



**HAL**  
open science

# Étude de l'impact des symbioses mycorhizienne et rhizobienne dans la domestication du Tara, *Caesalpinia spinosa* L

Sheena Sangay-Tucto

► **To cite this version:**

Sheena Sangay-Tucto. Étude de l'impact des symbioses mycorhizienne et rhizobienne dans la domestication du Tara, *Caesalpinia spinosa* L. Interactions entre organismes. Université Montpellier; Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2018. Français. NNT : 2018MONTG080 . tel-02063455

**HAL Id: tel-02063455**

**<https://theses.hal.science/tel-02063455>**

Submitted on 11 Mar 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ecologie fonctionnelle

École doctorale BIODIVERSITE, AGRICULTURE, ALIMENTATION, ENVIRONNEMENT, TERRE, EAU

Unité de recherche LSTM (Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes)

Etude de l'impact des symbioses mycorhizienne et  
rhizobienne dans la domestication du Tara (*Caesalpinia  
spinosa* L.)

Présentée par Sheena SANGAY-TUCTO  
Le 27 novembre 2018

Sous la direction de Robin DUPONNOIS  
et Christine LE ROUX

Devant le jury composé de

Wilfredo GONZALES, directeur de recherche, Université Péruvienne Cayetano Heredia, Pérou

Doris ZUÑIGA, directrice de recherche, Université Agraria La Molina, Pérou

Amadou BÂ, professeur des universités

Thierry GAUQUELIN, professeur des universités

Lionel MOULIN

José Bauer

Président du jury

Membre du jury

Rapporteur

Rapporteur

Invité

Co-directeur de thèse

Directeur(s) de Thèse

• Côté français:

Duponnois, Robin, IRD, Directeur de L'unité mixte de  
Recherche LSTM

Le Roux, Christine, Cirad, chercheur UMR LSTM

• Côté péruvien:

Zuñiga Dávila, Doris, directrice de recherche, Université  
Agraria La Molina

Bauer Cuya, José, directeur de recherche, Université  
Péruvienne Cayetano Heredia

*Je dédie ce travail à mes parents bien-aimés,  
Elena et Elio, pour leurs efforts et leur  
soutien inconditionnel depuis toujours.*

## REMERCIEMENTS

À Christine Le Roux pour son soutien constant pendant mon séjour au LSTM et dans les moments difficiles de la vie d'un doctorant.

À Robin Duponnois de m'avoir accepté au LSTM et de m'avoir donné toutes les facilités pour utiliser le matériel et l'équipement afin de mener cette thèse de doctorat.

Au Dr. Doris Zuñiga pour m'avoir accepté au laboratoire Marino Tabusso depuis mon retour au Pérou. Pour ses mots d'encouragement constants et pour avoir été mon guide et mon soutien dans cette dernière partie du doctorat.

À mon cher professeur et guide éternel, Carlos Llerena, de m'avoir toujours donné le temps de répondre à mes doutes et d'être toujours un soutien dans ce long parcours académique.

Au Dr. Bauer, pour son temps et sa disponibilité, et d'avoir toujours répondu à mes doutes et demandes à distance.

Au Dr. Jean Loup Guyot pour m'avoir encouragé à continuer dans cette voie, merci beaucoup pour les conseils d'un père que je n'oublierai jamais!

Aux secrétaires de l'école doctorale franco-péruvienne, Sciences de la vie, Rebeca et Violeta, pour leur efficacité et leur gentillesse à répondre à mes consultations à distance.

À tout le personnel du LSTM, toujours amical et heureux de répondre à mes questions, mention spéciale à: Joël, Nico Nouwen, Karine, Pierre, Alex, Amandine et Estelle.

Aux bonnes amitiés que j'ai pu rencontrer pendant mon séjour au LSTM, merci car elles ont toujours été attentives et prêtes à me donner tout le soutien nécessaire: Laurent, Maria Isabel, Rebecca, Fatou, Rondro, Cindy, Tasnime, Rakia, Alfredo, Wasila, Babacar et Seif. Aussi au professeur Dioumacor, à Nico, Adrien, Roba, Malika, Charline, Phuong, Odile, Panlada et Jenjira. Aux bons amis extérieurs du laboratoire: Francesca, Diana et Paty. À mes amis de Montpellier: Cricri, Manon et Didier. Merci de m'avoir fait goûté le plaisir de la recherche !

Au personnel technique du LSTM en France: Marjorie, Souhir, Naima et au Pérou : au M. Antonio Cornejo, au M. Mario Jhonatan Villegas Legua, au technicien Hector Huayta Castañeda, au M. Luis Alva Palacios pour m'avoir donné les moyens de récupérer des échantillons de sol des plantations de Tara à SilvaTeam à Huanuco.

Aux amis du laboratoire Marino Tabusso: à Ricardo, à Mariela, Johana, Javier, Nora, Katy; pour sa compagnie et son amitié lors de cette dernière étape de rédaction de thèse. Également à Bernabé, Jorge pour avoir partagé avec moi de bons moments d'amitié. Mention spéciale à mon grand ami Edwin pour son rôle de guide et pour ses longues discussions sur la science et la vie. À ma chère amie et guide, Ccori Martinez, pour ses conseils, pour les encouragements qu'elle m'a toujours envoyé soit proche ou éloignée, pour tous les éclats de rire partagés. Merci d'être une véritable amie pour toujours! À mes soeurs Manu, Eli et Vivian pour leurs enseignements quotidiens, pour avoir essayé chaque jour d'être une famille cool malgré le rythme effréné de chacune de nos vies, pour les joies vécues, pour les longues conversations sur le dépassement de soi et l'esprit d'entreprise, pour leur soutien immense dans les

moments difficiles de la vie et pas si difficile aussi, on va continuer à rêver toujours ... Nous sommes le produit de la logique et la raison du grand Elio et de la grande Elenita.

À Vivien pour son amour et sa patience pendant cette phase du doctorat, pour être mon pilier scientifique et pour m'avoir soutenu moralement à tout moment.

Merci d'être un beau père. Je te dois beaucoup!

À ma grande Juliette d'être ma source d'énergie et mon oasis de bonheur.

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	
SOMMAIRE.....	
RESUME.....	1
ABSTRACT .....	3
RESUMEN .....	5
INTRODUCTION .....	8
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1 Connaissance générale sur la Tara.....	11
1.1 Description botanique.....	13
1.2 Écologie .....	14
1.2.1 Distribution géographique.....	14
1.2.2 Préférence écologique.....	15
1.2.3 Pathogènes et ravageurs.....	16
1.2.4 Communauté écologique / habitats.....	17
1.3 Usages et échanges .....	18
1.4 Culture de la Tara .....	23
1.4.1 Gestion des forêts naturelles .....	23
1.4.2. Gestion des plantations de Tara.....	24
1.4.3 Rendement.....	24
1.4.4. Concentration de tanins chez la Tara.....	26
2 La symbiose mycorhizienne .....	27
2.1 Mycorhizes vésiculaires arbusculaires .....	30
2.1.1 Modèle de champignon mycorhizien arbusculaire: <i>Rhizophagus</i> <i>irregularis</i> .....	35
2.1.2 Dépendance mycorhizienne .....	35
2.2 Effet mycorhizosphère.....	37



2.3 Rôle de la symbiose mycorhizienne arbusculaire dans la croissance et le développement de la plante.....	38
2.4 Cas d'amélioration de la culture après l'inoculation des champignons mycorhiziens arbusculaires AMF .....	40
2.4.1 Au Pérou .....	40
2.4.2 Etudes dans d'autres pays.....	41
3 La symbiose rhizobienne.....	42
3.1 Les partenaires de la symbiose rhizobienne.....	43
3.1.1 Le membre de la plante: la plante hôte.....	43
3.1.2. Le partenaire bactérien: La rhizobia .....	43
3.2 La spécificité de l'hôte.....	44
3.3 Établissement de la symbiose rhizobienne .....	45
REFERENCES .....	48
CHAPITRE I: Impact de la symbiose mycorhizienne à arbuscules sur la croissance précoce de la tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ), une légumineuse à haute valeur écologique et commerciale .....	58
RÉSUMÉ.....	58
I.A INTRODUCTION .....	59
I.B Matériels et méthodes.....	60
I.B.1 Matériels.....	60
I.B.1.1 Le matériel végétal et son échantillonnage .....	60
I.B.2 Méthodes.....	61
I.B.2.1 Préparation en laboratoires.....	61
I.B.2.2 Évaluation de la structure de la communauté des champignons mycorhiziens arbusculaires.....	61
I.B.2.2.1 Extraction d'ADN .....	61
I.B.2.2.2 L'analyse moléculaire de la diversité des champignons mycorhiziens arbusculaires par séquençage (technologie <i>Illumina</i> ).....	62
I.B.2.2.3 Traitement des séquences générées par la technologie <i>Illumina</i> .....	63
I.B.2.3 Essais en serre.....	64
I.B.2.3.1 Désinfection et germination des graines de <i>C. spinosa</i> .....	64
I.B.2.4 Analyses statistiques .....	65

I.C. Résultats et discussion.....	66
REFERENCES .....	70
Chapitre II: Le pois ( <i>Pisum sativum</i> ) révèle la spécificité de la diversité rhizobienne associée à la légumineuse non-nodulante de tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ) au Pérou.....	73
RÉSUMÉ.....	73
II.A INTRODUCTION.....	74
II.B Matériel et méthodes.....	76
II.B.1 Matériels .....	76
II.B.1.1 Matériel végétal.....	76
II.B.1.2 Sols .....	77
II.B.2 Méthodes.....	77
II.B.2.1 Lieu d'exécution .....	77
II.B.2.2 Échantillonnage .....	77
II.B.2.3 Essais en serre .....	79
II.B.3 Tests de nodulation de <i>C. spinosa</i> .....	80
II.B.3.1 Culture in vitro de tara dans un milieu de Jensen inoculé avec une suspension de sol .....	80
II.B.3.2 Culture in vitro de tara ( <i>C. spinosa</i> ) dans un mélange de sable et de sol de plantation de tara ("L").....	80
II.B.3.3 Culture in vitro de tara ( <i>C. spinosa</i> ) dans un mélange d'attapulгите et de sol de plantation de tara ("L") .....	81
II.B.3.4. Nodulation de tara ( <i>C. spinosa</i> ) en serre.....	82
II.B.4 Mesure de la teneur en chlorophylle foliaire, activité de la nitrogénase, longueur des racines et biomasse sèche de tara .....	82
II.B.5 Récupération des rhizobiums des sols L, IL et OP, preuves d'infectiosité et d'efficacité sur la croissance des pois ( <i>P. sativum</i> ) .....	83
II.B.6 Caractérisation moléculaire de souches isolées de <i>P. sativum</i> .....	84
II.B.7 Efficacité des rhizobiums isolés sur pois ( <i>P. sativum</i> ), mesure de l'activité de la nitrogénase et de la teneur foliaire en chlorophylle. ....	85
II.C Résultats .....	87
II.C.1 Etat de la nodulation et de la fixation de la tara par l'azote .....	87

II.C.2 Récupération de souches de pois rhizobiens et effet de l'origine du sol sur la croissance de <i>P. sativum</i> .....	87
II.C.3 Caractérisation moléculaire des rhizobiums isolés de <i>P. sativum</i> .....	88
II.C.4 Isolement des souches et contrôle de l'infectivité des isolats de pois ( <i>P. sativum</i> ) .....	90
II.C.5 Contrôle de l'efficacité des isolats de pois ( <i>P. sativum</i> ) chez les pois ....	90
II.D Discussions .....	90
II.D.1 Etat de la nodulation et de la fixation de tara à l'azote.....	90
II.D.2 Caractérisation moléculaire des isolats rhizobiens de <i>P. sativum</i> .....	91
II.D.3 Discussion sur l'efficacité de la symbiose rhizobienne pour les pois .....	93
CONCLUSIONS .....	97
PERSPECTIVES .....	98
REFERENCES .....	99
ANNEXES .....	103
Publication 1.....	104
“Impacto de la simbiosis micorrítica arbuscular en el crecimiento temprano del cultivo de tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze)” .....	104
Publication 2.....	119
“Ecological Characteristics of Tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ), a Multipurpose Legume Tree of High Ecological and Commercial Value” .....	119

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Principaux pays importateurs de farine de gousse de Tara provenant du Pérou en 2015 .....	21
Tableau 2: Exportation de Tara pour les années 2017 et 2018 entre la période des mois janvier – mai.....	21
Tableau 3 Différences entre les ectomycorhizes et les mycorhizes vésiculaires à arbuscules .....	34
Tableau 4 Impact de l'inoculation des spores de <i>R. irregularis</i> sur la croissance et la teneur en éléments nutritifs des semis de <i>C. spinosa</i> après 4 mois de culture en serre.....	68
Tableau 5 Effet de l'origine du sol sur la croissance des plantes de Tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ) et Arveja ( <i>P. sativum</i> ) et l'effet du rhizobia récupéré sur les plantes du Pois en serre .....	95
Tableau 6 Effectivité du pois ( <i>P. sativum</i> ) par traitement, après 1 mois de culture en conditions in vitro .....	96
Tableau 7 Effectivité du Pois ( <i>P. sativum</i> ) par groupe des souches, après 1 mois de culture en conditions in vitro .....	96

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 Plante de Tara .....	14
Figure 2 Carte du monde, où se retrouvent de tara et la carte du Pérou .....	16
Figure 3 Illustration des structures de colonisation racinaire dans les interactions ectomycorhithiques et les mycorhizes arbusculaires.....	28
Figure 4 Principaux types de mycorhizes présentes représentées dans une section transversale de la racine .....	29
Figure 5 Phylogénie des Glomérromycètes .....	31
Figure 6 Structures de champignons mycorhiziens arbusculaires .....	33
Figure 7 Types d'association mycorhizienne arbusculaire. ....	34
Figure 8 Représentation schématique de l'effet du mycélium externe des champignons mycorhiziens à arbuscules .....	40
Figure 9 Infection à <i>Rhizobium leguminosarum</i> chez les légumineuses. ....	47
Figure 10 Structure taxonomique des communautés de champignons MA associées aux arbres de <i>C. spinosa</i> (Tara).....	69
Figure 11 Collecte d'échantillons .....	78
Figure 12 Schéma d'échantillonnage dans la zone d'étude .....	78
Figure 13 Arbre génétique obtenu à partir de cinquante-sept séquences partielles ITS.....	89

## RESUME

La Tara (*Caesalpinia spinosa*) est une espèce de légumineuse forestière de grande importance en raison de sa forte demande sur le marché international pour les tanins présents dans ses gousses et la gomme provenant de ses graines. Malgré sa grande importance pour le pays, la majeure partie de la production provient de forêts naturelles non aménagées. Ces forêts présentent des problèmes nutritionnels, généralement dus au manque de minéraux dans le sol (en particulier de phosphore (P) et d'azote (N)) et à une faible réserve en eau. Dans les sols pauvres, les micro-organismes peuvent être des alliés précieux, car ils augmentent l'assimilation de l'eau et des nutriments pour les plantes. La valorisation des micro-organismes présents dans le sol, à l'instar des mycorhizes et des bactéries, représente une stratégie alternative durable pour améliorer la fertilité des sols et la gestion des forêts en général. D'une part, les mycorhizes, i.e. l'association symbiotique entre un champignon bénéfique et les racines d'une plante hôte, permettent d'augmenter la surface racinaire de la plante et, par conséquent, une meilleure absorption de l'eau et des nutriments nécessaires à son développement. Par ailleurs, les bactéries du genre *Rhizobium* qui vivent en symbiose avec la plupart des légumineuses pourraient permettre un apport supplémentaire d'azote dont la Tara a besoin pour sa croissance. Selon différentes études, les symbioses rhizobienne et mycorrhizienne se sont révélés être une alternative à la réduction de l'utilisation d'engrais chimiques pour diverses cultures. Dans cette thèse, nous avons cherché à étudier la diversité des

champignons associés aux racines de la Tara, ainsi qu'à étudier l'effet de la présence de mycorhizes sur la croissance et le développement de la plante. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique d'analyse moléculaire, la technique Miseq *Illumina*, qui a permis d'explorer la diversité des mycorhizes (de type arbusculaire). Parmi les mycorhizes identifiées, il faut souligner la prépondérance de la famille des Gloméracées; en particulier le genre *Rhizophagus* spp, présent dans 70% des séquences. Nous avons également démontré que *C. spinosa* présente une mycorhization obligatoire. La mycorhization contrôlée de *C. spinosa* par *Rhizophagus irregularis* augmenté de manière significative la croissance et l'absorption d'azote et de phosphore par rapport aux plantes témoins. De plus, considérant que Tara est une légumineuse, la nodulation racinaire a été évaluée à l'aide de différents milieux de culture en serre et in vitro. Nous n'avons pas détecté de nodules rhizobiens dans les racines de Tara confirmant que cette légumineuse est certainement non nodulante.

Par conséquent, nous avons utilisé une plante piège associé à la culture de Tara, le pois, pour étudier la diversité des rhizobiums présents dans le sol de la plantation de Tara. Les rhizobiums des sols de la plantation se sont révélés très spécifiques et différents de ceux des sols situés en dehors de la plantation de Tara, sachant que cette plantation est exclusivement utilisée pour la culture de Tara. Ces rhizobiums se sont révélés être phylogénétiquement proches de *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. pisi* et *R. leguminosarum*. Un test d'inoculation contrôlé (*in vitro*) a été réalisé sur des pois, les bactéries étant préalablement piégées et isolées du pois; où il a été observé que les bactéries rhizosphériques de la plantation de Tara ont stimulé la croissance de cette culture par rapport aux bactéries présentes dans les sols collectés en dehors de la plantation.

## ABSTRACT

Tara (*Caesalpinia spinosa*) is a forest legume species of highly demanded in the international market for the use of its tannins present in its pods and its seed's gums. Despite its great importance for the country, most of the production comes from unmanaged natural forests. These forests present nutritional problems, which are usually due to the lack of minerals in the soil (particularly phosphorus (P) and nitrogen (N)) and fragile water storage. In poor soils, microorganisms can be precious allies since they increase the assimilation of water and nutrients for plants. The valuation of microorganisms present in the soil, as is the case of mycorrhizae and bacteria, represents an alternative sustainable strategy for improving the fertility of the soil and for forest management in general. On the one hand, mycorrhizae consists in the symbiotic association between a beneficial fungus and the roots of a host plant, achieving a greater root surface of the plant and as a consequence a better uptake of water and nutrients necessary for its development. On the other hand, the *Rhizobium* genus bacteria that live in symbiosis with most legumes could allow an additional supply of nitrogen that the Tara needs for its growth. In addition, both soil components have proven to be an alternative to reducing the use of chemical fertilizers for various crops. In this PhD thesis, we studied the diversity of fungi associated with the roots of Tara trees, as well as the effect of the presence of mycorrhizas on the growth and development of the plant. We used the Miseq



*Illumina* technique as a molecular analysis, which allowed to explore the diversity of mycorrhizae (of the arbuscular type) with a preponderance of the Glomeraceae family; in particular the genus *Rhizophagus spp*, which was present in 70% of the sequences. Also, we showed that *C. spinosa* presents a dependency with mycorrhiza of about 50%, *C. spinosa* could be classified as «obligatory mycorrhizal» or as «highly dependent on mycorrhiza. The controlled mycorrhization of *C. spinosa* by *Rhizophagus irregularis* increased significantly the growth and the absorption nitrogen and phosphorus compared to the control plants. In addition, considering that Tara is a legume species, radicular nodulation was evaluated. Different culture media were used as well as different growth conditions, in greenhouse and in vitro. Tara roots did not present rhizobial nodules confirming that this legume is likely non nodular.

Therefore, we used a trap plant to study the diversity of rhizobia present in the soil from the Tara plantation. We chose the pea *Pisum sativum* for being a legume associated with the cultivation of Tara. The rhizobia from the soils exclusively used for the cultivation of Tara turned out to be very specific and different from the rhizobia from soils outside the Tara plantation. Likewise, these rhizobia found to be phylogenetically close to *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. pisi* and *R. leguminosarum*. Finally, a controlled inoculation test (*in vitro*) was carried out on pea plants, with the bacteria previously trapped and isolated from the pea; where we observed that the rhizospheric bacteria from the Tara plantation stimulated the growth of the pea with respect to the bacteria present in soils collected outside the plantation.

## RESUMEN

La Tara (*Caesalpinia spinosa*) es una especie leguminosa forestal de gran importancia por su alta demanda en el mercado internacional para el uso de sus taninos presentes en sus vainas y de sus gomas provenientes de sus semillas. A pesar de su gran importancia para el país, la mayor parte de la producción proviene de bosques naturales no manejados. Estos bosques presentan problemas de nutrición, que por lo general son debidos a la carencia de minerales en el suelo (particularmente en fosforo (P) y en nitrógeno (N)) y a un fragil almacenamiento del agua. En suelos pobres, los micro-organismos pueden ser aliados preciosos dado que aumetan la assimilación de agua y nutrientes para las plantas. La valorización de los microorganismos presentes en el suelo, como es el caso de las micorrizas y las bacterias, representa una estrategia alternativa sostenible para la mejora de la fertilidad del mismo y el manejo forestal en general. De un lado, las micorrizas consisten en la asociación simbiotica entre un hongo benefico y las raíces de una planta hospedera, logrando una mayor superficie radicular de la planta y como consecuencia una mejor captación de agua y nutrientes necesarios para su desarrollo. De otro lado, las bacterias de genero *Rhizobium* que viven en simbiosis con la mayoría de las leguminosas podrian permitir un aporte de nitrógeno adicional que la Tara necesita para su crecimiento. Ademas, según diferentes estudios ambos componentes del suelo, han demostrado ser una alternativa a la reducción del uso de fertilizantes

químicos para diversos cultivos. En la presente investigación de tesis doctoral, se buscó estudiar la diversidad de hongos asociados a las raíces de los árboles de Tara, así como estudiar el efecto de la presencia de micorrizas en el crecimiento y desarrollo de la planta. Para ello, se utilizó el análisis molecular por la técnica *Miseq Illumina* que ha permitido comprobar la diversidad de micorrizas (de tipo arbuscular) con una preponderancia de la familia Glomeraceae; en particular el género *Rhizophagus* spp, el cual estuvo presente en un 70% de las secuencias. También, se demostró que *C. spinosa* presenta una micorrización obligatoria. Después de haber probado la micorrización controlada de *C. spinosa* por *Rhizophagus irregularis*, el crecimiento vegetativo del cultivo, la absorción de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo se incrementaron significativamente respecto a las plantas testigo. Además, considerando que la Tara es una especie leguminosa, se evaluó la nodulación racinaria. Para lo cual, se utilizaron diferentes medios de cultivo así como diferentes condiciones de crecimiento, en invernadero e *in vitro*. Poniendo en evidencia que las raíces de Tara no presentaron nódulos rizobianos confirmando que esta leguminosa es no nodulante.

Por lo cual, se recurrió al uso de una planta trampa para el estudio de la diversidad de rizobias presentes en el suelo proveniente de la plantación de Tara, donde se optó por utilizar la arveja por ser una leguminosa asociada al cultivo de Tara. Las rizobias provenientes de los suelos dentro de la plantación resultaron ser muy específicas y diferentes de las rizobias provenientes de suelos fuera de la plantación de Tara, teniendo en cuenta que dicha plantación es de uso exclusivo para el cultivo de Tara, donde no hubo presencia de especies acompañantes. Así mismo, estas rizobias encontradas demostraron ser cercanas

filogenéticamente a *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. pisi* y *R. leguminosarum*. Finalmente, se realizó una prueba de inoculación controlada (*in vitro*) en plantas de arveja, con las bacterias previamente atrapadas e aisladas a partir de la arveja; donde se observó que las bacterias rizosféricas provenientes de la plantación de Tara estimularon el crecimiento de este cultivo con respecto a las bacterias presentes en suelos recogidos fuera de la plantación.

## INTRODUCTION

La Tara (*Caesalpinia spinosa*) est une espèce forestière à multiple usages, source de tannins et de gommés naturelles nécessaires à différentes industries. Elle revêt donc une grande importance pour le pays compte tenu de sa contribution économique. Cette culture est exportée depuis 60 ans, le Pérou étant le principal fournisseur au monde, couvrant près de 80% de la production mondiale. La production la plus élevée provient des forêts naturelles et de certaines zones de parcelles agroforestières (1).

Cependant, l'offre actuelle ne répond pas à la forte demande, en particulier pour la farine de Tara. Ainsi, d'importantes opportunités commerciales se créent, les plantations de Tara continuent à se développer dans tout le pays. Nombre de ces nouvelles plantations, promues par des entreprises privées et certaines par des institutions de l'État, cherchent à assurer une gestion adéquate pour obtenir une production optimale de cette culture.

Pour cela, il est nécessaire d'utiliser certaines techniques sylvicoles telles que l'élagage de formation correcte, une évaluation sanitaire constante, ainsi qu'une application adéquate d'engrais. La fertilisation dans les cultures forestières peut être réalisée à l'aide de différents types d'intrants, chimiques et organiques. Ce dernier étant une alternative durable et écologique (2,3) en même temps. Ce

travail de recherche cherche à corriger ces pratiques actuellement utilisées par une approche écologique, en cherchant à préserver le sol et ainsi peut-être à restaurer les divers écosystèmes dégradés typiques des plantations de Tara.

Après avoir examiné les différentes études menées à Tara, il a été constaté que les connaissances sur les éléments présents dans le sol étaient insuffisantes, notamment certains micro-organismes, tels que les mycorhizes (association d'un champignon bénéfique à la racine de la culture), Par contre, les rhizobiums sont des bactéries responsables de la fixation de l'azote atmosphérique. Les deux pourraient jouer un rôle central dans la croissance et le développement de la Tara et des autres cultures associées.

Selon les études précédentes (4,5), il a été découvert que les Césalpiniciacées constituaient l'une des trois sous-familles composant les légumineuses, constituant ainsi le groupe des moins nodulantes puisque seulement 23% des espèces de cette famille sont capables de noduler. Cependant, (6) ont mis en évidence la présence de nodules dans des plantes de Tara prélevées dans une plantation de Tara à Huánuco, au Pérou. Compte tenu de cela, la présente étude vise à vérifier la nodulation de Tara à partir de la même plantation.

Des échantillons de Tara ont été prélevés dans une plantation de Tara dans la région de Huánuco de la ville d'Ambo. Ce qui a permis de réaliser différentes expériences pour répondre aux objectifs suivants:

Décrire la diversité des micro-organismes présents dans les sols des plantations de Tara avant de chercher à améliorer la production de Tara.

Après avoir détecté et identifié les micro-organismes associés, l'étape suivante consistait à effectuer des expériences dans des conditions contrôlées de mycorhization et d'inoculation de rhizobium. En outre, la nodulation de Tara a été vérifiée et des tests ont été effectués directement sur la même espèce. Il a toutefois été nécessaire de recourir à une plante nodulante servant de piège à rhizobia permettant d'évaluer la diversité des sols de plantations de Tara.

Enfin, les plantes ont été inoculées avec des rhizobia piégés provenant de plantations de Tara et leur croissance a été étudiée afin d'améliorer la productivité des plantations.

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

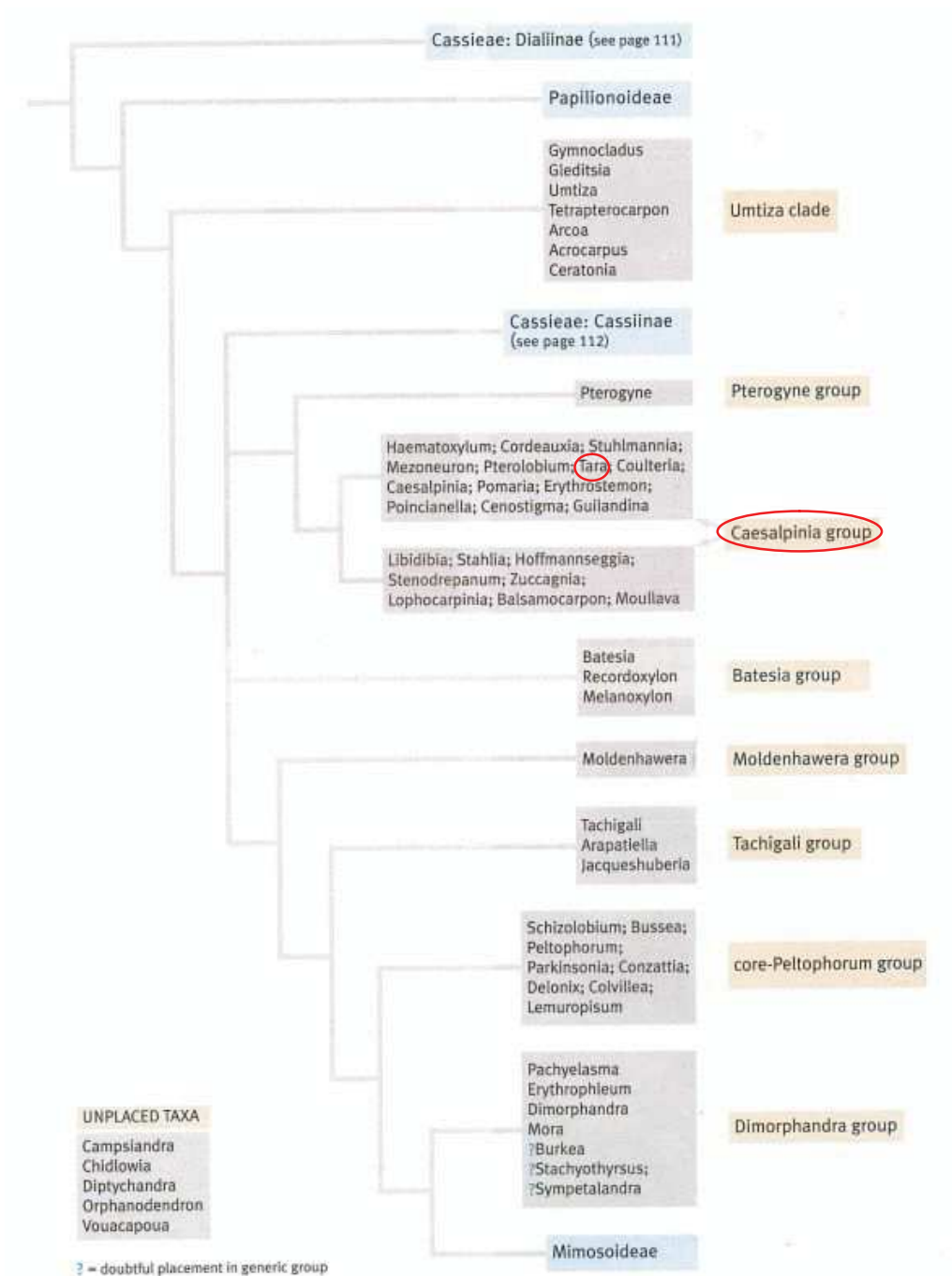
## 1 Connaissance générale sur la Tara

Le nom Tara vient de la langue aymara qui signifie "aplatie" ou "écrasée" en raison de la forme de la gousse (REDFOR, 1996, citée par (7).) Nous trouvons parfois d'autres dénominations en Amérique du Sud: au Pérou on l'appelle aussi "Taya", en Colombie: "Dividivi de tierra fría", "guarango", "cuica", "serrano", en Equateur "Guarango", "Vinillo", "Campeche", en Bolivie "Tara", au Chili, Au Venezuela et en Europe, il est également connu sous les noms de "Dividi de los Andes", "Acacia amarilla" ou "Caroube del Perú" (8).

Le nom scientifique de la Tara est *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze ou *Caesalpinia tinctoria*, en l'honneur d'Andrea Caesalpini (1524-1603), botaniste italien et Spinosa, du latin spinus-a-um, avec la présence d'épines (9).

La Tara est un arbre qui fait partie de la famille des *Caesalpinaceae*, de l'ordre des Fabales (également appelée ordre des légumineuses) (10). Comme le montre la figure 1, au niveau taxonomique, les espèces les plus proches de la Tara appartiennent à la sous-famille Coulteria (11) ou *Pterolobium stellatum* en Afrique.





**Figure 1** Relations entre les genres et les groupes informels de Caesalpinieae basé sur l'analyse de Polhill & Vidal (1981); Polhill (1994); Lewis et Schrire (1995); Kajita et al. (2001); Bruneau et al. (2001); Herendeen et al. (2003a & b); Simpson et Lewis (2003); Simpson et al. (2003); Haston et al. (2003 et soumis). Repris par Lewis et al., 2005

## 1.1 1.1 Description botanique

La Tara est un arbre de petite taille ou de taille moyenne pouvant atteindre une hauteur de 15 m, et exceptionnellement 25 m de hauteur (12). Le diamètre de son tronc va de 15 à 50 cm pour les plus gros spécimens (13). Son houppier peut atteindre plus de 6 mètres de diamètre. La tige peut être unique ou avoir plusieurs tiges sous forme de pousses courtes, cylindriques ou tortueuses (1), son écorce est brun foncé, munie d'épines triangulaires plates (13), avec un bois dense. Ses feuilles sont bipennées, alternes, disposées en spirale, autour de 8 paires de petites folioles à cuticule épaisse et cirée, d'une longueur totale d'environ 11 cm. Les fleurs sont regroupées en grappes d'environ 20 cm de long (1) avec 40 à 100 fleurs hermaphrodites qui ont un calice de 5 pétales et une corolle de 5 sépales jaunes avec des taches rougeâtres, 10 étamines et un pistil courbé se prolongeant dans un ovaire (14). La Tara fleurit de septembre à mars et les fruits sont récoltés de mars à septembre en fonction des précipitations ou des régions (1). Dans certaines zones et dans les plantations, il est possible de réaliser deux récoltes par an et le délai entre le bouton floral et la récolte est de 5 mois (12). Les fruits sont des gousses indéhiscentes (figure 2) aplaties et recourbées de 5 à 10 cm de long et de 1 à 3 cm de large, passant du vert au rouge au cours de la maturation, leur poids est de 2 à 5 g et leur composition ( en masse) correspond approximativement à: semences: 40%, coques: 38% et endosperme: 22% (15,16). Celles-ci contiennent jusqu'à 10 graines brunes à maturité, dont l'épiderme est recouvert de cire imperméable (1,14). Le nombre de graines par kilogramme de gousses varie entre 3000 et 4500 (17).

Le système racinaire est composé de racines pivotantes pouvant pénétrer dans le sol jusqu'à 5 m (Barriga, communication personnelle) et de nombreuses racines secondaires. La surface prospectée peut atteindre 10 mètres carrés (9).



Figure 1 Plante de Tara

## 1.2 1.2 Écologie

### 1.2.1 Distribution géographique

*Caesalpinia spinosa*, est arbre originaire des Andes péruviennes, mais s'est parfaitement adapté au climat du reste de l'Amérique du Sud, entre 4 ° N et 32 ° S, du Venezuela au nord du Chili (7,18). Sa zone de prédilection est située sur les pentes atlantiques entre 800 et 2800 m (19) et sur le versant pacifique entre 1600 et 2800 m.

Cependant, sur le versant occidental de la chaîne des Andes et dans les vallées interandines (Monte Ribereño, Monte Espinoso), on peut trouver jusqu'à 3200 m d'altitude et dans les "forêts de nuages" à partir de 500 m d'altitude (20)

*Caesalpinia spinosa* a été introduite et est cultivée dans le nord et l'est de l'Afrique, aux États-Unis, au Brésil et en Argentine (16,21-25).

### **1.2.2 Préférence écologique**

La Tara est une espèce xérophytique, c'est-à-dire qu'elle est bien adaptée aux milieux secs. On retrouve la Tara dans les zones où les précipitations varient entre 230 et 500 mm / an. Cependant, son développement optimal nécessite des zones avec une pluviométrie annuelle de 400 à 600 mm, conditions qu'on essaye d'obtenir en plantations (9,20,26). Le succès de la Tara dans le cas particulier des forêts de nuage (forte humidité mais faibles précipitations) provient de sa capacité à condenser les petites gouttes d'eau en suspension.

Nous trouvons la Tara dans les régions où les températures annuelles moyennes varient entre 12 ° C et 20 ° C, avec une plage optimale de 16 ° C dans les vallées interandines (9).

Selon (27), la présence de Tara est avant tout le résultat de conditions climatiques (fortement dépendantes de l'altitude), largement indépendantes de l'origine et de la qualité du sol. Ainsi la Tara puisse pousser sur des sols argileux, limoneux ou sableux. Dans la plupart des cas, elle se trouve sur des sols très peu profonds, caractérisés par une forte pierrosité et ne convenant pas à l'activité agricole (9,20,26). De plus, on peut la trouver sur des sols dégradés, ce qui en fait une plante intéressante pour la restauration écologique des sols.

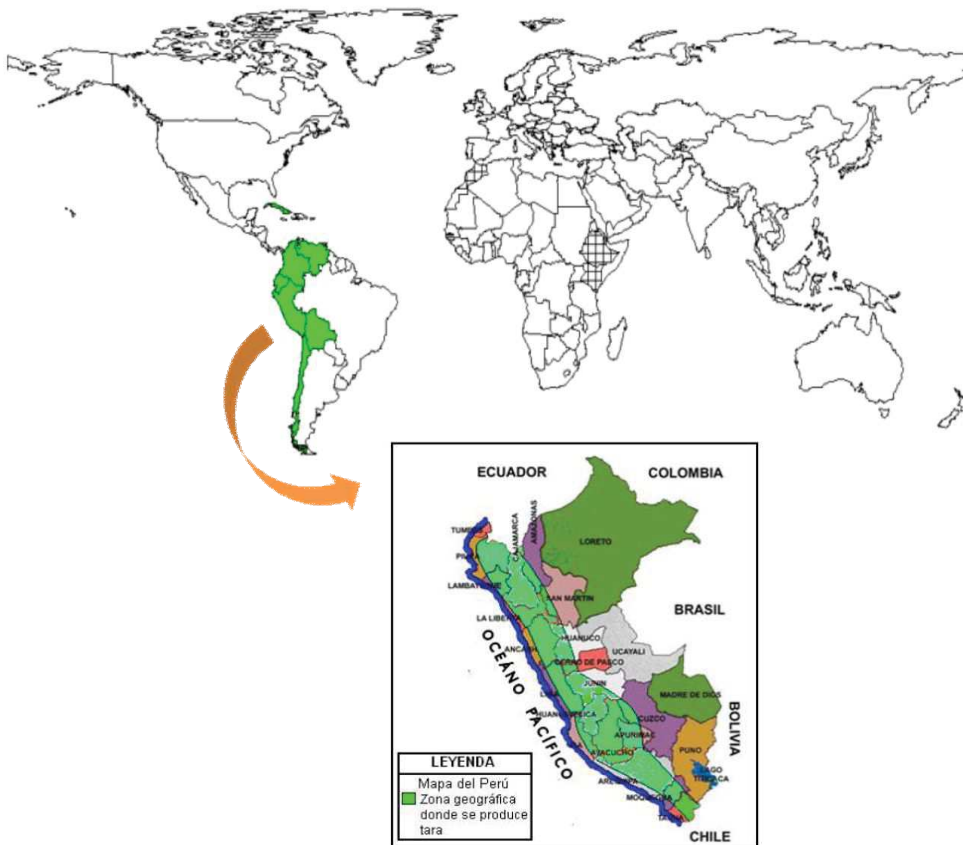


Figure 2 Carte du monde, où se retrouvent de tara et la carte du Pérou, montrant en vert (clair) toute la zone de production de tara

### 1.2.3 Pathogènes et ravageurs

Par sa nature, la Tara est très résistante aux agents pathogènes et aux parasites. Cependant, (28), tirés de la thèse de (29); indiquent que les parasites de la Tara sont principalement des insectes et des acariens appartenant aux ordres Lepidoptera, Díptera, Homóptera, Ortóptera, Acarina et autres. Parmi eux se détachent: les pucerons (*Aphis craccivora*) qui attaquent les feuilles, les fleurs, les gousses vertes et la tige; les queresas, *Pinnaspis* sp. et *Icerya Purchasi*, qui s'attaque aux branches et aux tiges; et la mouche blanche de la famille des Aleurodidae, un insecte suceur qui pique qui attaque le dessous des feuilles en

produisant des sécrétions sucrées associées au champignon appelé "fumagina". Les fourmis et les attaques de pucerons sont un problème dans certaines régions (7,31). L'apparition des parasites dépend souvent de l'association de Tara avec d'autres cultures (comme par exemple: chirimoyas, agrumes, avocats, olives et mangues (29), haricots, betteraves, cucurbitacées, crucifères, arachides (31); , pomme de terre, souci, luzerne, pallar et zapallo ((27), tiré de la thèse de (29). Les maladies les plus connues sont dues aux champignons Fumagina, Oidium (7,9) et Rhizoctonia (7). Les épiphytes du genre Cuscuta, peuvent parasiter la Tara "l'étouffant" peu à peu, surtout dans les forêts naturelles (7). C'est le cas du "pacha pacha" qui adhère aux cosses et forme les "poils d'ange" ou le huicho et de la quille qui s'enroule autour de la branche (9).

#### **1.2.4 Communauté écologique / habitats**

En forêt naturelle, dans les zones arides et semi-arides, la Tara est fréquemment associée à d'autres espèces d'arbustes telles que *Schinus molle* (Molle), *Prosopis laviegata*, *Acacia macracantha*, *Acacia visco*, *Opuntia ficus indica*, *Dodonaea viscosa*, *Jacaranda mimosifolia*, *Baccharis* sp., (1) et des espèces herbacées du genre *Eragrostis*, *Chloris*, *Pennisetum clandestinum*, *Cynodon dactylon*, *Calliandra* sp., *Rubus* sp., *Croton* sp., entre autres (1,9,32). Dans les forêts de nuage, il est associé à 80 espèces regroupées dans 37 familles et notamment à des plantes endémiques (33).

La Tara est couramment utilisée en agroforesterie car elle exerce très peu de concurrence avec les autres cultures agricoles car ses racines pivotantes prospectent le sol en profondeur (alors que les racines des cultures agricoles se

développent surtout dans les couches supérieures du sol) et d'autre part car sa coupe peu dense laisse pénétrer la lumière. De telle sorte qu'il est fréquemment planté avec d'autres espèces agricoles telles que le figuier de Barbarie, *Opuntia ficus-indica*, pour la culture de la cochenille. La Tara peut également être associée à diverses autres cultures telles que *Saccharum officinarum* (canne à sucre), *Zea mays* (maïs), *Pisum sativum* (arverjita) (1,7,34), *Phaseolus vulgaris* (haricot) (1), *Solanum tuberosum*. (pomme de terre), *Vicia faba* (haricots), *Medicago sativa* (luzerne), *Sorgho* spp (sorgho). Il est également possible de le trouver sous forme d'arbres isolés dans les champs de céréales (blé, orge) (1,7). Les surfaces des parcelles agricoles sont souvent réduites (généralement moins de 1 ha) et pourraient donc ressembler à un système de clôtures vivantes (32) dans lesquelles la Tara peut jouer le rôle de barrière (7). On le trouve également associé aux vergers de *Malus domestica* (pomme), *Pyrus spp.* (poire), *Prunus persica* (prune) (1) et *Annona cherimolia* (cherimoya) (35) et *Persea americana* (avocat) qui en bénéficient, en raison des caractéristiques des fleurs de Tara qui sont très attractives et augmentent la présence d'abeilles, alors que par les fleurs d'avocat par exemple ne sont pas très attractives pour les abeilles.

### ***1.3 Usages et échanges***

La Tara était utilisée par les peuples pré-incas et incas pour l'élaboration de colorants pour l'industrie textile ou de la céramiques, dans des tanneries et également à des fins médicinales.

Traditionnellement, la Tara est une espèce à usages multiples (bois de chauffage, outils agricoles, menuiserie, fruits, fourrage, clôtures) (32). Depuis 15 ans, il fait l'objet d'un intérêt économique pour la valeur de ses produits, principalement la gomme à usage alimentaire provenant de l'endosperme et les tanins provenant de la gousse pour l'industrie.

Les tanins de Tara sont facilement hydrolysables par l'action de l'enzyme tannase (36).

Ces tanins sont utilisés dans l'industrie du cuir en raison de leur pouvoir tannique, ce qui permet d'obtenir une grande variété de cuirs de couleur claire, qui se différencient par leur flexibilité et leur grande résistance (9,12). Le principal avantage du tanin provenant de la Tara est son origine naturelle, évitant ainsi l'utilisation de chrome industriel, particulièrement toxique (37); Pour ces raisons, les cuirs, une fois teints, sont destinés au marché du luxe. Selon les exigences de la demande internationale, la concentration idéale de tanins dans les gousses de Tara se situe entre 52% et 62% (7). Dans l'industrie du cuir, d'autres tanins d'origine végétale sont en concurrence avec la Tara, comme le "Quebracho" (*Schinopsis* spp) d'Argentine, le châtaignier (*Castanea sativa*) ou le Mimosa *Acacia mollissima*. Pour extraire le tanin de ces espèces, on utilise l'écorce et / ou le bois de l'arbre, en sacrifiant tout l'arbre, contrairement à la Tara dont les tanins proviennent de leurs gousses. La production de tanins ne détruit pas les arbres et la production est plus durable (7).

La gomme de Tara est une farine blanche à blanc jaunâtre et consiste essentiellement en polysaccharides de type galactomano. Il est utilisé comme agent épaississant et stabilisant dans plusieurs applications alimentaires (17).

Depuis 1995, la gomme de Tara est reconnue internationalement comme l'additif



E417 pour la production de crèmes glacées, gélatines, sauces, yaourts, produits de boulangerie et produits à base de viande. Son coût est supérieur à celui de l'amidon ou de la gélatine, mais il en faut beaucoup moins et la gomme de Tara n'influence pas la saveur ou la couleur comme les autres gommages issues d'exsudats d'essences forestières (12,37). Ainsi, la gomme de Tara est entrée sur le marché mondial des hydrocolloïdes en tant que produit alternatif à la gomme de Caroubier (*Ceratonia siliqua*), produite en Espagne et au Moyen-Orient (9), bien que son principal concurrent en matière de prix et d'utilisation soit la gomme de guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) (12).

La forte demande de la Tara et de ses dérivés ne cesse de croître: si la demande en farine de Tara atteignait 42 300 t en 2003, elle atteignait 49 000 t en 2008 (38). Cela entraîne une hausse des prix. Ainsi, en 1990, le prix de la farine de Tara a atteint 1050 USD / t contre 350 USD / t auparavant. En 2002, le prix avait encore augmenté et restait supérieur à 1 100 USD / t.

Actuellement, la production nationale est de 38 000 tonnes de Tara en gousses, dont 75% provient de forêts naturelles et 25% de plantations (Barriga 2017, communication personnelle). Le prix moyen actuel de la farine de Tara est de 1450 USD / t et celui de la gomme du Tara est de 3 400 USD / t (12).

De 2015 à 2016, les exportations ont progressé de 11% et, selon des informations récentes (voir tableau 2), les exportations en tonnes de Tara entre janvier et mai 2017 et 2018 ont augmenté de 18%, ce qui correspond à une augmentation de 29% en dollars. Les principaux importateurs étaient l'Argentine, la Suisse et les États-Unis (voir tableau 1). Les exportations de gomme de Tara en 2016 ont augmenté de 114% par rapport à l'année précédente pour atteindre 2 800 tonnes, générant des recettes de 8,9 millions de dollars pour le Pérou. En 2016, le total des

exportations cumulaient 51 millions de dollars US (12). Le prix de référence du kilogramme de farine de Tara est de 1,48\$ (39) et la gomme de Tara est de 3,44 (12).

**Tableau 1 Principaux pays importateurs de farine de gousse de Tara provenant du Pérou enl 2015 (40)**

<b>País</b>	<b>Cantidad (Kg)</b>	<b>\$ Franco de port</b>
<b>Argentina</b>	1 056,500	1 179,820
<b>Suiza</b>	1 007,270	442,706
<b>Estados Unidos</b>	1 070,201	1 153,252
<b>Bélgica</b>	736,1	844,836
<b>Italia</b>	735,075	828,005
<b>Brazil</b>	475,5	559,56
<b>Alemania</b>	363,625	422,292
<b>Uruguay</b>	350	379,26
<b>Francia</b>	278	336,4
<b>Austria</b>	161,837	191,74
<b>México</b>	54	57,9

**Tableau 2: Exportation de Tara pour les années 2017 et 2018 entre la période des mois janvier – mai**

<b>Año</b>	<b>Peso neto (Kg)</b>	<b>Variación Peso neto (Kg) 2018/2017</b>	<b>US\$ FOB</b>	<b>Variación US\$ FOB 2018/2017</b>
<b>2017</b>	8 796 906	18%	14 953 160	29%
<b>2018</b>	10 381 801		19 284 072	

Source : Douanes du Pérou, fournies par Adex (communication personnelle avec Huamaní, J. 2018).

Pour répondre à cette demande, le Pérou compte environ 6 000 hectares de Tara (ATFFS-SERFOR, 2014) tirés de (41), dont 22% sont de nouvelles plantations. Les principaux départements producteurs sont Huánuco (24% de la production), La Libertad (18% de la production), Ayacucho (17,5%) et Cajamarca (14% de la production). Les autres départements représentent 26% de la production nationale (ATFFS-SERFOR, 2014) tirés de (41). À Cajamarca, certaines années, la récolte par arbre a augmenté d'environ 45%. Le revenu quotidien de plus de 6000 producteurs de la région est passé de 0,85 à 3,15 dollars par jour (37). Malgré cela, une grande partie de la demande internationale reste insatisfaite et il existe actuellement un fort intérêt à accroître la production en créant de nouvelles plantations pour la culture de Tara (1). En plus de ses 2 utilisations principales, la graine de Tara est également une source d'huile comestible pour son contenu en huile oléique et linoléique (beurre, margarine et huile liquide), en protéines, en savons, dans les peintures, les vernis, les émaux, colorants d'impression, etc. (15). L'acide gallique, extrait de Tara, peut être utilisé en tant qu'antioxydant et décolorant dans la production industrielle d'huile ou de bière. En médecine, l'acide gallique est une molécule active dans les médicaments pour guérir les ulcères gastriques, mais aussi comme agent curatif, anti-inflammatoire, antiseptique, antibactérien, anti-ascorbique et anti-dysentérique (7,42). Le bois de Tara est utilisé dans les constructions rurales, dans la fabrication de manches d'outils ou comme bois de chauffage en raison de sa densité élevée qui lui confère une fort pouvoir capacité calorifique (pouvoir calorifique = 7 000 cal / Kg) (Padilla, 1995, Lojan, 1992) (38).

Dans le paysage urbain, la Tara représente un arbre d'ornement, pour la beauté de ses fleurs et de sa cime feuillue (28).

## **1.4 Culture de la Tara**

Dans les forêts naturelles de Tara, il n'y a pas de véritable sylviculture, la récolte de ses fruits ressemble davantage à un processus de récolte traditionnel, bien que des efforts soient déployés pour mettre en œuvre un plan de gestion forestière. À l'heure actuelle, la majeure partie de la production provient de ces forêts et pour 25% des plantations.

### **1.4.1 Gestion des forêts naturelles**

En général, les forêts naturelles de Tara sont totalement négligées: pleines de mauvaises herbes, d'arbustes et d'arbres, toutes densément abondantes, qui se disputent les éléments nutritifs, l'eau et la lumière. Il faut commencer par enlever les mauvaises herbes, les arbustes et les arbres de la racine, permettant ainsi une plus grande proportion de lumière. S'en suit l'éclaircie qui consiste en l'élimination définitive des arbres de Tara les plus faibles ou trop proches les uns des autres, ce qui permet d'assurer une distance suffisante entre les meilleures tiges. Ensuite, la taille est faite, qui consiste à couper les branches pour obtenir une meilleure production de la plante. Il est recommandé de le faire avant le début de la saison des pluies et en fonction de l'état de chaque plante. Ensuite, les plantes parasites et hôtes (achupallas, plantes sauvages, lichens) qui se trouvent dans les branches de la cime de l'arbre ou dans son tronc doivent être éliminées. Il est nécessaire de lutter efficacement contre les parasites et les maladies, puis de préparer le sol pour réduire l'érosion et enfin une fertilisation adéquate (43).

Il a été signalé que, dans le cas de plantes sauvages groupées dans des zones restreintes ou isolées, leur production atteindrait 10 kg / plante, ce qui peut être augmenté avec une irrigation et une fertilisation appropriées (9).

#### **1.4.2. Gestion des plantations de Tara**

Pour l'établissement de la plantation, il est nécessaire de prendre en compte plusieurs aspects tels que: le lieu de plantation, la densité, la préparation du terrain, l'installation des plants en soi. Les plantations doivent être effectuées au début de la saison des pluies. Dans le cas de plantations en zones semi-arides, il est nécessaire de prendre des précautions pour améliorer l'infiltration d'eau dans le sol (9).

La gestion des plantations de Tara consiste à élaguer les tiges lorsque celle-ci atteint une hauteur de 80 cm, ce qui consiste en une coupe de stimulation permettant de favoriser la production de gousses. L'irrigation de la plantation doit être effectuée à une fréquence de 3 à 4 fois par mois minimum. Il est recommandé de fertiliser les sols après un an d'installation de la plantation juste avant le début des premières pluies.

Le type de gestion dans les systèmes agroforestiers consiste à effectuer une taille durant les premières années, en évitant les déformations de tiges, en contrôlant les parasites et / ou les maladies. La densité la plus recommandée est de 4 x 5 m, dans lequel vous pouvez trouver entre 500 et 600 plantes par ha (9).

#### **1.4.3 Rendement**

La production de la Tara au Pérou est très variable, car il existe des arbres qui produisent 5 kg et d'autres qui en produisent 40 kg; ceux qui sont isolés, très

grands et avec une bonne disponibilité en eau peuvent produire 120 kg / an. Cependant, la teneur en tanins et la quantité de gomme varient également d'une plante à l'autre (20). Le rendement par arbre de la Tara est en moyenne de 20 kg à 40 kg de gousses, avec deux récoltes par an (9). Les gousses sont récoltées à maturité et sèchent au moment où elles deviennent rouges. Ensuite, elles sont séchées au soleil avant d'être transformées.

En général, la première récolte de Tara dans les plantations gérées est effectuée à partir de la troisième année, à l'état naturel après 4 ans. Bien que la première récolte puisse être donnée à la deuxième année, elle est minime (12). Leur durée de vie moyenne est de 100 ans (9), un arbre est estimé productif à 35 ans (1). Le rendement au niveau industriel, pour 100 kg de gousses de Tara récoltées, est compris entre 60 et 64% de farine de Tara, entre 34 et 38% de semences et 2% de déchets. La farine de Tara donne entre 45 et 50% d'extrait de tanin et, à partir de graines, environ 24% de gomme de Tara (7) est obtenue. La gousse contient jusqu'à 2,8% de protéines, 73% de glucides, 60 à 70% de tanins, tandis que les graines contiennent 19% de protéines, 67% de glucides, 4% de tanins et la valeur énergétique de la gousse de la Tara va de 318 à 400 kcal / 100 g, respectivement (1). Les caractéristiques souhaitables et sélectionnables que tentent d'améliorer les producteurs de Tara sont la quantité de tanins et une production de gousses (18); l'amélioration devrait se concentrer sur la production accrue de fruits avec une production accrue de gommes et de tanins.

#### **1.4.4. Concentration de tanins chez la Tara**

(18) a conclu que la production de tanins est un facteur déterminé génétiquement, puis indépendant de l'interaction avec l'environnement.

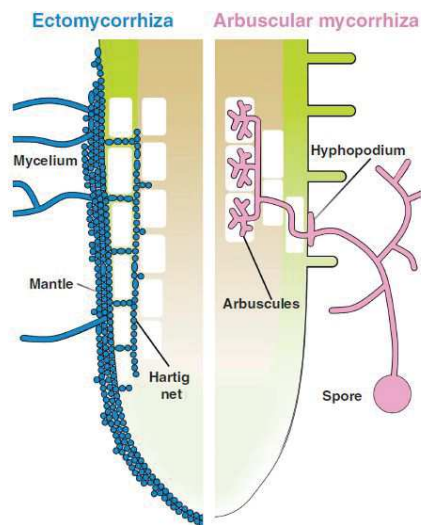
Cependant, au Pérou, il a été possible de différencier différents écotypes en produisant des gousses de différentes qualités. Ainsi, sur les sols moins acides, Tara présente une concentration plus élevée en tanins (7). Il a été constaté que, dans son aire de répartition naturelle, la meilleure qualité de tanin est obtenue à Ayacucho, où les sols sont alcalins. Avec une pluviométrie annuelle de 600 à 650 mm, la quantité en tanins varie de 60% à 62%, tandis qu'à Cajamarca, avec des sols légèrement acides et des précipitations plus abondantes (900 à 1100 mm), la quantité en tanins varie de 48% à 52%. Pour les collines du sud du Pérou (Ilo-Lomas de Tacahuay), on a obtenu des rendements en tanins de l'ordre de 48% (20). Considérant que le pourcentage de tanins présents dans les graines de Tara s'avère être une caractéristique importante de ses propriétés pour l'industrie de la tannerie, il est nécessaire de trouver la "formule magique verte" pour améliorer la concentration des tanins dans l'industrie.

Par conséquent, nous proposons d'utiliser les avantages de la symbiose mycorhizienne et l'effet d'autres bactéries, que nous allons voir dans le chapitre suivant, afin d'obtenir une meilleure disponibilité des éléments nutritifs et de l'eau pour les plantes de Tara et parvenir ainsi à une amélioration dans la production de « l'or vert des Incas ».

## - **2 La symbiose mycorhizienne**

Les mycorhizes (du grec mykes, mycète et rhiza, racine) représentent l'association entre certains champignons (mycobiontes) et les racines de plantes (phytobiontes). Le terme "mycorhize" a été inventé par Frank, un pathologiste forestier allemand, en 1877, lorsqu'il étudiait les racines de certains arbres de la forêt, afin de caractériser l'association entre plantes et champignons (44, 45). Cependant, son origine est aussi ancienne que les plantes terrestres, puisqu'il existe des traces de fossiles datant d'au moins 370 millions d'années (46). (47) définissent les mycorhizes en termes fonctionnels et structurels, comme "des organes à double absorption qui se forment lorsque les champignons symbiotes vivent dans les organes d'absorption sains (racines, rhizomes ou talus) de plantes terrestres, aquatiques ou épiphytes". (45). La plante fournit le symbiote fongique du carbone issu de la photosynthèse, ce qui peut faciliter l'apport d'éléments nutritifs pour la plante (48). Selon les symbiotes fongiques impliqués dans l'association, plusieurs types de mycorhizes sont reconnus (49). Il existe deux classes de mycorhizes d'importance pour les sols agricoles: les ectomycorhizes et les endomycorhizes (46), selon que le champignon colonise les espaces intercellulaires de la racine ou qu'il se développe à l'intérieur des cellules (50) (figure 4).



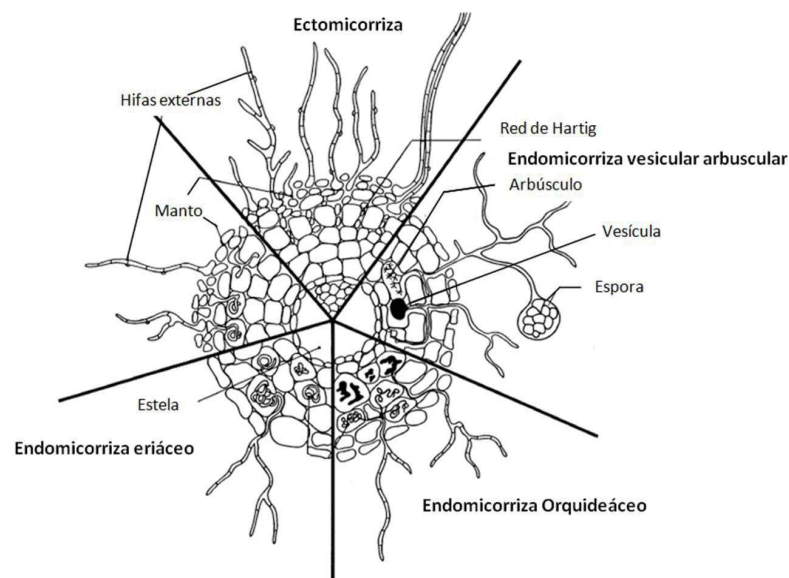


**Figure 3** Illustration des structures de colonisation racinaire dans les interactions ectomycorhithiques (bleu) et les mycorhizes arbusculaires (rose). Le champignon ectomycorhithien entoure la pointe de la racine d'un épais manteau d'hyphes très compacts, tandis que le réseau de Hartig se développe autour des cellules épidermiques (vert). Dans le cas des mycorhizes arbusculaires, l'extrémité de la racine n'est généralement pas colonisée. Les hyphes se développent à partir d'une spore et produisent un hyphopodium dans l'épiderme de la racine. La colonisation intraradicale se déroule de manière intra et intercellulaire et aboutit à la formation d'arbuscules, de petits champignons, à l'intérieur des cellules corticales internes (50).

Les ectomycorhizes: (du grec *ektos* qui signifie "à l'extérieur"), où les champignons se développent essentiellement autour de la racine, forment un paquet de mycélium (le manteau) à partir duquel se développent des hyphes insérés entre les cellules corticales de la racine (réseau de Hartig). Vers l'extérieur, les hyphes prolifèrent à partir du manteau fongique et colonisent leur environnement en formant le réseau extra-matriciel. Il se compose de 3 à 5% de plantes vasculaires et est principalement présent dans les dicotylédones (51). Ce type d'association est principalement représenté par des espèces forestières des régions tempérées, méditerranéennes et boréales, bien qu'il ait également été décrit pour certaines espèces tropicales de la famille des Dipterocarpaceae, Euphorbiaceae, Cesalpiniaceae, Myrtaceae et Fagaceae. Les associés fongiques sont des champignons supérieurs, appartenant aux Basidiomycètes (Boletus,

Russula, Laccaria ...), mais aussi aux Ascomycètes (Tuber, Elaphomyces ...) (52). Certains de ces champignons sont cultivables en l'absence de leur plante hôte (49). Les endomycorhizes (du grec endon: "à l'intérieur") se caractérisent par l'absence du manteau mycélien externe et par la pénétration d'hyphes fongiques dans les cellules corticales. Les endomycorhizes se divisent en plusieurs types (46):

- Eriacées: caractéristiques des endomycorhizes et des ectomycorhizes, associées aux Ascomycètes (Les Pezizaceae). Le mycélium forme des billes à l'intérieur des cellules du parenchyme cortical (52).
- Orchidacées: infectés par les basidiomycètes, le mycélium forme des billes à l'intérieur des cellules du parenchyme cortical (52).
- Mycorhizes vésiculaires arbusculaires: que nous verrons en détail dans le point suivant.

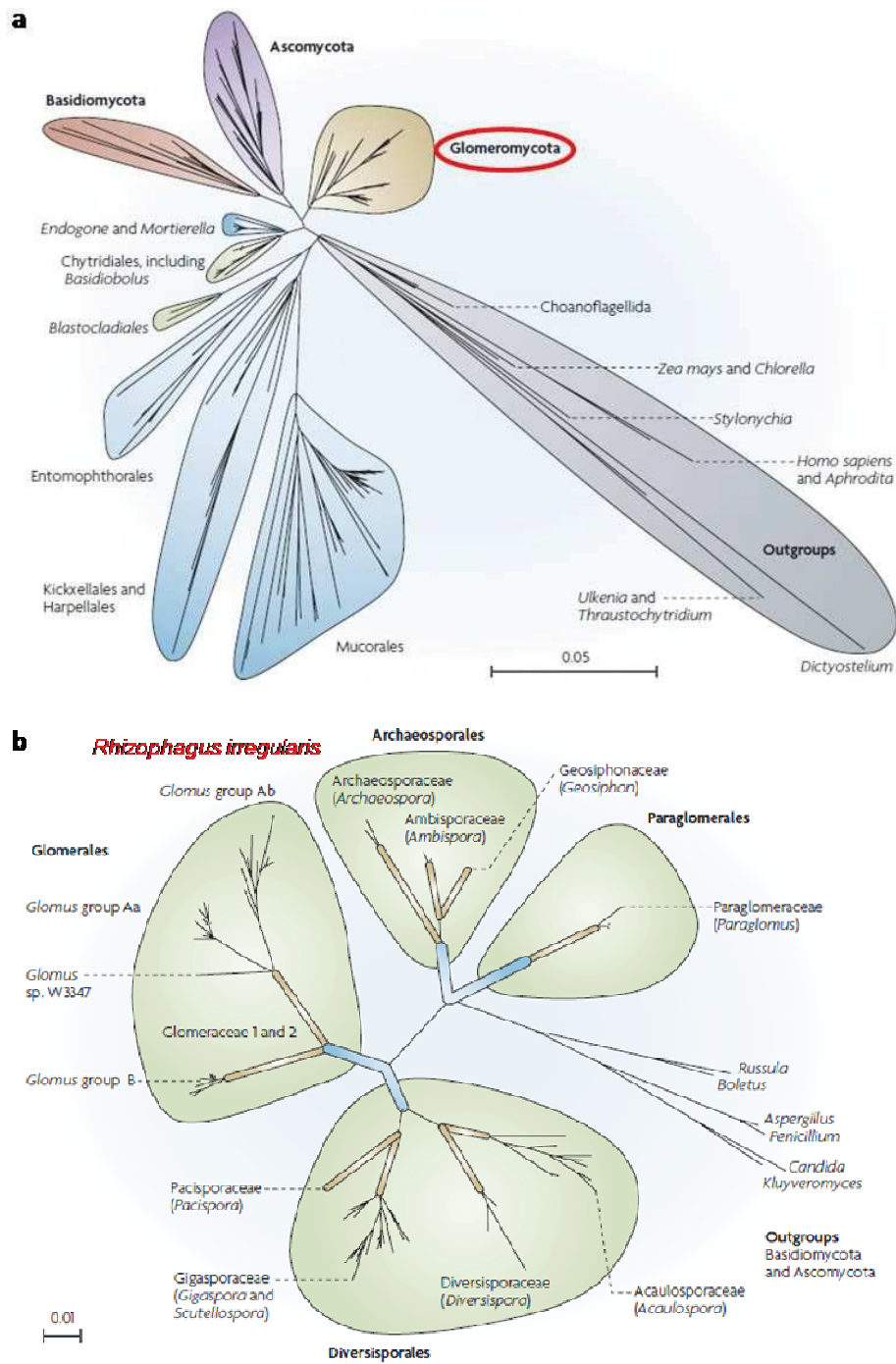


**Figure 4 Principaux types de mycorhizes présentes représentées dans une section transversale de la racine. Schéma modifié d'après F. Le Tacon, INRA Nancy - La Recherche n° 166 mai 1985.**

## 2.1 Mycorhizes vésiculaires arbusculaires

Les mycorhizes vésiculaires à arbuscules ont une grande variété de plantes hôtes, elles sont les plus omniprésentes dans les sols agricoles, représentant 9 à 55% de la biomasse totale de microorganismes du sol (53); (54), cité par (55), se retrouvent dans la plupart des écosystèmes, y compris arides et semi-arides (56). Arrivant à infecter la plupart des cultures agricoles et 90% de toutes les plantes vasculaires (57) elles sont principalement liées à l'approvisionnement en phosphore (49). Bien qu'elles aient une très large distribution, les mycorhizes arbusculaires sont caractéristiques des sols où le phosphore est le principal nutriment limitant la croissance des plantes, comme ceux que l'on trouve dans les régions tropicales et subtropicales (58). Il a été constaté que cette association mycorhizienne se développe de préférence dans les sols acides et que le pH optimal varie en fonction des différentes espèces de champignons. Plus l'humidité du sol est élevée, plus les mycorhizes sont abondantes. Il a également été prouvé que le développement des mycorhizes varie inversement avec la fertilité du sol. Les mycorhizes se trouvent normalement dans des sols déficients en un ou plusieurs minéraux (59).

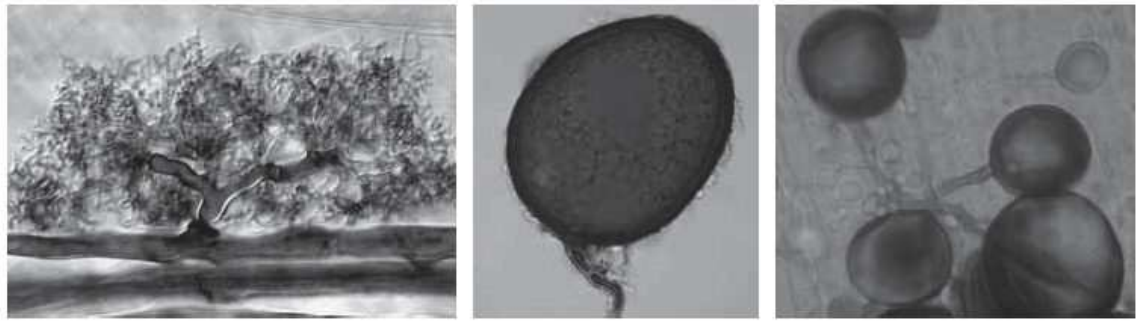
Les genres les plus importants sont *Glomus* (généralement les mycorhizes vésiculaires arbusculaires les plus isolées du sol), *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Entrophospora* et *Scutellospora*. (Figure 6).



**Figure 5** Phylogénie des Glomérormycètes (adapté de Parniske, 2008). **a**: arbre phylogénétique de différentes lignées de champignons, il s'agit des glomérormycètes (orange), des ascomycètes (en violet), des basidiomycètes (en rouge), des chytridiomycètes (en vert) et des Zygomycètes (en bleu). **b**: arbre phylogénétique de 4 ordres de Glomérormycètes, les champignons utilisés dans cette thèse sont indiqués en rouge: *Rhizophagus Irregis* (ex *Glomus intraradices*).

Les espèces mycorhizées vésiculaires arbusculaires produisent de grandes spores, au repos, pouvant atteindre un diamètre de 0,2 mm. Certaines mycorhizes vésiculaires arbusculaires possèdent des spores agglomérées dans des sporocapsules. La morphologie des spores est à la base de leur identification, compte tenu du fait que le champignon lui-même ne peut pas être cultivé (46). Les champignons des mycorhizes vésiculaires à arbuscules forment deux structures principales qui les distinguent des mycorhizes, des arbuscules et des vésicules (46).

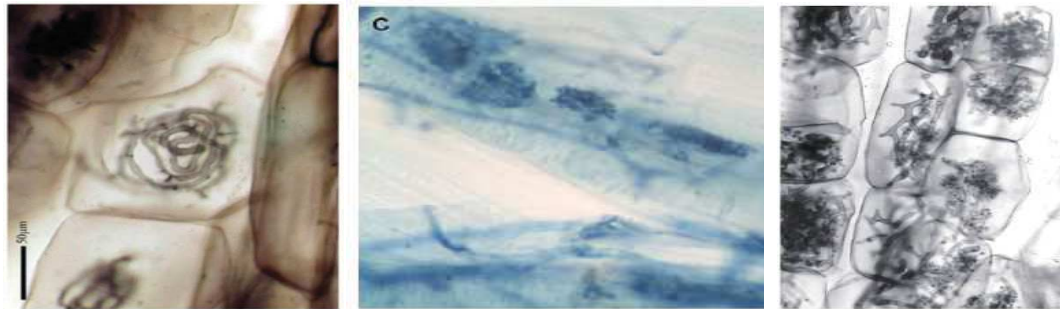
Les arbuscules ainsi que les vésicules sont des structures servant de réserve, situées dans ou entre les cellules. Ces structures sont considérées pour le diagnostic de la symbiose des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) (60) cité par (55). Les arbuscules sont des structures intracellulaires (on les trouve toujours à l'intérieur des cellules) caractéristiques, uniques dans chez les CMA. Ils sont constitués d'hyphes hautement ramifiés qui se développent entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique des cellules et sont responsables de l'échange de nutriments entre les symbiotes. Les vésicules sont des structures globuleuses contenant des lipides et des granules de glycogène qui servent d'organe de réserve pour le champignon. Ils sont situés à l'intérieur et entre les cellules.



**Figure 6 Structures de champignons mycorhiziens arbusculaires.** (a) Arbúsculo, (b) spores de *Glomus* sp. et (c) des vésicules dans les racines de capirona (*Calycophyllum spruceanum*) (54,61).

La morphologie des champignons MA peut changer dans les racines de différents hôtes et dans les racines de différents âges de la même plante (62), cité par (55,63). Certaines caractéristiques édaphiques, telles que l'apport de phosphore, peuvent entraîner des altérations de la morphologie des champignons MA dans les racines (64) cité par (63).

Certaines caractéristiques morphologiques des champignons MA, telles que les spores avec leurs hyphes minimisés, leurs vésicules, leurs arbuscules, leurs cellules auxiliaires, le développement d'hyphes de Paris (hyphes et rouleaux intracellulaires) et leurs "arums" (hyphes et arbuscules intercellulaires) (49,63) ), reconnaissables au microscope à basse résolution, permettent leur identification, au moins au niveau du sexe. Ce dernier type de colonisation mycorhizienne arbusculaire "Paris" et "Arum" serait déterminé par l'interaction entre le génotype de la plante et le génotype du champignon mycorhizien de la plante hôte (65-67). Cependant, il reste encore mystérieux de déterminer les facteurs liés à ce type d'association de mycorhizes arbusculaires.



**Figure 7** Types d'association mycorhizienne arbusculaire. a) Type "Paris": amas de mycélium en spirale occupant le milieu d'une cellule corticale (Peterson et al., 2006) tiré de Garbaye 2013; b) type "Arum" d'Arumbus (Jalonen, 2013); c) type de colonisation intermédiaire entre les types "Paris" et "Arum", le mycélium passant directement d'une cellule à une autre dans le type "Paris" mais portant de petits arbuscules en plus des spirales (Peterson et al., 2006) prises de Garbaye 2013.

**Tableau 3** Différences entre les ectomycorhizes et les mycorhizes vésiculaires à arbuscules

	<b>Ectomycorhizes</b>	<b>Mycorhizes vésiculaires à arbuscules</b>	<b>Référence</b>
<b>Plante hôte</b>	Généralement Gymnospermes	Très varié	(46)
<b>Site de culture</b>	En dehors de la plante hôte	À l'intérieur de la plante hôte	(46)
<b>Morphologie racinaire</b>	Implique des modifications importantes	Pas de modification après l'infection des endomycorhizes	(49,51)
<b>Réseau de Hartig</b>	Présent	Absent	(50)
<b>Partenaires fongiques</b>	Basidiomycètes ou Ascomycètes	Gloméromycètes	(52,68)

### **2.1.1 Modèle de champignon mycorhizien arbusculaire: *Rhizophagus irregularis***

Ces dernières années, la communauté scientifique a modifié le nom de plusieurs champignons mycorhiziens, dont le modèle fongique *Glomus intraradices*, reclassé en 2009 sous le nom de *Glomus irregularis* ((69), cité par (70). (71) ont proposé le nom *Rhizophagus irregularis*, ce dernier terme étant utilisé par plusieurs auteurs (72); (73) (74); (75); (76)), qui sera utilisé dans la présente étude sous le nom de *R. irregularis*.

### **2.1.2 Dépendance mycorhizienne**

La dépendance mycorhizienne est une propriété intrinsèque de chaque espèce végétale et, en fonction de l'espèce fongique, déterminée par l'ampleur des avantages procurés par la symbiose sur les effets du développement et de la croissance de la plante hôte.

Selon plusieurs études réalisées, en réponse à l'association avec un champignon, un meilleur établissement des espèces sur des terres dégradées est évident (77,78); augmentation de la production de biomasse d'arbres fruitiers (79); une amélioration de la production végétale ainsi qu'une efficacité photosynthétique plus élevée après une période de sécheresse (80). En général, certains mécanismes physiologiques impliqués dans les effets des mycorhizes sur le développement des plantes, qui ont été démontrés expérimentalement, confirment que le champignon impliqué dans la symbiose modifie l'équilibre interne de la plante (68). De plus, les racines des plantes sont indirectement impliquées dans la modification des



minéraux du sol; cependant, ce sont les microorganismes qui les accompagnent qui jouent un rôle direct. Surtout des champignons mycorhiziens et des bactéries qui contribuent à l'altération des minéraux et permettent la mobilisation d'un grand nombre de nutriments nécessaires à la croissance et au développement de la plante.

Pour l'étude de la dépendance mycorhizienne, il faut non seulement prendre en compte la contribution potentielle des champignons mycorhiziens, mais aussi exclure les contributions possibles de la fixation symbiotique de l'azote, par l'activité bactérienne, par la présence de légumineuses.

Les travaux de (81,82) sur les communautés de micro-organismes basés sur l'analyse de séquences codant pour l'ARNr 18S amplifié avec le premier AM1 à partir de racines de cultures agricoles ont montré une diversité plus faible des communautés fongiques MA dans les sols cultivés en comparaison avec les sols de prairies ou de forêts. Ces résultats coïncident avec la mesure de la richesse spécifique des sols cultivés selon le morphotype de spores (83-85). Cette perte de diversité a été attribuée à une pression de sélection complexe exercée par les pratiques agricoles sur les communautés de champignons MA, parmi lesquelles la fertilisation minérale, le travail du sol, l'utilisation de pesticides et la monoculture. La dépendance mycorhizienne comprend à la fois le type de culture, les conditions édaphiques (état du milieu modifié par la culture précédente et la culture associée) et l'effet de l'itinéraire technique suivi (86).

La dépendance mycorhizienne relative de la plante est calculée selon la formule suivante:

$$DM = \frac{BTM - BTNM}{BTM}$$

**DM:** Dépendance mycorhizienne

**BTM:** biomasse totale des plantes mycorhizées

**BTNM:** biomasse totale des plantes non mycorhizées

Il existe trois catégories d'espèces végétales en fonction de leur dépendance mycorhizienne: a) les plantes dites non mycotrophes capables de se développer sans l'intervention de champignons mycorhiziens, b) les mycotrophes facultatifs qui se reproduisent grâce à la symbiose mycorhizienne uniquement lorsque le milieu dans lequel ils se développent est pauvre en éléments nutritifs et c) des mycotrophes obligatoires, ceux qui ne peuvent terminer leur cycle de développement qu'en association avec des champignons mycorhiziens (87) cité par (88).

## 2.2 Effet mycorhizosphère

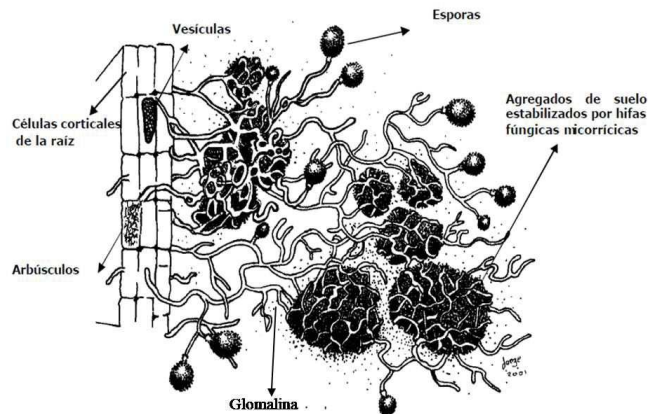
Les champignons mycorhiziens arbusculaires font partie intégrante du système pédologique. La rhizosphère est composée de sol proche des racines des plantes et est affectée par leur activité (89). L'établissement de la symbiose mycorhizienne des arbuscules conduit à l'apparition de nouveaux compartiments biologiques au sein de la rhizosphère, modifiant la physiologie de la plante et par conséquent la qualité et la quantité des exsudats de racines, le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne induit, dans la structure de la microflore tellurique, différents

compartiments microbiens composés de communautés bactériennes et fongiques présentant des caractéristiques spécifiques (structure, diversité fonctionnelle). Le terme "mycorhizosphère" a été proposé pour caractériser ce volume de sol sous l'influence de mycorhizes (90-92). La mycorhizosphère a deux composantes, la couche de sol autour des racines mycorhizées et le sol près des hyphes du champignon mycorhizien (HM) ou du mycélium externe qui constitue l'hyphasphère ou la mycosphère (89). Grâce à son réseau de mycéliums, le volume de sol exploré par le champignon s'avère beaucoup plus important que celui exploré par les seules racines (70).

### **2.3 Rôle de la symbiose mycorhizienne arbusculaire dans la croissance et le développement de la plante**

Ces champignons mycorhizés arbusculaires jouent un rôle important dans les écosystèmes car ils participent à la décomposition et à la minéralisation de la matière végétale organique (44,93). Ils mobilisent et transportent les éléments nutritifs tels que l'azote et le potassium présents dans le sol vers la plante hôte par le biais du mycélium extraradical, qui explore le sol et fournit une grande surface pour l'absorption d'eau et d'éléments nutritifs (49,94). Les champignons MA s'étendent dans le sol au-delà de la surface des racines ou de la zone des poils absorbants, car leur plus petit diamètre (semblable ou moins aux poils absorbants) leur permet de pénétrer dans les pores du sol auxquels les racines ne peuvent accéder, permettant ainsi une capacité d'exploration des sols et absorption des éléments nutritifs dans les sols plus secs (60), cité par (55). Ils améliorent

l'agrégation des particules du sol, ce qui lui confère une plus grande stabilité et peut représenter de 10 à 20 fois la réserve de carbone provenant de la biomasse microbienne du sol (95) grâce à la production de glomaline, une glycoprotéine agissant comme colle des particules de sol (54) (figure 8). Les CMA augmentent la tolérance aux périodes de sécheresse et de déficit en eau (80,96). Ils augmentent la tolérance à l'aluminium, la toxicité due aux métaux lourds et aux polluants organiques (54), ce qui constitue un avantage essentiel pour une absorption plus efficace du phosphore, des nutriments et des oligo-éléments dans le sol, augmentant potentiellement la croissance des plantes et l'uniformité des cultures sans avoir recours aux engrais (97, 98, 99, 100). Ils agissent en synergie avec des bactéries fixant l'azote et des microorganismes solubilisant le phosphore, en établissant une relation tripartite (101). Ils fonctionnent comme un mécanisme de restauration écologique des sols (102), augmentant la biodiversité végétale de l'écosystème en tant que produit de la biodiversité d'espèces AMF (54). Ils garantissent une meilleure protection des racines contre les micro-organismes pathogènes du sol (103,104) tels que les nématodes, le *Fusarium oxysporum* ou le *Rhizoctonia solani* (54) (105).



**Figure 8 Représentation schématique de l'effet du mycélium externe des champignons mycorhiziens à arbuscules sur la stabilisation et la formation d'agrégats de sol (106)**

Dans une étude réalisée par (107), il a été conclu que la plupart des légumineuses arboricoles de l'Amazonie péruvienne supportent des niveaux élevés d'infection mycorhizienne. Cependant, (63) ont conclu que, dans les sols ultisoles prédominants dans l'Amazonie péruvienne et carencés en phosphore (Yurimaguas, Pérou) provenant de jachères forestières secondaires de 16 ans et de 5 ans, chez les légumineuses de la sous-famille Caesalpinioideae, les niveaux d'infection mycorhizienne étaient faibles par rapport aux membres de la sous-famille Mimosaceae de la famille des Fabacées.

## **2.4 Cas d'amélioration de la culture après l'inoculation de l'AMF**

### **2.4.1 Au Pérou**

Selon différentes études d'inoculation de HMA sur des cultures au Pérou, l'efficacité et l'impact positif sur l'amélioration de la productivité ont été démontrés. Preuve d'un effet positif de l'inoculum mycorhizien du champignon *Scleroderma verrucosum* sur la production de plants de *Pinus radiata*, où des

plantes inoculées ont montré des tiges ‘une plus grande taille et d’un plus grand diamètre que celles des plantes témoins (59).

En outre, il a été constaté que ces CMA sont associés à de nombreuses cultures au Pérou; comme c'est le cas du genre *Glomus* qui sont associées aux racines de cacao sauvage (55). De même, (105) a montré que les champignons endomycorhiziens associés à la culture de physalis amélioreraient sa production en le protégeant du nématode *Meloidogyne incognita* présent dans le sol. Une réponse positive à l'inoculation de CMA chez des plants de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) a également été testée. Considérant que cette culture présente normalement des besoins élevés en phosphore en raison de son système racinaire rare, de sa période végétative courte et de son association naturelle limitée avec les champignons MA (108). Il a été démontré que l'inoculation de champignons MA dans la pomme de terre était très utile pour réduire ces besoins et améliorer l'équilibre hydrologique et hormonal des plantes lors du repiquage, ainsi que pour rendre la fertilisation phosphatée plus efficace (108).

#### **2.4.2 Etudes dans d'autres pays**

L'inoculation avec des champignons MA a été testée sur les plantes indigènes d'Amérique (*Amelanchier denticulata* ("Tlaxistle") et *Eysenhardtia polystachya* ("Bâton sucré") cultivées dans des sols pauvres du Mexique. Même avec des pourcentages relativement faibles de mycorhization, des améliorations significatives ont été obtenues dans la croissance initiale en diamètre et en

hauteur, ce qui peut conférer des avantages importants au moment de la transplantation sur le terrain (109).

De même, un effet bénéfique (plus grand poids sec foliaire et radical) a été observé au début de l'acclimatation de bananiers dans les agro-écosystèmes bananiers d'Urabá en Colombie suite à l'inoculation avec les champignons MA (Musa AAA cv. 'Gran Enano ') qui a permis de coloniser les racines en développement, obtenant ainsi des bénéfices pour la plante dès le début de sa croissance (110).

Une étude réalisée (88) sur des plantes de *Uapaca bojeri*, une espèce endémique de Madagascar, a également révélé que la présence d'un arbuste associé à cette *Leptolaena bojeriana* améliorerait de manière significative le taux de mycorhisation du sol, montrant une augmentation significative du poids sec de la biomasse aérienne de la plante.

Dans une étude (111) réalisée à Niébé, une espèce endémique du Burkina Faso, une augmentation significative de la croissance de cette culture a été observée lors de l'inoculation de champignons MA natifs par rapport à l'inoculum de champignons MA exotiques.

### - **3 La symbiose rhizobienne**

L'azote est un facteur limitant chez les plantes, même si l'azote moléculaire est abondant dans l'atmosphère. Les plantes ne possèdent pas de gènes codant pour la dinitrogénase (112), mais dépendent de l'activité de fixation de l'azote de bactéries diazotrophes ayant l'enzyme nitrogénase complexe (113). La plupart des espèces de légumineuses peuvent entrer en symbiose avec une bactérie appelée rhizobium.

Ainsi, le terme symbiose Rhizobienne est en association mutualiste avec des avantages réciproques entre les légumineuses et les bactéries de type rhizobium. Ces dernières permettent la réduction de l'azote atmosphérique sous une forme assimilable par les plantes. En contrepartie, la plante fournit du carbone au rhizobium sous forme de produit de la photosynthèse (114).

### **3.1 Les partenaires de la symbiose rhizobienne**

#### **3.1.1 Le membre de la plante: la plante hôte**

Les plantes qui établissent une fixation symbiotique de l'azote avec Rhizobium appartiennent toutes à la grande famille des Fabacées (ou légumineuse), sauf pour *Parasponia tomentosa* appartenant à celle des Ulmacées (113) comme on a pu observé l'existence de la symbiose Rhizobium chez quatre espèces de cette famille (115). Cette grande famille de Fabacees contient environ 20 000 espèces, qui regroupe trois sous-familles: Caesalpinacees, le Mimosacees et Papilionacees (113,116). La plupart des genres appartenant à ces deux derniers ont la capacité sous-familles pour former une symbiose Rhizobium, 50% Mimosacees et près de 90% des genres Papilionacees, cependant, seulement 5% à 10% des genres Caesalpinacées présentent cette capacité (117).

#### **3.1.2. Le partenaire bactérien: La rhizobia**

Les partenaires bactériens de cette symbiose connue sous le nom de rhizobium, vient de deux mots grecs « rhiza » (root) et « bios » (la vie), signifie étymologiquement « celui qui donne la vie dans les racines » ((118)(116).



Généralement, les rhizobiums définie comme un substrat de liaison bactérie-azote capable d'induire la formation de nodules sur les racines ou les branches de plantes légumineuses à l'intérieur duquel l'azote atmosphérique est réduite en ammoniac pour bénéficier à la plante (119).

Les rhizobies sont des bactéries à Gram négatif (93), réparties en 3 classes: protéobactéries  $\alpha$  et  $\beta$ :

L' $\alpha$ -protéobactéries: la plupart des symbioses légumineuses avec des membres du genre forment *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* et *Sinorhizobium*.

La  $\beta$ -Proteobacteria: Certaines légumineuses, comme un grand nombre du genre Mimosa sont principalement nodulées par les membres de cette classe dans le genre Burkholderia et Cupriavidus (120).

Cependant, la classification des rhizobiums est toujours en constante évolution ((Wang et Martinez-Romero, 2000 cité par (113), (121)).

### **3.2 La spécificité de l'hôte**

L'une des principales caractéristiques de l'association symbiotique légumineuses-rhizobiennes est sa spécificité, étant donné qu'une souche donnée infecte un nombre limité d'espèces végétales, appelé spectre hôte de la bactérie. La notion de simbiovar I (suivant le concept de pathovar classique pour les bactéries pathogènes des plantes) a été défini pour différencier les bactéries de la même espèce, mais ayant une gamme de différents hôte (122) pris en charge à partir de la vue (123)). Par exemple, les trois simbiovars de phaseoli, trifolii et viciae ont

été créés à partir des espèces *Rhizobium leguminosarum* pour les souches nodulation de *Phaseolus*, *Trifolium* et *tribus viciae* (y compris les genres *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* et *Lens*) respectivement (122,124, 125). Les souches de simbiovar *viciae* ont également été détectées dans *Rhizobium fabae* (126) et *Rhizobium pisi* (127).

En outre, *R. leguminosarum* peut former des nodules fixateurs d'azote chez plusieurs légumineuses. Selon spécificité de l'hôte par les gènes appelés de nodulation de l'hôte spécifique (*hsn*), qui ont été divisés en trois biovars (124); biovar *viciae* (vesce spécifiques, les haricots et les lentilles), biovar *trifolii* (trèfle spécifique) biovar *phaseoli* et (*Phaseolus* frejoles spécifiques) de reconquis (125). Alors que pour *R. leguminosarum* sv *viciae* (*Rlv*), la gamme d'hôtes est déterminé par les gènes de nodulation (*nod*) situés à l'intérieur d'un plasmide symbiotique (*pSym*) (128).

### **3.3 Établissement de la symbiose rhizobienne**

Au cours de la phase initiale de la symbiose, les flavonoïdes et les autres molécules apparentées sécrétées par les racines des légumineuses induiront l'activation ou la répression de l'expression des gènes de nodulation dans les rhizobies. Les bactéries *Rizobia* adhèrent généralement aux cellules ciliées de la racine de légumineuse et induisent leur déformation. Dans certains cas, les poils radiculaires sont déformés de manière à piéger les bactéries à l'intérieur d'un rouleau (ondulation).

Le mode d'infection le plus étudié et le plus répandu est l'infection intracellulaire qui part de ces poils ondulés de la racine, avec des fils d'infection poussant

comme des invaginations de la paroi de la plante de la cellule hôte à partir du centre du rouleau (Fig. 10a, b)

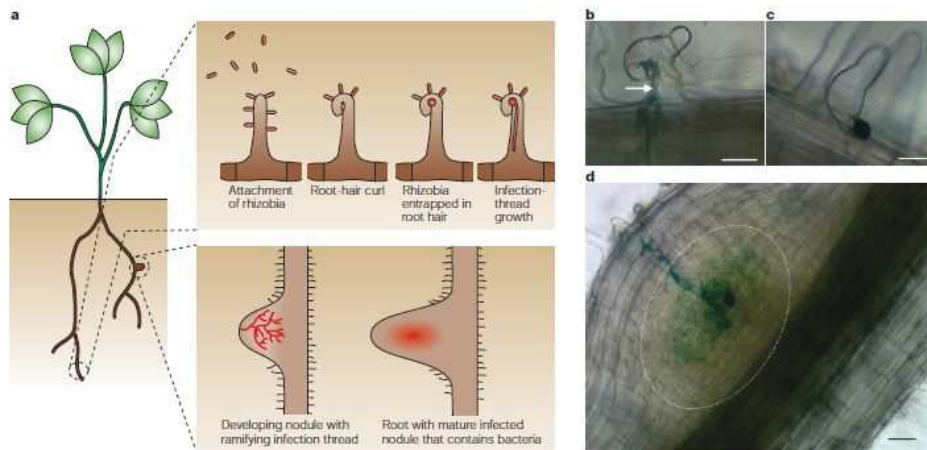
Le fil d'infection généré est la zone de multiplication active du rhizobium. Parallèlement à ce processus d'infection, la division cellulaire débute au niveau des cellules corticales de la racine, générant ainsi la formation du nodule (129).

Le fil de l'infection est invasif et traverse plusieurs cellules du cortex radicaire pour atteindre les nouvelles cellules en division (Figure 10 a, d). Lorsque les fils d'infection pénètrent dans ces cellules, les bactéries sont libérées dans le cytoplasme de la plante et entourées d'une membrane végétale. Les bactéries s'allongent et se différencient en formes fixatrices d'azote connues sous le nom de bactéroïdes (113, 129, 130). Ces bactéroïdes, qui sont entourés par la membrane de la plante (qui subit également des modifications importantes), sont appelés symbiosomes (129, 131). Sous plusieurs aspects, les symbiosomes peuvent être considérés comme des organites similaires aux mitochondries ou aux chloroplastes; ils sont entourés d'une membrane végétale spécialisée à travers laquelle il y a échange de métabolites, notamment l'absorption d'acides dicarboxyliques, l'exportation d'ammoniac et le cycle des acides aminés. Cependant, au lieu de réduire l'oxygène ou le dioxyde de carbone, comme cela se produit respectivement dans les mitochondries ou les chloroplastes, ces symbiosomes symbiotiques "organites" réduisent l'azote. Cette symbiose nécessite un échange de signaux moléculaires entre la plante et la bactérie (Oldroyd et Downie, 2004).

Ce type d'infection intracellulaire a été observé dans certaines légumineuses de zones tempérées (par exemple: *Medicago*, *Trifolium*, *Pisum*) et certaines

légumineuses de zones tropicales et subtropicales (par exemple: Lotus, Phaseolus, Glycine) (131).

La figure 10 ci-dessous montre le processus de formation de nodules racinaires dans les légumineuses



**Figure 9 Infection à *Rhizobium leguminosarum* chez les légumineuses. a) Les premiers stades de l'infection des poils absorbants par *Rhizobium* et la croissance des nodules dans les racines. Les images b, c et d ont été obtenues en inoculant *Pisum sativum* ou *Vicia hirsuta* avec *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. La racine a été colorée histochimiquement avec de la  $\beta$ -galactosidase, montrant la bactérie infectante en bleu. b) Un fil d'infection normale est montré à partir des cheveux radiculaires de *P. sativum*, qui se replient sur eux-mêmes et les bactéries piégées constituent une source d'infection. Le fil d'infection (indiqué par une flèche) a émergé d'un tel point d'infection. c) Certains mutants de *R. leguminosarum* biovar *viciae* forment des foyers d'infection, mais ne forment pas de fil d'infection, comme illustré ici avec un double mutant *nodO nodE* de *R. leguminosarum* biovar *viciae*. d) Les fils d'infection envahissent et se développent à travers les cellules de lapin vers un primordium nodulaire croissant (entouré d'un cercle). L'image est celle d'un très jeune nodule de *V. hirsuta* infecté, comme expliqué ci-dessus. (Images de courtoisie de Simon Walker, John Innes Centre, Royaume-Uni). Les barres dans les parties b et c représentent 20  $\mu$ m et dans la partie d, 100  $\mu$ m. Pris et adapté de (129).**

## REFERENCES

1. Aleman F. La Tara *Caesalpinia spinosa*, especie prodigiosa para los sistemas agriforestales en valles interandinos.pdf. *Acta Nova*. 2009;4(2-3).
2. Quispe Palomino MG. Efecto de 3 biofertilizantes en el Desarrollo de Plantones de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kunt a nivel de vivero. 2015.
3. Medina Méndez TB. Efecto de la aplicación de leonardita en la primera etapa de crecimiento de una plantación de *Caesalpinia spinosa* Tara en Huaral. [Lima]: UNALM; 2016.
4. Allen ON, Allen EK. *The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation*. Univ of Wisconsin Press; 1981. 886 p.
5. De Faria Sm, Lewis Gp, Sprent Ji, Sutherland Jm. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytol*. 1989;111(4):607–619.
6. Ogata Gutiérrez K. Diversidad de microorganismos en la rizófora de « Tara » (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze) y su efecto en el crecimiento del cultivo. [Lima]; 2006.
7. Mancero L. La Tara (*Caesalpinia spinosa*) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la Región. Programa Reg ECOBONA-INTERCOOPERATION [Internet]. Févr 2009 [cité 19 janv 2017]; Disponible sur: <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/27400>
8. 30th JECFA. TARA GUM. 1986 [cité 13 juill 2018]; Disponible sur: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/jecfa\\_additives/docs/Monograph1/Additive-455.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-455.pdf)
9. De la Cruz Lapa P. Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa*-*Caesalpinia tinctoria*. *Rev Inst Investig Fac Ing Geológica Minera Met Geográfica*. 2004;7(14):64–73.
10. Roskov Y, Zarucchi J, Novoselova M, Bisby F. Catalogue of Life : *Caesalpinia spinosa* (Molina)Kuntze [Internet]. [cité 19 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/eb41e5d0a6d9273819e07df482a6726f>
11. Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M. *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew; 2005. 598 p.
12. Barriga Ruiz CA. 2017.
13. Reynel C, Pennington TD, Pennington RT, Marcelo JL, Daza A. Árboles útiles del Ande peruano: una guía de identificación, ECOLOGÍA y propagación de las especies de la sierra y los bosques montanos en el Perú. Publisher not identified; 2007. 466 p.

14. FOSEFOR-INTERCOOPERATION-SAMIRI. La Tara en el Ecuador. *Caesalpinia spinosa*. Universidad Técnica del Norte, ESPOCH, Fundación Arco Iris; 2006.
15. Pastor Velásquez AA. Extracción por solventes, caracterización y refinación del aceite de semilla de Tara (*Caesalpinia tinctoria*). [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 1977.
16. Coppen JJW. Gums, resins and latexes of plant origin. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1995.
17. Peñarrieta J, Aleman F. Manejo silvicultural de la Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, en los valles interandinos de Cochabamba, Potosí y Chuquisaca. Cochabamba, Bolivia. Silvicultural management of Tare *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, in the interandean valleys of Cochabamba, Potosí and Chuquisaca. Cochabamba, Bolivia. 2009;
18. Narváz Trujillo A, Calvo A, Troya AM. Las poblaciones naturales de la Tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Ecuador: una aproximación al conocimiento de la diversidad genética y el contenido de taninos por medio de estudios moleculares y bioquímicos. Programa Reg ECOBONA-INTERCOOPERATION. 2009;23.
19. Melo M, Glorio P, Tarazona G. Revista de la Sociedad Química del Perú - Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. 2013 [cité 5 oct 2015]; Disponible sur: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?Script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2013000300004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000300004)
20. Barriga C. Cultivos y aprovechamiento de la Tara *Caesalpinia spinosa* en la región andina. ECOBONA. Lima; 2008.
21. Macbride JF. Leguminosae, Flora of Peru. *Field Mus Nat Hist Bot.* 1943;13(3/1):1-506.
22. Duke JA. *Caesalpinia spinosa*. In: Handbook of Legumes of World Economic Importance. Plenum Press. New York; 1981. 32-33 p.
23. Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. *Syst Bot Mo Bot Gard.* 1993;45(i-xl):1-1286.
24. Ulibarri EA. Sinopsis de *Caesalpinia* y *Hoffmannseggia* (Leguminosae - Caesalpinioideae) de Sudamérica. *Darwiniana.* 1996;(34:329).
25. Jørgensen PM, León-Yáñez S. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Syst Bot Mo Bot Gard.* 1999;75(i-viii):1-1182.
26. Nieto C, Barona N. El guarango. Una opción agroindustrial y de exportación para conservación productiva. *Fund Desde El Surco Quito Ecuad.* 2007;1-20.
27. Villanueva C. La tara El Oro Verde de los Incas [Internet]. 1º Edición. Lima: AGRUM. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2007 [cité 17 avr 2017]. 163 p. Disponible sur: <http://www.asocam.org/biblioteca/items/show/2374>

28. Bustamante OF, Bustamante JL. La tara (*Caesalpinia spinosa*): oro verde de los valles interandinos del Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica; 2009. 119 p.
29. Polo Villanueva FD. Insectos y Acaros perjudiciales de una plantación de Tara (*Caesalpinia spinosa*) durante la primavera en Lurín [Internet]. [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2016 [cité 18 avr 2017]. Disponible sur: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2596>
30. Novoa S, Ramirez K. EVALUACIÓN DEL ESTADO DE CONSERVACIÓN DE LA TARA *Caesalpinia spinosa* EN EL DEPARTAMENTO DE AYACUCHO. 2007.
31. Sánchez G, Vergara C. Plagas de hortalizas. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2003. 172 p.
32. Marien JN, Delaunay G. La tara, *Caesalpinia spinosa*: espèce agroforestière emblématique des vallées interandines au Pérou. *Bois For Trop.* 2010;(304):2.
33. Cano AC, Roque J, Arakaki M, Arana C, La Torre M, Llerena N, et al. Diversidad florística de las Lomas de Lachay (Lima) durante el evento "El Niño 1997-98". *Rev Peru Biol.* 1999;6(3):125–132.
34. Vigo E, Quiroz V, Tierra AC. Manual El cultivo de tara en Cajamarca. 2007;
35. Chuquiruna D, Germán P. Forestación piloto con la tara en la microcuenca de San Juan (Alto Jequetepeque) Cajamarca. 2010 [cité 12 nov 2016]; Disponible sur: <http://200.62.146.130/handle/cybertesis/1516>
36. Alvarez A. CMA, de Ugaz OL. Taninos. *Rev Quím.* 1992;6(1):47–63.
37. Michiels C. Tara, un petit arbre porteur de grandes promesses [Internet]. Trade for Development Centre; 2013 [cité 15 déc 2014]. Disponible sur: [http://www.befair.be/sites/default/files/all-files/brochure/La%20tara\\_FR\\_2013.pdf](http://www.befair.be/sites/default/files/all-files/brochure/La%20tara_FR_2013.pdf)
38. Flores Tapia F, Chávarry Sánchez L, Vega Isuhuaylas D. Criterios y pautas para la selección de árboles plus. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze « tara » o taya". 2005.
39. Koo Gallo W. Tara en Polvo archivos [Internet]. Agrodataperu. 2017 [cité 23 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.agrodataperu.com/category/exportaciones/tara-en-polvo-exportacion>
40. Perú Forestal en Números 2015. Anuario Forestal 2015. SERFOR Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre. In: *Forestry Yearbook 2015*. 1ra edición. Lima; 2016.
41. Agronoticias. TARA.pdf. avr 2016;423.
42. Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M. Legumes of the world. The Royal Botanic Gardens, Kew. United Kingdom: Linklater, R.; 2006.
43. Ermis Vigo, Quiroz V. Manual El cultivo de Tara en Cajamarca [Internet]. Perú; 2006 [cité 12 avr 2017]. 40 p. Disponible sur: <http://www.asocam.org/biblioteca/items/show/2376>

44. Béreau, M, Louisanna, E, de Grandcourt , A, Garbaye, J. Symbiose mycorrhizienne et nutrition minérale. 2003 [cité 11 nov 2016]; Disponible sur: <http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/5820>
45. Camargo-Ricalde S, Montaña N, De la Rosa-Mera C, Montaña S. MICORRIZAS: UNA GRAN UNIÓN DEBAJO DEL SUELO [Internet]. 2012 [cité 12 mai 2015]. Disponible sur: <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/art72.pdf>
46. Coyne MS. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Paraninfo, Editorial S. A.; 2000. 416 p.
47. Gerdemann J, Trappe J. Endogonaceae in the Pacific Northwest. 1-76 p. (Mycologia Memoir; vol. 5).
48. Urcelay C, Tecco PA, Chiarini F. Micorrizas arbusculares del tipo Arum y Paris y endófitos radicales septados oscuros en Miconia ioneura y Tibouchina paratropica (Melastomataceae). Bol Soc Argent Bot. 2005;40(3-4):251–255.
49. Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd edition. San Diego: Academic Press; 1997. 605 p.
50. Bonfante P, Genre A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nat Commun. 27 juill 2010;1:48.
51. Sanon A. Le concept de niche écologique associé à la co-existence des espèces végétales : mise en évidence du rôle de la symbiose mycorrhizienne et de sa microflore associée dans la structuration de la strate herbacée en milieu tropical. Henri Poincaré, Nancy I; 2009.
52. Duponnois R, Hafidi M, Ndoye I, Ramanankierana H, Bâ AM. Des champignons symbiotiques contre la désertification: écosystèmes méditerranéens, tropicaux et insulaires [Internet]. IRD Editions; 2013 [cité 10 mars 2017]. 511 p. Disponible sur: [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/divers15-04/010061524.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers15-04/010061524.pdf)
53. Olsson PA, Thingstrup I, Jakobsen I, Baath E. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. Soil Biol Biochem. 1999;9.
54. Ruiz PO, Rojas KC, Sieverding E. La distribución geográfica de los hongos de micorriza arbuscular: una prioridad de investigación en la Amazonía peruana. Espac Desarro. 2011;(23):47–63.
55. Arévalo Hernández CO. Prospección de la densidad de esporas y colonización de micorrizas en cacao silvestre de Ucayali Madre de Dios [Internet]. 2016 [cité 6 févr 2017]. Disponible sur: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1968>
56. Varma A. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: The State of Art. Crit Rev Biotechnol. janv 1995;15(3-4):179-99.
57. Sylvia DM, Hammond LC, Bennett JM, Haas JH, Linda SB. Field Response of Maize to a VAM Fungus and Water Management. Agron J. 4/01 1993;85(2):193-8.
58. Read DJ, Perez-Moreno J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? New Phytol. 2002;157(3):475-92.



59. Vergara Altamirano KE. Respuesta del inóculo micorrizal del hongo *Scleroderma verrucosum* en la producción de plántulas de *Pinus radiata* D. Don en Jauja [Junín]. [Internet]. 2004 [cité 3 févr 2017]. Disponible sur: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1741>
60. Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal symbiosis. 2008;
61. Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Botany*. 1984;62(10):2128-34.
62. Abbott LK, Robson AD. Factors influencing the occurrence of vesicular - arbuscular mycorrhizas. 1991;35:121-50.
63. Urcelay C, Tecco PA, Chiarini F. Micorrizas arbusculares del tipo « Arum » y « Paris » y endófitos radicales septados oscuros en *Miconia ioneura* y *Tibouchina paratropica* (Melastomataceae). *Bol Soc Argent Bot*. 2005;151-5.
64. Mosse B. Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytol*. 1973;72:127-36.
65. T. R. Cavagnaro, L-L. Gao, F. A. Smith, S. E. Smith. Morphology of Arbuscular Mycorrhizas Is Influenced by Fungal Identity. *New Phytol*. 2001;151(2):469-75.
66. Wu B, Isobe K, Ishii R. Arbuscular mycorrhizal colonization of the dominant plant species in primary successional volcanic deserts on the Southeast slope of Mount Fuji. *Mycorrhiza*. déc 2004;14(6):391-5.
67. Kubota M, McGonigle TP, Hyakumachi M. Co-occurrence of Arum- and Paris-type morphologies of arbuscular mycorrhizae in cucumber and tomato. *Mycorrhiza*. mars 2005;15(2):73-7.
68. Garbaye J. La symbiose mycorrhizienne: Une association entre les plantes et les champignons. Versailles: Editions Quae; 2013. 284 p.
69. Stockinger H, Walker C, Schusler A. “*Glomus intraradices* DAOM197198”, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytol*. 2009;183:1176-87.
70. Balzergue C. Régulation de la symbiose endomycorhizienne par le phosphate [Internet]. Université Paul Sabatier-Toulouse III; 2012 [cité 12 nov 2016]. Disponible sur: <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00796089/>
71. Schübler A, Walker C. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester. Edinb Kew UK R Bot Gard Munich Ger Bot Staatssamml Munich Or USA Or State Univ. 2010;
72. Labidi S, Ben Jeddi F, Tisserant B, Debiante D, Rezgui S, Grandmougin-Ferjani A, et al. Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO<sub>3</sub> stress. *Mycorrhiza*. juill 2012;22(5):337-45.
73. Ceballos I, Ruiz M, Fernández C, Peña R, Rodríguez A, Sanders IR. The In Vitro Mass-Produced Model Mycorrhizal Fungus, *Rhizophagus irregularis*, Significantly Increases Yields of the Globally Important Food Security Crop Cassava. Rillig M, éditeur. *PLoS ONE*. 7 août 2013;8(8):e70633.

74. Malbreil M, Tisserant E, Martin F, Roux C. Genomics of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Adv Bot Res.* 1 janv 2014;70:259-90.
75. Schwer CS. Understanding the effect of *Rhizophagus irregularis* within a biofertilizer for maize [Internet]. 2014 [cité 8 juin 2017]. Disponible sur: <http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:46829/eth-46829-01.pdf>
76. Selmi H. Effet de l'ajout de biochar sur la symbiose tripartite Ensifer meliloti-Rhizophagus irregularis-luzerne (*Medicago sativa* L.), sur la production d'inocula bactériens et envers la lutte aux agents pathogènes [Internet]. Université Laval; 2016 [cité 8 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.theses.ulaval.ca/2016/32315/32315.pdf>
77. Ruiz PO, Davey CB. Efectos del manejo de suelos de laderas en hongos formadores de micorrizas arbusculares y en bacterias fijadoras de nitrógeno en ultisoles sujetos a erosión pluvial en la amazonia peruana. *Ecol Apl.* 2003;2(1):87-92.
78. Sanon AA. Rôle des champignons mycorrhiziens à arbuscules dans les mécanismes régissant la co-existence entre espèces végétales. 2005 [cité 10 mai 2017]; Disponible sur: [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/divers13-07/010040027.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers13-07/010040027.pdf)
79. Guissou T, Bâ A, Plenchette C, Guinko S, Duponnois R. Effets des mycorhizes à arbuscules sur la tolérance à un stress hydrique de quatre arbres fruitiers : *Balanites aegyptiaca* (L) Del., *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth., *Tamarindus indica* L et *Zizyphus mauritiana* Lam. - 010025748.pdf. 2001 [cité 21 nov 2016];12(2). Disponible sur: [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/pleins\\_textes\\_7/b\\_fdi\\_59-60/010025748.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_59-60/010025748.pdf)
80. Ruiz-Sánchez M, Aroca R, Muñoz Y, Polón R, Ruiz-Lozano JM. The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *J Plant Physiol.* juill 2010;167(11):862-9.
81. Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. Ploughing up the wood-wide web? *Nature.* 1998;394(6692):431-431.
82. Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001;36(2-3):203-209.
83. Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mader P, Boller T, Wiemken A. Impact of Land Use Intensity on the Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agroecosystems of Central Europe. *Appl Environ Microbiol.* 1 mai 2003;69(5):2816-24.
84. Oehl F, Sieverding E, Mader P, Dubois D, Ineichen K, Boller T, et al. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia.* 1 mars 2004;138(4):574-83.
85. Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ris E-A, Boller T, Wiemken A. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytol.* 9 déc 2004;165(1):273-83.
86. Chiffrot V. Étude moléculaire des champignons mycorrhiziens arbusculaires dans un système agrisylvicole [Internet]. 2008 [cité 9 juin 2017]. Disponible sur: <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/25687/25687.html>

87. Durrieu G. *Écologie des champignons* [Internet]. 1 eds. Paris: MASSON; 1993 [cité 2 mai 2017]. 207 p. Disponible sur: [http://www.unitheque.com/Livre/elsevier\\_-\\_masson/Collection\\_d\\_ecologie/ecologie\\_des\\_champignons-6543.html](http://www.unitheque.com/Livre/elsevier_-_masson/Collection_d_ecologie/ecologie_des_champignons-6543.html)
88. Baohanta R. Facilitation de la régénération d'*Uapaca bojeri* par la gestion des communautés de champignons mycorrhiziens associées aux espèces pionnières de la zone dégradée de la forêt sclérophylle d'Arivonimamo. 2011.
89. Reyes Jaramillo I. La micorriza arbusculaire (MA) centro de la rizósfera: comunidad microbiológica dinámica del suelo. *Rev Contactos*. 2011;81:17–23.
90. Rambelli A. “The rhizosphere of mycorrhizae,” in *Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology*. G C Marks T T Kozlowski. 1973;299-343.
91. Linderman RG. Mycorrhizal Interactions with the Rhizosphere Microflora: The Mycorrhizosphere Effect. *PHYTOPATHOLOGY*. 1988;78(3):366-71.
92. Johansson JF, Paul LR, Finlay RD. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol*. avr 2004;48(1):1-13.
93. Gobat J-M, Aragno M, Matthey W. *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*. PPUR Presses polytechniques; 2010. 846 p.
94. Zougari-Elwedi B, Sanaa M, Labidi S, Lounès-Haj A. Évaluation de l'impact de la mycorhization arbusculaire sur la nutrition minérale des plantules de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L. var. Deglet Nour). 2012;19:193-202.
95. Rillig MC, Steinberg PD. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biol Biochem*. 2002;1371-4.
96. Meddich A, Oihabi A, Abbas Y, Bizid E. Rôle des champignons mycorrhiziens à arbuscules de zones arides dans la résistance du trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) au déficit hydrique. *Agronomie*. 2000;20(3):283–295.
97. Harley JL, Smith SE. *Mycorrhizal symbiosis*. *Mycorrhizal Symbiosis* [Internet]. 1983 [cité 16 juill 2018]; Disponible sur: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19831392690>
98. Schenck NC. VA mycorrhizal fungi 1950 to the present: the era of enlightenment. Molina R Ed *Proc 6th North Am Conf Mycorrhizae*. :56-60.
99. Duponnois R, Hafidi M, Wahbi S, Sanon A, Galiana A, Baudoin E, et al. La symbiose mycorrhizienne et la fertilité des sols dans les zones arides : un outil biologique sous-exploité dans la gestion des terres de la zone sahélo-saharienne. In: Dia A, Duponnois R, éditeurs. *La Grande Muraille Verte : capitalisation des recherches et valorisation des savoirs locaux* [Internet]. Marseille: IRD; 2012 [cité 21 nov 2016]. p. 351-69. (Synthèses). Disponible sur: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010058319>
100. Bilgo A, Sanon A, Sangaré SK, Dabiré P, Hien V, Duponnois R. Fertilité des sols et gestion du potentiel infectieux mycorrhizien. In: Duponnois R, Hafidi M, Ndoeye I, Ramanankierana H, Bâ AM, éditeurs. *Des champignons symbiotiques contre la désertification : écosystèmes méditerranéens, tropicaux et insulaires* [Internet]. Marseille:

IRD; 2013 [cité 10 janv 2017]. p. 95-123. Disponible sur: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010061527>

101. Denison RF, Kiers ET. Life Histories of Symbiotic Rhizobia and Mycorrhizal Fungi. *Curr Biol.* sept 2011;21(18):R775-85.

102. Henry C. Stimuler les communautés mycorrhiziennes par des plantes nurses pour la restauration écologique: exemple d'une forêt tropicale malgache après exploitation minière [Internet]. 2015 [cité 6 févr 2017]. Disponible sur: <http://agritrop.cirad.fr/578123/>

103. Marx D. Ectomycorrhizae as Biological Deterrents to Pathogenic Root Infections. *Annu Rev Phytopathol.* 1972;10(1):429-54.

104. Jalali BL. Vesicular-arbuscular mycorrhiza : current status. *Vistas Plant Pathol* Varma Verma JP Eds Malhotra Publ House New Delhi India. 1986;437-49.

105. Isla P FM. CONTROL BIOLÓGICO DEL Meloidogyne incognita EN AGUAYMANTO (Physalis peruviana L.) POR BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO Y HONGOS ENDOMICORRÍCICOS. [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2016.

106. Montaña Arias NM, Camargo Ricalde SL, García Sánchez R, Monroy Ata A. Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems). Distrito Federal, México; 2007. 460 p.

107. Ruiz PO, Scholes MC. Effect of different management options on mycorrhizal infection. In: N.C. Caudle (Ed.). *TropSoils Annual Report 1986-1987*. North Carolina State University, Raleigh. 1989;116-8.

108. Moreno Díaz P. Inoculación de micorrizas mva en papa (solanum tuberosum) respuesta en el crecimiento y nutrición de plantas inoculadas en invernadero y en campo. *Rev Latinoam Papa.* 1988;1(1):84-103.

109. Hernández-Cuevas L, Guerra-De la Cruz V, Santiago-Martínez G, Cuatlal-Cuahutencos P. Propagación y micorrización de plantas nativas con potencial para restauración de suelos. *Rev Mex Cienc For.* oct 2011;2(7):87-96.

110. Usuga Osorio CE, Castañeda Sánchez DA, Franco Molano AE. MULTIPLICATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAE FUNGI (AMF) AND MYCORRHIZATION EFFECT IN MICROPROPAGATED PLANTS OF BANANA (Musa AAA cv. Gran Enano)(Musaceae). *Rev Fac Nac Agron Medellín.* 2008;61(1):4279-4290.

111. HARO H. Optimisation des symbioses rhizobienne et mycorrhizienne pour améliorer la productivité du niébé [Vigna unguiculata (L.) Walp.] au Burkina Faso. 2016.

112. Hopkins WG. *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur; 2003. 536 p.

113. Svistoonoff S, Svistoonoff S. Role of a subtilase during early steps of actinorhizal symbiosis, Role of a subtilase during early steps of actinorhizal symbiosis [Internet]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc; 2003 [cité 16 oct 2014]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00149614/>

114. Dommergues YR, Mangenot F. *Écologie microbienne du sol*. Masson et Cie.; 1970. 816 p.
115. Lafay B. Bradyrhizobia isolated from root nodules of *Parasponia* (Ulmaceae) do not constitute a separate coherent lineage. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1 mai 2006;56(5):1013-8.
116. Nehila A. *Symbioses telluriques : Rôle et mécanisme de Tolérance aux stress abiotiques*. [Algérie]: Université d'Oran; 2016.
117. Doyle JJ, Luckow MA. The Rest of the Iceberg. *Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context*. *PLANT Physiol*. 1 mars 2003;131(3):900-10.
118. Frank B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges*. 1889;7:332-4.
119. Boakye EY, Lawson IYD, Danso SKA, Offei SK. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis*. 1 juin 2016;69(2):89-99.
120. Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen W-M, Elliott GN, Bontemps C, et al. Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *Mol Plant Microbe Interact*. 10 août 2011;24(11):1276-88.
121. Bontemps C, Rogel MA, Wiechmann A, Mussabekova A, Moody S, Simon MF, et al. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol*. janv 2016;209(1):319-33.
122. Rogel MA, Ormeño - Orillo E, Romero EM. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. Appl. Microbiol*. 2011;34:96-104.
123. RIAH N. *Diversité et structure génétique des populations de Rhizobium leguminosarum symbiovar viciae isolées du pois (Pisum sativum) et de la lentille (Lens culinaris) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien*. 2014.
124. Jordan DC. Gram-negative aerobic rods and cocci. Family III Rhizobiaceae. En N. Krieg, y J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams Wilkin Co Baltim USA. 1984;1:234-42.
125. Zhang X, Kosier B, Priefer UB. Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Mol Ecol*. 2001;10:2297-305.
126. Tian CF, Wang ET, Wu LJ, Han TX, Chen WF, Gu CT, et al. *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1 déc 2008;58(12):2871-5.
127. Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, et al. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1 nov 2008;58(11):2484-90.

128. Laguerre G, Geniaux E, Mazurier SI, Casartelli RR, Amarger N. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can J Microbiol.* avr 1993;39(4):412-9.
129. Oldroyd GED, Downie JA. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juill 2004;5(7):566-76.
130. Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, et al. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(13):5230–5235.
131. Gage DJ. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing *Rhizobia* during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1 juin 2004;68(2):280-300.

Comunicaciones Personales:

Barriga C. 2017

Huamani J., 2018

# **CHAPITRE I: Impact de la symbiose mycorhizienne à arbuscules sur la croissance précoce de la tara (*Caesalpinia spinosa*), une légumineuse à haute valeur écologique et commerciale**

## **RÉSUMÉ**

La Tara (*Caesalpinia spinosa*) est cultivée depuis de nombreuses années dans les forêts naturelles, principalement pour la récolte de ses gousses et de ses graines, en raison de sa valeur élevée de ses nombreuses utilisations depuis l'Antiquité. Cependant, l'écologie et l'état de conservation de ses forêts sont mal connus. La symbiose mycorhizienne peut jouer un rôle central dans la croissance précoce de cette légumineuse et constitue un élément clé pour l'amélioration des pratiques de gestion. L'objectif de cette étude a été de décrire l'état mycorhizien de Tara dans des plantations situées au Pérou et d'évaluer l'impact mycorhizien sur la croissance précoce des plantules de Tara en serre. Les résultats ont montré que la Tara était principalement associée à des champignons mycorhiziens arbusculaires de la famille des *Gloméracées*, notamment *Rhizophagus* spp. La mycorhization contrôlée avec les spores de *R. irregularis* a considérablement amélioré la croissance de Tara en serre ainsi que l'absorption d'éléments nutritifs tels que le phosphore (P) et l'azote (N). Par conséquent, *C. spinosa* pourrait être considéré comme "fortement dépendant des mycorhizes". Ces résultats soulignent la nécessité de prendre en compte la symbiose mycorhizienne arbusculaire pour maintenir durablement la productivité et la stabilité des plantations de Tara.

Mots clés: *Caesalpinia spinosa*, Symbiose mycorhizienne à arbuscule, Diversité, Dépendance mycorhizienne.



## I.A INTRODUCTION

Les forêts sèches sont les écosystèmes tropicaux les plus affaiblis par les fortes pressions anthropiques. Il a été rapporté que 66% des écosystèmes de forêts tropicales sèches ont été affectés à d'autres usages du sol, en particulier au Pérou, où le pourcentage de perte a atteint 95% (1). Des facteurs anthropiques, tels que des pratiques culturales non durables ou la surexploitation d'espèces à haute valeur commerciale, ont conduit à des problèmes de régénération qui ont un impact négatif sur la durabilité de la forêt (2). Par exemple, (3) ont signalé qu'une forêt de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze (Tara) avait été soumise à de faibles niveaux de régénération à Atiquipa (Pérou). Plus récemment, il a été signalé que dans la plupart des plantations de Tara évaluées dans différentes localités du Pérou, un processus de régénération limité avait été détecté comme conséquence d'une collecte excessive de semences ou des pratiques de surpâturage (4). La Tara est cultivée depuis de nombreuses années dans le cadre de la gestion de forêts naturelles, principalement pour la collecte de gousses et de graines (5). Bien que cette espèce forestière soit très appréciée pour ses nombreuses utilisations depuis l'Antiquité, on en sait peu sur l'écologie et l'état de conservation des forêts de Tara, limitant ainsi le développement de pratiques de gestion durables (5). La structure de la population et les modèles spatiaux des couvertures forestières ont été largement pris en compte pour évaluer leur dynamique de régénération (6). En général, ces critères résultent de l'effet et de l'interaction entre les facteurs environnementaux, les caractéristiques des espèces d'arbres, les interactions



spécifiques entre plantes, les interactions entre plantes et animaux et l'impact anthropique dans le temps (7). De nombreuses études ont également indiqué que les interactions mycorhiziennes peuvent renforcer les fonctions des écosystèmes et le succès de l'établissement des plantules, l'un des processus les plus critiques qui déterminent la durabilité des écosystèmes (8-10). Bien que certaines études aient montré que la colonisation des racines par les champignons mycorhizés à arbuscules (AM) variait considérablement chez Caesalpinioideae (11), il n'existe aucune information sur l'état mycorhizien de *C. spinosa* et sa dépendance mycorhizienne. Les objectifs de ce chapitre étaient les suivants: (i) déterminer le statut mycorhizien de Tara dans des plantations situées au Pérou et (ii) évaluer les impacts mycorhiziens sur la croissance précoce des plantules de Tara en serre. L'hypothèse est que cette espèce forestière était associée dans le champ aux champignons fongiques et que la gestion de l'infectivité des sols par les mycorhizes pourrait augmenter durablement la productivité et la stabilité des plantations de Tara au Pérou.

## **I.B Matériels et méthodes**

### **I.B.1 Matériels**

#### **I.B.1.1 Le matériel végétal et son échantillonnage**

Nous avons prélevés des racines (10 cm de profondeur) et des graines de Tara *C. spinosa* (Molina) Kuntze, provenant de 2 plantations différentes (nommés H1 et H2) de Tara à Canchacaya, dans la région de Huanuco (S 10 ° 10,654 ' ; W 076 ° 10,129' ; 2459 m d'altitude). Ces sites de prélèvement ont été les mêmes que ceux d' Ogata et al (2008). Pour chaque zone, ont été choisis au hasard cinq arbres de 5 ans, et pour chaque arbre 3 échantillons de racines ont été prélevés.

Les échantillons de racines ont été placés dans des nouveaux sacs en plastique qui ont été correctement étiquetés et transportés dans un dispositif de refroidissement avec des blocs de glace de gel pour maintenir la température à 4 ° C environ, jusqu'à ce qu'elles soient traitées dans le laboratoire. 1kg de gousses de Tara et leurs graines ont été récoltées au pieds des arbres, en choisissant les plus mûres.

## **I.B.2 Méthodes**

### **I.B.2.1 Préparation en laboratoires**

La partie expérimentale de cette recherche a été menée dans le laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes (LSTM), sur le campus international de Baillarguet à Montferrier sur lez dans la ville de Montpellier en France. Dans le laboratoire, les échantillons de racines ont été lavés avec de l'eau du robinet et ensuite observé sous un stéréomicroscope (Olympus SZ H10 research stereomicroscope) avec grossissement x4 pour détecter la présence de nodules de Rhizobium et / ou mycorhizes, puis séché pour l'analyse moléculaire.

### **I.B.2.2 Évaluation de la structure de la communauté des champignons mycorhiziens arbusculaires.**

#### **I.B.2.2.1 Extraction d'ADN**

Des racines sèches ont été broyées dans de l'azote liquide pour homogénéisation et l'ADN a été extrait dans un sous-échantillon (40 mg) en utilisant un homogénéisateur FastPrep-24 (MP Biomedicals Europe, Illkirch, France) et le kit FastDNA®SPIN (MP Biomedicals Europe), selon les instructions du fabricant. La qualité des extraits d'ADN ont été améliorée par l'addition de 20 à 30 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) au cours de la première étape d'extraction de

l'ADN. Trois répétitions ont été effectuées par échantillon de racine. L'intégrité de l'ADN a été vérifiée sur le gel d'agarose 1,5% et la quantification de l'ADN a été réalisée en utilisant le kit de dosage Quant-iT™ dsDNA PicoGreen® (Invitrogen, St. Aubin, France).

#### **I.B.2.2.2 L'analyse moléculaire de la diversité des champignons mycorhiziens arbusculaires par séquençage (technologie *Illumina*)**

Les échantillons d'ADN extraits de la racine de Tara, ont été purifiés pour amplifier le gène 18S l'ARNr, en utilisant des amorces spécifiques NS31 et AML2 (12,13) afin d'évaluer la diversité de champignons MA (Glomeromycota). Les amplicons obtenus ont été séquencés par la chaîne de séquençage obtenue grâce à la technologie Miseq de *Illumina* (1x300 pb) (Genotoul, Toulouse, France). Les réactions de PCR pour l'amplification ont été réalisées en deux étapes: i) la première étape a été réalisée dans un volume final de 50 µL en utilisant les amorces modifiées NS31 (5'-cttcctacacgacgctctccgatctTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') et AML2 (5'-ggagttcagacgtgtgctctccgatctGAACCCAAACACTTTGGTTTCC-3') 0.6 µM de chacun, 2 uL d'ADN (2 répétitions d'ADN extrait par échantillon), 200 uM de chaque dNTP, 200 ng / mL de BSA, GoTaq® DNA Polymerase (2 unités) et 1X Green GoTaq®, Tampon de réaction (Promega, Charbonnières, France). Les conditions de la PCR étaient les suivantes: 94 ° C pendant 5 min; 30 cycles de 94 ° C pendant 30 s, 58 ° C pendant 1 min, 72 ° C pendant 80s; une étape d'élongation finale à 72 ° C pendant 5 min. Trois répliques de PCR pour chaque échantillon ont été rassemblées, qui ont été purifiées en utilisant GFX PCR ADN et

le kit de purification de bandes à partir du gel (GE Healthcare Life Sciences, Vlizy-Villacoublay, France) suivant le fabricant; pour la deuxième étape, les produits de PCR ont été envoyés au séquençage à la plate-forme Genotoul (Toulouse, France), grâce à la technologie *Illumina*.

### **I.B.2.2.3 Traitement des séquences générées par la technologie Illumina.**

Les séquences d'un brin (NS31) obtenues avec le séquençage par la technologie Illumina ont été analysées et leur qualité a été vérifiée à l'aide du logiciel Mothur conformément à la procédure opératoire standard proposée ([http://www.mothur.org/wiki/MiSeq\\_SOP](http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP)) (14), toutefois, la qualité des séquences situées aux extrémités des fragments d'ADN obtenus a été vérifiée à l'aide de la configuration Q30 (commande trim.seqs). Ensuite, toutes les séquences ont été appauvries en codes barres et en amorces et toutes les séquences <150 pb (bases ambiguës ou homopolymères supérieurs à 8 pb) ont été éliminées. Ensuite, une étape de pré-classification (15) a été réalisée pour éliminer les séquences erronées probablement formées par des erreurs de séquençage. Les chimères ont également été éliminées sur la base de l'algorithme d'Uchime (16). Enfin, les séquences ont été classifiées en les alignant sur une base de données basée sur Glomeromycota de (17) et sur la méthode de classification RDP-naïve mise en œuvre dans Mothur (commande classify.seq). Toutes les séquences non-Glomeromycota (limite de confiance <40% au niveau de la famille) ont été éliminées. Le regroupement des séquences en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) a été effectué à l'aide de dist.seqs et de commandes de regroupement à Mothur, les OTU solitaires étant éliminées. Le nombre de

séquences entre chaque échantillon a été normalisé avec la commande sub.sample (19 114 séquences par échantillon). L'étape de sous-échantillonnage a permis de réduire le nombre de fausses OTU, ce qui est crucial pour obtenir une comparaison fiable entre les échantillons (18). Enfin, les OTU définies avec une divergence de 3% (similitude de 97%) ont été sélectionnées pour une affiliation taxonomique à l'aide de la commande classify.otu.

### **I.B.2.3 Essais en serre**

#### **I.B.2.3.1 Désinfection et germination des graines de *C. spinosa***

Les graines de *C. spinosa*, provenant de la même plantation Tara, ont été stérilisées superficiellement avec de l'acide sulfurique concentré à 95% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (19) pendant 15 min. Ensuite, la solution d'acide a été retirée et les graines ont été rincées pendant 12 h quatre fois dans de l'eau distillée stérile. Ensuite, ils ont été transférés de manière aseptique dans des boîtes de Pétri remplies d'agar à 1% (p / v) et ont germé dans le noir à 25 ° C pendant une semaine. Les graines germées ont été utilisées lorsque les racines mesuraient 1 à 2 cm de longueur, et ont été cultivées dans des pots de 250 cm<sup>3</sup> remplis d'un mélange de sol et de sable (1/4; v / v).

#### **I.B.2.3.2 Inoculation du champignon**

L'inoculum fongique *R. irregularis* a été produit dans des conditions axéniques selon (20). Considérant que 1 kg de cet inoculum contient 10<sup>6</sup> spores, un simple calcul a été effectué pour obtenir la quantité nécessaire en fonction du traitement. Il a été inoculé dans les pots à raison de 0, 125, 250 et 500 spores par pot. Ensuite,

les pots ont été disposés dans un bloc complet randomisé avec 10 répétitions par traitement. Les plantes ont été maintenues à la lumière naturelle (durée de la journée environ: 10h, température moyenne de 22 ° C, température maximale (jour) de 25 ° C et minimale (nuit) de 15 ° C). Celles-ci ont été irriguées quotidiennement avec de l'eau osmotique sans engrais.

### **I.B.2.3.3 Traitement des plantes après récolte**

Les semis de Tara ont été récoltés après 4 mois de culture et leurs racines ont été lavées à l'eau du robinet. Cinq semis de *C. spinosa* ont été portés au four (une semaine à 65 ° C) pour déterminer le poids sec de la partie aérienne. La détermination de l'azote et du phosphore a été réalisée à partir de tissus végétaux comme décrit dans (21). La colonisation MA a été évaluée comme décrit dans (22) en utilisant la coloration au bleu trypan et la dépendance mycorhizienne de *C. spinosa* a été exprimée en pourcentage de la différence entre la biomasse totale d'une plante mycorhizée et la biomasse totale d'une plante non mycorhizée divisée par la biomasse totale de la plante mycorhizée (23). La longueur des racines des plantes restantes a été évaluée selon (9). Enfin, les racines ont été portées au four (pendant une semaine à 65 ° C) pour être séchées, puis pesées.

### **I.B.2.4 Analyses statistiques**

Toutes les données ont été traitées avec une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA). Les moyennes ont été comparées à l'aide du test de Newman-Keul ( $p < 0,05$ ).

## I.C. Résultats et discussion

Dans les deux plantations H1 et H2, les arbres échantillonnés ne présentent pas ectomycorhizes ou de nodules *Rhizobium* sur les racines de Tara recueillies, ce qui indique un état symbiotique spécifique MA de la Tara. La diversité de champignons MA enregistré dans les racines a montré une prédominance de Tara pour la famille Glomeraceae (98% des séquences), notamment associé à *Rhizophagus*, *Sclerocystis* et *Glomeraceae incertae de* (Fig. 10). Les Glomeraceae sont les plus largement distribués dans les écosystèmes (24), avec des espèces MA (par exemple *Funneliformis mosseae* et *R. irregularis*), montrant une répartition géographique potentiellement extrêmement importante résultant d'un manque de spécialisation des conditions environnementales (25). La communauté des champignons mycorhiziens associée *C.spinosa* dans cette étude est en accord avec ceux enregistrés dans l'arbre *Ceratonia siliqua L.*, appartenant aussi à la sous-famille Caesalpinaceae (26) des légumineuse sclerophytes. La prédominance de *Rhizophagus* spp. (70% des séquences) peut suggérer un rôle fonctionnel important en relation avec la culture de Tara. Par conséquent, une souche de *R. irregularis* a été utilisée dans des expériences de mycorhization contrôlée pour évaluer les effets sur la croissance des cultures et la nutrition. De nombreuses études ont montré l'effet bénéfique de *R. irregularis* sur la croissance d'autres espèces d'arbres dans des conditions contrôlées (27-29) et après la plantation dans le domaine (30,31). Dans la présente étude, l'inoculation avec ledit champignon mycorhizien a augmenté de manière significative la croissance des semis Tara par rapport aux plantes non inoculés. Le traitement correspondant à l'inoculation avec 250 spores par rapport a mis en évidence une augmentation par 1,8 du poids sec

de la partie racinaire par rapport au témoin. Pour la biomasse aérienne, la biomasse totale et la longueur racinaire, l'augmentation par rapport au témoin est respectivement de 2,6 ; 2,2 et 2.1 (tableau 3).

Toutes les plantes inoculées avaient aussi une teneur en nutriments (azote et phosphore) significativement plus élevées que le témoin non inoculé, sauf pour le traitement inoculé avec 125 spores, chez qui la teneur en phosphore (la partie racine) était semblable à celle du témoin. (Tableau 3).

La dépendance micorhyzienne s'est avérée élevée avec un niveau d'environ 50%, ce qui pourrait classer *C. spinosa* comme « micorritique obligatoire » (32) ou «fortement dépendants aux mycorhizes » (33).

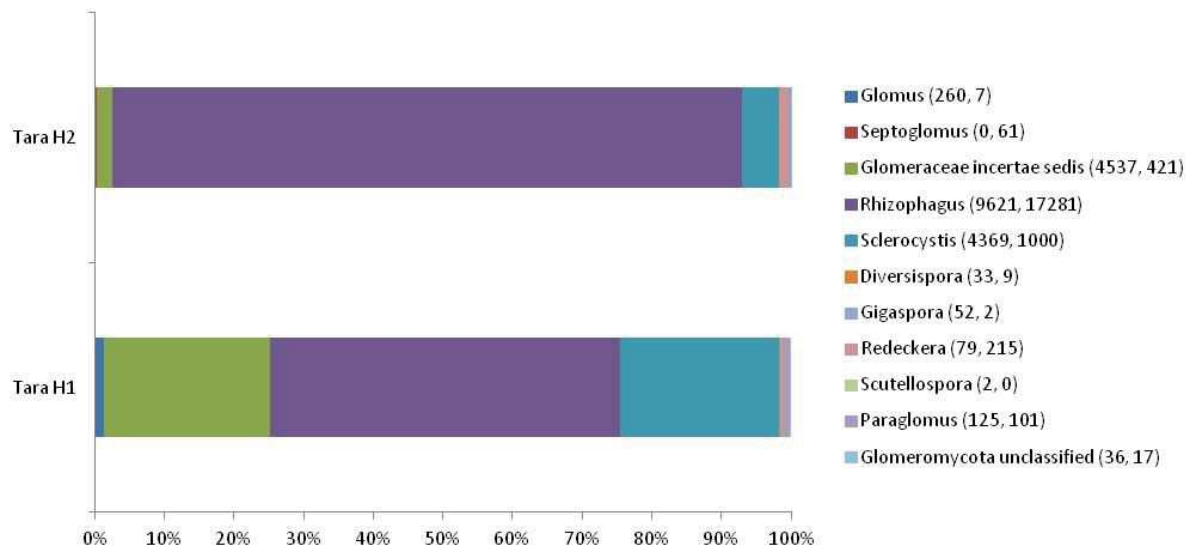
Dans l'ensemble, les résultats suggèrent que la gestion de l'infectiosité micorritique des sols à travers une micorrization contrôlée pourrait représenter une stratégie efficace pour améliorer la croissance des plantations de Tara. Par conséquent, ces résultats soulignent la nécessité d'envisager la symbiose AM pour maintenir durablement la productivité et la stabilité des plantations de *C. spinosa*.



**Tableau 4 Impact de l'inoculation des spores de *R. irregularis* sur la croissance et la teneur en éléments nutritifs des semis de *C. spinosa* après 4 mois de culture en serre**

	Nombre de spores AM inoculées par pot			
	Témoin (0)	125	250	500
<b>Biomasse aérienne (mg poids sec)</b>	161.3 (26.9) <sup>(1)</sup> a <sup>(2)</sup>	302.5 (79.2) b	417.9 (55.7) b	392.3 (26.9) b
<b>Biomasse racinaire (mg poids sec)</b>	184.1 (23.8) a	380.2 (95.6) b	336.8 (20.5) b	324.1 (90.1) b
<b>Biomasse totale (mg poids sec)</b>	345.4 (25.9) a	682.7 (174.4) a	754.7 (69.9) b	716.4 (24.8) b
<b>Longueur racinaire (cm)</b>	259.1 (11.5) a	438.6 (59.4) b	542.3 (93.9) bc	585.5 (24.5) c
<b>Dépendance mycorhizienne (%)</b>	-	47.4 (11.9) a	54.1 (4.1) a	51.2 (7.3) a
<b>Teneur en N dans la partie aérienne (mg g<sup>-1</sup> poids sec)</b>	2.12 (0.07) a	2.98 (0.12) b	3.04 (0.09) bc	3.12 (0.02) c
<b>Teneur en N dans la partie racinaire (mg g<sup>-1</sup> poids sec)</b>	0.78 (0.02) a	0.89 (0.03) b	0.91 (0.04) b	0.98 (0.08) b
<b>Teneur en P dans la partie aérienne (mg g<sup>-1</sup> poids sec)</b>	0.11 (0.02) a	0.23 (0.04) b	0.29 (0.02) bc	0.38 (0.02) c
<b>Teneur en P dans la partie racinaire (mg g<sup>-1</sup> poids sec)</b>	0.23 (0.02) a	0.25 (0.03) a	0.31 (0.02) b	0.32 (0.03) b

<sup>(1)</sup> Erreur standard. <sup>(2)</sup> Les données de la même ligne suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (P < 0,05)



**Figure 10** Structure taxonomique des communautés de champignons MA associées aux arbres de *C. spinosa* (Tara) (plantations H1 et H2). Les données ont été normalisées à 19 114 séquences par échantillon. Les données sont exprimées en abondance relative de chaque groupe taxonomique (% du nombre total de séquences) pour chaque arbre. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de séquences pour H1 et H2 respectivement.

## REFERENCES

1. Portillo-Quintero CA, Sánchez-Azofeifa GA. Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biological Conservation*. janv 2010;143(1):144-55.
2. Varghese A, Ticktin T, Mandle L, Nath S. Assessing the Effects of Multiple Stressors on the Recruitment of Fruit Harvested Trees in a Tropical Dry Forest, Western Ghats, India. *PLOS ONE*. 17 mars 2015;10(3):1-17.
3. Balaguer L, Arroyo-García R, Jiménez P, Jiménez MD, Villegas L, Cordero I, et al. Forest restoration in a fog oasis: evidence indicates need for cultural awareness in constructing the reference. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23004.
4. Cordero I, Jiménez MD, Delgado JA, Villegas L, Balaguer L. Spatial and demographic structure of Tara stands (*Caesalpinia spinosa*) in Peru: Influence of present and past forest management. *Forest Ecology and Management*. oct 2016;377:71-82.
5. Larrea M. La Tara, guarango o taya (*Caesalpinia Spinosa*) en la región andina. Criterios ambientales para su aprovechamiento y manejo sustentables en Bolivia, Ecuador y Perú. Secretaría General de la Comunidad Andina, Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION. 2010 [cité 6 août 2018]; Disponible sur: <http://www.asocam.org/node/51901>
6. Niklas KJ, Midgley JJ, Rand RH. Tree size frequency distributions, plant density, age and community disturbance. *Ecology Letters*. 14 avr 2003;6(5):405-11.
7. Wiegand T, Moloney KA. Rings, circles, and null-models for point pattern analysis in ecology. *Oikos*. 1 févr 2004;104(2):209-29.
8. Dickie IA, Koide RT, Steiner KC. Influences of Established Trees on Mycorrhizas, Nutrition, and Growth of *Quercus Rubra* Seedlings. *Ecological Monographs*. 1 nov 2002;72(4):505-21.
9. van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, et al. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. nov 1998;396(6706):69-72.
10. Ibáñez B, Gómez-Aparicio L, Ávila JM, Pérez-Ramos IM, García LV, Marañón T. Impact of tree decline on spatial patterns of seedling-mycorrhiza interactions: Implications for regeneration dynamics in Mediterranean forests. *Forest Ecology and Management*. 1 oct 2015;353:1-9.
11. Frioni L, Minasian H, Volfovicz R. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. *Forest Ecology and Management*. 8 mars 1999;115(1):41-7.
12. Simon L, Lalonde M, Bruns TD. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol*. janv 1992;58(1):291-5.

13. Lee J, Lee S, Young JPW. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol.* août 2008;65(2):339-49.
14. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* sept 2013;79(17):5112-20.
15. Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol.* juill 2010;12(7):1889-98.
16. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 15 août 2011;27(16):2194-200.
17. Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist.* 1 mars 2012;193(4):970-84.
18. Gihring TM, Green SJ, Schadt CW. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environ Microbiol.* févr 2012;14(2):285-90.
19. Sanon A. Le concept de niche écologique associé à la co-existence des espèces végétales : mise en évidence du rôle de la symbiose mycorrhizienne et de sa microflore associée dans la structuration de la strate herbacée en milieu tropical. *Henri Poincaré, Nancy I;* 2009.
20. Bécard G, Fortin JA. Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist.* 1 févr 1988;108(2):211-8.
21. Boudiaf I, Baudoin E, Sanguin H, Beddiar A, Thioulouse J, Galiana A, et al. The exotic legume tree species, *Acacia mearnsii*, alters microbial soil functionalities and the early development of a native tree species, *Quercus suber*, in North Africa. *Soil Biology and Biochemistry.* 1 oct 2013;65:172-9.
22. Ouahmane L, Hafidi M, Plenchette C, Kisa M, Boumezzough A, Thioulouse J, et al. *Lavandula* species as accompanying plants in *Cupressus* replanting strategies: Effect on plant growth, mycorrhizal soil infectivity and soil microbial catabolic diversity. *Applied Soil Ecology.* 1 déc 2006;34(2):190-9.
23. Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant Soil.* 1 juin 1983;70(2):199-209.
24. Opik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, et al. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol.* oct 2010;188(1):223-41.
25. Rosendahl S, McGee P, Morton JB. Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent

range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Mol Ecol.* oct 2009;18(20):4316-29.

26. Manaut N, Sanguin H, Ouahmane L, Bressan M, Thioulouse J, Baudoin E, et al. Potentialities of ecological engineering strategy based on native arbuscular mycorrhizal community for improving afforestation programs with carob trees in degraded environments. *Ecological Engineering.* juin 2015;79:113-9.

27. Duponnois R, Plenchette C. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza.* avr 2003;13(2):85-91.

28. Dabire AP, Hien V, Kisa M, Bilgo A, Sangare KS, Plenchette C, et al. Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. *Mycorrhiza.* sept 2007;17(6):537-45.

29. Kisa M, Sanon A, Thioulouse J, Assigbetse K, Sylla S, Spichiger R, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can 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 Microbiol Ecol.* oct 2007;62(1):32-44.

30. Duponnois R, Plenchette C, Prin Y, Ducouso M, Kisa M, Bâ AM, et al. Use of mycorrhizal inoculation to improve reafforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. *Ecological Engineering.* janv 2007;29(1):105-12.

31. Bilgo A, Sangare SK, Thioulouse J, Prin Y, Hien V, Galiana A, et al. Response of native soil microbial functions to the controlled mycorrhization of an exotic tree legume, *Acacia holosericea* in a Sahelian ecosystem. *Mycorrhiza.* 1 avr 2012;22(3):175-87.

32. Brundrett M. Mycorrhizas in Natural Ecosystems. In: *Advances in Ecological Research* [Internet]. Elsevier; 1991 [cité 16 juill 2018]. p. 171-313. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065250408600999>

33. Habte M, Manjunath A. Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. *Mycorrhiza.* 1 sept 1991;1(1):3-12.

## **Chapitre II: Le pois (*Pisum sativum*) révèle la spécificité de la diversité rhizobienne associée à la légumineuse non-nodulante de Tara (*Caesalpinia spinosa*) au Pérou.**

### **RÉSUMÉ**

La diversité des rhizobiums associés à la culture de Tara a été étudiée à partir de nodules de pois (*Pisum sativum*), une légumineuse qui pousse facilement dans les plantations ou les forêts naturelles de Tara. Le pois a été utilisé comme plante piège pour cette expérience car aucun nodule n'a été trouvé dans les racines de Tara qui ont été cultivées en serre ou *in vitro*, bien qu'ils proviennent du même site d'étude où Ogata et al (2008) avait décelé des nodules. On a obtenu 57 souches de nodules de pois, qui ont été caractérisées par l'analyse des régions de transcription partielle internes du ribosome (ITS) 16S-23S, séquencées et analysées phylogénétiquement. Sur ces 57 souches séquencées: 23 proviennent de nodules de pois cultivés dans des sols récoltés dans la lignée de plantation de Tara (sols du traitement L), 23 nodules de pois cultivés dans des sols entre 2 rangées d'arbres plantés (sols de traitement IL) et 11 nodules de pois cultivés dans des sols sur lesquels n'a jamais été cultivée auparavant la Tara (traitement OP). Tous les isolats ont été identifiés comme étant *Rhizobium* spp. L'arbre phylogénétique a été obtenu à partir des 57 séquences partielles d'ITS, montrant 4 groupes et 1 groupe unique isolé OP11. Les groupes 1 et 2 sont composés exclusivement de souches rhizobiennes récupérées et isolées provenant de la ligne plantée de Tara (L). Le groupe 3 comprend les souches de rhizobium récupérées et isolées de la la ligne plantée de Tara (L) et entre deux lignes (IL). Le groupe 4 comprend les souches

rhizobiales récupérées et isolées de l'interligne de la plantation de Tara (IL) et d'un champ situé à l'extérieur de la plantation où le Tara n'a jamais été cultivé (OP). Une grande diversité de rhizobia récupérés à partir de pois comme plante piège a été observée et la plus grande diversité de souches isolées a été obtenue à partir de sol sous l'influence directe de la Tara (L).

Mots-clés: *Pisum sativum*, Diversité rhizobienne, *Caesalpinia spinosa*

## II.A INTRODUCTION

La Tara est une espèce forestière considérée comme non ligneuse, originaire du Pérou, qui pousse dans des sols pauvres et sans beaucoup d'irrigation. Ainsi, depuis l'Antiquité, cette plante est utilisée pour la protection des sols. En plus de posséder d'autres caractéristiques intéressantes telles que son pouvoir tannique (dans ses gousses) et son épaississant naturel (dans ses graines) qui en font un grand intérêt économique.

La demande de la Tara est en augmentation, notamment la farine de Tara, car il s'agit d'un intrant d'origine organique rare sur les marchés internationaux. Étant donné que le Pérou est le plus grand producteur de Tara au monde, la majeure partie de la production provient de forêts naturelles, sans système de gestion adéquat (élagage, fertilisation, irrigation) mettant en péril sa production. La conséquence négative est un manque d'approvisionnement pour répondre aux besoins du marché. Pour ce faire, des projets de systèmes agroforestiers sont actuellement promus avec cette culture afin de répondre aux besoins requis.

Ces nouvelles plantations en systèmes agroforestiers, implantées dans les vallées inter-andines et sur le littoral, permettent le développement économique local et régional. Ainsi, il permet aux agriculteurs de cultiver leurs produits agricoles traditionnels (bananes biologiques, cacao (1), certaines graminées telles que le blé et l'orge (2), certaines cultures fourragères telles que la luzerne, le foin, la fétuque et l'avoine (2) et quelques arbres fruitiers avec la Tara, ceci est dû à la forme de la racine de la Tara qui ne concurrence pas les autres espèces de son environnement (3).

Plusieurs études (2,4-6) mentionnent que la Tara, en tant que légumineuse, devrait fixer l'azote atmosphérique dans le sol, compte tenu de sa capacité nodulaire, ce qui lui permet d'héberger des bactéries rhizobia dans ses racines, formant ainsi des nodules. Cependant, au sein de cette grande famille des légumineuses se trouvent les *Caesalpinioideae*, auxquelles appartient la Tara (7,8) selon lesquelles entre 10% et 20% seulement de la sous-famille des *Caesalpinioideae* présentent des nodules dans leurs racines. Il existe même une étude (9) qui laisse entendre que Tara est une espèce non-nodulante.

Cependant, (10) ont vérifié la présence de nodules dans les racines des plantes Tara d'une plantation du département de Huánuco. Par conséquent, l'intérêt de la présente étude est de corroborer ces informations afin de vérifier la présence de nodules dans Tara utilisant différents substrats dans différentes conditions de



culture (*in vitro* et en serre), en fournissant toujours les conditions nécessaires de leur lieu d'origine.

Après vérification de sa capacité de nodulation ou non, notre hypothèse part de l'idée générale qu'il existe une interaction avec les bactéries symbiotiques. Recherche pour évaluer l'effet de la présence de la culture de Tara sur la diversité des rhizobiums dans le sol d'une plantation de Tara.

En cas d'absence de nodules dans les plantes de Tara, il sera nécessaire de recourir à une plante piège associée à la culture de Tara, le pois. De cette manière, il sera possible d'isoler les bactéries symbiotiques présentes dans 2 zones différentes de la plantation à l'étude et également dans une zone extérieure à la plantation, où la Tara n'a jamais poussé auparavant. De plus, nous cherchons à estimer la diversité des bactéries symbiotiques au sein de ces 3 zones différentes et réalisons l'étude de phylogénie en séquençant l'ITS 16S - 23S. Enfin, nous chercherons à vérifier l'effet promoteur de ces souches bactériennes (bactéries rhizosphériques) sur la croissance du pois, en tant que plante associée à la culture de Tara dans un système agroforestier.

## **II.B Matériel et méthodes**

### ***II.B.1 Matériels***

#### **II.B.1.1 Matériel végétal**

Nous avons utilisés des graines de Tara *C. spinosa* (Molina) Kuntze issues des mêmes plantations que celles du chapitre 1 sur la mycorhization. Il est important

de préciser que ces sites d'études sont les mêmes que ceux de Ogata et al (2008) dans lesquels ont été décelés des nodules dans les racines de Tara.

Des semences d'Arveja *P. sativum* de la région de Cajamarca, Pérou ont été choisies car elles proviennent d'une zone où la Tara est abondante.

### **II.B.1.2 Sols**

- Les échantillons de sols ont été récoltés dans les 2 plantations de Tara déjà présentés.

## **II.B.2 Méthodes**

### **II.B.2.1 Lieu d'exécution**

La partie expérimentale de la présente étude a été réalisée dans le laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes (LSTM), sur le campus international de Baillarguet à Montferrier sur lez à Montpellier en France.

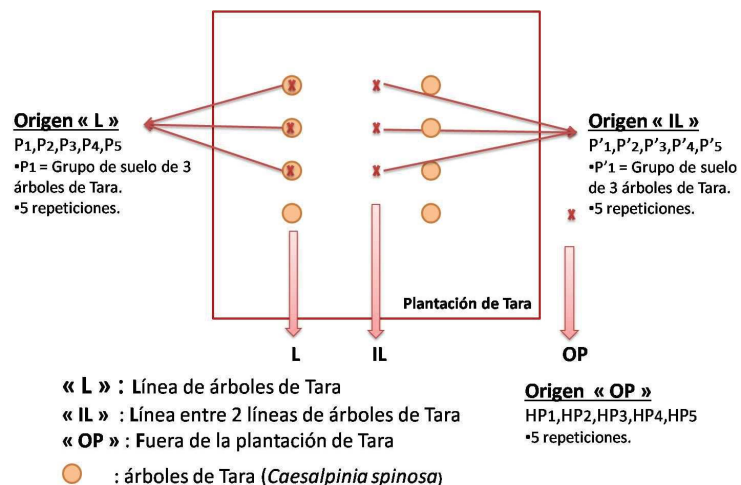
### **II.B.2.2 Échantillonnage**

La collecte des semences de Tara et des échantillons de sol ont été effectués dans 2 plantations de Tara à Canchacaya, dans la région de Huanuco (S 10 ° 10,654 ' ; W 076 ° 10,129' ; 2459 m d'altitude). Les sols ont été collectés (Fig.12 et 13) dans une ligne plantée de Tara, à une distance de 20 cm d'un arbre (traitement "L"), dans l'interligne (traitement "IL") et dans un champ situé à l'extérieur de la plantation de Tara et où la Tara n'a jamais été observée (traitement "OP"). Pour les traitements L et IL, 15 arbres ont été sélectionnés pour l'échantillonnage

des racines et du sol. Les sols collectés ont été regroupés par groupe de trois arbres pour obtenir 5 échantillons au total par condition. Dans le cas de l'origine OP, 5 échantillons de sol ont été collectés sans qu'il soit nécessaire de les regrouper. Les échantillons de sol ont été homogénéisés et tamisés à 2 mm pour obtenir un échantillon représentatif de chaque zone. Les trois sols représentatifs L, IL et OP ont été stockés dans des sacs en plastique, qui ont été maintenus à 4 ° C jusqu'à la réalisation des expériences.



**Figure 11** Collecte d'échantillons traitement L: sols récoltés dans la lignée des arbres de Tara, traitement IL: sols récoltés entre deux lignes de Tara et traitement OP: sols prélevés dans une zone de plantation où Tara n'avait jamais poussé auparavant.



**Figure 12** Schéma d'échantillonnage dans la zone d'étude

Les caractéristiques physico-chimiques des sols d'origine L étaient les suivantes: pH (H<sub>2</sub>O) 5,34, carbone (%) 0,64, azote (%) 0,05, C / N 13,9, P total (mg.kg<sup>-1</sup>) 894, P soluble (mg.kg<sup>-1</sup>) 82,3; ceux des sols d'origine IL étaient les suivantes: pH (H<sub>2</sub>O) 6,06, carbone (%) 0,86, azote (%) 0,07, C / N 13,4, P Total (mg.kg<sup>-1</sup>) 561, P Soluble (mg.kg<sup>-1</sup>) 8,2 et ceux des sols OP étaient les suivantes: pH (H<sub>2</sub>O) 6,11, carbone (%) 0,48, azote (%) 0,04, C / N 13,8, P total (mg.kg<sup>-1</sup>) 408, P soluble (mg) .kg<sup>-1</sup>) 3.

Dans les résultats d'analyse de sol de (10), provenant de la même plantation, une texture sablo-limoneuse a été déterminée.

### **II.B.2.3 Essais en serre**

#### **II.B.2.3.1 Désinfection et germination des graines de *C. spinosa***

Les graines de Tara ont été désinfectées comme suit: d'abord, elles ont été immergées dans de l'acide sulfurique concentré à 95% puis transférées dans un agitateur orbital pendant 45 à 60 minutes, puis rincées cinq fois avec de l'eau du robinet et cinq fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines ont été immergées dans une solution d'hypochlorite de calcium (CaCl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3% pendant 1 minute et finalement rincées avec une abondante eau distillée stérile. Celles-ci ont été déposées dans de l'eau distillée stérile dans un agitateur orbital pendant 1 heure. Des boîtes de Pétri contenant une solution moyenne de gélose aqueuse à 1% ont été utilisées pour la pré-germination des graines pendant 6 jours à 28 ° C dans le noir. Les graines considérées comme germées et prêtes à être transplantées dans les pots étaient celles qui atteignaient une longueur de 4 cm.

### **II.B.2.3.2 Désinfection et germination des semences de *P. sativum***

Les graines de pois ont été désinfectées comme suit: elles ont d'abord été traitées avec de l'éthanol à 96% pendant 3 minutes, puis rincées avec une grande quantité d'eau distillée stérile, puis désinfectées dans une solution d'hypochlorite de calcium ( $\text{CaCl}_2\text{O}_2$  à 3%) pendant 3 minutes, et enfin lavé avec de l'eau distillée stérile avant le semis. Les graines désinfectées ont été transférées dans des boîtes de Pétri avec une solution d'agar à 1% d'eau et incubées à 28 ° C dans l'obscurité pendant 3 jours pour la pré-germination et finalement transplantées dans des pots et des éprouvettes.

### **II.B.3 Tests de nodulation de *C. spinosa***

#### **II.B.3.1 Culture in vitro de Tara dans un milieu de Jensen inoculé avec une suspension de sol**

1 g de sol recueilli sur la ligne plantée de Tara ("L") a été mélangé à 20 ml d'eau distillée le laissant se mélanger pendant la nuit (12h) dans un agitateur orbital. Ensuite, la phase surnageante a été récupérée par centrifugation (pendant 3 min à 7 000 tr / min) et maintenue à 4 ° C. On a utilisé des tubes de Gibson (11) dans lesquels ont été placés 40 ml de milieu de culture Jensen (12) et 20 ml de solution saline tamponnée à pH 7 ( $\text{NaCl}$ , 0,15 mol.l<sup>-1</sup>;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,002 mol.l<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,004 mol.l<sup>-1</sup>). Tous les tubes à essai ont été scellés avec une feuille d'aluminium et autoclavés (120 ° C, 20 min). Ensuite, les plants de Tara (10 répétitions) ont été transférés dans des éprouvettes préparées précédemment et ensemencés avec 2 ml de surnageant de la suspension de sol. Ensuite, ils ont été placés dans une chambre de croissance des plantes dans les conditions suivantes: 22 ° C / 18 ° C pendant le jour / la nuit, avec une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité et une

humidité relative de 60-70%. Les plantes de Tara ont été irriguées une fois par semaine avec de l'eau distillée stérile et ont été récoltées 8 mois après l'inoculation.

### **II.B.3.2 Culture in vitro de Tara (*C. spinosa*) dans un mélange de sable et de sol de plantation de Tara ("L")**

Les éprouvettes ont été remplies de sable stérile (avec un rapport de texture fine et grossière de 1: 2) préalablement autoclavé (120 ° C, 20 min) et les 3 derniers cm (14 g) remplis de terre collectée à partir de la ligne planté de Tara ("L") et scellé avec une feuille d'aluminium. Les plants de Tara (10 répétitions) ont été transférés dans des éprouvettes. Ensuite, ils ont été maintenus dans une chambre de croissance à 22 ° C / 18 ° C pendant le jour / la nuit, avec une photopériode de 16: 8 L: D et une humidité relative de 60-70%. Les plantes de Tara ont été irriguées une fois par semaine avec de l'eau distillée stérile sans et ont été récoltées cinq mois après l'inoculation.

### **II.B.3.3 Culture in vitro de Tara (*C. spinosa*) dans un mélange d'attapulгите et de sol de plantation de Tara ("L")**

Les éprouvettes ont été remplies d'attapulгите calcinée (Oil Dri US Special, Damolin, Danemark; <http://www.damolin.dk>) préalablement stérilisée à l'autoclave (120 ° C, 20 min) et les 3 derniers cm (14 g) ont été remplis avec Sol recueilli dans la plantation de Tara ("L") et scellé avec du papier aluminium. Les plants de Tara (10 répétitions) ont été transférés dans des tubes à essai. Ensuite, ils

ont été maintenus dans une chambre de croissance à 22 ° C / 18 ° C pendant le jour / la nuit, avec une photopériode de 16h de lumière / 8h d'obscurité et une humidité relative de 60-70%. Les plantes de Tara ont été irriguées avec de l'eau distillée stérile et ont été récoltées cinq mois après l'inoculation.

#### **II.B.3.4. Nodulation de Tara (*C. spinosa*) en serre**

La nodulation de Tara a été testée avec les trois types de sol collectés, L, IL et OP. Les pots (5 répétitions pour chaque traitement) ont été remplis avec 300 ml de sol (dilution au 1/5, avec du sable stérile préalablement autoclavé (20 min, 120 ° C), où une graine de Tara pré-germée a été placée par pot et amenés dans une chambre de croissance à 22 ° C / 15 ° C pendant le jour / la nuit, avec une photopériode de 14h de lumière et 10h d'obscurité. Les plantes de Tara ont été arrosées trois fois par semaine avec de l'eau osmotique, sans additif nutritionnel. Six mois après l'inoculation, les plantes ont été récoltées.

#### **II.B.4 Mesure de la teneur en chlorophylle foliaire, activité de la nitrogénase, longueur des racines et biomasse sèche de Tara**

Après 6 mois de croissance sous les trois traitements L, IL et OP, en serre, comme décrit au point précédent, trois à cinq plants de Tara ont été récoltés par traitement (en fonction du taux de survie). L'efficacité de la fixation de diazote a été estimée en mesurant le contenu foliaire en chlorophylle à l'aide d'un appareil de mesure de la chlorophylle SPAD 52 (développement d'analyses sol-plante Minolta). Ensuite, la totalité de la plante a été transférée dans une bouteille en verre de 150 ml

contenant 1 ml d'eau et scellée à l'aide d'un bouchon à vis contenant un couvercle en caoutchouc afin de déterminer l'activité de l'enzyme nitrogénase par le test de réduction à l'acétylène (ARA). L'air dans la bouteille a été remplacé par 10% de méthane CH<sub>4</sub> ou d'acétylène): 15 ml de gaz acétylène (pureté 99,9%) ont été injectés à une pression de 1 atm dans la bouteille contenant la plante entière. Après une nuit d'incubation à 20 ° C, 1 mL de gaz contenu dans les bouteilles a été échantillonné et la concentration en éthylène a été évaluée par chromatographie en phase gazeuse décrite par (13).

Ensuite, les plantes ont été séparées en parties aérienne et racinaire, les racines ont été lavées, elles ont été numérisées à 300 dpi (Epson perfection 2450 photo, Seiko Epson) et, grâce au logiciel d'analyse d'images Optimas 6.1 (Media Cybernetics), la longueur des racines a été numérisée.

Enfin, les parties aérienne et racinaire de la plante ont été séchées pendant 7 jours à 50 ° C pour mesurer la biomasse sèche. Ce qui a également permis d'estimer plus tard l'efficacité de la fixation N<sub>2</sub>.

#### **II.B.5 Récupération des rhizobiums des sols L, IL et OP, preuves d'infectiosité et d'efficacité sur la croissance des pois (*P. sativum*)**

Les rhizobiums ont été récupérés en utilisant le pois (*P. sativum*) comme plante piège. Les semis de pois ont été cultivés en serre dans les conditions suivantes: 22 ° C / 15 ° C le jour / la nuit, avec une photopériode de 14h lumière : 10h obscurité dans des pots de 250 g remplis d'un mélange de sol et de sable (1 / 4; v / v). Cinq répétitions ont été effectuées pour chaque type de sol L, IL et OP. Après un mois,



les plantes de pois indigènes cultivées sur chacun des sols ont été récoltées, les nodules formés ont été récupérés et isolés. Les nombres totaux de nodules ont été comptés pour chaque traitement afin d'évaluer leur capacité d'infectivité chez les pois de serre. Ces nodules ont reçu le traitement suivant: stérilisation superficielle à l'éthanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) à 70% pendant 1 min, immersion dans du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 30% pendant 3 minutes et 30 secondes, rinçage à l'eau stérile pour finalement être broyé. Les suspensions bactériennes obtenues ont étéensemencées au moyen de la méthode d'ensemencement en stries sur des boîtes de Pétri enrichies en milieu de culture YMA, les plaques ont été incubées à 28 ° C. Après 1 à 3 jours d'incubation, des colonies isolées ont été observées. Les semis de pois ont été inoculés avec une semaine de croissance in vitro pour évaluer l'efficacité de chacune des souches isolées. L'impact des souches sur la croissance des plantes a été évalué en analysant la surface totale des feuilles et la longueur totale des racines des pois, à l'aide du logiciel d'analyse d'images Optimas 6.1 (Media Cybernetics). À ce stade in vitro, le nombre de nodules par traitement n'a pas été évalué.

Enfin, le poids sec de la partie aérienne et racinaire de *P. sativum* a été obtenu après 7 jours de séchage à 50 ° C.

#### **II.B.6 Caractérisation moléculaire de souches isolées de *P. sativum***

La caractérisation moléculaire de toutes les souches présentant une capacité infectieuse a été réalisée. Les rhizobies de pois ont été caractérisés par l'analyse des ARN partiels ribosomiques 16S-23S transcrits internes (ITS). Une fraction aliquote de 1 µL du bouillon bactérien dans 20 µL d'eau stérile a été suspendue en

éliminant les débris cellulaires par centrifugation à 13 000 tr / min pendant 1 min à température ambiante, 2 µL du surnageant ont été utilisés comme base pour l'amplification PCR. Les régions ITS des gènes de l'ADN ribosomal 16S et 23S (ADNr) ont été amplifiées en utilisant les amorces spécifiques de BR5, CTTGTAGCTCAGTTGGTTAG (14) et FGPL132 'CCGGGTTTCCCCATTCGG (15). Chaque réaction PCR a été réalisée dans un volume total de 25 µL contenant: 2 µL de suspension de cellules bactériennes, tampon de réaction 1X (pour une concentration finale en MgCl<sub>2</sub> de 1,5 mM), 200 µM de chaque dNTP, 0,8 µM de chaque amorce et 0,62U d'ADN polymérase GoTaq® (Promega Corporation, Madison, Wi). Les produits de PCR ont été séquencés directement en utilisant la même amorce, BR5. Le séquençage a été effectué par Genoscreen (Lille, France). Toutes les séquences ont été corrigées à l'aide du logiciel Chroma-Lite et l'alignement de ces séquences a été effectué à l'aide du programme BLAST du NCBI (Centre national de biotechnologie).

Pour la caractérisation bactérienne, des alignements multiples et la construction d'arbres phylogénétiques ont été réalisés à l'aide du programme multiplate-forme SeaView version 4 (16). Cette interface pilote le programme Clustal Omega pour plusieurs alignements de séquences et inclut la méthode de reconstruction d'arbre BioNJ basée sur la distance et le programme de phylogénie basé sur le maximum de vraisemblance, PhyML.

#### **II.B.7 Efficacité des rhizobiums isolés sur pois (*P. sativum*), mesure de l'activité de la nitrogénase et de la teneur foliaire en chlorophylle.**

Certaines des souches rhizobiennes ont été sélectionnées après caractérisation moléculaire pour tester leur efficacité in vitro. 40 ml de milieu de culture Jensen stérile ont été placés dans les éprouvettes en tant que substrat d'enracinement avec

une solution nutritive sans azote. Les plants de pois ont été transférés dans des éprouvettes.

1 mL d'inoculum ( $10^9$  cellules / mL de milieu liquide de levure au mannitol (YM) de chaque souche rhizobienne infectieuse sélectionnée a été injecté dans le tube à essai au début de l'apparition des premières feuilles des plants de pois. préalablement cultivé dans des tubes Falcon à 28 ° C pendant 48 heures dans un agitateur orbital (200 tr / min).

Les tubes témoins ont également reçu 40 ml de substrat de culture stérile Jensen et 1 ml de milieu de levure au mannitol liquide (YM). Chaque traitement a eu 4 répétitions. Les plants de pois inoculés et témoins (*P. sativum*) ont été introduits dans une chambre de croissance à 22 ° C / 18 ° C pendant la journée / la nuit, avec une photopériode 16h lumière: 8h obscurité et une humidité relative de 60 -70%. Toutes les plantes ont été récoltées 30 jours après l'inoculation. L'efficacité a été estimée en mesurant la biomasse produite. Le test ARA (test de réduction à l'acétylène) et la mesure de la teneur en chlorophylle foliaire ont été mesurés dans toutes les souches évaluées. La plante entière a été utilisée pour mesurer l'activité de l'enzyme nitrogénase au moyen du test ARA (test de réduction de l'acétylène) et la partie aérienne de la plante a été utilisée pour mesurer le contenu en chlorophylle à l'aide du SPAD52 (Minolta Analyses sol-plante), les deux méthodologies ont été décrites précédemment.

## **II.C Résultats**

### **II.C.1 Etat de la nodulation et de la fixation de la Tara par l'azote**

Aucun nodule n'a été trouvé dans les racines de Tara parmi les 45 plantes évaluées; c'est-à-dire, ni dans les 30 plantes qui ont poussé sous serre ni dans les 15 plantes issues d'une croissance in vitro. Cependant, l'observation microscopique a montré la présence de "pseudonodules" dans quelques racines (données non présentées). Le test ARA a montré une absence d'activité de la nitrogénase chez les 9 plantes ayant survécu au test (environ 0,10  $\mu\text{mol}$  de plante  $\text{C}_2\text{H}_4^{-1}\text{min}^{-1}$ ) (tableau 4).

### **II.C.2 Récupération de souches de pois rhizobiens et effet de l'origine du sol sur la croissance de *P. sativum***

Les résultats de la capture de pois sont présentés dans le tableau 4. Au total, 10 nodules ont été récupérés à partir des racines de pois issus du traitement OP, tandis que pour les 2 autres traitements (L et IL), il a été possible de récupérer plus de 40 nodules. Après 1 mois de culture de pois en serre (tableau 4), les biomasses sèches racinaires et sèches totales du traitement L étaient respectivement 32% et 44% supérieures aux résultats du traitement au PO. Les traitements IL et OP n'ont pas présentées de différences significatives pour les résultats de la biomasse racinaire sèche et de la biomasse sèche totale. La

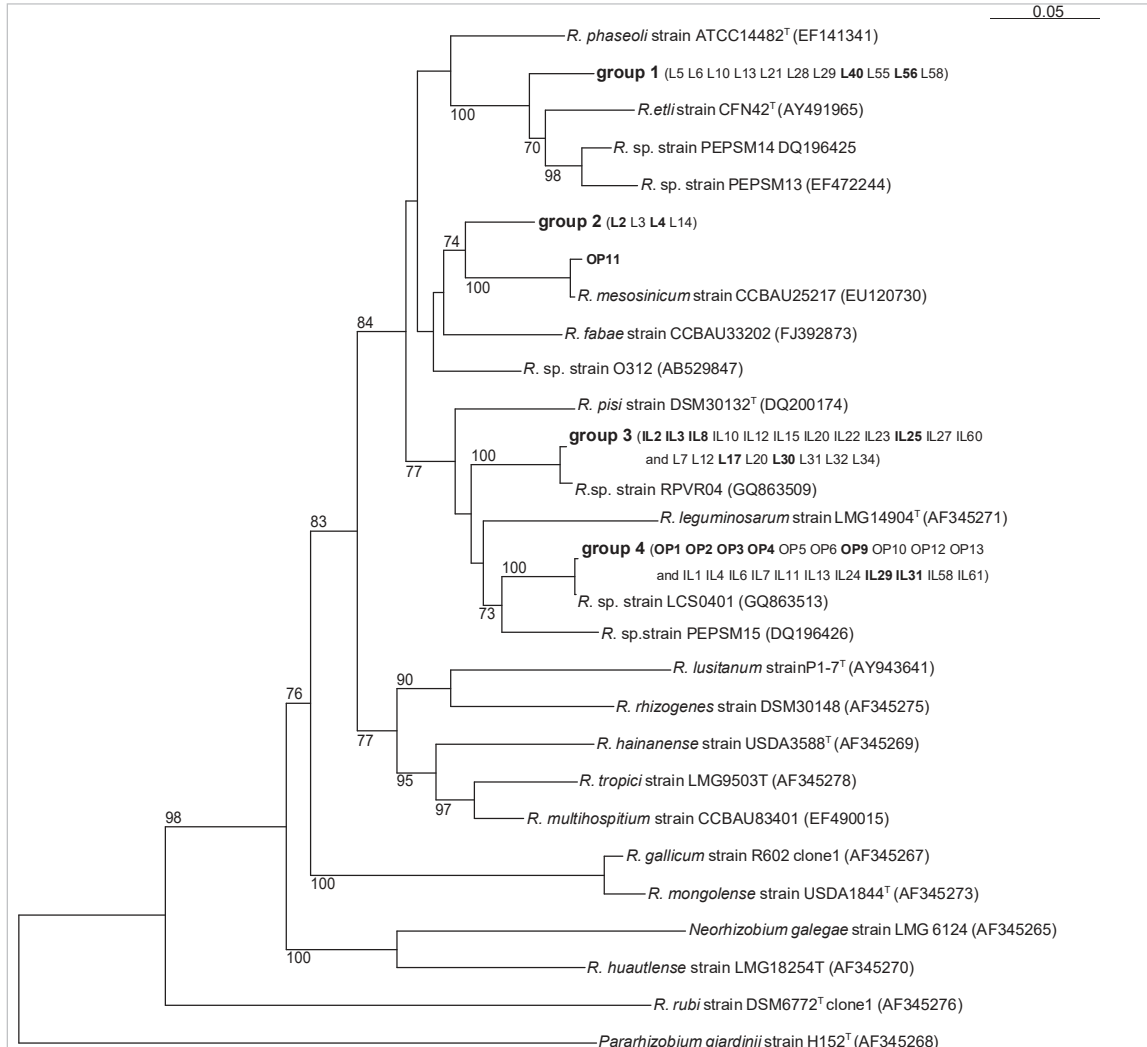
longueur racinaire n'a pas montré de différences entre les traitements. La surface foliaire totale était 2,3 fois plus élevée pour les traitements L et IL que pour OP.

### **II.C.3 Caractérisation moléculaire des rhizobiums isolés de *P. sativum***

L'amplification et le séquençage de l'ARNr 16S-23S (ITS) de la région intercalaire intergénique ont permis d'obtenir 57 souches différentes. Sur ces 57 souches séquencées, 23 proviennent de la récupération du pois cultivé sur les sols du traitement L, 23 proviennent du pois cultivé dans les sols du traitement de la IL et 11 de la récupération de pois ayant poussé dans les sols après le traitement par OP.

La caractérisation moléculaire de toutes les souches infectieuses a été réalisée. Des séquences de gènes partiels de ITS 16S-23S ont été obtenues pour 57 isolats. Sur la base des séquences partielles comparées aux autres séquences et références disponibles dans GenBank, tous les isolats ont été identifiés comme étant *Rhizobium* spp. La figure 13 montre l'arbre phylogénétique obtenu à partir de cinquante-sept séquences partielles d'ITS. Cet arbre phylogénétique a montré 4 groupes et un seul isolé, l'OP11. Les 11 souches appartenant au groupe 1 sont étroitement apparentées à la souche type *R. etli* CFN42. La souche OP11 et, dans une moindre mesure, les quatre souches appartenant au groupe 2 ont montré une relation très étroite avec *R. mésocinicum*. Les 20 souches du groupe 3 et les 21 souches du groupe 4 ne présentaient pas de relations étroites. Cependant, elles sont situées dans le même groupe que celui contenant les souches de type *R. pisi* et *R. leguminosarum*. Les cinquante-sept séquences ITS des souches de

*Rhizobium spp.*, Isolées de *P. sativum*, ont été déposées dans la base de données GenBank avec les numéros d'accès de KY073436 à KY073492.



**Figure 13** Arbre génétique obtenu à partir de cinquante-sept séquences partielles ITS. Arbre phylogénétique BioNJ basé sur les séquences intergéniques d'ARNr 16S-23S de 57 pois (*Pisum sativum*) *Rhizobium* spp. isolats, souches de référence et souches apparentées. Seules les valeurs de probabilité bootstrap supérieures à 70% (100 réplifications) sont données aux points de branchement. Les lacunes n'ont pas été prises en compte. L'échelle indiquait une divergence de séquence de 5%. *Pararhizobium giardinii* a été choisi comme groupe externe. Dans chaque groupe (1 à 4), *Rhizobium* spp. les séquences sont identiques. Le pois (*Pisum sativum*) a été nodulé sur les sols collectés - à partir de la ligne de plantation de tara (L) - à partir de l'interligne de plantation de tara (IL) - et à l'extérieur de la plantation de tara (OP). En gras, les dix-huit isolats choisis pour étudier leur efficacité sur la croissance des pois.

#### **II.C.4 Isolement des souches et contrôle de l'infectivité des isolats de pois (*P. sativum*)**

Nous avons isolé 57 souches bactériennes, 23 souches du traitement L, 23 souches du traitement IL et 11 souches du traitement OP. Dans le traitement OP, un nodule contenait deux souches, de sorte que 11 isolats de 10 nodules ont été obtenus. Les cinquante-sept souches isolées ont été utilisées pour le test d'infectivité. Les cinquante-sept isolats ont tous été capables de reformer des nodules dans des plants de pois. Les résultats du test d'infectivité sont présentés dans le tableau 5.

#### **II.C.5 Contrôle de l'efficacité des isolats de pois (*P. sativum*) chez les pois**

Après l'analyse phylogénétique, 18 des souches infectieuses ont été sélectionnées, 6 de chaque traitement (L, IL et OP) pour tester leur efficacité in vitro. Lors de l'analyse des effets des souches inoculées de la rhizosphère de Tara, les groupes 3 et 4 ont montré des valeurs significativement plus élevées sur la biomasse aérienne et totale de la plante, par rapport aux autres souches. Le groupe 3 a montré les valeurs d'une meilleure activité nitrogénase et d'une meilleure teneur en chlorophylle. Les groupes 1, 2 et OP11 ne présentaient pas de différences significatives en ce qui concerne les semis témoins de pois.

### **II.D Discussions**

#### **II.D.1 Etat de la nodulation et de la fixation de Tara à l'azote**

Contrairement à l'étude de référence (17), nous n'avons trouvé aucun nodule dans les racines de Tara, même si un nombre suffisant d'arbres (n = 30) ont été

échantillonnés dans la même zone d'étude. Cependant, (17) n'ont pas trouvé de nodules de Tara cultivés in vitro après l'inoculation de souches bactériennes isolées à partir des nodules de Tara trouvés. Dans cette étude, les Tara cultivées in vitro avec le sol de la plantation de Tara ne montrent pas non plus la présence de nodules. Ces résultats convergent vers l'absence de nodulation de *Caesalpinia spinosa*. Il est donc possible que les nœuds identifiés par (17) ne soient pas des nodules de Tara, mais des pseudonodules, tels que ceux trouvés dans la présente étude. Actuellement, il est difficile d'isoler et d'identifier les nodules en général et particulièrement à Tara en raison du niveau élevé de tanins et de la forte pigmentation de leurs racines. Pour résoudre ce problème, nous avons également effectué un test quantitatif supplémentaire de fixation de l'azote en utilisant le test de réduction à l'acétylène, qui était également négatif. *Caesalpinia spinosa* pourrait ainsi être inclus dans les espèces de légumineuses non nodulantes. En fait, bien que plus de 90% des Papilionoideae et des Mimosoideae soient probablement capables de symbiose avec des rhizobiums, seulement 23% des espèces de la sous-famille Caesalpinioideae le sont (8,18). La teneur élevée en gallotannins dans les racines de Tara (19), connues comme des molécules antimicrobiennes efficaces, pourrait peut-être empêcher l'infection des racines par des bactéries rhizobiennes. Il a été démontré que la Tara ne nodule pas, cependant elle peut développer dans le sol une diversité microbienne particulière que nous essayons de révéler grâce à une plante piège, *P. sativum*.

#### **II.D.2 Caractérisation moléculaire des isolats rhizobiens de *P. sativum***

Sur la base du séquençage partiel de la région ARNr ITS 16S-23S, il a été observé



que les 57 souches bactériennes nodulaires récupérées et isolées des sols appartenant à l'intérieur des plantations de Tara (L et IL) et à l'extérieur de la plantation (OP) de Tara, appartiennent exclusivement au genre *Rhizobium* spp. Les groupes 1 et 2 sont composés exclusivement de souches rhizobiennes récupérées et isolées de la lignée de plantation Tara (L). Le groupe 3 comprend les souches de rhizobium récupérées et isolées de la ligne plantée de Tara (L) et entre deux lignées (IL). Le groupe 4 comprend les souches rhizobiennes récupérées, isolées de l'interligne (IL) et d'un champ situé en dehors de la plantation où la Tara n'a jamais grandi (OP). Une grande diversité de rhizobia récupérés à partir de pois a été observée comme plante piège et la plus grande diversité de souches isolées a été obtenue à partir de sols (L).

Les souches récupérées et isolées avec des pois appartenant au groupe 1 sont situées à proximité de *R. etli* bv phaseoli CFN 42T (20) originaire du Mexique. La souche *R. etli* est la souche prédominante chez *P. vulgaris* nodulantes en Amérique (21). Au Pérou, *R. etli* a déjà été isolé de *P. sativum* (22). Dans notre cas, les souches appartenant au groupe 1 se retrouvent également à proximité des souches de *R. sp* PEPSM14 et PEPSM13 isolées au Pérou, près de Lima, par (23), qui ont observé que ces 2 souches isolées de *P. sativum* avaient une relation très étroite avec *R. etli* CFN42T, comme dans le cas de notre étude. D'après (24), *R. etli* aurait pu être amené d'Amérique en Espagne dans des semences de haricot ordinaires, sur la base de l'analyse du gène *nodC*.

Les souches isolées de pois appartenant au groupe 2 et principalement la souche unique OP11 sont étroitement apparentées à *R. mésocinicum* isolée de *Kummerowia stipulacea* (tribu des Desmodieae), en Chine (25). Les séquences

ITS de la souche représentative de *R. mesocinicum* CCBAU 25010T partagent une similarité de séquence de 91,5% respectivement avec *Rhizobium etli* CFN 42T. Les espèces de *Kummerowia* sont des légumineuses à valeur médicinale originaires d'Asie de l'Est, hôtes non sélectifs des rhizobies et pouvant noduler avec diverses bactéries dans différentes régions (26,27). La séquence ITS de la souche CCBAU 25010T était similaire à la souche CCBAU 25217 (similarité à 98%). Les souches récupérées avec des pois appartenant aux groupes 3 et 4 sont regroupées autour de la souche type *R. leguminosarum* LMG14904T, identique à celle de *R. leguminosarum* de vicia USDA2370T, isolée de *P. sativum* (28). *R. pisi* DSM30132T situé dans le même groupe, a également été isolé de *P. sativum* et a été baptisé *R. leguminosarum* avant reclassement: *R. pisi* (28). La souche la plus proche du groupe 3 est *R.sp.* RPVR04, isolé de *Phaseolus vulgaris* en Espagne (24) appartenant au groupe des *R. leguminosarum*, présentant une divergence. Les souches appartenant au groupe 4 se trouvent près de la souche PEPSM15 de *R.sp* isolée de *P. sativum* var. macrocarpum au Pérou, près de Lima, par (22) et sont les plus proches de la souche LCS0401 de *R. sp*, isolée des nodules de *Phaseolus vulgaris* en Espagne (24).

### **II.D.3 Discussion sur l'efficacité de la symbiose rhizobienne pour les pois**

La symbiose entre les souches de rhizobia et le pois semble être bénéfique pour la physiologie et la croissance du pois par rapport aux plantules témoins. Cependant, toutes les souches n'ont pas fonctionné de la même manière et les groupes 3 et 4 ont montré un meilleur résultat agronomique in vitro. Ces deux groupes sont rassemblés autour de *R. leguminosarum* LMG 14904T et plusieurs études ont

montré (29), (30), (31) la spécificité de *Rhizobium leguminosarum* de former des nodules fixant l'azote chez les plantes de *P. sativum*. La présence de *Rhizobium leguminosarum* pourrait expliquer les bons résultats des groupes 3 et 4. Ces résultats sont positifs compte tenu du fait qu'ils ont été obtenus à partir de sols de plantations de Tara à des fins commerciales, où le pois n'avait pas encore été cultivé. Une vision plus intégrée de cette étude pourrait examiner en profondeur le potentiel de l'association d'agroforesterie entre Tara et le pois. Traditionnellement, ces cultures sont mélangées dans certaines régions andines (2). Le rendement d'une telle culture pourrait être dû aux avantages apportés par les souches bactériennes présentes dans le pois et à leur capacité à s'associer spécifiquement à la rhizosphère de Tara. Inversement, à mesure que nous accumulons des preuves convaincantes de la capacité limitée de *Caesalpinia spinosa* à fixer l'azote, nous pourrions également améliorer la fertilité du sol, et donc la production de Tara, en mélangeant des plantations avec *P. sativum* comme fixateur d'azote.

**Tableau 5 Effet de l'origine du sol sur la croissance des plantes de Tara (*Caesalpinia spinosa*) et Arveja (*P. sativum*) et l'effet du rhizobia récupéré sur les plantes du Pois en serre**

Plante	Origine du sol	Croissance				Symbiose			
		Biomasse aérienne sèche (mg)	Biomasse racinaire sèche (mg)	Biomasse totale sèche (mg)	Surface foliaire (cm <sup>2</sup> )	Nombre total des nodules	Longueur racinaire (cm)	Activité nitrogenase (μmolC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> plant <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Chlorophylle (SPAD)
Tara	IL	233,5 (74,2) <sup>(1)</sup> a <sup>(2)</sup>	290,5 (60,8)a	524 (129,8)a,b	ND	0	108,8 (4,1)a	0,10 (0)a	49,5 (1,4)a
Tara	L	274,0 (23,6)a	218,8 (28,3)a	492,8 (27,3)a	ND	0	105,2 (16,8)a,b	0,11 (0,010)a	47,8 (1,0)a
Tara	OP	95,6 (25,6)a	144,9 (22,7)a	240,4 (32,8)b	ND	0	49,8 (3,2)b	0,09 (0,007)a	23,3 (7,1)b
Pois	IL	348,3 (51,4)a	522,4 (49,9)a,b	870,8 (71,0)b	28,3 (4,2)a,b	> 40a	1616,7 (189,2)a	ND	ND
Pois	L	484,6 (68,6)a	637,2 (19,8)a	1121,8 (52,9)a	30,5 (6,3)a	> 40a	1763,8 (125,9)a	ND	ND
Pois	OP	297,3 ( 77,0)a	482,1 (22,3)b	779,4 (60,4)b	13,3 (1,3)b	10b	1148,1 (222,2)a	ND	ND

ND: Non déterminé

<sup>(1)</sup>Error standard. <sup>(2)</sup> Les données de la même ligne suivie de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (P < 0.05)

**Tableau 6 Effectivité du pois (*P. sativum*) par traitement, après 1 mois de culture en conditions in vitro**

Provenance du sol	<i>In vitro</i>					
	Biomasse aérienne sèche (mg)	Biomasse racinaire sèche (mg)	Biomasse totale sèche (mg)	Longueur racinaire (cm)	Activité nitrogenase ( $\mu\text{molC}_2\text{H}_4 \text{ plant}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	Chlorophylle (SPAD)
<b>Control (non inoculé)</b>	382,8 (46,8) (1)c(2)	111,7 (4,8)b	494,4 c	788,9 (63,4)a	5,3 (1,6)b	0,8 (0,4)d
<b>IL</b>	692,4 (24,2)a	161,7 (6,7)a	854,1 a	984,8 (47,1)a	48,5 (4,0)a	33,1 (1,0)a
<b>L</b>	433,6 (26,4)b,c	139,3 (5,9)a	572,9 b,c	809,5 (35,6)a	24,6 (4,6)b	26,7 (1,0)b
<b>OP</b>	527,9 (46,4)b	158,1 (8,9)a	685,9 b	912,6 (41,1)a	20,2 (8,1)b	7,7 (3,2)c

(1) Error standard. (2) Les données de la même ligne suivie de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ( $P < 0.05$ )

**Tableau 7 Effectivité du Pois (*P. sativum*) par groupe des souches, après 1 mois de culture en conditions in vitro**

Provenance du sol	<i>In vitro</i>					
	Biomasse aérienne sèche (mg)	Biomasse racinaire sèche (mg)	Biomasse totale sèche (mg)	Longueur racinaire (cm)	Activité nitrogenase ( $\mu\text{molC}_2\text{H}_4 \text{ plant}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	Chlorophylle (SPAD)
<b>Control (non inoculé)</b>	382,8 (46,8) (1)b(2)	111,7 (4,8)c	494,4 b	788,9 (63,4)b	5,3 (1,6)b	0,75 (0,4)c
<b>Groupe 1</b>	420,6 (28,1)b	149,8 (9,5)a,b	570,5 b	876,6 (50,5)a,b	22,0(4,2)a,b	27,3 (1,4)a
<b>Groupe 2</b>	415,4 (37,5)b	131,3 (7,0)b,c	546,7 b	737,7 (46,9)b	22,8(7,9)a,b	25,3 (1,4)a,b
<b>Groupe 3</b>	696,2 (20,9)a	152,0 (10,1)a,b	848,2 a	932,4 (52,7)a,b	50,4(4,4)a	33,3 (1,3)a
<b>Groupe 4</b>	654,1 (34,8)a	170,1 (5,2)a	824,3 a	1020,7 (48,4)a	30,4(9,6)a,b	20,3 (5,9)a,b
<b>OP 11</b>	471,2 (69,2)b	146,9 (12,6)a,b	618,1 b	856,9 (54,1)a,b	34,5(8,5)a,b	13,4 (3,2)b

(1) Error standard. (2) Les données de la même ligne suivie de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ( $P < 0.05$ )

## CONCLUSIONS

1. La Tara a été principalement associée à des champignons mycorhiziens arbusculaires de la famille des Gloméracées, notamment *Rhizophagus irregularis*.
2. La mycorhization contrôlée, avec les spores de *R. irregularis*, a considérablement amélioré la culture de Tara en serre ainsi que l'absorption d'éléments nutritifs tels que le phosphore et l'azote.
3. *C. spinosa* pourrait être considéré comme "fortement dépendant de la mycorhize".
4. Aucune des plantes de Tara évaluées sur le terrain ou en laboratoire, n'a montré la présence de nodules dans les racines.
5. La présence de la culture de Tara dans les sols s'est avérée avoir un impact positif sur le développement et la croissance de la culture de Tara et de pois dans des conditions contrôlées.

## PERSPECTIVES

1. Poursuivre l'étude au stade *in situ*. Tester l'inoculation du champignon AM *Rhizophagus irregularis*, dans les plantations de Tara.
2. Tester la nodulation chez Tara avec des souches nodulantes qui ont déjà été démontrées la nodulation chez d'autres espèces.
3. Faire des études sur la concentration de tanins dans les gousses de Tara, en comparant les plantes mycorhizées et non mycorhizées.

## REFERENCES

1. El regional Piura. Seis mil plantones de tara mejorada para implementar sistema agroforestal en comunidad de Ayabaca [Internet]. 2016 [cité 11 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.elregionalpiura.com.pe/index.php/regionales/152-otras-provincias/13197-seis-mil-plantones-de-tara-mejorada-para-implementar-sistema-agroforestal-en-comunidad-de-ayabaca>
2. Aleman F. La tara *Caesalpinia spinosa*, especie prodigiosa para los sistemas agriforestales en valles interandinos.pdf. *Acta Nova*. 2009;4(2-3).
3. Villanueva C. La tara El Oro Verde de los Incas [Internet]. 1° Edición. Lima: AGRUM. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2007 [cité 17 avr 2017]. 163 p. Disponible sur: <http://www.asocam.org/biblioteca/items/show/2374>
4. Mancero L. La tara (*Caesalpinia spinosa*) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la Región. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPERATION [Internet]. févr 2009 [cité 19 janv 2017]; Disponible sur: <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/27400>
5. Marien JN, Delaunay G. La tara, *Caesalpinia spinosa*: espèce agroforestière emblématique des vallées interandines au Pérou. *Bois et forêts des tropiques*. 2010;(304):2.
6. Polo Villanueva FD. Insectos y Acaros perjudiciales de una plantación de tara (*Caesalpinia spinosa*) durante la primavera en Lurín [Internet]. [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2016 [cité 18 avr 2017]. Disponible sur: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2596>
7. Allen ON, Allen EK. *The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation*. Univ of Wisconsin Press; 1981. 886 p.
8. DE FARIA SM, LEWIS GP, SPRENT JI, SUTHERLAND JM. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytologist*. 1989;111(4):607–619.



9. Cordero I, Ruiz-Díez B, Coba de la Peña T, Balaguer L, Lucas MM, Rincón A, et al. Rhizobial diversity, symbiotic effectiveness and structure of nodules of *Vachellia macracantha*. *Soil Biology and Biochemistry*. mai 2016;96:39-54.
10. Ogata Gutiérrez K. Diversidad de microorganismos en la rizófora de « tara » (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze) y su efecto en el crecimiento del cultivo. [Lima]; 2006.
11. Gibson AH. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L.) plants. *Aust J Biol Sci* 16. 1963;28-42.
12. Vincent JM. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: Programme IB ed. International Biological Programme. Blackwell, Oxford: Handbook no. 15. [Internet]. Oxford: [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific; 1970 [cité 7 août 2018]. (Programme International Biological). Disponible sur: <https://trove.nla.gov.au/version/45249216>
13. Renier A, Maillet F, Fardoux J, Poinso V, Giraud E, Nouwen N. Photosynthetic Bradyrhizobium Sp. Strain ORS285 Synthesizes 2-O-Methylfucosylated Lipochitooligosaccharides for nod Gene-Dependent Interaction with Aeschynomene Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. déc 2011;24(12):1440-7.
14. Willems A, Coopman R, Gillis M. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in Bradyrhizobium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001;51(2):623-32.
15. Ponsonnet C, Nesme X. Identification of Agrobacterium strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch Microbiol*. 1 avr 1994;161(4):300-9.
16. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*. févr 2010;27(2):221-4.

17. Ogata K, Zuñiga D. Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huanuco. *Zonas Áridas*. 2008;12(1):191-208.
18. Doyle JJ. Phylogeny of the Legume Family: An Approach to Understanding the Origins of Nodulation. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1994;25:325-49.
19. Aguilar-Galvez A, Noratto G, Chambi F, Debaste F, Campos D. Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chemistry*. août 2014;156:301-4.
20. Depret G, Houot S, Allard M-R, Breuil M-C, Nouaÿm R, Laguerre G. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. *FEMS Microbiology Ecology*. déc 2004;51(1):87-97.
21. Aguilar OM, Riva O, Peltzer E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 14 sept 2004;101(37):13548-53.
22. Santillana N, Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Velázquez E, Zúñiga D. Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S–23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Archives of Microbiology*. mars 2008;189(3):239-47.
23. Santillana N, Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Velázquez E, Zúñiga D. Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S-23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Arch Microbiol*. mars 2008;189(3):239-47.
24. García-Fraile P, Mulas-García D, Peix A, Rivas R, González-Andrés F, Velázquez E. *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. *Canadian Journal of Microbiology*. août 2010;56(8):657-66.
25. Lin DX, Chen WF, Wang FQ, Hu D, Wang ET, Sui XH, et al. *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different

legumes. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY. 1 août 2009;59(8):1919-23.

26. Lin DX, Man CX, Wang ET, Chen WX. Diverse rhizobia that nodulate two species of *Kummerowia* in China. Archives of Microbiology. 2007;188(5):495-507.

27. Lin DX, Wang ET, Tang H, Han TX, He YR, Guan SH, et al. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY. 2008;58(6):1409-13.

28. Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, et al. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY. 1 nov 2008;58(11):2484-90.

29. Jordan DC. Gram-negative aerobic rods and cocci. Family III Rhizobiaceae. En N. Krieg, y J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*,. The Williams & Wilkin s Co Baltimore, USA. 1984;1:234-42.

30. Zhang X, Kosier B, Priefer UB. Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. Molecular Ecology. 2001;10:2297-305.

31. Palmer KM, Young JPW. Higher Diversity of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* Populations in Arable Soils than in Grass Soils. Appl Environ Microbiol. 6 janv 2000;66(6):2445-50.

## **ANNEXES**

## **Publication 1.**

### **“Impacto de la simbiosis micorrítica arbuscular en el crecimiento temprano del cultivo de Tara (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze)”**

Sheena Sangay-Tucto<sup>1,2</sup>, Hervé Sanguin<sup>3</sup>,  
Estelle Tournier<sup>3</sup>, Jean Thioulouse<sup>4</sup>, Yves  
Prin<sup>3</sup> y Robin Duponnois<sup>2</sup>

Revista Forestal del Perú, volumen 31 (pp 89 -  
96)

**Impacto de la simbiosis micorrítica  
arbuscular en el crecimiento temprano del  
cultivo de Tara (*Caesalpinia spinosa* (Molina)  
Kuntze)**

**Impact of the arbuscular mycorrhizal symbiosis  
on the early growth of Tara (*Caesalpinia spinosa*  
(Molina) Kuntze)**

Sheena Sangay-Tucto<sup>1,2</sup>, Hervé Sanguin<sup>3</sup>,  
Estelle Tournier<sup>3</sup>, Jean Thioulouse<sup>4</sup>, Yves  
Prin<sup>3</sup> y Robin Duponnois<sup>2</sup>

**Resumen**

Tara (*Caesalpinia spinosa*) ha sido cultivada durante muchos años en bosques naturales, principalmente para la recolección de sus vainas y sus semillas dado su alto valor por sus múltiples usos desde tiempos antiguos. Sin embargo, poco se conoce sobre la ecología y el estado de conservación de los bosques de Tara. La simbiosis micorrítica puede desempeñar un rol central en el crecimiento temprano de esta leguminosa y

constituye un componente clave para la mejora de las prácticas de manejo. El objetivo de este estudio fue describir el estado micorrítico de Tara en plantaciones localizadas en Perú y evaluar el impacto micorrítico sobre el crecimiento temprano de plántulas de Tara en condiciones de invernadero. Los resultados mostraron que la Tara se asoció principalmente con hongos micorríticos arbusculares de la familia *Glomeraceae*, notablemente *Rhizophagus* spp. La micorrización controlada con esporas de *R. irregularis* mejoró significativamente el crecimiento de Tara en invernadero, así como la absorción de nutrientes como el fósforo (P) y el nitrógeno (N). Por lo tanto, *C. spinosa* podría ser considerada como “altamente dependiente de la micorriza”. Estos resultados destacan la necesidad de considerar la simbiosis micorrítica arbuscular para mantener en forma sostenible la productividad y estabilidad de las plantaciones de Tara.

**Palabras clave:** *Caesalpinia spinosa*; simbiosis arbuscular micorrítica; diversidad; dependencia micorrítica.

---

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias y Filosofía, Unidad de Biominería y Medioambiente, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú. E-mail: [sheenasangay@gmail.com](mailto:sheenasangay@gmail.com)

<sup>2</sup> Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes-UMR 113, Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), Francia.

<sup>3</sup> Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes-UMR 113, Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD), Francia.

<sup>4</sup> Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Universidad de Lyon, Francia.

## Abstract

---

Tara (*Caesalpinia spinosa*) has been cultivated for many years by managing natural forests, mainly for pod and seed extraction, and is highly appreciated for its multiple uses since ancient times. However little is known about the ecology and conservation status of Tara forests. Mycorrhizal symbiosis may play a central role in the early growth of this legume tree and constitute a key component for the improvement of management practices. The aim of this study was to describe the Tara mycorrhizal status in plantations located in Peru and to evaluate the mycorrhizal impacts on the early growth of Tara seedlings in nursery conditions. The results showed that the Tara was mainly associated with AM fungi affiliated to the Glomeraceae family, notably *Rhizophagus* spp. The controlled mycorrhization with spores of *Rhizophagus irregularis* significantly enhanced the Tara growth in glasshouse, as well as the P and N nutrient uptake. Hence *C. spinosa* could be considered as “highly dependent on mycorrhiza”. These results emphasize the need to consider the AM symbiosis in order to sustainably maintain the productivity and stability of Tara plantations.

**Key words:** *Caesalpinia spinosa*; AM symbiosis; diversity; mycorrhizal dependency.

---



## Introducción

Los bosques secos son los ecosistemas tropicales más debilitados que resultan de las altas presiones antropogénicas. Se ha reportado que el 66% del ecosistema de bosque tropical seco ha sido asignado a otros usos de la tierra, particularmente en Perú donde el porcentaje de pérdida ha alcanzado el 95% (Portillo-Quintero y Sánchez-Azofeifa 2010). Factores antropogénicos, como prácticas culturales insostenibles o sobreexplotación de especies con alto valor comercial, han llevado a problemas de regeneración que afectan negativamente la sostenibilidad del bosque (Varghese *et al.* 2015). Por ejemplo, Balaguer *et al.* (2011), reportaron que un bosque de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Tara) fue sometido a bajos niveles de regeneración en Atiquipa (Perú). Más recientemente, se ha informado de que en la mayoría de las plantaciones de Tara evaluadas en diferentes localidades del Perú se detectó un proceso de regeneración limitado como resultado de la excesiva recolección de semillas o pastoreo (Cordero *et al.* 2016). La Tara se ha cultivado durante muchos años a través del manejo de bosques naturales, principalmente para la recolección de vainas y semillas (Larrea 2011). Aunque esta especie arbórea es altamente apreciada por sus múltiples usos desde la antigüedad, poco se sabe sobre la ecología y el estado de conservación de los bosques de Tara, limitando el desarrollo de prácticas de manejo sostenible (Larrea 2011). La estructura de la población y los patrones espaciales de las cubiertas forestales se han considerado ampliamente para evaluar su dinámica de regeneración (Niklas *et al.* 2003). Por lo general, estos criterios resultan del efecto y la interacción entre los factores ambientales, las características de las especies arbóreas, las intra e interacciones específicas entre planta y planta, las interacciones entre planta y animal y el impacto antropogénico en el tiempo (Wiegand y Moloney 2004). Numerosos estudios también han indicado que las interacciones micorríticas pueden impulsar las funciones de los ecosistemas y éxito del establecimiento de las plántulas, uno de los procesos más críticos que determinan la sostenibilidad de los ecosistemas (Dickie *et al.* 2002; van der Heijden *et al.* 2006; Ibanez *et al.* 2015). Aunque algunos estudios han reportado que *Caesalpinioideae* presenta una gran variación de colonización radicular con hongos micorríticos arbusculares (AM) (Fiori *et al.* 1999), no existe información sobre el estado micorrítico de *C. spinosa* y su dependencia micorrítica. Los objetivos en la presente investigación fueron: (i) determinar el estado micorrítico de Tara en plantaciones ubicadas en Perú y (ii) evaluar los impactos micorríticos sobre el crecimiento temprano de plántulas de Tara en condiciones de invernadero. Se plantea la hipótesis de que esta especie arbórea se asocia en condiciones de campo con hongos AM y que el manejo de la infectividad micorrítica del suelo podría incrementar de forma sostenible la productividad y estabilidad de las plantaciones de Tara en el Perú.

## **Materiales y Métodos**

### ***Materiales***

#### **Material vegetal**

- Raíces de árboles de Tara *C. spinosa* (Molina) Kuntze
- Semillas de Tara *C. spinosa* (Molina) Kuntze

### ***Métodos***

#### **Lugar de ejecución**

La parte experimental de la presente investigación se realizó en el Laboratorio de Simbiosis Tropicales y Mediterráneas (LSTM), en el campus internacional de Baillarguet en Montferrier sur lez en la ciudad de Montpellier en Francia.

#### **Toma de muestra**

La recolección de muestras de raíces (10 cm de profundidad) se llevó a cabo en una plantación de Tara en Canchacaya, de 2 zonas diferentes que denominamos H1 y H2 para el presente estudio. Ubicadas en la región de Huánuco (S 10°10.654'; W 076°10.129'), provincia de Ambo a 2459 msnm. Por cada zona, se seleccionaron cinco árboles al azar, y por cada árbol se recolectaron 3 muestras de raíces.

Las muestras de raíces fueron colocadas en bolsas de plástico de primer uso las que se encontraban debidamente rotuladas y luego transportadas en una caja frigorífica portátil que mantuvieran la temperatura a 4°C aproximadamente, hasta que fueran procesadas en el laboratorio.

En el laboratorio, las raíces fueron lavadas cuidadosamente con agua de caño y se observaron bajo un estereomicroscopio (Olympus SZ H10 research stereomicroscope) con aumentos de 4x para detectar la presencia de nódulos rizobianos y/o ectomicorrizas, luego se secaron para análisis molecular.

#### **Evaluación de la estructura de la comunidad AM**

##### ***- Extracción de ADN***

Se trituraron las raíces secas en nitrógeno líquido para homogenización y se extrajo el ADN en una submuestra (40 mg) usando un homogeneizador FastPrep-24 (MP biomedical Europe, Illkirch, France) y el kit FastDNA®SPIN (MP biomedical Europe), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se mejoró la calidad de los extractos de ADN, añadiendo 20-30 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) durante la primera etapa de extracción de ADN.

Se realizaron tres repeticiones por muestra de raíz. Se comprobó la integridad del ADN en gel de agarosa al 1,5% y se realizó la cuantificación del ADN utilizando el kit de ensayo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, St. Aubin, Francia).

**- Análisis molecular de la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares a través de secuenciación (tecnología Illumina)**

Las muestras de ADN extraídas a partir de la raíz de árboles de Tara, fueron purificadas para amplificar el gen 18S ARNr, utilizando cebadores específicos NS31 y AML2 (Simon *et al.* 1992; Lee *et al.* 2008) con la finalidad de evaluar la diversidad de los hongos AM (Glomeromycota). Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por medio de una cadena de secuenciamiento obtenidos a través de la tecnología Miseq illumina (1x300 pb) (Genotoul, Toulouse, Francia). Las reacciones de PCR para la amplificación fueron realizadas en dos etapas: i) la primera etapa se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL usando cebadores modificados NS31 (5'-ctttccctacacgacgctcttcgcatctTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') y AML2 (5'-ggagttcagacgtgtgctcttcgcatctGAACCCAAACACTTTGGTTTCC 3') 0,6 µM de cada uno respectivamente, 2 µL de ADN (2 repeticiones de ADN extraído por muestra), 200 µM de cada dNTP, 200 ng/mL BSA, GoTaq® ADN Polimerasa (2 unidades) y 1X Green GoTaq®, Buffer de reacción (Promega, Charbonnières, Francia). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 30s, 58°C por 1 min, 72°C por 80s; una etapa de elongación final a 72°C por 5 min. Se agruparon tres repeticiones de PCR por cada muestra, los cuales fueron purificados utilizando GFX PCR ADN y el kit de purificación de bandas a partir del gel (GE Healthcare Life Sciences, Vlizy-Villacoublay, Francia) siguiendo las indicaciones del fabricante; para la segunda etapa, se enviaron los productos de PCR a secuenciar a la plataforma Genotoul (Toulouse, Francia), a través de la tecnología *Illumina*.

---

**-Procesamiento de secuencias generadas por el secuenciamiento con la tecnología Illumina.**

Las secuencias de una hebra (NS31) obtenidas con el secuenciamiento por la tecnología Illumina fueron analizadas y se verificó su calidad usando el software Mothur de acuerdo con el procedimiento operativo estándar ([http://www.mothur.org/wiki/MiSeq\\_SOP](http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP)) propuesto en Kozich *et al.* (2013), sin embargo, la calidad de las secuencias ubicadas en los extremos de los fragmentos de ADN obtenidos fue verificada usando la configuración Q30 (comando *trim.seqs*). A continuación, todas las secuencias fueron agotadas con códigos de barras y cebadores, y se eliminaron todas las secuencias <150 pb (bases ambiguas u homopolímeros superiores a 8 pb). Enseguida, se realizó un paso de pre-agrupamiento (Huse *et al.* 2010) para eliminar secuencias erróneas formadas probablemente por errores del secuenciamiento, también se eliminó quimeras basándose en el algoritmo Uchime (Edgar *et al.* 2011). Por último, se clasificaron las secuencias alineándolas con una base de datos basada en Glomeromycota de Krüger *et al.* (2012) y el método clasificador RDP-naïve implementado en Mothur (comando *classify.seq*). Todas las secuencias no-Glomeromycota (<40% de confianza limite a nivel familiar) fueron eliminadas. Se realizó el agrupamiento de secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) utilizando *dist.seqs* y comandos de agrupamiento en Mothur, los OTUs solitarios fueron eliminados. Se normalizaron el número de secuencias entre cada muestra con el comando *sub.sample* (19,114 secuencias por muestra). El paso de submuestreo permitió reducir el número de falsos OTUs, lo cual es crucial para obtener una comparación confiable entre las muestras (Gihring *et al.* 2012) Finalmente, los OTUs definidos con una divergencia del 3% (97% de similitud) fueron seleccionados para la afiliación taxonómica usando el comando *classify.otu*.

## Ensayos a nivel de invernadero

### - Desinfección y germinación de semillas de *C. spinosa*

Las semillas de *C. spinosa*, recogidas de la misma plantación de Tara, se esterilizaron superficialmente con ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) al 95% (Sanon 2009) durante 15 min. Luego, se retiró la solución ácida y se enjuagaron las semillas durante 12h cuatro veces en agua destilada estéril. Posteriormente, se transfirieron asépticamente en placas petri llenas con agar al 1% (w/v) y germinaron en la oscuridad a 25°C durante 1 semana. Las semillas germinadas se utilizaron cuando las raíces tenían 1-2 cm de largo, las cuales se cultivaron en macetas de 250 cm<sup>3</sup> llenas con una mezcla de tierra/arena (1/4; v/v).

### - Inoculación del hongo

Se produjo el inóculo fúngico *R. irregularis* en condiciones axénicas según Bécard y Fortin (1988). Considerando que 1 kg de este inóculo contiene 10<sup>6</sup> esporas, se realizó un cálculo simple para obtener la cantidad necesaria según el tratamiento. Se procedió a inocular a razón de 0, 125, 250 y 500 esporas por maceta. Luego, estas se dispusieron en un diseño de bloques completos al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Las plantas se mantuvieron con luz natural (duración del día aproximadamente: 10h, temperatura media de 22°C, temperatura máxima (de día) de 25°C y mínima (de noche) de 15°C). Estas fueron regadas diariamente con agua osmótica sin aporte de fertilizantes.

### - Tratamiento de plantas post-cosecha

Las plántulas de Tara se cosecharon después de 4 meses de cultivo y sus raíces se lavaron con agua de caño. Se llevaron cinco plántulas de *C. spinosa* al horno (1 semana a 65°C) para determinar el peso seco de la parte aérea. Se realizó la determinación de nitrógeno y fósforo a partir de tejidos vegetales tal y como se describe en Boudiaf *et al.* (2013). Se evaluó la colonización de AM como se describe en Ouahmane *et al.* (2006) utilizando la tinción con azul de tripano y la dependencia micorrítica de *C. spinosa* se expresó como el porcentaje de la diferencia entre la biomasa total de una planta micorrizada y la biomasa total de una planta no micorrizada dividido entre la biomasa total de la planta micorrizada (Plenchette *et al.* 1983). Se evaluó la longitud radicular de las plantas restantes de acuerdo con van der Heijden *et al.* (1998). Finalmente, las raíces fueron llevadas al horno (por 1 semana a 65°C) para su secado y luego se pesaron.

**Análisis estadísticos**

Se trataron todos los datos con un análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Las medias se compararon mediante la prueba de New- man-Keul’s (P<0,05).

**Resultados**

**Presencia de nódulos rizobianos y/o ectomi- corrizas**

Los árboles muestreados de Tara de 5 años de la plantación de Canchacaya en Huánuco, de ambas zonas, H1 y H2, no presentaron ectomicorrizas ni nódulos rizobianos en las raíces de Tara recolectadas, lo que indica un estado simbiótico específico AM en Tara.

**Evaluación de la estructura de la comunidad AM**

La diversidad de hongos AM registrada en raíces de Tara mostró un predominio de la familia de *Glomeraceae* (98% de secuencias), notablemente asociado a *Rhizophagus*, *Sclerocystis* y *Glomeraceae incertae sedis* (Figura 1).

**Tratamientos de plantas post-cosecha**

**- Parámetros de crecimiento**

El tratamiento que se resalta corresponde a la inoculación con 250 esporas que en comparación al control incrementa en 1,8 para el peso seco de la parte radicular, en 2,6 para la parte aérea, en 2,2 para la biomasa total, en 2,1 para la longitud radicular (Cuadro 1).

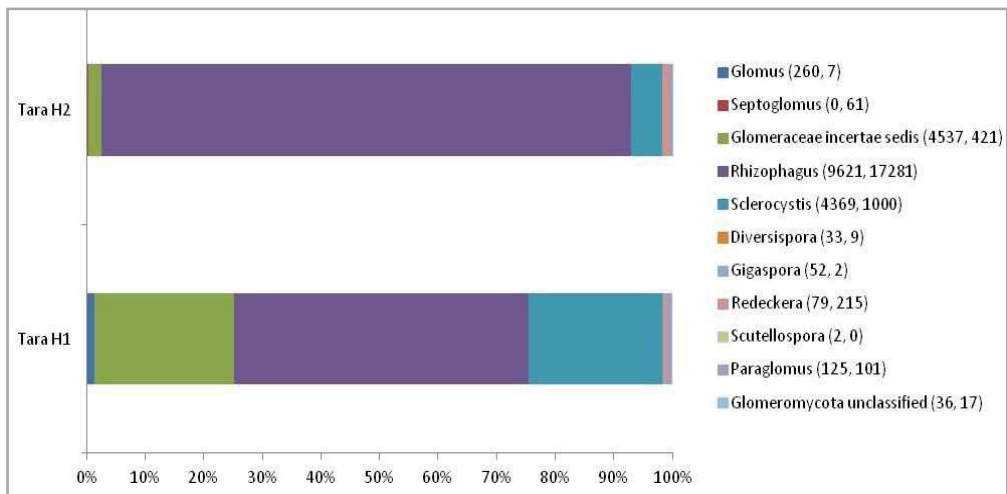


Figura 1. Estructura taxonómica de las comunidades de hongos AM asociados con los árboles de *C. spinosa* (Tara) (plantaciones H1 y H2). Los datos se normalizaron a 19114 secuencias por muestra. Los datos se expresan como abundancia relativa de cada grupo taxonómico (% del número total de secuencias) para cada árbol. Los números entre paréntesis indican el número de secuencias para H1 y H2 respectivamente.

	Número de esporas AM inoculadas por maceta			
	Control (0)	125	250	500
Biomasa aérea (mg peso seco)	161,3 (26,9) <sup>(1)</sup> a <sup>(2)</sup>	302,5 (79,2) b	417,9 (55,7) b	392,3 (26,9) b
Biomasa radicular (mg peso seco)	184,1 (23,8) a	380,2 (95,6) b	336,8 (20,5) b	324,1 (90,1) b
Biomasa Total (mg peso seco)	345,4 (25,9) a	682,7 (174,4) a	754,7 (69,9) b	716,4 (24,8) b
Longitud radicular (cm)	259,1 (11,5) a	438,6 (59,4) b	542,3 (93,9) bc	585,5 (24,5) c
Dependencia micorrítica (%)	-	47,4 (11,9) a	54,1 (4,1) a	51,2 (7,3) a
Contenido de N en la parte aérea (mg g <sup>-1</sup> peso seco)	2,12 (0,07) a	2,98 (0,12) b	3,04 (0,09) bc	3,12 (0,02) c
Contenido de N en la parte radicular (mg g <sup>-1</sup> peso seco)	0,78 (0,02) a	0,89 (0,03) b	0,91 (0,04) b	0,98 (0,08) b
Contenido de P en la parte aérea (mg g <sup>-1</sup> peso seco)	0,11 (0,02) a	0,23 (0,04) b	0,29 (0,02) bc	0,38 (0,02) c
Contenido de P en la parte radicular (mg g <sup>-1</sup> peso seco)	0,23 (0,02) a	0,25 (0,03) a	0,31 (0,02) b	0,32 (0,03) b

**Cuadro 1.** Impacto de la inoculación de esporas de *R. irregularis* en el crecimiento y contenido de nutrientes de plántulas de *C. spinosa* después de 4 meses de cultivo en condiciones de invernadero. <sup>(1)</sup> Error standard. <sup>(2)</sup> Dato en la misma línea seguido por la misma letra no son significativamente diferente de acuerdo a la prueba Newman-Keul's (P < 0,05).

#### - Contenido de nutrientes (nitrógeno y fósforo)

Todas las plantas inoculadas fueron significativamente mejores que el control sin inocular, a excepción del tratamiento inoculado con 125 esporas, cuyo contenido de fósforo (en la parte radicular) fue similar al control (Cuadro 1).

#### - Dependencia micorrítica

La dependencia micorrítica fue de aproximadamente al 50% en *C. spinosa*.

#### Discusión

Las *Glomeraceae* son las más ampliamente distribuidas en los ecosistemas (Opik *et al.* 2010), con especies AM (por ejemplo, *Funneliformis mosseae* y *R. irregularis*), mostrando una distribución geográfica extremadamente grande, potencialmente resultante de una falta de especialización de las condiciones ambientales (Rosendahl *et al.* 2009). La comunidad de hongos micorríticos arbusculares asociados a la *C. spinosa* en el presente estudio, están de acuerdo con los registrados en árboles *Ceratonia siliqua* L., una leguminosa esclerófila perteneciente también a la subfamilia de *Caesalpinaceae* (Manaut *et al.* 2015). El predominio de *Rhizophagus* spp. (70% de las secuencias) puede sugerir un rol



funcional importante en relación con el cultivo de Tara. En consecuencia, se utilizó una cepa de *R. irregularis* en experimentos de micorrización controlada para evaluar el efecto en el crecimiento y nutrición del cultivo. Numerosos estudios han demostrado el efecto benéfico de *R. irregularis* sobre el crecimiento de otras especies arbóreas en condiciones controladas (Duponnois y Plenchette 2003; Dabire *et al.* 2007; Kisa *et al.* 2007) y después de la siembra en campo (Duponnois *et al.* 2007; Bilgo *et al.* 2012). En el presente estudio, la inoculación con dicho hongo micorrítico aumentó significativamente el crecimiento de las plántulas de Tara en comparación a plantas no inoculadas.

Dado que los resultados de dependencia micorrítica en *C. spinosa* fue de 50%, esto indica que esta especie podría clasificarse como “micorrítica obligatoria” (Brundett 1991) o como “altamente dependiente de la micorriza” (Habe y Manjunath 1991).

### Agradecimientos

IRD, Embajada de Francia, Ministerio de Educación Nacional, Enseñanza Superior e Investigación de la República Francesa y Red Universitaria Raúl Porras Barrenechea/ CON- CYTEC-FONDECYT, UPCH y UNALM.

### Bibliografía

Balaguer, L; Arroyo-García, R; Jiménez, P; *et al.* 2011. Forest restoration in a fog oasis: evidence indicates need for cultural awareness in constructing the reference. PloS One 6:e23004  
. doi: 10.1371/journal.pone.0023004

Bécard, G; Fortin, JA. 1988. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol, 108: 211-218.

Bilgo, A; Sangare, SK; Thioulouse, J; Prin, Y; Hien, V; Galiana, A; Baudoin, E; Hafidi, M; Bâ, MA; Duponnois, R. 2012. Response of native soil microbial functions to the controlled mycorrhization of an exotic tree legume, *Acacia holosericea* in a Sahelian ecosystem. Mycorrhiza 22: 175-187

Boudiaf, I; Baudoin, E; Sanguin, H; Beddiar, A; Thioulouse, J; Galiana, A; Prin, Y; Le Roux, C; Lebrun, M; Duponnois, R. 2013. The exotic legume tree species, *Acacia mearnsii*, alters microbial soil functionalities and the early development of a native tree species *Quercus suber*, in North Africa. Soil Biol Biochem 65: 172-179

Brundett, MC. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. In: Macfayden, A; Begon, M and Fitter, AH (eds), advances in Ecological Research, Vol. 21. Academic Press Ltd, London, p. 171-313.

Cordero, I; Jimenez, MD; Delgado, JA; Villegas, L; Balaguer, L. 2016. Spatial and demographic structure of Tara stands (*Caesalpinia spinosa*) in Peru: Influence of



present and past forest management. For. Ecol. Manage. 377: 71-82

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

Dickie, IA; Koide, RT; Steiner, KC. 2002. Influences of established trees on mycorrhizas, nutrition, and growth of *Quercus rubra* seedlings. Ecol Monogr 72: 505-521

Duponnois, R; Plenchette, C. 2003. A mycorrhiza helper bacterium (MHB) enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. Mycorrhiza 13: 85-91

Duponnois, R; Plenchette, C; Prin, Y; Ducousso, M; Kisa, M; Bâ, AM; Galiana, A. 2007. Use of mycorrhizal inoculation to improve reforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. Ecol engin 29: 105-112

Edgar, RC; Haas, BJ; Clemente, JC; Quince, C; Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27: 2194-2200

Frioni, L; Minasian, H; Volfovicz, R. 1999. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. For Ecol Manage 115: 41-47

Gihring, TM; Green, SJ; Schadt, CW. 2012. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. Environ Microbiol 14: 285-290

Habte, M; Manjunath, A. 1991. Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. Mycorrhiza, 1: 3-12

Huse, SM; Welch, DM; Morrison, HG; Sogin, ML. 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. Environ Microbiol 12: 1889-1898.

Ibanez, B; Gomez-Aparicio, L; Avila, JM; Perez-Ramos, IM; Garcia, LV; Maranon, T. 2015. Impact of tree decline on spatial patterns of seedling-mycorrhiza interactions: Implications for regeneration dynamics in Mediterranean forests. For Ecol Manage 353: 1-9

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 can 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 Microbiol Ecol 62: 32-44

- Kozich, JJ; Westcott, SL; Baxter, NT; Highlander, SK; Schloss, PD. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79: 5112-20
- Krüger, M; Krüger, C; Walker, C; Stockinger, H; Schüssler, A. 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New phytol* 193: 970-984.
- Larrea, M. 2011. La Tara, guarango o taya (*Caesalpinia spinosa*) en la región andina: criterios ambientales para la sustentabilidad de su aprovechamiento y manejo en Bolivia, Ecuador y Perú. ECOBONA, Serie de Capacitación No. 5. Programa Regional ECOBONA-IN-TERCOOPER, Quito, Peru.
- Lee, J; Lee, S; Young, JPW. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 339-349
- Manaut, N; Sanguin, H; Ouahmane, L; Bressan, M; Thioulouse, J; Baudoin, E; Galiana, A; Hafidi, M; Prin, Y; Duponnois, R. 2015. Potentialities of ecological engineering strategy based on native arbuscular mycorrhizal community for improving afforestation programs with carob trees in degraded environment. *Ecol Eng* 79: 113-119
- Niklas, KJ; Midgley, JJ; Rand, RH. 2003. Tree size frequency distributions, plant density, age and community disturbance. *Ecol Lett* 6: 405-411.
- Öpik, M; Vanatoa, A; Vanatoa, E; Moora, M; Davison, J; Kalwij, JM; Reier, U; Zobel, M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol* 188: 223-241
- Ouahmane, L; Hafidi, M; Plenchette, C; Kisa, M; Boumezzough, A; Thioulouse, J; Duponnois, R. 2006. *Lavandula* species as accompanying plants in *Cupressus* replanting strategies: effect on plant growth, mycorrhizal soil infectivity and soil microbial catabolic diversity. *Appl Soil Ecol* 34: 190-199

- Plenchette, C; Fortin, JA; Furlan, V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P fertility:  
I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil* 70: 199-209
- Portillo-Quintero, CA; Sánchez-Azofeifa, GA. 2010. Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biol. Conserv.* 143: 144-155
- Rosendahl, S; McGee, P; Morton, JB. 2009. Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Mol Ecol* 18: 4316-4329
- Sanon, A. 2009. Le concept de niche écologique associé à la co-existence des espèces végétales : mise en évidence du rôle de la symbiose mycorrhizienne et de sa microflore associée dans la structuration de la strate herbacée en milieu tropical.
- 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; Streitwolf-Engel, R; Riedl, R; et al. 2006. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytol* 172:739–752
- Varghese, A; Ticktin, T; Mandle, L; Nath, S. 2015. Assessing the effects of multiple stressors on the recruitment of fruit harvested trees in a tropical dry forest, Western Ghats, India. *PLoS One* 10, e0119634.
- Wiegand, T; Moloney, KA. 2004. Rings, circles, and null-models for point pattern analysis in ecology. *Oikos* 104: 209-229.

Presentado: 11/11/2017 Aceptado: 14/12/2017

**Publication 2.**

**“Ecological Characteristics of Tara (*Caesalpinia spinosa*),  
a Multipurpose Legume Tree of High Ecological and  
Commercial Value”**

(Sheena Sangay-Tucto and Robin Duponnois)

Agricultural Research Updates. Volume 22. Chapter 7. (pp. 189-208)

## *Chapter*

### **Ecological Characteristics of Tara (*Caesalpinia Spinosa*), a Multipurpose Legume Tree of High Ecological and Commercial Value**

***Sheena Sangay-Tucto<sup>1,2,3</sup>*  
*and Robin Duponnois<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía, Unidad de Biominería y Medioambiente, Lima, Perú

<sup>2</sup>IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Montpellier, France

<sup>3</sup>Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso,” Dpto. Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria – UNALM, Lima, Perú

## ***Abstract***

Tara (*Caesalpinia spinosa*) has been cultivated for many years by managing natural forests, mainly for pod and seed extraction, and is highly appreciated for its multiple uses since ancient times. However it has been reported that limited regeneration process resulting from excessive seed collection or grazing was detected in most of Tara stands examined in different localities in Peru. Little is known about the ecology and conservation status of Tara forests. The aims of this chapter are to review the scientific knowledge acquired on this species in order to sustainably manage the Tara plantations and increase their productivity and stability. The botanical description of this tree species as well as its ecology (geographical distribution, ecological preferences, susceptibility to pathogens and pests, etc.) will be addressed. Showing the economical values of its products and the description of the strong demands for Tara products will assess the economic importance of the Tara. Then the cultural practices used for the management of Tara plantations will be characterized. This chapter will be concluded by some recommendations to better manage the Tara plantations.

**Keywords:** Tara, *Caesalpinia spinosa*, ecology, cultural practices, economic importance

## ***1. Introduction***

Tara has been cultivated for many years by managing natural forests, mainly for pod and seed extraction (Larrea, 2011). Although this tree species is highly appreciated for its multiple uses since ancient times, little is known about the ecology and conservation status of Tara forests, limiting the development of sustainable management practices (Larrea, 2011). The aims of this chapter are to review the scientific knowledge acquired on this species in order to sustainably manage the Tara plantations and increase their productivity.

## ***2. General Knowledge on Tara***

The name of Tara comes from the Aymara language meaning “flattened” or “crushed” because of the shape of the sheath (Redfor, 1996; Mancero, 2009). Other denominations have been sometimes found in South America. In Peru it is also called “Taya”; in Colombia: “Dividivi of cold soil,” “guarango,” “cuica,” “serrano”; in Ecuador: “Guarango,” “Vinillo,” “Campeche”; in Bolivia: “Tara”; in Chile, Venezuela and in Europe, it is also known as: “Dividi of The Andes,” “Acacia amarilla” or “Caroube del Perú” (30th JECFA, 1986).

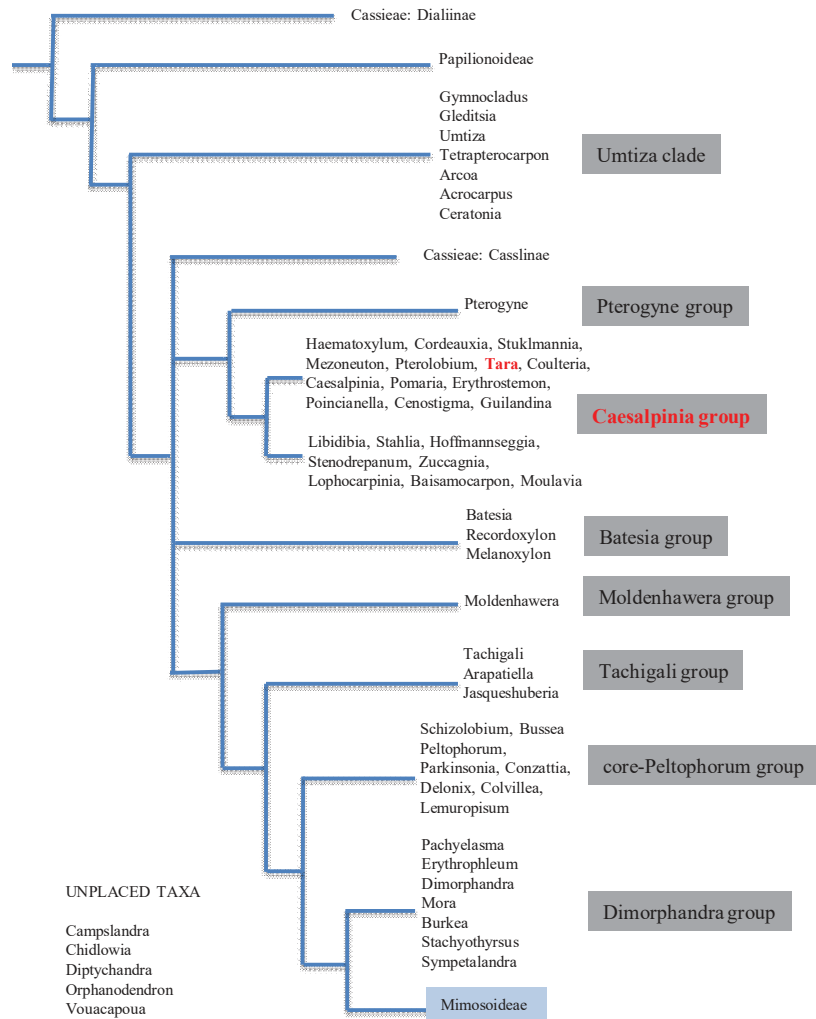


Figure 1. Diagram of relationships between genera and informal groups of Caesalpinieae based on the analyses of Polhill & Vidal (1981); Polhill (1994); Lewis & Schrire (1995); Kajita et al. (2001); Bruneau et al. (2001); Herendeen et al. (2003a & b); Simpson & Lewis (2003); Simpson et al. (2003). From Lewis et al. (2005).

The scientific name of Tara is *Caesalpinia spinosa*(Molina) Kuntze or *Caesalpinia tinctoria*, in honor to Andrea Caesalpini, Italian botanist and Spinosa, from the Latin spinus-a-um, with presence of thorns(De la Cruz Lapa 2004).

Tara is a tree belonging to the family *Caesalpinieae*, the order *Fabales* (also known as the order of legumes) (Roskov et al., 2017).As shown in Figure 1, at a taxonomic level, the closest species to Tara are *Coulteria*(Lewis et al., 2005) or *Pterolobium stellatum* in Africa.

## 2.1. Botanical Description

Tara is a small or medium tree, which can reach a height of 15 m, highest tree recorded of 25 m (Barriga, 2017) with a diameter of 15 to 50 cm for the larger specimens (Reynel et al., 2007). Its crown can reach more than 6 meters in diameter. The stem may be unique or have several stems and shoots that are short, cylindrical or winding (Aleman, 2009) and its bark is dark brown thorny provided with triangular flattened prickles (Reynel et al., 2007), with a dense wood. Its leaves are composed, bipinnate, alternating, arranged in spiral, of about 8 pairs of small leaflets with thick and waxed cuticle, of a total length of around 11 cm. The flowers are gathered in bunches of about 20 cm long (Aleman, 2009) with 40 to 100 hermaphrodite flowers having a cup 5 petals and a corolla of 5 yellow sepals with red spots, 10 stamens and a bent pistil extending in an ovary (Fosefor-Intercooperation-Samiri, 2006). Tara blooms from September to March and the fruits are harvested from March to September according to rainfall or areas (Aleman, 2009). In some areas and in plantations, it is possible to have two harvests per year, with 5 months between the Tara blooms to the fruit harvesting (Barriga, 2017). The fruits are indehiscent pods (Figure 2), flattened and recurved, 5 to 10 cm long and 1 to 3 cm wide, going from green to red in the course of maturation, weighing 2 to 5 grams and the composition (mass) is approximately: Seed: 40%, Shell: 38%, and endosperm: 22% (Pastor, 1977; Coppen, 1995). They contain up to 10 coffee brown seeds when ripe and have a waterproof wax coated epidermis (Fosefor-Intercooperation-Samiri, 2006; Aleman, 2009). The number of seeds per kilogram of pods fluctuates between 3000 and 4500 (Peñarrieta & Aleman, 2009). The root system is composed of taproots that can penetrate the ground up to 5 m (Aleman, 2009) and numerous secondary roots. The prospected surface can reach up to 10 square meters (De la Cruz Lapa, 2004).



Figure 2. Pods of Tara (Ardiles, L.).



## 2.2. Ecology

### 2.2.1. Geographical Distribution

*Caesalpinia spinosa*, this native tree from the Peruvian Andes, has perfectly adapted to the climate of the rest of South America, between 4°N and 32°S, from Venezuela to northern Chile (Narváez et al., 2009; Mancero, 2009). Its predilection area is located on the Atlantic slope between 800 and 2800 m (Melo et al., 2013) and the Pacific slope between 1600 and 2800 m. However, on the western slope of the Andes mountain range and within the inter-Andean valleys, it can be found up to 3200 m above sea level while Tara has also been recorded within the "cloud forests" at 500 m.a.s.l (Barriga, 2008). *Caesalpinia* has been introduced and is cultivated in northern and eastern Africa, United States, Brazil and Argentina (Macbride, 1943; Duke, 1981; Brako & Zarucchi, 1993; Coppen, 1995; Ulibarri, 1996; Jørgensen & León-Yáñez, 1999).

### 2.2.2. Ecological Preferences

Tara is a xerophytic species, which means that it is well adapted to dry environments. We find Tara within zones where the rains vary between 230 and 500 mm/year. However, its optimum development requires an annual rainfall of 400 to 600 mm, as it is the case in plantations (De la Cruz Lapa, 2004; Nieto & Barona, 2007; Barriga, 2008). The success of Tara in the particular case of cloud forests (high cloud immersion rate) comes from its ability to intercept cloud water.

Tara is found within regions where average annual temperatures vary between 12°C and 20°C, with an optimum range of 16°C within the valleys (De la Cruz Lapa, 2004).

According to Villanueva (2007), the presence of Tara is primarily the result of weather conditions (which are heavily dependent on altitude), largely irrespective of the origin and soil quality. In such a way that Tara can grow on clayey, loamy, or sandy soils. In most cases, it is found on top soils and soils with high stoniness which are not suitable for agricultural activity (De la Cruz Lapa, 2004; Nieto & Barona, 2007; Barriga, 2008). In addition, we can find it on degraded soils suggesting that Tara is an interesting plant for the ecological restoration of soils.

### 2.2.3. Pathogens and Pests

Tara is very resistant to pathogens and pests. However, Bustamante & Bustamante (2009), cited in the thesis of Polo Villanueva (2016) indicate that pests of Tara are mainly insects and mites belonging to the orders of *Lepidoptera*, *Diptera*, *Homoptera*, *Orthoptera*, *Acarina*. The aphids (*Aphis craccivora*) attack the leaves, flowers, green pods and stem; the maggots, *Pinnaspis* sp. and *Icerya purchasi* attack branches and stems; and the whitefly of the *Aleurodidae* family, which is a sucking-biting insect that attacks the underside of the leaves producing sugary secretions that are associated with the fungus called "sooty mold." Ants and aphids attacks are a problem in certain

regions (Novoa & Ramirez, 2007; Mancero, 2009). The appearance of pests often depends on the association of Tara with other crops (in the case of custard apples, citrus, avocado, olive and mango (Polo Villanueva, 2016), beans, beets, cucurbits, brassicas, peanuts (Sánchez & Vergara, 2003); tomato, potato, marigold, alfalfa, lima beans and squash (Villanueva, 2007), cited in the thesis of Polo Villanueva (2016). The most common diseases are due to *Fumagina*, *Oidium* (De la Cruz Lapa, 2004; Mancero, 2009) and *Rhizoctonia molds* (Mancero, 2009). Epiphytic plants of the genus dodder can parasitize the Tara by gradually "asphyxiating" it, especially in natural forests (Mancero, 2009). It is the case of the "pacha pacha" that adheres to the pods and forms the "angel hair" or to the huijuntó and túllanla that wraps around the branch (De la Cruz Lapa, 2004).

#### 2.2.4. Ecological Community/Habitats

In natural forest, in arid and semiarid areas, Tara is often associated with other shrub species such as *Schinus molle* (Molle), *Prosopis laviegate*, *Acacia macracantha*, *Acaciavisco*, *Opuntia sp.*, *ficus indica*, *Dodonaea viscosa*, *Jacaranda mimosifolia*, *Baccharis sp.*, (Aleman, 2009) and grasses of the genus *Eragrostis*, *Chloris*, *Pennisetum*, *clandestinum*, *Cynodon dactylon*, *Calliandra sp.*, *Rubus sp.*, *Croton sp.*, among others (De la Cruz Lapa, 2004; Aleman, 2009; Marien & Delaunay, 2010). Within cloud forests, it is found in association with 80 species grouped in 37 families and notably endemic plants (Cano et al., 1999). In the lomas ecosystem, an archipelago of fog oases in the Peruvian Coastal Desert, the predominant species is Tara (Moutarde, 2008; Balaguer et al., 2011).

The Tara is commonly used in agroforestry because it exerts very little competition with other agricultural crops because its pivoting roots prospect the soil in depth (whereas the roots of agricultural crops develop mainly in the superficial layers of the soil) and also, because of its sparse crown, it allows the light to pass through. Therefore it is often planted with other agricultural species such as tunas, *Opuntia ficus-indica*, for growing cochineal. Tara can also be associated with various other crops as *Saccharum officinarum* (sugar cane), *Zea mays* (maize), *Pisum sativum* (green peas) (Ermiš Vigo & Quiroz, 2006; Aleman, 2009; Mancero, 2009), *Phaseolus vulgaris* (bean) (Aleman, 2009), *Solanum tuberosum* (potato), *Vicia faba* (broad beans), *Medicago sativa* (alfalfa), *Sorghum* spp (sorghum). It is also possible to find it as isolated trees in the fields of cereals (wheat, barley) (Aleman, 2009; Mancero, 2009). The surfaces of agricultural plots are very small (usually less than 1 ha) and so could resemble a living fence system (Marien & Delaunay, 2010) within which Tara can play the role of barrier (Mancero, 2009). We also find it associated to orchards of *Malus domestica* (apple), *Pyrus spp.* (pear), *Prunus persica* (plum) (Aleman 2009) and *Annona cherimolia* (cherimoya) (Chuquiruna & Germán, 2010). *Persea Americana* (avocado) orchard benefits from the attractive Tara flowers by increasing the presence of bees, pollinating the less attractive avocado flowers.

### 2.3. USES AND TRADE

Tara was used by the pre-Inca and Inca populations for the elaboration of dyes for the textile or ceramics, in the tannery and also even for medicinal purposes. Currently, Tara is a multi-use species (firewood, agricultural tools, carpentry, fruits, fodder, fencing) (Marien & Delaunay, 2010). For the past 15 years, it has been an economic interest spot for the economic value of its products, mainly food gum from its endosperm and tannins from the pod for the industry.

Tara tannins are easily hydrolyzable by the action of tannase enzyme (Alvarez & de Ugaz, 1992). These tannins are used in the leather industry because of its tannic power, which allows a wide variety of light-colored leathers, which differ in terms of flexibility and high resistance (De la Cruz Lapa, 2004; Barriga, 2017). The greatest advantage of the Tara tannin is its natural origin, thus avoiding resorting to the use of industrial chrome, particularly toxic during tanning (Michiels, 2013). For these reasons, once leathers are dyed, they are destined for the luxury market. According to the requirements of international demand, the ideal concentration of tannins in pods of Tara is located between 58% and 62% (Mancero, 2009). In the tanning industry, other vegetable tannins are in competition with the Tara, as is the case of "Quebracho" (*Schinopsis molle*) from Argentina, or chestnut (*Castanea sativa*) or "Mimosa" *Acacia mollissima*. To extract the tannin from these species, the bark and/or wood of the tree is used, sacrificing the whole tree, unlike Tara whose tannins come from its pods. Tannin production does not destroy the trees and production has to be more sustainable (Mancero, 2009).

Tara gum is a white to yellowish-white powder consisting essentially of galactomannan type polysaccharides. This is used as a thickener and stabilizer in various food applications (Coppen, 1995). Since 1995, Tara gum has been recognized internationally as an additive (E417) for the production of ice cream, gelatin, sauces, yogurt, bakery products, and meat products. Its cost is higher than starch or gelatin, but much less is needed, and Tara gum does not affect taste or color as other gums that come from exudates of forest species (Michiels, 2013; Barriga, 2017). Thus, Tara gum has entered the hydrocolloids world market as an alternative gum product to Caroubier (*Ceratonia siliqua*), produced in Spain and the Middle East (De la Cruz Lapa, 2004), although its main competitor in price and use is Guar gum (*Cyamopsis tetragonoloba*) (Barriga, 2017).

The strong demand for Tara and its derivatives is growing steadily: if in 2003 it reached 42300 tons, in 2008 it reached 49000 tons (Flores et al., 2005). This leads to a rise in prices, so in 90's the price of the Tara increased to US \$ 1050 /t from what was previously at US \$ 350 / t. In 2002, the price still rose and remained above US \$ 1100/t. Currently, the national production of 38000 t of Tara in the pod is 75% of which comes from natural forests and 25% from plantations (Barriga, 2017). The current average price of Tara's powder is US \$ 1450 /t and Tara gum, with an average price of US \$ 3400 /t (Barriga, 2017).

From 2015 to 2016, exports grew by 11%. The main importers were Argentina, Switzerland, and the United States (Table 1). Tara gum exports increased by 114% over the previous year to 2800 tonnes, generating \$ 8.9 million in revenue

for Peru. In 2016, it was possible to export US \$ 51 million dollars (Barriga, 2017).

**Table 1. Major importing countries of flour of pods of Tara from Peru to 2015 (expressed in kilograms and dollars) (According to Peru Forestales en Numeros, 2015)**

Country	Quantity (Kg)	US\$FOB
Argentina	1056,500	1179,820
Switzerland	1007,270	442,706
United States	1070,201	1153,252
Belgium	736,1	844,836
Italy	735,075	828,005
Brasil	475,5	559,56
Germany	363,625	422,292
Uruguay	350	379,26
France	278	336,4
Austria	161,837	191,74
Mexico	54	57,9

The reference price in FOB dollars of 1 kg of Tara sheath powder is 1.48 (Koo, 2017) and Tara seed gum powder of 3.44 (Barriga, 2017).

To meet this demand, Peru has 6 000 ha of Tara surface(ATFFS-SERFOR, 2014) cited in Agronoticias (2016),of which 22% are new plantings.The main producing departments are Huánuco (24% of production), La Libertad (18% of production), Ayacucho (17.5%) and Cajamarca (14% of production). The other departments constitute 26% of domestic production (ATFFS-SERFOR, 2014) cited inAgronoticias (2016).In Cajamarca, in some years, the harvest per tree has progressed approximately 45%.Revenues for workdays of more than 6000 producers in the region have risen from 0.85 dollar per day to \$ 3.15 per day(Michiels, 2013). Tara plays a major part in generating revenue.

However, much of the international demand remains unsatisfied and thereiscurrently a strong interest to increase productionbycreating new plantations of Tara (Aleman, 2009).

Besides its two main uses, Tara seed is also a source of edible due to its content in oleic and linoleic oil (in butter, margarine and liquid oil), protein flours, soaps, paints, varnishes, enamels dyes, etc.

Gallic acid, extracted from Tara, can be used as an antioxidant and as bleaching agent in the industrial production of oil or beer.In medicine, gallic acid is an active molecule in drugs to treat gastric ulcers but also as healing, anti-inflammatory, antiseptic, antibacterial, anti-ascorbic and anti-dysentericagent (Lewis et al., 2005; Mancero, 2009).

Tara wood is used for rural constructions, in the making of tool handles, or as firewood due to its high density that gives it the heat property (calorific value = 7000 cal/Kg)(Padilla, 1995, Lojan, 1992) cited by Flores et al. (2005). Within the urban landscape, Tara represents an ornamental tree, for the beauty of its flowers (Villanueva, 2007).

## **2.4. Cultivation of Tara**

In natural forests of Tara, forestry does not really exist. The harvest of its fruits resembles more to a process of handmade harvesting, although there are efforts to carry out a forest management plan. At the moment, most of the production comes from these forests and 25% from managed plantations.

### **2.4.1. Management of Natural Forests**

Generally speaking the natural forests of Tara are completely neglected: full of weeds, shrubs and trees, all of them in abundant density competing for nutrients, water and light. Cleaning should start by removing weeds, shrubs and trees from the root, thus allowing a greater proportion of light. A thinning should also be practiced, which consists of the final elimination of weaker or too close plants, ensuring adequate spacing between the best plants. Then, the pruning is done, which is the cutting of branches to obtain a better production of the plant. It is recommended to do it before the beginning of the rainy season and depending on the state of each plant. Subsequently, the parasite and host plants (achupallas, tuyos, salvajina, lichens) that are in the branches of the crown of the tree or in its stem should be eliminated. It is necessary to control pests and diseases correctly, followed by preparation of the soil to reduce erosion and finally a suitable manuring (Ermis Vigo & Quiroz, 2006). It has been reported that in the case of wild plants grouped in small areas or isolated, their production reaches up to 10 kg/plant that could increase with proper irrigation and fertilization (De la Cruz Lapa, 2004).

### **2.4.2. Management of Tara Plantations**

For the establishment of plantations, it is necessary to take into account several aspects such as: the place of planting, density, preparation of the ground, installation of seedlings and replanting. Plantations must be made at the beginning of the rainy season, in the case of planting in semiarid areas, it is necessary to take provisions to improve water infiltration into the soil (De la Cruz Lapa, 2004).

The management of Tara plantations consists of pruning when it reaches a height of 70 cm that consists of a cut to stimulate the production of pods. The irrigation of the plantation should be carried out with a frequency of at least 3 to 4 times per month. It is recommended to fertilize the soils after a year of planting just before the start of the first rains.

The type of management in agroforestry systems consists of pruning in the first years, avoiding the laying of the stem, controlling pests and/or diseases. The recommended spacing is 4 x 5 m, which can be found between 500 and 600 plants per hectare (De la Cruz Lapa, 2004).

### **2.4.3. Performance**

Tara in Peru has a great variability of production, because there are trees that produce 5 kg and others that produce 40 kg. Those that are isolated, very large and with a good availability in water can produce 120 kg/year. However, tannin content and the amount of gums also vary among plants (Barriga, 2008). The yield per tree of Tara is on average 20 kg to 40 kg of pods, with two harvests per year (De la Cruz Lapa, 2004). Pods are harvested when they become ripe and dry the moment they turn red. They are then dried in the sun before being processed. In general, the first harvest of Tara within managed plantations is performed from the third year, in the natural state it is performed at the fourth year. Although the first harvest can be given in the second year, this is minimal (Barriga, 2017). Their average life span is 100 years (De la Cruz Lapa, 2004), a productive tree is estimated to 35 years (Aleman, 2009).

The yield at the industrial level, for every 100 kg of harvested Tara pods, is between 60 and 64% of Tara powder, between 34 and 38% of seeds and 2% of residues (Sanchez, 2007) cited by Mancero (2009).

### **2.4.4. Concentration of Tannins in Tara**

Narváez et al. (2009), after evaluating a population of Tara in Ecuador, concluded that the production of tannins is a genetically determined factor and therefore independent of the interaction with the environment. However, in Peru, it has been possible to differentiate various ecotypes producing pods of different qualities. The pod contains up to 2.8% of proteins, 73% of carbohydrates, 60 to 70% of tannins, while the seeds contain 19% protein, 67% carbohydrates, 4% tannin and energetic values of the pod and Tara are of 318-400 kcal/100 g, respectively (Aleman, 2009). Thus, on less acidic soils Tara has a higher concentration of tannins (Mancero, 2009). It has been found that, within the natural distribution, the best tannin quality is obtained from Ayacucho, where the soils are alkaline. With an annual rainfall of 600-650 mm, the amount of tannin is 60% to 62%, while in Cajamarca, with slightly acid soils and higher precipitation (900 to 1100 mm) the amount of tannin varies from 48% to 52%. For the hills of southern Peru (Ilo-Lomas de Tacahuay) tannins on the order of 48% (Barriga, 2008) were obtained.

From the industrial point of view, Tara powder gives between 45 and 50% of tannin extract, and from seeds it is obtained about 24% of Tara gum (Sanchez, 2007) cited by Mancero (2009). Desirable and selectable features that improve Tara, are the high amount of high tannins and an intense production of pods (Narváez et al., 2009). The improvement should focus on the higher production of fruits with greater production of gums and tannins.

### **Conclusion**

Although the knowledge gained on Tara shows that this tree species is of great ecological and economic importance, there are still many gaps that need to be filled in order to define cultural practices capable of ensuring productivity and stability of Tara plantations. In particular, it will be necessary to implement agro-



ecological practices in order to limit inputs of chemical inputs into Tara plantations. The microbial resources of the soil can ensure the mineral nutrition of the Tara (eg mycorrhizal fungi) but knowledge about the mycorrhizal status of the Tara in its natural area is practically non-existent. Hence research must be undertaken in order to control certain natural components of the ecosystem likely to affect the development of Tara.

### ***Acknowledgments***

I would like to thank Vivien Bonnesoeur and Cesar Barriga, for their valuable contributions and comments in this bibliographical synthesis. I would like also to thanks Doris Zuñiga for having welcomed me in her laboratory.

### ***References***

- Agronoticias (2016). TARA.pdf. N°. 423. 16-20 pp. Lima.
- Aleman, F. (2009). La Tara *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntze, especie prodigiosa para los sistemas agroforestales en valles interandinos. Acta Nova. 1er Congreso Nacional de Sistemas Agroforestales. Vol. 4, N° 2-3 *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntze, prodigious species for agroforestry systems in inter-Andean valleys. New Act. 1st National Congress of Agroforestry Systems. Vol. 4, No. 2-3.
- Alvarez, C.A. and de Ugaz, O.L. (1992). *Taninos*. *Rev Quím* 6:47–63. Universidad Pontificia Católica del Perú.
- Balaguer, L., Arroyo-García, R., Jiménez, P. and Jiménez, M. D. (2011). Villegas L., Cordero I., Rubio de Casas R., Fernández-Delgado R., Ron M. E., Manrique E., Vargas P., Cano E, Pueyo J., Aronson J. Forest restoration in a fog oasis: evidence indicates need for cultural awareness in constructing the reference. *PloS One* 6:e23004. doi: 10.1371/journal.pone.0023004.
- Barriga, C. (2008). Cultivos y aprovechamiento de la Tara *Caesalpinia spinosa* en la región andina (documento de trabajo). ECOBONA. Lima. Lima Cultivation and use of *Caesalpinia spinosa* in the Andean region (working document). ECOBONA. Lima.
- Brako, L. and Zarucchi, J.L. (1993). Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. *Syst Bot Mo Bot Gard* 45:1–1286.
- Cano, A.C., Roque, J., Arakaki, M., Arana, C., La Torre, M., Llerena, N. and Refulio, N. (1999). Diversidad florística de las Lomas de Lachay (Lima) durante el evento “El Niño 1997-98.” *Rev Perú Biol* 6:125–132 Floristic diversity of Lomas de Lachay (Lima) during the event “El Niño 1997-98.” *Rev Peru Biol* 6: 125-132.
- Chuquiruna, D. and Germán, P. (2010). Forestación piloto con la Tara en la microcuenca de San Juan (Alto Jequetepeque) Cajamarca. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Industrial. Universidad Nacional Mayor de San

- Marcos. Lima Forestation pilot with the Tara in the San Juan micro watershed (Alto Jequetepeque) Cajamarca. Thesis to choose the professional title of Industrial Engineer. National University of San Marcos. Lima.
- Coppen, J.J.W. (1995). Non-wood forest products. Gums, resins and latexes of plant origin. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. ISBN 92-5-103757-4. Rome.
- De la Cruz Lapa, P. (2004). Aprovechamiento integral y racional de la Tara *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. *Rev Inst Investig Fac Ing Geológica Minera Met Geográfica*, 7: 64-73. Comprehensive and rational use of the *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. *Rev Inst Investig Fac Geological Met Geographical Met*, 7: 64-73.
- Duke, J.A. (1981). *Caesalpinia spinosa*. In: Handbook of Legumes of World Economic Importance, Plenum Press. New York.
- Ermis, V. and Quiroz, V. (2006). Manual El cultivo de Tara en Cajamarca. Programa Desarrollo Rural Sostenible de la Cooperación Técnica Alemana - GTZ, en colaboración con la Asociación Civil Tierra. Cajamarca. Perú. The cultivation manual of Tara in Cajamarca. Sustainable Rural Development Program of the German Technical Cooperation - GTZ, in collaboration with the Earth Civil Association. Cajamarca. Peru.
- Flores, F., Chávarry, L. and Vega, D. (2005). Criterios y pautas para la selección de arboles plus. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “Tara” o taya.” Criteria and guidelines for the selection of trees plus. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “Tara” the taya.”
- FOSEFOR-INTERCOOPERATION-SAMIRI. (2006). La Tara en el Ecuador. *Caesalpinia spinosa*. Cartilla técnica. Universidad Técnica del Norte, ESPOCH, Fundación Arco Iris. Ecuador. The Tara in Ecuador. *Caesalpinia spinosa*. Technical card. Universidad Técnica del Norte, ESPOCH, Fundación Arco Iris. Ecuador.
- JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 30<sup>th</sup> report. (1986).
- Jørgensen, P.M. and León-Yáñez, S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Syst Bot Mo Bot Gard* 75:1–1182.
- Koo, W. (2017). Tara en Polvo archivos. In: Agrodataperu. <https://www.agrodataperu.com/category/exportaciones/tara-en-polvo-exportacion>. Accessed 23 May 2017.
- Larrea, M. (2011). La Tara, guarango o taya (*Caesalpinia spinosa*) en la Región Andina: criterios ambientales para la sustentabilidad de su aprovechamiento y manejo en Bolivia, Ecuador y Perú. ECOBONA, Serie de Capacitación No. 5. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPER, Quito, Peru. Tara, guarango or taya (*Caesalpinia spinosa*) in the Andean Region: environmental criteria for the sustainability of their use and management in Bolivia, Ecuador and Peru. ECOBONA, Training Series No. 5. ECOBONA-INTERCOOPER Regional Program, Quito, Peru.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. and Lock, M. (2005). Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew. ISBN 1900347806 - 9781900347808. UK. Bath Press.
- Macbride, J.F. (1943). Leguminosae, Flora of Peru. *Field Mus Nat Hist Bot* 13(3/1): 1-506.



- Mancero, L. (2009). La Tara (*Caesalpinia spinosa*) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la Región. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPERATION, Quito. Quito, febrero 2009. La Tara (*Caesalpinia spinosa*) in Peru, Bolivia and Ecuador: Analysis of the Productive Chain in the Region. ECOBONA-INTERCOOPERATION Regional Program, Quito. Quito, February 2009.
- Marien J. N. and Delaunay, G. (2010). La Tara, *Caesalpinia spinosa*: espèce agroforestière emblématique des vallées interandines au Pérou. *Bois for Trop*, 2: 8-12.
- Melo, M., Glorio, P. and Tarazona, G. (2013). Revista de la Sociedad Química del Perú - Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Rev. Soc. Quím. Perú* vol.79 no.3 Lima jul./set. 2013. Journal of the Chemical Society of Peru - Effect of maturity on the components of commercial value (tannins and gum) of Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Rev. Soc. Peru* vol.79 no.3 Lima jul./set. 2013.
- Michiels, C. (2013). Tara, un petit arbre porteur de grandes promesses. Un produit équitable pour l'industrie? Bruxelles. [www.issuu.com/tradefordevelopmentcentre/docs/tara\\_petitarbregrandespromesses](http://www.issuu.com/tradefordevelopmentcentre/docs/tara_petitarbregrandespromesses).
- Moutarde, F. (2008). Les lomas péruviennes et chiliennes. Fiche 39.197 199 pp. Chapitre Freiner l'évaporation et retenir les brouillards. *Agricultures singulières*. IRD éditions. Paris.
- Narváez, A, Calvo, A, Troya, A.M. (2009). Las poblaciones naturales de la Tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Ecuador: una aproximación al conocimiento de la diversidad genética y el contenido de taninos por medio de estudios moleculares y bioquímicos. Serie Investigación y Sistematización N°. 7. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPERATION 23. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Escuela de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE. Quito. The natural populations of Tara (*Caesalpinia spinosa*) in Ecuador: an approach to the knowledge of genetic diversity and tannin content through molecular and biochemical studies. Research and Systematization Series N°. 7. ECOBONA-INTERCOOPERATION Regional Program 23. Plant Biotechnology Laboratory. School of Biological Sciences Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE. Quito.
- Nieto, C. and Barona, N. (2007). El guarango. Una opción agroindustrial y de exportación para conservación productiva. Fundación Desde El Surco Quito Ecuador 1–20. The guarango. An agroindustrial and export option for productive conservation. Foundation from El Surco Quito Ecuador 1-20.
- Novoa, S. and Ramírez, K. (2007). Evaluación del estado de conservación de la Tara *Caesalpinia Spinosa* en el departamento de Ayacucho.
- Pastor, A. A. (1977). Extracción por solventes, caracterización y refinación del aceite de semilla de Tara (*Caesalpinia tinctoria*). Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú. Solvent extraction, characterization and refining of Tara (*Caesalpinia tinctoria*) seed oil. Thesis. National Agricultural University La Molina. Lima. Peru.
- Peñarrieta, J. and Aleman, F. (2009). Manejo silvicultural de la Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, en los valles interandinos de Cochabamba, Potosí y

- Chuquisaca. Cochabamba, Bolivia. Silvicultural management of Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, in the interandean valleys of Cochabamba, Potosí and Chuquisaca. Cochabamba, Bolivia.
- Perú Forestal en Números 2015 (2016). Anuario Forestal 2015. SERFOR Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre. 1ra edición. Lima. Forestry Yearbook 2015. SERFOR National Forest and Wildlife Service. 1st edition. Lima.
- Polo, F.D. (2016). Insectos y Acaros perjudiciales de una plantación de Tara (*Caesalpinia spinosa*) durante la primavera en Lurín. Tesis para optar título de Ingeniero Forestal. Universidad Nacional Agraria La Molina. Insects and harmful mites of a Tara plantation (*Caesalpinia spinosa*) during spring in Lurín. Thesis. National University Agraria La Molina.
- Reynel, C., Pennington, T.D., Pennington, R.T., Marcelo, J.L. and Daza A. (2007). Árboles útiles del Ande peruano: una guía de identificación, ecología y propagación de las especies de la sierra y los bosques montanos en el Perú. Useful trees of the Peruvian Ande: a guide of identification, ecology and propagation of the species of the mountain range and the mountain forests in Peru.
- Roskov, Y., Zarucchi, J., Novoselova, M. and Bisby F.(†) (eds.). (2017). ILDIS World Database of Legumes (version 12, May 2014). In: Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2017). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 30th April 2017. Digital resource at <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/eb41e5d0a6d9273819e07df482a6726f>. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.
- Sánchez, G. and Vergara, C. (2003). Plagas de hortalizas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Pests of vegetables. National University Agraria La Molina.
- Ulibarri, E.A. (1996). Sinopsis de *Caesalpinia* y *Hoffmannseggia* (*Leguminosae* - *Caesalpinioideae*) de Sudamérica. Darwiniana. Synopsis of *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (*Leguminosae* - *Caesalpinioideae*) from South America. Darwinian.
- Villanueva, C. (2007). La Tara El Oro Verde de los Incas, 1º Edición. AGRUM. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. The Tara The Green Gold of the Incas, 1st Edition. AGRUM. National University Agraria La Molina, Lima.