS, Stermitz FR, Hufbauer RA, Vivanco JM. 2002. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (\pm) catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology* 128: 1173-1179.
- Baker R. 1978. Inoculum potential. In *Plant Disease an Advanced Treatise Vol II. How Disease Develops in Populations* (eds. J. C. Horsfall and E. B. Cowling). Academic Press. New York pp : 137-157.
- Bañon S, Fernandez JA, Franco JA, Torrecillas A, Alarcón JJ, Sánchezblanco MJ. 2004. Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. *Scientia Horticulturae* 101: 333-342.
- Barea JM, Azcon-Aguilar C, Azcon R. 1988. The role of mycorrhiza in improving the establishment and function of the Rhizobium-legume system under field conditions. In: Beck DP, Materon LA (eds) *Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture*. Nijhof, Dordrecht.
- Barea J. M., Azcon-Aguilar C., Azcon R. 1997. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: Gange A. C. Brown V. K. (Eds.). *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. Blackwell Science, Cambridge, pp. 65-77.
- Barthes B, Roose E. 2002. Aggregate stability as an indicator of soil susceptibility to runoff and erosion validation at several levels. *Catena* 47: 133-149.
- Baudière A, Monange Y, Gauquelin Th. 2002 . *Le Monde des Plantes*. Intermédiaire des Botanistes. Toulouse 477: 2 - 5.

- Bécard G, Piche Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular–arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol* 55:2320–2325.
- Bécard G, Pfeffer PE. 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174: 62– 68.
- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C. 2004. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can J Bot - Rev Can Bot* 82 : 1186–1197.
- Becker WN; Hall IR. 1976. *Gigaspora margarita*, a new species in the Endogonaceae. *Mycotaxon*. 4(1):155-160.
- Bedini S, Maremmani A, Giovannetti M. 2000. Paris-type mycorrhizas in *Smilax aspera* L. growing in a Mediterranean sclerophyllous wood. *Mycorrhiza* 10: 9–13.
- Beena KR, Raviraja NS, Arun AB, Sridhar KR. 2000. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi on the coastal sand dunes of the west coast of India. *Current Science* 79:1459-1466.
- Belesky DP.1999. *in*: P.R. Beuselinck Ed. Lotus Species Used in Reclamation, Renovation and Revegetation, CSSA Special Publication Number 28, Madison, Wisconsin: 133–143.
- Bellingham PJ, Walker LR, Wardle DA. 2001. Differential facilitation by a nitrogen-fixing shrub during primary succession influences relative performance of canopy tree species, *J. Ecol* 89: 861–875.
- Beniston NT-WS. 1985. Fleurs d'Algérie. Entreprise nationale des arts graphiques. Eds, Reghaia, Algérie, p : 112. *in* Ighilhariz Z. 1990. Etude de comportement physiologique biochimique et structural de *Retama retam* (R'tem) vis-à-vis du chlorure de sodium. Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-sénia, Oran, Algérie.
- Bennett M, Onnebo SM, Azevedo C, Saiardi A. 2006. Inositol pyrophosphates: metabolism and signaling. *Cell Mol Life Sci* 63(5):552-64.
- Bertness MD, Callaway RM. 1994. Positive interactions in communities. *Trends Ecol Evol* 9: 191-193.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais J-C, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology* 4: 226.
- Besserer A, Bécard G, Jauneau A, Roux C, Séjalon-Delmas N. 2008. GR24, a synthetic analog of strigolactones, stimulates the mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energy metabolism. *Plant Physiology* 148: 402–413.
- Besserer A, Bécard G, Roux C, Séjalon-Delmas N. 2009. Role of mitochondria in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to strigolactones. *Plant Signaling and Behavior* 4: 75–77.
- Bethlenfalvay GJ, Schüepp H. 1994. Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. *in*: Gianinazzi S, Schüepp H (eds); *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Birkhauser Verlag; Basel, Switzerland. pp: 117-131.

- Bever J.D, Morton J.B, Antonovics J. et Schultz, P.A. 1996. Horst-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in mown grassland. *J. Ecol* vol 84: 71-82.
- Bianciotto V, Barbiero G, Bonfante P. 1995. Analyses of the cell cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus by flow cytometry and bromo- deoxyuridin labeling. *Protoplasma* 188: 161–169.
- Biermann BJ, Linderman RG. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 95:97-105.
- Blaszkowski J, Tadych M. 1997. *Glomus multiforum* and *G. verruculosum*, two new species in Glomales (Zygomycetes) from Poland. *Mycologia*. 89(5): 804-811.
- Bouwmeester HJ, Roux C, Lopez-Raez JA, Bécard G. 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* 12: 224–230.
- Boukhatem ZF, Domergue O, Bekki A, Merabet C, Sekkour S, Bouazza F, Duponnois R, de Lajudie P, Galiana A. 2012. Symbiotic characterization and diversity of rhizobia associated with native and introduced acacias in arid and semi-arid regions in Algeria. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 534–547.
- Bonfante P, Bianciotto V. 1995. Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi: morphology and cytology. In: Varma, A., Hock, B. (Eds.), *Mycorrhiza*. Springer, Berlin, pp: 229– 247.
- Bonfante P, Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1, 48.doi: 10.1038/ncomms1046.
- Boydak M, Dogru, M. 1997. The exchange of experience and state of the art in sustainable forest management (sfm) by ecoregion: mediterranean forests. XI World Forestry Congress, Antalya.Turkey.October.
- Brooker RW, Maestre FT, Callaway RM, Lortie CL, Cavieres LA, Kunstler G, Liancourt P, Tielbörger K, Travis JMJ, Anthelme F, Armas C, CollL, Corcket E, Delzon S, Forey E, Kikvidze Z, Olofsson J, Pugnaire F, Quiroz CL, Saccone P, Schiffers K, Seifan M, Touzard B, Michalet R. 2008. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. *Journal of Ecology* 96: 18-34.
- Brundrett M. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Adv. Ecol. Res* 21: 171-313.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Brundrett MC. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol . Rev* 79: 473–495.
- Bruno JF, Stachowicz JJ, Bertness MD. 2003. Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends Ecol. Evol* 18:119-125.
- Buee M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant–Microbe Interact* 13: 693–698.

- Callot G, Dupuis M. 1980. Le calcaire actif des sols et sa signification. Dull. Afes :17-26.
- Callaway RM. 1995. Positive interactions among plants. Bot Rev 61: 306-349.
- Campbell CD, Chapman SJ, Cameron CM, Davidson MS, Potts JM. 2003. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. Applied and Environmental Microbiology 69 : 3593-3599.
- Camprubí A, Calvet C, Cabot P, Pitet M, Estaún V. 2010. Arbuscularmycorrhizal fungi associated with psammophilic vegetation in Mediterranean coastal sand dunes. Spanish Journal of Agricultural Research 8: 96-102
- Caravaca F, Barea JM, Palenzuela J, Figuerola D, Alguacil MM, Roldan A. 2003. Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscularmycorrhizal fungi. Applied Soil Ecology 22:103-111
- Caravaca F, Alguacil MM, Azcón R, Roldán A. 2006. Formation of stable aggregates in rhizosphere soil of *Juniperus oxycedrus*: Effects of AM fungi and organic amendments. Appl. Soil Ecol 33:30-38
- Carpenter, Allen MF. 1988. Responses of *Hedysarum boreale* to mycorrhizas and Rhizobium: plant and soil nutrient changes in a disturbed shrub-steppe. New Phytologist 109: 125-132.
- Carreira JA, Asensi A, Niell FX. 1991. Sustitucion de comunidades y concentracion de nutrientes en plantas tras incendios forestales en unacuenca subaridadel SE de Espana. Organismes i Sistemes 6 : 199-214.
- Carreira JA, Lajtha K. 1997. Factors affecting phosphate sorption along a Mediterranean, dolomitic soil and vegetation chronosequence. European Journal of Soil Science 48: 139-149.
- Castro J, Zamora R, Hodar JA, Gomez JM. 2002. Use of shrubs as nurse plants: a new technique for reforestation in Mediterranean mountains. Restoration Ecology 10:297-305.
- Chabaud M, Genre A, Sieberer BJ, Faccio A, Fournier J, Novero M, Barker DG, Bonfante P. 2011. Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca²⁺ speking in the legume and non legume root epidermis. New Phytol 189: 347-355.
- Chesson P. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. Annual Review of Ecology and Systematics 31: 343-366.
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizins from a natural community. New Phytologist 130:259-265
- Cooke JC, Lefor MW. 1990. Comparison of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plants from disturbed and adjacent un-disturbed regions of coastal salt marsh in Clinton, Connecticut, USA. Environmental Management 14: 131-137.
- Cooke JC, Lefor MW. 1998. The mycorrhizal status of selected plant species from Connecticut wetlands and transition zones. Restoration Ecology 6: 213-222.

- Cornet F, Diem HG. 1982. Etude comparative de l'efficacité des souches de Rhizobium d'Acacia isolées de sols du Sénégal et effet de la double symbiose Rhizobium 1 Glomus mossaea sur la croissance d'Acacia holosericea et A. raddiana. Bois et Forêts des Tropiques 198 : 3-15.
- Crompton H. 1992. *Acacia saligna* for dry land fodder and soil stabilization. NFT Highlights NFTA 92-03: 1-2.
- Dabire AP, Hien V, Kisa M, Bilgo A, Sangare KS, Plenchette C, Galiana A, Prin Y, Duponnois R. 2007. Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. Mycorrhiza 17: 537-545.
- Dalpe R, Debresson C, Xiaoping H. 1992. The public sector as first user of innovations. Research Policy : 213-251.
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. 2001. Molecular diversity of arbuscular-mycorrhizal fungi colonizing arable crops. FEMS Microbiol. Ecol 36:203-209.
- Daniels BA, Skipper HD. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Ed. N. C. Schenck. The American Phytopathological Society :29-36
- Da Silva GA, Lumini E, Maia LC, Bonfante P, Bianciotto V. 2006. Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. Mycorrhiza 16: 183-189.
- De Angelis DL, Post WM, Travis CC. 1986. Positive feedback in natural systems. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Declerck S, Risede JM, Rufyikiri G, Delvaux B. 2002. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on severity of root rot of bananas caused by *Cylindrocladium spathiphylli*. Plant Pathology 51(1):109-115.
- Degens BP, Schipper LA, Sparling GP, Vojvodic-Vukovic M. 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. Soil Biology & Biochemistry 32: 189-196.
- De La cruz RE, Manalo M Q, Aggangan N S, Tambalo J D. 1988. Growth of three legume trees inoculated with VA mycorrhizal fungi and Rhizobium. Plant and Soil 108: 111-115.
- Diagne O, Ingleby K. 2003. Écologie des champignons mycorrhiziens arbusculaire infecant *Acacia raddiana*. In Un arbre au désert, Grouzis M, Floc HL (eds) IRD Editions . Paris : 205-228.
- Dianda M. 1991. Comparaison des effets de champignons V.A. introduits et indigènes associés ou non à Bradyrhizobium, sur la la croissance d'*Acacia albida*. Dans : Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semiarides. de John Libbey Eurotext (Paris), pp. 263-269.
- Diem HG, Gueye I, Gianinazzi-Pearson V, Fortin JA, Dommergues YR. 1981. Ecology of VA mycorrhizae in the tropics : The semi-arid zone of Senegal. Acta Oecologica / Oecologia Plantarum, 16 : 53-62.

- Diem GH, Dommergues Y, Duhoux E. 1998. Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques et rôles dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux IRD, FAO, CIRAD.
- Diop T, Gueye M, Dreyfus B, Plenchette C, Strullu DG. 1994. Indigenous arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Acacia albida* Del. in different areas of Senegal. *Appl. Environ. Microbiol* 60: 3433-3436.
- Dommergues Y, Mangenot F. 1970. *Ecologie microbienne du sol*. Masson, Paris.
- Donald CM. 1958. The interaction of competition for light and for nutrient. *Australian Journal of Agricultural Research* 9: 421-435.
- Douhan GW, Petersen C, Bledsoe CS, Rizzo DM. 2005. Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? *Mycorrhiza* 15:365–372.
- Douds Jr DD, Millner PD. 1999. Biodiversity of arbuscular-mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agric. Ecosys. Environ.* 74:77-93.
- Ducousso M, Thoen D. 1991. Les types mycorrhiziens des *Acacieae*. In : *Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi-arides*. Groupe d'Etude de l'Arbre. Paris, France. pp: 175-182.
- Duponnois R, Cadet P. 1994. Interactions of *Meloidogyne javanica* and *Glomus* sp. on growth and N₂ fixation of *Acacia seyal*. *Afro Asian Journal of Nematology* 4 :228-233.
- Duponnois R, Plenchette C, Thioulouse J, Cadet P. 2001. The mycorrhizal soil infectivity and arbuscular mycorrhizal fungal spore communities in soils of different aged fallows in Senegal. *Appl. Soil Ecol* 17:239-251
- Duponnois R, Founoune H, Masse D, Pontanier R. 2005. Inoculation of *Acacia holosericea* with ecto mycorrhizal fungi in a semi-arid site in Senegal : growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation. *Forest Ecology and Management* 207: 351-362.
- Duponnois R, Plenchette C, Prin Y, Ducousso M, Kisa M; Ba AM; Galiana A. 2007. Use of mycorrhizal inoculation to improve reforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. *Ecological Engineering* 29 :105-112.
- Duponnois R , Bâ A M, Prin Y, Baudoin E, Galiana A , Dreyfus B. 2010. Les champignons mycorrhiziens : une composante majeure dans les processus biologiques régissant la stabilité et la productivité des écosystèmes forestiers tropicaux p : 421-440 . IN *Le projet majeur africain de la Grande Muraille Verte* Abdoulaye Dia ?Robin Duponnois EDS IRD.
- Duponnois R, Ramanankierana H, Hafidi M, Baohanta R, Baudoin E, Thioulouse J, Sanguin H, Bâ A, Galiana A, Bally R, Lebrun M, Prin Y. 2013. Des ressources végétales endémiques pour optimiser durablement les opérations de réhabilitation du couvert forestier en milieu méditerranéen et tropical : exemple des plantes facilitatrices vectrices de propagation des champignons mycorrhiziens *Comptes rendus biologies* 336: 265-272.
- El-Lakany HH. 1987. Protective and productive tree plantations for desert development. Proc. of the 2nd International Conference on Desert Development, 25–31 January, Cairo, Egypt.

- Escaray FJ, Rosique FJC, Scambato AA, Bilenca D, Carrasco P, Matarredona AV, Ruiz OA, Menéndez AB. 2010. Evaluation of a technical revegetation action performed on foredunes at Devesa de la Albufera. Valencia, Spain. *Land Degrad Dev* 21: 239-247.
- Escaray FJ, Menendez AB, Gárriz A, Pieckenstain FL, Estrella MJ, Castagno LN, Carrasco P, Sanjuánd J, Ruiz OA. 2012. Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Science* 182: 121– 133.
- Estaun V, Save R, Biel C. 1997. AM inoculation as a biological tool to improve plant revegetation of a disturbed soil with *Rosmarinu sofficialis* under semi-arid conditions. *Applied Soil Ecology* 6: 223-229.
- Ferrol N, Calvente R, Cano C, Barea JM, Azcón-Aguilar C. 2004. Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource islands from a desertification threatened semiarid Mediterranean ecosystem. *Appl Soil Ecol* 25: 123-133.
- Finlay RD. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J Exp Bot* 59: 1115-1126.
- Fitter AH, Moyersoen B. 1996. Evolutionary trends in root microbe symbioses. *Philos Trans R Soc Lond B* 351:1367–1375.
- Fitter AH, Gilligan CA, Hollingworth K, Kleczkowski A, Twyman RM, Pitchford JW. 2005. Biodiversity and ecosystem function in soil. *Funct Ecol* 19: 369–377.
- Founoune H, Duponnois R, Bâ AM , El Bouami F. 2002. Influence of the dual arbuscul arendo mycorrhizal/ ectomycorrhizal symbiosis on the growth of *Acacia holosericea*(A. Cunn ex G. Don) in glasshouse conditions. *Ann ForSci* 59: 93-98.
- Frank B. 1885. Uber die auf Wurzelymbioseberuhende Ernährunggewisser Baumedurchunterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gessellschaft* 3: 128–145.
- Frioni L, Minasian H, Volfovicz R. 1999. Arbuscularmycorrhizae and ecto mycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. *For. Ecol. Manage* 115: 41-47.
- Gallaud J .1905. Étude sur les mycorrhizes endotrophes. *Rev Bot.* In :Koide RT, Mosse B 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14:145-163.
- Garbaye J. 2013. La symbiose mycorrhizienne, une association entre les plantes et les champignons. (Eds) Quae p 280.
- Garcia C, Roldan A, Hernandez T. 1997. Changes in microbial activity after abandonment of cultivation in a semi-arid Mediterranean environment. *Journal of Environment Quality* 26: 285-291.
- Gavériaux JP. 2012. Les glomeromycota. *Bull. Soc. Mycol. Nord Fr* 92:01-17.
- 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. *Plant Cell* 17: 3489–3499.

- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P. 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20: 1407-1420.
- George E; Romheld V, Marschner H. 1994. Contribution of mycorrhizal fungi to micronutrient uptake by plants. In *Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere* (eds) J.A. Monthey, D.E Crowley and D.G. Luster pp93-109. Boca raton FL CRC Press.
- George E, Gorgus E, Schmeisser A, Marschner H. 1996. A method to measure nutrient uptake from soil by mycorrhizal hyphae. In *Mycorrhizas in Integrated System from Genes to plant Development* (eds) Azcon-Aguilar and JM Barea). Luxembourg. European Community.
- Gerdemann JW. 1955. Relation of a large soil-borne spore to phyto-mycetous mycorrhizal infections. *Mycologia* 47: 619-632.
- Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhiza lendarone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br.mycol.soc* 46: 235-244.
- Gerdemann JW, Trappe JM. 1974. The Endogonaceae in the Pacific North West. *Mycologia Memoirs* 5: 1-76.
- Ghodbani T. 2008. Extractions du sable dunaire à Terga plage, Algérie ouest Impacts sur l'environnement, conflits d'usagers et outils de gestion. Proceedings of the international pluridisciplinary conference "The littoral: challenge, dialogue, action", 16-18 january 2008. Lille, France.
- Gianinazzi-Pearson V. 1982. Physiologie des endomycorhizes et perspectives offertes par leur utilisation. *Compte Rendu de l'Académie Agricole de France* 68:380-389.
- Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S. 1989. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-255.
- Giovannetti M, Nicolson TH. 1983. Vesicular-arbuscular mycorrhizas in Italian sand dunes. *Trans Br Mycol Soc* 80:552-557.
- Giovannetti M. 1985. Seasonal variations of vesicular-arbuscular mycorrhizae and Endogonaceous spores in a maritime sand dune. *Trans. Br. Mycol. Soc* 84: 485-500.
- Gobat JM, Aragno M, Matthey W. 2003. *Le sol vivant : Bases de pédologie, Biologie des sols*. Presses polytechniques et universitaires romandes (Ed) p : 528.
- 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. *Mycorrhizal* 4: 111-117.
- Gomez-Aparicio L, Zamora R, Gómez JM, Hódar JA, Castro J, Baraza E. 2004. Applying plant facilitation to forest restoration in Mediterranean ecosystems: a meta-analysis of the use of shrubs as nurse plants. *Ecol. Appl.* 14:1128 -1138.

- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pages V, Dun EA, Pillot J-P, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais J-C. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455:189–194.
- Govindarajulu , M. , Pfeffer , P.E. , Jin , H.R. , Abubaker , J. , Douds , D.D. , Allen , J.W. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis . *Nature* 43.
- Graham JH. 2001. What do root pathogens see in mycorrhizas? *New Phytol* 149:357–359.
- Grove T, Rackham O. 2001. The nature of Mediterranean Europe: an ecological history. Yale University Press, London,UK.
- Grove T, Le Tacon F, 1993. Mycorrhiza in plantation forestry, *Adv.Plant Pathol* 23 :191-227.
- Gutjahr C, Casieri L, Paszkowski U. 2009. *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytologist* 182(4):829-837.
- Harrison MJ. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59: 19–42.
- Hart MM, Reader RJ, Klironomos JN. 2003. Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi. *Trends Ecol. Evol* 18:418-423.
- Hatimi A. 1995. Symbiotes racinaires de trois légumineuses arborescentes de dunes littorales de Souss-Massa. Ed. INRA, Paris, Les Colloques 77:183-190.
- Hatimi A, Tahrouch S. 2007. Caractérisation chimique, botanique et micro biologique du sol des dunes littorales du Souss-Massa. *Biomatec Echo* 2(5):85-97.
- Hauggaard-Nielsen H, Jensen ES. 2005. Facilitative root interaction in intercrops. *Plant Soil* 274 :237–250.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford, Oxon.
- Hayman DS. 1970. Endogone spores numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatments. *Trans. Br. Mycol. Soc* 54(1): 53-63. 49
- Hayman DS. 1982. Practical aspects of vesicular arbuscular mycomhiza. *in Advances in Agric. Microbiol.* Ed. N S Subba Rao. pp : 325–373.
- Helgason A, Pa' lsson S, Thorleifsson G, et al. 2007. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet* 39(2): 218-225.
- Hepper FN. 1979. Second edition of the map showing the extent of floristic exploration in Africa south of the Sahara, published by A.E.T.F.A.T. In G. Kunkel, Taxonomic aspects of African economic botany. Proceedings of the IX Plenary Meeting of A.E.T.F.A.T. Las Palmas de Gran Canaria, 18-23 March, 1978. pp: 157-162.

- Herrera CM. 1992. Historical effects and sorting processes as explanations for contemporary ecological patterns : character syndromes in mediterranean woody plants. *American Naturalist* 140: 421-446.
- Herrera MA, Salamanca CP, Barea JM. 1993: Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol* 59: 129–133.
- He X.-H, Critchley C, Bledsoe C. 2003. Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Crit. Rev. Plant Sci* 22: 531–567.
- Hijri I, Sykorova Z, Oehl F, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, edecker D. 2006. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low indiversity. *Mol Ecol* 15: 2277-2289.
- Hildebrandt U, Janetta K, Ouziad F, Renne B, Nawrath Bothe KH. 2001. Arbuscular mycorrhizal colonization of halophytes in Central European salt marshes. *Mycorrhiza* 10:175-183.
- Hinsinger P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237: 173–195.
- Hoefnagels MH, Broome SW, Shafer SR. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in salt marshes in north Carolina. *Estuaries* 16:851-858.
- Hodge A, Campbell CD, Fitter HA, 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature* 413, 297–299.
- Holl KD. 2002. Effect of shrubs on tree seedling establishment in an abandoned tropical pasture. *Journal of Ecology* 90: 179-187.
- Hopper SD, Maslin BR. 1978. Phytogeography of Acacia in Western Australia. *Aust. J. Bot.* 26:63–78.
- Hunter AF, Aarssen LW. 1988. Plants helping plants. *Bioscience* 38:34-40.
- Ighilhariz Z. 1990. Etude de comportement physiologique biochimique et structural de *Retama retam* (R'tem) vis-à-vis du chlorure de sodium. Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-sénia, Oran, Algérie.
- Janos DP. 1980. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica* 12 : 56–64.
- Jansa J, Bukovská P, Gryndler M. 2013. Mycorrhizal hyphae as ecological niche for highly specialized hypersymbionts-or just soil free-riders? *Frontiers in Plant Science* 4:134.
- Jasper DA, Abbot LK, Robson AD. 1991. The effect of soil disturbance on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soils from different vegetation types. *N. Phytol* 118: 471-476
- Jeffries P, Barea JM. 2001. Arbuscular mycorrhiza-a key component of sustainable plant–soil ecosystems in Hock B (Ed.), *The Mycota IX Fungal Associations*. Springer, Berlin, pp: 95-113.

- Jensen A, Jakobsen I. 1980. The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in barley and wheat grown in some Danish soils with different fertilizer treatments. *Plant and Soil* 55: 403-414.
- Joffre R, Rambal S, Damesin C. 2007. Functional attributes in Mediterranean-type ecosystems. In : *Hand book of functional plant ecology* (Pugnaire Francisco & Valladares Fernando, Eds., CRC Press, Boca raton, Florida, 285-312.
- Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol* 48:1-13
- Johnson CR, Michelini S. 1975. Effect of mycorrhizae on container grown Acacia. *Proceeding, Florida state Horticultural society* 87: 520-522.
- Johnson N, Zak D, Tilman D, Pfleger F. 1991. Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. *Oecologia* 86(3): 349-358.
- Joner EJ, Leyval C. 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ Sci Technol* 37:2371-2375
- Kennedy AC, Smith KL. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170: 75-86.
- Killick DJB. 1979. African mountain heathlands. In : R.L. Specht, ed. *Heathlands and Related Shrubland of the World*. Elsevier, Amsterdam :97-116.
- Kisa M, Sanon A, Thioulouse J, Assigbetse K, Sylla S, Spichiger R, Dieng L, Berthelin J, Prin Y, Galiana A, Lepage M, Duponnois R. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis counterbalance the negative influence of the exotic tree species *Eucalyptus camaldulensis* on the structure and functioning of soil microbial communities in a sahelian soil. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 32-44.
- Klironomos JN, Hart MM. 2002. Colonisation of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12: 181-184.
- Kooijman AM, Jongejans J, Sevink, J. 2005. Parent material effects on Mediterranean woodland ecosystems in NE Spain. *Catena* 59 (1): 55-68.
- Koske R E. 1975. Endogone spores in Australian sand dunes. *Canadian Journal of Botany* 53:668-72.
- Koske RE, Polson WR. 1984. Are VA mycorrhizae required for sand dune stabilization? *BioScience* 34: 420-424.
- Koske RE, Walker C. 1985. Species of *Gigaspora* (Endogonaceae) with roughened outer walls. *Mycologia* 77: 702-720.
- Koske RE, Gemma JN., 1997. Mycorrhizae and succession in plantings of beach grass in sand dunes. *84(1)*: 118-130.
- Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED. 2008. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 9823–9828.

Krings M, Taylor TN, Hass H, Kerp H, Dotzler N, Hermsen EJ. 2007. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytol* 174: 648-657.

Kuhn H, Küster H, Requena N. 2010. Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 185: 716–733.

Lambers H, Raven JA, Shaver GR, Smith SE. 2008. Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology & Evolution* 23: 95-103.

Lambert DH, Baker DE, Cole HJR.. 1979. The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper, and other elements. *Soil Sci. Soc. Am* 43: 976–980.

Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, Van Breemen, N. 2001. Linking plant to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 248-255.

Lee J, Lee S, Young JPW. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 339 –349.

Lesueur D, Diem HG. 1997. The requirement of iron for nodulation and growth of *Acacia mangium*. *Canadian journal of forest research* 27(5):686-692.

Le Tacon F, Garbaye J, Carr G. 1987. The use of mycorrhizas in tropical forests ». In : *Trees and mycorrhiza. Proceedings of the Asian Seminar, 13-17 April 1987, Kuala Lumpur*, Ed. F. S. NGP : 15-32.

Le Tacon F, Selosse MA. 1997. The role of mycorrhizae in the colonization of continents and diversification of terrestrial ecosystems. *Revue Forestiere Francaise (France)* p15-24.

Leyval C, Joner EJ. 2001. Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. *in: Trace elements in the rhizosphere*. CRC Press pp 165-185.

Lewis MR, Cullen JJ, Platt T. 1984. Relationships between vertical mixing and photoadaptation of phytoplankton : similarity criteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser* 15: 141-149.

Li T, Zhao ZW. 2005. Arbuscular mycorrhizas in a hot and arid ecosystem in southwest China. *Appl Soil Ecol* 29: 135-141.

Linderman RG. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizospheremicroflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366-371.

Liu A, Hamel C, Elmi A, Costa C, Ma B, Smith DL. 2002. Concentrations of K, Ca and Mg in maize colonised by arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. *Can. J. Soil Sci* 82(3): 271-278.

- 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. *The Plant Journal* 50: 529–544
- Logi C, Sbrana C, Giovannetti M. 1998. Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied Environmental Microbiology* 64: 3473–3479
- Lovelock CE, Wright SF, Clark DA, Ruess RW. 2004. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology* 92: 278-287.
- Mansouri LM. 2011. Production d'inoculum de Rhizobium associés à *Acacia saligna* pour la revégétalisation de la carrière de Terga (Ain Témouchent). Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-sénia, Oran, Algérie.
- Maremmani A, Bedini S, Matošević I, Tomei PE, Giovannetti M. 2003. Type of mycorrhizal associations in two coastal nature reserves of the Mediterranean basin. *Mycorrhiza* 13: 33-40.
- Marschner P, Timonen S. 2005. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Appl Soil Ecol* 28: 23–36.
- Maslin BR. 1974. Studies in the genus *Acacia*-2-*Miscellaneous* new phyllodinous species. *Nuytsia* 1:315-331.-3-The taxonomy of *A. saligna* (Labill.) H. Wendl. *Nuytsia* 1:322-340.
- Marsudi NDS, Glenn AR, Dilworth MJ. 1999. Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. *Soil Biol Biochem* 31: 1229–1238.
- Mathur N, Vyas A. 2000. Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* under water stress. *J. of Arid Environ* 45: 191-195.
- Maillet F, Poinot V, Andre O, Puech-Pages V, Haouy A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel A, et al . 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58–63.
- Mayor X , Rodà, F. 1994. Effects of irrigation and fertilization on stem diameter growth in a Mediterranean holmoak forest. *Forest ecology and management* 68(1): 119-126.
- McGee P. 1986. Mycorrhizal associations of plant species in a semiarid community. *Australian Journal of Botany* 34:585-593.
- Merryweather J, Fitter A. 1998. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non scripta*. II. Seasonal and spatial patterns of fungal populations. *New Phytol* 138:131-142.
- Miller DD, Domoto PA, Walker C. 1985. Colonization and efficacy of different endomycorrhizal fungi with Apple seedlings at two phosphorus levels. *New Phytologist* 100: 393-402.
- Mitcheh A. 1986. Tous les Arbres de nos Forêts, édition Bordas, p : 319.

- More D, White J. 2005. Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion, pp 18 :797.
- Morton JB. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32:267-324.
- Morton JB. 1985. Variation in mycorrhizal and spore morphology of *Glomusocultum* and *Glomusdiaphanum* as influenced by plant host and soil environment. *Mycologia*. 77: 192-204.
- Morton JB. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32:267–324
- Morton JB, Benny, GL. 1990. Revised classification of arbuscularmycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Morton JB, Bentivenga SP, Wheeler WW. 1993. Germ plasma in the International Collection of Arbuscular and Vesicular–arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48: 491-528.
- Mosse B. 1981. VAM research for tropical agriculture. *Res. Bull. Hawaii Inst. Trop. Agric. Human Res* 94:5-82.
- Mosse B. 1988. Some studies relating to “independent” growth of vesicular arbuscular endophytes. *Can. J. Bot* 66: 2533–2540.
- Mukerji KG, Kapoor A. 1986. Occurrence and importance of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in semiarid regions of India. *For. Ecol. Manage* 18: 117-126.
- Nasr H. 1985. Approche expérimentale de l’amélioration de la fixation biologique de l’azote chez une légumineuse arborescente : *Acacia cyanophylla* Lindl. *DE*. 63.
- Nasr H, Diem HG. 1987. Effet de l’endomycorhization vésiculo-arbusculaire sur la croissance et la fixation de l’azote par *Acacia cyanophylla* Lindl. In: les arbres fixateurs d’azote, pp :232-243. Paris : OR STOM.
- Nehls U, Mikolajewski S, Magel E, Hampp R. 2001. Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas : gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytologist* 150: 533–541.
- Newman EL. 1988. Mycorrhizal links between plants: their functioning and ecological significance. *Advances in Ecological Research* 18: 243-270.
- Nicolson TH. 1960. Mycorrhiza in the gramineae. II. Developpement in different habitats, particularly sand dunes. *Trans. Br. Mycol. Soc* 43(1):132-145.
- Nicolson TH, Johnston C. 1979. Mycorrhiza in the gramineae. III. *Glomus fasciculatum* as the endophyte of pioner grasses in a maritime sand dune. *Trans. BR. Mycol. Soc* 72:261-268.
- Norman MJT, Pearson CJ, Searle PGE. 1995. *The Ecology of Tropical Food Crops*. Cambridge University Press, Cambridge: 436.

- Nouaim R, Chaussod R, El Aboudi A, Schnabel C, Peltier JP. 1991. L'arganier : essai de synthèse des connaissances sur cet arbre. In: Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Groupe d'étude de l'arbre (Paris), pp 373-388.
- Nouaim R, Chaussod R. 1996. Rôle des mycorhizes dans l'alimentation hydrique et minérale des plantes , notamment des ligneux de zones arides Cahiers Options Méditerranéennes 20 : 9- 26.
- Oehl F, Sieverding E, Palenzuela J, Ineichen K, Silva GA. 2011. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. IMA Fungus 2: 191–199.
- Offre P, Pivato B, Siblot S, Gamalero E, Corberand T, Lemanceau P, Mougel C. 2007. Identification of Bacterial Groups Preferentially Associated with Mycorrhizal Roots of *Medicago truncatula*. Appl Environ Microbiol 73:913– 921.
- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, Gough C. 2005. Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. Plant Journal 44: 195–207.
- Olsson PA, Thingstrup I, Jakobsen I, Bââth E. 1999. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. SoilBiology and Biochemistry 31: 1879-1887.
- 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.
- Ortas I, Harries PJ, Rowell DI. 1996. Enhanced uptake of phosphorus by mycorrhizal sorghum plants as influenced by form of nitrogen. Plant Soil 184:255-264.
- Ouahmane L, Duponnois R, Hafidi M, Kisa M, Boumezzough A, Thioulouse J, Plenchette C. 2006a. Some Mediterranean plant species (*Lavandula* spp. and *Thymus satureioides*) act as potential “plant nurses” for the early growth of *Cupressus atlantica*. Plant Ecol 185:123-124.
- Ouahmane L, Hafidi M, Kisa M, Boumezzouch A, Thioulouse J, Duponnois R. 2006b. *Lavandula* species as a source of arbuscular mycorrhizal propagules facilitating the early development of *Cupressus arizonica*. Appl. Soil Ecol 34: 190-199.
- Ozenda P. 1958. Flore du Sahara septentrional et centrale .CNRS., Paris. 486p. in Ighilhariz Z. 1990. Etude de comportement physiologique biochimique et structural de *Retama retam* (R'tem) vis-à-vis du chlorure de sodium. Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-sénia, Oran, Algérie.
- Parniske M. 2005. Plant-fungal associations: Cue for the branching connection. Nature 435: 750–751.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Review Microbiology 6: 763–775.
- Peterson GD, Allen CR, Holling CS. 1998. Ecological resilience, biodiversity, and scale. Ecosystems 1: 6–18.

- Pfeffer PE, Bago B, Shachar-hill Y. 2001. Exploring mycorrhizal function with NMR spectroscopy. *New Phytologist* 150: 543–553.
- 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.
- Pielou EC. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Biol* 13:131-144.
- Pirozynski KA, Malloch DW. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6(3):153-64.
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. 1982. Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107: 535-538.
- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. 1983. Growth response of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant & Soil* 70: 199-209.
- Plenchette C. 1989. Potentiel infectieux mycorrhizogène du sol des parcelles du dispositif Dehérain. *C.R. Acad. Agric. Fr* 75: 23-29.
- Plenchette C, Perrin R, Duvert P. 1989. The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. *Can. J. Bot* 67:112-115.
- Pons F, Gianinazzi-Pearson V. 1984. Influence du phosphore, du potassium, de l'azote et du pH sur le comportement in vitro de champignons endomycorrhizogènes à vésicules et arbuscules. *Cryptogamie-Mycologie* 5 : 87-100.
- Poulin M, Simard J, Catford JG, Labrie F, Piché Y. 1997. Response of symbiotic endomycorrhizal fungi to estrogens and antiestrogens. *Mol. Plant–Microbe Interact* 10:481-487.
- Pumplin N, Harrison MJ. 2009. Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 151: 809-819.
- Pozo MJ, Azcon-Aguilar C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 393-398.
- Quezel P, Santa S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 2 tomes CNRS, ed ; France 1170p. in Ighilhariz Z. 1990. Etude de comportement physiologique biochimique et structural de *Retama retam* (R'tem) vis-à-vis du chlorure de sodium. Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-sénia, Oran, Algérie.
- Quezel P, Gast M. 1998. Genévrier. *Encyclopédie berbère*, 20 Gauda-Girrei, Aix-en-Provence, Edisud p. 3016-3023.
- Rambelli A. 1973. The Rhizosphere of Mycorrhizae. in: Marks GL, Koslowski TT (eds): *Ectomycorrhizae, their ecology and physiology*. Academic Press, New York. pp: 299-343.

- Redecker D, Morton JB, Bruns TD. 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol. Phylogen. Evol.* 14: 276-284.
- Reddell P, Warren R. 1987. Inoculation of acacias with mycorrhizal fungi: potential benefits. *in*: Turnbull JW. (ed.), *Australian Acacias in Developing Countries*,. ACIAR proceedings Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia 16: 50-53.
- Rejili M, Vadel AM, Guetet A, Mahdhi M, Lachiheb B, Ferchichi A, Mars M. 2009. Influence of temperature and salinity on the germination of *Lotus creticus* (L.) from the arid land of Tunisia, *Afr. J. Ecol* 48: 329-337.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994. Four hundred million year old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:11841-11843.
- Requena N, Jeffries P, Barea JM. 1996. Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol* 62: 842-847.
- Requena N, Jimenez I, Toro M, Barea JM. 1997. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytol.* 136: 667-677.
- Requena N, Perez-Solis E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM. 2001. Management of indigenous Plant–Microbe Symbioses aids restoration of desertifiedecosystems.*Appl. Environ. Microbiol* 67: 495-498.
- Requena N, Serrano E, Ocon A, Breuninger M. 2007. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68:33-40.
- Rillig MC, Mummey DL. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist.* 171: 41-53.
- Robinson D, Fitter A. 1999. The magnitude and control of carbon transfer between plants linked by a common mycorrhizal network. *Journal of Experimental Botany* 330:9-13.
- Rouiller J, Souchier B, Bruckert S, Feller C, Toutain F, Védry JC. 1994. Méthodes d'analyses des sols : 619-652 *in* : Bonneau M, Souchier B, eds. *Pédologie. 2. Constituants et propriétés du sol.* Masson, Paris, France.
- Rodríguez-Echevarria S, Freitas H. 2006. Diversity of AMF associated with *Ammophila arenaria* ssp. *arundinacea* in Portuguese sand dunes. *Mycorrhiza* 16: 543-552.
- Ruiz-Lozano JM, Azcón R, Gómez M (1996) Alleviation of salt stress by arbuscularmycorrhizalGlomus species in *Lactuca sativa* plants.*Physiol Plant* 98:767–772
- Rundel PW. 1995. Adaptive significance of some morphological and physiological characteristics in Mediterranean plants : facts and fallacies. *in* : Roy J, Aronson J, di Castri F, eds. *Time scales of biological responses to water constraints. The case of Mediterranean biota.* Amsterdam : 119-139.;
- Salahedin M, Jamal S, Mehdi Z. 2013. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium on shoot and root growth of chickpea in a calcareous soil. *International Journal of Agricultural Research Review* 3(2): 381-385.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci* 74: 5463-5467.
- Sanguin H, Khouli S, Zarik L G, ryta H, Boumezzough A, Ouahmane L, Hafidi M, Ouhammou A, Prin Y, Dreyfus B, Cambededes J, Miché L, Gauquelin T, Duponnois R. 2013. Rôles potentiels de la symbiose mycorhizienne dans la conservation des populations méditerranéennes de Genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L.). *Ecologia Mediterranea* 39(1):99-107.
- Sanon A, Martin P, Thioulouse J, Planchette C, Spichiger R, Lepage M, Duponnois R. 2006. Displacement of an herbaceous plant species community by Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Gmelina arborea*, an exotic tree, grown in a microcosm experiment. *Mycorrhiza* 16 : 125-132.
- Sardans J, Peñuelas J. 2013. Plant-soil interactions in Mediterranean forests and shrublands: impact of climatic change. *Plant and Soil* 365(1-2):1-33.
- Schenk HJ, Mahall BE. 2002. Positive and negative plant interactions contribute to a north-south-patterned association between two desert shrub species. *Oecologia* 132: 402-410.
- Schubler A, Schwarzott I, Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res* 105 (12): 1413-1421.
- Schüßler A, Walker C. 2010. The Glomeromycota; a species list with new families and new genera. Gloucester: 1-58.
- Sekkour S. 2008. Essai d'introduction d'un couple symbiotique Rhizobium-Acacia saligna pour la revégétalisation de la Sablière de Sidi Lakhdar (Wilaya de Mostaganem). Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-sénia, Oran, Algérie.
- Selvam A, Mahadevan A. 2002. Distribution of mycorrhizas in an abandoned fly ash pond and mined sites of Neyveli Lignite Corporation, Tamil Nadu, India. *Basic Appl Ecol* 3:277-284.
- Sengupta A, Chaudhuri S. 1990. Vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in pioneer salt marsh plants of the Ganges river delta in West Bengal (India). *Plant and Soil* 122, 111-113.
- Shannon CE, Weaver W. 1949. The mathematical theory of communication. University Illinois Press, Urbana, 117 pp.
- Sheha MY. 1984. Adaptation of plants in Kuwait. Kuwait Foundation for Science Development, 1st Edition.
- Silvertown J. 2004. Plant coexistence and the niche. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 605-611.
- Simard SW, Durall DM. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* 82: 1140-1165.
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD. 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 291-295.

- Simón M, García I, Gil, C, Polo A. 1994. Characteristics of the organic matter of Mediterranean high-mountain soils. *Geoderma* 61(1) : 119-131.
- Smith TF. 1980. The effect of saison and crop relation with abundance of spores of vesicular-arbuscular(VA) mycorrhizal endophytes. *Plant and soil* 57: 475-479.
- Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd Edition. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd Edition. Clarendon Press, Oxford.
- Smith FA, Smith SE. 1997. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 137: 373-388.
- Specht RL. 1973. Structure and functional response of ecosystems in the Mediterranean climate of Australia. *in* : Chapman D Castri F, Mooney HA ed *Mediterranean-type ecosystems : origin and structure*. Chapman and Hall, London pp: 113-120.
- Specht RL. 1979. Heath lands and related shrub lands. *Ecosystems of the world* 9A ed. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam.
- Stevens KL. 1986. Allelopathic polyacetylenes from *Centaurea repens* Russian knapweed. *Journal of Chemical Ecology* 12: 1205-1212.
- Stocker VO. 1974. Der wasser-und photosynthesehaushat von wustenpflanzen dersud-Algerischen Shara. I: Standorte und versuchspflanzen. *Flora*, Bd. 163:46-88. In Ighilhariz Z. 1990. Etude de comportement physiologique biochimique et structural de *Retama retam* (R'tem) vis-à-vis du chlorure de sodium. Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-sénia, Oran, Algérie.
- Striker GG, Insausti P, Grimoldi AA, Ploschuk EL, Vasellati V. 2005. Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. *Plant Soil* 276: 301-311.
- Stutz JC, Copeman R, Martin CA, Morton JB. 2000. Patterns of species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in arid regions of southwestern North America and Namibia. *Afr. Can. J. Bot* 78:237-245.
- Strullu DG. 1991. Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. *Techniques et Documentation*Lavoisier. Paris. pp : 242 .
- Sutton JC, Barron GL. 1972. Population dynamics of *Endogone* spores in soil. *Can. J. Bot.* 50: 1909-1914.
- Sylvia D M. 1986. Spatial and temporal distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Uniola paniculata* in Florida foredunes. *Mycologia*, 78: 728-734.
- Tao L, Zhiwei Z. 2005. Arbuscular mycorrhizas in a hot and arid ecosystem in southwest China. *Applied Soil Ecology* 29: 135-141.
- Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the early devonian. *Mycologia* 87: 560-573.

- Taylor AFS, Alexander I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19: 102-112.
- Tawarayama K, Takaya Y, Turjaman M, Tuah SJ, Limin SH, Tamai Y, Cha JY, Wagatsuma T, Osaki M. 2003. Arbuscular mycorrhizal colonization of tree species grown in peat swamp forests of Central Kalimantan, Indonesia. *Forest Ecology and Management* 182 (1): 381-386.
- Thomas JP. 1968. Ecologie et dynamique de la végétation de la dune littorale dans la région de Djidjelli. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr.nord*, 59: 37-98.
- Thompson WD, Campbell R, Evans T. 1985. Fibrin degradation and angiogenesis: quantitative analysis of the angiogenic response in the chick chorioallantoic membrane. *J Pathol* 145: 27-37.
- Tlili A, Dupre-Crochet S, Erard M, Nubetae O. 2011. Kinetic analysis of phagosomal production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 50(3):438-447.
- Tilman D, Downing AL. 1994. Biodiversity and stability in grasslands. *Nature* 367: 363-365.
- Tilman D, Wedin D, Knops J. 1996. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grasslands ecosystems. *Nature* 379: 718-20.
- Trappe JM. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: Safir GR ed *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC, Boca Raton, FL, pp: 5-26.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization d'un system racinaire recherché de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle *in* Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S. Eds, INRA edition, Paris, pp: 217-221.
- Tsai SM, Phillips DA. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol* 57: 1485-1488.
- Tulasne LR, Tulasne C. 1845. Description d'une espèce nouvelle du genre *Secotium* Kze. appartenant a la flore française. *Annales des Sciences Naturelles Botanique*. 4(3 série):169-177.
- Turrini A, Avio L, Bedina S, Giovannetti M. 2008. In situ collection of endangered arbuscular mycorrhizal fungi in a Mediterranean Unesco Biosphere Reserve. *Biodivers Conserv* 17: 643-657.
- Umehara M, Hanada A, Yoshida S, Akiyama K, Arite T, Takeda-Kamiya N, Magome H, Kamiya Y, Shirasu K, Yoneyama K, et al. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455: 195-200.
- Vadez V, Lim G, Durand P, Diem HG. 1995. Comparative growth and symbiotic performances of four *Acacia mangium* provenances from Papua New-Guinea in response to P supply at various concentrations. *Biology and Fertility of Soils* 19:60-64.
- Vandenkoornhuyse PS, Baldauf L, Leyval C, Straczek J, Young JP. 2002. Extensive fungal diversity in plant roots. *Science* 295: 2051.

- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- van der Heijden MGA, Bakker R, Verwaal J, Scheublin TR, Rutten M, van Logtestijn R, Staehelin C. 2006. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 178-187.
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V. 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol* 7: 879–887.
- Vasconcelos I, Almeida RT, Mendes PF. 1984. Ocorre ãncia de rizobios e endomicorrizas em leguminosas arboÁreas e arbustivas do Estado do Ceara Â, Brasil. *Cs. Agron. Fortaleza* 15 :45-52.
- Verdú M, Dávila P, García-Fayos P, Flores-Hernández N, Valiente-Banuet A. 2003. ‘Convergent’ traits of mediterranean woody plants belong to pre-mediterranean lineages. *Biological Journal of the Linnean Society* 78 : 415-427.
- Vignolio OR, Biel C, de Herralde F, Araújo-alves JPL, Savé R. 2005. Use of water-stress tolerant *Lotus creticus* and *Cynodon dactylon* in soil revegetation on different slopes in a Mediterranean climate. *Ann. Bot. Fenn* 42: 195-205.
- Walker C, Sanders FE. 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon* 27: 169 182.
- Wang FY, Liu RJ. 2001. A preliminary survey of arbuscular mycorrhizal fungi in saline alkaline soil of the Yellow river delta. *Biodivers Sci* 9:389-392.
- Wardle DA, Giller KE, Barker GM. 1999. The regulation and functional significance of soil biodiversity in agro-ecosystems. *in* Wood D, Lenné JM (eds) *Agrobiodiversity: Characterisation, Utilization and Management*. CABI, London. pp 87-121.
- Weidmann S, Sanchez L, Descombin J, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 2004. Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 17:1385-1393.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *in* Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., Eds, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic, San Diego, pp. 315-322.
- Wilson JB, Agnew ADQ. 1992. Positive-feedback switches in plant communities. *Adv Ecol Res* 23:263-336.
- Witkowski ETF. 1991a. Effects of invasive alien acacias on nutrient cycling in the coastal lowlands of the Cape Fynbos. *J. Appl. Ecol* 28: 1-15.

Witkowski ETF. 1991b. Growth and competition between seedlings of *Protea repens* (L.) and the alien invasive, *Acacia saligna* (Labill.) Wendl. In relation to nutrient availability. *Functional Ecology* 5: 101-110.

Yaalon DH. 1997. Soils in the Mediterranean region : what makes them different? *Catena* 28(3): 157-169.

Yano-Melo AM, Saggin Jr OJ, Maia LC. 2003. Tolerance of mycorrhizal banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 95: 343-348.

Yao MC, Fuller P, Xi X. 2003. Programmed DNA Deletion As an RNA-Guided System of Genome Defense. *Science* 300:1581-1584.

Zaidi A, Saghir Khan MD, Amil MD. 2003. Interactive effect of rhizotrophic microorganism on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *European Journal of Agronomy* 19 (1): 15-21.

Zakhia F, Jeder H, Domergue O, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004. Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia, *Syst. Appl. Microbiol* 27 : 380-395.

Zhang Q, Blaylock LA, Harrison MJ. 2010. Two *Medicago truncatula* half-ABC transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* 22: 1483-1497.

Zhao H, Shen ZM, Kahn PC, Lipke PN. 2001. Interaction of alpha-agglutinin and a agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* sexual cell adhesion molecules. *J Bacteriol* 183(9):2874-2880.

Zhu YG, Miller RM. 2003. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends Plant Sci* 8:407-409.

Zinke PJ. 1973. Analogies between the soil and vegetation types of Italy, Greece and California. in: F. di Castri et H.A. Mooney Eds., *Mediterranean type ecosystems, origin and structures*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 7:61-80.

Zohary M. 1959. A revision of the genus *Retama* (Bioss.). in Ighilhariz Z. 1990. Etude de comportement physiologique biochimique et structural de *Retama retam* (R'tem) vis-à-vis du chlorure de sodium. Mémoire de magistère, Université d'Oran Es-sénia, Oran, Algérie.

<http://www.Invam.caf.wvu.edu> (The International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Endomycorrhizal Fungi).

<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/gigasporaceae/gigaspora/decipiens>

<http://mycorrhizas.info/resource.html>

<http://biology.kenyon.edu/fennessy/SrexMarx/fonland.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<http://therapie-genique-aragon-1s5.webnode.fr/la-therapie-genique/a3%29-clonage-du-g%C3%A8ne/>

<http://mycorrhizas.info/resource.html>)

<http://biology.kenyon.edu/fennessy/SrexMarx/fonland.htm>

Annexes

Rapport-Gratuit.com

Annexes

Annexe1

Analyses physicochimiques du sol

1. Analyse granulométrique

La granulométrie a été déterminée par la méthode internationale à la pipette de Robinson.

- Dans un bécher de 600 ml, mettre 15g de terre fine séchée et tamisée.
- Ajouter 50 ml de l'eau oxygénée (H₂O₂) à 20 volumes.
- Recouvrir le bécher afin d'éviter les projections pendant la période de l'effervescence.
- Mettre le bécher sur un bain de sable dont la température ne dépasse pas 85°C

Si une ébullition trop forte se manifestait, l'eau oxygénée se décompose très rapidement.

Si la terre est humifère l'effervescence peut produire une mousse abondante risquant de déborder, ce phénomène peut être évité en ajoutant quelques gouttes d'alcool éthylique.

A la fin d'effervescence, faucher pendant 2 h pour éliminer l'H₂O₂ en excès et terminer par 10 min d'ébullition (on peut accélérer l'élimination de l'excès d'eau oxygénée en ajoutant quelques gouttes d'ammoniaque).

- S'assurer que toute l'eau oxygénée a disparu en versant quelques gouttes du liquide chaud 60°C dans une solution de permanganate de potassium, en présence d'eau oxygénée le permanganate de potassium se décolore.
- Laisser refroidir puis transvaser à l'aide d'un jet de pissette dans un flacon de sédimentation à large ouverture et jaugé de 750 ml.
- 15 ml d'hexaméthaphosphate de sodium 50 g/l. Cette solution alcaline a pour rôle de disperser les particules qui ont tendance à s'agglomérer.
- Compléter avec de l'eau déminéralisée jusqu'au trait de jauge 750 ml.
- Agiter le flacon durant une heure sur un agitateur magnétique.
- Porter le flacon à proximité de la pipette de Robinson qui doit être placée dans une pièce à température constante.

Pour le mélange des argiles, des limons fins et des limons grossiers :

- Maintenir la température à 20°C, agiter immédiatement par retournement répété de manière à mettre en suspension toute la terre.
- Laisser décompter pendant 20 secondes.

- Prélever au bout de 46 secondes, à 10cm de profondeur 10ml de liquide.
- Porter la capsule dans une étuve à dessiccation à température 105°C.
- Après évaporation totale, peser la capsule et son contenu sec.
- Par différence avec le poids de la capsule vide, déterminer le poids P1 de sédiment. (Argile + limons fins + limons grossiers + hexaméthaphosphate de sodium) contenu dans 10 ml de suspension.

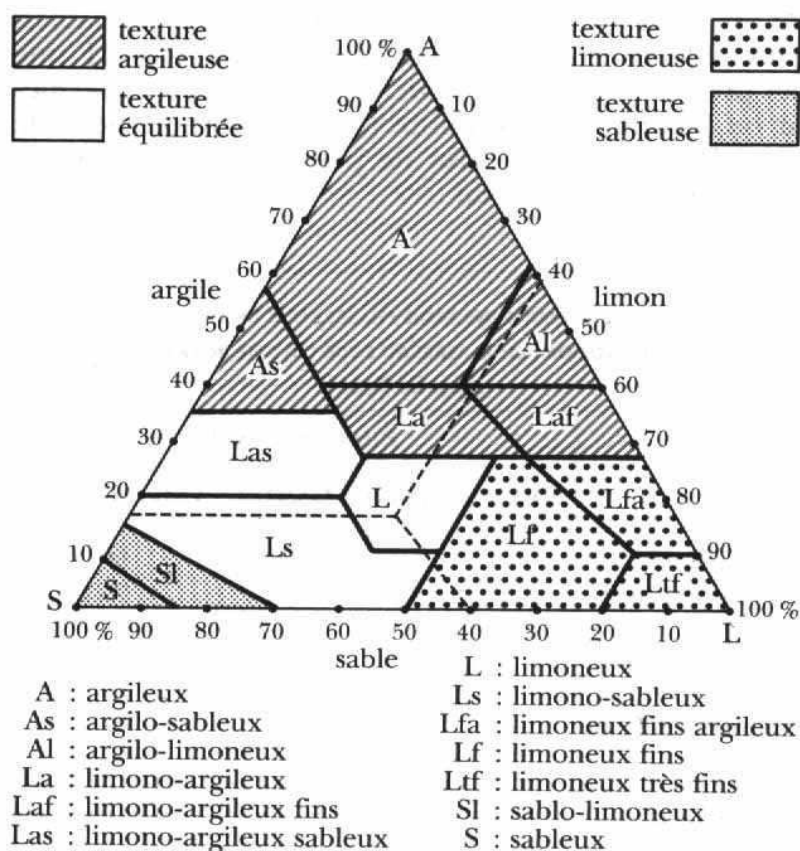
Pour le mélange des argiles et des limons fins :

- Après agitation et retournement du liquide, laisser déposer durant 4 min.
- Effectuer le prélèvement de 10 ml à une profondeur de 10 cm après la sédimentation.
- Transvaser le prélèvement dans une capsule en verre pyrex.
- Faire évaporer puis peser la capsule.
- Par différence avec le poids de la capsule vide, déterminer le poids P2 du sédiment (Argile + limon fin + hexaméthaphosphate de sodium) contenu dans 10 ml de suspension.

Pour l'argile :

- Agiter et laisser sédimenter 8h.
- Effectuer le prélèvement de 10 ml.
- Peser comme précédemment P3 (Argile + hexaméthaphosphate de sodium) dans 10 ml de suspension.
- Verser 15 ml d' hexaméthaphosphate de sodium dans un flacon gaugé de 750 ml.
- Agiter puis faire un prélèvement à la pipette Robinson comme précédemment.
- Transvaser le prélèvement dans une capsule en verre pyrex.
- Faire évaporer puis peser la capsule et son contenu sec.
- Déterminer comme précédemment le poids correspondant à la surcharge en hexaméthaphosphate de sodium contenu dans 10 ml de suspension.
- D'après les pesées P1, P2, P3, calculer les taux des Argiles, limons fins et limons grossiers.
- Tamiser et peser les sables fins et sables grossiers, pour les sables grossiers utiliser un tamis de 200 µm et pour les sables fins un tamis de 50µm.

2. Le triangle de texture



TRIANGLE DES TEXTURES
(d'après U.S. département of agriculture)

3. Dosage du carbone total et de la matière organique

- Utiliser un sol finement broyé et passé au tamis (0.2 mm).
- Peser 0.25 g de sol, introduire la prise dans un ballon pyrex avec réfrigérant ascendant, ajouter 10 ml de solution de bichromate à 8% et 15 ml d'acide sulfurique H₂SO₄ pure.
- Porter 5 min à l'ébullition douce.
- Laisser refroidir puis transvaser dans une fiole jaugée de 200 ml, laver trois fois à l'eau distillée, verser dans un bécher de 250ml.
- Diluer à 200ml.
- Ajouter 1.5g de fluorure de sodium (FNa) en poudre par ml d'acide sulfurique H₂SO₄ plus 3 à 4 gouttes de diphénylamine puis titrer l'excès de bichromate avec une solution de Mohr à 0.2N (la couleur passe du bleu foncé au bleu-vert).

Les calculs

1g de bichromate 0.2N oxyde 0.615mg de carbone (C)

Effectuer un témoin avec du sable stérile calciné, soit

n : la quantité de sel de Mohr versé

n' : la quantité de sel de Mohr correspondant à l'échantillon.

$$C\% = (n - n') \times 0.615 \times 100 / 1000$$

Pour obtenir le taux de la matière organique, multiplier C% par 1.72.

Annexe 2

Les milieux de montage des spores sont le PVLG et le réactif de Melzer. Ces milieux sont composés de la manière suivante:

- **Le solvant PVLG (Alcool polyvinylique, acide lactique, glycérol)**

Alcool polyvinylique 1,66 g

Eau distillée 10 ml

Acide lactique 10 ml

Glycérine 1 ml

- **Réactif de Melzer**

Hydrate chloral 100 g

Iodine 1,5 g

Iodide de potassium.....5 g

Eau distillée 100 ml

Annexe 3

Extraction de l'ADN à partir des racines

L'ADN est extrait à partir des broyats racinaires en utilisant le kit de centrifugation « FastDNA SPIN Kit » et en suivant les instructions du manuel

- Ajouter 50 mg de broyats racinaires de chaque échantillon dans les tubes à billes fournies dans le kit.
- Ajouter 10 mg de PVP.
- Ajouter 800 µl CLS-VF + 200 µl PPS.
- Homogénéiser dans l'appareil à vitesse 6 pendant 40 secondes et laisser agir sur paillasse 15 min.
- Centrifuger à 14000 g à 10 min.
- Transférer le surnageant (700 µl à 800 µl) dans les tubes de 2 ml.

- Ajouter le même volume de Binding Matrix et agiter pendant 5min sur un agitateur plat.
- Transférer 800 µl de la solution dans des tubes à filtre et centrifuger à 14000g/1min.
- Vider les tubes et répéter la même chose pour le reste de la solution.
- Ajouter 500 µl SEWS-M et mélanger doucement avec la pipette.
- Centrifuger 14000g/1min et vider les tubes.
- Centrifuger à nouveau les tubes vides à 14000g/2min.
- Mettre les filtres dans des nouveau tubes et ajouter 100µl de DES et ensuite incuber les tubes à 55°C pendant 5min.
- Centrifuger à 14000g/1min et jeter les filtres.
- Conserver les tubes contenant de l'ADN à -20°C.

Annexe 4

- **Gel d'agarose**

1 g d'agarose pour 100 ml de TBE 0.5X.

- **Tris Borate EDTA (TBE)**

Il est recommandé de se procurer cette solution tampon toute prête à la concentration 10 X. Le TBE est ensuite dilué dans de l'eau osmosée à 0.5 X pour son utilisation pour la préparation des gels d'électrophorèse et du tampon d'électrophorèse.

Annexe 5

Composition du milieu SOC :

Bactotryptone	20g
Extrait de levure	5g
NaCl	10 mM
Glucose	20 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂ , 6H ₂ O	10 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	10 mM
H ₂ O	qsp 1l

Annexe 6

- Solution mère **Ampicilline : 500 mg/10 mL H₂O** (permet de faire 5 L de LB_{Amp} / Xgal / IPTG)

- Solution mère **IPTG : 238 mg/10 mL H₂O** (permet de faire 7,5 L de LB_{Amp} / Xgal / IPTG)
- Solution mère de **X-gal : 40 mg/2 mL dimethylsulfoxyde** (permet de faire 1,5 L de LB_{Amp} / Xgal / IPTG)
- Ces 3 solutions sont à stocker à -20°C.
- Le X-gal et le IPTG peuvent être aliquotés par 400 µL en Eppendorf, ce qui permet de faire 9 boîtes de Pétri-LB (étalement de 40 µL par boîte). Pour l'ampicilline, aliquoter par 1,8 mL (permet de faire 800 mL de milieu LB_{Amp}).
- Composition du milieu LB (Luria Bertani) :

10 g NaCl

10 g (bacto)tryptone

5 g yeast extract

Ajuster le pH à 7 avec NaOH-5M

15 g agar-agar

Qsp H₂O 1 litre

Annexe 7

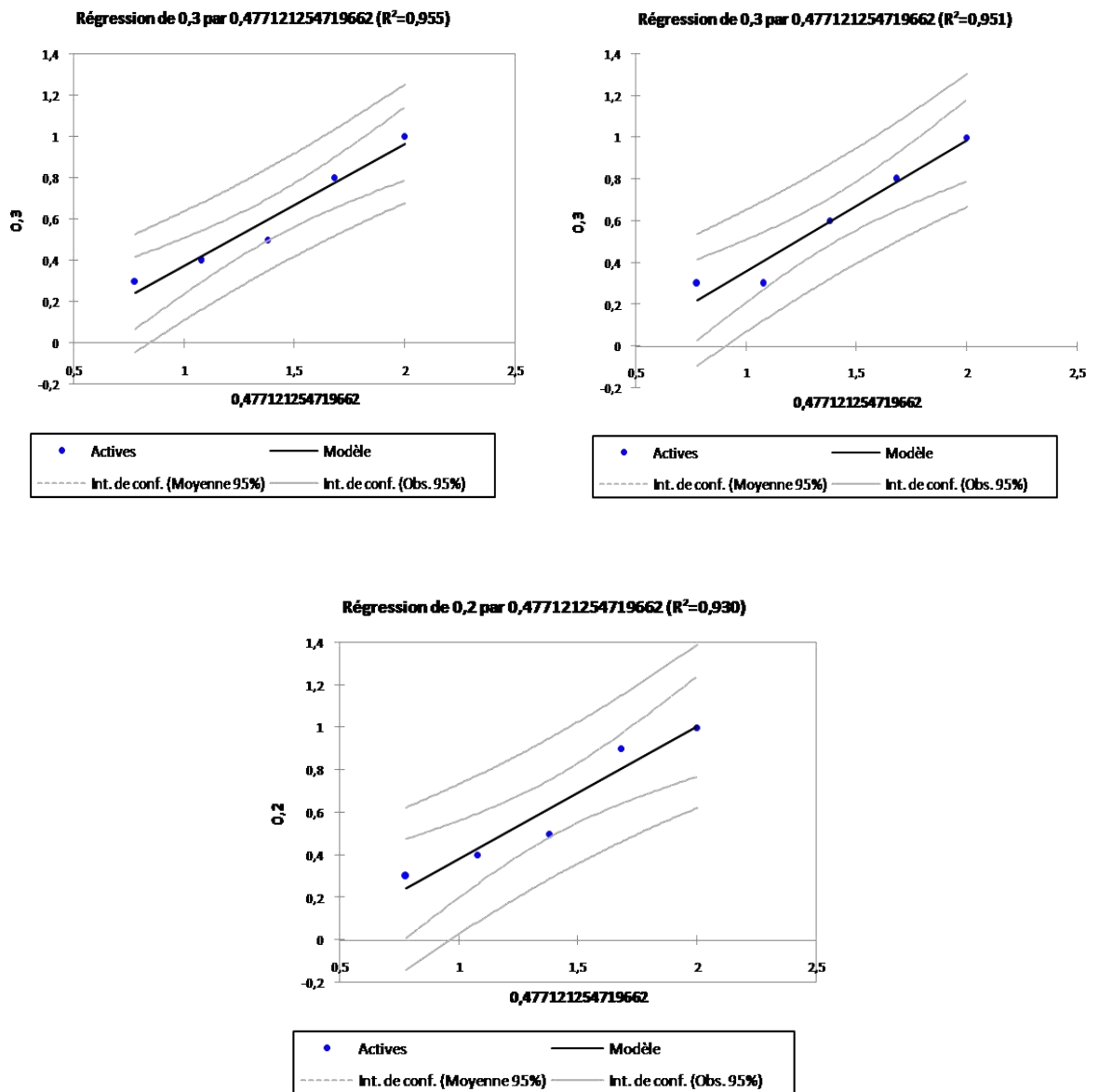


Figure 1 : Modèles de régression linéaire à partir de la relation pourcentage de plantes mycorhizées en fonction du logarithme de la quantité de sol d'*A. saligna*

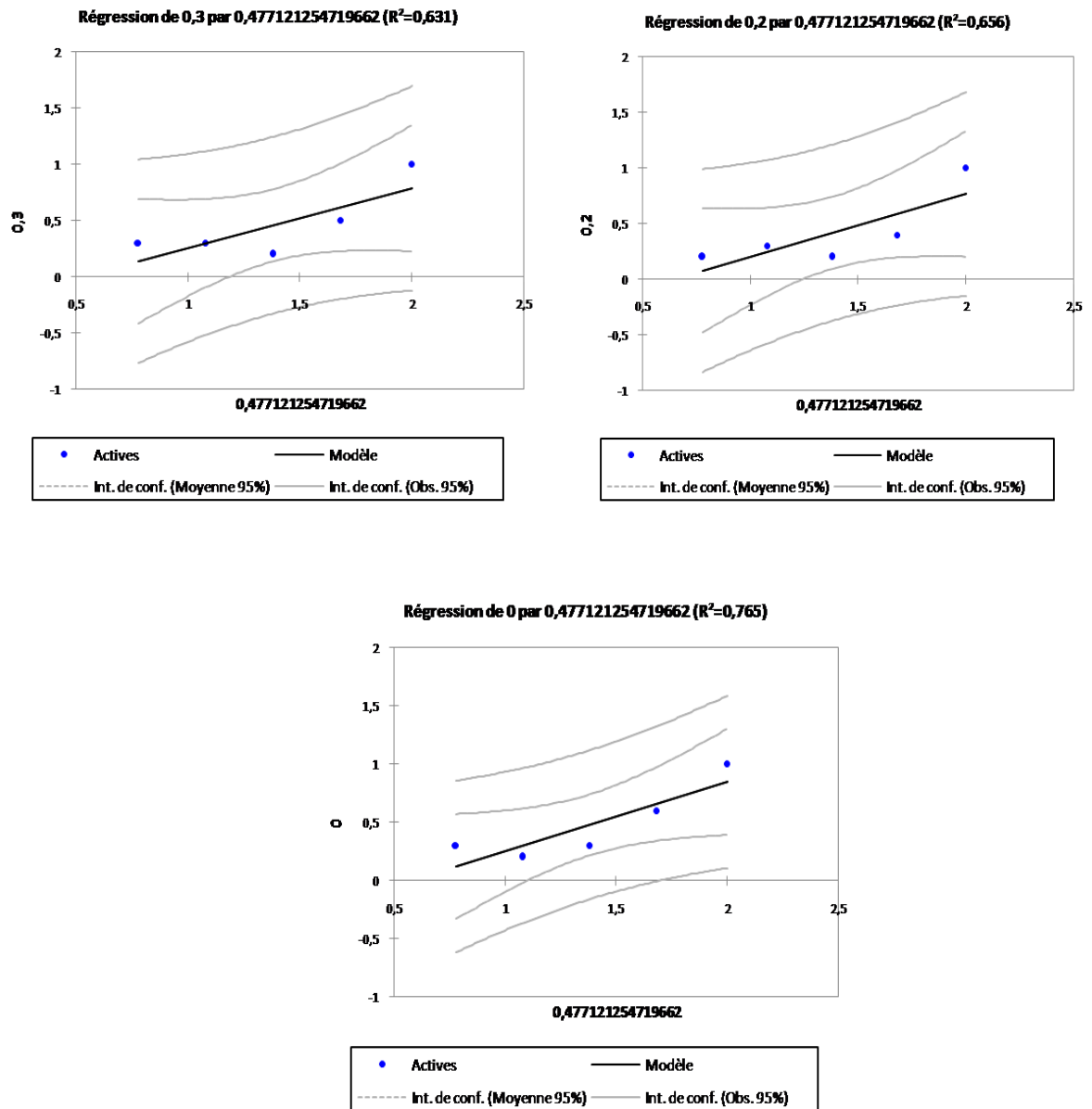


Figure 2 : Modèles de régressions linéaires à partir de la relation pourcentage de plantes mycorhizées en fonction du logarithme de la quantité de sol de *R. monosperma*

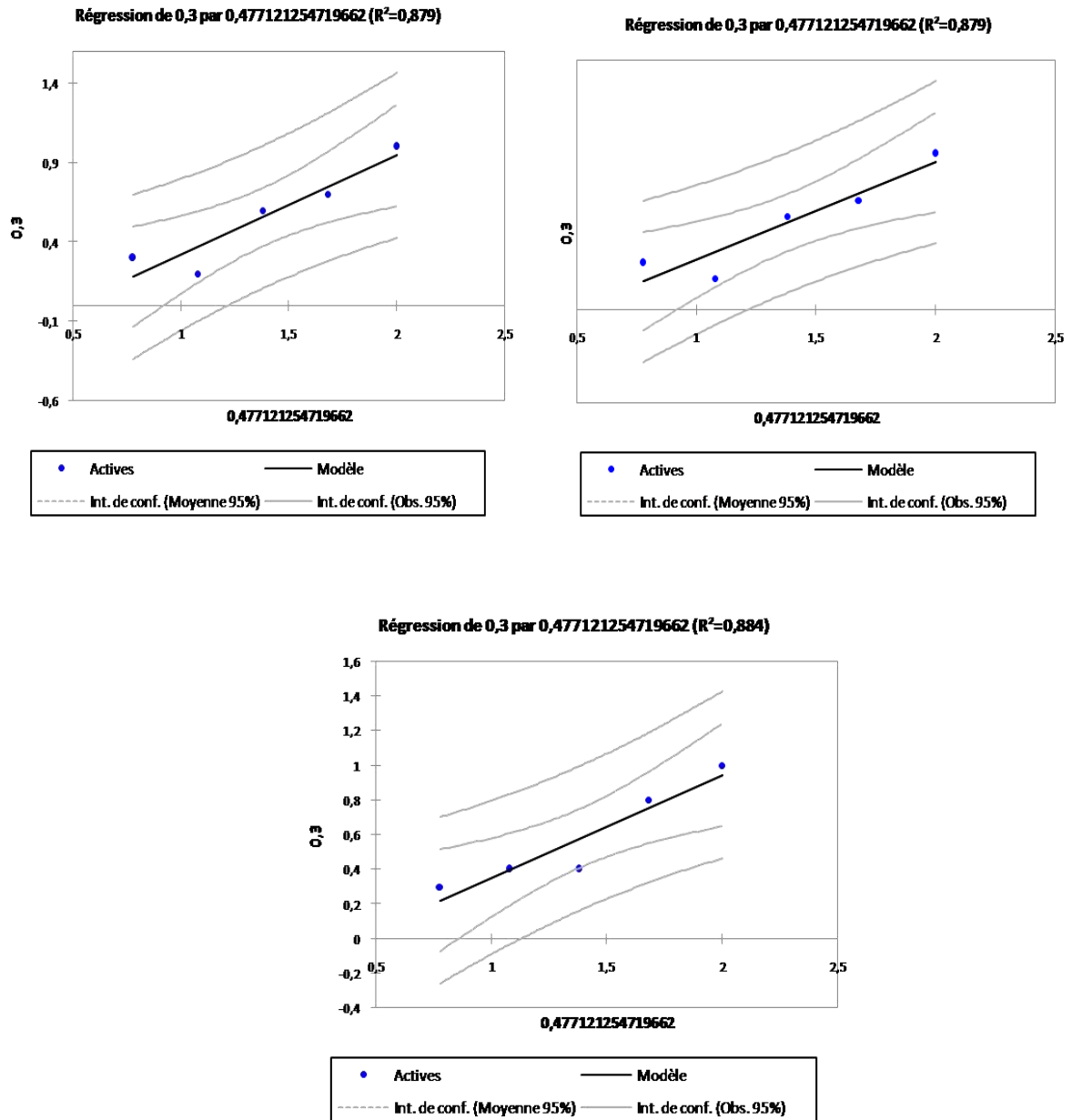


Figure 3 : Modèles de régressions linéaires à partir de la relation pourcentage de plantes mycorhizées en fonction du logarithme de la quantité de sol de *L. creticus*

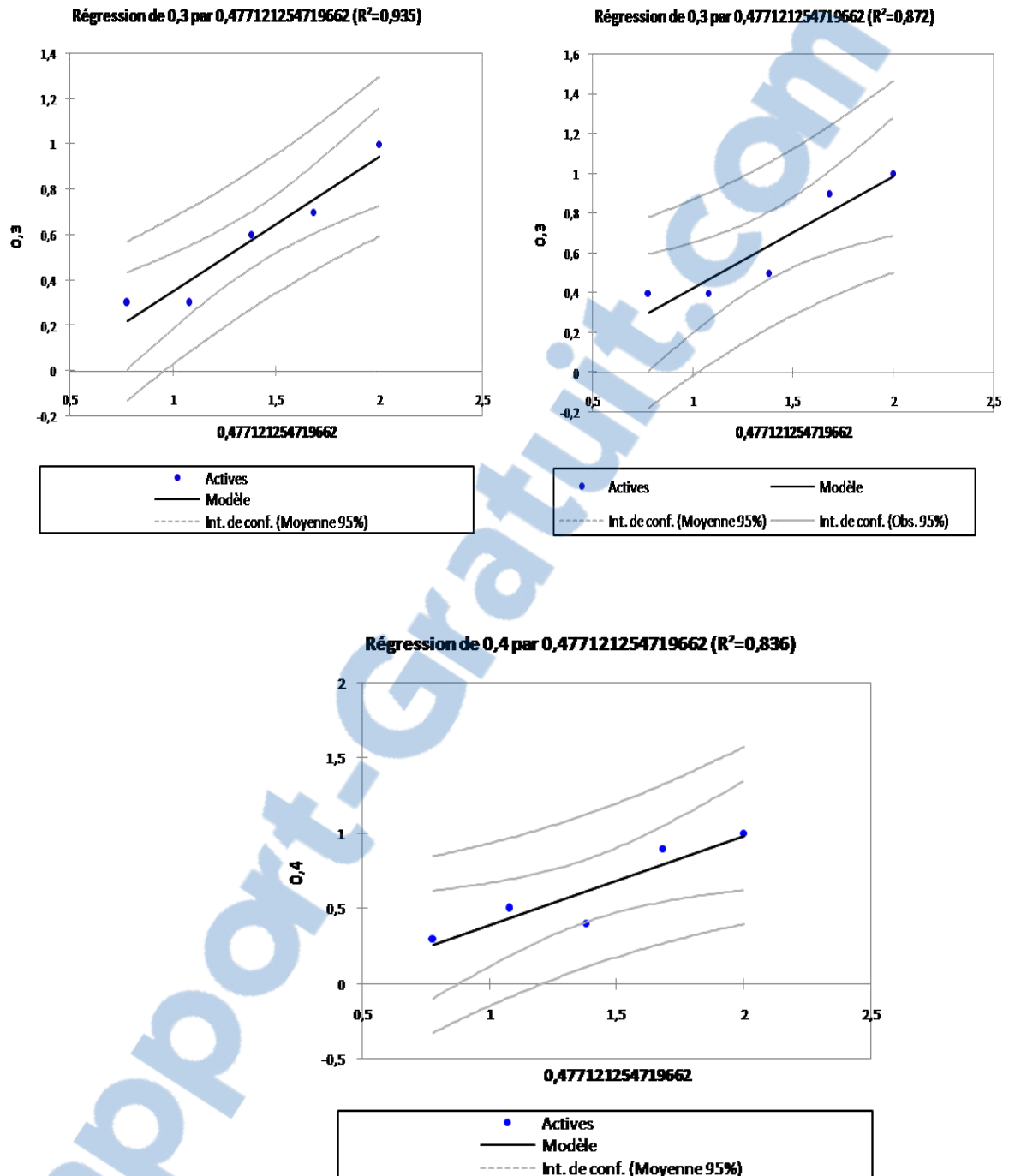


Figure 4 : Modèles de régressions linéaires à partir de la relation pourcentage de plantes mycorhizées en fonction du logarithme de la quantité de sol de *P. lentiscus*

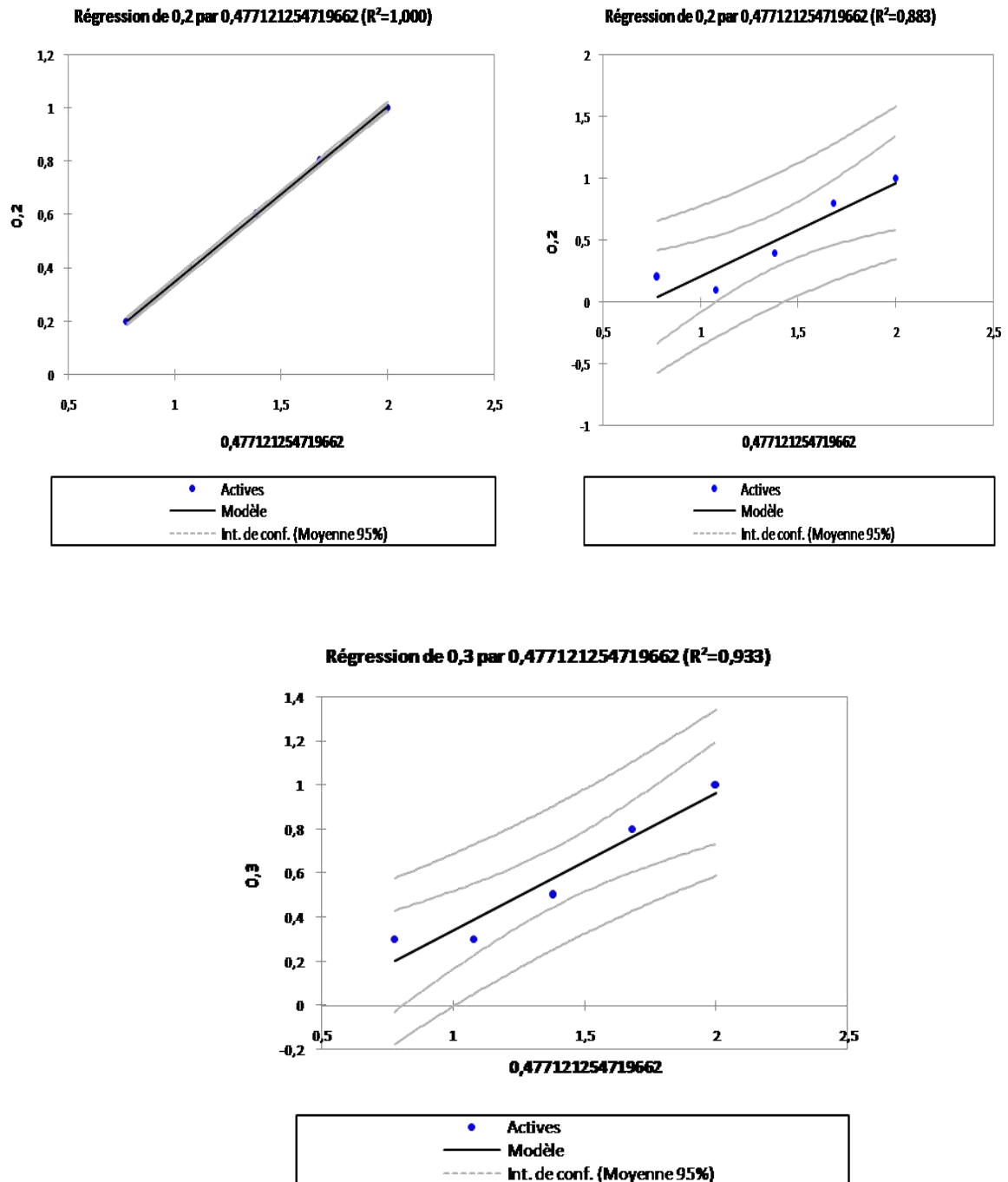


Figure 5 : Modèles de régressions linéaires à partir de la relation pourcentage de plantes mycorhizées en fonction du logarithme de la quantité de sol de *J. oxycedrus*

Annexe 8

- **Calcul PIM₅₀**

Le PIM₅₀ est l'exponentiel de X à un Y égale à 0,5 dans les régressions linéaires

Exemple

Equation d'une régression : $0,3 = -0,2187 + 0,5916 * 0,4771$

On remplace 0,3 par 0,5 (Y=0,5)

$$0,5 = -0,2187 + 0,5916 * x$$

$$x = (0,5 + 0,2187) / 0,5916$$

$$x = 1,2148$$

L'exponentiel de X égale à 16,4

$$PIM_{50} = 16,4$$

Annexe 9

La quantité d'eau pour avoir la capacité de rétention d'eau à 30% dans 20g de sol de Terga est de 1,767ml (**Tab.1**).

Tableau 1: Calculs déterminant CRE 30% du sol

Pots (g)	Sol sec (g)	Total 100% (g)	V H2O-100% (ml)	V H2O-30%
8,61	20	34,24	5,63	1,689
8,7	20	34,89	6,19	1,857
8,67	20	34,52	5,85	1,755
				Moy=1,767

Les calculs suivants permettent de calculer la capacité de rétention d'eau à 30% dans le sol de chaque traitement (**Tab. 2**)

Exemple :

$$\left. \begin{array}{l} 20\text{g sol} \longrightarrow 1,767 \text{ ml} \\ 0,5\text{g sol} \longrightarrow x \text{ ml} \end{array} \right\} X = 0,44$$

Alors la CRE à 30% de 500 mg de sol est de 44

Le sol est humecté avec 59 μl d'eau par puits (**Tab. 2**). L'ajout des substrats organiques est de 16 μl pour 400 mg sol sec et dans notre cas la quantité moyenne est de 27 μl de substrat organique par puits.

Tableau 2 : Calculs déterminant CRE 30% pour chaque puits.

	tare	tare+sol	sol (g)	mg sol sec/ p	CRE-30% (μl)
Plaque sol de <i>saligna</i>	113,6	175,482	61,882	645	57
Plaque sol de <i>monosperma</i>	113,642	177,538	63,896	666	59
Plaque sol de <i>creticus</i>	113,811	177,876	64,065	667	59
Plaque sol de <i>lentiscus</i>	113,56	180,972	67,412	702	62
Plaque sol de <i>oxycedrus</i>	113,546	175,02	61,474	640	56
Plaque sol nu	113,485	179,639	66,154	689	61
					Moyenne =59

Publication

<http://ijagcs.com/wp-content/uploads/2015/01/194-202.pdf>

Assessing The Native Arbuscular Mycorrhizal Symbioses To Rehabilitate A Degraded Coastal Sand Dune In Algeria

Bouazza Marouf K¹, Ighilhariz Z¹, de Lajudie P², Duponnois R², Bekki A¹

1. Laboratoire de Biotechnologie des Rhizobiums et Amélioration des Plantes, Département de Biotechnologie, Université d'Oran, Ahmed Ben Bella Algeria.
2. IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR LSTM, Montpellier, France

Corresponding author email: bouazza.marouf.k@gmail.com

ABSTRACT: We examined local arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) plant symbioses for their potential for land rehabilitation after sand industrial exploitation in a study site of the coastal sand quarry of Terga (NW Algeria, semi-arid climate). We focused on the mycorrhizal status of five representative plant species (*Acacia saligna*, *Lotus creticus*, *Retama monosperma*, *Pistacia lentiscus* and *Juniperus oxycedrus*) present in the Terga quarry. The arbuscular mycorrhizal (AM) structures showed significant and contrasting rates of root colonization among plant species. Spores density in soil was generally high, but variable depending on soil disturbance and local conditions. AMF diversity study in the rhizospheric soil fraction resulted in the distinction of eleven spore morphotypes affiliated to four genera (*Glomus*, *Scutellospora*, *Gigaspora* and *Acaulospora*) with predominance of *Glomus*. The mycorrhizal soil infectivity (MSI) level could be considered as significant except in the rhizosphere of *R. monosperma*. Our results suggest that *A. saligna*, *L. creticus* and *P. lentiscus* are well adapted to Terga local conditions and promote arbuscular mycorrhizal symbiosis. Management of mycorrhizal soil potential by introducing these species is very promising approach to contribute to degraded ecosystem rehabilitation such as in Terga. They may further constitute an important source of AM inoculum in semi-arid ecosystems.

KEY WORDS: Glomales biodiversity; Mycorrhizal soil infectivity; Revegetation strategies; Semi-arid.

INTRODUCTION

The semi-arid ecosystems such as Mediterranean coastal areas are frequently subjected to natural and anthropogenic disturbances (Le Houérou, 2000). This is the case of Terga coastal dunes (NW Algeria) after massive industrial sand mining. Land degradation is further exacerbated by lower rainfall, long periods of drought and high winds causing loss of vegetation and degradation of physical, chemical and biological soil properties (Requina *et al.*, 2001). All these climatic and soil disturbance conditions have severe detrimental effect on the ecosystem restoration, for which a revegetation strategy is needed.

Among successful revegetation strategies widely reported in semi-arid ecosystem, are those including mycorrhizal symbioses (Requina *et al.*, 1996; Azcon-Aguilar *et al.*, 2003; Sanguin *et al.*, 2013). Two strategies are usually offered based on the level of environmental degradation (Duponnois *et al.*, 2013): (I) management of the native soil mycorrhizal potential via native, drought tolerant and mycotrophic plant species establishment (Ouahmane *et al.*, 2006a), and/or (II) plants inoculation through selected mycosymbiots (Estaún *et al.*, 1997; Caravaca *et al.*, 2003; Duponnois *et al.*, 2007).

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can improve plants nutrient uptake efficiency in soils with low fertility by increasing the absorption surface and nutrient sources mobilization (Smith and Read, 2008). They help plants to tolerate biotic (Declerck *et al.*, 2002) and abiotic stress (Mathur and Vyas, 2000; Yano-Melo *et al.*, 2003). They may influence on the structure and activity of microbial Communities in mycorrhizosphere (Dabire *et al.*, 2007) and promote coexistence between plant species (Hart *et al.*, 2003). AMF promote plant settlement, especially in nutrient-poor environments such as sand dunes and contribute to dune fixation by forming aggregates of sand grains (Koske and Polson, 1984).

Although the AMF are important for vegetation persistence in semi-arid Mediterranean ecosystem (Caravaca *et al.*, 2003), understanding the mycorrhizal associations in Terga ecosystem and their distribution in the soil is needed for sound sustainable restoration and management of the exploited site (Requina *et al.*,

1996). Therefore, the objective of this work is to determine the mycorrhizal status of five local plant species and studied the relationship between plant species, mycorrhizal potential and soil fertility.

MATERIALS AND METHODS

Study site and samples collection

The study was conducted in Terga coastal sand dunes, located in Northwestern Algeria submitted to semi-arid Mediterranean climate with hot dry summers. The average annual rainfall, occurring mainly in autumn, is 300 mm. A botanical survey was carried out. The study focused on five plant species present in the quarry; *Acacia saligna*, *Retama monosperma*, *Lotus creticus*, *Juniperus oxycedrus* and *Pistacia lentiscus*. Sampling is performed in a preserved area in two locations: (1) on a high dune facing the sea (N40 ° 37 'E0 44'), and (2) in the back of the dune which stretches a plateau characterized by dense natural vegetation (N41 ° 16 E2 ° 05 '). For each target species, ten individual plants were randomly chosen. Roots and soil were collected from the rhizosphere of each plant. The control sample was taken from the bare soil. The physicochemical parameters of different soil composites were analyzed.

AM root colonization detection and evaluation

AM infection was observed after root staining according to Philips and Hayman (1970) under an optical microscope to spot mycorrhizal structures and to estimate the target species AM root infection degree as described by Trouvelot *et al.* (1986).

Spores density assessment

Soil samplings were performed in Spring and Winter. AM fungal spores were extracted from rhizospheric soil of target species and bare soil using the wet sieving method described by Gerdermann and Nicolson (1963). The spore suspension was centrifuged on a sucrose gradient to concentrate the spores and to minimize soil particles and root fragments (Daniels and Skipper, 1982). The mixture obtained after spore extraction was observed under a binocular microscope. The average spore number was expressed as a score per 100 g of dry soil.

Morphological identification of spores

Spores were sorted out manually under a binocular microscope according to color and size. In each homogeneous lot, the morphological characteristics of spores were observed under microscope (Olympus SZ H10 research stereomicroscope, connected to computer digital image analysis software). Slides of each different spore morphotype were prepared using either polyvinyl-alcohol alone or mixed with Melzer's solution (Azcon-Aguilar *et al.*, 2003). Spores identification was mainly based on color, size, wall structure and hyphal attachment, according to the descriptions provided by the International Culture Collection of Arbuscular mycorrhizal Fungi ([http:// www.lnvam.caf.wvu.edu](http://www.lnvam.caf.wvu.edu)).

Mycorrhizal soil infectivity (MSI) determination

The method used for MSI determination was described by Plenchette *et al.* (1989). Young mycotrophic plants are cultivated on a series of concentrations of rhizospheric soils and bare soil, diluted with the same sterilized soil. Six dilutions (100, 48, 24, 12, 6 and 3%) were performed in triplicate. The seeds of sorghum (*Sorghum sudanense*) were germinated for two days in Petri dishes on humid filter paper and transplanted into small plastic pots containing 100g of each dilution with ten seeds per pot. Culture was carried out for two weeks with 16h light and 25 ± 1 ° C. The plants were watered daily with sterile distilled water.

At harvest, the whole root system of each seedling was carefully rinsed with water and prepared according to Phillips and Haymann (1970). Mycorrhizal structures were observed under an optical microscope. Each root system showing at least one infection point (hyphal penetration in the root) was considered as mycorrhizal. These results were expressed as the percentage of mycorrhizal plants per pot.

Linear regressions ($Y = aX + b$) was calculated from the relationship between the percentage of mycorrhizal plants versus the logarithm of the natural soil quantity. Mycorrhizal Soil Infectivity (MSI) is expressed as MSI_{50} units, corresponding to the natural soil quantity required to infect 50% of a plant population under the biological test conditions.

Statistical Analyses

Data were processed with the variance analysis (ANOVA) at $p < 0.05$ using XL Stat software. Means were compared by the Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) test ($p < 0.05$). Spearman correlation coefficient was calculated between all variables. The relative abundance of spores was calculated (Johnson *et al.*, 1991). The Shannon diversity index (H) was calculated according to the following equation: $H = -\sum (Pi \ln [Pi])$ where Pi is the relative abundance (the number of individuals of the species i in relation to the total number

of individuals of all species), and *ln* is the natural log. Pielou's evenness index (E) was obtained by the following equation: $E = H/\log(S)$ where S is the total number of species.

RESULTS

Study site characteristics

The preserved area in Terga is characterized by a large plant biodiversity of trees, shrubs and herbaceous plants (Table 1). We chose to further focus our study on *Acacia saligna*, *Juniperus oxycedrus*, *Pistacia lentiscus*, *Retama monosperma*, and *Lotus creticus*. The mined area is totally naked. The physico-chemical parameter (Table 2) shows that all soils have a sandy soil structure, characterized by an alkaline pH. Nitrogen, Phosphorus and organic matter are generally low.

AM Root colonization

In all plant species, root fragments microscopic examinations revealed the presence of AMF structures like arbuscules and vesicles (Figure 1). The vesicles were widely observed compared to arbuscular structures present only in *A. saligna* and *P. lentiscus*.

Variance analysis indicates that AM colonization depends on plant species ($F = 9.904, P < 0.0001$). The lowest infection frequency value (F %) was observed for *J. oxycedrus* (54%), while it didn't differ significantly among other species (72% to 82.5%). As regards the intensity of AM colonization in the root system (M %) and in mycorrhizal fragments (m %), the difference among species was significant (Table 3).

Table1. Terga dune floristic survey.

Trees	Shrubs	Herbaceous
Juniperus phoenicea	Calycotome villosa intermedia	Ammophila arenaria
Juniperus oxycedrus	Chamaerops humilis	Asparagus acutifolius
Acacia saligna	Cistus salviifolius	Bellis sylvestris
Tamarix sp	Cistus sericeus	Brassica fruticulosaglabberina
	Ephedra altissima	Calendula tomentosa
	Erica multiflora	Centaurea fragilis
	Genista cephalanta	Centaurium umbellatum
	Halimium halimifolium	Clematis cirrhosa
	Helianthemum origanifolium	Crucianella maritima
	Helianthemum racemosum	Cyperus kalli
	Lonicera implexa	Daphne gnidium
	Lycium intricatum	Echinops spinosus
	Osyris lanceolata	Lagurus ovatus
	Phillyrea angustifolia media	Lavandula dentata
	Pistacia lentiscus	Limonium densiflorum
	Quercus coccifera	Lobularia maritima
	Retama monosperma bovei	Lotus creticus
	Rosmarinus officinalis	Malcolmia arenaria
		Matthiola tricuspidata
		Medicago littoralis
		Micromeria inodora
		Ononis antennata
		Ononis variegata
		Orlaya maritime
		Pancratium maritimum
		Paronychia argentea
		Prasium majus
		Reichardia tingitana
		Rubia peregrine
		Rumex bucephaloflorus
		Senecio leucanthemifolius crassifolius
		Silene ramosissima
		Stipa tenacissima
		Serratula mucronata
		Urginea maritimum

Table 2. Physico-chemical analysis of the target species rhizospheric soil and bare soil

Parameters	Clay	Loam	Sand	pH	Organic matter %	Total Nitrogen%	Total Phosphorus %
Soils origins							
A. saligna	3	5	92	8.87	6.49	0.05	0.037
L. creticus	2	4	94	8.13	0.40	0.01	0.031
R. monosperma	2	4	94	8.37	0.10	0.03	0.033
P. lentiscus	5	3	92	8.45	6.47	0.07	0.035
J. oxycedrus	4	5	91	8.39	6.39	0.05	0.035
Bare soil	2	4	94	9	0.10	0.10	0.037

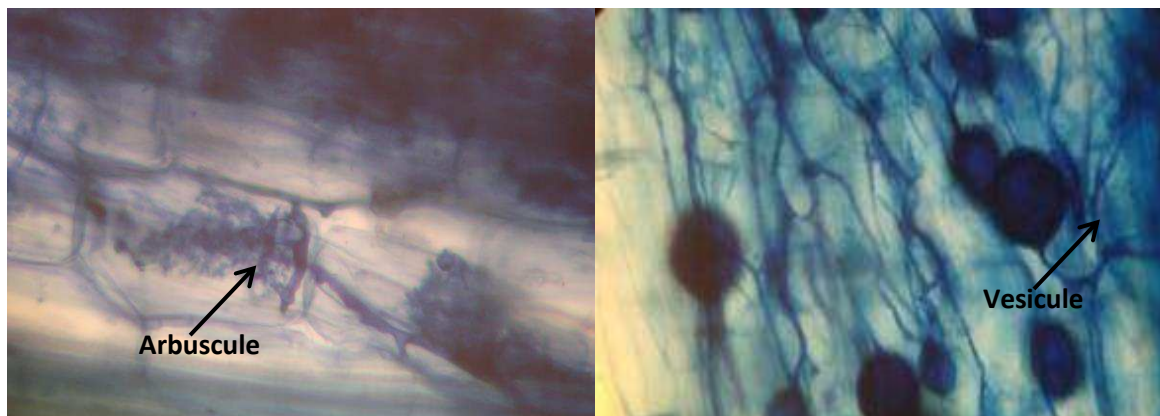


Figure 1. Arbuscular Mycorrhizal Fungi structures in target species roots

Table 3. Arbuscular mycorrhizal colonization in roots.

Species	Mycorrhizal frequency (F%)	Mycorrhizal intensity in root system (M%)	Mycorrhizal intensity in mycorrhizal fragment (m%)	Arbuscules content in mycorrhizal fragment (a%)	Arbuscules content in root system (A%)
<i>A. saligna</i>	82.50 ^a	36.25 ^b	44.17 ^b	24.86	9.00
<i>R. monosperma</i>	80.00 ^a	27.30 ^d	34.12 ^d	0.00	0.00
<i>L. creticus</i>	72.00 ^a	28.40 ^c	39.44 ^c	0.00	0.00
<i>P. lentiscus</i>	80.00 ^a	37.26 ^a	46.57 ^a	5.09	1.90
<i>J. oxycedrus</i>	54.00 ^b	14.80 ^e	27.40 ^e	0.00	0.00

For each column, values followed by the same letter are not significantly different at P <0.05

Spore density

The average spore density (Table4) varies very significantly among species (F= 34.98, P <0.0001) with largest spore scores for *R. monosperma* soil (123.6 spores /100g soil) and *J. oxycedrus* (111.6 spores/100g soil) and close scores for *A. saligna*, *P. lentiscus* and *L. creticus* (65.5, 80.8, 76.6 spores/100g soil respectively). Bare soil had very poor spore score (12.16 spores /100g soil).

Winter and Spring samples (Table 4) showed a negative correlation (r= -0.623, α= 0.05) and a highly significant variation between seasons (F= 33.42, P <0.0001). Thus the maximum spore score was recorded in *R. monosperma* Spring soil (123.6 spores/100g soil) then decreasing to 44.8 spores /100g soil in winter. Similar trends were also observed for the four other plant species.

Table 4. Spore densities across seasons

Soils Origins	spores number /100g soil	
	Winter	Spring
<i>A. saligna</i>	36.33±4.16 ^a	67.33±8.02 ^b
<i>L. creticus</i>	32.33±11.01 ^a	76.33±14.36 ^b
<i>R. monosperma</i>	45.00±11.53 ^a	123.33±27.53 ^a
<i>P. lentiscus</i>	32.00±8.88 ^a	80.33±4.50 ^b
<i>J. oxycedrus</i>	41.33±5.50 ^a	110.00±18.02 ^a
Bare soil	12.00±1.00 ^b	12.33±3.05 ^c

For each column, values followed by the same letter are not significantly different at P <0.05

Spores diversity

Spore morphotypes observed according to shape, color and size; vary from 4 in bare soil to 11 in rhizospheric soil (Table 5). Most of the morphotypes are common in all soils and some are specific. The relative abundance of the different spore types is shown in Table 5. Presence of characteristic structures (hyphae, saccule and walls) on some spores observed allows their allocation to a genus. These spores belong to four genera: *Glomus*, *Scutellospora*, *Gigaspora* and *Acaulospora*. The genus *Glomus* is the most frequent in the five studied plant species. It varies colors among spores (black, dark brown, light brown, hyaline and orange). The genus *Gigaspora* spores has yellowish white whose *Gigaspora margarita* (Figure 2). Brown spores and brown with dark outline characterized by the saccule, correspond to *Acaulospora* (Figure 2).

Table 5. Morphological characteristics and relative abundance of spores

Spore Color	Morphotypes diameter (µm)	Relative abundance (%) of spores morphotypes					
		A. saligna	L. creticus	R. monosperma	P. lentiscus	J. oxycedrus	Bare soil
Black	60-100	19	14	9	4	8	32
Black	250-400	3	5	11	-	4	16
light brown	40-100	10	11	10	10	10	-
light brown	240-450	23	4	11	6	8	-
dark brown	40-100	8	7	13	4	16	3
dark brown	160-450	10	1	13	2	12	-
Cream to yellowish	240-400	6	-	6	-	2	-
Hyaline to pale yellow	40-80	12	9	15	9	17	49
Brown dark wall	80-120	7	19	12	3	23	-
orange	60-80	2	4	-	-	-	-
oval brown	20-30	-	-	-	29	-	-
irregular brown	200-360	-	15	-	26	-	-
Irregular brown yellow	200-360	-	11	-	7	-	-

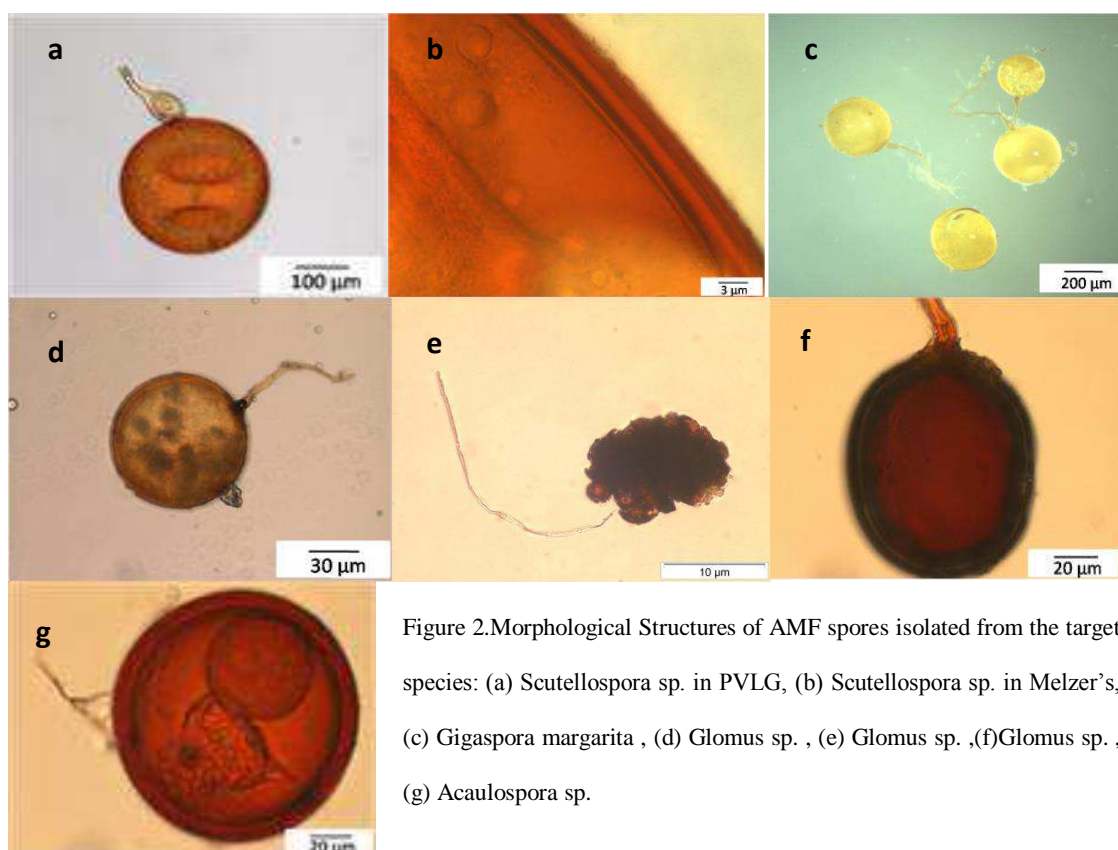


Figure 2. Morphological Structures of AMF spores isolated from the target species: (a) Scutellospora sp. in PVLG, (b) Scutellospora sp. in Melzer's, (c) Gigaspora margarita, (d) Glomus sp., (e) Glomus sp., (f) Glomus sp., (g) Acaulospora sp.

The Shannon diversity index (H) and the Pielou's evenness index (E), are parameters that express AMF diversity (Table 6). H index ranged from 2.02 to 2.28 and follow the gradient *L. creticus*>*R. monosperma*>*A. saligna*>*P. lentiscus*>*J. oxycedrus*. E index vary from 0.43 to 0.53 following the gradient *L. creticus*>*A. saligna*>*P. lentiscus*>*R. monosperma*>*J. oxycedrus*.

Mycorrhizal Soil Infectivity

The MSI₅₀ characterizes the amount of rhizospheric soil required to infect 50% of a plant population under bioassay conditions. Here it varied significantly depending on the soil (F= 10.277, P < 0.001). Tukey test showed three groups of rhizospheric soils compared to the level of infectivity (Table 7). A low value of MSI₅₀ indicates high soil infectivity. Concerning *A. saligna* soil, only 16.22 g of rhizospheric soil is sufficient to infect 50% of plants. In comparison, the necessary amount of *R. monosperma* soil is 29.50 g and over to 100 g for bare soil. This means that there were not enough propagates of mycorrhizal fungi in 100 g of bare soil to obtain

50% of mycorrhizal seedlings. The number of MSI₅₀ units per 100 g soil is calculated by dividing 100 by MSI₅₀ value (g). More the number of units MSI₅₀ is higher, more the soil is rich in mycorrhizal propagates.

Table 6. AMF diversity as reflected by Shannon diversity and Pielou's evenness indexes

Species	H (Shannon)	E (Pielou)
A. saligna	2.10	0.50
R. monosperma	2.17	0.45
L. creticus	2.28	0.53
P. lentiscus	2.05	0.47
J. oxycedrus	2.02	0.43

Table 7. Mycorrhizal soil infectivities in target species rhizospheric soil and bare soil

soils origins	Regression coefficients	MSI ₅₀ units g per 100g	Nb MSI ₅₀ units g per 100g
A. saligna	0.94	16.22 ^b	6.17 ^b
R. monosperma	0.68	29.50 ^a	3.39 ^a
L. creticus	0.88	18.15 ^b	5.51 ^b
P. lentiscus	0.88	18.09 ^b	5.53 ^b
J. oxycedrus	0.94	19.74 ^b	5.07 ^b
Bare soil	-	>100 ^c	<1

Correlation between spore density Root colonization and soil fertility

Table 8 presents the correlations between the density of spores, mycorrhizal intensity (M %) and soil fertility in total nitrogen (N), total phosphorus (P) and organic matter (OM). The Pearson correlation coefficient is denoted by *r*. Negative correlations could be observed between spore density and the content of P and between spore density and M%.

Table 8. Correlation coefficient (*r*) between spore density and mycorrhiza intensity and soil fertility

	Organic matter%	Total Nitrogen %	Total Phosphorus%	Mycorrhiza intensity (M%)	Nb MSI ₅₀ units /100 g
spore density	-0.281	-0.091	-0.551	-0.570	-0.566
Mycorrhiza intensity (M%)	0.107	0.261	0.262	1	0.290

Values in bold are different from 0 at signification level alpha=0,05

DISCUSSION

The arbuscular mycorrhizal fungi are geographically widely distributed (Öpik et al., 2006) and almost generally present in the plant kingdom (Trappe, 1987). Many reports showed that most plant species of semi-arid Mediterranean environments are mycorrhized (Requena et al., 1996 Ferrol et al., 2004; Maremmi et al., 2003). Here we detected the presence of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of all target species (A. saligna, L. creticus, R. monosperma, P. lentiscus and J. oxycedrus). Such symbiotic associations were reported previously (Ducouso and Thoen, 1991; Escaray et al., 2010; Hatimi and Tahrouch, 2007; Ferrol et al., 2004; Caravaca et al., 2006). AMF infection rates were high and vary depending on the studied species. Our results are consistent with those reported by Requena et al., (1996) in South Spain. According to Diagne and Ingleby (2003) mycorrhizal infection is affected by soil disturbances but not by the climate or the vegetation.

Despite current adverse conditions, dune soils may harbor rich and varied bacterial and fungal microflora (Hatimi and Tahrouch 2007). Despite the total absence of vegetation in the Terga exploited area and poor nutrients and limited water, spores could be detected in soil. The spore density is known to vary considerably among ecosystems. Values range from a few dozen to 10,000 spores per 100 g soil (Froni et al., 1999; Zhao and Li, 2005; Abbas et al., 2006; Camprubí et al., 2010). Spore densities found in this study in rhizospheric soils can be considered as relatively large compared to densities reported in semi-arid coastal dunes (Hatimi and Tahrouch 2007; Camprubí et al., 2010), but remain relatively low compared to those reported in other semi -arid soils (Ouahmane et al., 2006b; Abbas et al., 2006).

The spore densities observed in rhizospheric soils of R. monosperma and J. oxycedrus are substantially higher than those of A. saligna, L. creticus and P. lentiscus. Nicolson (1960) reported that the factors affecting the distribution of AM fungi in sand dunes are plant species, degree of dune stability, organic matter and soil microbiological activity. Soil disturbance affect spore formation in these dunes. Indeed R. monosperma and J. oxycedrus were found in a fixed dune protected from the wind and surrounded by dense vegetation ; in comparison the other colonizing species were subjected to severe climatic disturbances and limited canopy. Spore density is higher in older dunes than in the mobile and the younger dunes located near the sea (Koske, 1975). Soil disturbance affect the AM fungi community in sand dunes systems (Beena et al., 2000).

The seasonal variation in spore abundance has been reported by several authors (Hayman, 1970; Sutton and Barron, 1972; Giovanetti et al., 1985; Hatimi and Tahrouch 2007). It may be attributed to the

process of spore formation, germination and degradation (Smith, 1980). Our results show that there is a seasonal dynamics with increase spore density during Spring, consistent with Smith (1980) observation.

In Terga ecosystem, spore density is negatively correlated to the rate of AM root colonization. Thus, the impact of disturbances on spore production appears to be higher than on root colonization of host plants. In arid areas, few or no sporulation is observed although roots are clearly colonized (Morton et al., 1993). Several studies showed that there is no correlation between spore density and intensity of root infection (Mukerji and Kapoor, 1986; Clapp et al., 1995; Merryweather and Fitter, 1998). In controlled conditions correlation between spore population and root infection is often positive (Jensen and Jakobsen, 1980). The weak relationship between the formation of endomycorrhizae and density of spores may be due to the mortality, dormant spores (Jasper et al., 1991) and discontinuous sporulation of some Glomeromycota members (Schüßler et al., 2001). However, the spores don't seem to be the only ones able to infect plants but also mycorrhizal roots and extraradical mycelia in the soil (Klironomos and Hart, 2002).

This study evidences the rich diversity of AM fungi in the sandy soil of Terga coastal dunes with eleven spore morphotypes belonging to four genera *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, and *Gigaspora*. The Shannon diversity index indicates that some fungal species are more frequent than others. Moreover this index increases; the plant species is favorable to all fungal species, offering same survival opportunities. Therefore *L. creticus* rhizospheric soil exhibit high diversity of AM species; previously observed by Camprubí et al. (2010) in Spanish Mediterranean dunes. The values of the evenness index being in the medium of [0, 1], indicate a variable species distribution. A high value of this index (tends to 1) would show an equitable distribution of species. In contrast, a low value (tends to 0) means that there are in the middle several rare species and there is disproportionate distribution of species, which therefore translates into a very selective vegetation.

Fungi belonging to the genus *Glomus* were predominant in samples, with the highest number of morphotypes. According Turrini et al. (2008), the diversity of species other than *Glomus* in highly disturbed ecosystems is low. This can be explained by the ability of *Glomus* species to initiate a colonization process from spores, infected roots and hyphae unlike genera as *Gigaspora* and *Scutellospora*, able to initiate new root infection only from spores (Biermann and Linderman 1983).

MSI_{50} values in rhizospheric Terga soils are similar to those found in cultivated soils in France (Plenchette et al., 1989b) and higher than those found in the fallows of Senegal (Duponnois et al., 2001). *R. monosperma* rhizospheric soil shows the lowest mycorrhizal soil infectivity although it is the richest in spores. Soils in disturbed ecosystems contain very few viable spores (Diop et al., 1994) which may explain the negative correlation found between MSI_{50} units and spore density in Terga soils. Other rhizospheric soils have an important mycorrhizal soil intensity compared to the infectivity potential estimated in the rhizosphere soil of the Spanish Mediterranean dunes (Camprubí et al., 2010).

The spore density in the rhizosphere soil is negatively correlated between the phosphorus content. Frioni et al. (1999) found a negative correlation between AM colonization and P content. Mycorrhizae have an important role in the survival and growth of plants in soils poor in nutrient particularly phosphorus (Smith and Read, 1997).

The overall results (soil fertility, root colonization, MSI, spores' diversity and density) suggest that *L. creticus*, *A. saligna* and *P. lentiscus* are most suitable for the rehabilitation of Terga degraded soils. Several studies have suggested that legume with mycorrhizal dependency can improve the fertility restoration of disturbed soils and AMF biodiversity (Duponnois et al., 2001). Ferrol et al. (2004) suggested that the mycelial network AM colonized *P. lentiscus* soil could be a major source of AM inoculum.

CONCLUSION

The management of soil mycorrhizal potential by the introduction of *A. saligna*, *L. creticus* and *P. lentiscus* is very promising and may validly contribute to Terga ecosystem rehabilitation, since they are adapted to these ecosystem local conditions and have the ability to promote arbuscular mycorrhizal symbioses which plays a key role in the ecosystem productivity and stability. They can also be an important source of AM inoculum in semi-arid ecosystems.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Pr HADJAJ Aouel Segheir for his help in the botanical inventory and KADIRI Amina for her support in the statistical analysis.

REFERENCES

- Abbas Y, Ducouso M, Abourough M, Azcon R, Duponnois R. 2006. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters woodlands in Morocco. *Ann ForSci* 63:285–291

- Alguacil M, Caravaca F, Dias-Vivancos P, Hernandez JA, Roldan A. 2006. Effect of arbuscular mycorrhizal and induced drought stress on antioxidant enzyme and nitrate reductase activities in *Juniperus oxycedrus* L. grown in a composted sewage sludge-amended semi- arid soil. *Plant Soil* 279:209-218
- Azcon-Aguilar C, Palenzuela J, Roldan A, Bautist S, Vallejo R, Barea JM. 2003. Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrub lands. *Appl. Soil Ecol* 22:29-37
- Beena KR, Raviraja NS, Arun AB, Sridhar KR. 2000. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi on the coastal sand dunes of the west coast of India. *Current Science* 79:1459-1466
- Biermann BJ, Linderman RG. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 95:97-105
- Brundrett MC, Abbott LK. 1994. Mycorrhizal fungal propagules in the Jarrah forest. I. Seasonal study of inoculum levels. *New phytol* 127:539-546
- Camprubí A, Calvet C, Cabot P, Pitet M, Estaún V. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with psammophilic vegetation in Mediterranean coastal sand dunes. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8(S1):S96-S102
- Caravaca F, Barea JM, Palenzuela J, Figueroa D, Alguacil MM, Roldan A. 2003 Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 22:103-111
- Caravaca F, Alguacil MM, Azcón R, Roldán A. 2006. Formation of stable aggregates in rhizosphere soil of *Juniperus oxycedrus*: Effects of AM fungi and organic amendments. *Appl. Soil Ecol* 33:30-38
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizins from a natural community. *New Phytologist* 130:259-265
- Dabire AP, Hien V, Kisa M, Bilgo A, Sangare KS; Plenchette C; Galiana A; Prin Y; Duponnois R. 2007. Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. *Mycorrhiza* 17(6):537-545
- Daniels BA, Skipper HD. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Ed. N. C. Schenck. The American Phytopathological Society. pp:29-36
- Declerck S, Risede JM, Rufyikiri G, Delvaux B. 2002. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on severity of root rot of bananas caused by *Cylindrocladialium pathophyllum*. *Plant Pathology* 51(1):109-115
- Diagne O, Ingleby K. 2003. Écologie des champignons mycorrhiziens arbusculaire infécant *Acacia raddiana*. In *Un arbre au désert*, Grouzis M, Flocc HL (ed) IRD Editions Paris: 205-228
- Diop T, Gueye M, Dreyfus B, Plenchette C, Strullu DG. 1994. Indigenous arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Acacia albida* Del. in different areas of Senegal. *Appl. Environ. Microbiol* 60:3433-3436
- Ducousso M, Thoen D. 1991. Les types mycorrhiziens des Acaciaeae. In : *Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi-arides*. Groupe d'Etude de l'Arbre, Paris, France, pp:175-182
- Duponnois R, Plenchette C, Thioulouse J, Cadet P. 2001. The mycorrhizal soil infectivity and arbuscular mycorrhizal fungal spore communities in soils of different aged fallows in Senegal. *Appl. Soil Ecol* 17:239-251
- Duponnois R, Plenchette C, Prin Y, Ducousso M, Kisa M; Ba AM; Galiana A. 2007. Use of mycorrhizal inoculation to improve reforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. *Ecological Engineering* 29(1):105-112
- Duponnois R, Ramanankirana H, Hafidi M, Baohanta R, Baudoin E, Thioulouse J, Sanguin H, Bâ A, Galiana A, Bally R, Lebrun M, Prin Y. 2013. Des ressources végétales endémiques pour optimiser durablement les opérations de réhabilitation du couvert forestier en milieu méditerranéen et tropical : exemple des plantes facilitatrices vectrices de propagation des champignons mycorrhiziens *Comptes rendus biologiques* 336(5-6):265-272
- Escaray FJ, Rosique FJC, Scambato AA, Bilencia D, Carrasco P, Matarredona AV, Ruiz OA, Menéndez AB. 2010. Evaluation of a technical revegetation action performed on foredunes at Devesa de la Albufera, Valencia, Spain. *Land Degrad. Dev* 21:239-247
- 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
- Ferrol N, Calvente R, Cano C, Barea JM, Azcón-Aguilar C. 2004. Analysing arbuscular mycorrhizal fungal diversity in shrub-associated resource islands from a desertification threatened semiarid Mediterranean ecosystem. *Appl Soil Ecol* 25:123-133
- Frión L, Minasian H, Volfovic Z. 1999. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. *For. Ecol. Manage* 115:41-47
- Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. mycol. soc* 46:235-244
- Giovannetti M. 1985. Seasonal variations of vesicular-arbuscular mycorrhizae and Endogonaceous spores in a maritime sand dune. *Trans. Br. Mycol. Soc* 84:485-500
- Hart MM, Reader RJ, Klironomos JN. 2003. Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi. *Trends Ecol. Evol* 18:418-423
- Hatimi A. 1995. Symbiotes racinaires de trois légumineuses arborescentes de dunes littorales de Souss-Massa. Ed. INRA, Paris, *Les Colloques* 77:183-190
- Hatimi A, Tahrouch S. 2007. Caractérisation chimique, botanique et microbiologique du sol des dunes littorales du Souss-Massa. *Biomatec Echo* 2(5):85-97
- Hayman DS. 1970. Endogone spores numbers in soil and vesicular-arbuscular mycorrhiza in wheat as influenced by season and soil treatments. *Trans. Br. Mycol. Soc* 54(1):53-63
- Jasper DA, Abbot LK, Robson AD. 1991. The effect of soil disturbance on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soils from different vegetation types. *N. Phytol* 118:471-476
- Jeffries P, Barea JM. 2001. Arbuscular mycorrhiza—a key component of sustainable plant–soil ecosystems in Hock B (Ed.), *The Mycota IX Fungal Associations*. Springer, Berlin, pp:95-113
- Jensen A, Jakobsen I. 1980. The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in barley and wheat grown in some Danish soils with different fertilizer treatments. *Plant and Soil* 55:403-414
- Johnson N, Zak D, Tilman D, Pflieger F. 1991. Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. *Oecologia* 86(3):349-358
- Klironomos JN, Hart MM. 2002. Colonisation of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12:181-184
- Koske RE, Sutton JC, Sheppard BR. 1975. Ecology of Endogone in Lake Huron sand dunes. *Canadian Journal of Botany* 53:87-93
- Koske RE, Polson WR. 1984. Are VA mycorrhizae required for sand dune stabilization? *BioScience* 34:420-424
- Le Houerou HN. 2000. Restoration and rehabilitation of arid and semiarid Mediterranean ecosystems in North Africa and West Asia: A review. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 14:3-14
- Li T, Zhao ZW. 2005. Arbuscular mycorrhizas in a hot and arid ecosystem in southwest China. *Appl Soil Ecol* 29:135-141
- Maremani A, Bedini S, Matošević I, Tomei PE, Giovannetti M. 2003. Type of mycorrhizal associations in two coastal nature reserves of the Mediterranean basin. *Mycorrhiza* 13:33-40

- Marschner P, Timonen S. 2005. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Appl Soil Ecol* 28:23–36
- Mathur N, Vyas A. 2000. Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production, nutrient uptake and physiological changes in *Ziziphus mauritiana* under water stress. *J. of Arid Environ* 45:191-195
- Merryweather J, Fitter A. 1998. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*. II. Seasonal and spatial patterns of fungal populations. *New Phytol.* 138:131-142
- Morton JB, Bentivenga SP, Wheeler WW. 1993. Germ plasma in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48:491-528
- Mukerji KG, Kapoor A. 1986. Occurrence and importance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in semiarid regions of India. *For. Ecol. Manage* 18:117-126
- Nicolson TH. 1960. Mycorrhiza in the gramineae. II. Development in different habitats, particularly sand dunes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 43(1):132-145
- 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
- Ouahmane L, Duponnois R, Hafidi M, Kisa M, Boumezzough A, Thioulouse J, Plenchette C. 2006a. Some Mediterranean plant species (*Lavandula* spp. and *Thymus satureioides*) act as potential "plant nurses" for the early growth of *Cupressus atlantica*. *Plant Ecol* 185:123-124
- Ouahmane L, Hafidi M, Kisa M, Boumezzough A, Thioulouse J, Duponnois R. 2006b. *Lavandula* species as a source of arbuscular mycorrhizal propagules facilitating the early development of *Cupressus arizonica*. *Appl. Soil Ecol* 34:190-199
- 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
- Plenchette C. 1989. Potentiel infectieux mycorrhizogène du sol des parcelles du dispositif Dehérain. *C.R. Acad. Agric. Fr* 75:23-29
- Plenchette C, Perrin R, Duvert P. 1989. The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. *Can. J. Bot* 67:112-115
- Requena N, Jeffries P, Barea JM. 1996. Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol* 62:842-847
- Requena N, Perez-Solis E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM. 2001. Management of indigenous Plant-Microbe Symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol* 67:495-498
- Sanguin H, Khoulissa S, Zarik L, Gryta H, Boumezzough A, Ouahmane L, Hafidi M, Ouammou A, Prin Y, Dreyfus B, Cambecedes J, Miché L, Gauquelin T, Duponnois R (2013) Rôles potentiels de la symbiose mycorrhizienne dans la conservation des populations méditerranéennes de *Genévrier thurifère* (*Juniperus thurifera* L.). *Ecologia Mediterranea*. 39(1):99-107
- Schubler A, Schwarzott1, Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105 (12):1413-1421
- Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd Edition. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. Clarendon Press, Oxford
- Smith TF. 1980. The effect of season and crop relation with abundance of spores of vesicular- arbuscular(VA) mycorrhizal endophytes. *Plant and soil* 57:475-479
- Sutton JC, Barron GL. 1972. Population dynamics of *Endogone* spores in soil. *Can. J. Bot.* 50:1909-1914
- The International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Endomycorrhizal Fungi ([http:// www.invam.caf.wvu.edu](http://www.invam.caf.wvu.edu)).
- Trappe JM. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: Safir GR (ed) *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC, Boca Raton, FL, pp:5–26
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization d'un system racinaire recherché de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S. (Eds.), INRA edition, Paris, pp:217-221
- Turrini A, Avio L, Bedina S, Giovannetti M. 2008. In situ collection of endangered arbuscular mycorrhizal fungi in a Mediterranean UNESCO Biosphere Reserve. *Biodivers Conserv* 17:643-657
- Yano-Melo AM, Saggin Jr OJ, Maia LC. 2003. Tolerance of mycorrhizal banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 95: 343-348