

TABLE DES MATIERES

GLOSSAIRE	i
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES PHOTOS.....	viii
LISTE DES ANNEXES	ix
CADRE DE L'ETUDE.....	x

INTRODUCTION GENERALE	1
------------------------------------	----------

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
---------------------------------------	----------

I. Les invasions biologiques : <<Un danger pour la biodiversité>>	4
I.1 Généralités	4
I.2 Processus des invasions	4
I.3 Le succès de l'invasion des espèces végétales.....	7
I.4 Conséquences des invasions biologiques sur les écosystèmes envahis	11
II. Les interactions Plantes-microorganismes rhizosphériques du sol.....	12
II.1 La rhizosphère	12
II.2 Interactions bénéfiques entre plantes et microorganismes rhizosphériques	13
II.3 Interactions délétères entre plantes et microorganismes rhizosphériques	20
II.4 Importance des microorganismes sélectionnés dans la réhabilitation des zones perturbées ...	22
III. Implication des racines protéoïdes sur le développement des plantes	23
III.1 Historique des racines protéoïdes de la plante	23
III.2 Morphologie et fonctionnement des racines protéoïdes	23

CHAPITRE I : Caractérisation des parcelles colonisées par *Grevillea banksii* dans la partie Est de Madagascar

I. INTRODUCTION	26
II. MATERIELS ET METHODES.....	27
II.1 Site d'étude	27
II.2 Inventaire floristique et prélèvement de sols et de racines	29
II.3 Statut mycorhizien des espèces de plante de trois parcelles	31
II.4 Analyses des échantillons de sol sous l'influence ou non de <i>G. banksii</i>	31
II.5 Traitement statistique des données	38
III. RESULTATS	38
III.1 Composition floristique des différentes parcelles	38
III.2 Physionomie des différentes formations végétales étudiées	40
III.3 Statut symbiotique des plantes dans les parcelles d'étude	40
III.4 Propriétés chimique et microbiologique du sol de chaque parcelle	42
III.5 Résultats de l'analyse moléculaire (PCR-DGGE).....	46

IV. DISCUSSION.....	48
V. CONCLUSION	52

CHAPITRE II : Caractère invasif de *Grevillea banksii* dans la zone Est de Madagascar

I. INTRODUCTION.....	53
II. MATERIELS ET METHODES.....	54
II.1 Matériel végétal : <i>G. banksii</i>	54
II.2 Expérience 1 : Mise en évidence des effets de l'installation de <i>G. banksii</i>	55
II.3 Expérience 2 : Etude de la formation et du développement des racines protéoïdes chez <i>G. banksii</i>	57
II.4 Expérience 3 : Effets des extraits de feuille et de racine de <i>G. banksii</i> sur les communautés microbiennes du sol.....	58
III. RESULTATS.....	60
III.1 Développement de <i>G. banksii</i> et nombre de racines protéoïdes sur les 2 types de sol.....	60
III.2 Intensité mycorhizogène du sol après installation de <i>G. banksii</i>	62
III.3 Structure et fonctionnement de la communauté microbienne du sol après installation de <i>G. banksii</i> sur le sol forestier et le sol sous pseudo-steppe	62
III.4 Formation et développement des racines protéoïdes chez <i>G. banksii</i> en condition contrôlée	67
III.5 Effets des extraits de racine et de feuille de <i>G. banksii</i> sur le dynamisme des microorganismes bénéfiques pour la plante	69
IV. DISCUSSION.....	71
IV.1 Amélioration du développement de <i>G. banksii</i> : implication des racines protéoïdes	72
IV.2 Dynamisme des microorganismes du sol après installation de <i>G. banksii</i>	74
IV.3 Effets allélopathiques des extraits de <i>G. banksii</i> sur les microorganismes symbiotiques.....	76
V. CONCLUSION	77

CHAPITRE III : Développement et association symbiotique de *Dalbergia trichocarpa* et *Intsia bijuga* sur le sol envahi par *G. banksii*

I. INTRODUCTION.....	78
II. MATERIELS ET METHODES.....	79
II.1 Matériels végétaux.....	79
II.2 Pré-germination des graines	79
II.3 Dispositif expérimental.....	80
II.4 Evaluation des effets de l'installation de <i>G. banksii</i> sur le développement de <i>I. bijuga</i> et <i>D. trichocarpa</i>	80
III RESULTATS.....	87
III.1 Développement de <i>I. bijuga</i> et de <i>D. trichocarpa</i> sur les 3 types de sol.....	87
III.2 Nodosités chez <i>D. trichocarpa</i> sur les trois types de sol.....	88
III.3 Caractères morphologiques des ectomycorhizes chez <i>I. bijuga</i> sur les trois types de sol.....	89
III.4 Diversité génétique des ectomycorhizes de plants de <i>I. bijuga</i>	90

III.5 Identité des BNL chez <i>D. trichocarpa</i> cultivé sur le sol sous <i>G. banksii</i>	92
III.6 Activités enzymatiques et nombre de microorganisme dans les sols de culture de <i>I. bijuga</i> et <i>D. trichocarpa</i>	93
IV. DISCUSSION	94
IV.1 Evolution du développement de <i>I. bijuga</i> et <i>Intsia bijuga</i> sur le sol envahi par <i>G. banksii</i> ...	94
IV.2 Fonctionnement de l'association symbiotique chez <i>I. bijuga</i> et <i>D. trichocarpa</i> cultivés sur le sol envahi par <i>G. banksii</i>	95
V. CONCLUSION	97

CHAPITRE IV : Mycorhization contrôlée de *Intsia bijuga* et de *Dalbergia trichocarpa* sur le sol envahi par *Grevillea banksii*

I. INTRODUCTION	98
II. MATERIELS ET METHODES	99
II.1 Les partenaires symbiotiques.....	99
II.2 Préparation des inocula.....	100
II.3 Inoculation en serre des plants de <i>I. bijuga</i> et <i>D. trichocarpa</i>	101
II.4 Evaluation des effets de l'inoculation.....	102
III. RESULTATS	104
III.1 Impacts de l'inoculation de <i>D. trichocarpa</i> sur les sols envahis par <i>G. banksii</i>	104
III.2 Impacts de l'inoculation de <i>I. bijuga</i> sur le sol pré-colonisé par <i>G. banksii</i>	112
IV. DISCUSSION	115
IV.2 Importance de l'inoculation ectomycorhizienne sur la croissance de <i>I. bijuga</i> au niveau du sol envahi par <i>G. banksii</i>	117
IV.3 Impacts de l'inoculation de <i>I. bijuga</i> et <i>D. trichocarpa</i> sur les activités enzymatiques des microorganismes du sol envahi par <i>G. banksii</i>	118
V. CONCLUSION	119
CONCLUSION GENERALE	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125
ANNEXES	
RESUME	
ABSTRACT	

GLOSSAIRE

Espèce exotique (espèce allochtone) : une espèce non indigène se trouvant dans un milieu qui n'est pas son aire de propagation naturelle et qui y a été introduite par suite directe ou indirecte de l'activité humaine.

Espèce exotique envahissante (anglicisme : Espèce invasive) : une espèce introduite, volontairement ou non, qui se répand d'une manière très agressive en induisant des changements significatifs de comportement, de structure ou de fonctionnement des écosystèmes au sein duquel elle se propage (Cronk et Fuller 1996 ; Muller 2000 et 2004).

Espèce native (indigène) ou espèce autochtone : une espèce présente naturellement dans son territoire

Biotique : ensemble des facteurs biologiques liés à l'activité des êtres vivants et agissant sur la distribution des espèces animales et végétales d'un biotope donné.

Abiotique : ensemble des facteurs physico-chimiques et pédoclimatiques d'un écosystème influençant sur une biocénose donnée.

Biomasse : ensemble de la matière organique, qu'elle soit d'origine végétale, animale ou microbienne

Carpophore : organe de reproduction de certains champignons. Synonym : Fructification

Communauté : groupe de populations de différentes espèces, interconnectées ou susceptibles de l'être, à un moment ou à un autre, et coexistant dans une aire donnée. Synonyme : Peuplement.

Cycle biogéochimique : processus de transport et de transformation cyclique d'un élément ou composé chimique entre les grands réservoirs que sont la géosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère, dans lesquels se retrouve la biosphère.

Ecosystème : ensemble formé par une association ou communauté d'êtres vivants (ou biocénose) et son environnement géologique, pédologique et atmosphérique (le biotope)

Hyphes : filament tubulaire (ramifié ou non) constituant le thalle filamenteux des champignons

Morphotype de mycorhize : morphologie typique du mycorhize

Mutualisme : désigne un constat physiologique : deux organismes, symbiotiques ou séparés dans l'espace, établissent des relations réciproquement profitables (Brundrett, 2004).

Mycélium : masse de filaments filiformes (hyphes), ramifiés ou réticulés, formant la structure végétative des champignons et se distinguant de la fructification. Pluriel : mycelia.

Mycorhize : relation symbiotique entre un champignon et une plante autotrophe

Population : groupe de génets interféconds qui partagent un ensemble de gènes (= de même espèce biologique).

Propagule : organe de dissémination et de reproduction (non sexuelle) d'un être vivant animal, végétal, bactérien ou fongique.

Régénération : faculté d'une entité vivante (cellule, organe, organisme, écosystème.) à se reconstituer après destruction d'une partie de cette entité.

Spore : organe de conservation ou de propagation des champignons issu de la multiplication asexuée (conidie) ou sexuée (ascospore, basidiospore).

Symbiose : désigne un constat morpho-anatomique : deux organismes vivant (*biosis*) ensemble (*sun*), établissant selon les cas une relation neutre (neutralisme), défavorable (parasitisme) pour l'un ou bénéfique (mutualisme) pour les deux partenaires (Brundrett, 2004). Synonyme : Association.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	ADN ribosomal (Nucléaire ou mitochondrial)
ANOVA	Analysis of Variance
ARN	Acide RiboNucléique
BNL	Bactéries Nodulant les Légumineuses
BSA	Bovine Serum Albumin
CNRE	Centre National de Recherches sur l'Environnement
Cs	Coefficient de similarité
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (électrophorèse en gradient dénaturant)
dNTP	désoxyriboNucléotide Tri-Phosphate
DSF	Département Soutien et Formation
ECM	Ectomycorhize
EDTA	Ethyl Diamine Tétra-Acétate
EICA	Evolution of Increased Competitive Ability
ERH	Enemy Release Hypothesis
FDA	Fluorescéine Di-Acétate
FSP	Fonds de Solidarité Prioritaire
GI	<i>Glomus intraradices</i>
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
ITS	Internal Transcribed Spacer (espace transcrit intergénique)
MA	Mycorhize Arbusculaire
méq	Millier équivalent
MNM	Melin-Norkrans modifié par Marx
MPN	Most Probable Number
MVA	Mycorhize à Vésicules et à Arbuscules
NCBI	National Center of Biotechnology Information
OTU	Unité Taxonomique Opérationnelle
PARRUR	PARtenariat et Recherche dans le secteur RURal
pb	paire de base (unité de longueur de l'ADN)

PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
pH	potentiel d'Hydrogène
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PIM	Potentiel Infectieux Mycorrhizogène
Pis	<i>Pisolithus</i>
pNPP	para-NitroPhényl Phosphate
ppm	partie par million
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction)
rpm	rotation par minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
STM	Collection bactérienne du LSTM
TAE	Tampon tris-Acétate-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (Bactérie qui vit dans les sources chaudes)
Temed	Tétraméthyl éthylène diamine
TCP	Phosphate Tricalcique
TSA	Triptic Soy Agar
UICN	Union Internationale pour la Conservation de la Nature
v/v	volume par volume
YM	Yeast Mannitol
YMA	Yeast Mannitol Agar

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition réactionnelle d'une réaction PCR

Tableau 2 : Cycle de température de la réaction PCR

Tableau 3 : Composition d'un gel DGGE 8%

Tableau 4 : Composition floristique des parcelles d'étude

Tableau 5 : Fréquence des espèces ligneuses (Fréq.) et recouvrement (Rec.) des espèces herbacées dans les différentes formations végétales étudiées

Tableau 6 : Statut symbiotique des espèces d'arbres et arbustes dominantes dans les trois parcelles d'études.

Tableau 7 : Propriétés chimiques des sols de trois parcelles d'étude

Tableau 8 : Coefficient de similarité (Cs) des échantillons de sol

Tableau 9 : Diversité bactérienne dans les 3 parcelles (Fo, Go, Po)

Tableau 10 : Diversité bactérienne dans le sol rhizosphérique des racines protéoïdes de *G. banksii*

Tableau 11 : Résultats du test antifongique des extraits de racine et de feuille de *G. banksii*

Tableau 12 : Activité antibactérienne des extraits de racine et feuille de *G. banksii*

Tableau 13 : Variation du taux d'ectomycorhization de *I. bijuga* et taux d'endomycorhization de *D. trichocarpa* sur les trois types de sol

Tableau 14 : Diversité morphologique des ectomycorhizes de plants de *I. bijuga* sur les 3 types de sol

Tableau 15 : Regroupement des bandes de restriction de la région ITS en OTUs par les 3 enzymes (*HinfI*, *RsaI* et *AluI*)

Tableau 16 : Identité moléculaire de quatre BNL piégées avec *D. trichocarpa* dans le sol sous *G. banksii*

Tableau 17 : Activités enzymatiques (A) et nombre (B) de microorganismes dans les trois types de sol après culture de *I. bijuga* et *D. trichocarpa*

Tableau 18 : Composition réactionnelle pour l'amplification d'ADN de BNL

Tableau 19 : Cycle de température pour l'amplification d'ADN de BNL

Tableau 20 : Diversité de BNL issue de nodules de *D. trichocarpa* après simple ou double inoculation sur le sol SE5

Tableau 21 : Impacts de l'inoculation sur le développement de *I. bijuga* et sur l'activité des microorganismes sur le sol envahi par *G. banksii*

Tableau 22 : Caractères morphotypiques des ectomycorhizes chez *I. bijuga* après inoculation

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Processus d'invasion biologique
- Figure 2.** Schéma du dispositif d'échantillonnage d'inventaire floristique
- Figure 3.** Densité de microorganismes dans les 3 types de sol
- Figure 4.** Variation des activités enzymatiques de microorganismes dans les 3 types de sol
- Figure 5.** Intensité mycorhizogène du sol des trois parcelles d'étude
- Figure 6.** Types de spore observé dans chaque type du sol
- Figure 7.** Corrélation entre les 3 types de sol avec ses qualités chimiques et microbiologiques
- Figure 8.** Variation du développement de *G. banksii* sur les 2 types de sol
- Figure 9.** Nombre de racines protéoïdes par plantule et par type de sol
- Figure 10.** Influence de l'installation de *G. banksii* sur l'intensité mycorhizogène du sol après 4 mois de culture
- Figure 11.** Influence de l'installation de *G. banksii* sur quelques groupes de microorganismes telluriques après 4 mois de cultures
- Figure 12.** Variation de l'activité microbienne globale du sol après l'installation de *G. banksii*
- Figure 13.** Modification des activités phosphatasiques du sol après l'installation de *G. banksii*
- Figure 14.** Nombre de racines protéoïdes et développement de *G. banksii* sur le sol stérilisé ou non et inoculé ou non en condition contrôlée
- Figure 15.** Impacts des extraits de feuille et de racine de *G. banksii* sur la nodulation chez *D. trichocarpa* inoculé par la souche STM 609
- Figure 16.** Ensemencement par la technique des quatre cadrans
- Figure 17.** Evolution du développement de *I. bijuga* et *D. trichocarpa* sur les 3 types de sol
- Figure 18.** Variation du nombre de nodules par plantule de *D. trichocarpa* sur trois types de sol
- Figure 19.** Impacts de l'inoculation sur le développement de *D. trichocarpa* sur le sol SE1 (B) et le sol SE5 (A)
- Figure 20.** Impacts de l'inoculation sur le taux de mycorhization de *D. trichocarpa* sur le sol SE5 (A) et le sol SE1(B)
- Figure 21.** Impacts de l'inoculation sur le nombre de nodules de *D. trichocarpa* sur le sol SE5 (A) et le sol SE1 (B)

Figure 22. Impacts de l'inoculation de *D. trichocarpa* sur l'activité de phosphatase acide du sol sur le sol SE5 (A) et le sol SE1(B)

Figure 23. Impacts de l'inoculation de *D. trichocarpa* sur l'activité microbienne globale du sol sur le sol SE5 (A) et le sol SE1(B)

Figure 24. Relation entre les différents traitements inoculés et le développement de *D. trichocarpa* sur le sol SE1

Figure 25. Relation entre les différents traitements inoculés et le développement de *D. trichocarpa* sur le sol SE5

Figure 26. Relation entre les souches ectomycorhiziennes utilisées, le développement de *I. bijuga* et les activités des microorganismes du sol

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 Morphologie des racines protéoïdes en condition de faible concentration de phosphore

Photo 2 Les trois parcelles d'étude

Photo 3 Profil des bandes PCR (A) et DGGE (B) des 3 types de sol sur gel visualisé sous UV

Photo 4 Plantules de *G. banksii* sur 2 types du sol après 4 mois de culture sous serre

Photo 5 Système racinaire de *G. banksii*

Photo 6 Profil DGGE des bactéries des sols avant et après installation de *G. banksii*

Photo 7 Inhibition du développement de rhizobia par les extraits de feuilles (A) et de racines protéoïdes (B) de *G. banksii*

Photo 8 Profils RFLP des morphotypes des ectomycorhizes des plants de *I. bijuga* selon les trois enzymes de restriction (*HinfI*, *RsaI* et *AluI*)

Photo 9 Profil PCR des BNL isolés sur *D. trichocarpa* cultivé sur le sol sous *G. banksii*

Photo 10 Profil DGGE des sols après inoculation

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 Composition du milieu de culture

Annexe 2 Préparation de la solution tampon potassium phosphate

Annexe 3 Réactifs pour la coloration des racines

Annexe 4 Exemple de calcul des MPN

Annexe 5 Milieu de culture des plantes en tubes

Annexe 6 Extraction d'ADN rhizobium

Annexe 7 Articles et communications scientifiques

CADRE DE L'ETUDE

Cette étude a été initiée en 2011 dans le cadre du projet intitulé « Fonctionnement symbiotiques des écosystèmes forestiers à Madagascar » de la Jeune Equipe Associée à l'IRD (JEAI) << **MADASYM**>> ou MADAgascar SYMBiose, financé par DSF IRD.

Ce projet a été coordonné par Mr **RAMANANKIERANA Heriniaina** au sein du **CNRE**. J'étais parmi les doctorants de l'équipe et bénéficiait l'encadrement des chercheurs membres du projet (sur le terrain et au Laboratoire).

Le projet MADASYM a pris fin en 2012 où j'étais encore en première année de thèse. En effet, pour continuer les activités de recherches, en 2013 j'ai obtenu un autre financement d'une année : une allocation de recherche financée par la coopération française (**FSP-RARRUR**) destinée aux étudiants malgaches pour appuyer les travaux de terrain ou de laboratoire à Madagascar.

En outre, des outils biomoléculaires qui sont encore moins développés à Madagascar ont été nécessaires pour atteindre certains objectifs de cette étude, grâce à la coopération établie avec **Pr Damase KHASA**, des séjours au sein du laboratoire de l'Institut Biologique et Intégrative des Systèmes (**IBIS**) de l'université Laval Canada m'ont permis de faire des analyses biomoléculaires des bactéries du sol ainsi que les communautés mycorhiziennes et fixatrices d'azote (rhizobia). Ces séjours de 3mois par an pendant trois années (2011, 2012, 2013) ont été financés par l'Agence Universitaire de la Francophonie (**AUF**) à travers une allocation de mobilité.

Vers la fin de l'année 2013, la Fondation International pour la Science (**IFS**) a approuvé ma demande de bourse de recherche qui m'a permis de finaliser ce projet de thèse.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

A l'échelle planète terre, les invasions biologiques ne sont pas des faits nouveaux (Pascal *et al.*, 2006), mais elles étaient plus accélérées depuis la seconde moitié du XXe siècle (Williamson, 1996 ; Mack *et al.*, 2000 ; Mooney et Cleland, 2001) avec la mondialisation et le développement exponentiel des flux internationaux de personnes et des marchandises (Richardson et Pysek, 2008). Actuellement, l'invasion biologique est classée comme la deuxième cause d'extinction des espèces après la dégradation des habitats écologiques et la surexploitation des ressources (Elton, 1958 ; Lodge, 1993 ; Williamson, 1996 ; Wilcove *et al.*, 1998 ; Parker, 1999 ; Mooney et Hobbs, 2000 ; Sala *et al.*, 2000 ; Cronck *et al.*, 2001 ; Simberloff, 2003 ; Rejmanek, 2003 ; Meed, 2004). En effet, les espèces invasives arrivent jusqu'à influencer la répartition spatiale de la biodiversité (Brown et Gurevitch, 2004) et également à modifier la structure des communautés végétales surtout dans le contexte d'un écosystème insulaire (Gratton et Denno, 2005). Cependant, il est presque impossible d'estimer l'impact réel des espèces envahissantes qui pourrait être spécifique d'une espèce à l'autre et à chaque écosystème (Thiele *et al.*, 2010).

A notre époque, la problématique des espèces envahissantes est devenue l'une des thématiques en plein essor, non seulement dans le domaine des sciences biologiques mais aussi dans le domaine socio-économique. Ces dernières années, le nombre de publications sur la biologie des invasions a augmenté de manière exponentielle (Richardson et Pysek, 2008).

A Madagascar, l'introduction des espèces exotiques a commencé depuis la première arrivée de l'homme dans la Grande île, il y avait plus de 2000 ans où il apportait avec lui des plantes cultivées (Rakotoarisoa, 1997). Les colonisateurs français depuis leur arrivée en 1895 ont déjà fait leur reboisement, en utilisant des plantes exotiques, un des objectifs importants de la politique coloniale (François, 1926). Cette situation intensifiait l'introduction des plantes exotiques à Madagascar. Il est également à noter que le reboisement utilisant des espèces exotiques à croissance rapide, avait pour but au début, de limiter la dégradation du sol, d'améliorer sa productivité et de lutter contre l'exploitation abusive des essences natives (Tassin, 1995 ; Carrière et Randriambanona, 2007). Par conséquent, on a recensé plus de 900 espèces d'arbres introduites à Madagascar (Chauvet, 1969 ; Sutter et Rakotonoely, 1989). Pourtant, certaines de ces espèces deviennent invasives dont les plus dangereuses arrivent à menacer la conservation de la végétation particulièrement les espèces natives

(Richardson *et al.*, 2004 ; Jager *et al.*, 2007 ; Ens et French, 2008 ; Gerber *et al.*, 2008). Ainsi, le taux d'invasivité des espèces introduites atteint jusqu'à 8,9% à Madagascar (Kull *et al.*, 2012). Ces auteurs ont suspecté 101 espèces de plantes envahissantes alors que Tassin *et al.*, (2009), en se référant aux deux bases de données (*The Global Compendium of Weeds et Invasive Woody Plants-Word Species List*) couplées avec le nombre des arboretums, ont trouvé 21 espèces forestières présentant un risque élevé d'invasion à Madagascar.

Paradoxalement, peu d'études ont été consacrées aux impacts de cette invasion biologique sur les caractéristiques « natives » du milieu d'introduction à Madagascar. En particulier, l'influence de ces espèces invasives sur le fonctionnement de la microflore (symbiotique et libre) du sol et sur le développement des essences natives demeure très peu explorée. C'est le cas de *G. banksii* dans la partie Est de Madagascar qui figure parmi les espèces invasives à risque élevé alors qu'aucune étude concernant l'invasivité de cette espèce dans la zone d'introduction n'a encore été faite. Les données restent au niveau des observations sur le terrain par certains chercheurs (Binggeli, 2003 ; Edmond, obs. pers. dans Tassin *et al.*, 2009). La majorité des études sur *G. banksii* ont été orientées vers les diverses possibilités d'utilisation de cette espèce entre autres les activités d'embroussaillage des <<tanety>> des basses collines de l'Est de Madagascar, la jachère agricole et l'agroforesterie (Andrianirina, 1969 ; Rajoelison, 1987 ; Randrianatoandro, 2003). Récemment des études sur la propagation de *G. banksii* dans la partie Est de Madagascar (forêt de Vohibola) ont conclu que les activités anthropiques telles que le feu de brousse et le <<tavy>> sont les principaux catalyseurs de la propagation de l'espèce (Andriamiharimanana, 2011). Cet auteur en déduit que la propagation de *G. banksii* dans le temps va affecter les forêts naturelles.

Par ailleurs les mécanismes des interactions entre plantes exotiques envahissantes et plantes natives sont très compliqués. Des études ont suggéré que les plantes exotiques envahissantes affectent, dans plusieurs cas, les propriétés biotiques et abiotiques du sol (Kourtev *et al.*, 2002 ; Mack *et al.*, 2003) favorisant ainsi le processus d'invasion des plantes exotiques (Ehrenfeld *et al.*, 2001 ; 2003). Autrement dit, le changement des communautés microbiennes du sol induit par les espèces exotiques envahissantes affecte négativement la régénération des espèces natives (Yu *et al.*, 2005).

Ainsi, l'hypothèse dans laquelle ce travail de thèse s'est basée stipule que << L'évolution temporelle des peuplements de champignons mycorhiziens, des bactéries fixatrices d'azote et leurs microorganismes associés dans le sol est fortement affectée par la propagation de la

plante invasive, *G. banksii*. Celle-ci se traduit par des modifications dans la structure spécifique et fonctionnelle des communautés microbiennes qui ne pourront, à termes, assurer leur rôle au niveau du développement et de la conservation d'essences forestières mycotrophes indigènes ».

Pour cela, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- décrire les principales modifications induites par l'introduction et l'occupation de l'espèce invasive au niveau de la structure et du fonctionnement des communautés microbiennes symbiotiques du sol (champignons mycorhiziens, bactéries fixatrices d'azote) et leurs microorganismes associés et ses conséquences au niveau des caractéristiques physico-chimiques des sols,
- déterminer les facteurs pouvant favoriser l'envahissement de *G. banksii* (monospécificité des peuplements de *G. banksii*) sur le sol de la partie Est de Madagascar,
- évaluer l'impact de l'installation de la plante invasive, *G. banksii* sur le développement des essences natives de Madagascar,
- proposer des modes de gestion des ressources forestières susceptibles de remédier aux perturbations induites par les espèces de plantes invasives et ainsi promouvoir la conservation et la valorisation des essences forestières endémiques.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les invasions biologiques : <<Un danger pour la biodiversité>>

I.1 Généralités

L'invasion biologique, selon plusieurs auteurs, est un phénomène conduisant à une distribution d'une espèce qui constitue, hors de son aire de répartition naturelle, une ou des populations pérennes et autonomes dans les milieux investis (Pascal *et al.*, 2009 ; Barbault et Atramentowicz, 2010) grâce à l'activité humaine dans un habitat et/ou un territoire qui n'est pas le sien à l'origine. L'arrivée de l'espèce peut être accidentelle ou intentionnellement par l'homme (Carlton, 1987 ; Carlton et Geller, 1993 ; Ruiz *et al.*, 1997). En effet, la dominance d'une espèce introduite engendre un changement global (Vitousek *et al.*, 1996) et constitue dans ce contexte des conséquences éventuellement néfastes aux écosystèmes, généralement une modification du fonctionnement de l'écosystème envahi voire une restructuration à large échelle d'un paysage. Ainsi dans le langage courant, l'invasion biologique est qualifiée avoir une action d'envahir et de répandre dangereusement une espèce dans un milieu donné.

Actuellement, l'invasion biologique est classée par UICN comme la deuxième cause d'extinction des espèces après la dégradation des habitats et la surexploitation des ressources (Elton, 1958 ; Lodge, 1993 ; Williamson, 1996 ; Parker, 1999 ; Mooney et Hobbs, 2000 ; Sala *et al.*, 2000 ; Cronck *et al.*, 2001). Ainsi, elle est devenue un thème célèbre et plus étudié non seulement dans le domaine des sciences biologiques mais aussi dans le domaine socio-économique.

I.2 Processus des invasions

L'histoire de l'introduction des espèces exotiques est inséparable de l'évolution de la vie humaine. Depuis la découverte de nouvelles aires géographiques, l'homme apportait avec lui des espèces domestiques ou sauvages. De plus, une intensification de l'introduction des espèces exotiques a lieu face au développement de l'agriculture et de l'élevage depuis la Néolithique (Borrell, 2012). Depuis la fin du XVe Siècle, ère coloniale européenne et époque de développement des échanges commerciaux dans le monde, bon nombre d'espèces ont été introduites d'un pays à un autre. Ces échanges commerciaux ont été plus intenses

et multipliés par 17 entre les années 1965 et 1990, ils ont augmenté l'introduction des espèces exotiques dans plusieurs pays (Perrings *et al.*, 2005).

Cependant, ce ne sont pas toutes les espèces introduites capables de survivre dans un milieu d'introduction ou toute introduction d'espèce exotique qui conduiront à l'invasion. Ainsi Richardson *et al.*, (2000) ont décrit le processus d'invasion selon une séquence introduction-naturalisation-invasion (Figure 1). Dans cette séquence, le passage d'une étape à une autre nécessite chaque fois le franchissement d'une barrière naturelle et à chaque étape, le processus peut être mis en échec (Williamson et Fitter, 1996). Dans ce sens, Williamson (1996), par son concept des 3x10, a défini que seulement une pour mille des espèces de plantes exotiques introduites sont devenues invasives.

I.2.1 L'introduction d'espèce

L'introduction d'une nouvelle espèce implique l'apport soit de propagules, de graines ou d'individus en dehors de son aire de répartition géographique d'origine vers un nouvel écosystème, dû aux mouvements internationaux des biens et des personnes, de manière directe ou indirecte (Carlton, 1987 ; Carlton et Geller, 1993 ; Ruiz *et al.*, 1997). Pour le cas de l'introduction volontaire ou intentionnelle de nouvelles espèces, elle est motivée généralement par l'intérêt de l'humanité à satisfaire ou à enrichir ses diverses activités (agriculture, élevage, industrie pharmaceutique, ornementation etc...) (Kowarik, 1995 ; Pimentel *et al.*, 2005). Dans ce cas, l'homme est un facteur principal permettant d'aider l'espèce à affronter la **barrière géographique**. Tandis que pour l'introduction indirecte ou non intentionnelle, l'homme n'intervient directement au transport de l'espèce. Frésard (2011) a expliqué que le transport maritime véhicule involontairement un nombre considérable d'espèces exotiques dans tous les océans du globe.

I.2.2 Une espèce naturalisée

Une espèce naturalisée concerne évidemment des espèces allochtones capables de s'acclimater c'est-à-dire de résister vis-à-vis des conditions climatiques d'une région d'introduction, autrement dit ayant une capacité à affronter la barrière environnementale. Dans ce cas, l'espèce doit être capable de se régénérer dans son milieu d'introduction pour qu'elle puisse donner une nouvelle descendance et avoir une population viable à long terme sans l'aide de l'homme (Williamson et Fitter, 1996 ; Richardson *et al.*, 2000). Il s'agit d'affronter la **barrière reproductive**. On dit alors que l'espèce est naturalisée dans son nouvel

environnement mais n'envahit pas obligatoirement les écosystèmes naturels et semi-naturels. Selon Williamson (1996), 10 sur 1000 espèces de plantes introduites peuvent être naturalisées. Il faut bien noter aussi que l'évaluation d'une espèce allochtone avant de la considérer comme une espèce naturalisée demande un intervalle de temps assez long.

I.2.3 L'expansion de l'espèce et le début de l'invasion

Une fois l'espèce initiale est capable de donner une population viable, c'est grâce à sa capacité de puiser les ressources nécessaires à son développement, à se défendre contre les ennemis naturels ou inversement à créer des relations mutualistes avec d'autres espèces qui lui permettra de produire une descendance en grand nombre et parfois à une distance considérable des parents. Ainsi, l'espèce présente de ce fait un potentiel de dispersion considérable dans la région d'introduction et envahit la zone d'introduction. Il s'agit de l'affrontement de la **barrière de dispersion**. D'où la définition d'une espèce invasive comme étant une espèce dont son développement va nuire aux espèces et à la biodiversité locale. Plusieurs auteurs ont défini une espèce invasive par rapport aux impacts économiques et environnementaux (Davis et Thompson, 2001) qu'elle produise.

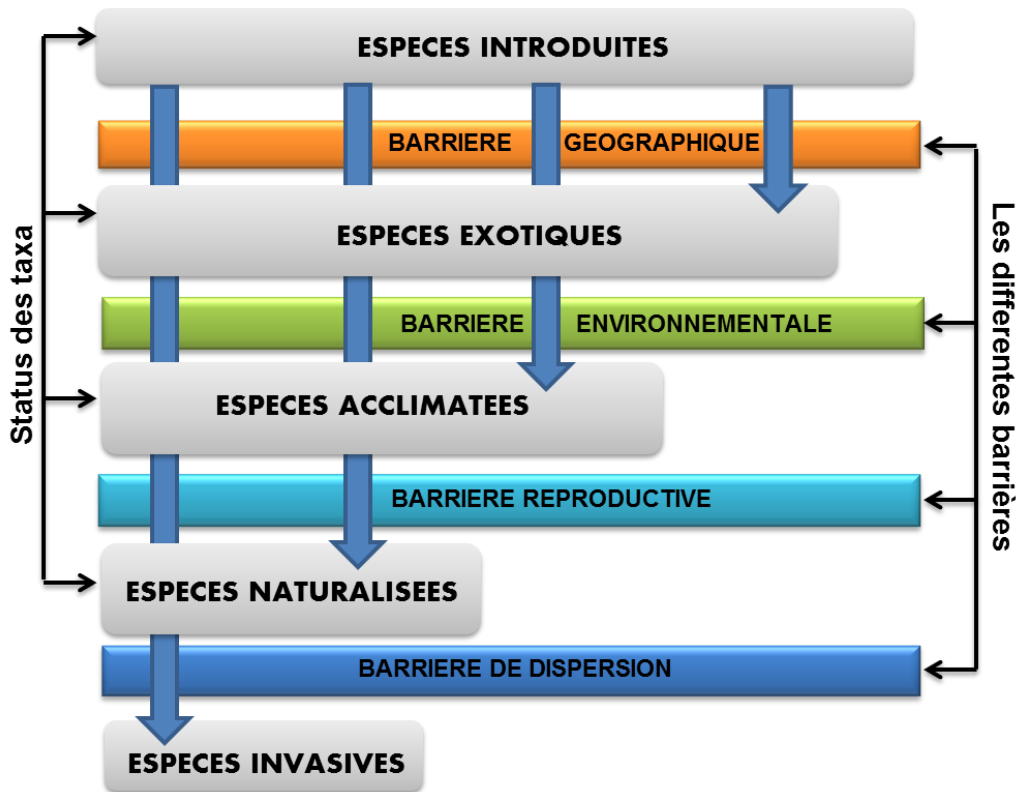


Figure 1. Processus d'invasion biologique (Richardson *et al.*, 2000)

I.3 Le succès de l'invasion des espèces végétales

Dans le cadre de cette étude, on a repris la définition des espèces végétales envahissantes formulée par Cronk et Fuller, en 1995 selon laquelle, il s'agit des espèces exotiques naturalisées qui en s'installant dans un territoire, modifient la composition, la structure et le fonctionnement des écosystèmes naturels ou semi-naturels dans lesquels elles se propagent d'une manière excessive. Richardson *et al.*, (2000) ont appelé ces espèces invasives, des plantes transformatrices.

Plusieurs facteurs peuvent favoriser le succès des invasions des espèces végétales dans un milieu d'introduction entre autres la **capacité invasive de l'espèce** (invasivité) qui est l'aptitude des espèces à l'invasion et la **sensibilité du milieu** (Vanderhoeven *et al.*, 2006) ou la vulnérabilité d'un écosystème aux invasions (invasibilité). Ces deux facteurs sont essentiels pour évaluer les possibilités d'invasion d'une espèce dans un milieu donné.

I.3.1 Invasivité d'une espèce

L'invasivité d'une espèce se réfère à son potentiel invasif, c'est à dire sa capacité à se montrer envahissante (à avoir des effets négatifs sur les espèces locales). Il est déjà décrit au paragraphe précédent que l'aptitude d'une espèce à affronter la barrière de dispersion amène l'espèce à envahir le milieu d'introduction. En effet, une espèce végétale est, par la suite, devenue potentiellement envahissante si et seulement si, elle a une large amplitude écologique, un potentiel de dispersion important, une croissance rapide, une fécondité élevée, une bonne résistance aux pathogènes et aux prédateurs (Mckinney et Lokwood, 1999 ; Vanderhoeven *et al.*, 2006). Toutefois, toutes les espèces n'ont pas la même capacité de devenir envahissante. Ainsi il est très difficile, voire impossible d'établir un profil type des espèces invasives car l'invasivité d'une espèce n'est pas universelle (Daehler, 2003 ; Meerts *et al.*, 2004). Une espèce de plante identifiée invasive dans un milieu donné ne l'est pas donc forcément dans d'autres. C'est le cas, par exemple, de *G. banksii* qui est potentiellement envahissante dans la partie Est de Madagascar (Binggeli, 2003) mais ne l'est pas dans la partie centrale de la grande Ile.

I.3.1.1 Les différentes théories d'invasion biologique

Plusieurs théories ont expliqué l'invasivité d'une espèce végétale dans un milieu d'introduction :

❖ La pression de propagule

Lokwood *et al.*, (2005) ont expliqué l'importance primordiale de la pression de propagule dans le processus d'une invasion biologique. Cette pression comprend le nombre d'individus introduits (spore, graines etc..) dans un nouvel écosystème (la taille de la population invasive) et le nombre d'introduction (la fréquence des événements d'introduction). En effet, cette pression pourra intervenir à la fois dans le mécanisme d'expansion géographique d'une espèce exotique (première étape de l'invasion) et dans l'implantation de l'espèce dans son nouvel écosystème (deuxième étape de l'invasion)

❖ L'hypothèse de la perte des ennemis naturels (ERH)

Cette hypothèse stipule qu'une plante est moins sensible à l'attaque par des ennemis naturels présents dans l'aire d'introduction que dans son aire d'indigénat (Keane et Crawley, 2002). Dans son aire de distribution d'origine, l'espèce exotique affronte la pression de prédation générée par des herbivores (spécifique à cette plante) ou des pathogènes pour qu'elle puisse vivre avec d'autres plantes, par contre l'absence de ces prédateurs dans son nouveau milieu favorise l'expansion de l'espèce exotique (développement sans contrainte) plus que celle des espèces natives.

❖ L'hypothèse de EICA

Elle consiste, qu'une fois libérées de leurs ennemis naturels dans leur région d'introduction, les plantes exotiques peuvent allouer plus de ressources à sa croissance et à sa reproduction (Blossey et Notzold, 1995 ; Bossdorf *et al.*, 2004). C'est le cas, par exemple, de *Prunus serotina*, qui a un développement favorisé en absence de *Pythium* sp. un champignon pathogène de *P. serotina* dans son milieu natif (Reinhart *et al.*, 2003).

❖ L'hypothèse des armes nouvelles (ou Novel weapons)

Callaway et Ridenour en 2004 ont développé une théorie complémentaire de l'EICA. Ces auteurs affirment que les plantes exotiques produisent des exsudats racinaires (substances toxiques) qui inhibent le développement de la plante native et défavorisent la croissance des microorganismes du sol du milieu envahi. L'effet allélopathique est un exemple concret pour cette dernière théorie. L'allélopathie se définit comme étant tout effet direct ou indirect, positif ou négatif d'une plante y compris les microorganismes sur les espèces avoisinantes par le biais de la libération des produits biochimiques (Rice, 1984). En effet la théorie EICA correspond en quelque sorte au cas d'allélopathie à effet négatif produite par les espèces exotiques. Plusieurs études ont suggéré que l'effet allélopathique contribue en particulier dans la capacité

d'une espèce exotique à envahir les communautés végétales dans son milieu d'introduction (Abdul Wahab et Rice, 1967 ; El-Ghareeb, 1991 ; Fletcher et Renney, 1963 ; Kanchan et Jayachandra, 1979 ; Osvald, 1948 ; Vaughn et Berhow, 1999 ; Ridenour et Callaway, 2001).

I.3.1.2 Symbiose racinaire et invasion des plantes exotiques

En plus des différentes théories mentionnées auparavant, la symbiose racinaire pourrait constituer un autre facteur favorisant l'installation des plantes exotiques dans son nouveau milieu.

➤ La symbiose mycorhizienne

Au cours de son installation, les plantes invasives mycotrophes peuvent probablement rencontrer des partenaires mutualistes (champignons mycorhiziens) dans le milieu d'introduction étant donné que ces derniers existent partout dans le monde (Richardson *et al.*, 2000) où ils s'associent souvent avec des plantes natives avant l'introduction. Chez certaines espèces de *Pinus*, son introduction dans un nouveau milieu est souvent limitée par l'absence d'ectomycorhizes compatibles (Brisco, 1959 ; Poynton, 1979). Il a été démontré également dans plusieurs cas que la présence de mycorhize natif de type éricoïde augmente l'invasivité chez plusieurs espèces de plantes (Wardle, 1991 ; Lazarides *et al.*, 1997). Des études ont montré que le mycorhize arbusculaire est un important médiateur de l'interaction compétitive entre plante invasive et plante native (Scheublin *et al.*, 2007). A titre d'exemple : les effets compétitifs de la plante invasive *Centaurea maculosa* sur une plante native *Festuca idahoensis* sont favorisés indirectement par la présence de mycorhize arbusculaire (Marler *et al.*, 1999 ; Zabinski *et al.*, 2002 ; Callaway *et al.*, 2004b ; Carey *et al.*, 2004). Cependant, Richardson (2000) a précisé que le mycorhize arbusculaire ne limite, ni facilite l'invasion. De même Klironomos en 2002 a montré que le mycorhize arbusculaire dans le sol d'Amérique du Nord a des effets bénéfiques pour cinq espèces natives contrairement pour cinq autres espèces invasives de cette région du monde. Pour le cas de *Anthemis cotula*, le champignon mycorhizien a favorisé l'établissement et l'invasion de l'espèce dans son milieu d'introduction (Shah *et al.*, 2008a,b) mais cette espèce est capable par la suite de changer la structure et la composition de la communauté de champignon arbusculaire du milieu d'introduction à son profit. Généralement, le rôle de champignon mycorhizien sur la facilitation de l'invasion d'espèces exotiques dépend de la plante hôte, l'identité des plantes voisines, la disponibilité des ressources et les conditions abiotiques du milieu (Hartnett *et al.*, 1994 ; Johnson *et al.*,

1997 ; Shah *et al.*, 2008a,b). De plus, la majorité des plantes invasives ne sont pas dépendante de la symbiose mycorhizienne avec laquelle elles s'associent souvent faiblement (Reeves *et al.*, 1979 ; Allen et Allen, 1980 ; Pendleton et Smith, 1983 ; Richardson *et al.*, 2000 ; Callaway *et al.*, 2004b).

➤ La symbiose fixatrice d'azote

L'invasivité de certaines espèces de plantes exotiques est souvent favorisée, grâce à leur capacité à former une symbiose mutualiste avec les bactéries fixatrices d'azote (*Rhizobium* sp.; *Frankia* sp.) présentes dans le milieu d'introduction (Allen et Allen, 1981 ; de Faria *et al.*, 1989 ; Clawson *et al.*, 1997 ; Ehnenfeld, 2003). Il se peut que les symbiotes arrivent déjà avec les plantes invasives et peuvent cohabiter avec le rhizobium natif (Weir *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2005). En effet, la présence des bactéries fixatrices d'azote dans un écosystème d'introduction permet aux plantes invasives nitrophiles d'améliorer sa capacité invasive dans ce milieu (Yelenik *et al.*, 2004). Le succès d'invasion de *Myrica faya* à Hawaï est favorisé, par exemple, par sa symbiose avec l'actinomycète *Frankia* fixatrice d'azote (Vitousek *et al.*, 1987 ; Burleigh et Dawson, 1994). Vitousek *et al.* (1987) ont montré également que l'invasion par *Myrica faya* a altéré le cycle de l'azote dans l'écosystème Hawaïen et contribue à l'altération des communautés des plantes natives.

I.3.2 Invasibilité d'un milieu

L'invasibilité d'un écosystème est définie comme la vulnérabilité d'un écosystème aux invasions biologiques (Meerts *et al.*, 2004 ; Thiebaut, 2007). En effet, l'invasivité élevée d'une espèce n'est pas suffisante pour prédire qu'elle est identifiée comme une espèce envahissante. Celle-ci dépend également de la vulnérabilité d'un écosystème étant donné que tous les écosystèmes ne montrent pas la même sensibilité aux invasions. Il existe des milieux plus vulnérables et des communautés végétales plus sensibles que d'autres (Chitry, 2008). Il a été déjà démontré que le succès d'une invasion biologique reste le résultat de l'interaction entre l'invasibilité du milieu et le potentiel invasif de l'espèce (Thebault, 2009).

Deux principaux facteurs peuvent généralement caractériser la vulnérabilité d'un écosystème aux invasions. Premièrement, la **perturbation d'un milieu** induit une ouverture du milieu dans laquelle la probabilité d'installation d'une nouvelle espèce est généralement plus élevée par rapport au milieu intact (non perturbé) (Burke et Grime, 1996 ; Meerts *et al.*, 2004 ; Vanderhoeven *et al.*, 2006). Dans ce cas, les milieux les plus sensibles sont en général des

milieux ayant subi des perturbations liées ou non à l'homme (Hodkinson et Thompson, 1997). Les bords de la route sont un exemple de micro-habitats les plus perturbés par l'homme où les espèces exotiques sont bien adaptées (Tyser et Worley, 1992). Deuxièmement, la **disponibilité des ressources** (Meerts *et al.*, 2004) notamment les éléments minéraux, connus généralement indispensables au développement des plantes, influencent particulièrement les interactions compétitives entre les espèces végétales. Le phénomène d'eutrophisation, par exemple, pourrait favoriser l'établissement d'une espèce végétale envahissante à fort potentiel de production (Alpert *et al.*, 2000). La théorie de la ressource fluctuante résume les deux facteurs indiqués ci-dessus (Burke et Grime, 1996), elle stipule qu'un écosystème est vulnérable aux invasions à partir d'un moment où les ressources restent inutilisées soit sous l'effet de diminution de la consommation des ressources (destruction d'une partie de la végétation consommatrice par une perturbation) soit d'un apport exogène des nutriments (eutrophisation) (Meerts *et al.*, 2004 ; Vanderhoeven *et al.*, 2006).

En outre, le changement climatique peut favoriser l'invasion d'une espèce exotique (Union of Concerned Scientists, 2001) soit en créant des conditions environnementales plus favorables aux invasions, soit en perturbant le développement des espèces natives qui rend ces espèces incapables de résister aux invasions.

I.4 Conséquences des invasions biologiques sur les écosystèmes envahis

Terminologiquement, une communauté correspond à des organismes taxonomiquement similaires (par exemple : des plantes, des animaux ou des micro-organismes) et un écosystème est constitué par l'ensemble formé par une communauté d'êtres vivants et son environnement biologique, géologique, édaphique, hydrologique, climatique, etc... (Tabacchi *et al.*, 2010). Ces différentes communautés peuvent interagir les unes avec les autres et sous plusieurs formes telle que des coopérations ou des compétitions. C'est surtout cette dernière interaction qui favorise l'invasion biologique qui est considérée actuellement comme un élément majeur des changements globaux (Pitelka, 1997 ; Dukes et Mooney, 1999) et est classée à la deuxième cause de l'érosion de la biodiversité après la destruction des habitats (Vitousek *et al.*, 1997).

Les effets des invasions biologiques sont difficiles à évaluer. Cependant, ils peuvent être mesurés à plusieurs niveaux : au niveau génétique (hybridation), démographique sur la dynamique des populations (taux de mortalité, taux de croissance, abondance), au niveau de la communauté (richesse spécifique, structure du réseau d'interactions) et du fonctionnement de

l'écosystème (disponibilité en nutriments, productivité primaire) etc... (Parker *et al.*, 1999). Ces invasions biologiques peuvent également s'accompagner de conséquences sanitaires et économiques considérables.

D'une manière générale, les effets de la propagation des plantes exotiques sont étudiés au niveau des écosystèmes terrestres, plus particulièrement au niveau du fonctionnement de ces écosystèmes (Ehrenfeld, 2003). En effet, les espèces qui ont plus d'impact sont probablement celles qui augmentent l'inflammabilité des écosystèmes (Levine *et al.*, 2003). Habituellement, les dysfonctionnements des écosystèmes sont observés au niveau de l'altération de la composition biotique ou de l'environnement abiotique des communautés qui constituent ces écosystèmes (Mack *et al.*, 2000 ; Strayer *et al.*, 2006). Une disparition des espèces locales est souvent produite suite aux invasions biologiques par des plantes exotiques en formant par la même occasion des peuplements monospécifiques. Pourtant, ces plantes exotiques s'intègrent facilement dans une végétation plurispécifique dans leur région d'origine. Les perturbations au niveau des espèces indigènes sont souvent dues aux principaux mécanismes suivant : la compétition interspécifique, la prédation, l'hybridation et la transmission d'agents pathogènes. C'est le cas, par exemple, de la Reserve Naturelle de Betampona (Est de Madagascar) où plusieurs espèces y ont été identifiées invasives (*Psidium cattleianum*, *Aframomum angustifolium*, *Rubus mollucanus*) et recouvrent environ 24,48% de la surface totale du site depuis sa création en 1927 (Ratovomanana, 2006). Parmi toutes ces plantes exotiques, *Psidium cattleianum* est particulièrement signalée comme un incident pour cette Réserve Naturelle par sa capacité à inhiber la régénération des espèces natives et à détruire par la suite la composition et la structure de la forêt originale (Ratovomanana, 2006). Cette situation est actuellement observée dans plusieurs régions de la Grande Île où le taux de déforestation entre 2000 et 2005 s'élève à 0,53% de la surface forestière à Madagascar (CI, MBG, MINEVEF, 2005). Pourtant, les activités vivrières de bon nombre de la population Malagasy dépendent encore de la forêt ainsi que de ses services écosystémiques.

II. Les interactions Plantes-microorganismes rhizosphériques du sol

<< Promouvoir le développement des plantes dans les sols perturbés >>

II.1 La rhizosphère

Hiltner (1904) a défini le terme rhizosphère comme étant le volume de sol sous l'influence des racines des plantes où il y a une forte activité microbienne résultant de la libération ou

l'exsudation de substances organiques par les racines. Au niveau de cette rhizosphère se déroulent de nombreux processus biogéochimiques entre autres l'interaction entre la plante hôte, le sol, les microorganismes telluriques et certaines conditions abiotiques du milieu, c'est l'effet rhizosphérique. Ceci intervient dans le fonctionnement des écosystèmes (Van Der Putten *et al.*, 2007). La rhizosphère contient plusieurs groupes microbiens dont les bactéries, les actinomycètes, les champignons, les nématodes, les protozoaires, les algues et les microarthropodes. En fait, au cours de leurs cycles de vie, des réseaux d'interactions complexes se forment entre ces différents microorganismes avec les plantes, la faune du sol et les composantes chimiques et physiques du système sol-plante. Certains de ces microorganismes exercent des interactions bénéfiques (symbioses) ou délétères (pathogénie) sur la croissance et la santé de la plante.

II.2 Interactions bénéfiques entre plantes et microorganismes rhizosphériques

Plusieurs microorganismes du sol sont capables d'améliorer la croissance des plantes par différents mécanismes. Le plus souvent se produit par la facilitation à l'accès aux différentes ressources des éléments nutritifs indispensables pour la croissance de la plante dont l'azote, le phosphore, le fer, l'eau etc. Pour ce faire, les plantes forment dans la plupart des cas des associations symbiotiques avec les microorganismes du sol. Deux types de ces symbioses bénéfiques peuvent exister entre autre la symbiose mutualiste qui est souvent obligatoire entre les deux partenaires (symbiose mycorhizienne et symbiose fixatrice d'azote) et la symbiose associative (coopération) qui est considérée comme une interaction facultative (PGPR).

II.2.1 Symbiose mycorhizienne

Parmi les microorganismes bénéfiques sont les champignons mycorhiziens qui forment des associations symbiotiques avec les plantes hôtes. Au niveau de ces associations, les champignons apportent à la plante des éléments nutritifs, essentiellement le phosphore indispensable à sa croissance et renforcent ses défenses naturelles vis-à-vis de stress d'origine biotique ou abiotique. En retour, les champignons reçoivent les photosynthétats nécessaires à leur croissance et à leur développement (Smith et Read, 1997). Cette relation très intime s'appelle «symbiose mycorhizienne». Elle est rencontrée chez la plupart des végétaux vasculaires, sauf quelques-uns appartenant aux familles des Cypéracées, Crucifères, Juncées et Protéacées (Gianinazzi-Pearson, 1986).

II.2.1.1 Différents types de mycorhize et leurs importances respectives

Deux principaux types d'association mycorhizienne ont été décrits en fonction de leurs caractéristiques morphologiques : les endomycorhizes et les ectomycorhizes.

II.1.1.1 Ectomycorhizes

Ces associations symbiotiques se présentent sous forme de racines courtes très ramifiées. Elles se caractérisent par la présence, autour des apex racinaires, d'un manteau fongique visible à l'œil nu dont la partie interne s'insinue entre les cellules de l'exocortex pour donner naissance à un réseau mycélien ou réseau de Hartig, lieu d'échange entre les deux symbiotes. Les ectomycorhizes concernent peu d'espèces (environ 5% des végétaux) et se rencontrent surtout chez les essences forestières, rarement des feuillus et fréquemment des résineux (Boullard 1962, 1982 ; Le Tacon, 1985). Les champignons ectomycorhiziens appartiennent essentiellement aux groupes des Ascomycètes et des Basidiomycètes (Strullu, 1985 ; Gianinazzi-Pearson, 1986) dont plus de 10 000 espèces sont déjà décrites (Brussaard *et al.*, 1997). Les ectomycorhizes sont ainsi utilisées surtout dans les programmes de reboisement dans différents pays pour améliorer la croissance des plants en pépinière et en plantation grâce à la sélection de partenaires fongiques efficaces.

II.1.1.2 Endomycorhizes

Les endomycorhizes sont les plus répandues concernant, environ 90% des végétaux (Le Tacon, 1985) et se rencontrent essentiellement chez les plantes cultivées et chez la plupart des arbres tropicaux. Notons que les champignons endomycorhiziens sont des champignons microscopiques impossibles à cultiver qu'en présence d'une plante hôte.

Ce type d'association ne provoque que peu de changement dans la morphologie racinaire. En effet, elles ne forment jamais de manteau autour des racines, mais développent deux réseaux mycéliens dont l'un est intraradiculaire et l'autre externe. En effet, les hyphes pénètrent à l'intérieur des cellules corticales de l'hôte où ils forment des arbuscules ou des pelotons, lieu d'échange entre les deux partenaires ; et/ou des vésicules, qui servent d'organes de stockage. Ainsi, les endomycorhizes se répartissent en trois groupes en fonction du type de plantes infectées et des champignons associés (Boullard, 1982) :

- les endomycorhizes éricoïdes des Ericales
- les endomycorhizes à péletons des Orchidées
- les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA)

Dans la biosphère, la MVA est le type d'endomycorhize le plus répandu (Boullard, 1968 ; Gianinazzi, 1982 ; Strullu, 1985), elle est souvent trouvée chez la majorité des plantes horticoles, des arbres fruitiers et des arbres forestiers. Ce dernier type d'endomycorhize est particulièrement étudié dans le cadre du présent travail.

II.1.1.3 Importance de la symbiose mycorhizienne dans le développement des plantes

Les plantes mycorhizées au cours de leur développement tirent les profits suivants : (i) une augmentation de l'assimilation des minéraux à faible mobilité, des micronutriments et de l'azote, (ii) une augmentation de l'absorption d'eau et (iii) une amélioration de la santé de la plante du fait de son action contre certains pathogènes (Smith et Read, 2008).

➤ Amélioration de la mobilisation des éléments nutritifs : exemple du phosphore

Le phosphore, un élément indispensable pour le développement des plantes, est rarement disponible sous cette forme mais à des formes des phosphates non disponibles pour la plante surtout dans les sols tropicaux (Lal, 1990 ; Formoso, 1999). En réponse à l'insuffisance du phosphore, grâce aux hyphes des champignons mycorhiziens, chez les plantes mycorhizées, ce phosphore peut être absorbé au-delà de la zone d'épuisement. Ceci est dû probablement à l'augmentation de la masse racinaire et du volume de sol exploré par le champignon mycorhizien (Gianinazzi-Pearson, 1986, 1982 ; Mousain et Salsac, 1982). Chez l'endomycorhize, il est estimé que la longueur de l'hyphes se développant dans le sol autour de chaque centimètre de racine peut atteindre 1,34m (Gianinazzi-Pearson, 1982). Dans plusieurs études, les mycorhizes, quel que soit leur type, jouent un rôle principal dans l'absorption du phosphore chez les végétaux (Boullard, 1968 ; Strullu, 1985). C'est le cas par exemple d'une amélioration de l'absorption du phosphore chez *Centaurea maculosa* en présence d'une association mycorhizienne sur ses racines (Zabinsky *et al.*, 2002). Le mycorhize, outre le phosphore, est capable d'améliorer l'acquisition d'autres éléments faiblement mobilisés dans le sol tels que le zinc et le cuivre (Hayman, 1978 ; LE Tacon, 1985). Le mycorhize joue également un rôle déterminant dans le métabolisme de l'azote à travers les champignons ectomycorhiziens qui sont capables d'absorber l'azote ammoniacal (NH_4^+), l'azote nitrique (NO_3^-) et de les transférer à la plante sous forme d'acides aminés (Gianinazzi-Person et Diem, 1982).

➤ Adaptation des plantes mycorhizées au stress hydrique

La tolérance des plantes mycorhiziennes d'un abaissement du potentiel hydrique s'exprime par une diminution de la résistance au transport de l'eau dans les racines mycorhizées et par le maintien de la turgescence des cellules foliaires grâce à l'accumulation des solutés (Subramanaian *et al.*, 1995 ; Duan *et al.*, 1996 ; Collinson *et al.*, 1997). Grâce à leurs caractères moins sensibles à la sécheresse, les plantes mycorhizées résistent mieux au choc hydrique que celles non mycorhizées au cours de leurs transplantations (Safir *et al.*, 1971 ; Bowen, 1980 ; Hardie et Leyton, 1981 ; Cornet *et al.*, 1982 ; Mousain, 1984, 1991). Une expérience réalisée sur *Rosa hybrida* a montré que la présence des champignons endomycorhiziens (*Glomus intraradices*, *Glomus deserticola*) permet un maintien de la turgescence au niveau du feuillage lors de déficits hydriques (Auge *et al.*, 1986).

➤ Tolérance des plantes mycorhizées aux agents pathogènes

En association avec les racines des plantes, les microorganismes bénéfiques peuvent amorcer le système immunitaire inné et conférer une résistance à un large spectre d'agents pathogènes, avec un impact minimal sur le rendement et la croissance (Van Hulten *et al.*, 2006). En effet, l'établissement de la symbiose mycorhizienne permet aux plantes de tolérer ou de réduire la sensibilité vis-à-vis de certains pathogènes telluriques dont les bactéries, les champignons et les nématodes (Marx, 1972 ; Sharma *et al.*, 1992 ; Azcon-Aguilar et Barea, 1992 ; Bennett *et al.*, 2006). Cette activité dite biocontrôle pourrait être due aux activités bactériennes élevées au niveau du compartiment mycorhizosphérique. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les mécanismes de phytoprotection chez les plantes mycorhizées particulièrement chez les plantes ectomycorhizées, (i) une compétition entre microorganismes rhizosphériques pour la nutrition, (ii) l'existence d'une barrière physique constituée par le manchon fongique, (iii) une production de substances toxiques par le mycorhize et (iv) une stimulation des mécanismes de défense de l'hôte (Marx, 1973). En effet, certains champignons ectomycorhiziens (*Pisolithus tinctorius*, *Paxillus involutus*) produisent de grandes quantités de substances phénoliques lorsqu'ils sont cultivés en culture pure (Duponnois et Garbaye, 1990) qui pourraient être toxiques pour les nématodes en diminuant la viabilité des œufs et des jeunes des agents pathogènes (Senghor, 1998). Il a été démontré que les ectomycorhizes ont accumulé ces composés phénoliques dans les cellules corticales et qui pourraient avoir une incidence sur le développement des nématodes dans les racines (Malajczuk *et al.*, 1984). Le développement de la symbiose endomycorhizienne (*Glomus* sp.) contribue également dans la réduction de

l'infection des nématodes à galles (*Meloidogyne javanica* ou *M. mayaguensis*) sur les racines d'*Acacia holosericea* (Duponnois *et al.*, 1998).

II.2.1.2 Facteurs susceptibles d'influencer les mycorhizes

L'association mycorhizienne ainsi que son développement sur les racines des plantes peuvent être affectés par certaines pratiques culturales entre autres les apports importants d'engrais surtout les engrais chimiques, l'utilisation des pesticides, la désinfection du sol, la multiplication végétative *in vitro* (Gianinazzi, 1982). Bartscki (1982) a observé une éradication de la mycorhization suite à l'utilisation de benomyl (fongicide).

L'absorption et le transport du phosphore du champignon à la plante peuvent être inhibés par certains facteurs environnementaux dont la température, la lumière, la teneur en eau et le pH du sol etc. A titre d'exemple, les champignons endomycorhiziens ont besoin d'une certaine température pour son développement optimal. Dans ce sens, Sieverding (1988) a montré que peu d'isolats de champignons endomycorhiziens (*Acaulospora* et *Scutellospora*) sont efficaces à faible température (20°C). Dans d'autre cas, Boullard (1964) a conclu qu'un sol très humide, compact et peu aéré est néfaste pour l'association endomycorhizienne.

Au niveau du sol riche en phosphore assimilable par les plantes, le rôle principal de la mycorhization est déjà atteint et dans ce cas l'intensité et les effets bénéfiques de la mycorhization sont largement réduits (LE Tacon, 1985 ; Gianinazzi-Pearson, 1986).

Des études ont montré aussi que les invasions biologiques notamment l'invasion végétale influencent l'association mycorhizienne. C'est le cas par exemple de Garlic mustard (*Alliaria petiolata*), une espèce invasive non mycorhizienne qui réduit voire empêche la formation de la symbiose mycorhizienne (Roberts et Anderson 2001 ; Stinson *et al.*, 2006 ; Stinson *et al.*, 2007 ; Callaway *et al.*, 2008 ; Wolfe *et al.*, 2008). Wolfe *et al.*, 2008 ont montré que *A. petiolata* a diminué le degré de colonisation ectomycorhizienne des communautés de plantes dans son milieu d'introduction, en Amérique du Nord (Nuzzo, 2000). Ce qui influence l'établissement d'arbre forestier et modifie le cycle biogéochimique dans le sol.

II.2.2 Symbiose fixatrice d'azote

II.2.2.1 Fixation d'azote et formation des nodules

L'azote, intervient dans l'élaboration de molécules importantes chez les végétaux comme les protéines, les nucléotides, les acides nucléiques et la chlorophylle (Epstein, 1972). Il est essentiel pour la synthèse des enzymes de la photosynthèse (Lamaze *et al.*, 1990) et favorise

l'absorption des éléments minéraux et la croissance des plantes (Stenvenson, 1986). Ainsi, l'azote est un élément indispensable et constitue un facteur limitant pour le bon développement surtout des plantes supérieures fixatrices ou non d'azote. Seules quelques espèces de procaryotes peuvent fixer l'azote de l'air atmosphérique (N_2) en le convertissant en ammoniac (NH_3) (forme combinée) et rendant ainsi l'élément assimilable par les plantes (Dommergues *et al.*, 1999 ; Peret, 2007).

La fixation d'azote peut être effectuée soit par les fixateurs libres comprenant des bactéries de divers genres comme les bactéries aérobies (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *diazotrophicus*), les bactéries anaérobies strictes (*Clostridium*) ou facultatives (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*), les bactéries à photosynthèse anoxygénique (*Rhodobacter*, *Rhodospirillum*) et les cyanobactéries (*Synechococcus*) ; soit par des fixateurs symbiotiques en s'associant avec les végétaux. Ce dernier type de fixation d'azote est caractérisé généralement par la formation de nodules racinaires chez les plantes de la famille des légumineuses colonisées par des bactéries Gram négatif, fixatrices d'azote, généralement des rhizobia ou des bactéries nodulant les légumineuses (BNL) (Moulin, 2002). Des bactéries Gram positif telles que des représentants du genre *Frankia* peuvent développer des nodules avec quelques espèces de plantes (plantes actinorhiziennes) dont les genres *Alnus*, *Eleagnus*, *Casuarina* ou *Myrica* (Benson et Silvester, 1999). En retour, les bactéries reçoivent de la plante les photosynthétats nécessaires à leur développement (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Dommergues *et al.*, 1999). Cette symbiose fixatrice d'azote est essentiellement basée sur une communication moléculaire entre les deux partenaires (Gage, 2004).

La symbiose entre la bactérie du genre *Rhizobium* et la plante de la famille des légumineuses est la plus connue pour l'étude de la symbiose fixatrice d'azote. Environ 88% des espèces de légumineuses formant ce type de symbiose sont capables de former des nodules (de Faria *et al.*, 1989). D'où le terme de rhizobia qui a été donné aux bactéries capables d'induire la formation de nodules sur les légumineuses. Plus tard, on a découvert que le *Rhizobium* n'était pas la seule espèce fixatrice d'azote chez les légumineuses, on a recensé aussi des représentants des genres *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia* (SY *et al.*, 2001 ; Rivas *et al.*, 2002)[classe des α -protéobactéries] et *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001 ; Rasolomampianina *et al.*, 2005), *Ralstonia* (Chen *et al.*, 2001) et *Herbaspirillum* (Valverde *et al.*, 2003) [classe des β -protéobactéries] ainsi que certaines γ -protéobactéries comme

Enterobacter sur *Hedysarum* (Benhizia *et al.*, 2004). Tous ces microorganismes forment actuellement l'ensemble des bactéries connues comme symbiotes des légumineuses (Zakhia et de Lajudie, 2001 ; Moulin *et al.* 2001 ; Chen *et al.*, 2001 ; Ngom *et al.*, 2004) et sont désignés sous le terme plus généralisé « BNL » ou « Bactéries Nodulant les Légumineuses » (Zakhia *et al.*, 2004). Cette formation de nodules est contrôlée par des molécules extracellulaires appelées facteurs Nod, qui sont reconnues par la plante hôte (Lerouge *et al.*, 1990 ; Schultze et Kondorosi, 1998).

II.2.2.2 Facteurs influençant la symbiose fixatrice d'azote

La fixation de l'azote se déroule généralement au niveau de la rhizosphère par les bactéries du sol en formant une symbiose avec les racines des légumineuses. Plusieurs facteurs environnementaux peuvent limiter la croissance et l'activité des bactéries du sol (Obaton, 1992 ; Fitouri, 2011) inhibant ainsi la formation et/ou le fonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote.

➤ **Le pH du sol** : les deux partenaires symbiotiques sont extrêmement sensibles au pH du sol. En effet, la majorité des légumineuses nécessitent des pH neutres ou légèrement acides pour établir une symbiose efficiente dans le sol (Bordeleau et Prévost, 1994). Pour les légumineuses des zones tropicales comme le niébé (*Vigna unguiculata*) et l'arachide (*Arachis hypogaea*), leur développement est souvent optimal à un pH allant de 5 à 6,5. L'acidité élevée du sol influence la solubilité des éléments minéraux et provoque des troubles dans la nutrition minérale, affectant ainsi d'une part le développement de la plante hôte, et d'autre part l'efficacité de rhizobia et engendrant par conséquent une diminution de la nodulation (Munns, 1977). Alors que le pH alcalin du sol a un effet négatif sur la disponibilité de certains minéraux tels que le fer et le manganèse autant pour le rhizobium que pour la plante hôte (Bordeleau et Prévost, 1994). Des études faites par Kimou et Zengbe (1994) cités par Nwaga et Ngo Nkot (1998), ont montré que l'acidité et la pauvreté du sol en phosphore assimilable constituent un facteur limitant l'activité des bactéries fixatrices d'azote.

➤ **Le stress hydrique** : il affecte la symbiose fixatrice d'azote en inhibant la formation et la croissance nodulaire, le métabolisme du carbone et de l'azote, l'activité de la nitrogénase et la perméabilité nodulaire à l'oxygène (Zahran et Sprent, 1986 ; Aguirreolea et Sanchez-Díaz, 1989 ; Sadowsky, 2005).

➤ **La salinité** : elle affecte l'initiation, le développement et le fonctionnement des nodules, de même que la capacité photosynthétique des feuilles. Rao *et al.*, (2002) ont conclu

que la fixation symbiotique de l'azote est probablement affectée par le sel plus que la croissance des plantes. Ainsi, le processus infectieux est l'étape la plus sensible à la présence du sel (Payakapong *et al.*, 2006).

II.2.3 Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (ou PGPR)

Parmi les microorganismes de la rhizosphère, les rhizobactéries promotrices de croissance de plante ou PGPR représentent un groupe de bactéries inoffensives qui colonise la rhizosphère et contribue à la croissance et à la santé des plantes. Comme son nom l'indique, les rhizobactéries sont des bactéries qui ont la capacité à coloniser les racines des plantes de façon intense (Schroth et Hancock, 1982).

La stimulation du développement des plantes par les bactéries PGPR est généralement effectuée selon différents mécanismes entre autres l'amélioration de la nutrition minérale, la production de phytohormone et/ou la suppression de la maladie (Tarkka *et al.*, 2008). Barea *et al.*, (2005) ont qualifié cette propriété phytostimulation des bactéries PGPR comme biofertilisante et/ou biocontrôle. Ainsi, deux groupes de bactéries PGPR ont été décrits : le premier groupe est les bactéries biofertilisantes qui sont des bactéries impliquées dans l'amélioration du cycle des nutriments et dans la stimulation de développement des plantes (Vessey, 2003) et le second groupe rassemble des bactéries qui sont impliquées dans le contrôle biologique des pathogènes des plantes (Biopesticides) par la production des antibiotiques (Whipps, 2001 ; Raaijmakers *et al.*, 2002).

A titre d'exemple : le genre *Azospirillum* constitue une des bactéries PGPR phytostimulatrices par leur capacité à synthétiser de phytohormones (auxines et gibbérellines) qui stimulent la croissance de la plante. Certaines bactéries sont des phytoprotectrices dont le genre *Pseudomonas* est le plus étudié (Haas et Defago, 2005 ; Raaijmakers *et al.*, 2009). L'étude de Lemanceau en 1992 a montré l'effet bénéfique (PGPR) des *Pseudomonas* sp. fluorescents sur la stimulation de la croissance des plantes et surtout sur la protection contre des microorganismes pathogènes. Il a été expliqué que deux mécanismes sont responsables de ces effets bénéfiques de *Pseudomonas* sp. dont la modification des équilibres microbiens au niveau de la rhizosphère et la modification du métabolisme et de la physiologie de la plante.

II.3 Interactions délétères entre plantes et microorganismes rhizosphériques

Au niveau de la rhizosphère, les interactions des microorganismes avec les plantes peuvent produire des effets délétères pour lesquels les bactéries ou les champignons pathogènes vont

inhiber la croissance des plantes voire produire des maladies pour la plante (phytopathologie). Dans d'autres cas, l'installation des plantes dans un milieu donné peut influencer le dynamisme des microorganismes préexistants (cas de plante invasive).

II.3.1 Les microorganismes pathogènes des plantes

Il est déjà démontré que la rhizosphère comprend un grand nombre de microorganismes du sol. Le développement de ces microorganismes est souvent stimulé par l'excrétion des exsudats racinaires des plantes au niveau de la rhizosphère. Certains de ces microorganismes expriment des activités pathogènes à l'encontre de la plante dont des microorganismes pathogènes et parasites et d'autres non parasites. En effet, les microorganismes pathogènes non parasites réduisent la croissance de la plante en émettant des substances toxiques. Tandis que les microorganismes pathogènes parasites se développent selon deux phases : une saprophyte et l'autre parasite. Ainsi dans son milieu natif, le développement de *Prunus serotina* est affecté négativement par un champignon pathogène du sol *Pythium* sp. (Reinhart *et al.*, 2003).

II.3.2 Influence des plantes invasives sur le dynamisme des microorganismes du sol : cas des champignons mycorhiziens et des bactéries fixatrices d'azote

La symbiose mycorhizienne et la symbiose fixatrice d'azote sont deux grandes symbioses mutualistes trouvées chez la majorité des végétaux dont leurs présences améliorent les besoins nutritifs des plantes hôtes et assurent la santé de la plante. En effet, la diversité et l'abondance des champignons ectomycorhiziens constituent un élément important pour les communautés microbiennes du sol forestier assurant ainsi un bon fonctionnement des écosystèmes forestiers (Aerts, 2002 ; Read *et al.*, 2004). Néanmoins, l'interaction entre ces symbioses mutualistes avec les plantes invasives (non mycotrophe surtout) a potentiellement altéré les propriétés chimiques du sol (Miki et Kondoh, 2002 ; Hawkes *et al.*, 2005), le cycle d'azote et les bactéries fixatrices d'azote (Rice, 1964 ; Vitousek *et al.*, 1987 ; Hawkes *et al.*, 2005) et la colonisation racinaire par les champignons endomycorhiziens (Vogelsang *et al.*, 2005) ; ceux qui influencent à leur tour les communautés de plantes natives. *Alliaria petiolata* (garlic mustard) une espèce exotique envahissante en Amérique du Nord (Nuzzo, 2000), par exemple, inhibe la formation de la symbiose endomycorhizienne (Roberts et Anderson, 2001 ; Stinson *et al.*, 2006) et la symbiose ectomycorhizienne (Wolfe *et al.*, 2008) des plantules poussant sur le sol envahi par cette espèce. De nombreuses études rendent compte également des

modifications de la composition et de la densité de la faune du sol suite à l'invasion par une espèce de plante exotique (Belnap et Philips, 2001 ; Kourtev *et al.*, 2002 ; Herrera et Dudley, 2003 ; Ernst et Cappuccino, 2005).

II.4 Importance des microorganismes sélectionnés dans la réhabilitation des zones perturbées

Dans les milieux où il y avait altération de la structure de la couverture végétale, grâce à la désertification, à l'activité humaine, à l'invasion biologique etc., des modifications des propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols (structure du sol, biodisponibilité en éléments nutritifs, activité microbienne, etc.) sont souvent observées (Garcia *et al.*, 1997 ; Requena *et al.*, 2001). Dans ce cas, les champignons mycorhiziens et les bactéries bénéfiques pour la plante sont parmi les composantes du sol affectées par la dégradation de la couverture végétale (Bethlenfalvay et Schüepp, 1994). Par ailleurs, la structure du couvert végétal ainsi que son développement étaient intimement liés à l'établissement de la symbiose mycorhizienne et/ou à la présence des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique (Odum, 1959 ; Van Der Heijden *et al.*, 1998).

Depuis quelques années, il est clairement établi qu'il est possible de trouver des voies pour améliorer la croissance des arbres forestiers via la mycorhization contrôlée dans diverses conditions écologiques (Le Tacon *et al.*, 1997). Ainsi, dans le programme de réhabilitation du sol dégradé et de restauration de couverture végétale, il est recommandé de recourir à la biofertilisation par l'utilisation des symbioses racinaires (Dommergues *et al.*, 1985) en inoculant par exemple par une ou des souches de champignons mycorhiziens lors de la phase d'élevage des plants en pépinière (Duponnois *et al.*, 2005, 2007) et/ou des souches de rhizobia pour les légumineuses afin d'améliorer la nutrition minérale des plantes dans le sol pauvre et assurer par la suite leur développement (Dommergues *et al.*, 1985). En effet, la symbiose fixatrice d'azote permet aux légumineuses de satisfaire leurs besoins en azote tandis que la symbiose mycorhizienne améliore l'absorption de l'eau et des éléments minéraux comme le phosphore, un élément qui est généralement pauvre dans les sols tropicaux (Mosse, 1981 ; Le Tacon *et al.* 1986 ; Damase *et al.*, 1987).

Par définition, la mycorhization contrôlée est un ensemble de technique qui consiste à optimiser l'établissement de la symbiose mycorhizienne en introduisant en pépinière des souches mycorhiziennes sélectionnées et à évaluer leurs effets sur la croissance de la plante hôte (Le Tacon, 1982 ; Le Tacon *et al.*, 1986 ; Garbaye *et al.*, 1988 ; Yazid *et al.*, 1994). Cette

technique permet à la fois de déterminer l'efficacité des souches fongiques sur la croissance de la plante et de sélectionner des champignons susceptibles d'être utilisés pour la production de plants performants pour le reboisement (Garbaye *et al.*, 1988 ; Garbaye, 1990 ; Le Tacon *et al.*, 1992 ; Le Tacon *et al.*, 1997 ; Palardé *et al.*, 1997 ; Dell *et al.*, 1997). L'effet bénéfique de cette technique sur la croissance des plantes en pépinière et après transplantation a permis de sauver plusieurs espèces d'essences ligneuses dans beaucoup de pays tempérés, surtout lorsque le champignon est adapté aux conditions écologiques du site à reboiser. Chez les ectomycorhizes, l'inoculation en pépinière peut entraîner un maintien à court terme (1 à 2 ans après transplantation) de l'espèce sur le système racinaire (Marx *et al.*, 1988 ; Danielson et Visser, 1989 ; Buschena *et al.*, 1992 ; Thomson *et al.*, 1996 ; Honig *et al.*, 2000) et jusqu'à 10 ans après transplantation (Garbaye et Churin, 1997 ; Selosse *et al.*, 1998, 1999). En outre, les endomycorhizes contribuent à l'absorption de certaines substances organiques et protègent les plantules contre certaines maladies et stress hydrique assurant ainsi leur survie après la transplantation au champ (Menge *et al.*, 1978 ; John T.V et Coleman D.C, 1983).

III. Implication des racines protéoïdes sur le développement des plantes

III.1 Historique des racines protéoïdes de la plante

En 1894, Adolf Engler a observé une morphologie exceptionnelle sur le système racinaire de plantes de la Famille des Proteaceae poussant dans le parc botanique de Leipzig. Il a remarqué des groupes denses de courtes radicelles latérales très rapprochées. En 1960, Purnell a inventé le terme « racines protéoïdes » pour décrire ce type de racine après avoir examiné le système racinaire de 44 espèces de 10 genres de la famille des Proteaceae. En effet, Lamont en 1982 a trouvé que toutes les espèces de la famille des Proteaceae ont des racines protéoïdes à l'exception de *Persoonia*. Actuellement, les racines protéoïdes peuvent être trouvées chez beaucoup de familles autres que les Proteaceae dont les familles des Betulaceae, Casuarinaceae, Cucurbitaceae, Cyperaceae, Eleagnaceae, Fabaceae, Mimosaceae, Moraceae, Myricaceae et Restionaceae (Skene 1998 ; Neumann et Martinoia, 2002 ; Shane et Lambers, 2005).

III.2 Morphologie et fonctionnement des racines protéoïdes

La morphologie des racines protéoïdes dépend fortement des espèces de plantes hôtes. Ces racines protéoïdes peuvent être constituées par des racines simples (Ex. chez *Lupinus albus*) ou par des racines complexes (Ex. chez *Banksia* sp.). Skene (1998) a décrit que la présence

des racines protéoïdes permet aux plantes porteuses de bien se développer dans des conditions du sol pauvre en éléments nutritifs. D'un autre côté, la majorité des espèces de plantes présentant des racines protéoïdes sont des espèces non mycotrophiques, c'est à dire ne forment pas de symbiose avec les champignons mycorhiziens. Cependant la famille des Casuarinaceae peut, exceptionnellement, former à la fois des racines protéoïdes, de symbiose fixatrice d'azote et de symbiose mycorhizienne en réponse à la déficience en nutriments (Diem *et al.*, 2000).

Comme les hyphes de champignons mycorhiziens, les racines protéoïdes explorent une dense surface du sol par rapport aux racines non protéoïdes. A titre d'exemple, les racines protéoïdes de *Hakea obliqua* explorent 25 fois de surface de sol par rapport aux racines non protéoïdes (Dell *et al.*, 1980). Purnell en 1960, a suggéré que ces racines protéoïdes sont très importantes pour l'acquisition des éléments nutritifs de la plante hôte surtout en milieu pauvre en ces éléments. Dans la majorité des cas, ces racines protéoïdes se sont formées abondamment dans des conditions de pauvreté du milieu en phosphore. Ainsi, elles peuvent mobiliser le phosphore minéral non disponible qui précipite avec les métaux dont le Fer, l'Aluminium et le Calcium. Elles peuvent aussi extraire le phosphore, l'azote organique du sol et les microéléments comme le Fer et le Manganèse (Dinkelaker *et al.*, 1995). En effet, la concentration de phosphore dans un milieu influence le développement des racines protéoïdes. Ainsi, l'ajout en excès de quantité de phosphore par exemple chez *Banksia ericifolia*, a diminué les racines protéoïdes produites, influençant ainsi à son tour la croissance de la plante (Dinkelaker *et al.*, 1995). Aussi, la déficience en Fer induit la formation des racines protéoïdes comme chez *Lupinus consentinii*, *Ficus benjamina* (Dinkelaker *et al.*, 1995) et *Casuarina glauca* (Arahou et Diem, 1997). En fait, la plupart des espèces ont développé plus de racines protéoïdes en réponse au stress soit en phosphore soit en Fer. Cependant *L. consentinii* est la seule espèce qui produise des racines protéoïdes en réponse à la déficience en phosphore ou en fer (Watt M. et Evans, 1999).

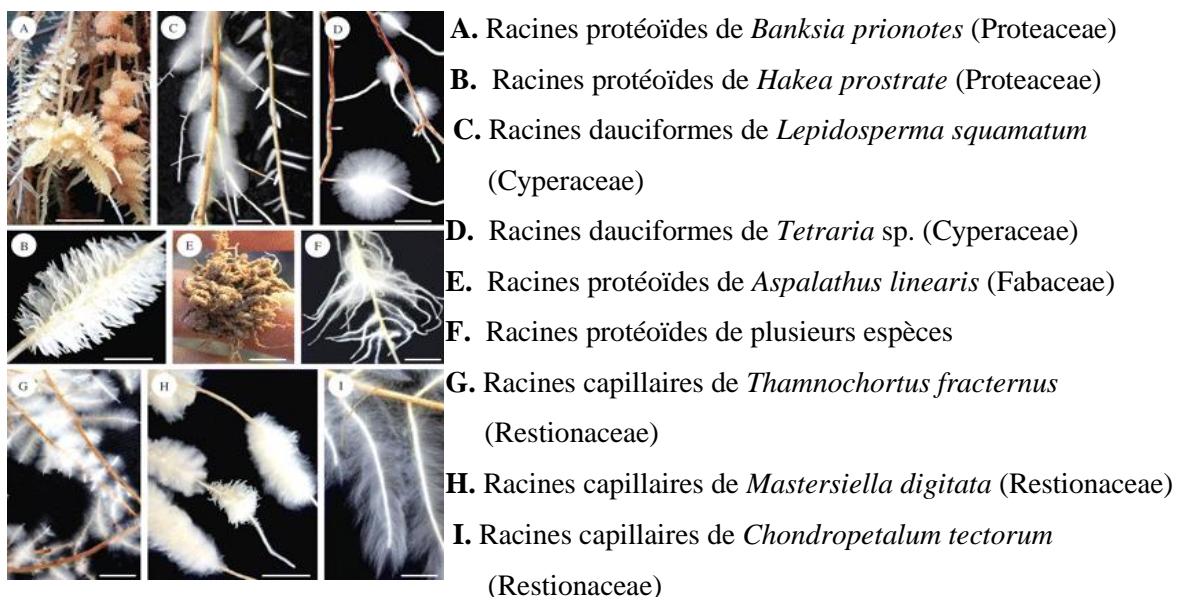


Photo 1 Morphologie des racines protéoïdes en condition de faible concentration de phosphore

(Source : <http://aob.oxfordjournals.org/content/98/4/693/F3.expansion>)

CHAPITRE I :

CARACTERISATION DES PARCELLES COLONISEES PAR *Grevillea banksii* DANS LA PARTIE EST DE MADAGASCAR

CARACTERISATION DES PARCELLES COLONISEES PAR *Grevillea banksii* DANS LA PARTIE EST DE MADAGASCAR

I. INTRODUCTION

Autrefois, la partie orientale de Madagascar était couverte d'une bande continue de forêt naturelle du nord au sud. L'exploitation irrationnelle des ressources forestières, la destruction des écosystèmes naturels sont entre autres les causes de disparition des forêts sur plusieurs domaines de la région Est de la Grande île. De ce fait, il ne reste plus actuellement que quelques reliques de forêts naturelles. Pourtant, les activités vivrières de bon nombre de la population Malagasy dépendent encore de la forêt ainsi que de ses services écosystémiques. Face à cette situation, une opération de reboisement privilégiant les espèces exotiques à croissance rapide et résistantes aux différentes conditions pédoclimatiques est l'une des initiatives prises par le gouvernement malagasy sans que des études préalables sur le comportement de ces plantes n'aient été effectuées. C'est pourquoi, certaines de ces plantes se sont montrées invasives dans certains endroits comme c'est le cas de *G. banksii* dans la partie est de Madagascar (Binggeli, 2003 ; Andriamiharimanana, 2011). Cette espèce de plante a été introduite dans les années 1950 et 1960 dans le cadre du programme de protection et de restauration des sols (Tassin, 1995). Plusieurs auteurs ont considéré que les espèces envahissantes constituent la seconde cause de perte de la biodiversité après la destruction et la fragmentation des habitats (Wilcove *et al.* 1998 ; Simberloff 2003 ; Rejmanek, 2003). Ces dernières années, l'installation des plantes exotiques conduisant à des modifications profondes de la structure et du fonctionnement de l'écosystème a été mondialement reconnue (Pimentel, 2002 ; Pascal *et al.*, 2006). En plus, il a été signalé que les plantes invasives affectent les écosystèmes natifs du milieu envahi (Binggeli, 2003 ; Carrière *et al.*, 2008).

Dans plusieurs endroits de la partie orientale de Madagascar, des fragments de forêts déjà envahis par des espèces envahissantes et qui ne font pas encore l'objet d'aucune étude antérieure, ni de projet de conservation sont observés. Parmi ces forêts, la relique forestière de Ianjomara-Vatomandry fait partie des plus frappés et pourrait disparaître d'ici peu s'il n'y aura pas de précaution prise.

Dans le cadre de la remédiation aux différentes perturbations induites par l'invasion de l'espèce exotique au niveau du fonctionnement de ces écosystèmes forestiers, il est primordial

de décrire la structure des différents types de couverture végétale du site concerné. L'hypothèse dans laquelle repose le premier chapitre de ce travail a été la suivante : ***Les modifications de la composition floristique d'une communauté végétale, consécutives à l'invasion d'une espèce exotique, pourraient altérer le fonctionnement de la population épigée et hypogée de l'écosystème (floristique et microbien).***

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la structure de trois formations végétales de la forêt de *Ianjomara* dont la forêt naturelle proprement dite, la population de *G. banksii* et la zone dégradée formée par de pseudo-steppe. Cette étude a été orientée sur l'évaluation de la composition et de la richesse floristique de la végétation et la description du statut symbiotique de chaque espèce de plante. Les propriétés physico-chimiques et microbiologiques des sols ont été également analysées.

II. MATERIELS ET METHODES

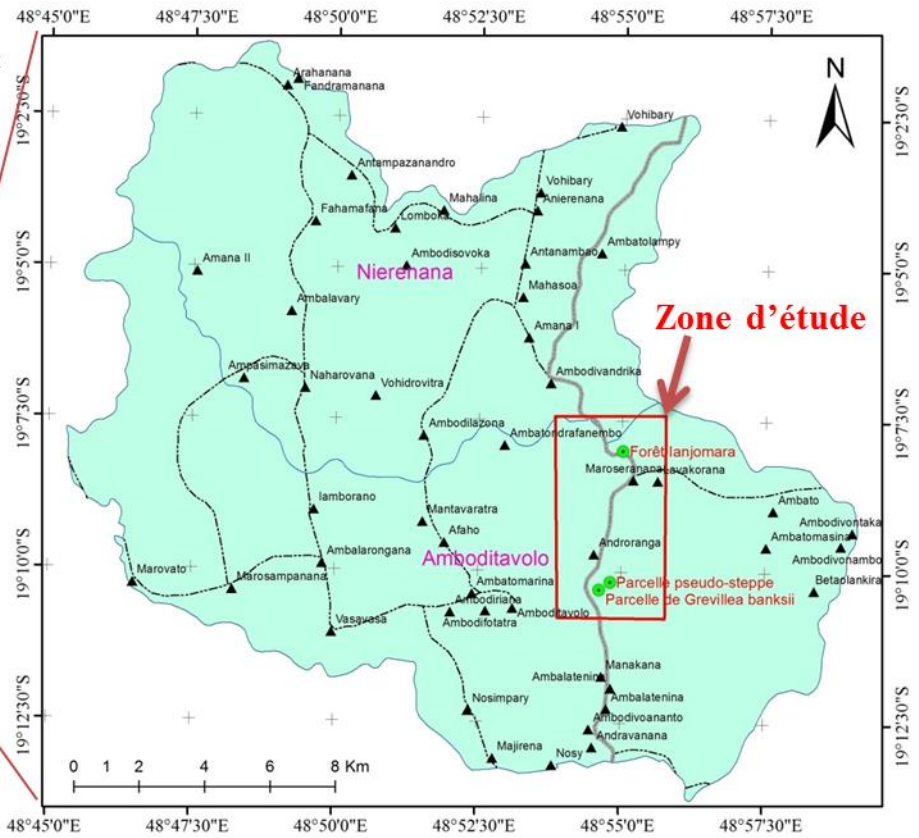
II.1 Site d'étude

Le site principal de cette étude est caractérisé par des reliques de forêt naturelle entourées par des surfaces largement envahies par *G. banksii* dans le centre Est de Madagascar (19° 07'S; 48° 54'E), Forêt de Ianjomara – Vatomandry (Carte 1). Cette formation appartient à la forêt dense humide de basse altitude de la région orientale malagasy où *D. trichocarpa* et *I. bijuga* sont actuellement rarement observés. Différentes parcelles ont été identifiées dont une parcelle forestière non influencée par *G. banksii*, une parcelle complètement envahie par *G. banksii* et une dernière parcelle en dehors de la formation forestière et dépourvue de *G. banksii* (zone recouverte généralement par des espèces herbacées sous forme de pseudo-steppe) (Photo 2). Ainsi, le principal critère du choix de l'emplacement des parcelles a été la physionomie de la végétation et la composition floristique. Selon Godron *et al.*, (1983), l'aire de relevé doit être une zone homogène caractérisée par l'uniformité de ses conditions écologiques et par l'homogénéité apparente de la physionomie et de la composition floristique du couvert végétal.

Chapitre I: Caractérisation des parcelles colonisées par *G. banksii* dans la partie Est de Madagascar

Légende:

- Parcelles de prélèvement
- ▲ Villages
- Route Nationale N°11a
- - - Piste
- Limite commune
- Zone d'étude



Carte 1. Localisation de la zone d'étude (source : BD 500, FTM)



Photo 2 Les trois parcelles d'étude

II.2 Inventaire floristique et prélèvement de sols et de racines

II.2.1 Relevé de la végétation

Les relevés de la végétation ont été réalisés pendant la période maximale de végétation c'est-à-dire à la fin de la période de pluie (fin du mois de mars 2011). L'inventaire floristique a été effectué sur trois types de végétation de la zone d'étude.

- forêt naturelle composée d'essences natives sans *G. banksii*
- formation homogène de *G. banksii*
- pseudo-steppe : terme proposé par Trochain, (1957) pour désigner une formation végétale constituée par des graminées vivaces telles que *Aristida* sp., *Stipa* sp. en touffes compactes non contigües à leur base, mais rapprochées au niveau des feuilles.

Le relevé floristique a été réalisé dans des parcelles circulaires de rayon de 10 m soit la surface de relevé de 314 m². Elles sont espacées de 50 à 100 m selon la répartition des types de formations végétales étudiées (Figure 2). Les parcelles ont été placées le long d'un transect partant de l'intérieur d'une forêt naturelle, passant par la formation homogène de *G. banksii* jusqu'à la formation de pseudo-steppe.

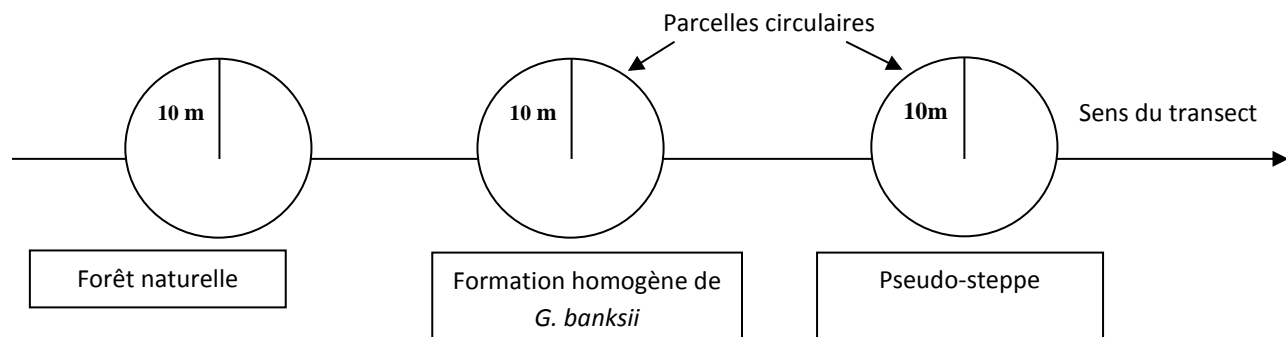


Figure 2. Schéma de dispositif d'échantillonnage d'inventaire floristique

Dans chaque parcelle, la présence de toutes les espèces rencontrées a été notée et les espèces ligneuses ayant un diamètre supérieur à 2 cm ont été repérées pour pouvoir calculer :

- la densité totale (D) qui est l'abondance de toutes les espèces ligneuses dans la parcelle exprimée en nombre d'individus par hectare ($N \cdot ha^{-1}$) ;
- la fréquence des espèces qui est donnée par la formule : $F = (n_i/N) \times 100$; avec n_i nombre de l'espèce i et N nombre total des espèces.

Quelques-unes des espèces ont pu être identifiées sur le terrain, des spécimens d'herbier ont été emmenés au laboratoire pour les autres. Les herbiers ont été examinés par M. Razakamalala Richard, Botaniste du MBG (Missouri Botanical Garden) de Madagascar et ont été comparés aux herbiers de référence du PBZT (Parc Botanique et Zoologique de Tsimabazaza) d'Antananarivo-Madagascar. La correction de l'orthographe des noms scientifiques des plantes a été effectuée à l'aide de la base de données *Tropicos* du MBG et celle d'*e-Floras* qui sont des catalogues de plantes vasculaires de Madagascar établis par le MBG.

II.2.2 Prélèvement d'échantillons de sol

La structure et le fonctionnement des microorganismes dépendent de plusieurs facteurs liés à l'aire d'étude. En conséquence, le nombre de prélèvement doit être représentatif de la surface de l'écosystème étudié. Or, dans le cadre d'une étude comparative de deux ou trois sites à priori contrastés, la variabilité intra-site des communautés microbiennes peut atténuer l'effet inter-sites. Cette limitation peut être contournée par l'analyse d'échantillons composites, c'est-à-dire par un mélange d'échantillons de sols issus des répliquats spatiaux d'un même site. Ainsi, la stratégie d'échantillonnage est déterminante dans la caractérisation des communautés microbiennes du sol et dans l'estimation de leur diversité. En effet, trois échantillonnages du sol ont été effectués pour chaque parcelle. Les trois échantillons de sols ont été mélangés pour chaque parcelle afin d'obtenir un sol composite. Les sols ont été conservés à l'air libre pour les analyses microbiologiques et à -20°C pour les analyses moléculaires.

II.2.3 Prélèvement d'échantillons de racine

Des échantillons de racine de chaque espèce de plante répertoriée dans les différentes parcelles ont été prélevés. Le prélèvement a été effectué préférentiellement sur les jeunes plantules pour qu'on puisse avoir des racines fines. Pour les grands arbres, une méthode de suivi racinaire a été adoptée afin de s'assurer que les racines récoltées appartiennent à la plante cible. Pour cela, les racines ont été soigneusement déterrées à partir de la base du tronc jusqu'aux extrémités. Les racines prélevées ont été conservées à +4°C jusqu'à leur observation au laboratoire.

II.3 Statut mycorhizien des espèces de plante de trois parcelles

II.3.1 Observation des ectomycorhizes

L'observation de l'ectomycorhize sur les racines a été effectuée sous loupe binoculaire au grossissement X40. Les critères d'identification des mycorhizes ectotrophes (statut symbiotique) ont été basés sur la technique décrite par Agerer (1991) qui consiste à l'observation de la couleur et de la texture du manteau, la couleur et l'abondance des hyphes externes, la présence et la couleur des cordons des morphotypes d'ectomycorhize.

II.3.2 Observation des endomycorhizes à vésicules et à arbuscules (MVA)

Les racines fines de chaque plante prélevées sur les parcelles d'étude ont fait l'objet de l'observation des endomycorhizes à vésicules et à arbuscules. Ces derniers ne sont pas visibles à l'œil nu. La méthode décrite par Phillips et Hayman, (1970) a été utilisée pour vérifier la présence de ces structures endomycorhiziennes dans les racines. Pour cela, les racines fines ont été colorées par immersion dans une solution de bleu trypan 0,5% pendant 30 min à 90°C après trempage dans une solution de KOH 10% à 90°C pendant 30 min. Pour chaque système racinaire, 100 fragments de racine fine de 1 cm de long ont été étalés entre lame et lamelle et examinés sous microscope optique (Grossissement x40). La présence des vésicules et/ou des mycéliums de champignon dans des fragments de racine indique l'infection endomycorhizogène de la plante en question par des champignons endomycorhiziens.

II.4 Analyses des échantillons de sol sous l'influence ou non de *G. banksii*

II.4.1 Analyse chimique

Pour chaque échantillon de sol, des analyses permettant de décrire globalement les propriétés chimiques du sol ont été réalisées. Le pH a été mesuré par électrométrie dans une suspension sol-solvant (1 : 2,5 ; v/v). Le carbone organique total (C) a été dosé selon la méthode par oxydation avec du $K_2Cr_2O_7$, en présence de H_2SO_4 concentré. L'azote total a été déterminé par la méthode de Kjeldahl (Black *et al.*, 1965) tel que décrite par Pauwels *et al.* (1992). Celle-ci consiste à la minéralisation complète de l'azote organique par traitement à chaud avec un mélange d'acide sulfurique concentré et d'acide salicylique, et un catalyseur constitué de $CuSO_4 + Se$. La minéralisation est suivie d'une distillation par entraînement à la vapeur de l'azote sous forme de NH_3 , après alcalinisation de l'extrait minéralisé avec du NaOH. Le distillat a été fixé dans l'acide borique (H_3BO_3) et ensuite titré avec l'acide sulfurique ou l'acide chlorhydrique dilué (0,01N). Le phosphore assimilable a été déterminé par la méthode Bray II. Cette méthode combine l'extraction du phosphore en milieu acide (HCl 0,1 N) à la

complexation par le fluorure d'ammonium (NH_4F 0,03 N) de l'aluminium lié au phosphore. Le dosage du phosphore extrait a été ensuite fait par spectrophotométrie (réglée à la longueur d'onde de 665 nm) avec le bleu de molybdène.

II.4.2 Analyse microbiologique

Les microorganismes telluriques notamment les champignons et les bactéries sont impliqués dans de nombreux processus biogéochimiques. Il est donc important de connaître la quantité et les activités de ces microorganismes dans le sol.

II.4.2.1 Dénombrement des microorganismes telluriques

Cinq grammes de chaque échantillon de sol ont été nécessaires pour démarrer la série de dilution en cascade de 10^{-1} à 10^{-5} avec la solution de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1M. Cent microlitres de chaque dilution ont été prélevés et étalés dans des boîtes de pétri stériles (140°C , 20 min), contenant préalablement le milieu de culture avec trois répétitions pour chaque échantillon et chaque milieu de culture. Ce dernier étant spécifique pour chaque groupe fonctionnel de microorganismes à dénombrer :

- ***Tryptic Soy Agar*** (TSA) est utilisé pour le dénombrement de la flore totale cultivable du sol. Le comptage de toutes les colonies formées a été effectué tous les 24h pendant 72h d'incubation à 30°C .
- ***Phosphate TriCalcique*** (TCP) : sur ce milieu de culture, les microorganismes capables de solubiliser le phosphate forment un halo autour de la colonie bactérienne. Ce halo est formé après 48h d'incubation à 30°C .
- ***Waksman*** (Waksman, 1961) : ce milieu permet de dénombrer la population des actinomycètes. Ce sont des microorganismes saprophytes Gram (+) qui se développent lentement sur milieu gélosé ; ils sont connus par leurs capacités à produire des antibiotiques. Ainsi, les cultures sur milieu Waksman ont été incubées dans une étuve à 30°C et la lecture des résultats a été effectuée après 7 jours d'incubation.
- ***Yeast Mannitol Agar*** (YMA), (Vincent, 1970). C'est un milieu de culture permettant de dénombrer et d'isoler le *Rhizobium* dans le sol. La flore de *rhizobium* est dénombrable après 24h d'incubation pour ceux qui sont à croissance rapide et jusqu'à 7j pour ceux qui sont à croissance lente.

La composition et la méthode de préparation de chaque milieu de culture sont détaillées dans l'annexe 1.

II.4.2.2 Mesure des activités enzymatiques des microorganismes du sol

Un test enzymatique est un indice d'activité microbienne du sol. Celui-ci permet de visualiser le potentiel de dégradation des substrats organiques du sol par certaines enzymes, elles-mêmes produites par les micro-organismes du sol.

II.4.2.2.1 Activité microbienne globale du sol

La capacité de différentes enzymes (lipases, protéases, estérases etc.) du sol à hydrolyser la fluorescéine diacétate (FDA) a été exploitée, en utilisant la méthode décrite par Schnürer et Rosswall, (1982), pour déterminer l'activité microbienne globale du sol.

Une solution tampon phosphate à pH 7,6 a été ajoutée dans les échantillons du sol préalablement tamisés à 2mm de maille. La réaction d'hydrolyse est déclenchée en ajoutant le substrat FDA (sigma F7378) 1mg.ml⁻¹. Après 1h d'incubation à 30°C sous agitation, une solution d'acétone pure a été utilisée pour arrêter la réaction d'hydrolyse. La mesure de la densité optique du surnageant à 490nm a été réalisée après une centrifugation pendant 5 min à 10.000rpm. Une gamme étalon de fluorescéine a été préparée à partir de la solution standard de fluorescéine (1mg.ml⁻¹). L'équation de la courbe de tendance formée par les valeurs de densité optique (DO) de cette gamme étalon permet de calculer les valeurs exactes des produits d'hydrolyse dans chaque échantillon de sol. L'activité microbienne globale du sol est exprimée en µg de fluorescéine libérée par heure et par gramme du sol (µg de fluorescéine.h⁻¹.g⁻¹ de sol).

II.4.2.2.2 Activité des phosphatases du sol

L'activité des phosphatases de chaque échantillon de sol a été mesurée en milieu acide (Phosphatase acide) de pH 6 et en milieu alcalin (Phosphatase alcaline) de pH 11. Le suivi de l'hydrolyse phosphatasique du sol a été basé sur la méthode décrite par Tabatabai *et al.*, (1982). Une solution de *p*-Nitrophenyl Phosphate (ou *p*NPP) à 5mM a été utilisée comme substrat de la réaction d'hydrolyse. Cette solution a été préparée à partir du produit en pastille de *p*NPP (Réf. 104-0 Sigma Phosphatase Substrate). Des mélanges de ce substrat avec des échantillons de sol et de tampon à pH6 et 7 (annexe 2) ont été préparés.

Après agitation, les solutions ont été incubées à 37°C pendant 1 h, puis des solutions de CaCl₂ 0,5M et de NaOH 0,5M ont été rajoutées pour arrêter la réaction d'hydrolyse. Les solutions ont été par la suite filtrées après centrifugation 5 min à 10 000rpm. Du para-Nitrophenol (*p*N) est libéré par l'activité phospho-monoestérasique. Sa concentration a été mesurée par

colorimétrie à 400nm (spectrophotomètre). Les résultats sont exprimés en μg de *pN* produits par gramme d'échantillon et par heure d'incubation ($\mu\text{g. pN. g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

II.4.3 Détermination de l'intensité mycorhizogène du sol

La détermination de l'abondance des champignons endomycorhiziens fait appel au dénombrement des spores, ou de façon plus fiable, à la détermination du potentiel infectieux mycorhizogène des sols (Plenchette *et al.*, 1989).

Une quantification des spores a été réalisée dans une suspension du sol à travers une série de tamis avec des pores de taille différente soit de 50, 80, 100 et 200 μm sous jet d'eau. Le filtrat obtenu a été centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min. Le surnagent a été éliminé puis remplacé par une solution de saccharose à 60%. Une centrifugation de la solution est de nouveau réalisée à 1000 rpm pendant 3 min. Le surnagent a été filtré à travers un papier Wattman afin de récupérer les spores. L'observation a été faite sous loupe binoculaire pendant laquelle les spores ont été dénombrées puis classées selon leur taille et leur couleur (Walker, 1983).

La détermination du potentiel mycorhizogène de chaque sol a été faite en utilisant une plante hautement mycotrophe (le maïs pour notre cas). Les plantules de maïs ont été cultivées sur des sols préalablement préparés dans des pots plastiques. Six dilutions du sol ont été préparées avec un facteur de dilution ($a = 4$) et chaque dilution a été répétée 5 fois. Après 20 jours de culture, les racines ont été colorées avec la solution de bleu trypan 0,5% (voir annexe 3) pendant 15 min à 90°C et observées sous microscope optique à fort grossissement.

La longueur de propagule par 100g de sol a été déterminée selon la formule :

$$\text{Log}_{10} \text{ MPN} = (x \log a) - K$$

Avec, x = moyenne des godets mycorhizés,

a = facteur de dilution,

K est donné dans la table de Fischer et Yates (1948 ; 1970) (voir annexe 4).

II.4.4 Détermination de la diversité microbienne du sol par la technique de biologie moléculaire (PCR-DGGE)

II.4.4.1 Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique de chaque échantillon du sol a été extrait en utilisant le protocole décrit par le fabricant de Kit d'extraction <<Power Max TM Soil DNA Isolation Kit>> (Mo. Bio Laboratories). L'extrait d'ADN a été conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation.

II.4.4.2 Amplification par PCR des fragments de 16S-ADNr

Le mélange PCR est constitué à basse température par ajout successif des réactifs dont la nature et la concentration finale sont indiquées dans le tableau 1. Il s'agit principalement des amorces et du mélange de quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADNr et de l'ADN polymérase. Ce mélange a été ajouté en dernier pour éviter toute amplification non spécifique. Une fois le mélange est terminé, 1 µL de la solution d'ADN matriciel à amplifier a été ajouté, ce qui conduit à un volume final par échantillon de 25µL.

Tableau 1 : Composition réactionnelle d'une réaction PCR

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume pour une réaction
Tampon 10X	10X	1X	2,5µl
MgCl₂	25mM	1,5mM	1,5µl
dNTPs	10mM	0,2mM	0,5µl
Amorce 358f-GC	25µM	0,2µM	0,2µl
Amorce 907r	25µM	0,2µM	0,2µl
BSA	10mg/ml	0,4mg/ml	1µl
Taq polymerase	5U/µl	1U/réaction	0,2µl
Eau	-	-	17,9µl

Les composants préparés ont été introduits au plus vite dans le thermocycler pour la réaction d'amplification. Cette dernière a été effectuée selon le programme suivant :

Tableau 2 : Cycle de température de la réaction PCR

	Température	Durée
Dénaturation initiale	94°C	4 min
Dénaturation	94°C	50s
Hybridation	56°C	50s
Elongation	72°C	50s
Elongation finale	72°C	10min

II.4.4.3 Visualisation des fragments amplifiés

L'amplification de l'ADN a été vérifiée par électrophorèse des produits PCR sur un gel d'agarose à 1% (w:v). Le gel a été préparé, par dissolution au four à micro-ondes, 2,5 g d'agarose dans 250ml de tampon TAE 1X. Le mélange a été coulé dans un moule horizontal équipé de plusieurs rangées de peigne. Après une durée minimale de polymérisation de 30 min, le gel a été totalement immergé dans une cuve électrophorétique contenant du tampon

TAE 1X puis les peignes ont été délicatement retirés. Au dépôt des échantillons dans les puits, un aliquot de 4µl de chaque produit PCR a été préalablement mélangé à 1µl de colorant de charge 6X (20ml EDTA 0,1M ; 0,5g SDS 0,5% ; 0,05g bleu de bromophénol 0,05% et 40g de sucrose 40%. Le volume a été ajusté à 100µl sur un morceau de parafilm pour la densification et la visualisation du mélange. Un marqueur de taille 100 paires de base (Promega) a été également mélangé avec du colorant de charge et déposé dans chaque rangée dans les mêmes conditions pour contrôler la taille des fragments amplifiés. La migration s'effectue pendant 90 min à 120 volts. La visualisation de l'ADN se fait sur une plaque UV (GelDoc-It d'UVP) après coloration du gel sur la solution de bromure d'éthidium (0,5mg/ml) pendant 20 min suivie de rinçage à l'eau distillée pendant 20 min.

II.4.4.4 Analyse DGGE et révélation du gel

La méthode décrite par Muyzer *et al.*, (1996) avec les conditions expérimentales de Schauer *et al.*, (2003) a été utilisée pour l'analyse DGGE. Elle se déroule selon quatre étapes :

- **La préparation d'un gel DGGE 8%** avec un gradient en substances dénaturantes allant de 30 à 70%. Une solution contenant 80% de substances dénaturantes est composée d'une solution d'urée 7M et de formamide déionisée à 40% (v:v) (voir tableau 3).
- **La migration des produits PCR** a été effectuée pendant 16h à 60 volts dans un bain de TAE 1X (40mM Tris, 20mM acétate de sodium, 1mM EDTA) maintenu à 65°C.
- **La coloration de l'ADN** avec du SYBR Gold (Molecular Probes). Le gel a été coloré pendant 30 min dans une solution de SYBR Gold dilué 1/10 000 (25 µl de SYBR Gold dans 250ml de TAE 1X). Puis le gel a été décoloré dans une solution de TAE 1X pendant 30 min.
- **La visualisation des fragments migrés** a été faite sur une plaque UV (GelDoc-It d'UVP), positionnée sur le bouton SYBR Gold.

Les solutions utilisées pour la préparation du gel ont été préparées à partir de deux solutions mères de polyacrylamide contenant respectivement 0% et 80% de substances dénaturantes et des réactifs nécessaires à la polymérisation du gel, c'est-à-dire une solution d'APS à 10% w:v (Eurobio) et de TEMED (Eurobio GETEM18-0T). Les deux mix (30% et 70%) préparés pour former le gradient ont un volume final de 13ml chacun. Ces solutions sont présentées ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3 : Composition d'un gel DGGE 8%

	Solution 0% dénaturant	Solution 80% dénaturant	TEMED 100%	APS 10%	Gel-Dye 0.5%
Solution 30%	8,125ml	4,875ml	13 µl	130 µl	0 µl
Solution 70%	1,625ml	11,375ml	13 µl	130 µl	130 µl

II.4.4.5 Analyse des profils DGGE

Les gels DGGE obtenus sont habituellement photographiés et l'image digitalisée est ensuite analysée en utilisant différentes techniques pour obtenir les profils DGGE. Dans notre cas, nous avons analysé nos profils DGGE par comparaison de tous les profils des échantillons de sol dans un même gel par identification visuelle des bandes. En effet, les bandes présentes dans chaque profil ont été d'abord dénombrées puis la position précise de chaque bande est bien notée afin de déterminer la présence ou l'absence des bandes communes entre les échantillons. Ces données nous permettent de déterminer le coefficient de similarité entre les profils DGGE. Pour cela, nous avons calculé le coefficient de similarité de Sorensen (Cs) pour évaluer le degré de similarité entre deux échantillons de sol selon la formule :

$$Cs = \frac{2j}{a+b}$$

Avec, *a* = nombre de bandes dans un échantillon A,

b = nombre de bandes dans un échantillon B,

j = nombre de bandes communes aux deux échantillons A et B

(Sorensen, 1948 ; Lindström, 1998 ; Murray *et al.*, 1996 ; Konstantinov *et al.*, 2003).

Une valeur de Cs égale à **0** indique que les échantillons sont complètement différents et une valeur **1** indique qu'ils sont identiques (Dice 1945).

II.4.4.6 Séquençage des fragments des gènes de 16S-rDNA

Les principales bandes DGGE ont été excisées du gel en utilisant un scalpel stérile. Chaque bande isolée a été récupérée et mise dans 60µl d'eau *Gibco* (ou dans de l'eau bidistillée stérile). L'élution se fait durant toute la nuit à + 4°C. Le surnageant a été récupéré dans des tubes eppendorf stériles après centrifugation pendant 1 min à 13 000 rpm. Un microlitre de l'éluant a été utilisé pour la ré-amplification des fragments d'ADN par PCR dans les mêmes conditions que précédemment. Les produits PCR ont été séquencés après avoir migré et ré-amplifiés dans du gel d'agarose 1% pour vérifier la pureté et la taille des fragments. Le séquençage des bandes a été effectué au sein du service bio-informatique du laboratoire de l'Institut Biologique Intégrative et des Systèmes (IBIS) de l'Université Laval-Canada.

Les séquences obtenues ont été alignées en utilisant le logiciel BioEdit version 7.0.9 (Hall T.A., 1999) et puis comparées avec la base des données de NCBI (National Center of Biotechnology Information) en utilisant le BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotid).

II.5 Traitement statistique des données

Toutes les données obtenues ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA/MANOVA) à l'aide du logiciel **Statistica**. Le test de Newman Keuls ($p < 0,05$) a été utilisé pour mettre en évidence les différences entre les variables. Une analyse en composante principale (ACP) à l'aide du logiciel **XLSTAT** a été également réalisée pour évaluer les liaisons entre les variables.

III. RESULTATS

III.1 Composition floristique des différentes parcelles

Les inventaires forestiers effectués dans les différentes formations végétales étudiées ont permis de recenser 48 espèces dont 10 endémiques. La composition floristique des 3 parcelles est donnée dans le tableau 4 ci-après. La richesse floristique de la forêt naturelle a été la plus élevée avec 29 espèces réparties dans 25 genres et 24 familles (Tableau 4).

Tableau 4 : Composition floristique des parcelles d'étude

	Formation à <i>G. banksii</i>	Pseudo- steppe	Forêt naturelle sans <i>G. banksii</i>
Nombre d'espèce	12	7	29
Nombre de genre	12	4	25
Nombre de famille	10	4	24
Densité des ligneux (N.ha ⁻¹)	94012	0	9809

Les familles les mieux représentées étaient les Arecaceae (3 espèces de *Dypsis*) et les Apocynaceae (3 espèces de *Landolphia*). Le nombre d'espèces inventoriées dans la végétation dégradée et de la formation homogène de *G. banksii* ont été respectivement de 9 et 12. Malgré l'apparence monospécifique de la pseudo-steppe, elle a été composée de 7 espèces qui ont été principalement des espèces appartenant à la famille des Poaceae et des Cyperaceae.

La densité de *G. banksii* de la formation homogène (94012 N.ha⁻¹) était dix fois supérieure à celle des arbres et arbustes de la forêt naturelle (9809 N.ha⁻¹) (Tableau 4). Ce résultat montre la capacité de *G. banksii* à coloniser un espace ouvert et à dominer les autres espèces. La densité la plus faible a été enregistrée dans la formation dégradée avec 20 N.ha⁻¹. Ce sont

surtout des *Ravenala madagascariensis* (Strelitziaceae) ayant résisté au passage du feu qui y persistaient.

Le tableau 5 ci-dessous résume la fréquence et le recouvrement des trois espèces ligneuses les plus fréquentes pour les deux formations végétales (Forêt naturelle, *G. banksii*) et les trois espèces herbacées ayant un recouvrement élevé pour la pseudo-steppe. Pour la forêt naturelle, *Uapaca ferruginea* Baill. était l'espèce ligneuse la plus fréquente (41%) suivie par *Dypsis* sp. (14%) et *Gaertnera macrostipula* (7%). *Clidemia hirta* était l'espèce herbacée la plus dominante avec un recouvrement de 5%.

Tableau 5 : Fréquence des espèces ligneuses (Fréq.) et recouvrement (Rec.) des espèces herbacées dans les différentes formations végétales étudiées

Nom scientifique	Familles	Formes biologiques	Fréq. et Rec. (%)
Forêt naturelle			
<i>Uapaca ferruginea</i> Baill.	Euphorbiaceae	Arbre	41
<i>Dypsis</i> sp2.	Arecaceae	Arbre	14
<i>Gaertnera macrostipula</i> Baker	Rubiaceae	Arbre	7
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	Melastomataceae	Herbe	5
Formation à <i>G. banksii</i>			
<i>G. banksii</i> R. Br.	Proteaceae	Arbre	98
<i>Ravenala madagascariensis</i> Sonn.	Strelitziaceae	Arbre	2
<i>Macaranga cuspidata</i> Boivin ex Baill.	Euphorbiaceae	Arbre	1
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don	Melastomataceae	Herbe	7
Pseudo-steppe			
<i>Aristida similis</i> Steud.	Poaceae	Herbe	80
<i>Panicum luridum</i> Hack.	Poaceae	Herbe	5
<i>Fimbristylis</i> sp.	Cyperaceae	Herbe	2
<i>Commelina</i> sp.	Commelinaceae	Herbe	2

La fréquence de *G. banksii* atteint 98% dans la formation envahie par cette espèce. Cette fréquence ne dépasse pas 1% pour les autres espèces ligneuses telles que *Ravenala madagascariensis* et *Macaranga cupsida*. L'espèce herbacée la plus fréquente était *Clidemia hirta* avec un recouvrement de 7%.

L'espèce herbacée ayant un recouvrement le plus élevé c'est-à-dire la plus fréquente au niveau de la pseudo-steppe était *Aristida similis* qui a un taux de recouvrement allant jusqu'à 80%. Les autres espèces ont un faible recouvrement ne dépassant pas 5%, c'était le cas de *Panicum luridum* et *Fimbristylis* sp.

III.2 Physionomie des différentes formations végétales étudiées

III.2.1 La forêt naturelle

Il s'agit d'une formation multistrate avec:

- une strate basse inférieure à 1m composée essentiellement de *Clidemia hirta* (L.) (Melastomataceae), *Rubus* sp. (Rosaceae),
- une strate moyenne (2 à 4m) formée d'arbustes comme *Aphloia theiformis* (Vahl) Benn. (Aphloiaceae), *Streblus dimepate* C.C.Berg (Moraceae), *Gaertnera macrostipula* Baker (Rubiaceae), *Dracaena reflexa* Lam. (Apsaragaceae)
- une strate haute (4 à 8 m) avec *Dypsis* sp. (Arecaceae), *Uapaca ferruginea* Baill. (Euphorbiaceae), *Scolopia maoulidae* S. Hul, Labat et O. Pascal (Salicaceae), *Noronhia emarginata* (Lam.) Thouars (Oleaceae).

On note la présence abondante de liane *Tacca leontopetaloides* (L.) Kuntze (Dioscoreaceae).

III.2.2 La formation à *G. banksii*

La population de *G. banksii* vue de loin apparaît comme une formation monospécifique. Cependant, sous les pieds de *G. banksii*, quelques espèces de la famille des Melastomataceae telles que *Clidemia hirta* (L.) D. Don et *Tristemma virusanum* Juss. ainsi que des espèces de graminées *Panicum luridum* Hack. *Aristida similis* Steud. parviennent à se développer notamment dans les ouvertures ou sur les lisières.

III.2.3 La pseudo-steppe

La pseudo-steppe se présente comme une formation herbacée basse (0,3 m) constituée principalement d'espèces d'herbes appartenant à la famille des Poaceae (*Aristida similis* Steud.) et des Cyperaceae (*Fimbristylis* sp.). Les espèces ligneuses ont été absentes. On note la présence de quelques espèces de légumineuses comme *Desmodium* sp.

III.3 Statut symbiotique des plantes dans les parcelles d'étude

L'examen macroscopique et microscopique des racines couplé avec la recherche bibliographique a montré que la majorité des espèces de plante dans les parcelles d'étude ont été endotrophes (capables de s'associer avec les champignons endomycorhiziens, MVA). Une seule espèce, *Uapaca ferruginea* Baill. est capable de s'associer à la fois avec des endomycorhizes et des ectomycorhizes. Le statut symbiotique de toutes les espèces de plantes recensées dans les parcelles d'étude est présenté dans le tableau 6.

Chapitre I: Caractérisation des parcelles colonisées par *G. banksii* dans la partie Est de Madagascar

Tableau 6 : Statut symbiotique des espèces d'arbre et d'arbuste dominantes des trois parcelles d'étude

Espèces de plante	Famille	Parcelle	Statut symbiotique
<i>Agelaea pentagyna</i> (Lam.) Baill. (?)	Connaraceae	F	MA
<i>Aphloia theiformis</i> (Vahl) Benn. (n)	Aphloiaceae	F	MA+
<i>Aristida similis</i> Steud. (?)	Poaceae	G et P	MA+
<i>Burasaia madagascariensis</i> DC. (E)	Menispermaceae	F	MA
<i>Cinnamum camphoratum</i> Blume (n)	Lauraceae	G	MA+
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don (n)	Melastomataceae	F et G	(MA)
<i>Colubrina decipiens</i> (Baill.) Capuron (n)	Rhamnaceae	F	MA
<i>Commelina</i> sp. (?)	Commeliceae	P	MA+
<i>Dalbergia madagascariensis</i> Vatke (E)	Fabaceae	F	MA+
<i>Dombeya dolichophylla</i> Arènes (?)	Malvaceae	F	MA
<i>Dracaena reflexa</i> Lam. (n)	Asparagaceae	F	(MA)
<i>Dichapetalum leucosia</i> (Spreng.) Engl. (E)	Dichapetalaceae	F	MA
<i>Dyopsis</i> sp. (?)	Arecaceae	F	(MA)
<i>Gaertnera macrostipula</i> Baker (?)	Rubiaceae	F	MA
<i>Grevillea banksii</i> R. Br. (n)	Proteaceae	G	(MA)
<i>Harungana madagascariensis</i> Lam. Ex Poir.	Hypericaceae	G	MA+
<i>Hugonia</i> sp. (?)	Linaceae	F	MA
<i>Landolphia myrtifolia</i> (Poir.) Markgr. (E)	Apocynaceae	F	MA
<i>Landolphia</i> sp. (?)	Apocynaceae	F	NM
<i>Landolphia gummifera</i> (Poir.) K. Schum. (E)	Apocynaceae	F	(MA)
<i>Macaranga cuspidata</i> Boivin ex Baill (?)	Euphorbiaceae	G	MA+
<i>Noronhia emarginata</i> (Lam.) Thouars (E)	Oleaceae	F	MA+
<i>Osmunda regalis</i> L. (?)	Osmondaceae.	F	MA
<i>Ouratea</i> sp. (?)	Ochnaceae	F	MA
<i>Panicum luridum</i> Hack. (?)	Poaceae	G et P	MA
<i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. et Thonn. (n)	Phyllanthaceae	G	(MA)
<i>Poupartia chapelierii</i> (Guillaumin) H. Perrier(E)	Anacardiaceae	F	MA+
<i>Psorospermum fanerana</i> Baker (E)	Clusiaceae	F	MA
<i>Ravenala madagascariensis</i> Sonn. (E)	Strelitzaceae	F et G	(MA)
<i>Rubus</i> sp. (?)	Rosaceae	F	MA+
<i>Sauvagesia erecta</i> L. (n)	Ochnaceae	G	MA
<i>Scolopia maoulidae</i> S. Hul, Labat et O. Pascal (?)	Salicaceae	F	MA
<i>Streblus dimepate</i> (Bureau) C.C. Berg (?)	Moraceae	F	MA
<i>Tacca leontopetaloides</i> (L.) Kuntze (?)	Discoreaceae	F	MA
<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume (?)	Cannabaceae	P	MA+
<i>Tristemma virusanum</i> Juss. (n)	Melastomataceae	G	MA
<i>Trophis montana</i> (Leandri) C.C. Berg (?)	Moraceae	F	MA
<i>Uapaca ferruginea</i> Baill. (E)	Euphorbiaceae	F	MA et ECM
<i>Voacanga thouarsii</i> Roem. et Schult. (n)	Apocynaceae	G	NM

(E) endémique, (n) non endémique, (?): pas d'information, (AM) mycorhize à arbuscules, (MA) faiblement mycorhizé, (MA+) fortement mycorhizé, (MA et ECM) coexistence de mycorhize à arbuscule et d'ectomycorhize, (F) parcelle Forestier, (G) parcelle de *G. banksii*, (P) parcelle de *Pseudo-steppe*

III.4 Propriétés chimique et microbiologique du sol de chaque parcelle

III.4.1 Propriétés chimiques des sols d'étude

Les résultats des analyses chimiques du sol des 3 parcelles d'étude sont donnés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Propriétés chimiques des sols de trois parcelles d'étude

	pH(eau)	C (%)	N (%)	P (ppm)	K(meq/100g)
Sol sous Pseudo-steppe	6,27	1,15	0,113	2,3	0,026
Sol sous <i>G. banksii</i>	5,95	1,57	0,125	3,4	0,026
Sol forestier	5,53	2,67	0,205	3,6	0,095

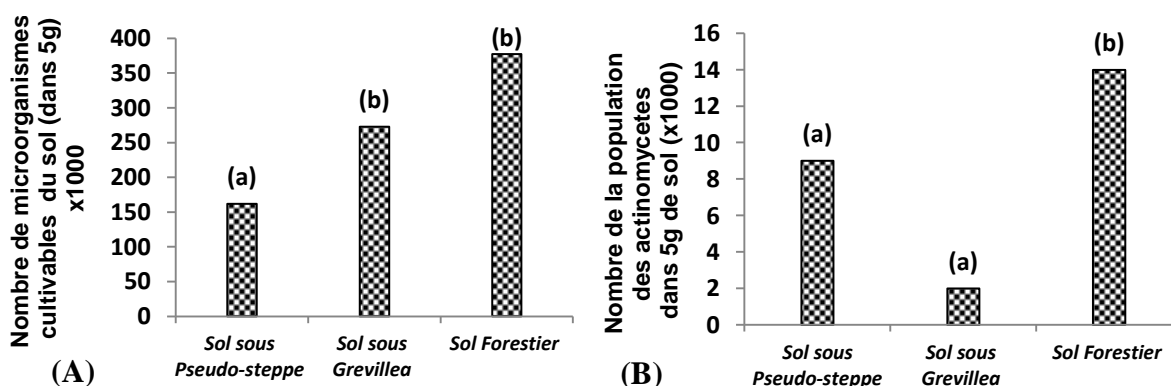
(pH) potentiel d'hydrogène ; (C) Carbone ; (N) Azote totale; (P) Phosphore assimilable; (K) Potassium total

Les analyses physico-chimiques des sols de chaque parcelle montrent que le sol sous *G. banksii* était plus acide et plus riche en phosphore disponible que ceux des autres parcelles. Ces résultats montrent également des quantités similaires en potassium, en carbone et en azote pour le sol sous *G. banksii* et pour le sol sous pseudo-steppe. Par contre, la quantité de phosphore disponible du sol sous *G. banksii* a été proche de celle du sol forestier.

III.4.2 Les communautés microbiennes des sols et leurs activités

III.4.2.1 Dénombrement de quelques groupes de microorganismes des sols

Au niveau de la structure des microorganismes des sols issus de différentes végétations, les nombres de la microflore totale cultivable dans le sol sous l'influence de *G. banksii* et celle sous la forêt naturelle ont été significativement supérieurs à ceux enregistrés dans le sol sous pseudo-steppe (Figure 3A). Cependant, les nombres des actinomycètes et ceux des microorganismes capables de solubiliser le phosphate ont été comparables pour le sol de la plante exotique et celui sous pseudo-steppe. Ces nombres ont été significativement inférieurs à ceux enregistrés sous la forêt naturelle (Figure 3B et 2C). Aucune différence significative n'a été enregistrée au niveau du nombre de colonie de bactéries fixatrices d'azotes atmosphériques (rhizobium et azotobacter) dans les trois types de sol (Figure 3D).



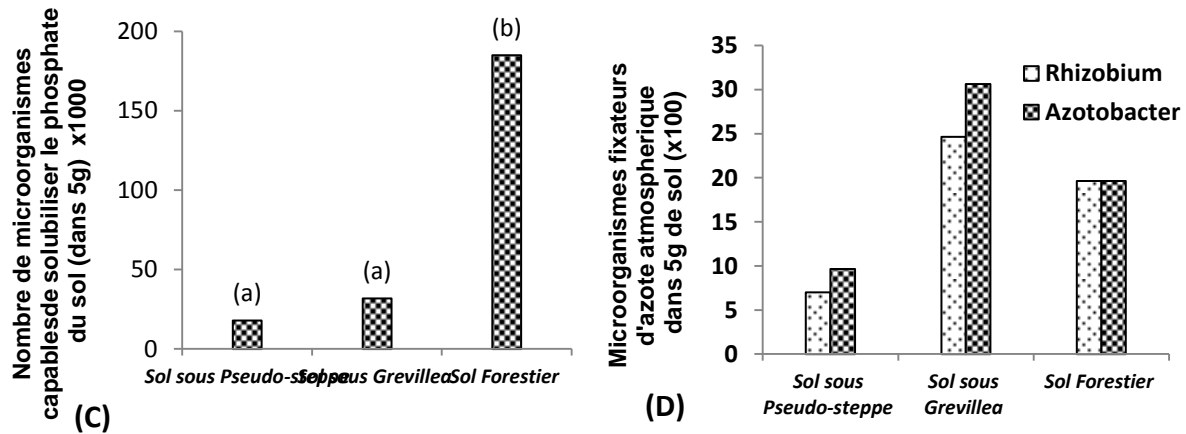


Figure 3. Densité de microorganismes dans les 3 types de sol : (A) nombre de flore totale cultivable du sol ; (B) nombre des actinomycètes ; (C) nombre de microorganismes solubilisant le phosphate (D) nombre des bactéries fixatrices d'azote

Les traitements suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls

III.4.2.2 Activités microbiennes des sols

Généralement, l'activité des enzymes phosphatasiques était faible et comparable au niveau des sols sous pseudo-steppe et sous *G. banksii* (Figure 4A). Cette activité a été la plus faible sous la plante exotique que ce soit en milieu acide qu'en milieu basique. L'activité de ce groupe d'enzymes, mesurée toujours en milieu acide et en milieu alcalin, a été plus stimulée au niveau du sol forestier (figure 4A). De même, la quantité de fluorescéine produite dans les sols sous pseudo-steppe et sous *G. banksii* était comparable. Par contre, cette quantité de fluorescéine produite qui indique l'activité microbienne globale a été significativement faible par rapport à celle enregistrée dans le sol forestier (Figure 4B).

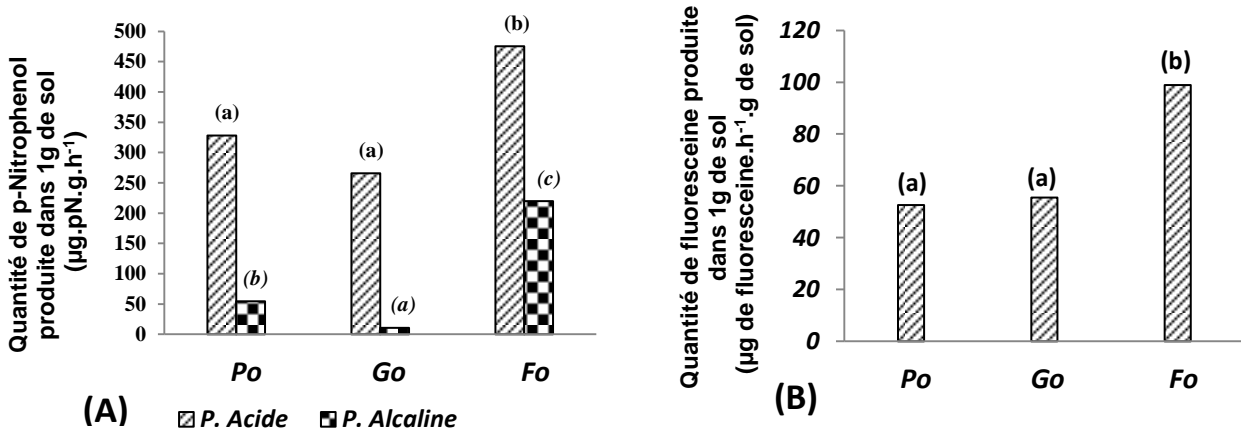


Figure 4. Variation des activités enzymatiques des microorganismes dans les 3 types de sol : (A) activités phosphatasiques du sol ; (B) activité microbienne globale du sol ;

Les traitements suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls

Sigles : (Po) sol sous Pseudo-steppe, (Go) sol sous *G. banksii*, (Fo) sol Forestier

III.4.2.3 Intensité mycorhizienne de sols

La mesure de l'intensité mycorhizienne du sol était effectuée suivant deux méthodes : le dénombrement des spores de champignons endomycorhiziens et l'évaluation du potentiel infectieux mycorhizogène (PIM) du sol en utilisant une plante hautement mycotrophique.

Les résultats ont montré qu'une différence significative a été observée en terme de nombre de spores de champignons endomycorhiziens entre les trois types de sol (Figure 5A). Ce nombre de spores a été faible dans le sol sous pseudo-steppe et le sol forestier. Le sol sous *G. banksii* présente un nombre élevé de spores endomycorhiziens par rapport aux autres types du sol (Figure 5A). Selon leurs couleurs, 5 types de spore ont été observés dans les 3 types du sol dont les spores de couleur noire, marron, brune, jaune et blanc (Figure 6). Parmi ces spores, 3 types (noir, marron, brun) seulement ont été trouvés dans le sol sous *G. banksii* contre 5 types dans le sol forestier et sol sous pseudo-steppe (Figure 6). Pour la quantité de propagules mycorhiziennes, elle a été significativement élevée dans le sol forestier par rapport à celles enregistrées dans le sol sous *G. banksii* ou sous pseudo-steppe (figure 5B).

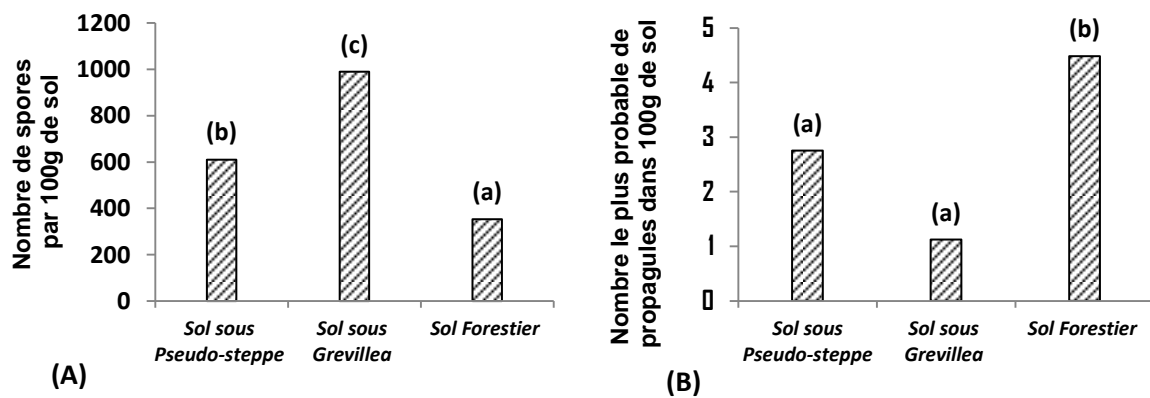
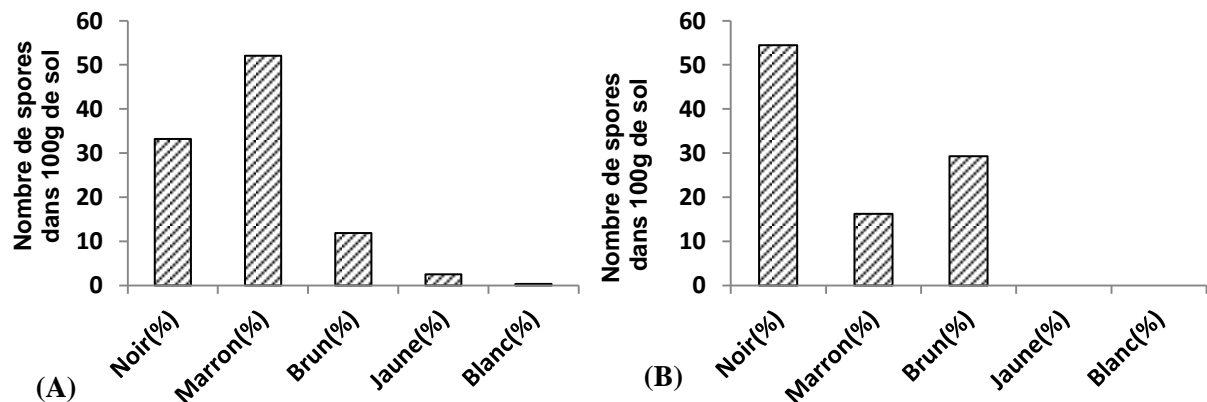


Figure 5. Intensité mycorhizogène du sol des trois parcelles d'étude : (A) Nombre de spores dans 100g de sol (B) nombre probable de propagules (NPP) dans 100g de sol

Les traitements suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls



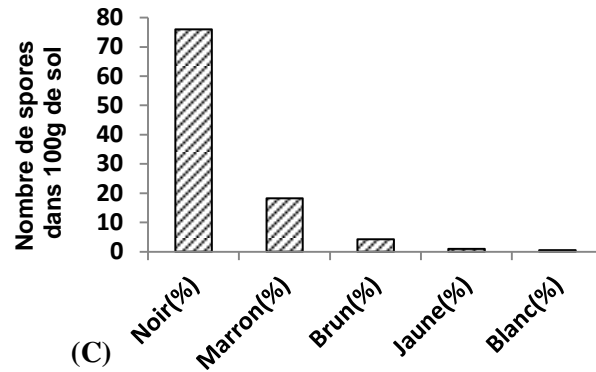


Figure 6. Types de spore observé dans chaque type du sol : (A) Sol forestier; (B) Sol sous *G. banksii*; (C) Sol sous pseudo-steppe

Après l'analyse en composantes principales des paramètres caractérisant les 3 types de sol, des corrélations positives ou négatives ont été observées entre certains paramètres selon les deux premiers axes F1 et F2 qui représentent respectivement 77,07% et 22,93% de l'inertie totale. Ainsi, tous les paramètres mesurés, à l'exception du nombre de spores et le pH du sol, contribuent à la constitution de l'axe F1. En effet, le sol Fo est caractérisé par une quantité élevée des paramètres suivants : l'activité globale de microorganisme du sol, l'activité phosphatasique en milieu acide et alcalin, la densité des microorganismes du sol (flore totale cultivable du sol, *Rhizobium*, *Azotobacter*, flore totale solubilisatrice de phosphate et Actinomycètes) et la quantité des éléments nutritifs indispensables pour les plantes dans le sol (phosphore assimilable, azote totale, potassium total et carbone total). Par contre, un pH faible et un nombre élevé de spores caractérisent respectivement le sol Po et Go.

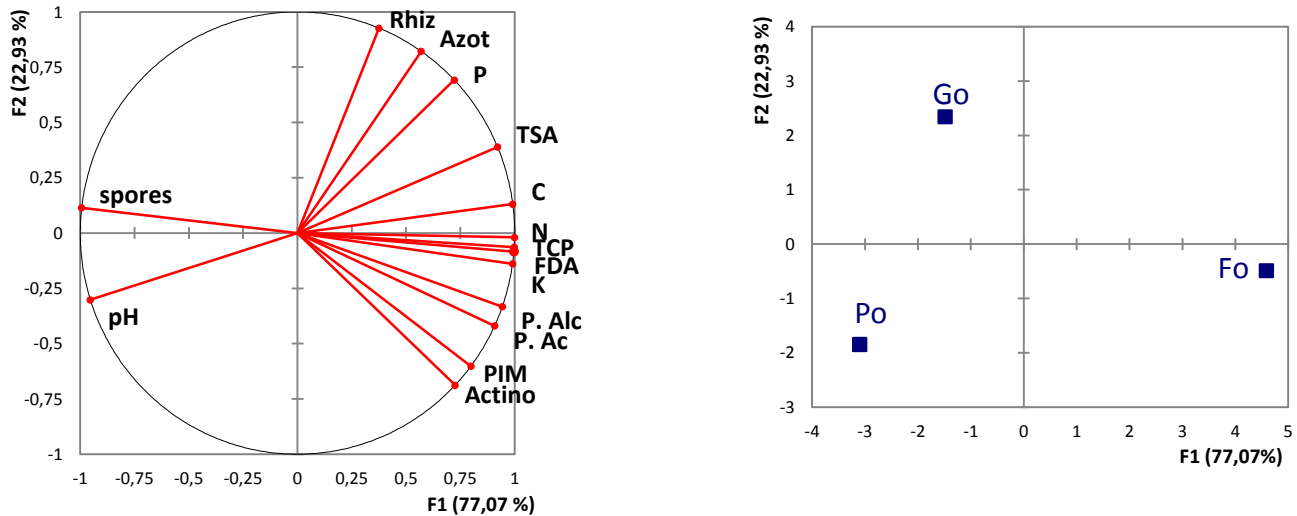


Figure 7. Corrélation entre les 3 types de sol avec ses qualités chimiques et microbiologiques

Signes : (*Rhiz*) *Rhizobium*; (*Azot*) *Azotobacter*; (*Actino*) *Actinomycètes*; (*P*) *Phosphore*; (*C*) *Carbone*; (*N*) *Azote*; (*K*) *Potassium*; (*pH*) *potentiel d'Hydrogène* (*TCP*) *flore totale solubilisatrice de phosphate*; (*FDA*) *Activité globale de microorganismes du sol*; (*TSA*) *flore totale cultivable du sol*; (*P. Alc*) *activité phosphatasique des microorganismes en milieu alcalin*; (*P. Ac*) *activité phosphatasique en milieu acide des microorganismes*; (*PIM*) *Potentiel Infectieux Mycorrhizogène du sol*; (*Go*) *sol sous *G. banksii**; (*Po*) *sol sous pseudo-steppe*; (*Fo*) *sol forestier*

III.5 Résultats de l'analyse moléculaire (PCR-DGGE)

Une amplification de la région 16S des échantillons d'ADN extraits des échantillons de sol des trois parcelles a été effectuée avec la technique de Polymerase Chain Reaction (PCR). Puis la diversité bactérienne du sol entre les sols des différentes parcelles a été déterminée en utilisant la technique de DGGE.

Une bonne amplification de la région 16S des bactéries du sol des trois parcelles d'étude a été obtenue (photo 3A) en utilisant le couple d'amorce 358f et 907r avec la composition réactionnelle définie après optimisation de certaines concentrations des réactifs (Matériels et Méthodes paragraphe II.4.4.2 Tableau 1) ainsi que le cycle de la température de polymérisation des fragments d'ADN (Matériels et méthodes paragraphe II.4.4.2 Tableau 2). Le résultat de la migration de ces produits PCR sur gel de polyacrylamide (analyse DGGE) avec un gradient de dénaturation 30-70% est illustré par la photo 3B. Les bandes présentes dans les profils illustrent la diversité des communautés microbiennes observées dans les échantillons du sol (photo 3B). En effet, le calcul du coefficient de similarité (Cs) entre les échantillons du sol (Tableau 8) basé sur la formule de Sorensen a montré que le sol sous *G. banksii* et le sol forestier ont un Cs (0,35) assez bas qui indique une faible similarité entre ces

deux échantillons. Tandis que la valeur de Cs (0,67) entre le sol sous *G. banksii* et le sol sous pseudo-steppe était proche de 1, ce qui indique un degré de similarité élevé entre ces échantillons de sol. L'identification moléculaire (séquençage) des bandes DGGE (Tableau 9) a montré également la diversité bactérienne dans les différents types de sol.

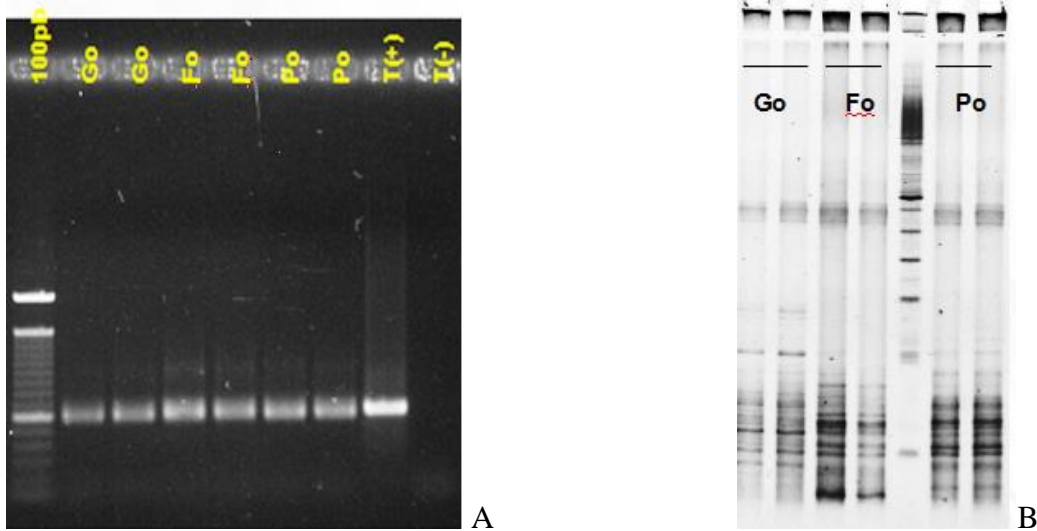


Photo 3 Profil des bandes PCR (A) et DGGE (B) des 3 types de sol sur gel visualisé sous UV

Sigles: (A) Bandes sur gel d'agarose des produits PCR des fragments d'ADN génomique du sol ; (B) Bandes sur gel de polyacrylamide (DGGE) des produits PCR des fragments d'ADN génomique du sol. (Go) sol sous *G. banksii*, (Fo) sol forestier, (Po) sol sous pseudo-steppe, T(+) : témoin positif (*E. coli*), T(-) : témoin négatif (eau Gibco), 100pb : marqueur de poids moléculaire

Tableau 8 : Coefficient de similarité (Cs) des échantillons de sol

Echantillon du sol	G	P	F
G	1,00		
P	0,67	1,00	
F	0,34	0,65	1,00

(G) sol sous *G. banksii*, (F) sol forestier, (P) sol sous pseudo-steppe

Chapitre I: Caractérisation des parcelles colonisées par *G. banksii* dans la partie Est de Madagascar

Tableau 9 : Diversité bactérienne dans les 3 parcelles (Fo, Go, Po)

Notation: (+) Présence, (-) Absence

Code des bandes DGGE	Sol forestier	Sol sous pseudo-steppe	Sol sous <i>G. banksii</i>	Pourcentage de similarité	Numéro d'accession	Position taxonomique
2-1-1	+	+	+	361/453 (80%)	GQ008606	<i>Uncultured bacterium</i>
2-1-3	-	+	+	446/529 (84%)	JQ994026	<i>Uncultured Burkholderia</i> sp.
2-1-5	+	-	-	468/502 (93%)	FR872388	<i>Burkholderia</i> sp.
2-1-6	+	-	-	433/524 (83%)	JF763852	<i>Burkholderia</i> sp.
2-1-8	+	-	-	399/477 (84%)	FR872388	<i>Burkholderia</i> sp.
2-1-9	+	+	-	465/532 (87%)	JN622118	<i>Burkholderia</i> sp.
2-1-11	+	+	-	497/512 (97%)	JX293337	<i>Arthrobacter</i> sp.
2-1-12	-	-	+	462/508 (91%)	JQ796366	<i>Arthrobacter</i> sp.
2-1-15	+	-	-	466/508 (92%)	HM587736	<i>Arthrobacter</i> sp.
2-3-17	-	-	+	475/519 (92%)	HM627214	<i>Mucilaginibacter</i> sp.
2-4-5	+	-	-	444/522 (85%)	AB293987	<i>Burkholderia</i> sp.
2-4-6	+	-	-	305/348 (88%)	JF717707	<i>Uncultured Burkholderiaceae bacterium</i>
2-4-8	+	-	-	473/529 (89%)	JQ316419	<i>Burkholderia</i> sp.
2-4-9	+	+	-	444/536 (83%)	JN622118	<i>Burkholderia</i> sp.
2-4-11	+	+	-	420/507 (83%)	FJ936978	<i>Uncultured bacterium</i>
2-4-12	-	-	+	444/500 (89%)	HQ684353	<i>Uncultured bacterium</i>
2-4-15	+	-	-	499/530 (94%)	JQ357350	<i>Uncultured bacterium</i>
2-4-20	-	+	+	480/529 (91%)	EU044281	<i>Uncultured Burkholderia</i> sp.
2-6-21	-	-	+	497/526 (94%)	EF072360	<i>Uncultured Flavobacteria bacterium</i>
2-6-23	+	-	+	423/494 (86%)	HQ598864	<i>Uncultured Acidobacteria bacterium</i>
2-6-24	+	+	+	467/505 (92%)	JN168354	<i>Uncultured bacterium</i>
2-6-25	+	+	+	356/364 (98%)	FJ569934	<i>Uncultured Acidobacteria bacterium</i>
2-6-26	+	+	+	355/396 (90%)	EF075823	<i>Uncultured Acidobacteria bacterium</i>
2-7-15	+	-	-	480/498 (96%)	GQ924548	<i>Kibdelosporangium</i> sp.
2-7-22	+	+	+	218/268 (81%)	FQ730187	<i>16S rRNA amplicon</i>
2-8-25	+	+	-	457/499 (92%)	AM936465	<i>Uncultured Acidobacteria bacterium</i>
2-8-26	+	+	+	455/498 (91%)	GU219933	<i>Uncultured Acidobacteria bacterium</i>
2-14-3	-	+	+	526/528 (99%)	JF189075	<i>Uncultured bacterium</i>
2-16-27	+	-	-	403/481 (84%)	GU219933	<i>Acidobacteria bacterium</i>

IV. DISCUSSION

L'objectif principal de ce chapitre était de caractériser la structure de la végétation et d'analyser les propriétés physico-chimiques et microbiologiques des différentes parcelles identifiées dans la zone d'étude dont la parcelle de la forêt naturelle, la parcelle de *G. banksii* et la parcelle de pseudo-steppe. Il s'agit de comparer la parcelle formée par la population de *G. banksii*, une espèce invasive de la partie Est de Madagascar, avec la parcelle forestière (Ianjomara) et la parcelle de pseudo-steppe.

Au niveau de la composition floristique et le taux de recouvrement de chaque espèce de plante identifiée, les résultats ont montré que les trois parcelles ont été significativement différentes. Les espèces recensées dans la parcelle de la forêt naturelle ont été plus diversifiées (29 espèces) que celles recensées dans la parcelle de pseudo-steppe (7 espèces) et la parcelle de *G. banksii* (12 espèces). Ces deux dernières parcelles ont été dominées respectivement par une population d'*Aristida similis* à 80% de recouvrement et par une population de *G. banksii* à 98% de recouvrement. En effet, il semble que chacune de ces deux parcelles ont été formées par une population homogène d'une seule espèce alors qu'il y a eu quelques espèces d'herbacées en dessous de la population de *G. banksii*. En travaillant avec d'autres espèces envahissantes à Madagascar (*Opuntia monacantha*, *Psidium cattleianum*, *Aucoumea klaineana*), des auteurs affirment que vu le taux de recouvrement élevé de ces espèces, leurs envahissements provoquent une homogénéisation des formations et une diminution de la diversité floristique (Andrianantenaina, 2005 ; Randrianasolo, 2006 ; Rafilipoarijaona, 2006). Ce qui pourrait se traduire par la perturbation des autres espèces voisines pour lui permettre de mieux se développer et former par la suite des peuplements monospécifiques (D'Antonio et Mahall, 1991 ; Collins et Wein, 1993 ; Hamilton *et al.*, 1999). D'une autre façon, les espèces exotiques envahissantes se propagent généralement d'une manière rapide sur le milieu ouvert ou semi-ouvert (milieu perturbé). A cet égard, des auteurs ont déjà remarqué que *G. banksii* s'installe et se propage dans un milieu dégradé, expliquant ainsi son caractère héliophile et sa présence dans les collines de basse altitude déboisées et érodées (Hagen, 2001 ; Bourgeois et Camou, 2006).

En outre, la forêt naturelle d'Ianjomara, caractérisée par un fragment forestier, est géographiquement isolée et constituée par la formation originelle dont *Uapaca ferruginea* constitue un taux de recouvrement de 41% suivi de *Dypsis* sp. (14%). Des auteurs ont supposé que les écosystèmes les plus riches en nombre d'espèces sont certainement les moins sensibles aux invasions biologiques (Elton, 1958). Cependant, nous avons enregistré dans la parcelle de la forêt naturelle quelques espèces qui sont déjà statuées invasives, n'en citons que *Psidium cattleianum* (Mac Donald *et al.*, 1991 ; Meyer, 2000 ; Binggeli, 2003), *Clidimia hirta* (Wester et Wood, 1977 ; Peters, 2001 ; Saara, 2003). Ratovomanana (2006) a déjà signalé l'invasion de *Psidium cattleianum* dans la Réserve Nationale de Betampona. Cette espèce a la capacité d'inhiber la régénération des essences forestières natives et lui permettant de coloniser une grande surface de cette Réserve Nationale. Des investigations ont montré également que

l'installation des espèces exotiques est favorisée dans le milieu où il y a des modifications de la composition ainsi que la structure et le fonctionnement des écosystèmes naturels ou semi-naturels (Cronk et Fuller, 1995). Ces modifications proviennent souvent de l'altération des conditions microclimatiques entre autres une augmentation de l'ensoleillement, de la température, de la pénétration du vent, de la diminution de l'humidité relative suite à un changement floristique d'une forêt naturelle (Curran *et al.*, 1999 ; Peters, 2001 ; Benitez-Malvido et Martinez-Ramos, 2003 ; Laurance *et al.*, 2006). Dans ce cas, la régénération des plantules des essences strictement forestières sera fortement inhibée (Benitez-Malvido, 1998). Par contre, ces modifications favorisent par la suite l'installation des espèces exotiques à croissance rapide (Laurance *et al.*, 2006) surtout des espèces envahissantes (Hodkinson et Thompson, 1997). Ces données corroborent nos résultats qui montrent qu'aucun pied de *G. banksii* n'a été trouvé dans la parcelle de forêt naturelle alors qu'elle a été très abondante dans les milieux ouverts. Cela peut s'expliquer par le fait que cette espèce qui est une espèce pionnière et héliophile n'arrive pas à se développer sur les formations plus ou moins fermées (Andriamiharimanana, 2011). Ainsi *G. banksii* est-il bénéfique ou constitue-t-il un danger pour la régénération des essences forestières natives? D'autres investigations orientées surtout vers les paramètres biotiques ou abiotiques régissant le développement de ces essences forestières natives sont encore nécessaires pour arriver à répondre à cette question.

Rappelons que le sol est un des compartiments essentiels de l'écosystème, agissant comme contrôleur et révélateur de nombreux processus écologiques par ses caractères physiques, chimiques et biologiques, à court et moyen terme" (Grubb et Whittaker, 1989). De plus, la théorie de feedback positif des plantes sur le sol stipule que des sols différents sélectionnent des végétations différentes (Hobbie, 1992). Parallèlement, l'identité de l'essence dominante de la végétation influence fortement les propriétés du sol (Dijkstra et Smits, 2002 ; Prescott, 2002 ; Hagen-Thorn *et al.*, 2004). Nos résultats ont montré que les caractéristiques chimiques et microbiologiques du sol sous *G. banksii*, collecté sous une formation homogène de cette plante, pourraient être considérées comme des propriétés idéales du sol favorisant le développement de cette plante exotique. Il a été démontré par ces résultats que le sol de la plante invasive, *G. banksii*, était plus acide et plus riche en phosphore disponible (assimilable) par rapport au sol forestier ou sol sous pseudo-steppe. Ces résultats pourraient être en relation avec le fonctionnement des racines protéoïdes chez les systèmes racinaires de *G. banksii*. Il est à noter que ces racines protéoïdes sont des caractéristiques particulières de la famille des

Proteaceae>> (Purnell, 1960). Des études ont rapporté que les racines protéoïdes acidifient la rhizosphère suite à la sécrétion des acides organiques et à la solubilisation de Ca, Fe et Al du phosphate (Gardner *et al.*, 1981, 1982a, 1983 ; Marschner, 1991a ; Marschner *et al.*, 1986 ; Dinkelaker *et al.*, 1989 ; Grierson et Attiwill, 1989). Gardner *et al.*, (1983) ont montré que les racines protéoïdes de *Lupinus albus* produisent une large quantité d'acides organiques issus de ses exsudats racinaires, particulièrement le citrate. Cet élément intervient dans la chélation et la mobilisation du fer dans le sol ; ce qui augmente la disponibilité du phosphore dans ce sol. Des résultats similaires ont été obtenus par Grierson et Attiwill, 1989 avec *Banksia integrifolia*. Toutes ces études ont suggéré que ce phosphore est plutôt disponible pour les plantes porteuses de racines protéoïdes (Jeffrey, 1967 ; Lamont, 1980). Cependant, aucune étude n'a montré la disponibilité de ce phosphore pour les autres espèces de plantes avoisinantes à notre connaissance.

A part ces racines protéoïdes, l'établissement de la symbiose mycorhizienne sur les plantes au sein d'un écosystème favorise généralement la disponibilité du phosphore (Boullard, 1968 ; Mosse B 1981 ; Strullu, 1985 ; Le Tacon F *et al.*, 1986 ; Khasa P.D *et al.*, 1987) et d'autres éléments nutritifs du sol ainsi que l'amélioration de la santé de la plante. Ce qui maintient par la suite la structure et la diversité de la couverture végétale ainsi que sa productivité (Odum, 1959 ; Van Der Heijden *et al.*, 1998 ; Scheublin *et al.*, 2007 ; Shah *et al.*, 2009a,b). Par contre le sol sous *G. banksii* a été pauvre en propagules mycorhiziennes par rapport au sol forestier et au sol sous pseudo-steppe. De plus, la forme résistante <<Spores>> de champignons endomycorhiziens a été très abondante dans le sol de *G. banksii* que dans les autres types de sol. Ces résultats nous semblent indiquer une perturbation de la structure de la communauté des champignons endomycorhiziens dans le sol sous l'influence de l'installation de *G. banksii*. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Shah *et al.*, (2010), qui ont mis en évidence des impacts de deux espèces invasives *Anthemis cotula* et *Conyza canadensis* sur les champignons endomycorhiziens dans le sol rhizosphérique de différents sites de l'Himalaya Kashmir - Inde. Ces auteurs ont montré que la densité de spores dans le sol rhizosphérique de ces deux espèces invasives a été plus élevée que dans le site non envahi. Cependant la diversité des champignons endomycorhiziens dans les sols envahis par les deux espèces invasives a été faible par rapport au sol rhizosphérique non envahi (9 et 7 espèces de MVA dans les sols rhizosphériques respectivement de *A. cotula* et *C. canadensis* contre 17 et 10 espèces de MVA dans le sol rhizosphérique non envahi). Ainsi Shah *et al.*, (2008a, b) ont expliqué que les

plantes exotiques invasives peuvent modifier potentiellement l'abondance et la composition des communautés de champignons endomycorhiziens du sol. Il est évident que si la plante invasive a une faible dépendance mycorhizienne, celle-ci influence négativement la diversité de plante native (Vogelsang *et al.*, 2004 ; Van Der Heijden *et al.*, 1998).

Récemment, l'impact des plantes exotiques envahissantes sur les communautés microbiennes du sol a attiré l'attention des scientifiques. Il est connu actuellement que les plantes invasives modifient profondément la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol envahi (Kourtev *et al.*, 2002, 2003 ; Li *et al.* 2006). En effet Hong-bang *et al.*, (2007) ont montré que l'établissement de *Ageratina adenophora* a modifié les communautés microbiennes du sol. La présente étude a montré que le sol rhizosphérique de *G. banksii* par rapport au sol rhizosphérique des autres plantes voisines, présente une communauté microbienne assez pauvre surtout pour les microorganismes bénéfiques pour la croissance et la santé de la plante tels les actinomycètes et les microorganismes capables de solubiliser le phosphate du sol. Ce sol rhizosphérique de *G. banksii* présente également des activités microbiennes globales et phosphatasiques faibles. Le sol sous *G. banksii* en général ressemble au sol sous pseudo-steppe du point de vue caractéristique microbiologique. Ceci a été confirmé par les résultats des analyses moléculaires des communautés microbiennes des sols, qui ont montré que le sol sous *G. banksii* a été proche de celui de pseudo-steppe en terme de diversité microbienne du sol.

V. CONCLUSION

En bref, cette première partie nous a permis de décrire la composition floristique et les propriétés globales de sols conditionnés par trois types de végétations différentes de la zone d'étude. Il a été clairement démontré par ces résultats que la parcelle de *G. banksii* a été dominée par cette espèce à 98% de recouvrement. Cependant, *G. banksii*, ne se trouve pas dans la forêt naturelle bien qu'elle soit abondante à l'extérieur de cette formation naturelle. Par ailleurs, les caractéristiques chimiques et microbiologiques du sol sous *G. banksii* sont généralement très proches de ceux du sol dégradé sous pseudo-steppe. Ces paramètres (chimiques et microbiologiques) étaient faibles, à l'exception du pH et le nombre de spores, dans ces deux types de sol que dans le sol forestier. Le sol de *G. banksii* présente également un faible potentiel d'infection mycorhizogène alors qu'il a une quantité élevée de spores endomycorhiziens. A ces caractéristiques s'associe une faible diversité floristique et des activités microbiennes perturbées.

CHAPITRE II :

CARACTERE INVASIF DE *Grevillea banksii* R. Br. DANS LA ZONE EST DE MADAGASCAR

CARACTERE INVASIF DE *Grevillea banksii* R. Br. DANS LA ZONE EST DE MADAGASCAR

I. INTRODUCTION

De nombreuses espèces végétales ont été introduites dans de nouveaux habitats à travers le monde et plusieurs d'entre elles peuvent s'adapter dans son lieu d'introduction (Lockwood *et al.*, 2007). Williamson, (1996) a conclu que 0,1 pour mille des espèces introduites est devenu invasives. Ainsi plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le succès des espèces de plantes exotiques à envahir son milieu d'introduction. Cependant la plupart de ces études sont principalement focalisées sur la population épigée du sol (Levine *et al.*, 2003). Deux facteurs sont majoritairement étudiés pour mieux comprendre les mécanismes et les effets de l'invasion d'une plante dont l'invasibilité des écosystèmes (Kareiva, 1996 ; Lyons et Schwartz, 2001) et les caractères invasifs des espèces de plante (Kareiva, 1996 ; Rejmanek, 2000). Pour cela, l'invasibilité d'un milieu se traduit selon plusieurs auteurs par l'absence d'ennemis naturels, la présence d'une niche vacante et la disponibilité des ressources (Hobbs et Huenneke, 1992 ; Keane et Crawley, 2002 ; Saccone *et al.*, 2010). La capacité d'invasion des espèces exotiques ou appelé communément «*Invasivité des espèces*» dépend beaucoup des facteurs entre autres le mode de reproduction et de sa dispersion, l'utilisation des ressources, la plasticité et l'allélopathie (Callaway et Aschehoug, 2000). Certains auteurs ont défini que l'invasivité d'une espèce est caractérisée généralement par sa capacité à produire des changements significatifs sur les compositions spécifiques, la structure et les fonctionnements des écosystèmes (Cronk et Fuller, 1995 ; Richardson *et al.*, 2000 ; Raizada *et al.*, 2008). Cela se produit souvent grâce à un mécanisme très spécifique d'une espèce à l'autre. Quelques-unes forment une interaction compétitive (Leger et Rice, 2003 ; Blair et Wolfe, 2004) contre les espèces natives pour lui permettre de mieux se développer et de former par la suite des peuplements monospécifiques (D'Antonio et Mahall, 1991 ; Collins et Wein, 1993 ; Hamilton *et al.*, 1999).

En outre les communautés microbiennes du sol peuvent jouer un rôle important dans le processus d'invasion des plantes (Wolfe et Kliromonos 2005 ; Callaway *et al.*, 2003). En effet, plusieurs études ont montré l'influence des plantes exotiques sur la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol (Kourtev *et al.*, 2002 ; Callaway *et al.*, 2004 ; Hawkes *et al.*, 2005 ; Batten *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2006 ; Lorenzo *et al.*, 2010 ;

Elgersma *et al.*, 2011 ; Lankau, 2011; Wilson *et al.*, 2012) alors que certains de ces microorganismes interagissent avec les plantes au niveau de la rhizosphère, ce qui influence à leur tour le fonctionnement des écosystèmes (Van Der Putten *et al.*, 2007).

A Madagascar, l'invasion de *G. banksii* (Binggeli, 2003) est observée seulement sur sa capacité à envahir rapidement le milieu ouvert ou semi-ouvert et cette plante semble avoir une forte capacité à envahir les collines déboisées et érodées de basse altitude (Le Bourgeois et Camou, 2006). Cependant, le mécanisme qui régit cette invasion reste encore mal connu. Ainsi, l'objectif principal de ce chapitre est ***de décrire les propriétés envahissantes de G. banksii sur le sol de la partie Est de Madagascar***. Pour cela, l'étude a été d'abord focalisée sur la structure et le fonctionnement des microorganismes du sol (symbiotique ou non) après installation de *G. banksii* sur le sol non pré-colonisé par cette plante. Puis, la présence des racines protéoïdes dans le système racinaire de *G. banksii* ainsi que les possibles rôles de ces structures sur la capacité invasive de la plante ont été étudiés. Ainsi, l'évolution de ces racines protéoïdes au cours du développement de *G. banksii* a été suivie. Les effets allélopathiques des extraits de racine et de feuille de *G. banksii* sur les microorganismes symbiotiques des plantes ont été également testés.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériel végétal : *G. banksii*

Grevillia banksii R. Br. est un petit arbre ou arbuste mesurant quelques mètres de hauteur (jusqu'à 10m), une plante à croissance végétative rapide, à graines anémophiles, autofécondation, une espèce héliophile et pyrophile. Elle appartient à la famille des Proteaceae (Engler, 1894 ; Purnell, 1960) et nos observations ont montré qu'elle possède des racines protéoïdes. Il est originaire du Queensland (Australie) et se répartit actuellement dans différentes régions, entre autres l'île de Rarotonga de l'archipel des îles de Cook en Pacifique Sud, dans les îles Fidji, en Polynésie française, en Afrique du Sud (KwaZulu-Natal, Port Edward) et à la Réunion ; envahissante à Hawaï, à Madagascar (partie Est) (Binggeli, 2003 ; Le Bourgeois et Camou, 2006). La date d'introduction de l'espèce à Madagascar est inconnue mais la campagne de vulgarisation était entre les années 1950 et 1960 dans l'objectif de stabilisation des Lavaka et de recouvrement de terrain dégradé. *Grevillea banksii*, pousse au détriment de la végétation dans les milieux naturels perturbés ouverts ou semi-ouverts, secs à humides et sur les pâturages peu entretenus.

II.2 Expérience 1 : Mise en évidence des effets de l'installation de *G. banksii*

II.2.1 Germination des graines de *G. banksii*

Les graines de *G. banksii* provenant du SNGF (Silo National des Graines Forestières) ont été trempées dans du peroxyde d'hydrogène 30% pendant 15 min puis, rincées abondamment avec de l'eau du robinet avant d'être imbibées pendant 24 heures dans de l'eau distillée stérile. Après 24 heures, les graines ont été mises à germer dans du sable stérilisé (120°C, 40 min) dans un germoir sous les conditions de la serre du LME/CNRE (photopériode 12h, température d'environ 15°C la nuit et 28°C le jour).

II.2.2 Dispositif expérimental

Les sols (forestier et sous pseudo-steppe) ont été partagés dans des pots plastiques de 1L après tamisage à 2mm de maille où des graines pré-germées de *G. banksii* ont été repiquées à raison d'une graine par pot. Vingt-cinq répétitions ont été préparées pour chaque type de sol. Les expérimentations ont été disposées en randomisation totale et conduites sous la serre du LME/CNRE et les plantules ont été arrosées 2 à 3 fois par semaine avec de l'eau du robinet sans fertilisation.

II.2.3 Suivi de l'expérimentation et analyses des échantillons

Après 5 mois de culture sous serre, 10 plants ont été choisis au hasard pour chaque type de sol. Les plants ont été dépotés, les parties aérienne et racinaire ont été séparées les unes des autres au niveau du collet pour la mesure de biomasse de la plante. La densité des racines protéoïdes a été déterminée au niveau du système racinaire de chaque plante par dénombrement de ces racines protéoïdes. Les sols issus de 10 plants ont été mélangés pour obtenir un sol composite qui a été par la suite conservé à +4°C pour les analyses microbiologiques et à -20°C pour l'analyse moléculaire. Des sols rhizosphériques des racines protéoïdes de chaque type de sol ont été également récupérés et conservés pour d'autres analyses.

Les paramètres suivants ont été mesurés pour chaque type de sol :

II.2.3.1 Intensité mycorrhizogène du sol

L'intensité mycorrhizogène des sols après l'installation de la plante invasive, *G. banksii*, a été mesurée selon deux méthodes à savoir (1) la détermination du potentiel infectieux mycorrhizogène (PIM) des sols composites selon la technique décrite par Plenchette *et al.*, (1989) et (2) le dénombrement des spores. La première méthode consiste à la culture de plantule hautement mycotrophe sur une série de dilution du sol avec un facteur de dilution de

¹/₄ . Les racines de la plante ont été collectées et colorées avec le bleu trypan 0,5% après 20 jours de culture sous serre pour évaluer l'infection mycorhizogène indiquée par la présence des vésicules à l'intérieur des bouts de racines observés sous microscope optique à grossissement X40.

Puis une suspension de sol a été tamisée sur une série de tamis de taille de pores différente soit de 50, 80, 100 et 200µm. Les spores dans chaque type de sol ont été comptés et groupés selon leur taille et leur couleur observées sous loupe binoculaire.

II.2.3.2 Activités enzymatiques du sol

L'activité des enzymes du sol dont la phosphatase en milieu acide et alcalin qui hydrolyse le para Nitrophenyl phosphate (pNPP) et l'enzyme hydrolysant la fluorescéine diacétate (FDA), a été mesurée dans le sol de chaque traitement selon les méthodes déjà décrites auparavant (Chapitre I). Les produits d'analyse (para-Nitrophenol et fluorescéine) ont été évalués par la méthode colorimétrique au spectrophotomètre sous la longueur d'onde respectivement 400 nm et 490 nm. Les résultats sont exprimés par la quantité de produit d'hydrolyse par gramme de sol et par unité de temps.

II.2.3.3 Dénombrement de groupement fonctionnel des microorganismes du sol

Dans chaque type de sol, trois groupes de microorganisme ont été dénombrés dont la flore totale cultivable du sol, la population d'actinomycètes et la flore totale capable de solubiliser le phosphate. La population de ces trois groupes de microorganismes a été évaluée respectivement sur milieu de culture TSA (Tryptic Soy Agar), Waksman et TCP (Phosphate TriCalcique) selon la technique de suspension – dilution et d'étalement sur milieu solide d'une quantité précise de la solution de l'échantillon du sol. Les colonies des microorganismes ont été dénombrées après incubation à l'étuve à 30°C pendant 24, 48 et 72 h pour la flore totale cultivable du sol, 7jours pour les actinomycètes et 48h pour la flore solubilisatrice de phosphate.

II.2.3.4 Diversité microbienne du sol par la technique de biologie moléculaire

Des échantillons d'ADN génomique extraits à partir de nos échantillons de sol ont été analysés par la technique de PCR-DGGE au sein du Laboratoire IBIS de l'université Laval-Canada. Les bandes DGGE ont été excisées du gel puis séquencées après la ré-amplification par PCR des fragments d'ADN. Les séquences obtenues ont été comparées avec la base de données de NCBI (National Center of Biotechnology Information).

II.3 Expérience 2 : Etude de la formation et du développement des racines protéoïdes chez *G. banksii*

G. banksii appartenant à la famille de Proteaceae est caractérisé généralement par la présence des racines protéoïdes au niveau de son système racinaire (Purnell, 1960). Plusieurs études ont montré que la présence des racines protéoïdes est un facteur de propagation rapide d'une espèce de plante dans un nouvel écosystème hors de son habitat natif. Cependant, la formation et le développement de ces structures dépendent de plusieurs facteurs. Ici nous avons considéré un exemple des facteurs régissant la formation des racines protéoïdes : *les microorganismes* du sol. Sur ce domaine, Lamont *et al.*, 1974 ont déjà montré que la formation des racines protéoïdes chez *Hakea prostrata* est fortement dépendante des microorganismes du sol. Par contre, Gardner *et al.*, (1982) sur des expérimentations chez *Lupinus albus* ont illustré que les racines protéoïdes peuvent se développer dans des conditions aseptiques, mais que leur développement est nettement amélioré par la présence de certains groupes de micro-organismes du sol. Ces deux cas ont été considérés pour l'étude de la formation et du développement des racines protéoïdes chez *G. banksii*.

II.3.1 Expérimentation

Le sol sous pseudo-steppe considéré comme dégradé a été choisi pour les expérimentations sous serre. Trois traitements du sol ont été préparés dont (i) un sol stérilisé (autoclavage à 120°C, 40min), (ii) un sol non stérilisé et (iii) un troisième traitement constitué par un sol stérilisé associé avec le sol adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* (5g par pot). Vingt et cinq répétitions pour chaque traitement ont été effectuées et une graine pré-germée de *G. banksii* a été repiquée dans chaque pot. Les plants ont été arrosés deux fois par semaine sans aucun apport de fertilisant.

II.3.2 Evaluation des expériences

Après cinq mois de culture, cinq plantules par traitement ont été dépotées. Des racines protéoïdes formées sur les systèmes racinaires de *G. banksii* ont été dénombrées par plantule et par traitement. Les parties aériennes et racinaires ont été séparées en coupant au niveau du collet. Les poids secs des biomasses ont été mesurés après séchage à l'étuve 100°C pendant 24h, pour évaluer le développement de la plante.

II.4 Expérience 3 : Effets des extraits de feuille et de racine de *G. banksii* sur les communautés microbiennes du sol

II.4.1 Isolement et mises en collection des isolats microbiens du sol

II.4.1.1 Isolement des isolats de champignons mycorhiziens

Une collecte de carpophores de champignon a été effectuée durant la saison de pluie (mois de janvier 2012). Les carpophores ont été conservés à +4°C jusqu'à l'arrivée au laboratoire pour l'isolement du mycélium végétatif. La méthode d'isolement décrite par Bâ (1990) et reprise par Sanon (1997) a été adoptée. Les carpophores, débarrassés des particules de sol, ont été fractionnés en deux en condition stérile. Des fragments de la partie interne du péridium ont été prélevés à l'aide d'un scalpel stérile et déposés sur milieu gélosé MNM (Marx, 1969) préalablement préparé. Les cultures ont été incubées à 28°C dans une étuve et des repiquages successifs sur le même milieu ont été effectués pour éliminer les contaminants.

II.4.1.2 Isolement et identification des isolats de rhizobium du sol

L'isolement des isolats de rhizobium a été réalisé à partir des sols issus de trois parcelles d'étude. Une suspension-dilution du sol a été préparée à l'aide de micropipette par la technique de dilution en cascade. Une série de dilution 10^{-1} à 10^{-5} a été préparée à partir de la solution mère (suspension du sol composé de 5g de sol et 45ml d'eau distillée stérile). Cent microlitres de ces dilutions ont été étalés par épuisement dans une boîte de pétri contenant préalablement du milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970) additionné de 2,5ml/l d'une solution de rouge congo 1% (voir en annexe 1 la composition du milieu). Des repiquages successifs des colonies formées ont été réalisés sur un nouvel milieu de culture pour avoir des isolats purs de rhizobium.

II.4.2 Préparation de l'extrait total de *G. banksii*

La méthode consiste à sécher à l'air libre les feuilles et les racines de *G. banksii* puis à les broyer à l'aide du mortier. La poudre végétale obtenue a été macérée dans quelques microlitres d'eau distillée. Le macérât a été homogénéisé pendant 24 heures sous agitateur magnétique de type New Brunswick (Scientific CO., INC, Edition N.J., USA). L'homogénat a été filtré successivement sur papier filtre Wattman n°1 puis sur filtre millipore de 0,45µm. Le filtrat obtenu a été évaporé à l'aide de SpeedVac concentrator (SPD 2010) pour avoir une poudre de feuille et de racine constituant l'extrait total de la plante.

II.4.3 Test d'activité antifongique

L'effet des extraits de racine (protéoïdes et non) et de feuille de *G. banksii* a été testé sur la croissance des isolats fongiques isolés (4 souches codées respectivement Pis E, Pis P, Pis02 et SCA) par la méthode de confrontation par contact direct sur milieu de culture. Cette méthode consiste à effectuer un test de dualité entre les différents isolats fongiques et les extraits de racine et de feuille imbibés dans le disque test (6mm de diamètre). Pour cela, les isolats fongiques préalablement rajeunis sur le milieu MNM ont été repiqués sous la forme d'un cylindre d'agar, à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Les disques imbibés par 10µl des extraits (concentration 1mg/ml) ont été placés à côté de l'isolat fongique en croissance marqué par la présence des mycéliums. L'évaluation des résultats a été faite par la mesure de diamètre du halo d'inhibition autour du disque.

II.4.4 Test d'activité antibactérienne

Les souches bactériennes utilisées dans ce test sont des souches de rhizobium isolées à partir de nodules de *Dalbergia trichocarpa*, issues de la collection du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE et des isolats de rhizobium isolés à partir des sols du site d'étude. Une pré-culture de ces souches de rhizobium dans un milieu YM liquide a été préparée préalablement. Une dilution $\frac{1}{10}$ de la pré-culture a été effectuée et 10ml de la solution diluée ont étéensemencés sur le milieu Mueller-Hinton (MH) dans une boîte de Pétri par la technique d'inondation. Les boîtes inondées ont été incubées pendant 15min dans une étuve 30°C. Ensuite, l'excès de liquide a été aspiré à l'aide d'une pipette puis les cultures ont été de nouveaux ré-incubées pendant 15min à 30°C. Des disques de 6mm de diamètre ont été imbibés de 10µl d'extrait et séchés dans une étuve à 35°C pendant 30min. Ces disques ont été par la suite déposés sur le milieu MH inondé par les souches de rhizobium. Un disque imbibé par de l'eau distillée a été utilisé comme témoin. Le diamètre des zones d'inhibition (halo autour des disques) a été mesuré après 24h d'incubation à 30°C.

Un test des extraits de feuille et de racine de *G. banksii* sur l'inhibition de la formation des nodules chez *D. trichocarpa* a été effectué *in vitro* dans des tubes Gibson. Ainsi, une souche de rhizobium STM609, souche effective sur *D. trichocarpa*, a été utilisée pour le test. Il s'agit de faire un test de nodulation (chapitre III paragraphe II.4.4.4) utilisant la souche de rhizobium mais en ajoutant seulement un millilitre de l'extrait dans chaque tube.

III. RESULTATS

III.1 Développement de *G. banksii* et nombre de racines protéoïdes sur les 2 types de sol

Après 4 mois de culture sous serre de *G. banksii* sur les 2 types de sol, les résultats ont montré que la partie aérienne de la plante s'est bien développée sur le sol forestier que sur le sol sous pseudo-steppe (photo 4 ; figure 8). Par contre, le poids sec de la biomasse racinaire a présenté des valeurs similaires pour les deux types de sol (Figure 8). Cette situation pourrait être expliquée par le fait que les racines protéoïdes se sont bien développées chez les plantes cultivées sur le sol sous pseudo-steppe (Figure 8). On pourra en déduire que ce type de racine se développe mieux en milieu pauvre qu'en milieu riche en éléments nutritifs.



Photo 4 Plantules de *G. banksii* sur 2 types de sol après 4 mois de culture sous serre

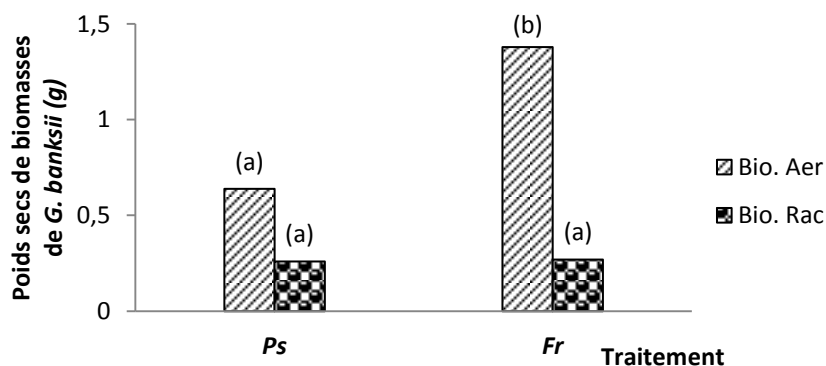


Figure 8. Variation du développement de *G. banksii* sur les 2 types de sol
 Les traitements suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls
Sigles : Ps : sol sous pseudo-steppe ; Gb sol sous *G. banksii* ; Fr : sol forestier
 Bio. Aer : Biomasse aérienne ; Bio. Rac : Biomasse racinaire



Photo 5 Système racinaire de *G. banksii*

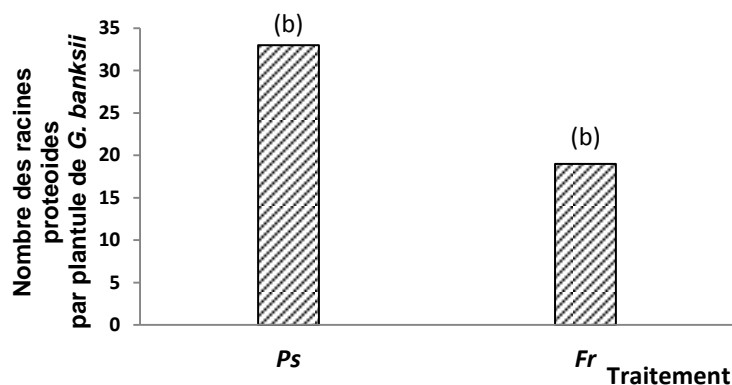


Figure 9. Nombre de racines protéoïdes par plantule et par type de sol
 Les traitements suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls
 (Ps) sol sous pseudo-steppe ; (Fr) sol forestier

III.2 Intensité mycorhizogène du sol après installation de *G. banksii*

Deux méthodes ont été utilisées pour caractériser l'intensité mycorhizogène du sol, après 4 mois d'installation de *G. banksii* sur le sol forestier et sur le sol sous pseudo-steppe, (i) le dénombrement des spores de champignons mycorhiziens et (ii) l'évaluation de la capacité des propagules mycorhiziennes dans les sols à coloniser le système racinaire d'une plante hautement mycotrophique.

Les résultats ont montré que l'installation de *G. banksii* a augmenté le nombre de spores dans chaque type de sol avec toujours un nombre plus élevé au niveau du sol forestier (figure 10A). Ces résultats illustrent la stimulation de la sporulation de champignons mycorhiziens suite à l'installation de *G. banksii*. Par contre, l'installation de cette plante exotique a diminué le nombre le plus probable (NPP) de propagule de mycorhizes dans les deux types du sol. Cette valeur de NPP a été toujours plus élevée dans le sol forestier que dans le sol sous pseudo-steppe (figure 10B).

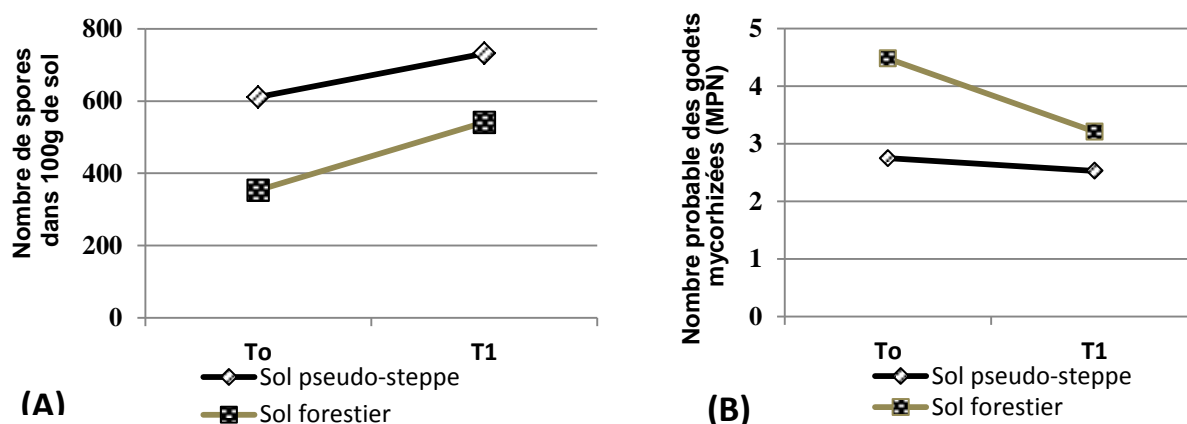


Figure 10. Influence de l'installation de *G. banksii* sur l'intensité mycorhizogène du sol après 4 mois de culture : (A) nombre de spores dans 100g de sol dans les deux types de sol ; (B) potentiel infectieux mycorhizogène (PIM) des sols
(To) sol avant installation de *G. banksii* ; (T1) sol après installation de *G. banksii*

III.3 Structure et fonctionnement de la communauté microbienne du sol après installation de *G. banksii* sur le sol forestier et le sol sous pseudo-steppe

III.3.1 Structure de la population microbienne du sol

Après 4 mois de culture de *G. banksii*, les résultats ont montré que le nombre de la flore totale cultivable du sol diminue dans les deux types de sol. Par contre, le sol fortement adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* du sol sous pseudo-steppe héberge un nombre élevé de flore totale cultivable (Figure 11A). Une diminution du nombre de la flore capable de solubiliser le

phosphate a été enregistrée dans le sol forestier de même que celui dans le sol adhérent aux racines protéoïdes. Par contre, l'installation de *G. banksii* a fortement réduit le nombre de cette flore capable de solubiliser le phosphate dans le sol sous pseudo-steppe (Figure 11B).

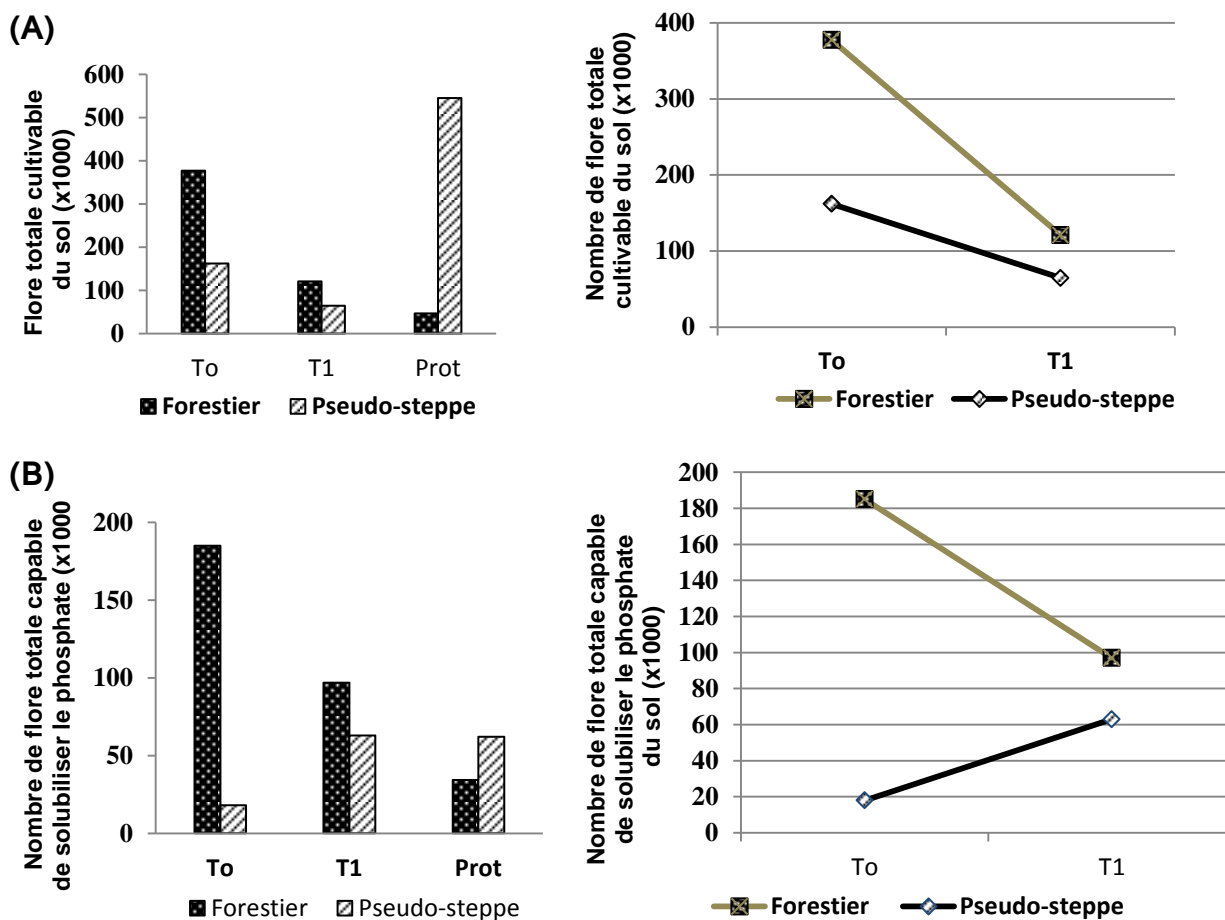


Figure 11. Influence de l'installation de *G. banksii* sur quelques groupes de microorganismes telluriques après 4 mois de cultures : (A) flore totale sur milieu TSA, (B) flore totale solubilisatrice de phosphate sur milieu TCP (*To*) sol avant culture de *G. banksii* ; (*T1*) sol après culture de *G. banksii* ; (*Prot*) sol adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* ;

III.3.2 Activité microbienne globale du sol

Le suivi de l'hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA) a montré que les deux types de sol ont présenté une nette amélioration des activités microbiennes globales après l'installation de *G. banksii* pendant quatre mois sous serre (figure 12B). Ces activités ont été encore plus intenses dans les sols adhérents aux racines protéoïdes surtout avec le sol forestier (Figure 12A) où cette activité est sept fois plus que celle enregistrée dans le sol non adhérent aux racines protéoïdes (Figure 12D). Ce qui nous montre que l'amélioration de l'activité globale des

microorganismes générée par l'installation de *G. banksii* se concentre majoritairement autour des racines protéoïdes.

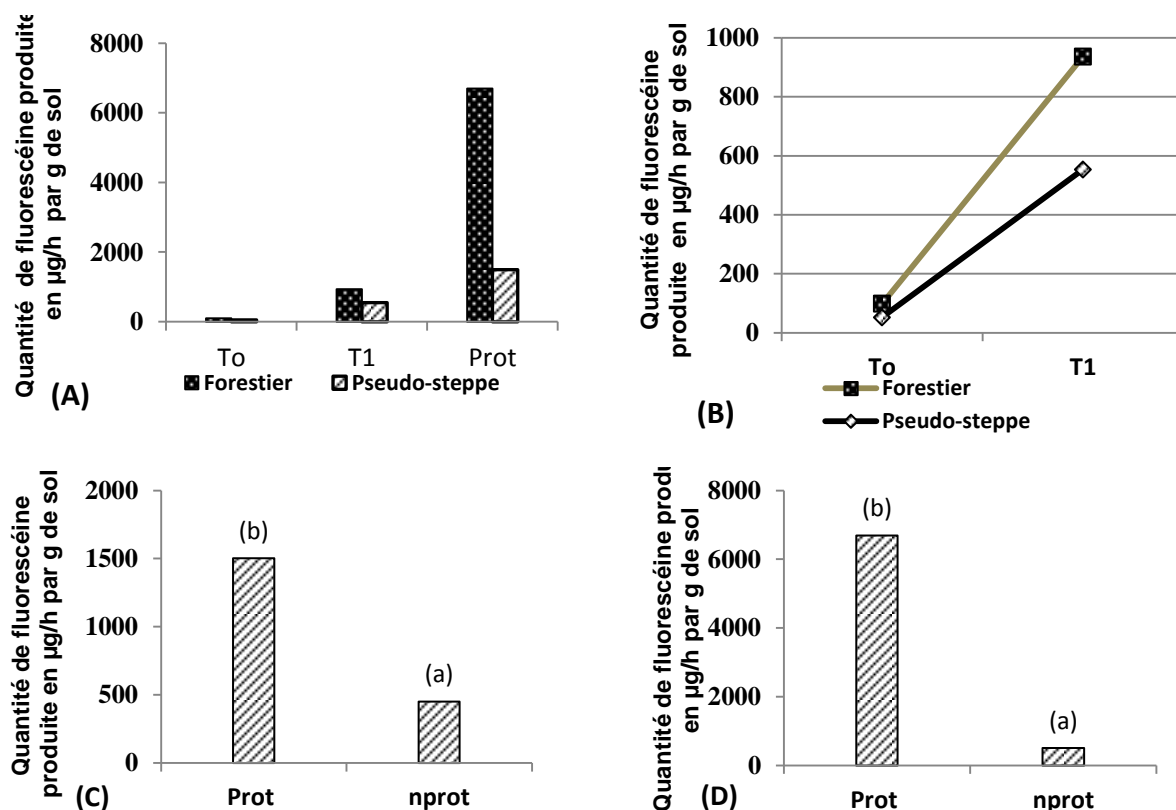


Figure 12. Variation de l'activité microbienne globale du sol après installation de *G. banksii*,

Les traitements suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls.

Sigles : (To) sol avant culture de *G. banksii* ; (T1) sol après culture de *G. banksii* ; (Prot) sol adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* ; (nprot) sol non adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* ; (A) activité microbienne globale du sol par l'hydrolyse de FDA ; (B) activité microbienne globale du sol avant (To) et après (T1) colonisation de *G. banksii* ; (C) activité microbienne globale du sol adhérent aux racines protéoïdes (prot) et non adhérent (nprot), du *G. banksii* cultivée sur le sol sous pseudo-steppe ; (D) activité microbienne globale du sol adhérent aux racines protéoïdes (prot) et non adhérent (nprot) du *G. banksii* cultivée sur le sol forestier

III.3.3 Activité des phosphatases microbiennes du sol

Le p-Nitrophenyl Phosphate ou pNPP a été le substrat utilisé pour mesurer l'activité phosphomonoestérasiqne des microorganismes du sol en milieu acide et en milieu alcalin. Le produit de l'hydrolyse est exprimé en µg de p-Nitrophenol (pNP) par gramme de sol pendant une heure d'incubation.

Que ce soit en milieu acide ou en milieu alcalin, les résultats ont montré que la colonisation de *G. banksii* sur les deux types de sol a diminué l'activité des phosphatases microbiennes du sol

(Figures 13B et 13D). Par contre, une forte activité de phosphatase acide a été enregistrée dans les sols adhérents aux racines protéoïdes de *G. banksii* (Figure 13A).

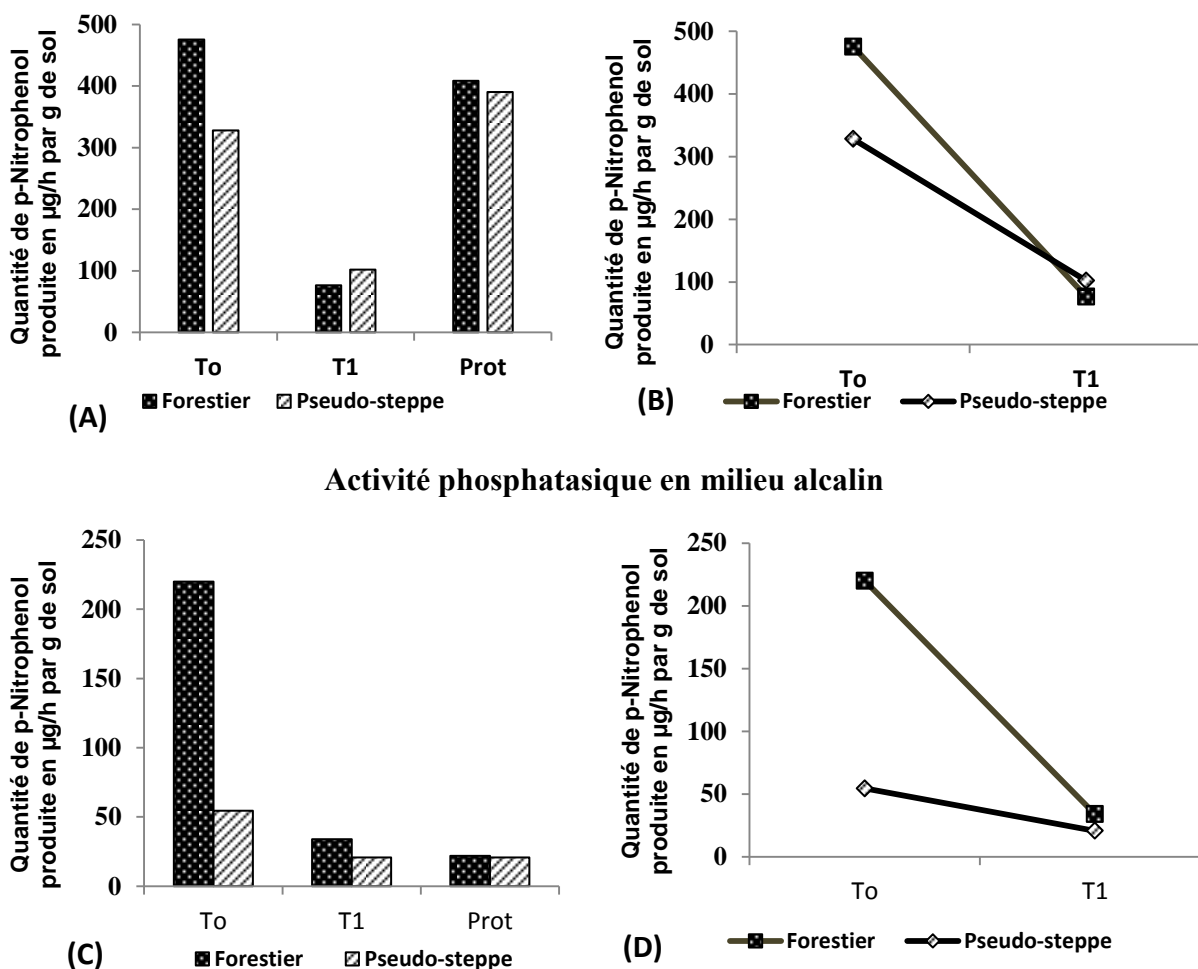


Figure 13. Modification des activités phosphatasiques du sol après installation de *G. banksii*

Sigles : (To) sol avant culture de *G. banksii* ; (T1) sol après culture de *G. banksii* ; (Prot) sol adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii*

III.3.4 Diversité des communautés microbiennes dans les deux types de sol

Les échantillons de sol après installation de *G. banksii* ont fait l'objet de l'extraction d'ADN génomique qui représente les génomes de tous les microorganismes viables ou non dans les sols. Ces échantillons d'ADN ont été amplifiés par la technique de PCR en utilisant des amorces spécifiques pour les bactéries du sol, conduisant à l'obtention des fragments d'ADN de longueur et de taille différente selon les groupes de bactéries. Ces fragments ont été migrés à travers un gradient de dénaturation du gel DGGE selon leur taille, leur longueur et leur composition en GC. Pour cela, les fragments de petite taille et/ou pauvres en GC migrent plus

loin et ainsi de suite. Ainsi une bande constituée par une ou plusieurs fragments est formée et chaque bande représente normalement un groupe de bactéries.

Les résultats ont montré que le nombre de bande du sol sous pseudo-steppe et du sol forestier après installation de *G. banksii* (photo 6B) a été largement inférieur au nombre des bandes sur le profil DGGE de ces deux types de sol à l'état initial (photo 6A). Cependant, on a observé des bandes au nombre plus élevé dans le sol rhizosphérique des racines protéoïdes de *G. banksii* sur ces deux types de sol (photo AC).

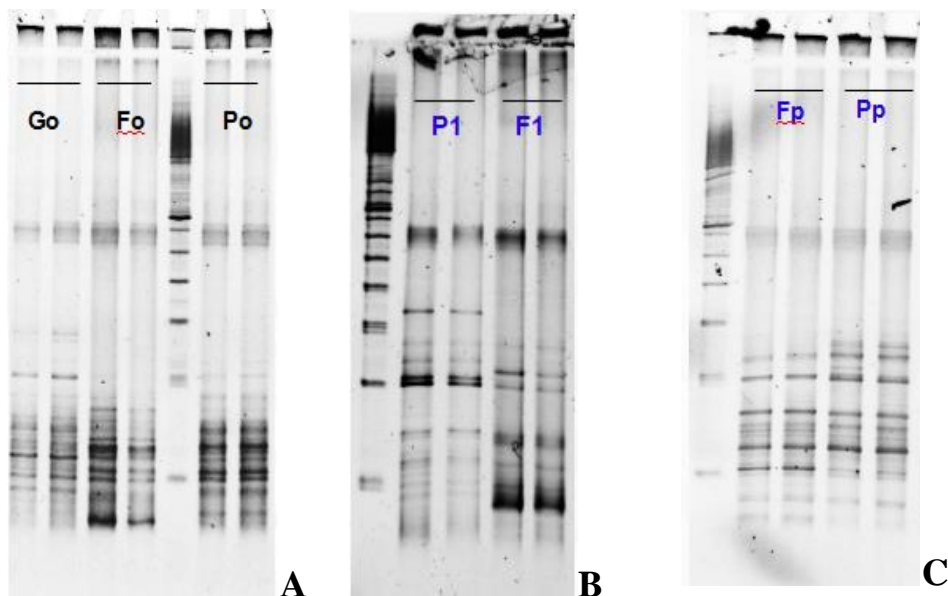


Photo 6 Profil DGGE des bactéries des sols avant et après installation de *G. banksii*

Sigles : (A) Sols à l'état initial ; (B) Sols après culture de *G. banksii* ; (C) Sols adhérents aux racines protéoïdes ; (Go) sol sous *G. banksii* ; (Fo) sol forestier ; (Po) sol sous prairie ; (P1) sol sous prairie après installation de *G. banksii* ; (F1) sol forestier après installation de *G. banksii* ; (Pp) sol rhizosphérique des racines protéoïdes de *G. banksii* sur le sol sous prairie ; (Fp) sol rhizosphérique des racines protéoïdes de *G. banksii* sur le sol forestier

L'identité des bandes présentes dans les échantillons de sol adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* a été identifiée par séquençage des bandes excisées du gel DGGE. Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences enregistrées dans le site web de NCBI. Les résultats ont montré que le sol adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* cultivé dans les deux types de sol contiennent cinq espèces de bactérie à savoir *Burkholderia* sp., *Bacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Mucilaginobacter* sp. et *Leifsonia* sp. (Tableau 10). Parmi ces cinq espèces, *Burkholderia* sp. était l'espèce la plus dominante dans les deux types de sol et constitue environ 40% des séquences identifiées.

Tableau 10 : Diversité bactérienne dans le sol rhizosphérique des racines protéoïdes de *G. banksii*

Code des bandes DGGE	Fp	Pp	Pourcentage de similarité	Numéro d'accension	Genre / Espèce
2-1-1	+	+	361/453 (80%)	GQ008606	<i>Bacterium</i> sp.
2-1-2	+	+	491/519 (95%)	HQ396159	<i>Mucilaginibacter</i> sp.
2-1-3	+	+	446/529 (84%)	JQ994026	<i>Burkholderia</i> sp.
2-1-4	+	-	472/530 (89%)	JF494821	<i>Burkholderia phytofirmans</i>
2-1-5	+	+	468/502 (93%)	FR872388	<i>Burkholderia</i> sp.
2-1-6	+	+	433/524 (83%)	JF763852	<i>Burkholderia</i> sp.
2-1-7	+	-	487/529 (92%)	JQ357369	<i>Bacterium</i> sp.
2-1-8	+	+	399/477 (84%)	FR872388	<i>Burkholderia</i> sp.
2-1-9	+	+	465/532 (87%)	JN622118	<i>Burkholderia</i> sp.
2-1-10	+	-	440/512 (86%)	JX293337	<i>Arthrobacter</i> sp.
2-1-11	+	+	497/512 (97%)	JX293337	<i>Arthrobacter</i> sp.
2-1-12	+	+	462/508 (91%)	JQ796366	<i>Arthrobacter</i> sp.
2-1-13	+	+	454/507 (90%)	JX067673	<i>Leifsonia</i> sp.
2-1-15	+	-	466/508 (92%)	HM587736	<i>Arthrobacter</i> sp.
2-3-2	+	+	504/525 (96%)	HQ396159	<i>Mucilaginibacter</i> sp.
2-3-17	-	+	475/519 (92%)	HM627214	<i>Mucilaginibacter</i> sp.
2-3-18	-	+	438/498 (88%)	GQ472779	<i>alpha proteobacterium</i>
2-3-19	-	+	395/507 (78%)	FR749798	<i>Bacterium</i> sp.
2-4-5	+	+	444/522 (85%)	AB293987	<i>Burkholderia</i> sp.
2-4-6	+	+	305/348 (88%)	JF717707	<i>Bacterium</i> sp.
2-4-8	+	+	473/529 (89%)	JQ316419	<i>Burkholderia</i> sp.
2-4-9	+	+	444/536 (83%)	JN622118	<i>Burkholderia</i> sp.
2-4-11	+	+	420/507 (83%)	FJ936978	<i>Bacterium</i> sp.
2-4-12	+	+	444/500 (89%)	HQ684353	<i>Bacterium</i> sp.
2-4-13	+	+	466/511 (91%)	JX067673	<i>Leifsonia</i> sp.
2-4-15	+	-	499/530 (94%)	JQ357350	<i>Bacterium</i> sp.
2-14-3	+	+	526/528 (99%)	JF189075	<i>Bacterium</i> sp.

(+) Présence, (-) Absence, (**Pp**) Sol adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* poussé sur le sol sous pseudo-steppe ; (**Fp**) Sol adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* poussé sur le sol forestier

III.4 Formation et développement des racines protéoïdes chez *G. banksii* en condition contrôlée

L'objectif de cette partie étant de décrire l'interaction entre microorganismes rhizosphériques, la croissance de la plante et le développement des racines protéoïdes; pour cela une inoculation avec le sol rhizosphériques de *G. banksii* a été effectuée sur le sol sous pseudo-steppe stérilisé et puis cultivé de *G. banksii*. Un autre traitement a été effectué sur sol sous pseudo-steppe stérilisé non inoculé avec le sol rhizosphériques de *G. banksii*. Et enfin un sol sous pseudo-steppe non stérilisé a servi de témoin.

Les résultats de l'expérimentation après cinq mois sous serre, ont montré que la formation des racines protéoïdes chez *G. banksii* se déroule bel et bien sur le sol préalablement stérilisé. De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les deux traitements stérilisé et non stérilisé pour le nombre de racines protéoïdes formées (Figure 14C). De même, la stérilisation préalable des sols n'a pas eu d'effet significatif sur les poids secs des biomasses aérienne et racinaire des plantes (Figures 14A et 14B). Pourtant l'ajout du sol rhizosphérique des racines protéoïdes comme inoculum dans le sol stérilisé a stimulé la formation des racines protéoïdes (figure 14C) ainsi que le développement de la partie aérienne et racinaire de *G. banksii* (Figures 14A et 14B).

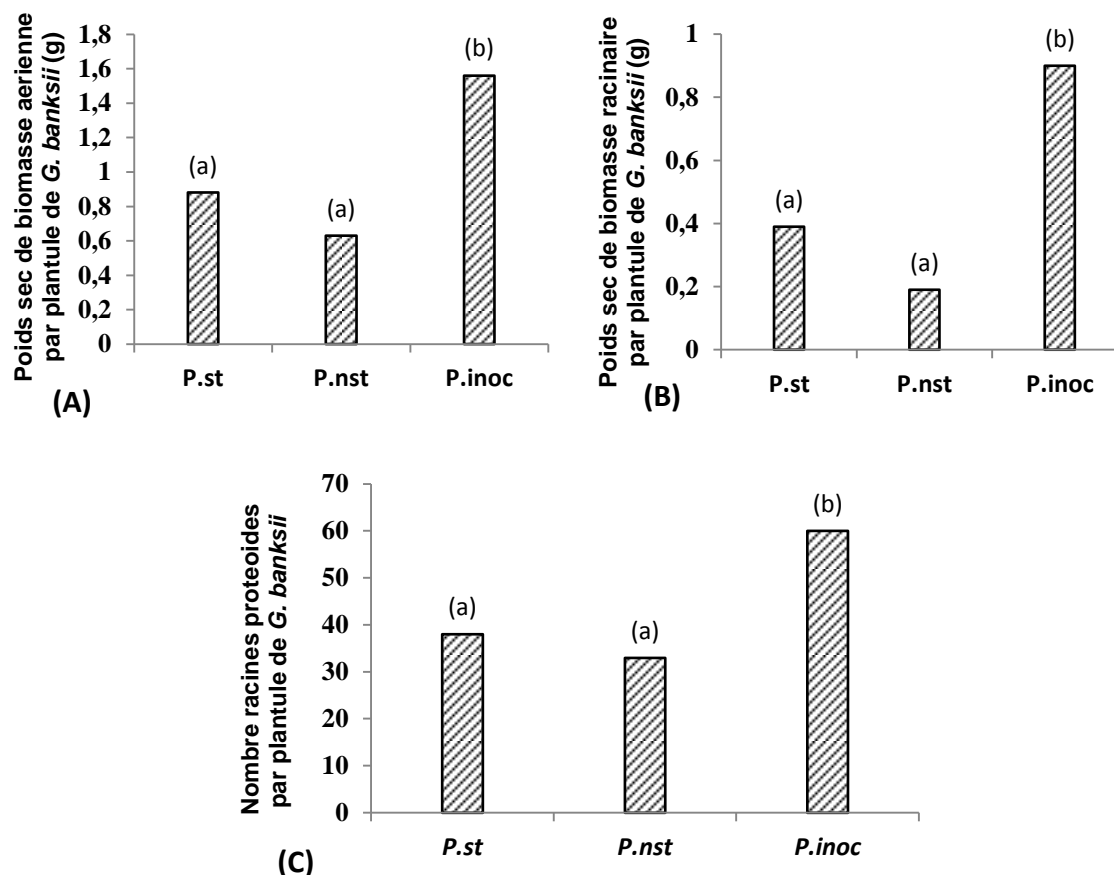


Figure 14. Nombre de racines protéoïdes et développement de *G. banksii* sur le sol stérilisé ou non et inoculé ou non en condition contrôlée: (A) Biomasse aérienne de *G. banksii* ; (B) Biomasse racinaire de *G. banksii* ; (C) nombre des racines protéoïdes par plantules de *G. banksii*

(*P.st*) sol sous pseudo-steppe stérilisé et cultivé de *G. banksii* (5mois) ; (*P.nst*) ; Sol sous pseudo-steppe non stérilisé et cultivé de *G. banksii* (5mois) ; (*P.inoc*) ; Sol sous pseudo-steppe inoculé par du sol rhizosphérique de *G. banksii* et cultivé de *G. banksii* (5mois).

Les traitements suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls.

III.5 Effets des extraits de racine et de feuille de *G. banksii* sur le dynamisme des microorganismes bénéfiques pour la plante

III.5.1 Activité antifongique

Les extraits de racine et de feuille de *G. banksii* n'ont pas présenté d'activité antifongique pour les quatre souches testées (trois souches de *Pisolithus* : PisE, Pis02 et Pis P) et une souche de scléroderme (SCA).

Tableau 11 : Résultats du test antifongique des extraits de racine et de feuille de *G. banksii*

Code	Origine géographique	Identification moléculaire	<i>Test antibiogramme</i>		
			Racines totales	Racines protéoïdes	Feuilles
Pis E	Ankatso-Antananarivo	Non identifié	-	-	-
Pis P	Ankatso-Antananarivo	Non identifié	-	-	-
PisO2	Arivonimamo-Antananarivo	<i>Pisolithus tinctorius</i>	-	-	-
SCA	Arivonimamo-Antananarivo	Non identifié	-	-	-

(-) Absence d'activité antifongique (+) Présence d'activité antifongique (**Pis E**) souche de *Pisolithus* sp. collectée sous *Eucalyptus*; (**Pis P**) souche de *Pisolithus* sp. collectée sous *Pinus* (**Pis02**) souche de *Pisolithus tinctorius* (**SCA**) souche de scléroderme

III.5.2 Activité antibactérienne

Les extraits de racine et de feuille de *G. banksii* ont présenté des activités inhibitrices d'intensité variable sur la croissance de certaines souches de rhizobia (Photo 7A) testées. Généralement, le développement de 8 souches sur les 26 testées a été inhibé par ces extraits. Pour les extraits aqueux de feuille de *G. banksii*, une inhibition non totale (présence de quelques colonies à l'intérieur de la zone d'inhibition) du développement de rhizobia (Photo 7B) a été observée sur 3 souches. Les extraits de feuille ont été moins actifs que ceux des racines quant à l'inhibition du développement des souches de rhizobia testées. Parmi les souches testées, STM609 une souche de référence compatible et efficiente avec *D. trichocarpa*, s'est montrée résistante avec tous les extraits aqueux de *G. banksii*. Cependant, ces mêmes extraits ont beaucoup influencé la nodulation chez *Dalbergia trichocarpa* inoculé avec la souche de STM609 *in vitro*. Ces résultats, présentés dans la figure 15, illustrent bien que l'ajout d'extraits aqueux de feuille ou de racine ou les deux à la fois dans un test de nodulation de *D. trichocarpa in vitro* inoculé par la souche STM609 a diminué

significativement le nombre de nodules formés au niveau des racines par rapport au traitement témoin.

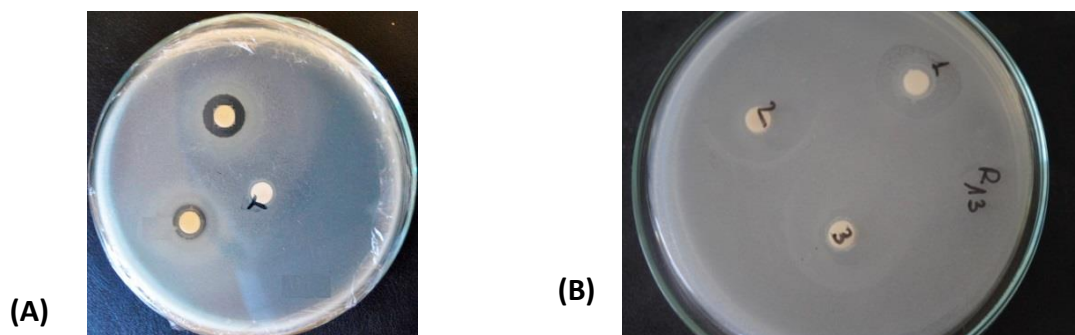


Photo 7 Inhibition du développement de rhizobia par les extraits de racine protéoïdes (A) et de feuille (B) de *G. banksii*

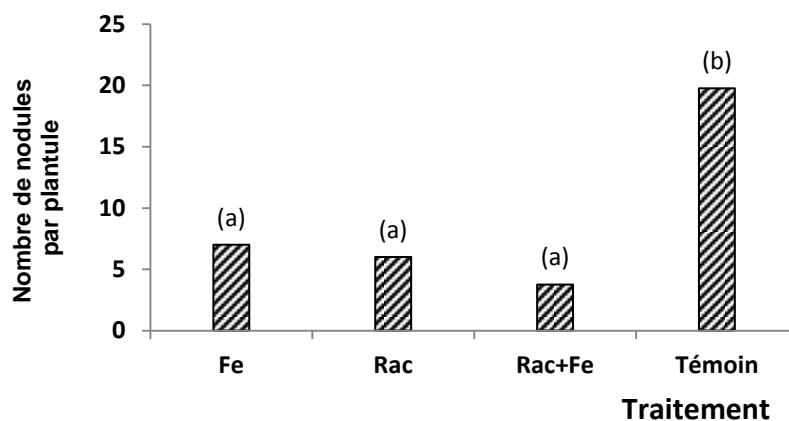


Figure 15. Impacts des extraits de feuille et de racine de *G. banksii* sur la nodulation chez *D. trichocarpa* inoculé par la souche STM 609

(*Fe*) extrait de feuille, (*Rac*) extrait de racine, (*Témoin*) Pas d'extrait

Les traitements suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls.

Tableau 12 : Activité antibactérienne des extraits de racine et de feuille de *G. banksii*

Code souches	Source (plante hôte/sol)	Espèce	Halos d'inhibition (mm)	
			Racines protéoïdes	Feuilles
STM 609	<i>D. purpurascens</i>	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	6	6
R4	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia arboris</i>	8	8
R5	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	6	6
R6	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia arboris</i>	6	6
R8	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	6	7
R10	Sol sous <i>G. banksii</i>	<i>Burkholderia</i> <i>contaminans</i>	6	6
R12	Sol sous <i>G. banksii</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	6	6
R13	Sol sous <i>G. banksii</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	6	10
R14	Sol sous <i>G. banksii</i>	<i>Burkholderia arboris</i>	6	6
R19	Sol sous <i>G. banksii</i>	<i>Burkholderia arboris</i>	6	6
R15	<i>Sol forestier</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	6	6
R16	<i>Sol forestier</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	6	6
R17	<i>Sol sous pseudo-steppe</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	6	6
R18	<i>Sol sous pseudo-steppe</i>	<i>Burkholderia arboris</i>	6	6
R45	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	8	-
R46	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	6	-
R50	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	6	-
R51	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Rhizobium etli</i>	6	-
R52	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Herbaspirillum</i> <i>frisingense</i>	6	-
R53	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	13	-
R55	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	8	-
R59	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	8	-
R61	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>	6	-
R67	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	6	-
R68	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	6	-
R69	<i>D. trichocarpa</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	15	-

IV. DISCUSSION

L'objectif principal de ce chapitre était de décrire les propriétés envahissantes de *G. banksii* sur le sol de la partie Est de Madagascar. L'étude a été focalisée sur la variation du développement de *G. banksii* via la formation des racines protéoïdes sur ses systèmes racinaires d'une part et sur le dynamisme des microorganismes du sol après installation de *G. banksii* d'autre part. Les effets allélopathiques des extraits aqueux de feuille, de racines totales

et de racines protéoïdes de *G. banksii* ont été testés sur la croissance des microorganismes symbiotiques associés aux plantes natives de Madagascar.

IV.1 Amélioration du développement de *G. banksii* : implication des racines protéoïdes

Pour se développer, les plantes ont besoin d'énergie venant généralement du rayonnement solaire, de l'eau, de macroéléments en grande quantité et de microéléments à l'état de trace. Dans les conditions où leurs besoins sont satisfaits, les plantes suivent un développement normal. Le résultat de cette étude a montré une forte stimulation du développement de *G. banksii* sur le sol forestier, considéré comme un sol riche en éléments nutritifs. Plusieurs auteurs ont déjà démontré que la disponibilité élevée en éléments nutritifs du sol favorise le développement des plantes exotiques envahissantes (Burke et Grime, 1996 ; Wedin et Tilman, 1996 ; Dukes et Mooney, 1999) plus que celui des plantes natives (Daehler, 2003). Toutefois, l'exportation des éléments nutritifs par la plante se trouve freinée à cause de leur perte ou insuffisance (Zhang *et al.*, 1996), ce qui va limiter la croissance de la plante à un certain moment. Cela peut être la raison pour laquelle *G. banksii* se développe moins (avec faible biomasse totale) sur le sol dégradé (sous pseudo-steppe) que sur le sol forestier. Par contre, le développement racinaire de *G. banksii* a été comparable pour les deux types de sol expliquant ainsi la capacité de la plante à exploiter plus d'éléments nutritifs quelque soit le type de sol (Lambers *et al.*, 1998).

Parmi les éléments nutritifs essentiels pour la plante, le phosphore constitue un des éléments les moins disponibles constituant ainsi un des facteurs majeurs limitant la croissance et le développement des plantes (Marschner, 1995 ; Hinsinger, 2001 ; Vance *et al.*, 2003). Les sols tropicaux sont pourtant généralement pauvres en phosphore disponible (Lal, 1990 ; Formoso, 1999). Ainsi, en réponse à l'insuffisance du phosphore, les plantes développent des mécanismes leur permettant de faciliter l'acquisition de cet élément nutritif. Parmi ces mécanismes figure la formation des racines protéoïdes chez les plantes de la famille des Proteaceae (Jeffrey, 1967 ; Stadel-Miller *et al.*, 2001 ; Neumann et Martinoia, 2002). Des auteurs ont indiqué par exemple que chez le lupin blanc, les racines protéoïdes participent à la solubilisation des phosphates dans le sol (Gardner *et al.*, 1983). Ces structures racinaires exsudent de l'acide citrique (Jones, 1998) et différentes enzymes phosphatases (Goldstein *et al.*, 1988a, 1988b) dans la rhizosphère dans des conditions de carence en phosphore. Ces racines protéoïdes sont habituellement abondantes quand la concentration en phosphore du milieu est faible c'est-à-dire que sa production est inversement proportionnelle à la quantité du

phosphore dans le sol (Lamont, 1972a ; Gardner *et al.*, 1982b ; Marschner, 1986 ; Marschner *et al.*, 1986 ; Walker et Pate, 1986 ; Louis *et al.*, 1990 ; Handreck, 1991 ; Skene *et al.*, 1996). Nos résultats ont montré que *G. banksii*, comme d'autres espèces de Proteaceae produit plus de racines protéoïdes dans le sol dégradé (sous pseudo-steppe) que dans le sol forestier.

Cette étude a montré également que la rhizosphère de ces racines protéoïdes de *G. banksii* abrite une importante quantité de microorganismes soit trois fois plus que dans le sol rhizosphérique (non protéoïdes) de *G. banksii*. Cette dense population de microorganismes a été accompagnée par une activité phosphatasique importante dans ce compartiment de sol. Parmi ces microorganismes, les bactéries capables de solubiliser des phosphates ont été les plus abondantes. La présence de ce groupe de microorganisme dans le sol rhizosphérique de racines protéoïdes de *Telopea speciosissima* a été déjà décrite (Wenzel *et al.*, 1994). En effet, au niveau de la rhizosphère, le mécanisme de solubilisation des phosphates par les microorganismes s'effectue souvent par une sécrétion de protons et d'agents complexant comme l'acide gluconique pour solubiliser le P-Ca, le P-Al ou le P-Fe (Gyaneshwar *et al.* 2002) ; alors que les racines de plantes les effectuent par une sécrétion d'acides organiques tels que les acides oxalique, malique et citrique (Cosgrove, 1977 ; Mengel et Kirkby, 1978 ; Gardner *et al.*, 1983 ; Marschner, 1986 ; Marschner *et al.*, 1987). Ainsi, ces résultats suggèrent que sur le sol dégradé, *G. banksii* a développé plus de racines protéoïdes créant ainsi un environnement favorable pour le développement de certains microorganismes du sol notamment les microorganismes capables de solubiliser le phosphate du sol permettant en même temps de satisfaire ses besoins en phosphore.

D'un autre côté, les analyses biomoléculaires utilisant la technique de DGGE ont permis d'identifier cinq types (genres) de microorganisme dans le sol adhérent aux racines protéoïdes de *G. banksii* dont *Burkholderia*, *Bacterium*, *Arthrobacter*, *Mucilaginobacter* et *Leifsonia*. Parmi ces bactéries, *Burkholderia* a été le plus abondant et constitue environ 40% des espèces présentes dans ce sol. Cette espèce est déjà identifiée dominante dans le sol rhizosphérique de racines protéoïdes de *Lupinus albus*, une autre espèce de Proteaceae (Weisskopf *et al.*, 2011). Ces auteurs ont montré que la baisse de pH, la production de citrate et d'oxalate généré au cours du développement des racines protéoïdes jouent un grand rôle sur l'établissement, le développement et la persistance de *Burkholderia*. Il a été déjà démontré également que plusieurs espèces de *Burkholderia* peuvent stimuler directement le développement de la plante. A titre d'exemple, l'inoculation par des souches de *Burkholderia* a significativement

amélioré le développement des biomasses aériennes et racinaires de maïs et de sorgho (Chiarini *et al.*, 1998 ; Bevivino *et al.*, 2000). Ces rhizobactéries facilitent le développement de la plante par différents mécanismes dont entre autres l'empêchement de la prolifération des organismes phytopathogènes, l'amélioration de l'acquisition des éléments nutritifs tels que l'azote, le phosphore, le fer ou la production d'hormones de croissance de la plante telles que les auxines ou les cytokines (Glick *et al.*, 1999 ; Vessey *et al.*, 2003). Ces résultats pourraient expliquer l'implication de ces microorganismes présents dans le sol adhérent aux racines protéoïdes dans l'amélioration du développement de *G. banksii*. Ces résultats conduisent pourtant à un nouveau questionnement scientifique sur les possibles rôles des microorganismes du sol sur l'induction de la formation des racines protéoïdes.

Des expérimentations réalisées sur le sol sous pseudo steppe visant à vérifier l'implication des microorganismes du sol sur la formation des racines protéoïdes ont été entreprises. Sur ce sol, préalablement stérilisé ou non, une formation des racines protéoïdes sur le système racinaire de *G. banksii* a été toujours enregistrée, ce qui suggère que la formation des racines protéoïdes chez *G. banksii* se fait indépendamment de la présence des microorganismes du sol. Par contre, il a été démontré chez *Hakea prostrata*, que les racines protéoïdes ne se forment pas en condition aseptique sur des sols préalablement stérilisés (Lamont *et al.*, 1974). La formation de ces structures racinaires est surtout stimulée dans les conditions de carence en éléments nutritifs tel que l'azote chez deux espèces de *Hakea* (Lamont, 1971). Dans une deuxième expérience où on a ajouté du sol rhizosphérique des racines protéoïdes de *G. banksii*, les résultats ont montré que le nombre de racines protéoïdes augmente et que le développement de la plante est nettement amélioré. Ces résultats conduisent à penser que les microorganismes rhizosphériques de ces racines protéoïdes interviennent dans le développement des racines protéoïdes chez *G. banksii* lui permettant de se propager rapidement dans son milieu d'installation. Ces résultats corroborent ceux de Gardner *et al.*, (1982) sur le lupin blanc (*Lupinus albus*).

IV.2 Dynamisme des microorganismes du sol après installation de *G. banksii*

Dans un écosystème terrestre, les communautés microbiennes du sol jouent un grand rôle dans le cycle des éléments nutritifs des plantes et régulent les interactions entre les différentes espèces de plantes de cet écosystème (Wolfe et Klironomos, 2005 ; Van Der Heijden, 2008). Plusieurs études ont montré que les plantes exotiques envahissantes peuvent influencer l'abondance, la composition et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol

(Callaway *et al.*, 2003 ; Lorenzo *et al.*, 2010). Les résultats de cette étude ont montré clairement que seulement 4 mois après installation de *G. banksii* sur les sols issus de différente couverture végétale dont le sol forestier et le sol sous pseudo-steppe, la communauté microbienne du sol a connu une forte modification. A la fois, la structure (par dénombrement des différents groupes physiologiques de microorganismes du sol) et le fonctionnement (mesuré par les activités enzymatiques du sol) des communautés de microorganismes sont affectés par l'installation de *G. banksii* dans les deux types de sol. En travaillant avec d'autres espèces exotiques (*Berberis thunbergii*, *Mikania micrantha*, *Falcataria moluccana*, *Centaurea solstitialis*, *Aegilops triuncialis*, *Lonicera maackii* et *Eupatorium adenophorum*), plusieurs auteurs ont montré l'altération dramatique des compositions des microorganismes du sol suite à l'installation de ces plantes exotiques (Kourtev *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2006 ; Allison *et al.*, 2006 ; Batten *et al.*, 2006 ; Arthur *et al.*, 2012). Ces modifications des communautés microbiennes du sol sont de plus en plus citées comme étant à l'origine de l'expansion des plantes invasives (Belnap et Philips, 2001 ; Kourtev *et al.*, 2002a ; 2003 ; Hawkes *et al.*, 2005 ; Batten *et al.*, 2006 ; Stinson *et al.*, 2006). Dans ce sens, Sun *et al.*, (2013) ont conclu que le changement de la structure des communautés microbiennes du sol et les activités enzymatiques jouent un rôle important dans le processus d'invasion de *E. adenophorum* dans la forêt secondaire du Sud-Ouest de la Chine.

En outre, nos résultats ont montré que la modification de la structure et du fonctionnement de champignon mycorhizien arbusculaire est remarquablement observée après installation de *G. banksii* sur les deux types de sol. Ceci se présente essentiellement par la diminution du potentiel infectieux mycorhizogène du sol. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus sur *Alliaria petiolata*, une plante invasive non mycotrophe dont son installation inhibe fortement les communautés de champignons endomycorhiziens dans la partie nord d'Amérique (Roberts et Anderson, 2001). Cette inhibition se présente par la perturbation de la germination des spores de champignons endomycorhiziens grâce aux composés allelopathiques que la plante produise permettant à cette espèce de se propager rapidement dans les sites envahis et inhibant ainsi le développement des plantes natives mycotrophes (Roberts et Anderson, 2001 ; Stinson *et al.*, 2006). Par contre, une étude récente a montré que l'installation d'une plante invasive mycotrophe, *Ageratina adenophora*, dans la forêt chinoise augmente l'abondance de champignon mycorhizien arbusculaire dans le sol favorisant l'établissement de la plante invasive mais inhibant le développement des plantes natives (Hong-bang *et al.*, 2007). Il est

déjà démontré également que des composés allelopathiques produits par les plantes invasives comme les sesquiterpènes induisent la prolifération des hyphes de champignons arbusculaires (Akiyama *et al.*, 2005). Ainsi, dans les deux cas, l'influence de plantes invasives sur les communautés de champignons arbusculaires dans le sol envahi dépend généralement du statut mycorhizien de ces plantes. Pourtant et quelque soit le statut mycorhizien de ces plantes, leur propagation inhibe toujours le développement des plantes natives.

IV.3 Effets allélopathiques des extraits de *G. banksii* sur les microorganismes symbiotiques

Vis-à-vis du développement des champignons ectomycorhiziens, nos résultats ont montré que les extraits de feuille et de racine de *G. banksii* ne présentent pas d'activité antifongique du moins sur les quatre souches de champignon ectomycorhizien testées. Ce qui suggère que des champignons ectomycorhiziens peuvent survivre sur le site envahi par *G. banksii*. Il est pourtant intéressant de savoir si ces champignons résistants à la propagation de *G. banksii* sont toujours capables de former des structures symbiotiques (mycorhizes) actives sur les plantes natives (voir chap. IV). Dans le site envahi par *A. petiolata*, une diminution du taux de colonisation de champignon ectomycorhizien a été observée sur le système racinaire de *Pinus strobus* (Wolfe *et al.*, 2008). Ces auteurs ont montré que le benzyl isothiocyanate, une substance chimique présente dans les tissus de *A. petiolata*, fait partie des responsables de l'inhibition du développement de champignon ectomycorhizien (Wolfe *et al.*, 2008).

A part la symbiose mycorhizienne, la symbiose fixatrice d'azote est parmi les plus importantes symbioses racinaires participant à l'amélioration de l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes. Ainsi, nous avons testé l'effet allélopathique des extraits aqueux des parties aérienne et racinaire de *G. banksii* sur le développement de quelques souches de rhizobia ainsi que sur la nodulation d'une espèce de légumineuse *D. trichocarpa*. Les résultats ont montré que le développement de certaines souches de rhizobium est inhibé par les extraits de *G. banksii* et que les extraits des racines sont plus actifs que ceux de feuilles. Ces résultats corroborent ceux obtenus sur l'effet allélopathique d'extraits de *Aristida adscensionis* sur le développement de rhizobium (Murthy et Nagodra, 1997). Ce qui suggère que certaines communautés de rhizobium du sol résistent dans le sol envahi par *G. banksii*. Ceci est confirmé par la présence de population de rhizobium dans le sol sous *G. banksii* (chapitre I).

Parmi les souches de rhizobium résistantes aux extraits de *G. banksii*, STM609 s'est déjà montrée efficiente et capable de former de nodules chez *D. trichocarpa* (Rasolomampianina *et*

al., 2005). Pourtant, nos résultats ont montré que le taux de nodulation de *D. trichocarpa* diminue en ajoutant des extraits aqueux de *G. banksii* lors du test de nodulation in vitro, inoculé avec la souche STM609. Thibault (1982) a montré que chez *Alnus crispa*, non seulement le nombre de nodule mais l'activité de nitrogénase est aussi affectée par l'extrait aqueux de *Populus balsamifera* limitant ainsi le développement de *A. crispa*. Nos résultats suggèrent que *G. banksii* influence la diversité et la structure des communautés de rhizobia au détriment des associations symbiotiques avec les plantes natives. Ceci pourrait influencer négativement le développement de *D. trichocarpa* sur le sol envahi par *G. banksii*.

V. CONCLUSION

Les résultats de ce chapitre illustrent les caractères invasifs de *G. banksii* par sa capacité à former des racines protéoïdes surtout dans les conditions de sol pauvre en éléments nutritifs. La formation de ces structures racinaires spéciales n'est pas significativement dépendante de la présence ou non des microorganismes du sol en général. Par contre, leur nombre augmente avec la présence des microorganismes du sol rhizosphérique de ces mêmes racines. Les analyses microbiologiques effectuées sur les sols fortement adhérents aux racines protéoïdes ont montré que ces structures racinaires abritent plusieurs microorganismes telluriques bénéfiques pour la croissance de la plante exotique (*G. banksii*). Cependant l'installation de *G. banksii* modifie généralement la structure et le fonctionnement des microorganismes telluriques. Enfin les parties aériennes et racinaires de *G. banksii* n'affectent pas directement la croissance des microorganismes du sol (champignons et rhizobia) mais elles inhibent partiellement l'association symbiotique entre les bactéries (rhizobium : STM609) et les légumineuses (*D. trichocarpa*). En bref, l'installation de *G. banksii* induit un changement au niveau des communautés microbiennes du sol qui pourra être nuisible pour le développement de la plante native mais favorise la performance de la plante invasive. Ceux-ci contribuent à l'invasivité de *G. banksii* dans son milieu d'introduction.

CHAPITRE III :

**DEVELOPPEMENT ET ASSOCIATION SYMBIOTIQUE DE
Dalbergia trichocarpa Baker, *ET Intsia bijuga*
(Colebr.) Kuntze, SUR LE SOL ENVAHI PAR *G. banksii***

DEVELOPPEMENT ET ASSOCIATION SYMBIOTIQUE DE *Dalbergia trichocarpa* ET *Intsia bijuga* SUR LE SOL ENVAHI PAR *G. banksii*

I. INTRODUCTION

Les plantes constituent une composante majeure de différents écosystèmes et assurent en grande partie leur bon fonctionnement à travers particulièrement les cycles biogéochimiques des éléments (Chapin *et al.*, 1997). De ce fait, leur installation affecte beaucoup les écosystèmes naturels (Binggeli, 2003 ; Carrière *et al.*, 2008). Récemment, les interactions des plantes avec la faune et la flore du sol font l'objet de l'attention particulière des scientifiques en raison de la potentialité des feedback plant-sol qui peuvent influencer positivement ou négativement la structure et le fonctionnement de la communauté végétale (van der Putten *et al.*, 1993 ; Bever 1994 ; Bever *et al.*, 1997 ; Klironomos, 2002 ; Bever, 2003 ; Reynolds *et al.*, 2003 ; Kardol *et al.*, 2006 ; Kardol *et al.*, 2007). Les modifications au niveau de la composition floristique consécutive à l'invasion d'une espèce exotique, pourraient donc altérer indirectement le fonctionnement de tout l'écosystème notamment l'évolution des communautés microbiennes du sol intimement liées à la succession végétale (Ohtonen *et al.*, 1999 ; Bardgett *et al.*, 2005b).

Des études ont montré que la propagation des plantes exotiques invasives constitue une source importante de perturbation au niveau de la structure et du fonctionnement des microorganismes du sol (Kourtev *et al.*, 2002 ; Kuske *et al.*, 2002 ; Batten *et al.*, 2006 ; Hawkes *et al.*, 2006 ; Reinhart *et al.*, 2006). Cependant, les effets du changement des communautés microbiennes du sol, induits par les plantes invasives, sur la performance de plantes natives sont peu explorés (Klironomos, 2002 ; Wolfe et Klironomos, 2005). Ainsi, l'objectif de ce chapitre est d'évaluer les modifications induites par *G. banksii* au niveau des communautés microbiennes du sol, particulièrement les communautés microbiennes symbiotiques (Champignons mycorhiziens, bactéries nodulant les légumineuses) de *D. trichocarpa* et d'*I. bijuga*.

L'hypothèse de l'étude stipulait que la propagation de *G. banksii* affecterait les champignons mycorhiziens, les bactéries fixatrices d'azote et leurs microorganismes associés, se traduisant par des modifications de la structure spécifique et fonctionnelle des communautés microbiennes du sol garant du bon développement et de la conservation des essences ligneuses autochtones.

L'investigation consiste à déterminer la diversité des microorganismes symbiotiques présents dans le sol à différents états de dégradation (issu des trois parcelles d'étude) suivi

de l'évaluation du développement des essences natives de Madagascar sous les conditions de ces types du sol. La culture des plantules de *I. bijuga* et de *D. trichocarpa* sur ces sols permettra de piéger les microorganismes symbiotiques (mycorhiziens ou fixateurs d'azote) associés respectivement à ces deux plantes. La structure et le fonctionnement de ces microorganismes seront par la suite caractérisés pour déterminer globalement les impacts de la pré-installation de l'espèce invasive, *G. banksii*. La diversité et les activités des microorganismes telluriques seront évalués dans chaque sol de culture.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériels végétaux

II.1.1 *Dalbergia trichocarpa*

Dalbergia trichocarpa Baker, est une essence ligneuse endémique de Madagascar et qualifiée comme bois de haute qualité. On la trouve dans plusieurs régions de Madagascar mais elle est particulièrement abondante dans la partie Est de la Grande île. Elle appartient à la famille des Fabaceae. Cette espèce à croissance lente peut s'associer aux deux types de symbiose racinaire dont la symbiose fixatrice d'azote et la symbiose endomycorhizienne (Mycorhize à vésicules et arbuscules, MVA).

II.1.2 *Intsia bijuga*

Intsia bijuga (Colebr.) Kuntze, est une plante vasculaire, dicotylédone, appartenant à la famille des Fabaceae, c'est un grand arbre atteignant 15 à 40 m de hauteur et 60 à 120 cm de diamètre. C'est une espèce autochtone à Madagascar et connue sous les noms communs de « Hintsy », « Tsararavina » ou « Harandranto » en malagasy, faux gaiac en français et « Merbau », « Borneo teak » ou « Moluccan ironwood » en anglais. A Madagascar, elle pousse généralement à la périphérie des formations forestières de basse altitude le long de la partie orientale.

II.2 Pré-germination des graines

II.2.1 *Dalbergia trichocarpa*

La scarification et stérilisation superficielle des graines de *D. trichocarpa* ont été effectuées par immersion dans de l'eau de javel pendant quelques minutes suivies par rinçage abondante dans de l'eau distillée préalablement stérilisée. Les graines ont été par la suite pré-germées dans du sable stérilisé à 140°C pendant 40mn puis incubées à 30°C à l'obscurité et en atmosphère humide jusqu'à ce que les racelles atteignent 1 à 3 cm de longueur.

II.2.2 *Intsia bijuga*

La levée de dormance des graines d'*I. bijuga* a été effectuée manuellement. Les graines ont été grattées au niveau du tégument à l'aide d'une lime. Puis elles ont été lavées avec de l'eau du robinet pour enlever les débris et rincées à l'eau distillée stérile. Les graines rincées ont été incubées dans de l'eau distillée stérile pendant 24h sous la température ambiante du laboratoire. Les graines ont été par la suite transférées dans du sable stérilisé et incubées à l'obscurité jusqu'à ce que les germes atteignent 3 à 4 cm de longueur.

II.3 Dispositif expérimental

Trois types de sol, à savoir le sol sous *G. banksii*, le sol sous pseudo-steppe et le sol forestier, provenant du site d'étude de *Ianjomara* ont été préparés pour une expérimentation sous serre visant à suivre le développement des deux plantes et l'évolution de la communauté microbienne du sol. Les sols ont été partagés dans des pots plastiques de 1L. Vingt et cinq répétitions ont été effectuées pour chaque espèce de plante et pour chaque type de sol.

Une graine pré-germée des essences forestières (*I. bijuga* ou *D. trichocarpa*) a été plantée dans chaque pot. Les pots ont été placés en randomisation totale, partagés en deux blocs de même composition et entretenus sous la serre du LME/CNRE (environ 12h de lumière naturelle par jour, 28°C de température moyenne du jour et 18°C de température moyenne de la nuit). Les plants ont été arrosés deux fois par semaine avec de l'eau du robinet sans les fertiliser.

II.4 Evaluation des effets de l'installation de *G. banksii* sur le développement de *I. bijuga* et *D. trichocarpa*

Les effets de l'installation de *G. banksii* dans le sol sur le développement des deux essences ligneuses, (*D. trichocarpa* et *I. bijuga*) ont été évalués en considérant des paramètres liés au développement des plantes, aux infections des racines par des microorganismes symbiotiques ou à la structure et au fonctionnement des microorganismes du sol.

II.4.1 Développement de la plante

L'évolution du développement des plantes (*I. bijuga* et *D. trichocarpa*) pour chaque type du sol a été évaluée en mesurant leurs biomasses aériennes et racinaires.

II.4.1.1 Biomasse aérienne

Après cinq mois de culture, cinq plants choisis au hasard ont été prélevés pour chaque traitement, puis les parties aériennes et racinaires ont été séparées au niveau du collet. Les mêmes plantes ont été utilisées pour la suite des activités.

La biomasse aérienne des plantes est constituée par l'ensemble des feuilles et des tiges au-dessus du collet. Après un léger lavage à l'eau du robinet, les parties aériennes ont été enveloppées dans du papier aluminium, puis séchées dans une étuve à 100°C pendant 24h. La biomasse aérienne est par la suite évaluée sur une balance de précision juste quelques instants après avoir sorti les échantillons de l'étuve. Cette précaution permet d'éviter d'éventuel changement de poids des échantillons dû aux conditions de conservation au laboratoire.

II.4.1.2 Biomasse racinaire

Les systèmes racinaires de chaque plante prélevée ont été soigneusement récupérés. Les sols rhizosphériques ont été récupérés en secouant les racines et éventuellement par rinçage à l'eau courante. Les sols ainsi obtenus ont été séchés à l'air libre, puis conservés à +4°C pour des analyses microbiologiques. Après avoir effectué les observations relatives au taux de mycorhization, les systèmes racinaires ont été séchés à l'étuve 100°C pendant 24h. La biomasse racinaire a été évaluée sur balance de précision juste quelques instants après avoir sorti les échantillons de l'étuve.

II.4.2 Taux de mycorhization

II.4.2.1 Taux d'ectomycorhization chez *I. bijuga*

Après cinq mois de culture sur les trois types de sol, le taux d'ectomycorhization d'*I. bijuga* a été évalué sur les systèmes racinaires des plantules. Le système racinaire de chaque plante a été soigneusement prélevé et rincé abondamment avec de l'eau du robinet puis étalé dans une boîte de pétri contenant de l'eau distillée de manière à obtenir une répartition homogène des bouts de racine. Sur un champ de loupe binoculaire au grossissement X40, contenant au moins cent bouts de racine, le nombre de bouts racinaires ectomycorhizés a été compté. Au moins, trois comptages ont été effectués pour chaque système racinaire. La moyenne ainsi obtenue donne le taux d'ectomycorhization en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'ectomycorhization} = \frac{\text{Nombre de racines ectomycorhizées}}{\text{Nombre total de racines observées}} \times 100$$

II.4.2.2 Taux d'endomycorhization chez *D. trichocarpa*

Le taux d'endomycorhization concerne uniquement les plants de *D. trichocarpa*. Cinq plantules ont été prises au hasard, et les systèmes racinaires ont été lavés avec de l'eau du robinet. Les racines fines de chaque système racinaire ont été soigneusement prélevées et colorées suivant la technique de Phillips et Hayman, (1970). Les racines ont été trempées dans une solution de KOH 10% à 90°C pendant 30min. Elles ont été, par la suite, rincées plusieurs fois à l'eau distillée et puis colorées dans une solution de bleu trypan 0,5% pendant 30 min à 90°C. Avant l'observation sous microscope optique (grossissement X40), les racines ont été lavées à l'eau du robinet puis découpées en morceaux d'environ 1cm et déposées entre lame et lamelle à raison de 10 fragments par lame. La présence de vésicules et/ou d'organe fongique indique la colonisation des racines de la plante par les champignons endomycorhiziens. Environ 100 fragments ont été observés pour chaque système racinaire. Le taux de mycorhization (TM) est donné par la formule suivante:

$$TM = \frac{\text{Nombre de fragments de racines colonisées}}{\text{Nombre total de fragments de racines observées}} \times 100$$

II.4.3 Diversité morphologique et moléculaire des ectomycorhizes

II.4.3.1 Morphotypage des ectomycorhizes

Le morphotypage consiste à classer les différents morphotypes de bouts racinaires ectomycorhizés selon des caractères morphologiques observables à l'œil nu et/ou sous loupe binoculaire. Chaque morphotype d'ectomycorhize a, par la suite, fait l'objet d'étude morphologique plus approfondie selon les critères proposés par Agerer, (1991). La couleur et la texture du manteau, la couleur et l'abondance des hyphes externes, la présence et la couleur des cordons de chaque morphotype observé sous loupe binoculaire ont été utilisés pour classer les morphotypes dans différents groupes. Tous les morphotypes ont été par la suite conservés séparément dans des tubes de 1,5 ml contenant une solution GEE (Glycérol 30%, Ethanol 30% et Eau 40%) et stockés à -20°C pour des analyses moléculaires.

II.4.3.2 Analyse moléculaire des ectomycorhizes

L'analyse moléculaire des ectomycorhizes consiste à identifier le taxon prélevé en utilisant les techniques moléculaires. Cette caractérisation spécifique a été réalisée en étudiant le polymorphisme de l'ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de l'ADN ribosomique nucléaire des cellules fongiques par la technique de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) et du séquençage de l'ITS.

II.4.3.2.1 Extraction de l'ADN des ectomycorhizes

Il existe différents protocoles d'extraction d'ADN qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- lyse des cellules ;
- élimination des protéines ;
- élimination des autres acides nucléiques (ARN, etc.) ;
- concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

Différentes variantes sont employées, suivant que l'on cherche à extraire de l'ADN génomique (issu du ou des chromosomes des cellules analysées) ou de l'ADN plasmidique (provenant de plasmides portés le plus souvent par des cellules bactériennes comme *Escherichia coli*). Des kits commerciaux sont disponibles pour réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi.

Dans notre cas, l'ADN génomique a été extrait à l'aide de kits commerciaux, DNeasy plant mini kit (Qiagen). Ce kit permet d'extraire en même temps l'ADN fongique et l'ADN de la plante à partir des structures ectomycorhiziennes. L'extraction a été faite, selon les directives du fabricant du kit, au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE (Madagascar). Les extraits ont été, par la suite, séchés au vacuum afin de préserver leur qualité. Les analyses moléculaires ont été réalisées à l'Université Laval (Québec, Canada) (Laboratoire de l'Institut Biologique et Intégrative des Systèmes) où les échantillons d'ADN ont été remis en suspension dans 30 µl d'eau *Gibco* dès l'arrivée au laboratoire puis conservés à -20°C.

II.4.3.2.2 Amplification de la région ITS

Parmi les approches moléculaires disponibles en systématique fongique, nous avons utilisé celle basée sur l'analyse des séquences de l'ADN ribosomique. L'unité ribosomique présente dans le génome de tous les organismes, est répétée en tandem chez les champignons. Les séquences de cette unité contiennent à la fois des régions variables et des régions conservées. Dans notre cas, la région ITS de l'ADN ribosomique nucléaire a été la cible de la caractérisation. La région amplifiée comprend ITS-1, ADNr 5.8S et ITS-2. Cette région, assez bien conservée à l'intérieur d'une même espèce fongique, est très variable d'une espèce à une autre et constitue donc un bon indicateur taxonomique à l'échelle de l'espèce, chez bon nombre de champignons. Deux amorces universelles ITS1F (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA3') l'amorce spécifique des champignons (Gardes et Bruns, 1993) et ITS-4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White *et al.*, 1990) ont été utilisées pour l'amplification. La réaction d'amplification a été réalisée en ajoutant dans un

mélange réactionnel de volume final de 20 μL : 1 μL d'échantillon d'ADN; 1,2 μL de MgCl_2 (25mM); 0,4 μL de dNTPs (10mM), 0,2 μL d'enzyme de polymérase (Taq Sigma, 5U par réaction); 0,4 μL d'amorces (25 μM) et 2 μL du tampon enzyme (10X, Sigma). Les amplifications se sont déroulées dans un thermocycler selon le programme suivant : la dénaturation initiale d'ADN pendant 4 min à 94°C suivi de 35 cycles à trois étapes (dénaturation pendant 1 min à 94°C, hybridation des amorces pendant 1 min à 55°C, élongation de l'ADN pendant 1 minute à 72°C) puis élongation finale de 10 min à 72 °C.

Les produits d'amplification ont été vérifiés par la technique de l'électrophorèse. Cette technique consiste à faire migrer sur un gel d'agarose à 1%, préparé avec du tampon TAE 1X (0,02 M Tris-Acétate ; 0,05 mM EDTA), un aliquot de 4 μL des produits PCR + 1 μL de tampon de charge (6x Load, Proméga). L'électrophorèse se déroule dans du tampon TAE 1X (0,02 M Tris-Acétate ; 0,5 mM EDTA) sous une tension de 100V pendant 120 min. Afin d'estimer la taille des fragments amplifiés, un marqueur de masse moléculaire (100 pb ladder, Proméga) a été mis à migrer parallèlement avec les produits d'amplification. Les fragments d'ADN ont été visualisés sous UV (UVP, GelDoc-It 310 Motorized Lens) après avoir trempé le gel dans une solution de bromure d'éthidium 1% pendant 20 min suivi d'un rinçage dans de l'eau distillée pendant 15 à 20 min.

II.4.3.2.3 Analyse RFLP des produits d'amplification de la région ITS

La technique de ITS-RFLP consiste à une digestion enzymatique de la région ITS. Elle permet d'identifier le polymorphisme d'une population ou communauté par restriction d'une zone ou région d'ADN bien ciblée, dans la plupart des cas, une région ou une zone où des mutations ponctuelles peuvent se passer engendrent une apparition ou une disparition de sites de restriction. Trois enzymes de restriction : *Alu I*, *RSaI*, *Hinf I* (Proméga) ont été utilisées pour digérer les fragments PCR-ITS. Un aliquot de 12 μL de chaque échantillon d'ADN amplifié a été digéré dans un volume final de 25 μL d'un mélange réactionnel contenant 2,5 μL de tampon NEB #4 recommandé pour tous les quatre enzymes de restriction et 0,25 μL d'enzyme de restriction. Les échantillons ont été ensuite incubés pendant 2h à 37°C. Les produits des digestions enzymatiques ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% qui comprend 7,5g d'agarose (1,5%), 25ml d'éthanol et 2,5g de synergel (0,5%) permettant la séparation de fragments d'ADN de petite taille. Un marqueur de poids moléculaire (100pb ladder Proméga) a été chargé parallèlement aux produits de la digestion pour permettre la détermination de la taille des fragments digérés. La migration se fait dans du tampon TAE 1X (0,04 M Tris-Acétate ; 1mM EDTA). Les profils de restriction ont été visualisés et photographiés et les tailles des

fragments déterminées comme précédemment décrit pour les amplifiants. Les profils de restriction identiques sont groupés dans une unité taxonomique opérationnelle (OTU).

II.4.4 Nodosités chez *D. trichocarpa*

II.4.4.1 Collecte et conservation de nodules

Sur le système racinaire de *D. trichocarpa*, cultivé dans des pots contenant respectivement les trois types de sol, les nodules formés ont été collectés et dénombrés. Ces nodules ont été conservés dans des tubes contenant du gel de silice (silicagel) pour l'isolement ultérieur des bactéries nodulant les légumineuses (BNL).

II.4.4.2 Isolement et purification des isolats de BNL à partir de nodules

L'isolement des isolats de BNL a été réalisé à partir de nodules frais ou de nodules secs (seuls les nodules issus de *D. trichocarpa* cultivé sur le sol sous *G. banksii* ont fait l'objet d'isolement). Les nodules frais ont été utilisés directement, alors que ceux qui sont conservés par dessiccation ont été réhydratés à l'aide de l'eau distillée stérile. La technique consiste à imbiber à l'aide de l'eau distillée stérilisée, les nodosités pendant 4 à 24 heures selon l'état des nodules. Une fois que ces nodosités ont repris leur volume initial, elles ont été désinfectées superficiellement dans l'alcool 96°C pendant 5 à 10 secondes suivi d'un rinçage successif avec de l'eau distillée stérile 5 à 10 fois. Les nodules ont été, par la suite, déposés dans une boîte de pétri stérile dans deux à trois gouttes d'eau distillée stérile par nodule puis écrasés avec une pince stérile pour obtenir une suspension de nodules. Un étalement de la suspension de nodule a été fait à l'aide d'une anse de platine selon la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970) sur des boîtes de pétri contenant préalablement de milieu YMA (Yeast Mannitol- Agar). Les boîtes ensemencées ont été par la suite incubées dans une étuve à 30°C pendant 48 à 72 heures. La purification des isolats obtenus a été effectuée par un repiquage successif des colonies dans un milieu de culture YMA.

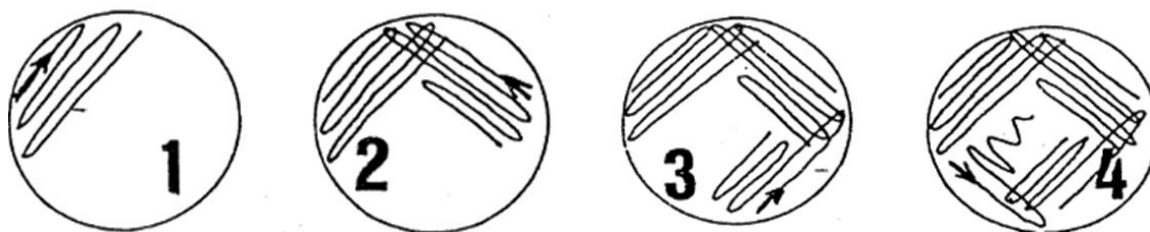


Figure 16 Ensemencement par la technique des quatre cadrans (Vincent, 1970)

II.4.4.3 Conservation des isolats

Les isolats sélectionnés ont été ensemencés dans des tubes contenant du milieu YMA dépourvu de rouge Congo à gélose inclinée puis maintenu à + 4°C. Une copie de chaque isolat a été également conservée dans des congélateurs à - 20°C et à - 80°C dans des cryotubes stériles contenant 100µl de glycérol 40% ensemencés par l'isolat pur à l'aide d'une anse de platine.

II.4.4.4 Test de nodulation

Le test de nodulation des isolats vise à identifier et à évaluer leur aptitude à former des nodules avec la plante hôte dans des conditions bactériologiquement contrôlées (Vincent, 1970 ; Beck *et al.*, 1993). Ce test consiste en l'inoculation des plantules de *D. trichocarpa* avec ces isolats dans des tubes Gibson contenant une gélose inclinée de milieu de Jensen (Gibson, 1963) (Composition du milieu Jensen en annexe 5). L'inoculation a été effectuée, après 3 à 4 jours de repiquage des graines, par ajout dans le milieu de Jensen en tube 1ml de culture des isolats de BNL en milieu YM liquide en phase exponentielle. Les plantes ont été incubées dans une chambre de culture (température moyenne 25°C, 12h de lumière et 12h d'obscurité). La formation des nodules au niveau des systèmes racinaires a été vérifiée tous les jours durant les 6 à 8 semaines du test.

Ce test permet de sélectionner les isolats de BNL capables de ré-noduler *D. trichocarpa*. La capacité des isolats efficaces à stimuler le développement de *D. trichocarpa* sera par la suite testée sur le sol pré-colonisé par *G. banksii* (Chapitre IV).

II.4.4.5 Caractérisation moléculaire des isolats de BNL

Tous les isolats de BNL efficaces ont fait l'objet d'extraction d'ADN génomique. L'extraction d'ADN a été effectuée en utilisant le protocole décrit par Sritharan et Barker (1991) (protocole donné dans l'annexe 6). Un microlitre de lysat dilué contenant tout l'ADN de l'isolat bactérien a été traité par un appareil PCR de type Eppendorf AG 2233/Hamburg à l'aide de deux amorces bactériennes universelles ciblées pour l'ADNr16S:

➤ **Amorce 1. RD1** (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') Weisburg W.G *et al.*, (1991)

➤ **Amorce 2. FGPS6** (5'-GGAGAG TTAGATCTTGGCTCA-3'), Normand *et al.*, (1992)

L'utilisation de ces amorces spécifiques permet d'amplifier un segment d'ADN d'environ 1300 paires de base.

Les échantillons d'ADN ont été par la suite utilisés pour produire plusieurs copies d'une zone spécifique de l'ADN (la région codée par l'ARN 16S). Le séquençage des fragments

d'ADNr 16S a été par la suite effectué et les séquences ainsi obtenues ont été comparées à l'ensemble de celles déjà déposées dans les bases de données du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

II.4.5 Activités enzymatiques du sol

Pour chaque type de sol et chaque type de plante, l'activité microbienne totale du sol mesurée par la capacité des microorganismes à hydrolyser la Fluorescéine Diacétate (FDA) et l'activité des enzymes phosphatasiques actives en milieu acide ou alcalin hydrolysant le para Nitrophenyl Phosphate (p-NPP) ont été évaluées selon la technique décrite au chapitre I (paragraphe II.4.2.2). La quantité des produits de l'hydrolyse qui sont respectivement de la fluorescéine et du p-NPP a été évaluée au spectrophotomètre respectivement sous la longueur d'onde 490 nm et 400 nm. Les résultats sont exprimés par la quantité de produit d'hydrolyse par gramme de sol et par unité de temps.

II.4.6 La diversité microbienne du sol

La flore totale cultivable du sol, les actinomycètes ainsi que la flore capable de solubiliser le phosphate dans chaque type de sol ont été dénombrés. Le nombre de ces groupes de microorganisme a été évalué respectivement sur milieu TSA (*Tryptic Soy Agar*), milieu Waksman et milieu TCP (*Phosphate TriCalcique*). Cent microlitre d'une dilution précise de la solution de sol ont été étalés sur le milieu solide pré-fabriquée spécifique pour chaque groupe de microorganisme. Le nombre de la flore totale cultivable a été compté après 24, 48 et 72 heures d'incubation à 30°C. Les colonies d'actinomycète ont été dénombrées après 7 jours d'incubation. Les colonies bactériennes solubilisatrices de phosphate se distinguent des autres microorganismes sur milieu TCP par leur capacité à solubiliser cette source de P qui se traduit par l'apparition de halo clair autour des colonies alors que le reste du milieu reste opaque.

III RESULTATS

III.1 Développement de *I. bijuga* et de *D. trichocarpa* sur les 3 types de sol

L'évolution du développement de *I. bijuga* et de *D. trichocarpa* sur les sols issus de type de végétation différente est présentée dans la figure 17. Ces résultats ont montré que les deux essences forestières se développent significativement moins sur le sol sous *G. banksii* et sous pseudo-steppe que sur le sol forestier. De même, ce faible développement des plantes a été accompagné par des très faibles taux d'ectomycorhization pour *I. bijuga*. Par

contre, aucune différence significative n'a été observée entre les taux de mycorhization de *D. trichocarpa* enregistrés sur les trois types de sol (Tableau 13).

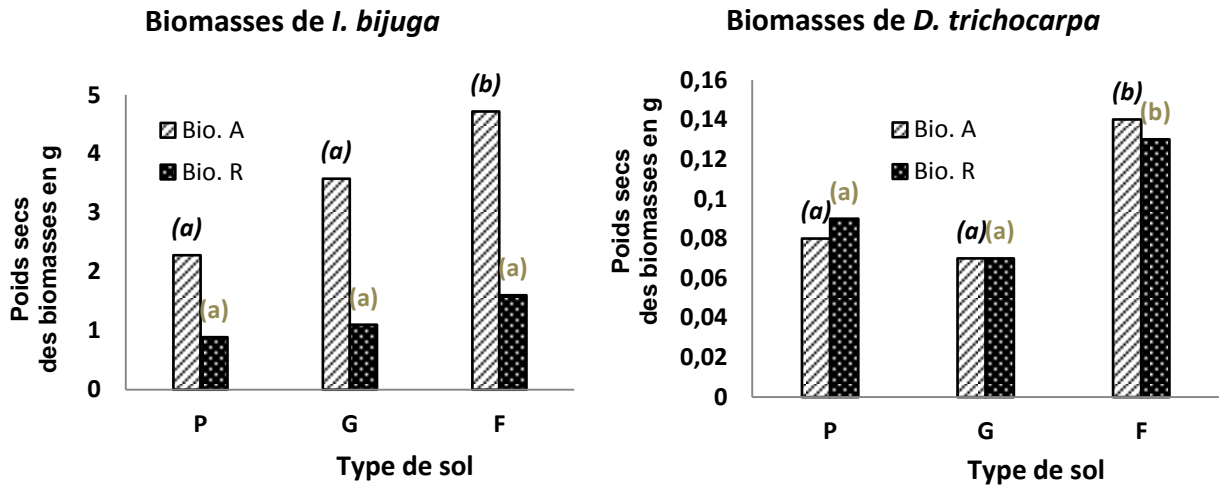


Figure 17. Evolution du développement de *I. bijuga* et de *D. trichocarpa* sur les 3 types de sol

Les traitements suivis d'une même lettre et de même couleur constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls

Signe: (P) sol sous pseudo-steppe, (G) sol sous *G. banksii*, (F) sol forestier
(Bio. A): Biomasse aérienne, (Bio. R): Biomasse racinaire

Tableau 13: Variation du taux d'ectomycorhization de *I. bijuga* et taux d'endomycorhization de *D. trichocarpa* sur les trois types de sol

	Taux de mycorhization (%)	
	<i>I. bijuga</i>	<i>D. trichocarpa</i>
Sol sous pseudo-steppe	18,4 a	63,4 a
Sol sous <i>G. banksii</i>	12,6 a	64,3 a
Sol forestier	45,2 b	73,4 a

Les données dans la même colonne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ($p < 0,05$)

III.2 Nodosités chez *D. trichocarpa* sur les trois types de sol

Après cinq mois de culture de *D. trichocarpa* sur les sols d'étude, des différences significatives du nombre de nodules par plantule ont été observées entre les 3 types de sol, selon le test de Newman Keuls au seuil de probabilité 0,05 (Figure 18). En effet, le taux de nodulation a enregistré sa plus faible valeur sur le sol colonisé par *G. banksii*. Par contre, les plants cultivés sur le sol sous pseudo-steppe et sur le sol forestier ont présenté des taux de nodulation comparables.

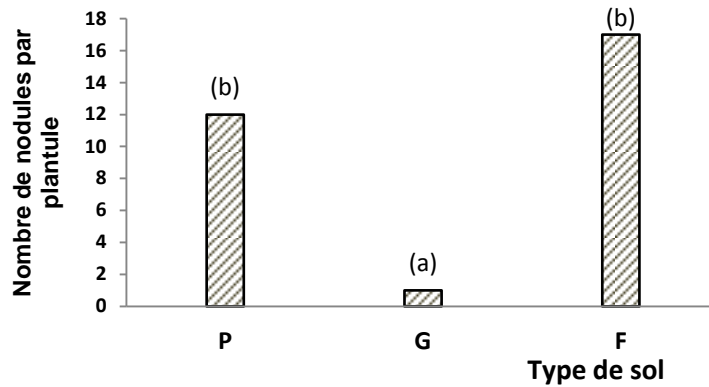


Figure 18. Variation du nombre de nodules par plantule de *D. trichocarpa* sur trois types de sol

Les traitements suivis d'une même lettre constituent un groupe statistiquement homogène, au seuil de probabilité 0,05, selon le test de Newman-Keuls

Sigle: (P) sol sous pseudo-steppe, (G) sol sous *G. banksii*, (F) sol forestier

III.3 Caractères morphologiques des ectomycorhizes chez *I. bijuga* sur les trois types de sol

La caractérisation morphologique des ectomycorhizes sur les racines de *I. bijuga* a été basée sur les quatre critères suivants: (i) couleur du manteau, (ii) texture du manteau, (iii) ramification des fragments mycorhizés, (iv) couleur des hyphes fongiques. Ainsi, 10 morphotypes ont été récoltés sur le sol forestier, 5 sur le sol sous *G. banksii* et 5 morphotypes sur le sol sous pseudo-steppe (Tableau 14). En comparant tous les morphotypes observés dans les trois types de sol, 11 morphotypes ont été identifiés. Quatre morphotypes (M1, M2, M8, M10) ont été partagés par les plants du sol forestier et ceux du sol sous *G. banksii*. Un autre morphotype (M11) a été observé à la fois sur les plants du sol sous *G. banksii* et ceux du sol sous prairie. Par contre, trois morphotypes (M3, M5 et M6) ont été récoltés uniquement sur les plants du sol forestier.

Tableau 14 : Diversité morphologique des ectomycorhizes de plants de *I. bijuga* sur les 3 types de sol

Morphotype	Type de sol			Caractères morphologiques
	F	G	P	
M1	(+)	(+)	(-)	Marron, texture ornementé, non ramifié, absence d'hyphe
M2	(+)	(+)	(-)	Jaune, texture ornementé, non ramifié, absence d'hyphe
M3	(+)	(-)	(-)	Noir, texture ornementé, non ramifié, hyphe marron
M4	(+)	(-)	(+)	Blanc, texture lisse, non ramifié, hyphe jaune
M5	(+)	(-)	(-)	Marron foncée, texture ornementée, non ramifiée, Hyphe marron
M6	(+)	(-)	(-)	Marron clair, texture ornementé, non ramifié, absence d'hyphe
M7	(+)	(-)	(+)	Marron clair, texture lisse, ramifié, hyphe jaune
M8	(+)	(+)	(+)	Marron clair, texture lisse, non ramifié, absence d'hyphe
M9	(+)	(-)	(+)	Marron, texture ornementé, non ramifié, hyphe jaune
M10	(+)	(+)	(-)	Marron foncée, texture ornementé, ramifié, hyphe marron
M11	(-)	(+)	(+)	Jaune, texture lisse, non ramifié, hyphe jaune

(+) présence ; (-) absence ; (P) sol sous pseudo-steppe ; (G) sol sous *G. banksii* ; (F) sol forestier ; (M) morphotype ;

III.4 Diversité génétique des ectomycorhizes de plants de *I. bijuga*

Pour tous les 11 morphotypes d'ectomycorhize observés au niveau des systèmes racinaires d'*I. bijuga* cultivé sur les trois types de sol, trois échantillons par morphotype et par type de sol ont été utilisés pour extraire l'ADN du champignon formant les mycorhizes. Au total, 60 échantillons d'ADN ont fait l'objet de caractérisation moléculaire. Une amplification des fragments d'ADN par PCR (région ITS) suivie par la fragmentation des produits amplifiés (RFLP) par les enzymes de restriction a été effectuée. Parmi les 60 échantillons d'ADN, on a pu amplifier par la technique de PCR-ITS 30 extraits d'ADN. Le groupement des amplifiants en OTUs a été basé sur l'utilisation combinée de trois enzymes de restriction (*HinfI*, *RsaI* et *AluI*) (Photo 8). En effet, ces amplifiants sont groupés dans 17 OTUs dont 11 OTUs dans le sol forestier, 3 OTUs dans le sol de pseudo-steppe et 3 OTUs dans le sol de *G. banksii* (tableau 15). Aucun OTU commun n'a été observé pour les trois types de sol indiquant que la technique de RFLP utilisant les trois enzymes cités ci-dessus n'a décelé aucun morphotype commun chez les plants de *I. bijuga* cultivé sur les trois sols.

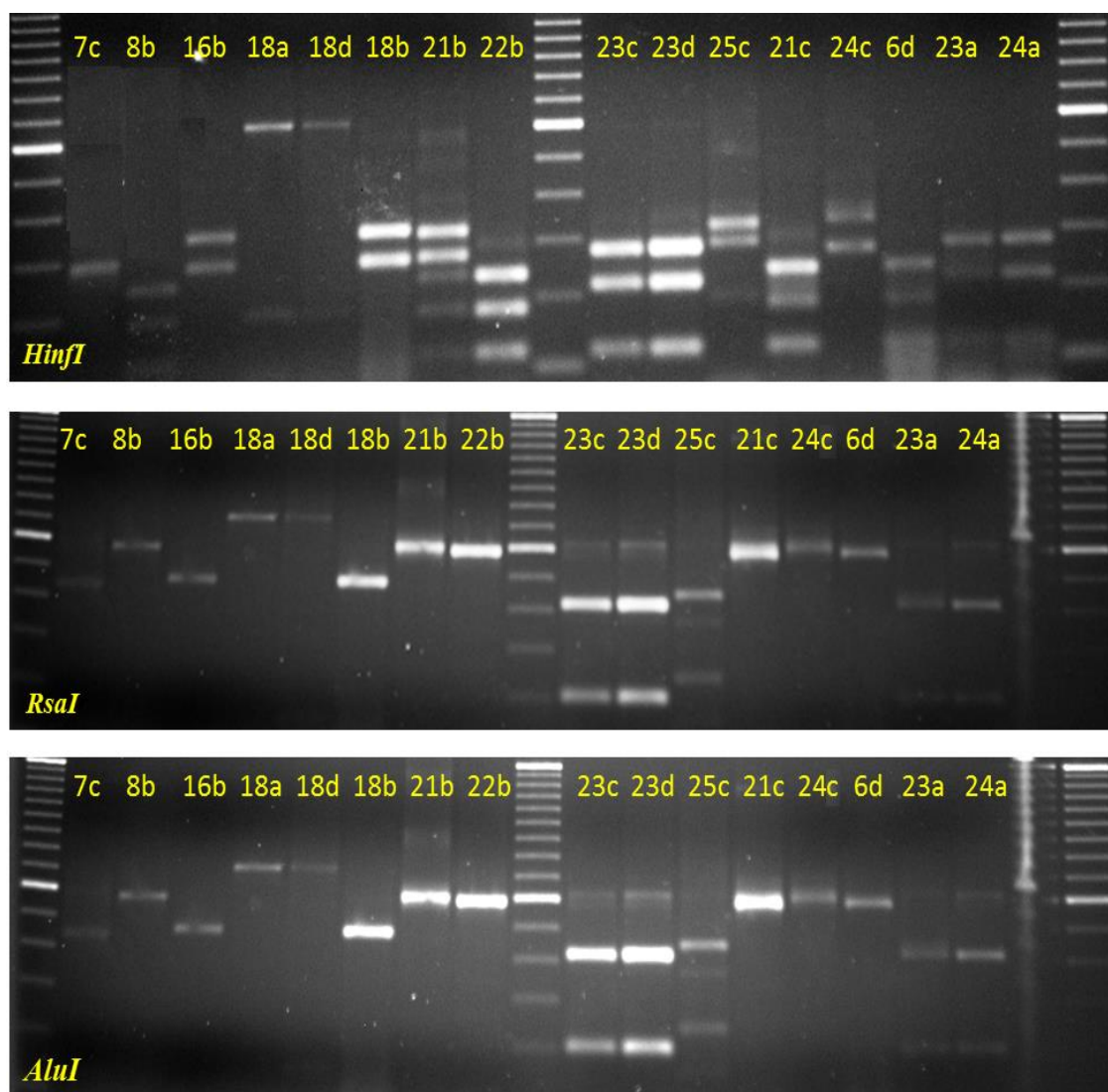


Photo 8 Profils RFLP des morphotypes d'ectomycorhize des plants de *I. bijuga* selon les trois enzymes de restriction (*HinfI*, *RsaI* et *AluI*)

Tableau 15 : Regroupement des bandes de restriction de la région ITS en OTUs par les 3 enzymes (*HinfI*, *RsaI* et *AluI*)

	Taille des bandes ITS et RFLP (pb)				Traitement
	ITS	<i>HinfI</i>	<i>RsaI</i>	<i>AluI</i>	
OTU 1	600	300/300	595/5	440/160	F
OTU 2	600	275/200/125	595/5	575/25	F
OTU 3	600	325/275	375/225	440/160	P
OTU 4	800	625/175	400/350	725/75	P
OTU 5	600	330/270	595/5	575/25	F
OTU 6	600	240/180/120	595/5	575/25	F
OTU 7	600	280/220/120	500/100	415/185	G
OTU 8	700	320/300/80	595/5	450/250	P
OTU 9	600	240/180/120	595/5	595/5	F
OTU 10	600	325/275	600	600	G
OTU 11	600	240/180/120	595/5	575/25	F
OTU 12	600	280/220/120	500/100	415/185	G
OTU 13	600	240/180/120	575/25	575/25	F
OTU 14	600	325/275	595/5	600	F
OTU 15	600	425/175	595/5	600	F
OTU 16	600	225/175/100	595/5	600	F
OTU 17	800	375/75	725/75	500/200/100	F

(P) sol sous pseudo-steppe ; (G) sol sous *G. banksii* ; (F) sol forestier

III.5 Identité des BNL chez *D. trichocarpa* cultivé sur le sol sous *G. banksii*.

En utilisant deux amorces RD1 et FGPS6, nous avons pu amplifier les extraits d'ADN des isolats de BNL. Les bandes se sont trouvées entre la taille 1200 et 2000pb du marqueur du poids moléculaire (Photo 9). Les ADN des quatre isolats de BNL sur les 19 sélectionnés ont été séquencés indiquant ainsi leur appartenance au genre *Burkholderia* (tableau 16).

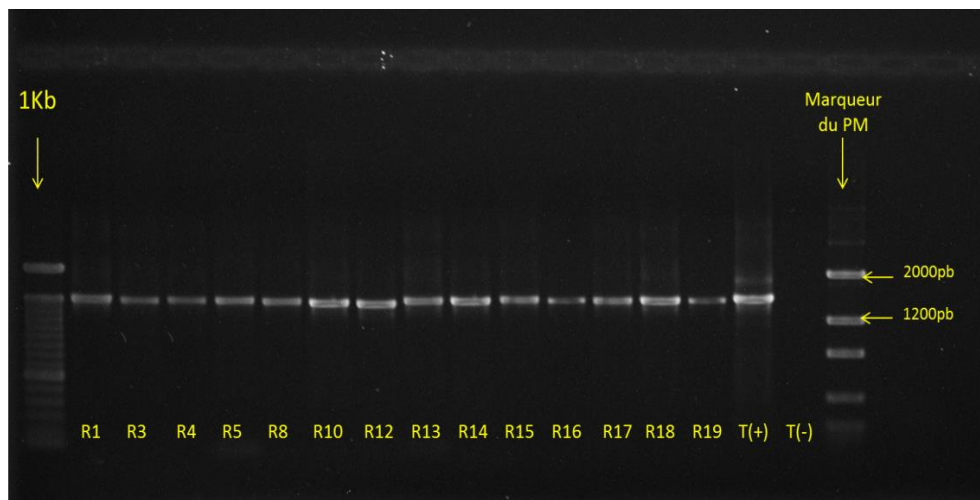


Photo 9 Profil PCR des BNL isolés sur *D. trichocarpa* cultivé sur le sol sous *G. banksii*

Sigles : (R) rhizobium; (T+) témoin positif; (T-) témoin négatif

Tableau 16 : Identité moléculaire de quatre BNL piégées avec *D. trichocarpa* dans le sol sous *G. banksii*

Code	Numéro d'accension	% Identités	Espèce
GR4	JF792427	766/826(93%)	<i>Burkholderia arboris</i>
GR5	AY677088	643/683(94%)	<i>Burkholderia cepacia</i>
GR6	JX868558	539/557(97%)	<i>Burkholderia arboris</i>
GR8	JX987284	252/281(90%)	<i>Burkholderia</i> sp.

III.6 Activités enzymatiques et nombre de microorganisme dans les sols de culture de *I. bijuga* et *D. trichocarpa*

De faible développement des microorganismes bénéfiques pour les plants (Bactéries solubilisatrices de phosphates, actinomycètes) a été enregistré dans le sol sous *G. banksii* (Gb) et dans le sol sous pseudo-steppe (Ps) où *D. trichocarpa* et *I. bijuga* ont été cultivés. Il en est de même pour les activités enzymatiques, les sols sous *G. banksii* et sous pseudo-steppe ont présenté des activités microbiennes globales et des activités phosphatasiques plus faibles que celles enregistrées dans le sol forestier (Fr) (Tableau 17).

Tableau 17 : Activités enzymatiques (A) et nombre (B) de microorganismes dans les trois types de sol après culture de *I. bijuga* et *D. trichocarpa*

A	µg de Fluorescéine. h ⁻¹ . g ⁻¹	µg de p-Nitrophenol. h ⁻¹ . g ⁻¹	
	Activité microbienne globale	Phosphatase acide	Phosphatase alcaline
<i>Ps</i>	928,30 a	136,42 a	6,11 a
<i>Gb</i>	1288,02 a	120,55 a	7,46 a
<i>Fr</i>	1529,69 b	163,01 b	39,05 b

B	UFC/g de sol		
	Flore totale cultivable	Solubilisatrice de phosphate	Actinomycètes
<i>Ps</i>	5833 a	1700 a	233 a
<i>Gb</i>	21567 b	2000 a	1500 a
<i>Fr</i>	25667 b	4733 b	1166 a

Les données dans la même colonne suivie par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (p<0,05)

Sigles : (*Gb*) sol sous *G. banksii*, (*Ps*) sol sous pseudo-steppe, (*Fr*) sol forestier

IV. DISCUSSION

L'objectif de ce chapitre était d'évaluer le développement de deux essences forestières (*I. bijuga* et *D. trichocarpa*) ainsi que leurs microorganismes associés sur le sol préalablement envahi par *G. banksii*.

IV.1 Evolution du développement de *I. bijuga* et *Intsia bijuga* sur le sol envahi par *G. banksii*

Les résultats sur l'inventaire floristique des trois formations végétales de la zone d'étude ont montré que la plante exotique envahissante, *G. banksii* et les espèces natives de Madagascar ne se développent pas sur les mêmes endroits (Chap. I). Face à cette situation et afin d'identifier les stratégies permettant d'améliorer la régénération des espèces de plantes natives, il est important de savoir le comportement de ces dernières vis-à-vis des sols envahis par l'espèce invasive, *G. banksii*.

Après cinq mois de culture sous serre, nos résultats ont montré que les deux essences forestières se développent mieux sur le sol forestier que sur le sol envahi par *G. banksii* et sur le sol sous pseudo steppe. Ces résultats corroborent ceux déjà démontrés par d'autres scientifiques dans le domaine. En travaillant sur d'autres espèces de plantes invasives (*Eupatorium adenophorum*, *Alliaria petiolata*), des auteurs ont déjà montré que le développement de plusieurs espèces de plantes natives est fortement inhibé sur le sol dominé par certaines espèces invasives (Yu *et al.*, 2005 ; Stinson *et al.*, 2006). D'autres études ont également expliqué que les effets des plantes invasives sur la communauté de plantes dans un écosystème envahi varient avec les habitats et dépendent surtout du statut de chaque individu de plante native présente (Gaertner *et al.*, 2009 ; Thiele *et al.*, 2010). Nos résultats s'ajoutent à ceux obtenus par Reinhart et Callaway, (2006) qui indiquent que la modification des communautés microbiennes du sol induite par la plante invasive permet à cette dernière de faciliter son invasivité et réduit considérablement la performance des plantes natives. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène d'inhibition du développement des plantes natives via l'installation des espèces invasives. L'une d'entre eux avance que le sol envahi contient des micro- ou macroorganismes pathogènes pour les plantes natives ou que ce sol envahi présente de faible communauté microbienne bénéfique et indispensable pour le développement ou la performance des plantes natives. Certaines investigations ont conclu que l'espèce invasive, dans son milieu de propagation, peut changer les communautés microbiennes du sol (Callaway *et al.*, 2004) ; en produisant par exemple des substances allélopathiques (Benjamin *et al.*, 2008).

Ceux qui perturbent énormément les associations mutuelles qui peuvent se former au niveau des racines des plantes natives inhibant ainsi leur développement (Richardson *et al.*, 2000; Callaway et Ridenour, 2004 ; Stinson *et al.*, 2006). Dans ce sens, Sarah *et al.*, (2003) ont suggéré que l'interaction compétitive entre plantes exotiques envahissantes et plantes natives dépend, dans plusieurs cas, des isolats de champignon mycorhizien présent dans le milieu.

IV.2 Fonctionnement de l'association symbiotique chez *I. bijuga* et *D. trichocarpa* cultivés sur le sol envahi par *G. banksii*

Sur le sol envahi par *G. banksii*, le taux de la mycorhization arbusculaire et de la nodulation sur les plants de *D. trichocarpa* ont été significativement faibles, comparés à ceux enregistrés sur le sol forestier. Des auteurs ont déjà signalé des réductions significatives du taux d'infection mycorhizienne chez les plantes qui se développent sur des sols perturbés (Reeves *et al.*, 1979 ; Miller, 1979) et/ou dégradés (Powell, 1980). Ces réductions du taux d'infection mycorhizienne ont été dûs soit par un potentiel infectieux mycorhizogène (PIM) faible du sol qui est à l'origine de la faible colonisation des racines (Smith et Read, 1997), soit par la faible présence des champignons capables de coloniser les systèmes racinaires des plantes natives, ou l'incompatibilité entre champignon mycorhizien du sol et la plante hôte (Hawkes *et al.*, 2006 ; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002). Dans plusieurs cas, la forte présence des plantes invasives affecte négativement la colonisation des plantes natives par les champignons mycorhiziens dans les milieux envahis (Mummey *et al.*, 2005). Sous ces conditions, ce sont les plantes fortement dépendantes des mycorhizes qui souffrent beaucoup (Siqueira *et al.*, 1998 ; Sharma et Adholeya, 2000; Reeves *et al.*, 1979 ; Miller, 1979). Dans notre cas, les sols sous la plante invasive *G. banksii* présentent des faibles PIM malgré la densité élevée en spores endomycorhiziens. Ceux qui suggèrent que la viabilité des spores de champignon endomycorhizien ainsi que leur capacité à coloniser les racines de *D. trichocarpa* ont été fortement inhibés par l'installation de la plante invasive. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Hawkes *et al.*, (2006) qui ont démontré une faible colonisation de champignon mycorhizien arbusculaire sur les racines de plante native dans la zone envahi par *Bromus tectorum* en Utah.

La faible nodulation des racines de *D. trichocarpa* enregistrée sur le sol pré-colonisé par *G. banksii* ne fait que confirmer ce qu'on a déjà présenté dans le chapitre II sur l'inhibition de la nodulation par l'extrait de *G. banksii* chez *D. trichocarpa* cultivé in vitro. Nous avons

déjà présenté dans le chapitre II du présent document que la majorité des isolats de BNL isolés dans le sol influencé par *G. banksii* sont incompatibles avec les plantules de *D. trichocarpa* même si leur développement n'a pas été inhibé par l'extrait de *G. banksii*. Cela suggère que l'installation de *G. banksii* avait un effet sélectif sur les rhizobia éliminant ainsi les isolats compatibles avec *D. trichocarpa*. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Sanon *et al* en 2009 montrant l'effet inhibiteur de l'extrait aqueux d'*Amaranthus viridis* vis à vis de la croissance de certains rhizobia *in vitro* entraînant ainsi une réduction de la nodulation des espèces d'*Acacia* sur des expérimentations sous serre avec le sol sous la plante invasive.

Chez *I. bijuga*, le taux de colonisation racinaire par les champignons ectomycorhiziens a enregistré sa plus faible valeur sur le sol sous *G. banksii* dans une expérimentation sous serre. Ce faible taux d'ectomycorhization pourrait être attribué soit aux effets négatifs des extraits des différents organes de la plante invasive sur le développement des champignons ectomycorhiziens soit à la faible performance des champignons ectomycorhiziens vis-à-vis de *I. bijuga* dans le sol envahi par *G. banksii*. Toutefois, ce faible taux de colonisation ectomycorhizienne pourrait engendrer des dysfonctionnements importants de la nutrition minérale et hydrique des plantes (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Gianinazzi-Pearson, 1982 ; Plenchette, 1982 ; Strullu, 1991). Ce qui pourrait expliquer le faible développement de *I. bijuga* sur le sol de la plante invasive. A l'échelle de l'écosystème forestier, des auteurs ont déjà montré que la diversité et l'abondance des champignons ectomycorhiziens contribuent au fonctionnement de ces écosystèmes (Aerts, 2002 ; Read *et al.*, 2004). Dans le chapitre précédent (chap II), les résultats ont montré que l'extrait aqueux de *G. banksii* n'a pas affecté le développement des quatre champignons ectomycorhiziens associés à *I. bijuga*, ce qui suggère que l'inhibition de l'association ectomycorhizienne chez cette plante native sur le sol de la plante invasive dépend d'autres facteurs que la toxicité des différents organes de *G. banksii*. Parmi ces conditions, l'implication des racines protéoïdes de la plante invasive dans le phénomène d'inhibition du fonctionnement de la symbiose ectomycorhizienne pourrait être une piste intéressante. Dans ce sens, l'identification des molécules constitutives des exsudats des racines protéoïdes ainsi que le test d'antagonisme de ces exsudats sur les microorganismes bénéfiques de plante native feront l'objet de la suite de ce travail.

En considérant la totalité des microorganismes dans le sol, nos résultats ont montré que l'installation de la plante invasive a fortement perturbé la structure (nombre de la flore totale et des groupes de microorganismes bénéfiques) et le fonctionnement (activité

microbienne globale) des microorganismes du sol. Avec d'autres plantes invasives, des auteurs ont déjà rapporté des modifications de la structure et du fonctionnement des communautés microbiennes du sol après installation des espèces de plante exotique (Wolfe et Klironomos, 2005 ; Van Der Putten *et al.*, 2007). Il a été déjà rapporté également que ces modifications affectent le fonctionnement des symbioses racinaires étant donné l'interaction positive entre les symbioses racinaires et certains microorganismes du sol (Garbaye, 1991 ; Garbaye, 1994).

V. CONCLUSION

En bref, ce chapitre nous a permis de décrire l'impact de l'installation de *G. banksii* sur le développement et la régénération des essences autochtones de Madagascar. Ainsi, nous avons enregistré un développement moins stimulé des deux essences natives (*I. bijuga* et *D. trichocarpa*) sur le sol de *G. banksii*. Cette situation a été due en partie par la perturbation du fonctionnement et de la structure de la microflore symbiotique ainsi que ceux de leurs microorganismes associés qui interviennent dans le développement de la majorité des plantes. La colonisation racinaire par les champignons endomycorhiziens ainsi que la nodulation des plantules de *D. trichocarpa* se trouvent fortement perturbées sur le sol envahi. Pour les bactéries nodulant les légumineuses, ces perturbations affectent à la fois le nombre de nodules formés et la diversité des bactéries. Ces perturbations ont affecté également le fonctionnement et la diversité des champignons ectomycorhiziens qui ont été moins actifs sur *I. bijuga* dans le sol de *G. banksii*. Les recherches de symbiotes microbiens capables de stimuler le développement des deux plantes natives sous les conditions du sol de *G. banksii* feront donc l'objet de l'étude du prochain chapitre.

CHAPITRE IV :

**MYCORHIZATION CONTROLEE DE *Intsia bijuga*
ET *Dalbergia trichocarpa* SUR LE SOL ENVAHI
PAR *G. banksii***

MYCORRHIZATION CONTROLEE DE *Intsia bijuga* ET DE *Dalbergia trichocarpa* SUR LE SOL ENVAHI PAR *G. banksii*

I. INTRODUCTION

La présente étude a démontré dans les chapitres précédents que l'installation de *G. banksii* a entraîné des changements profonds dans la structure de la couverture végétale native de la zone envahie. Parallèlement, l'invasion par cette espèce a provoqué également des perturbations des propriétés physico-chimiques et biologiques du sol, plus particulièrement, la structure et la diversité fonctionnelle des microorganismes symbiotiques et leurs microorganismes associés, composante fondamentale de la dynamique des principaux cycles biogéochimiques des éléments dans le sol. Le développement et la régénération de deux essences forestières natives de Madagascar, *Intsia bijuga* et *Dalbergia trichocarpa* ont été parmi les plus touchés par ces perturbations (Andrianandrasana *et al.*, 2014). Pour remédier à cette situation, l'apport artificiel de souches de symbiotes microbiens efficaces reste ainsi une des alternatives intéressantes permettant de reconstituer la couverture végétale dans les zones perturbées et de faciliter la régénération des essences forestières natives. Des auteurs ont déjà démontré que la capacité d'une espèce végétale à tolérer un stress d'origine biotique et/ou abiotique dépend du degré d'établissement et de fonctionnement des relations symbiotiques entre les symbiotes et la plante hôte (Odum, 1959 ; Barea *et al.*, 1997). Ainsi, l'établissement des structures symbiotiques est souvent à l'origine de la sécrétion d'exsudats racinaires qui stimulent le développement et l'activité des microorganismes du sol (Altomare *et al.*, 1999 ; Singh et Kapoor, 1999), particulièrement certains groupes bactériens impliqués dans le déroulement des principaux cycles biogéochimiques (N, P et C) (Frey-Klett *et al.*, 2005). D'un autre côté, le succès de nombreuses espèces de légumineuse face aux différents stress environnementaux dépend essentiellement de leur capacité à valoriser l'azote atmosphérique grâce à sa symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote (Galiana *et al.*, 1998). Dans ce sens, des interactions positives entre les symbioses fixatrices d'azote et les mycorrhizes ont été également rapportées (Cornet *et al.*, 1982). Ainsi, ces effets cumulés et bénéfiques des deux structures mycorrhiziennes ont été démontrés sur *Acacia* sp. (Roskoski *et al.*, 1986 ; Lal et Khanna 1993 ; De La Cruz *et al.*, 1988) ; *Albizia falcataria* (Umali-Garcia *et al.*, 1988 ; De La Cruz *et al.*, 1988 ; Wolde-Meskel et Sinclair, 1998) ; *Leucaena leucocephala* (Roskoski *et al.*, 1986 ; Koffa et De La Cruz, 1995) et *Centrolobium tomentosum* (Marques *et al.*, 2001). Ces effets ont concerné à la fois la

nutrition azotée et phosphatée, la nodulation, la mycorhization et le développement de la plante hôte (Della-Cruz *et al.*, 1988 ; Manjunath *et al.*, 1984 ; Marques *et al.*, 1997 ; Herrera *et al.*, 1993). De plus, certains auteurs ont déjà démontré que l'interaction entre ces deux types de symbiose joue des rôles importants dans le maintien du bon fonctionnement des écosystèmes (Duponnois *et al.*, 2001 ; Founoune *et al.*, 2002 ; André *et al.*, 2003).

Dans le présent chapitre, l'objectif principal était d'atténuer les effets négatifs de *G. banksii* sur le développement de *I. bijuga* et *D. trichocarpa* en valorisant des souches microbiennes symbiotiques (fongiques et bactériennes) performantes sélectionnées. Il s'agit ainsi de tester la performance des isolats microbiens provenant de la zone d'étude dans des expérimentations de co-inoculation des deux essences forestières natives en conditions contrôlées utilisant des sols envahis par *G. banksii*. Des souches (bactéries et champignons mycorhiziens) fournies par le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement-CNRE dont la capacité à stimuler le développement de *D. trichocarpa* et/ou *I. bijuga* a été déjà démontré, ont été utilisées comme références.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Les partenaires symbiotiques

Il a été déjà démontré que *D. trichocarpa* peut s'associer à la fois avec des champignons endomycorhiziens et des bactéries fixatrices d'azote (Rasolomampianina, 2005). Cet auteur a identifié plusieurs souches de rhizobia qui se sont montrées performantes sur le développement de *D. trichocarpa* dont la plus intéressante a été codée **STM 609**. D'autre étude a illustré également l'effet combiné de la souche STM 609 et une souche endomycorhizienne, *Glomus intraradices* sur l'amélioration du développement de *D. trichocarpa* (Rajaonarimamy, 2010). Ces deux souches symbiotiques ont été utilisées comme référence, dans le cadre de cette étude, pour évaluer la performance de deux autres souches (une bactérie fixatrice d'azote et une souche endomycorhizienne) natives de la zone d'étude. Au total 4 souches ont été utilisées pour l'inoculation de *D. trichocarpa* dont STM 609, *Rhizobium* native (Rn), *Glomus intraradices* (GI) et MVA native (MVAn).

Pour la plante ectotrophe, *I. bijuga*, une étude antérieure sur le test de compatibilité avec différentes souches de *Pisolithus* et de *Scleroderme* a conclu que le développement de cette plante a été significativement amélioré avec une souche de *Pisolithus* codée PisO2 (Rakotoarimanga, 2010). Cette souche a été ainsi utilisée comme référence, dans le cadre de cette étude, pour évaluer la performance d'une autre souche de *Pisolithus* codée Pis E, isolée à partir de carpophore récolté dans la zone d'étude quant à la stimulation du développement de *I. bijuga* sur le sol envahi par la plante invasive.

II.2 Préparation des inocula

II.2.1 Inoculum fongique

II.2.1.1 Préparation d'inoculum endomycorhizien

La production d'inoculum de champignons endomycorhiziens a été réalisée sous la serre du LME/CNRE sur des racines d'une plante hautement mycotrophique. Les deux souches de MVA (GI et MVAn) ont été cultivées sur des racines de sorgho (*Sorghum* sp.), dans des pots contenant du sable stérilisé à 140°C pendant 40min. Après la vérification de l'infection des racines par ces souches (observation des mycorhizes arbusculaires dans les racines après trois semaines de culture), l'inoculum a été préparé en découpant les racines de la plante en petits fragments d'environ 1 cm. Ces derniers ont été mélangés avec le sol rhizosphérique de sorgho contenant encore des spores du champignon arbusculaire. L'inoculum fongique est donc formé par un mélange de fragments des jeunes racines mycorhizées et de spores de champignon arbusculaire de la même espèce.

II.2.1.2 Préparation d'inoculum ectomycorhizien

Les souches de champignon ectomycorhizien utilisées dans cette expérience ont été entretenues régulièrement en culture dans des boîtes de Pétri contenant le milieu nutritif MNM gélosé (Marx, 1969). Des erlenmeyers de capacité 500ml ont été remplis de milieu de culture MNM liquide, bouchés avec du coton cardé puis autoclavés à 140°C pendant 20 min. Sous la hotte à flux laminaire et à une température de 25°C, le milieu MNM utilisé comme substrat a étéensemencé par des implants fongiques prélevés sur des cultures préalablement préparées sur milieu solide. Les cultures ont été par la suite incubées à l'obscurité sous une température de 30°C jusqu'à ce que les mycélia fongiques colonisent la totalité de la surface horizontale du substrat à l'intérieur des erlenmeyers.

II.2.2 Inoculum bactérien

Pour chaque souche, une pré-culture a été préparée à partir d'une colonie pure en utilisant le milieu de culture YM (Vincent, 1970). Pour ce faire, les souches ont été repiquées dans des tubes stériles de 50ml contenant préalablement 25ml du milieu YM. Les tubes ont été incubés sous agitation et à l'obscurité à une température de 28°C jusqu'à la phase exponentielle de croissance de chaque souche soit entre 3 et 7 jours d'incubation.

La pré-culture obtenue pour chaque souche a été utilisée pour ensemencer 200ml du milieu YM, préparés préalablement dans un erlenmeyer de 500ml, à raison de 10% (V/V).

II.3 Inoculation en serre des plants de *I. bijuga* et *D. trichocarpa*

II.3.1 Inoculation de *D. trichocarpa*

Deux types de sol ont été utilisés dans cette étude : sol sous la population homogène de *G. banksii* et sol sous pseudo-steppe. Ils ont été prélevés dans les différentes parcelles du site d'étude dans la partie Est de Madagascar (Ianjomara-Vatomandry). Le sol sous pseudo-steppe a été pré-colonisé par *G. banksii* pendant 12 mois sous serre. Ainsi, les propriétés des deux types de sol ont été toutes influencées par *G. banksii* mais c'est la durée de l'installation qui est différente soit 1an (Sol envahi 1an, codé **SE1**) et plus de 5ans (sol envahi plus de 5ans, codé **SE5**).

Des graines pré-germées de *D. trichocarpa* (Technique de germination, chapitre III paragraphe II.4.4) ont été repiquées dans des gaines en plastique de pépinière contenant environ 500g de mélange du sol de culture et de sable stérilisé à 140°C pendant 40 min. Neuf traitements chacun avec 25 répétitions ont été établis avec des simples et/ou des combinaisons d'inoculation utilisant les souches de champignon et de rhizobium. Ces traitements sont les suivants:

- *Glomus intraradices* seul ou simple inoculation
- STM 609 seul ou simple inoculation
- Rn seul ou simple inoculation
- MVAn seul ou simple inoculation
- *Glomus intraradices* + STM 609 ou double inoculation
- *Glomus intraradices* + Rn ou double inoculation
- MVAn + STM 609 ou double inoculation
- MVAn + Rn ou double inoculation
- Témoin sans inoculation

L'inoculum fongique (environ 5g) a été versé dans un trou au centre de chaque pot où les plantules seront repiquées. Après 3 à 4 jours de repiquage des graines prégermées de *D. trichocarpa*, 5ml d'inoculum de *Rhizobium* ont été injectés au niveau du trou de plantation selon le traitement ci-dessus.

II.3.2 Inoculation de *I. bijuga*

Seul le sol prélevé sous la population homogène de *G. banksii* a été utilisé pour l'inoculation de *I. bijuga*. Le sol a été partagé dans des pots plastiques de 1L. Vingt et cinq répétitions pour chacune des deux souches de champignon ectomycorhizien ont été préparées. Le témoin ne reçoit aucune souche de champignon. Une graine pré-germée de *I. bijuga* a été repiquée dans chaque pot. L'inoculation des plantules avec 10ml d'inoculum a été effectuée une semaine après repiquage des graines. Le traitement témoin reçoit 10 ml du milieu MNM liquide sans inoculum fongique par pot.

II.4 Evaluation des effets de l'inoculation

II.4.1 Biomasses des plantules des plantes natives

Pour tous les traitements, que ce soit avec *I. bijuga* ou avec *D. trichocarpa*, 5 plantules prises au hasard ont été dépotées. Les parties aériennes et racinaires de chaque plantule ont été séparées et enveloppées dans du papier aluminium. Ces biomasses ont été ensuite séchées dans une étuve réglée à 100°C pendant 24h. Le poids sec des biomasses aériennes et racinaires ont été mesurés à l'aide d'une balance de précision. Des mesures du taux de phosphore et de l'azote ont été également effectuées sur la partie aérienne de la plante.

II.4.2 Dénombrement des nodules et taux d'endomycorhization chez *D. trichocarpa*

Après 5 mois de culture de *D. trichocarpa*, cinq plantules par traitement ont été dépotées. Les sols issus de chaque traitement ont été récupérés et conservés à + 4°C pour d'autres analyses microbiologiques ultérieure. Le système racinaire de chaque plantule a été soigneusement lavé à l'eau courante. Les nodules formés sur les racines ont été nettoyés, comptés et conservés dans des tubes contenant de silicagel pour l'isolement ultérieur des souches de BNL. Les racines ont été ensuite utilisées pour déterminer le taux de colonisation par les champignons mycorhiziens arbusculaires. La technique consiste à éclaircir et à colorer les morceaux de racines par la méthode de Phillips et Hayman, (1970). Chaque système racinaire a été ensuite découpé en morceaux d'environ 1 cm. Les morceaux de racine ont été ensuite déposés entre lame et lamelle, et observés au microscope au grossissement X40. Environ 100 fragments ont été observés pour chaque système racinaire. Le taux de mycorhization a été calculé selon la formule suivante :

$$TM = \frac{\text{Nombre de fragments de racine colonisée}}{\text{Nombre total de fragments de racine observée}} \times 100$$

II.4.3 Morphotypage et taux d'ectomycorhization chez *I. bijuga*

Des racines de *I. bijuga* inoculées ou non avec des souches de Pisolithes ont été prélevées après 5 mois de culture sous serre ; à raison de 5 systèmes racinaires issues de 5 plants différents par traitement. Les racines courtes mycorhizées sont classifiées selon leurs caractères morphologiques proposés par Agerer, (1991) observés sous la loupe binoculaire. Le taux de mycorhization des racines a été déterminé en comptant des bouts mycorhizés et ceux non mycorhizés sur un champ contenant 100 fragments de racine. La fréquence de chaque groupe de morphotype d'ectomycorhize a été également évaluée pour chaque plante. Le taux de mycorhization a été calculé de la façon suivante:

$$\text{Taux de Mycorhization} = \frac{\text{Nombres des racines ectomycorhizées}}{\text{Nombre total des racines observées}} \times 100$$

II.4.4 Mesure des activités des enzymes du sol après inoculation

La capacité des microorganismes à hydrolyser la fluorescéine diacetate (FDA) par leurs enzymes permet d'évaluer l'activité globale de ces microorganismes du sol. La quantité de fluorescéine, le produit d'hydrolyse, a été mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde 490nm après une heure d'incubation du sol mélangé avec les différents réactifs à 30°C (Technique, chapitre I paragraphe II.4.2.2.1).

L'activité de phosphatases d'origine microbienne du sol a été mesurée par leur capacité à hydrolyser le substrat pNPP. La quantité du produit d'hydrolyse, p-Nitrophenol, a été évaluée au spectrophotomètre sous la longueur d'onde 400nm, après l'incubation du sol mélangé avec les différents réactifs à 37°C (Technique, chapitre I paragraphe II.4.2.2.2).

II.4.5 Identification moléculaire des symbiotes fongiques et bactériens chez les traitements inoculés

Trois matériels biologiques dont les nodules de *D. trichocarpa*, les morphotypes d'ectomycorhize chez *I. bijuga* et les échantillons du sol (SE5) issus de culture des deux types de plante avec les différents traitements ont fait l'objet d'une étude utilisant les techniques de biologie moléculaire. L'objectif étant d'identifier les microorganismes impliqués dans ces structures symbiotiques.

L'isolement des BNL a été effectué sur des nodules observés sur les systèmes racinaires de *D. trichocarpa* en utilisant la technique décrite dans le chap. III (paragraphe II.4.4.2).

La technique décrite par Sritharan et Barker, (1991) a été utilisée pour l'extraction d'ADN des souches de BNL (Annexe 6). Elle consiste à cultiver les bactéries dans un milieu de culture YMA puis à mettre en suspension une colonie de bactéries dans 100µl de la solution TTE (Tris 20mmol/l à pH8; Triton X-100 1% et EDTA 2mmol/l). La suspension est par la suite déposée dans un thermocycler à 95°C pendant 10min puis refroidie à + 4°C. Le produit obtenu constitue l'échantillon d'ADN de bactéries étudiées. Différents couples d'amorce ont été utilisés pour l'amplification de ces échantillons d'ADN entre autre le RD1/FD1 et FGPS6/RD1. La composition réactionnelle et le cycle des températures sont présentés dans les tableaux 19 ci-après. Les amplifiats qui ont des belles bandes ont été séquencés directement pour identifier les espèces qui leur correspondent.

L'identification des champignons formants les ectomycorhizes ainsi que la description de la diversité des bactéries dans les échantillons de sol ont été effectuées en utilisant la technique décrite respectivement dans le chapitre III (paragraphe II.4.3.2) et dans le chapitre I (paragraphe II.4.4).

Chapitre IV : Mycorhization contrôlée de *I. bijuga* et *D. trichocarpa* sur le sol envahi par *Grevillea banksii*

Tableau 18 : Composition réactionnelle pour l'amplification d'ADN de BNL

Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Quantité pour une réaction (µl)
10X Buffer	10X	1X	2
BSA	100X	0,4	0,08
MgCl₂	25mM	1,5	1,2
dNTPs	10mM	0,2	0,4
A1	25µM	0,2	0,16
A2	25µM	0,2	0,16
Taq sigma	5unités/µl	1unité/réaction	0,2
ADN	-	-	1
H₂O Gibco	-	-	14,8

(A1) amorce 1 ; (A2): amorce 2 (pour un couple d'amorce fD1/rD1 par exemple);
Le volume final d'une réaction est de 20µl

Les composants préparés sont introduits au plus vite dans le thermocycler pour la réaction d'amplification. Cette dernière est effectuée selon le programme suivant :

Tableau 19 : Cycle de température pour l'amplification d'ADN de BNL

	Température (°C)	Durée	
Dénaturation initiale	95	4min	
Dénaturation	94	50s	} 30 cycles
Hybridation	57	50s	
Elongation	72	1min	
Elongation finale	72	10min	

III. RESULTATS

III.1 Impacts de l'inoculation de *D. trichocarpa* sur les sols envahis par *G. banksii*

Les impacts d'une simple ou d'une double inoculation de *D. trichocarpa* avec les différentes souches de BNL et de champignon arbusculaire ont été évalués sur deux types de sol dont le sol envahi par *G. banksii* pendant 1an sous serre (SE1) et un autre type de sol envahi par *G. banksii* pendant plus de 5ans sur le terrain (SE5).

III.1.1 Impacts de l'inoculation sur le développement de *D. trichocarpa*

Les figures 19A et 19B illustrent les résultats des mesures effectuées sur les biomasses aériennes et racinaires de *D. trichocarpa* cultivé sur les deux types de sol et inoculé avec des souches de BNL et/ou de champignons arbusculaires par simple ou double inoculation.

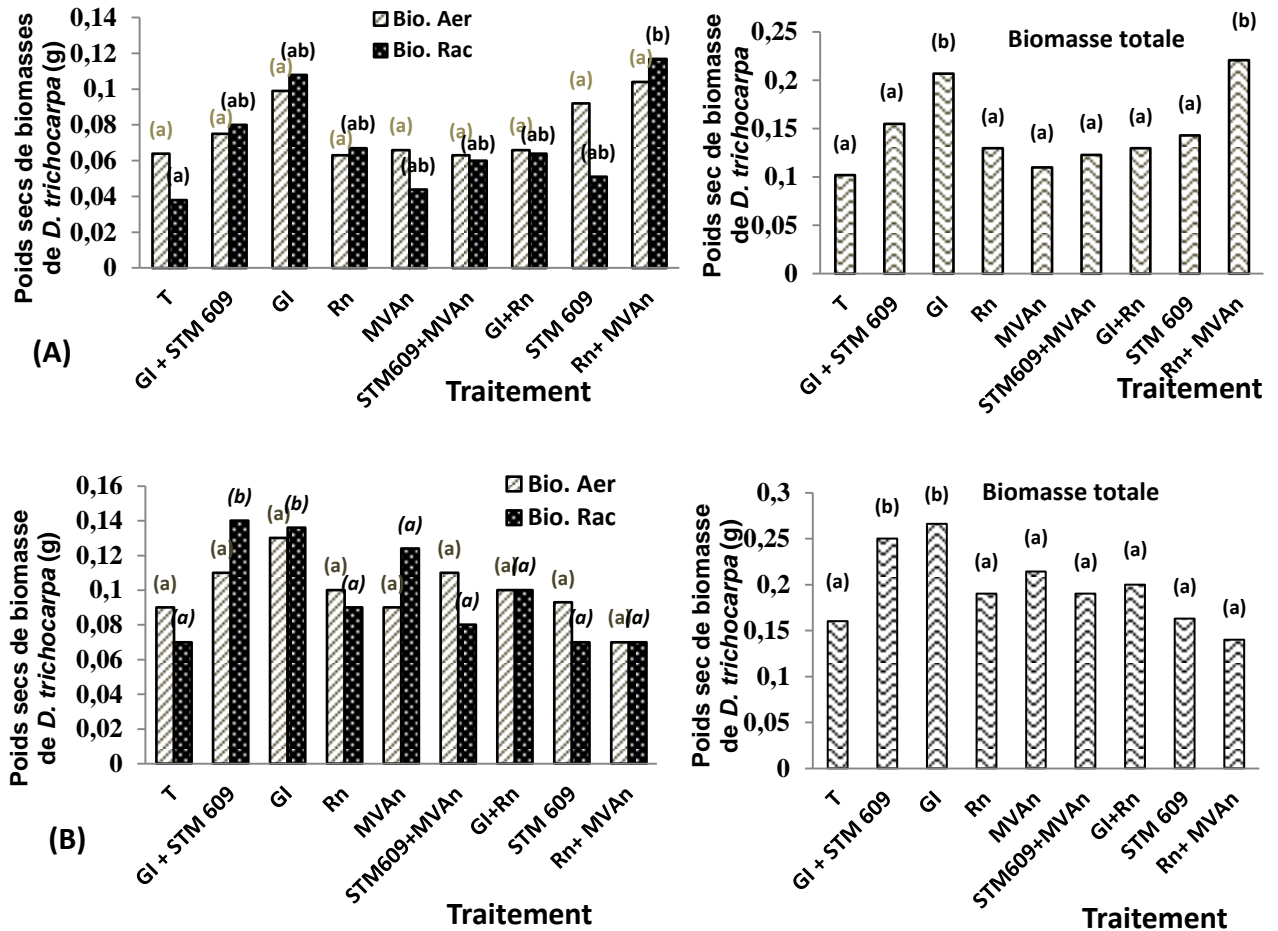


Figure 19. Impacts de l'inoculation sur le développement de *D. trichocarpa* sur le sol SE1 (B) et le sol SE5 (A)

Les lettres (a) et (b) indiquent la différence significative entre les traitements selon le test de Newman-Keuls ($p < 0.05$)

Signes : (STM) inoculé avec la souche STM609; (Rn) inoculé avec la souche de rhizobium native; (GI) inoculé avec la souche de *Glomus intraradices*; (MVAn) inoculé avec la souche de champignon arbusculaire native; (T) Témoin non inoculé

Le poids sec de la biomasse totale des plantules de *D. trichocarpa* cultivées sur le sol SE5 et ayant subi le traitement simple inoculation de *G. intraradices* (GI) ou le traitement double inoculation de deux souches natives (Rn + MVAn) a été significativement élevé par rapport à ceux observés sur les autres traitements (Figure 18A). Sur le sol SE1, les valeurs les plus élevées de la biomasse totale de *D. trichocarpa* ont été enregistrées sur le traitement de simple inoculation de GI et le traitement de double inoculation de GI+STM609 (Figure 18B). Aucune différence significative n'a été enregistrée entre les

autres traitements inoculés et le traitement non inoculé. Pour les deux types de sol, la souche de *G. intraradices* a généralement stimulé le développement des plants de *D. trichocarpa*. Par contre, les souches symbiotiques natives (Rn et MVAn) se sont montrées plus efficaces quant à la stimulation du développement de cette essence forestière sur le sol envahi pendant plus de 5ans par rapport aux souches de référence (GI et STM609) qui ont été plus actives sur le sol envahi 1an.

III.1.2 Impacts de l'inoculation sur le taux de mycorhization et le nombre de nodules chez *D. trichocarpa* sur les sols envahis par *G. banksii*

Le taux de mycorhization par plantule de *D. trichocarpa* sur les traitements inoculés, à l'exception du traitement avec STM609, a été significativement élevé par rapport à ceux observés sur le traitement non inoculé sur le sol SE5. Le traitement avec MVAn a présenté le taux de mycorhization le plus élevé (98,17%) suivi de traitement GI+Rn (89,67%) (Figure 20A). Sur le sol SE1, les traitements GI et Rn+MVAn présentent des taux de mycorhization significativement élevés respectivement de 68,52% et 70% par rapport aux autres traitements (Figure 20B). Sur les traitements utilisant les champignons endomycorhiziens, la colonisation des racines par ces champignons a été plus stimulée sur le sol envahi pendant plus de 5ans que sur celui de 1an.

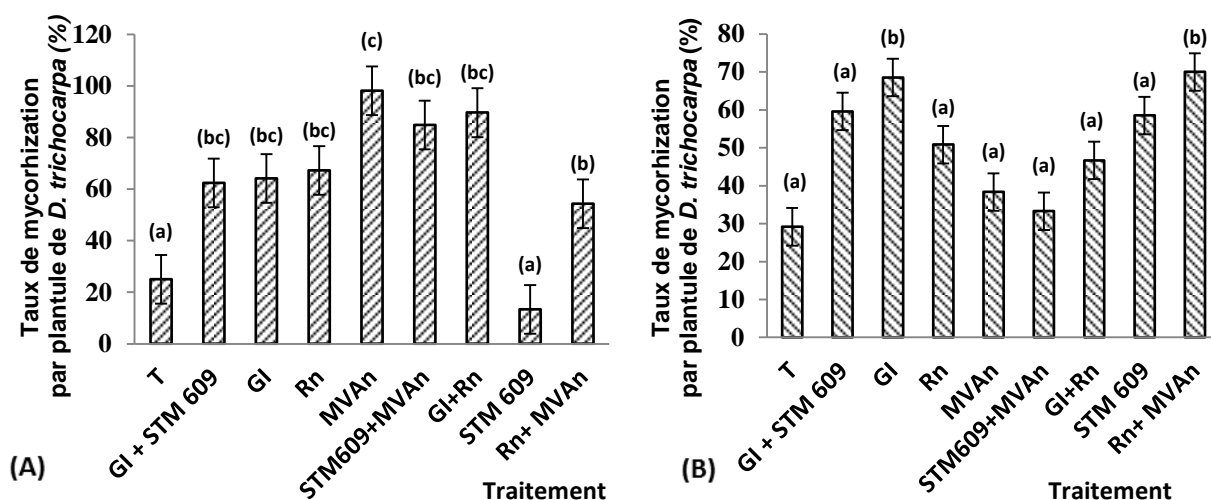


Figure 20. Impacts de l'inoculation sur le taux de mycorhization de *D. trichocarpa* sur le sol SE5 (A) et le sol SE1(B)

Les lettres (a) et (b) indiquent la différence significative entre les traitements selon le test de Newman-Keuls ($p < 0.05$)

Des différences significatives ont été constatées au niveau du nombre de nodules par plantule de *D. trichocarpa* entre tous les traitements inoculés et ce pour les deux types de sol. Les nombres de nodules les plus élevés ont été enregistrés au niveau des traitements

avec STM609 suivi par celui du traitement GI+Rn. Entre les deux types de sol, la nodulation a été plus stimulée sur le sol SE1 que sur le sol SE5 (Figures 21A et 21B).

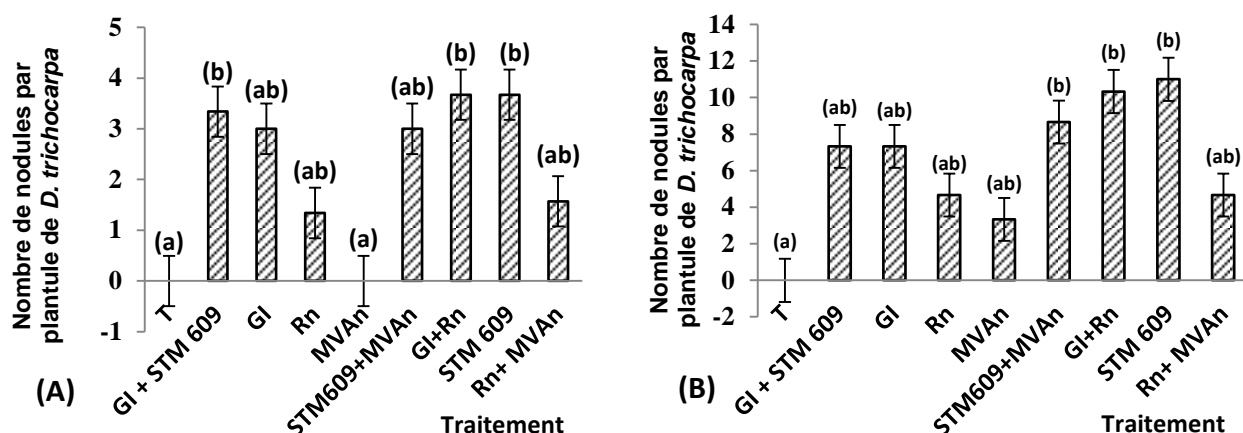


Figure 21. Impacts de l'inoculation sur le nombre de nodules de *D. trichocarpa* sur le sol SE5 (A) et le sol SE1 (B)

Les lettres (a) et (b) indiquent la différence significative entre les traitements selon le test de Newman-Keuls ($p < 0.05$)

Sigles: (STM) inoculé avec la souche STM609; (Rn) inoculé avec la souche de rhizobium native; (GI) inoculé avec la souche de *Glomus intraradices*; (MVAn) inoculé avec la souche de champignon arbusculaire native; (T) Témoin non inoculé.

III.1.3 Impacts de l'inoculation de *D. trichocarpa* sur les activités des enzymes du sol

La quantité de p-Nitrophenol produite par les microorganismes du sol lors de l'hydrolyse de pNPP a été significativement élevée avec le sol du traitement GI+STM609 par rapport à celles enregistrées sur les autres traitements avec le sol SE5. Cette quantité a été de 31,90µg/h par g de sol. Sur le sol SE1, l'activité des enzymes phosphatasiques a été significativement plus stimulée sur le traitement GI+Rn et le traitement GI (avec des quantités du produit d'hydrolyse respectivement de 154,36µg/h/g et de 121,66µg/h/g de sol) que sur les autres traitements. Par contre, aucune différence significative n'a été enregistrée pour l'activité des enzymes phosphatasiques entre les autres traitements inoculés (autre que GI+Rn et GI) et le traitement témoin (Figure 22).

Quant aux activités microbiennes globales du sol, l'inoculation avec la souche de référence STM609 a été toujours à l'origine des activités plus stimulées. La quantité de fluorescéine produite durant l'hydrolyse de la FDA diminue du traitement STM609 + MVAn (1069,28µg/h/g de sol) vers le traitement STM 609 (970,15µg/h/g de sol) pour le sol SE5. Pour le sol SE1, les activités microbiennes globales les plus intenses ont été enregistrées avec le traitement STM609 (622,09µg/h/g de sol de fluorescéine) et avec le traitement GI-Rn (419,43µg/h/g de sol de fluorescéine) (Figure 23).

Que ce soit pour l'activité phosphatasique en milieu acide ou pour l'activité microbienne globale du sol, les intensités enregistrées sur les sols SE5 ont été plus élevées que celles

observées sur le sol SE1. Également, les souches symbiotiques (*Glomus* GI et STM609) de référence se sont montrées plus efficaces quant à la stimulation de l'activité microbienne globale du sol que les souches natives.

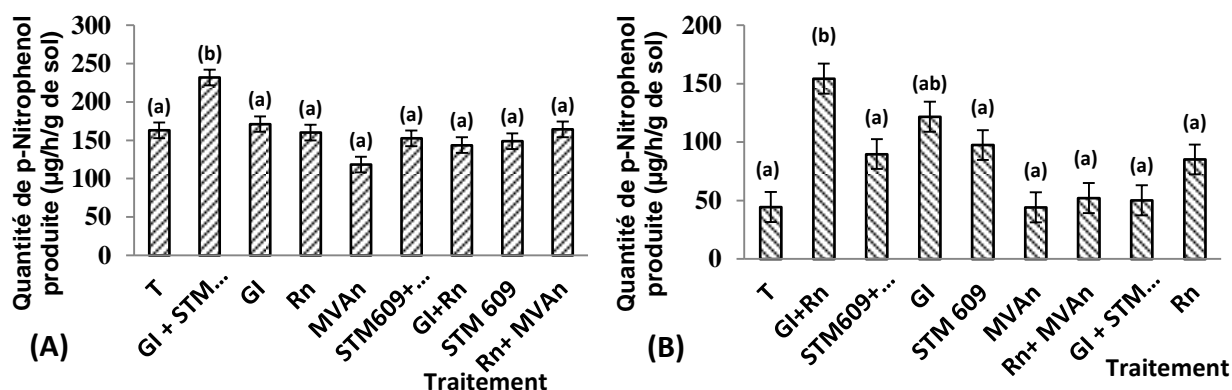


Figure 22. Impacts de l'inoculation de *D. trichocarpa* sur l'activité de phosphatase acide sur le sol SE5 (A) et le sol SE1(B)

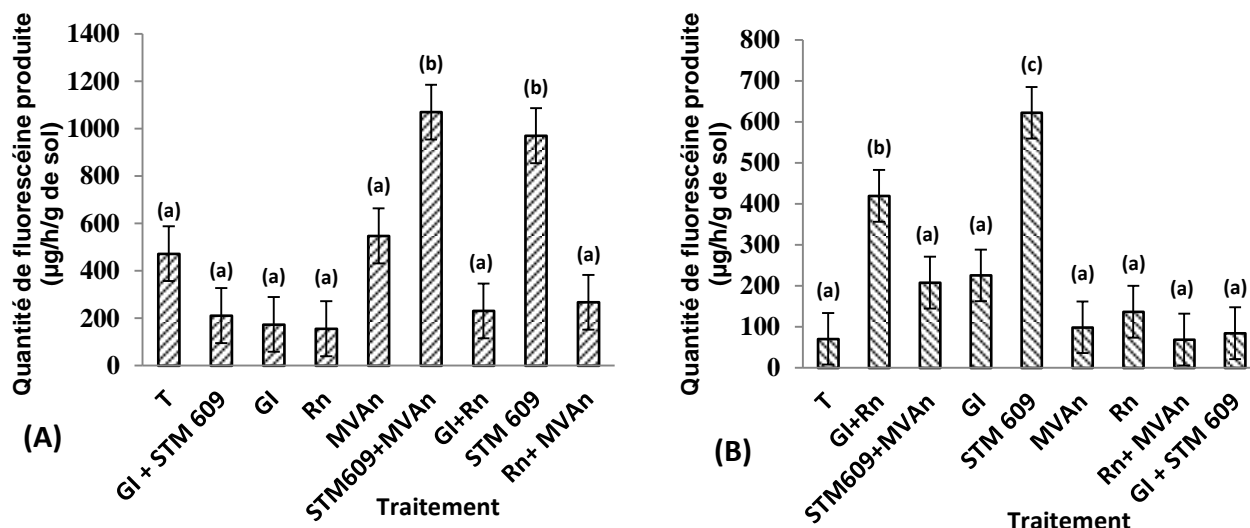


Figure 23. Impacts de l'inoculation de *D. trichocarpa* sur l'activité microbienne globale sur le sol SE5 (A) et le sol SE1(B)

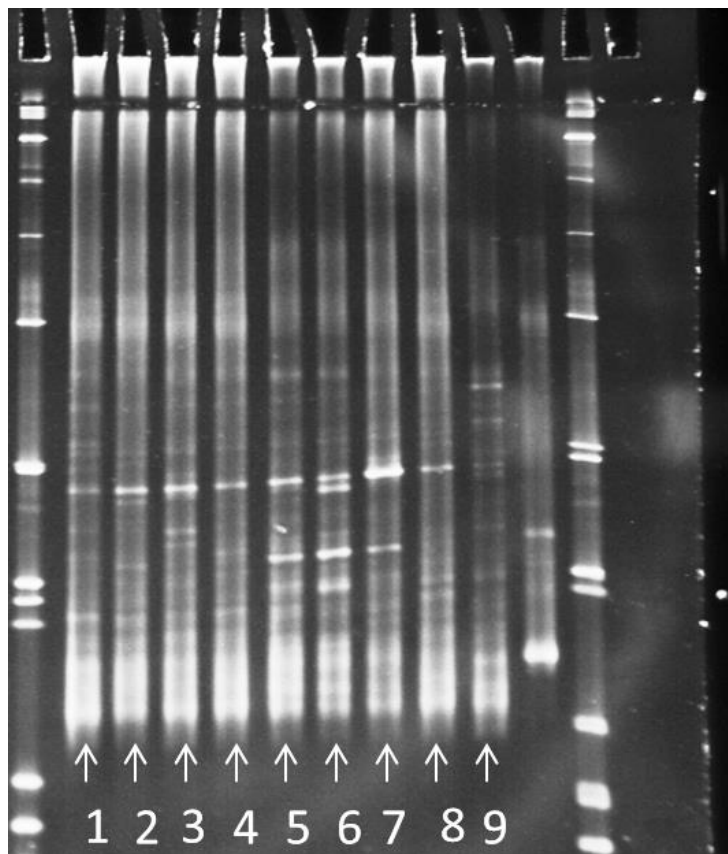
Les lettres (a) et (b) indiquent la différence significative entre les traitements selon le test de Newman-Keuls ($p < 0.05$)

Sigles: (STM) inoculé avec la souche STM609; (Rn) inoculé avec la souche de rhizobium native; (GI) inoculé avec la souche de *Glomus intraradices*; (MVAn) inoculé avec la souche de champignon arbusculaire native; (T) Témoin non inoculé.

III.1.4 Diversité génétique par la technique de DGGE des bactéries du sol de *D. trichocarpa* inoculé, cas du sol SE5.

Pour les 9 traitements du sol SE5 dont 8 traitements inoculés et un traitement non inoculé, les profils DGGE du sol sont présentés par la photo ci-après (Photo 11). Les différentes bandes dans chaque profil indiquent les communautés bactériennes dans chaque traitement de sol. En effet, le profil présentant un nombre de bandes plus élevé indique une diversité

bactérienne plus importante. Ainsi, les profils 5, 6 et 7 correspondant respectivement aux traitements STM609, GI+Rn et Rn+MVAn présentent des surplus de bandes qu'on n'a pas trouvées dans les autres traitements (Photo 11). Ces bandes correspondraient aux groupes de microorganisme dont le développement a été stimulé par la présence de l'inoculum introduit.



1. T
2. GI
3. MVAn
4. Rn
5. STM609
6. GI + Rn
7. Rn + MVAn
8. GI + STM609
9. MVAn + STM609

Photo 10 Profil DGGE des sols après inoculation

Sigles : (STM) inoculé avec la souche STM609; (Rn) inoculé avec la souche de rhizobium native; (GI) inoculé avec la souche de *Glomus intraradices*; (MVAn) inoculé avec la souche de champignon arbusculaire native; (T) Témoin non inoculé

III.1.5 Identité de BNL sur les racines de *D. trichocarpa* après simple ou double inoculation, cas du sol SE5

L'identité des isolats de BNL issus des nodules collectés sur les racines de *D. trichocarpa* inoculé (simple ou double inoculation rhizobium-MVA) sur le sol SE5 est présentée dans le tableau 20. Cinq (05) genres de BNL ont été identifiés à partir de tous les isolats dont les genres *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Ralstonia*, *Enterobacter* et *Herbaspirillum*. Parmi les 8 traitements, l'inoculation avec STM609 a présenté la diversité la plus élevée en BNL avec les 5 genres identifiés. Les sols des autres traitements n'ont présenté au maximum que 2 genres par sol. Les résultats ont montré également que le genre *Burkholderia* a été présent dans tous les traitements.

Chapitre IV : Mycorhization contrôlée de *I. bijuga* et *D. trichocarpa* sur le sol envahi par *Grevillea banksii*

Tableau 20 : Diversité de BNL issue de nodules de *D. trichocarpa* après simple ou double inoculation sur le sol SE5

Traitement	% identité	Num. d'accession	Espèce
STM609	98%	JX010988.1	<i>Burkholderia cepacia</i>
	98%	KC954648.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	98%	AB299599.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	98%	KC833504.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	99%	KF150335.1	<i>Ralstonia pickettii</i>
	99%	AB552864.1	<i>Rhizobium</i> sp.
	97%	EU072715.1	<i>Ralstonia</i> sp.
	98%	FR872388.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	98%	JQ617901.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	94%	KF411347.1	<i>Enterobacter cloacae</i>
GI	99%	AB299599.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	97%	KF411347.1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	97%	KF411347.1	<i>Enterobacter cloacae</i>
MVAn	98%	JX010988.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	97%	KC462881.1	<i>Burkholderia</i> sp.
Rn	98%	FJ025138.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	99%	FN178365.1	<i>Rhizobium tropici</i>
	99%	JQ316419.1	<i>Burkholderia</i> sp.
STM + MVAn	95%	KF465946.1	<i>Rhizobium</i> sp.
	98%	KF031510.1	<i>Rhizobium tropici</i>
	93%	CP005950.1	<i>Rhizobium etli</i>
	92%	HQ538615	<i>Herbaspirillum</i> sp.
	99%	EU399918	<i>Herbaspirillum frisingense</i>
GI + STM	93%	KF411347.1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	95%	KF411347.1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	93%	KF411347.1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	93%	KF411347.1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	95%	KF411347.1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	96%	KF411347.1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	97%	NR_102849.1	<i>Burkholderia phenoliruptrix</i>
MVAn + Rn	99%	AB299594.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	98%	AY117623.1	<i>Rhizobium tropici</i>
	98%	AY117623.1	<i>Rhizobium tropici</i>
	98%	AB299594.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	98%	AB299594.1	<i>Burkholderia</i> sp.
	98%	FR872388.1	<i>Burkholderia</i> sp.
GI + Rn	98%	KC954648.1	<i>Burkholderia</i> sp.

(STM) inoculé avec la souche STM609; (Rn) inoculé avec la souche de rhizobium native; (GI) inoculé avec la souche de *Glomus intraradices*; (MVAn) inoculé avec la souche de champignon arbusculaire native.

III.1.6 Relation entre les différents paramètres de culture, le développement de *D. trichocarpa* et les propriétés microbiologiques du sol de culture

Les relations entre les différents paramètres liés au développement de *D. trichocarpa* et les propriétés microbiologiques et enzymatiques du sol SE1 sont présentées dans les figures 24A et 24B selon l'analyse en composante principale. Les deux axes F1 et F2 qui présentent respectivement 44,26% et 26,24% de l'inertie totale ont été considérés pour l'interprétation des résultats.

Suivant l'axe F1, la nodulation, le taux de mycorhization, les biomasses aérienne et racinaire de *D. trichocarpa* ont été positivement corrélées avec les traitements simple inoculation avec *G. intraradices*, STM609 et avec les traitements double inoculation *G. intraradices* + rhizobium native, le STM609 + MVA native. Par contre, l'activité des phosphatases en milieu acide et l'activité microbienne globale du sol ont été négativement influencées par les traitements cités ci-dessus.

Sur l'axe F2, tous les paramètres mesurés tels que les biomasses, la nodulation, le taux de mycorhization, l'activité phosphatasique et l'activité microbienne globale des microorganismes du sol ont été positivement corrélées avec les traitements *G. intraradices* seul, *G. intraradices* + STM609, rhizobium native et MVA native.

Ainsi sur le sol SE1, tous les traitements, sauf la co-inoculation avec Rn+MVAn ont participé à l'amélioration du développement de *D. trichocarpa*. Particulièrement, le traitement avec la souche *G. intraradices* en simple inoculation a amélioré significativement la nodulation, la mycorhization et le développement de *D. trichocarpa*. Tandis que la combinaison de *G. intraradices* avec la souche STM609 a stimulé les activités enzymatiques des microorganismes du sol dont l'activité microbienne globale et l'activité des phosphatases en milieu acide.

Pour le sol SE5, les axes F1 et F2 qui absorbent respectivement 39,13% et 22,78% (Figures 25A et 25B) de l'inertie totale ont été utilisés pour l'interprétation des résultats. Suivant l'axe F1, le taux de mycorhization, la biomasse racinaire et la phosphatase acide sont positivement corrélés avec les traitements simple inoculation MVA native, Rhizobium native, *G. intraradices* et double inoculation de *G. intraradices* + rhizobium native, *G. intraradices* + STM609, rhizobium native + MVA native.

Suivant l'axe F2, le développement des plantes (biomasses aérienne et racinaire), la nodulation et l'activité de phosphatase acide sont positivement liés avec les traitements simple inoculation *G. intraradices* et double inoculation *G. intraradices* + STM609 et rhizobium native + MVA native.

Ainsi, dans le sol SE5, la souche MVAn en simple inoculation a permis d'améliorer la mycorhization alors que la simple inoculation avec STM 609 a stimulé la nodulation de *D. trichocarpa*. La co-inoculation de Rn+MVAn a favorisé le développement de la plante et l'activité des phosphatases en milieu acide des microorganismes. Par contre, aucun traitement n'a stimulé l'activité globale des microorganismes dans ce sol.

Chapitre IV : Mycorhization contrôlée de *I. bijuga* et *D. trichocarpa* sur le sol envahi par *Grevillea banksii*

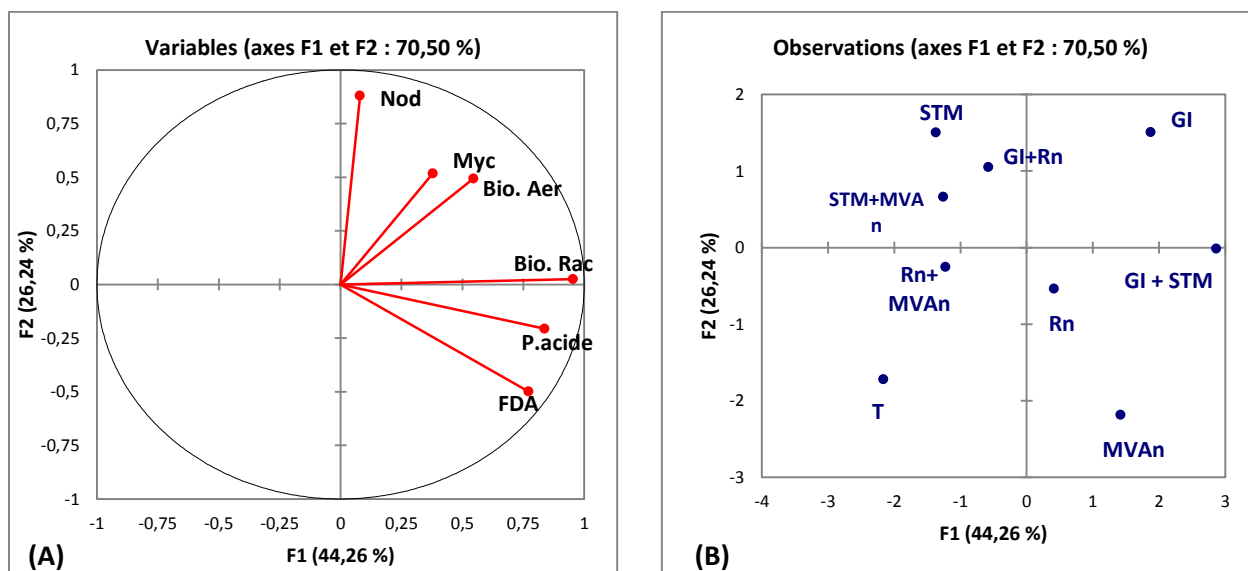


Figure 24. Relation entre les différents traitements inoculés et le développement de *D. trichocarpa* sur le sol SE1

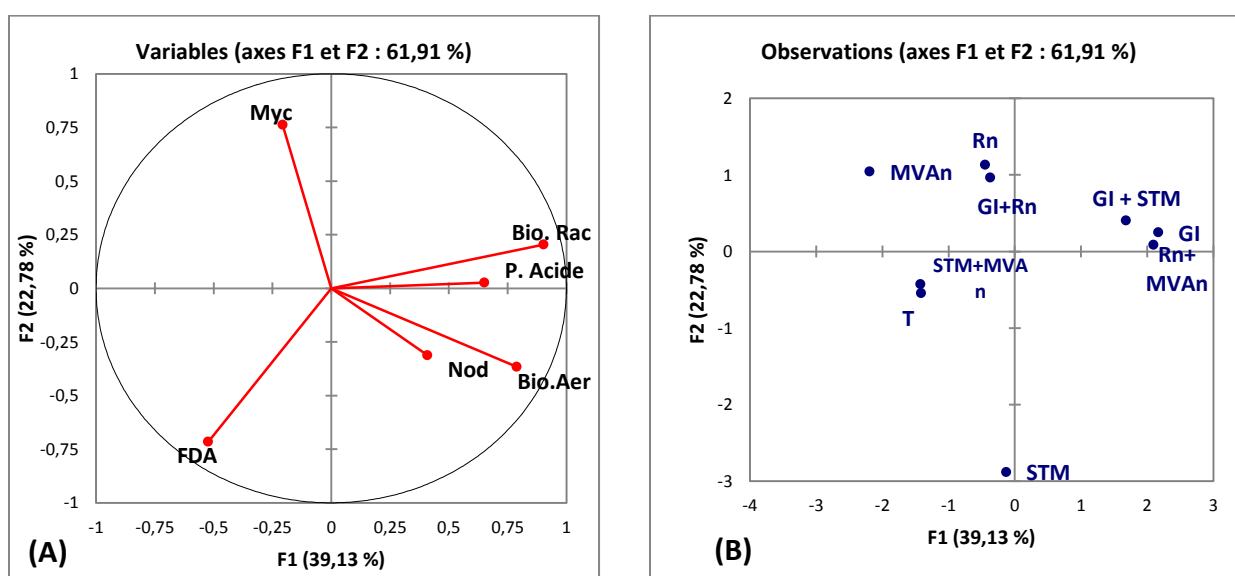


Figure 25. Relation entre les différents traitements inoculés et le développement de *D. trichocarpa* sur le sol SE5

Signes : (*Nod*) nombre de nodules ; (*Myc*) Taux de mycorhization ; (*Bio. Aer*) Biomasse aérienne ; (*Bio. Rac*) biomasse racinaire ; (*P. acide*) phosphatase acide ; (*FDA*) Fluorescéine diacetate ; (*STM*) inoculé avec la souche STM609 ; (*Rn*) inoculé avec la souche de rhizobium native ; (*GI*) inoculé avec la souche de *Glomus intraradices* ; (*MVAn*) inoculé avec la souche de champignon arbusculaire native ; (*T*) Témoin non inoculé

III.2 Impacts de l'inoculation de *I. bijuga* sur le sol pré-colonisé par *G. banksii*

L'impact de l'inoculation microbienne sur le développement de *I. bijuga* a été évalué sur le sol envahi par *G. banksii* pendant au moins cinq ans (SE5). Deux souches de champignon ectomycorhizien ont été utilisées (Pis02 et PisE) pour l'inoculation.

III.2.1 Impacts de l'inoculation sur le développement et sur le taux de mycorhization de *I. bijuga*

Le développement de *I. bijuga*, inoculé par des souches ectomycorhiziennes sur le sol pré-colonisé par *G. banksii* est présenté dans le tableau 21. Ces résultats ont montré que les poids secs des biomasses aériennes ont été significativement élevés avec les deux souches ectomycorhiziennes par rapport au traitement témoin. Tandis qu'aucune différence significative n'a été enregistrée sur les poids secs des biomasses racinaires de *I. bijuga*, sur la quantité de phosphore et celle de l'azote contenus dans les feuilles de *I. bijuga* entre les deux traitements inoculés et le traitement témoin.

Une différence significative a été également observée pour le taux de mycorhization de *I. bijuga* enregistré entre les deux traitements inoculés par les souches ectomycorhiziennes et le traitement témoin.

Tableau 21 : Impacts de l'inoculation sur le développement de *I. bijuga* et sur l'activité des microorganismes sur le sol envahi par *G. banksii*

	T	Pis02	PisE
Biomasse aérienne de <i>I. bijuga</i> (en g)	1,787a	2,769 b	2,849 b
Biomasse racinaire de <i>I. bijuga</i> (en g)	0,329 a	0,527 a	0,562 a
Biomasse totale de <i>I. bijuga</i> (en g)	2,116 a	3,296 b	3,411 b
Taux de mycorhization de <i>I. bijuga</i> (% de racines mycorhizées par plante)	31,446 a	74,535 b	78,558 b
Activité microbienne globale (µg de fluorescéine .h⁻¹.g⁻¹ de sol sec)	38,330a	46,040 a	136,359 b
Activité de phosphatase acide (µg de p- nitrophenol .h⁻¹.g⁻¹de sol)	20,007 a	24,238 b	25,817 b
Azote dans les feuilles(%)	2,612 a	2,913 a	2,724 a
Phosphore dans les feuilles	0,523 a	0,462 a	0,471 a

*Les données dans la même ligne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes
selon le test de Newman-Keuls (p < 0,05)*

*(Pis02) souche de *Pisolithus tinctorius* ; (PisE) souche de *Pisolithus* sp. ; (T) témoin*

Une quantité significativement élevée de fluorescéine produite (136,36µg/h/g de sol) lors de l'hydrolyse de la FDA a été enregistrée dans le sol du traitement avec PisE par rapport à celles enregistrées dans le traitement avec Pis02 et le traitement témoin non inoculé.

Pour l'activité des phosphatases en milieu acide, des quantités significativement élevées de p-Nitrophenol, produit durant l'hydrolyse de la pNPP ont été observées dans les sols de

culture de *I. bijuga* inoculé respectivement par les deux souches par rapport à celles observées dans les sols témoins non inoculés.

III.2.3 Diversité morphologique des ectomycorhizes sur les racines de *I. bijuga* après inoculation

Le Tableau 22 montre la diversité morphologique des ectomycorhizes observés sur les racines de *I. bijuga*, inoculés avec les deux souches ectomycorhiziennes (Pis02 et PisE) après 4 mois de culture sous serre. Les résultats ont montré que le traitement avec Pis02 a présenté 6 morphotypes contre 4 sur le traitement avec PisE et 3 seulement sur le témoin. Ces résultats suggèrent que l'introduction des symbiotes au cours du développement des plantules de *I. bijuga*, a amélioré le taux de mycorhization des racines (Tableau 22) et a permis également de générer une diversité spécifique des champignons formant la symbiose ectomycorhizienne sur les racines de la plante.

Parmi les 6 morphotypes d'ectomycorhize identifiés, le morphotype M2 a été le plus abondant avec un pourcentage de colonisation des racines de 47,07% pour le traitement avec Pis02, 48,2% pour PisE et 15% pour les traitements témoins. De plus, ce morphotype colonise mieux les racines des plants inoculés que celles des plants témoins non inoculés. Le morphotype M5 suit de près le morphotype M2 en terme de présence au niveau des systèmes racinaires des plants. Par contre, ce morphotype n'a pas été observé au niveau des plants témoins.

Tableau 22 : Caractères morphotypiques des ectomycorhizes chez *I. bijuga* après inoculation

Morphotype	Caractéristiques morphologiques	% par plantule et par traitement		
		Pis02	PisE	T
M1	Texture ornementée de couleur marron, présence d'hyphe et absence de ramification	5,75	13,06	9,43
M2	Texture ornementée de couleur marron, pas d'hyphe ni de ramification	47,07	48,2	15,75
M3	Texture ornementée de couleur jaune, pas d'hyphe mais avec de ramification	3,96	0,82	4,5
M4	Texture ornementée de couleur marron, pas d'hyphe mais avec de ramification	4,13	0	0
M5	Texture ornementée de couleur jaune, pas d'hyphe ni de ramification	11,16	16,29	0
M6	Texture ornementée de couleur jaune, présence d'hyphe mais pas de ramification	2.41	0	0

(M) Morphotype ; (Pis02) souche de *Pisolithus tinctorius* ; (PisE) souche de *Pisolithus* sp. ; (T) témoin

III.2.4 Relation entre les souches ectomycorhiziennes inoculées, le développement de *I. bijuga* et les activités de microorganismes du sol

Sur le sol SE5, les effets de l'inoculation avec les souches ectomycorhiziennes Pis02 et PisE sur le développement de *I. bijuga* et sur les activités des microorganismes du sol sont présentés dans la figure 26. Dans ce cercle de corrélation, les deux axes F1 et F2 constituent 100% de l'inertie totale représentant respectivement 89,68% et 10,32% de cette inertie (Figure 26). Ces deux axes ont été retenus pour l'interprétation des résultats.

Tous les paramètres mesurés, sauf pour la quantité du phosphore dans les feuilles de *I. bijuga*, ont été positivement corrélés avec les deux traitements inoculés (PisE et Pis02) suivant l'axe F2. Selon l'axe F1, le traitement avec la souche PisE correspond à des activités microbiennes globales du sol plus stimulées. Par contre, le traitement avec la souche Pis02 est corrélé avec des quantités élevées en azote dans les biomasses de la plante.

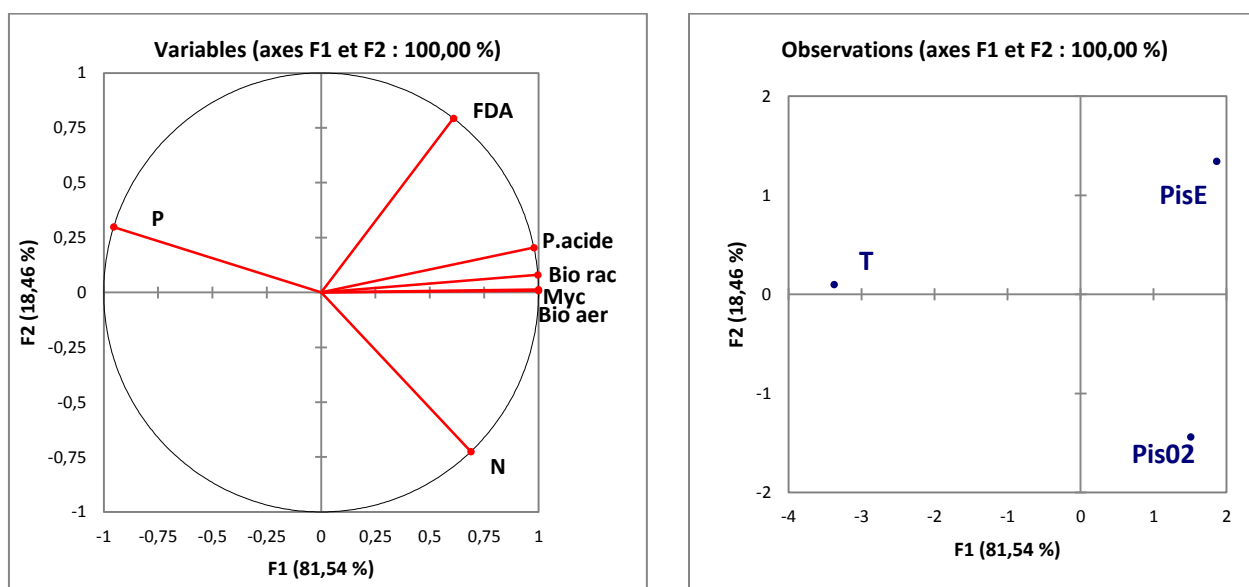


Figure 26. Relation entre les souches ectomycorhiziennes utilisées, le développement de *I. bijuga* et les activités des microorganismes du sol

Sigles : (Pis02) souche de *Pisolithus tinctorius* ; (PisE) souche de *Pisolithus spp.* ; (T) témoin; (FDA) Fluorescéine diacetate (activité globale de microorganismes) ; (P. acide) Phosphatase acide ; (Bio rac) Biomasse racinaire ; (Bio aer) Biomasse aérienne ; (Myc) taux de mycorhization ; (P) phosphore dans les feuilles; (N) Azote dans les feuilles.

IV. DISCUSSION

L'objectif de ce dernier chapitre était d'identifier les couples symbiotiques susceptibles d'être utilisées pour améliorer le développement de nos essences natives (*I. bijuga* et *D. trichocarpa*) sur le sol envahi par *G. banksii*. Le dispositif expérimental a consisté à inoculer des plantules de *D. trichocarpa* et de *I. bijuga* sur des sols préalablement envahis

par *G. banksii*. Ainsi, deux types de sol (envahis par *G. banksii* pendant une année SE1 ou au moins cinq ans SE5) ont été utilisés pour *D. trichocarpa* sur lesquels, les plantules ont été inoculées en simple ou en double inoculation avec des souches de BNL et de champignon arbusculaire. Pour le cas de *I. bijuga*, seul le sol envahi par *G. banksii* pendant plus de 5ans a été utilisé sur lequel, les plantules ont été avec l'une ou l'autre des deux souches de champignon ectomycorhizien (Pis02 et PisE). Les impacts de l'inoculation ont été évalués sur le développement des plantules et sur la structure et le fonctionnement des microorganismes du sol de culture.

IV.1 Importance de la simple et la double inoculation *Rhizobium*-MVA sur la croissance de *D. trichocarpa* au niveau du sol envahi par *G. banksii*

Les effets d'une simple ou d'une double inoculation avec les souches des BNL et/ou champignons arbusculaires ont été largement étudiés sur l'amélioration du développement des légumineuses. La performance de la double inoculation a été particulièrement illustrée dans les écosystèmes dégradés (Duponnois *et al.*, 2001 ; Founoune *et al.*, 2002 ; André *et al.*, 2003). En effet, Mortimer *et al.*, (2012) ont montré que la double inoculation avec *Rhizobium-Glomus mossae* a amélioré le développement de *Acacia cyclops* sur un sol pauvre en éléments nutritifs. Il a été démontré que la double inoculation améliore également la teneur en azote du sol (Requena *et al.*, 2001). Cependant Ballesteros-Almanza *et al.*, (2010) ont montré que la simple inoculation avec soit la souche de *Glomus* soit la souche de rhizobium seule donne des résultats plus intéressants que la co-inoculation avec ces deux types de symbiote microbien quant à l'amélioration de la capacité des légumineuses (*Phaseolus* sp.) à tolérer le stress hydrique.

Les résultats de la présente étude sur le sol envahi par *G. banksii* montrent que tous les traitements en simple ou double inoculation ont amélioré la nodulation, la mycorhization et le développement de *D. trichocarpa* par rapport au traitement témoin. Ces résultats confirment l'importance de la symbiose mycorhizienne et/ou fixatrice d'azote sur l'établissement et le développement des plantes hôtes dans des zones perturbées que certains auteurs ont déjà mentionné (Estaun *et al.*, 1997 ; Duponnois *et al.*, 2001 ; 2005). Par contre, il a été déjà signalé que la réussite d'une telle opération dépend de plusieurs facteurs liés soit au sol (Slankis, 1974) soit aux couples symbiotiques (Azcon *et al.*, 1991). En effet, nos résultats ont montré que l'effet de l'inoculation sur le développement de *D. trichocarpa* et la colonisation de ses racines par les symbiotes microbiens sur le sol envahi par *G. banksii* varie beaucoup en fonction du temps d'envahissement du sol par la plante exotique. Ainsi, plus le temps d'envahissement de la plante exotique est long, plus les

plantules de *D. trichocarpa* s'adaptent mal même en présence des symbiotes microbiens performants. Dans cette situation, les résultats de la présente étude ont montré que les souches symbiotiques natives de la région d'étude se sont montrées particulièrement efficaces. En effet, la souche de rhizobium native du site (Rn) combiné avec le champignon endomycorhizien de référence (GI) ou le champignon endomycorhizien du site (MVAn) a amélioré à la fois le développement de *D. trichocarpa*, le taux de mycorhization et de nodulation des plantes. Ces résultats corroborent ceux des autres études dans lesquelles les souches de champignon MVA ou rhizobium natives contribuent à l'amélioration du développement des plantes natives sur un milieu perturbé (Caravaca *et al.*, 2003 ; Tchabi *et al.*, 2010 ; Ceccon *et al.*, 2012). Ces observations ont été également remarquées avec des simples inoculations telle que Caravaca *et al.*, (2003) ont expérimenté sur un arbuste natif, *Rhamnus lycioides* en Espagne et Ceccon *et al.*, (2012) sur le couple *Acacia farnesiana*/ *Sinorhizobium americanum* au Mexique.

Dans certains types de sol, l'introduction de nouveau champignon altère la structure des communautés microbiennes résidentes et perturbe même le fonctionnement des systèmes symbiotiques (Callaway et Walker, 1997). Or, dans cette étude, une synergie parfaite entre la souche de référence (GI) et les souches natives a été observée. De tel résultat a été déjà obtenu par certains auteurs en travaillant sur des souches microbiennes d'origine différente (Azcon *et al.*, 1991 ; Lal et Khanna, 1993 ; Marques *et al.*, 2001).

IV.2 Importance de l'inoculation ectomycorhizienne sur la croissance de *I. bijuga* au niveau du sol envahi par *G. banksii*

Il est bien connu que les champignons ectomycorhiziens améliorent le développement des plantes dans un sol pauvre en éléments nutritifs (Bolan, 1991) et peuvent intervenir dans la protection des plantes contre des agents pathogènes du sol (Kang *et al.*, 1997). Nos résultats montrent que, après cinq mois de culture de *I. bijuga* sur le sol envahi par *G. banksii*, le développement des plants de *I. bijuga* inoculés par l'une ou l'autre des deux souches de *Pisolithus* codés Pis02 et PisE est nettement amélioré par rapport à celui des plants témoins non inoculés. Ces résultats renforcent ceux obtenus dans le chapitre II montrant que les extraits de la plante exotique n'ont pas d'effet négatif sur le développement de ces deux souches ectomycorhiziennes. Les deux souches ectomycorhiziennes arrivent même à stimuler le développement de *I. bijuga* sur le sol envahi par *G. banksii*. Dans ce cas, la propagation de la plante exotique ne constitue pas un danger pour le développement de *I. bijuga* si les deux champignons restent encore présents dans le sol. Par contre, il est important de savoir exactement jusqu'à quelles conditions, ces

deux champignons arrivent ils encore à établir des structures symbiotiques fonctionnelles avec l'essence native. En effet, le développement de l'essence forestière native inoculée avec ces champignons n'a pas été accompagné par une nette amélioration de la nutrition phosphatée de la plante. Les champignons ectomycorhiziens sont connus pourtant comme des agents très efficaces quant à l'amélioration de la nutrition phosphatée des plantes surtout en milieu pauvre en cet élément (Grove *et al.*, 1994). Il est donc possible que les deux champignons ectomycorhiziens arrivent à établir des structures symbiotiques mais le fonctionnement de ces structures est quelque peu inhibé par d'autres facteurs liés aux conditions pédoclimatiques. Des difficultés de certaines structures ectomycorhiziennes à explorer des éléments nutritifs (Tinker, 1984 ; Mousain, 1989 ; Martin et Lorillou, 1997) et /ou à produire des enzymes phosphatasiques (Jayachandran *et al.*, 1992 ; Mousain, 1989) ou protéase (Nasholm *et al.*, 1998) ont été déjà rapportés surtout dans des conditions de sols fortement perturbés.

IV.3 Impacts de l'inoculation de *I. bijuga* et *D. trichocarpa* sur les activités enzymatiques des microorganismes du sol envahi par *G. banksii*

Rappelons que les activités enzymatiques des microorganismes du sol contribuent à l'amélioration de la nutrition minérale des plantes. En effet, la stimulation de l'activité des enzymes phosphatasiques du sol permet d'augmenter la quantité de phosphore (Pi) libéré à partir des formes stables (Po) (Clarholm, 1997) les rendant ainsi disponibles pour les plantes. Il est déjà mentionné que l'inoculation mycorhizienne augmente l'activité des enzymes du sol telles que les phosphatases et les déshydrogénases (Kothari *et al.*, 1990). Dans ce sens, nos résultats ont démontré clairement que le traitement des plantes avec la souche de *G. intraradices* en co-inoculation avec la souche de rhizobium native (sur le sol envahi 1an) et avec la souche de STM609 (sur le sol envahi plus de 5ans) a significativement stimulé l'activité des phosphatases en milieu acide des microorganismes du sol. Ramanankierana *et al.*, (2006) en travaillant sur différents compartiments mycorrhizosphériques du sol, ont déjà démontré que la présence des hyphes de champignon mycorhizien stimule l'activité globale des microorganismes du sol. Nos résultats confirment ces observations étant donné que l'inoculation avec la souche STM609 en simple inoculation (sur le sol envahi 1an) et en co-inoculation avec la souche MVAn (sur le sol envahi plus de 5ans) a fortement augmenté l'activité globale de la population microbienne du sol.

V. CONCLUSION

En bref, ce quatrième chapitre nous montre les effets positifs de la technologie d'inoculation valorisant les souches microbiennes natives des zones dégradées sur la stimulation de la croissance des espèces de plantes natives vis-à-vis des sols envahis par l'espèce invasive, *G. banksii*. Chez *D. trichocarpa*, la performance des symbiotes microbiens varie en fonction du temps d'envahissement du sol par *G. banksii*. En effet (i) sur le sol envahi pendant un an, une simple inoculation avec la souche de *G. intraradices* ou la souche de rhizobium STM609 améliore le développement, la nodulation et la colonisation de champignon arbusculaire de *D. trichocarpa*. Ces deux souches ont favorisé également l'activité globale des microorganismes du sol ainsi que l'activité des enzymes phosphatasiques du sol en milieu acide ; (ii) sur le sol envahi pendant plus de 5ans, à part la souche de rhizobium STM609, la souche de champignon arbusculaire native s'est montrée également efficace quant à l'amélioration du développement, de la nodulation et de la colonisation par le champignon arbusculaire de *D. trichocarpa*. Par contre, seul le traitement en double inoculation de rhizobium STM609 avec *G. intraradices* ou la souche de champignon arbusculaire native a favorisé les activités microbiennes du sol. Chez *I. bijuga*, les deux souches ectomycorhiziennes Pis02 et PisE constituent des candidates potentielles pour la facilitation de l'installation de cette essence forestière sur le sol envahi par *G. banksii*.

CONCLUSION GENERALE

La compréhension des impacts de l'envahissement des espèces végétales sur les propriétés chimiques et biologiques du sol, en particulier sur les communautés microbiennes symbiotiques pourra guider les actions de restauration d'une couverture végétale native dans la zone envahie. Ainsi, l'objectif global de ce travail était d'évaluer les principales modifications induites par l'introduction et l'occupation du sol par *G. banksii* au niveau de la structure et du fonctionnement des communautés de champignons mycorhiziens, des bactéries fixatrices d'azote et de leurs microorganismes associés afin de tracer par la suite des itinéraires sylvicoles permettant de rétablir une couverture végétale native dans les zones de propagation. Les approches adoptées ont été focalisées, dans un premier temps, sur la caractérisation de la composition floristique et les propriétés chimiques et microbiennes du sol des parcelles occupées par la population de *G. banksii* ainsi que deux autres formations végétales (forêt naturelle et parcelle de pseudo-steppe) avoisinant ces zones envahies (**Chapitre I**). Les propriétés envahissantes de *G. banksii* ont été par la suite étudiées dans une expérimentation sous serre utilisant des sols provenant de la zone orientale de Madagascar (**Chapitre II**). Les impacts de l'envahissement de *G. banksii* sur l'association symbiotique (mycorhizes et symbiose fixatrice d'azote) de deux espèces ligneuses natives ont fait l'objet du **chapitre III**. Et puis, la sélection et la caractérisation des isolats microbiens symbiotiques capables d'atténuer les effets négatifs de la propagation de *G. banksii* sur le développement de *I. bijuga* et de *D. trichocarpa* ont bouclé les activités (**Chapitre IV**).

A partir des données recueillies sur le terrain, le présent travail a pu montrer que la propagation de *G. banksii* a fortement modifié la composition floristique de la couverture végétale avec une tendance à la disparition des essences forestières natives et à la domination de *G. banksii*. Cette modification concerne surtout les essences ligneuses étant donné que certaines espèces herbacées (*Clidemia hirta*, *Tristemma virusuanum*, *Aristida similis*) subsistent sous la formation dense de *G. banksii*. Les phénomènes de co-existence entre ces espèces de la famille des Melastomataceae et Poaceae restent pourtant à élucider. Par ailleurs, il a été déjà démontré qu'un des problèmes majeurs des plusieurs espèces exotiques envahissantes est leur capacité à inhiber le développement des espèces de plantes natives (Yu *et al.*, 2005, Stinson *et al.*, 2006). Cependant, *G. banksii* semble avoir un caractère particulier étant donné qu'on ne l'a pas trouvé à l'intérieur des formations forestières dans la zone d'étude. Par contre, cette espèce exotique s'installe facilement et se

propage avec une vitesse alarmante dans les surfaces perturbées (surface éclaircie, zone de passage de feu,...). Cette situation pourrait être liée en partie aux propriétés héliophiles de cette plante exotique.

En outre, les résultats des analyses chimiques et microbiologiques des sols issus des différents types de végétation observée dans le site ont révélé que la structure et le fonctionnement des microorganismes dans le sol sous *G. banksii* sont totalement différents des autres types de sol. En effet, une forte inhibition du développement des groupes de microorganismes (champignons mycorhiziens, bactéries fixatrices d'azote,...) généralement bénéfiques pour les plantes a été enregistrée dans le sol de la plante exotique. Particulièrement au niveau de la communauté de champignons mycorhiziens, des faibles pouvoirs endomycorhizogènes (PIM) accompagnés par des densités importantes en spores ont caractérisé les sols sous *G. banksii*. A ces propriétés s'ajoutent des activités enzymatiques et microbiennes fortement inhibées. Ces caractéristiques microbiologiques des sols pourraient constituer des facteurs limitant le développement des autres essences ligneuses, conduisant ainsi à l'inhibition du développement des plantes natives (Van Der Heijden *et al.*, 1998). Dans plusieurs cas, la modification de la structure et du fonctionnement des communautés microbiennes du sol a été citée comme des facteurs d'expansion des plantes exotiques envahissantes (Belnap et Philips, 2001 ; Kourtev *et al.*, 2002a ; 2003 ; Hawkes *et al.*, 2005 ; Batten *et al.*, 2006 ; Stinson *et al.*, 2006).

Considérant la plante exotique proprement dite, ses propriétés envahissantes sur les sols de la partie Est de Madagascar sont basées sur trois points : (i) sa capacité à produire des racines protéoïdes lui permettant de se développer en milieu pauvre en éléments nutritifs ; (ii) l'inhibition des activités des communautés microbiennes du sol bénéfiques pour les plantes natives après son installation dans les zones éclaircies de la forêt ; (iii) et l'activité allélopathique que les extraits de ses racines et feuilles présentent vis-à-vis de certains microorganismes symbiotiques des plantes (champignons mycorhiziens, bactéries fixatrices d'azote). En effet, la présence des racines protéoïdes a été déjà signalée chez les espèces de la famille des Proteaceae (Purnell, 1960). Par contre, la liaison entre la formation de ces structures racinaires et l'inhibition du développement des espèces natives a été décrite pour la première fois dans cette étude. Ces racines sont connues par leur capacité à produire des enzymes phosphatasiques améliorant ainsi la nutrition phosphatée de la plante hôte (Jeffrey, 1967 ; Goldstein *et al.*, 1988a, 1988b ; Stade-Miller *et al.*, 2001 ; Neumann et Martinoia, 2002). Ce qui corrobore parfaitement avec la détection d'une forte activité des enzymes phosphatasiques en milieu acide dans le sol rhizosphérique des racines protéoïdes de *G. banksii* démontrée dans cette étude. Des populations importantes

des microorganismes capables de solubiliser le phosphate ont été également enregistrées dans ce sol.

Les effets allélopathiques des extraits des différents organes sur les microorganismes du sol bénéfiques pour les plantes natives ont été également signalés parmi les propriétés envahissantes des plantes exotiques (Sanon, 2007). Dans ce sens, Stinson *et al.*, (2006) ont démontré que l'inhibition de la germination des spores endomycorhiziennes par les composés allélopathiques produits par les espèces invasives est l'une des causes de la diminution de pouvoir endomycorhizogène du sol envahi. Toutefois, chez les plantes invasives mycotrophes, certaines composées allelopathiques peuvent stimuler la prolifération des hyphes de champignons endomycorhiziens dans le site envahi (Akiyama *et al.*, 2005). Dans ce cas, il est possible que la prolifération des hyphes mycorhiziens soit stimulée seulement au profit de la plante exotique. La présente étude n'a pas pu élucider les effets des extraits de la plante exotique ni sur les phénomènes de sporulation ou de germination des spores endomycorhiziennes ni sur la croissance des hyphes de ces champignons. Par contre, il a été clairement établi par les résultats obtenus que *G. banksii*, une plante faiblement endomycorhizée héberge une densité de spore endomycorhizienne élevée et des faibles propagules susceptibles de former des structures mycorhiziennes avec d'autres plantes.

Vis-à-vis des champignons ectomycorhiziens, *G. banksii* n'a pas eu d'effet négatif considérable. Par contre, les expérimentations ont concerné seulement quelques isolats ectomycorhiziens. Il sera donc intéressant d'élargir les investigations sur les effets de la propagation de *G. banksii* vis-à-vis du développement d'une population plus importante de champignons ectomycorhiziens. Dans ce sens, les effets des différents extraits de la plante devraient être étudiés depuis le développement des souches fongiques symbiotiques jusqu'au fonctionnement des structures ectomycorhiziennes.

Sur un autre groupe de microorganismes symbiotiques (bactéries fixatrices d'azote), les effets des extraits de différents organes de *G. banksii* ont été également étudiés. Ces extraits, particulièrement, les extraits des racines protéoïdes, ont inhibé le développement de la plupart des isolats de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote testés. Cette inhibition a été observée jusqu'à la formation des nodules *in vitro* pour l'isolat STM609. Une telle inhibition, enregistrée au niveau de l'activité de nitrogénase sous l'action de l'extrait aqueux de *Populus balsamifera* a été déjà rapportée chez *Alnus crispa* (Thibault 1982).

Après avoir décrit les différentes modifications apportées par l'installation de *G. banksii* sur les propriétés microbiologiques du sol et la composition floristique de la couverture végétale ainsi que les caractéristiques de cette plante qui lui fait un danger réel pour la végétation native, la présente étude a rapporté des résultats permettant de tracer des itinéraires sylvicoles valorisant les essences forestières natives du site d'étude. En effet, les résultats de cette étude ont montré qu'il est possible de réinstaller une couverture végétale impliquant des essences forestières natives telles que *I. bijuga* et *D. trichocarpa* dans les zones anciennement envahies par la plante exotique à travers la technique d'inoculation microbienne utilisant les souches ectomycorhiziennes issues du site d'étude. Avec cette technologie, le développement des plantules des deux plantes sur le sol envahi par la plante exotique a été comparable à celui observé sur le sol forestier. Plusieurs facteurs ont été déjà identifiés comme à l'origine de l'inhibition du développement des plantes au niveau des zones envahies par les plantes exotiques dont parmi les plus cités figure le fonctionnement des structures symbiotiques au niveau des racines (Haubensak *et al.*, 2004 ; Symstad, 2004 ; Richardson *et al.*, 2000 ; Callaway et Ridenour, 2004 ; Ashton *et al.*, 2005 ; Stinson *et al.*, 2006 ; Reinhart et Callaway, 2006). Nos résultats rejoignent ces observations, indiquant que le fonctionnement de la symbiose endomycorhizienne et la symbiose fixatrice d'azote chez *D. trichocarpa* ont été fortement perturbés dans les sols préalablement envahis par la plante exotique. Les expérimentations n'ont pas pu expliquer les mécanismes de ces inhibitions. Pourtant, il a été bien clair que le pouvoir mycorrhizogène (PIM) du sol a été fortement affaibli par le passage de la plante exotique. Des auteurs ont déjà montré que la colonisation des racines des plantes natives par les champignons mycorhiziens arbusculaires diminue suivant l'installation des espèces envahissantes dans un milieu (Mummey *et al.*, 2005 ; Hawkes *et al.*, 2006). Des effets similaires ont été également observés pour la symbiose fixatrice d'azote. En effet, la nodulation chez *D. trichocarpa* a été inhibée dans le sol de *G. banksii*. Il a été déjà rapporté que le fonctionnement des deux types de symbioses racinaires (fixatrice d'azote et endomycorhizienne) peut être perturbé par un même facteur (Cornet *et al.*, 1982).

Bien que les impacts négatifs de l'installation de la plante exotique n'aient pas été assez significatifs sur la symbiose ectomycorhizienne chez *I. bijuga*, les résultats ont toujours montré que le fonctionnement de la symbiose a été affecté. En effet, le taux de mycorhization des plantes augmente avec l'inoculation, par contre, ces modifications n'ont pas eu d'impact significatif sur le développement des plantes. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer cette situation mais la plus probable dans notre cas c'est l'inhibition du fonctionnement des structures symbiotiques. Cette inhibition pourrait être

intrinsèque au champignon symbiotique suite à la présence des composés allélopathiques tel que Wolfe *et al.*, (2008) ont déjà montré sur *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria bicolor* et *Scléroderma cepa* ou provoquée par des conditions pédoclimatiques telle que la présence en abondance de phosphore (LE Tacon, 1985 ; Gianinazzi-Pearson, 1986, 1986). D'une manière générale, un haut degré d'établissement et de fonctionnement des symbioses entre plantes et microorganismes du sol permet d'atténuer les effets négatifs des stress surtout en milieu dégradé (Odum, 1959 ; Barea *et al.*, 1997 ; Duponnois *et al.*, 2001 ; Founoune *et al.*, 2002 ; André *et al.*, 2003). En revanche, l'application de l'inoculation utilisant des isolats de champignons mycorhiziens et/ou bactéries symbiotiques performants issus des sites perturbés permet de façon évidente la stimulation du développement des plantules. C'est exactement les cas pour *I. bijuga* et *D. trichocarpa* sur le sol pré-colonisé par *G. banksii* dans ce travail. L'effet observé sur les plantules se traduit à la fois sur le développement des plantes, l'amélioration de la nodulation et la mycorhization.

Bref, cette étude a permis de décrire la caractéristique d'une zone occupée par *G. banksii* dans laquelle la diversité floristique ainsi que la densité et les activités microbiennes du sol sous *G. banksii* ont été très faibles par rapport à celles enregistrées dans la zone forestière. De plus, certains caractères envahissants de *G. banksii* ont été décrit notamment sa capacité à modifier l'environnement biotique du milieu envahi, aussi la potentialité plus remarquable de la racine protéoïde sur le développement de la plante en milieu dégradé. Une perturbation des associations symbiotiques (mycorhizienne et fixatrice d'azote) a été également observée chez les deux essences autochtones cultivées sur le sol envahi par *G. banksii*. Cependant, l'application de la technologie de l'inoculation microbienne a permis de réduire significativement les effets négatifs de *G. banksii* sur la régénération de *I. bijuga* et de *D. trichocarpa*. Ces résultats suggèrent que la compréhension des caractères invasifs d'une espèce exotique envahissante permet de proposer des techniques d'atténuation correspondantes à leurs mécanismes d'invasion afin d'améliorer la conservation des espèces natives du milieu envahi.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul-Wahab A. S. et Rice, E. L. (1967)** Plant inhibition by Johnson Grass and its possible significance in old field succession. *Bull. Torrey Bot. Club.* 94: 485–497.
- Aerts R. (2002)** The role of various types of mycorrhizal fungi in nutrient cycling and plant competition. *Mycorrhizal Ecology* (Eds. Van Der Heijden M. et Sanders I.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 117–133.
- Agerer R. (1991)** Characterization of ectomycorrhiza. In: Methods in microbiology. Vol. 23. (Eds. Norris J.R., Read D.J et Varma A.K.) *Academic Press, New York.* pp. 25–73.
- Aguirreolea J. et Sanchez-Díaz M. (1989)** CO₂ evolution by nodulated roots in *Medicago sativa* L. under water stress. *J. Plant Physiol.* 134: 598-602.
- Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. (2005)** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824–827.
- Allen E.B. et Allen M.F. (1980)** Natural re-establishment of vesicular arbuscular mycorrhizae following stripmine reclamation in Wyoming. *J. Appl. Ecol.* 17: 139 –147.
- Allen O.N. et Allen E.K. (1981)** The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation. Madison, WI, USA: University of Wisconsin Press.
- Allison D.B., Cui X., Page, G.P. et Sabripour M. (2006)** Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat. Rev. Genet.* 7(1): 55 – 65.
- Alpert P., Bone E. et Holzapfel C. (2000)** Invasiveness, invasibility and the role of environmental stress in the spread of non-native plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3(1): 52-66.
- Altomare C., W.A. Norvell T. Bjbrkman et G.E. Harman (1999)** Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2926-2933.
- André S., Neyra M. et Duponnois R. (2003)** Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis changes the Colonisation Pattern of *Acacia tortilis* spp. *Raddiana* Rhizosphere by Two Strains of Rhizobia. *Microbiol. Ecol.* 45: 137–144 DOI: 10.1007/s00248-002-1022-3.
- Andriamiharimanana J.N. (2011)** Dynamique spatio-temporelle des espèces envahissantes à Madagascar: cas de *Grevillea banksii* dans la forêt littorale de Vohibola. Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Département des Eaux et Forêts. Antananarivo, Université d'Antananarivo: 61p
- Andrianandrasana M.D., Baohanta R.H., Randriambanona H., Raherimandimby M., Damase K., Duponnois R. et Ramanankierana H. (2014)** Propagation of

- Grevillea banksii* affects the dynamic of mycorrhizal fungi communities association with native tree species of Madagascar. *J. Life Sci.* 8(6): 511-516.
- Andrianantenaina H. N. (2005)** Contribution a l'étude de potentialite d'envahissement d'*Opuntia monacantha* dans le Reserve Spéciale de Beza Mahafaly. Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Département des Eaux et Forêts. Antananarivo, Université d'Antananarivo : 66p.
- Andrianirina G. (1969)** Note et réflexions sur le *Grevillea* blanc (*Grevillea banksii*). Direction des Eaux et Forêts et de la conservation des sols. Antananarivo: 32p.
- Arahou M. et Diem H.G. (1997)** Iron deficiency induces cluster (proteoid) root formation in *Casuarina glauca*. *Plant Soil* 196: 71-79.
- Arthur M.A., Bray S.R., Kuchle C.R., et McEwan R.W. (2012)** The influence of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, on leaf decomposition and microbial community dynamics. *Plant Ecol.* 213: 1571–1582.
- Ashton I.W., Hyatt L.A., Howe K.M., Gurevitch J. et Lerdau M.T. (2005)** Invasive species accelerate decomposition and litter nitrogen loss in a mixed deciduous forest. *Ecol. Appl.* 15: 1263-1272.
- Augé R.M., Schekel K.A. et Wample R.L. (1986)** Osmotic adjustment in leaves of VA mycorrhizal and nonmycorrhizal rose plants in response to drought stress. *Plant Physiol.* 82: 765-770.
- Azcón R., Rubio R. et Barea J.M. (1991)** Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth, N₂-fixation (N₁₅) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytol.* 117: 399–404.
- Azcón-Aguilar C. et Barea J.M. (1992)** Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere micro-organisms. In: Mycorrhizal functioning: an integrative plant–fungal process. (Eds. Allen M.J.). *New York: Chapman et Hall* 163–198.
- Bâ A.M. et Thoen D. (1990)** First synthesis of ectomycorrhizas between *Azafia Africana* Sm. (Caesalpinioideae) and native fungi from West Africa. *New Phytol.* 114: 99-103.
- Ballesteros-Almanza L., Altamirano-Hernandez J., Peña-Cabriaes J.J., Santoyo G., Sanchez-Yañez J.M., Valencia-Cantero E., Macias-Rodriguez L., Lopez-Bucio J., Cardenas-Navarro R. et Farias-Rodriguez R. (2010).** Effect of co-inoculation with mycorrhiza and rhizobia on the nodule trehalose content of different bean genotypes. *Open Microbiol. J.* 17(4): 83-92.
- Barbault R. et Atramentowicz M. (2010)** Les invasions biologiques, une question de natures et sociétés. (Eds. Quæ), 192 p.

- Bardgett R.D., Yeates G.W. et Anderson J.M. (2005b)** Patterns and determinants of soil biological diversity. In: *Biological Diversity and Function in Soils* (Eds. Bardgett R.D., Usher M.B. et Hopkins D.W.), Cambridge University Press. *Camb.* pp. 100–118.
- Barea J. M., Azcon-Aguilar C. et Azcon R. (1997)** Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil–plant systems. In: *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems* Gange. (Eds. Brown A. C. et Blackwell V. K.). *Science, Camb.* pp. 65–77.
- Barea J.M., Azcon R. et Azcon-Aguilar C. (2005a)**. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrients cycling and soil structure. In: *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* (Eds. Buscot F., Varma S.) *Heidelberg, Germany: Springer-Verlag*, 195–212.
- Barea J.M., Pozo M.J., Azcón R. et Azcón-Aguilar C. (2005b)** Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56(417): 1761-1778. *Press, Cambridge.*
- Bartscki H., (1982)** Influence de quelques pesticides sur l'infection endomycorhizienne. Les mycorhizes, partie intégrante de la plante: biologie et perspectives d'utilisation, Colloques de l'I.N.R.A., France, .u, 259 - 266.
- Batten K.M., Scow K.M., Davies K.F. et Harrison S.P. (2006)** Two invasive plants alter soil microbial community composition in serpentine grasslands. *Biol. Invasions* 8: 217-230.
- Beck D.P., Materon L.A. et Afandi F. (1993)** Practical Rhizobium–legume technology manual, (Eds. ICARDA), *Syria*, P.389.
- Belnap J. et Phillips S. (2001)** Soil biota in an ungrazed grassland: response to annual grass (*Bromus tectorum*) invasion. *Ecol. Appl.* 11: 1261–1275.
- Benhizia Y., Benhizia H., Benguedouar A., Muresu R., Giacomini A. et Squartini A., (2004)**. Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbial.* 27: 462-468.
- Benítez-Malvido J. (1998)** Impact of forest fragmentation on seedling abundance in a tropical rain forest. *Conserv. Biol.* 2: 380-389.
- Benítez-Malvido J. et Martinez-Ramos M. (2003)** Impact of Forest Fragmentation on Understory Plant Species Richness in Amazonia. *Conserv. Biol.* 17(2): 389-400.
- Bennett A.E., Alers-Garcia J. et Bever J.O., (2006)** Three-way interactions among mutualistic mycorrhizal fungi, plants and plant enemies: hypotheses and synthesis. *Am. Natur.* 167(2): 141-152.

- Benson D.R. et Silvester W.B. (1999)** Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57(2): 293-319.
- Bethlenfalvay G.J. et Schuëpp H. (1994)** Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. In: Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems (Eds. Gianinazzi, S. et Schuëpp, H.). *Birkhäuser Verlag, Basel* pp. 171-313.
- Bever J. D. (1994)** Feedback between plants and their soil communities in an old field community. *Ecology* 75: 1965-1977.
- Bever J.D., Westover K.M. et Antonovics J. (1997)** Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *J. Ecol.* 85: 561-573.
- Bever J.D. (2003)** Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytol.* 157: 465-473.
- Bevevino A., Dalmatri C., Tabacchioni S. et Chiarini L. (2000)** Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biol. Fertil. Soils.* 31, ¾, 225-235.
- Binggeli P., (2003)** Introduced and invasive plants. In: The natural history of Madagascar. (Eds. Goodman S. M. et Benstead J. P.). Chicago, Londres. The University of Chicago Press, 257-268.
- Black C.A., Evans D.O., White J.L., Ensminger L.E., Clark F.E. et Dinauer R.C. (1965)** Methods of soil analysis. No.9. Agronomy. *Amer. Soc. Agron., Madison.* pp. 1572
- Blair A.C. et Wolfe L.M. (2004)** The evolution of an invasive plant: an experimental study with *Silene latifolia*. *Ecology* 85: 3035–3042.
- Blossey B. et Nötzold R. (1995)** Evolution of increased competitive ability in invasive, nonindigenous plants: a hypothesis. *J. Ecol.* 83: 887–889.
- Bolan N.S. (1991)** A critical review of the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* 134: 189-207.
- Bordeleau L. M., et Prévost D. (1994)** Nodulation and nitrogen fixation under extreme environments. *Plant soil* 161: 115–125.
- Borrell A. (2012)** Statut et lutte contre une espèce exotique envahissante: la vision d'Amérique *Neovision vision* en Midi-Pyrénées. Mémoire de fin d'études. 103 p.
- Bossdorf O., Prati H.A. et Schmid B., (2004)** Reduced competitive ability in an invasive plant. *Ecol. Lett.* 7: 346–353.

- Boullard B. (1962)** Mycorrhizas endotrophes chez diverse plante collectée dans les peuplements nord-américains de pin Weymouth (*P. strobus*). *Bull. Soc. Linn. Normandie* 10, iii. 30
- Boullard B., et Moreau R. (1962)** Sol, microflore et végétation; équilibres biochimiques et concurrence biologique. *Masson et Co.*, Paris 172 p.
- Boullard B. (1964)** Acquisitions récentes relatives à l'écologie des mycorhizes. *J. A. T. B.* A. Paris, 1Q -.11: 515-538.
- Boullard B. (1968)** Les mycorhizes. Paris, Masson et Cie.
- Boullard B. (1982)** Brève réponse à une question: que recouvre la notion de mycorhizes? Les mycorhizes, partie intégrante de la plante: biologie et perspectives d'utilisation, Colloques de l'I.N.R.A., France, J.1 : 15-21.
- Bowen G.D. (1980)** Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In *Tropical Mycorrhiza Research* (Eds. Mikola P.). Clarendon Press, Oxford, 165-190.
- Brisco C.B. (1959)** Early results of mycorrhizal inoculations of pine in Puerto Rico. *Carrib. For.* 20: 73.
- Brown K.A. et Gurevitch J. (2004)** Long term impacts of logging on forest diversity in Madagascar. *Proceedings of the National Academy of Science* 101: 6045–6049.
- Brundrett M. (2004)** Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 79: 473-495.
- Brussard L., Behan-Pelletier V.M, Bignell D.E., Brown V.K, Didden W., Folgarait P., Fragoso C., Freckman D.W., Gupta V., Hattori T., Hawkswoeth D.L., Klopatek C., Lavelle P., Malloch D.W., Rusek J., Soderstrom B, Tiedje J.M. et Virginia R.A (1997)** Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *Ambio.* 26: 563-570.
- Burke M.J.W. et Grime J.P. (1996)** An experimental study of plant community invasibility. *Ecology* 77: 776–790.
- Burleigh S.H. et Dawson J. O. (1994)** Occurrence of *Myrica* nodulating *Frankia* in Hawaiian volcanic soils. *Plant Soil* 164: 283-289.
- Buschena C.A., Doudrick R.L et Anderson N.A. (1992)** Persistence of *Laccaria spp.* as ectomycorrhizal symbionts of container-grown black spruce. *Can. J. Forest Res.* 22: 1883-1887.
- Callaway R.M. et Walker L.R. (1997)** Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology* 78: 1958–1965.
- Callaway R.M., Aschehoug E.T. (2000)** Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. *Science* 290: 521–523.

- Callaway R.M., Mahall B.R., Wicks C. Pankey J. et Zabinski C. (2003)** Soil fungi and the effects of an invasive forb on grasses: Neighbor identity matters. *Ecology* 84(1): 129–135.
- Callaway R.M. et Ridenour W.M., (2004)** Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Front. Ecol. Env.* 2(8): 436-443.
- Callaway R.M., Thelen G.C., Rodriguez A., Holben, W.E., (2004)** Soil biota and exotic plant invasion. *Nature* 427: 731–733.
- Callaway R.M., Cipollini D., Barto K., Thelen G.C., Hallett S.G., Prati D., Stinson K. et Klironomos J. (2008)** Novel weapons: invasive plants suppress fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology* 89: 1043-55.
- Caravaca F., Barea J.M., Palenzuela J., Figueroa, D., Alguacil M.M. et Roldán A. (2003)** Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.* 22: 103-111.
- Carey E. V., Marler M. J. et Callaway R. M. (2004)** Mycorrhizae transfer carbon from a native grass to an invasive weed: evidence from stable isotopes and physiology. *Plant Ecol.* 172: 133–141.
- Carlton J. T. (1987)** Patterns of transoceanic marine biological invasions in the Pacific Ocean. *B. Mar. Sci.* 41(2): 452-465.
- Carlton J. T. et Geller J. B. (1993)** Ecological roulette: the global transport of non-indigenous marine organisms. *Science*, 261: 78-82.
- Carrière S.M. et Randriambanona H. (2007)** Biodiversité introduite et autochtone: antagonisme ou complémentarité? Le cas de l'eucalyptus à Madagascar. *BFT N°292* (2)
- Carrière S.M., Randrianasolo E. et Hennenfen J. (2008)** Aires protégées et lutte contre les bioinvasions: des objectifs antagonistes? Le cas de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) autour du parc national de Ranomafana à Madagascar. *La revue en sciences de l'Environnement* Vol 8 no 1.
- Ceccon E., Almazo-Rogel A., Almazo-Rogel E. et Toledo (2012)** The effect of inoculation of an indigenous bacteria on the early growth of *Acacia farnesiana* in a degraded area. *Cerne, Lavras*, 18 (1): 49-57.
- Chapin F.S., Walker B.H., Hobbs, R.J. (1997)** Biotic control over the functioning of ecosystems. *Science* 277: 500-504.
- Chauvet M., (1969)** Inventaire des especes forestières introduites à Madagascar. Tananarive, Madagascar, *Ensa*, 187 p.

- Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M., Vandamme P. (2001)** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1729–1735.
- Chen W.M., James E.K., Chou J.H., Sheu S.Y., Yang S.Z., Sprent J.I. (2005)** β -Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytol.* 168: 661–675.
- Chiarini L., Bevivino A., Tabacchioni S. et Dalmastri C. (1998)** Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. *Soil Biol. Biochem.* 30: 81-87.
- Chitry M., Maskell L. C., Pino J., Pyšek P., Vil M., Font X. et Smart S. M., (2008)** Habitat invasions by alien plants: a quantitative comparison among Mediterranean, subcontinental and oceanic regions of Europe. *J. Appl. Ecol.* 45(2): 448-458.
- Clarholm M. (1997)** The nitrogen problem. In: Ecotoxicology: Responses, biomarkers and risk assessment (Eds. J.T. Zelikoff). *OECD Workshop, SOS Publications*, Fair Haven, NJ, USA, pp.387-402.
- Clawson M.L., Benson D.R., Resch S.C., Stephens D.W. et Silvester W.B. (1997)** Typical *Frankia* infect actinorhizal plants exotic to New Zealand. *New Zeal. J. Bot.* 35: 361–367
- Collins B. et Wein G.R. (1993)** Competition between native and immigrant *Polygonum* congeners. *Can. J. Bot.* 71: 939-945.
- Collinson Sr., Clawson U., Kam S.N. et Black C.R. (1997)** Effects of soil moisture deficits on the water relations of bambara groundnut (*Vigna subterranean* L. Verdc.). *J. Exp. Bot.* 48: 877-84.
- Cornet F. et Diem H.G. (1982)** Étude comparative de l'efficacité des souches de *Rhizobium* d'*Acacia* isolées de sols du Sénégal et effet de la double symbiose *Rhizobium-Glomus mosseae* sur la croissance de *Acacia holosericea* et *A. raddiana*. *BFT* 198: 3-15.
- Cosgrove D.J. (1977)** Microbial transformations in the phosphorous cycle. In: Advances in microbial ecology, vol. 1 (Eds. Alexander M.). New York: Plenum Press, 95-134.
- Cronk Q.C.B. et Fuller J. L. (1995)** Plant Invaders. The Threat to Natural Ecosystems. London: *Chapman et Hall*.
- Cronk Q.C.B. et Fuller J.L. (1996)** Plant invaders. *Chapman et Hall*, Londres, 241 p.

- Curran L. M., I. Caniago G. D. Paoli D. Astianti M. Kusneti M. Leighton C. E. Nirarita et Haeruma H. N. (1999)** Impact of El Niño and Logging on Canopy Tree Recruitment in Borneo. *Science* 286: 2184-2188.
- D'Antonio C. M. et Mahall B.E. (1991)** Root profiles and competition between the invasive, exotic perennial, *Carpobrotus edulis*, and two native shrub species in California coastal scrub. *Am. J. Bot.* 78: 885-894.
- Daehler C. C. (2003)** Performance comparisons of co-occurring native and alien invasive plants: implications for conservation and restoration. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 183–211.
- Damase K. P. (1987)** Utilisation des endomycorhizes à vésicules et arbuscules en milieu tropical: études préliminaires d'une application au Zaïre. Thèse de maîtrise, Faculté de Foresterie et géomatique Université Laval Québec 81p.
- Danielson R.M. et Visser S. (1989)** Host response to inoculation and behaviour of introduced and indigenous ectomycorrhizal fungi of Jack pine grown on oil-sands tailings. *Can. J. Forest Res.* 19: 1412-1421.
- Davis M.A., Thompson K. et Grime J.P. (2001)** Charles S. Elton and the dissociation of invasion ecology from the rest of ecology. *Divers. Distrib.* 7: 97–102.
- De Faria S. M., Lewis G. P., Sprent J.I. et Sutherland J. M. (1989).** Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New. Phytol.* 111: 607- 619.
- De la Cruz R.E., Manalo M.Q., Aggangan N.S. et Tambalo J.D. (1988)** Growth of three legumes trees inoculated with VA mycorrhizal fungi and Rhizobium. *Plant Soil* 108: 111-115.
- Dell B., Kuo J, Thompson G.J. (1980)** Development of proteoid roots in *Hakea obliqua* R.Br. (Proteaceae) grown in water culture. *Aust. J. Bot.* 28: 27-37.
- Dell B. et Malajczuk N. (1997)** L'inoculation des eucalyptus introduits en Asie avec des champignons ectomycorhiziens Australiens en vue d'augmenter la productivité des plantations. *R.F.F.* N° spéciale, 174-184.
- Dice L.R. (1945)** Measurement of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Diem G.H., Duhoux E., Zaid H. et Arahou M. (2000)** Cluster roots in Casuarinaceae: Role and relationship to soil nutrient factors. *Ann. Bot-London* 85: 929-936.
- Dijkstra F.A. et Smits M.M. (2002)** Tree species effects on calcium cycling: the role of 527 calcium uptake in deep soils. *Ecosystems*, 5: 385-398.

- Dinkelaker B., Römheld V. et Marschner H. (1989)** Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell. Environ.* 12: 285–292.
- Dinkelaker B., Hengeler C., Marschner H. (1995)** Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Bot. Acta.* 108: 183-200.
- Dommergues Y. et Mangenot F. (1970)** Ecologie microbienne du sol. Masson, Paris.
- Dommergues Y., Dreyfus B., Diem H.G. et Duhoux E (1985)** Fixation de l'azote et agriculture tropicale. La Recherche, vol.16, n°162: 22-31.
- Dommergues Y., Duhoux E., et Diem H.G. (1999)** Les arbres fixateurs d'azote: Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux. (Eds. *Lavoisier*), 498 p.
- Duan X., Neuman D.S., Reiber J.M., Green C.D., Saxton A.M., Auge R.M. (1996)** Mycorrhizal influence on hydroulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *J. Exp. Bot.* 303: 1541-50.
- Dukes J.S. et Mooney H.A. (1999)** Does global change increase the success of biological invaders? *Trends Ecol. Evol.* 14: 135–139.
- Duponnois R. et Garbaye J. (1990)** The bacteria associated with *Laccaria laccata* ectomycorrhizas or sporocarps: effect on symbiosis establishment on *Douglas fir*. *Symbiosis* 9: 267-273.
- Duponnois R., Senghor k., Bâ A.M., Ducoussou M. et Cadet P. (1998)** Interaction entre les symbioses bactériennes et fongiques et les nématodes a galles chez *Acacia holosericea* In L'acacia au Sénégal rapport de colloque et séminaires du 3-5 décembre 1996, Dakar, Sénégal. (Eds. ORSTOM).
- Duponnois R., Plenchette C., Thioulouse J. et Cadet P. (2001a)** The mycorrhizal soil infectivity and arbuscular Mycorrhizal fungal spores communities in soils of different aged fallows in Senegal. *Appl. Soil Ecol.* 17: 239-251.
- Duponnois R., Plenchette C. et Bâ A.M. (2001b)** Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *Glomus aggregatum* in Senegal. *Eur. J. Soil Biol.* 37: 181-186.
- Duponnois R., Founoune H., Masse D. et Pontanier R. (2005)** Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semi-arid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity. *Forest Ecol. Manag.* 207: 351-362.

- Duponnois R., Plenchette C., Prin Y., Ducouso M., Kisa M., Bâ A.M. et Galiana A. (2007)** Use of mycorrhizal inoculation to improve reforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. *Ecol. Eng.* 29: 105-112.
- Ehrenfeld J.G. (2001).** Plant–soil interactions. In: Encyclopedia of biodiversity (Eds. Levin S.), San Diego (CA): *Academic Press*. p 689–709.
- Ehrenfeld J.G. (2003)** Ecosystem effects and causes of exotic species invasions. *Ecosystems* 6: 503–523.
- Elgersma K.J. et Ehrenfeld J.G. (2011)** Linear and non-linear impacts of a non-native plant invasion on soil microbial community structure and function. *Biol. Invasions* 13: 757–768.
- El-Ghareeb R.M. (1991)** Suppression of annuals by *Tribulus terrestris* in an abandoned field in the sandy desert of Kuwait. *J. Veg. Sci.* 2: 147–154.
- Elton C.S. (1958)** The Ecology of Invasions. Methuen, London. Environments. *Plant Soil* 161, 115-135.
- Engler A. (1894)** Proteaceae. In Die natürlichen Pflanzenfamilien (Eds. Engler, A., et Prantl, K.).
- Ens E.J. et French K. (2008)** Exotic woody invader limits the recruitment of the indigenous plant species. *Biol. Conserv.* 141: 590–595.
- Epstein E. (1972)** Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. New York: John Wiley et Sons, Inc. 412p.
- Ernst C.M. et Cappuccino N. (2005)** The effects of an invasive alien vine, *Vincetoxicum rossicum* (Asclepiadaceae), on arthropod populations in Ontario old fields. *Biol. Invasions* 7(3): 417-425.
- Estaun V., Save R. et Biel C. (1997)** AM inoculation as a biological tool to improve plant re-vegetation of a disturbed soil with *Rosmarinus officinalis* under semi-arid conditions. *Appl. Soil Ecol.* 6: 23–229
- Fisher R. A. et Yates R. L. (1948)** Statistical Tables for biological, Agricultural and medical Research, 3th eds. Edinburgh: Oliver and Boyd.
- Fisher R. A. et Yates R. L. (1970)** Statistical Tables for biological, Agricultural and medical Research, 6th eds. Hafner Publishing Co., Darien, Connecticut.
- Fitouri-Dhane S. (2011)** Diversités Phénotypique et Moléculaire des Microsymbiotes du Sulla du nord (*Hedysarum coronarium* L.) et sélection de souches rhizobiales efficaces. Thèse de doctorat en sciences agronomique. Institut National Agronomique de Tunisie. Université de Carthage. 145pp.

- Fletcher R. A. et Renney A. J. (1963)** A growth inhibitor found in *Centaurea* spp. *Can. J. Plant Sci.* 43: 475-481.
- Formoso C.T., Isatto E.L. et Hirota E.H. (1999)** "Method for Waste Control in the Building Industry," Proceedings of the 7th Annual Conference of the IGL C, Berkeley, pp. 325-334.
- Founoune H., Duponnois R., Bâ A.M. et El Bouami F. (2002)** Influence of the dual arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal symbiosis on the growth of *Acacia holosericea* (A. Cunn. Ex G. Don) in glasshouse conditions. *Ann. Forest Sci.* 59: 93-98.
- Francois E. (1926)** Le réboisement à Madagascar. *Revue de Botanique Appliquée et d'agriculture Tropicale* 6: 737-744.
- Frésard Marjolaine, (2011)** « L'analyse économique du contrôle des invasions biologiques: Une Revue de Littérature », *Revue d'économie politique*, 121: 489-525.
- Frey-Klett P., Chavatte M., Clausse M.L., Courrier S., Le Roux C., Raaijmakers J., Martinotti M.G., Pierrat J.C. et Garbaye J. (2005)** Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytol.* In press.
- Gaertner M., Breeyen A.D., Hui C., Richardson D.M. (2009)** Impacts of alien plant invasions on species richness in Mediterranean-type ecosystems: a meta-analysis. *Prog. Phys. Geog.* 33: 319-338.
- Gage D.J. (2004)** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (2): 280-300.
- Galiana A., Gnahoua G.M., Chaumont J., Lesueur D., Prin Y., et Mallet B. (1998)** Improvement of nitrogen fixation in *Acacia mangium* through inoculation with rhizobium. *Agroforest. Syst.* 40: 297-307.
- Garbaye J., Delwaulle J.C. et Diangana D. (1988)** Growth response of eucalyptus in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecol. Manag.* 24: 151-157.
- Garbaye J. (1990)** Les problèmes posés par la mycorhization contrôlée du chêne. *Rev. For. Fr. XLII* 1: 35-47.
- Garbaye J. (1991)** Biological interactions in the rhizosphere. *Experientia* 47: 370-375.
- Garbaye J (1994)** Helper Bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197-210.
- Garbaye J. et Churin J.L. (1997)** Growth stimulation of young oak plantations inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with special reference to summer drought. *Forest. Ecol. Manag.* 98: 221-228.

- Garcia C., Hernandez T., Roldan A. et Albaladejo L. (1997)** Biological and biochemical quality of a semiarid soil after induced revegetation. *J. Environ. Qual.* 26: 1116-1122.
- Gardes M Bruns TD. (1993)** ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2:113-118.
- Gardner W.K., Parbery D.G. et Barber D.A. (1981)** Proteoid root morphology and function in *Lupinus albus*. *Plant Soil* 60: 143-147.
- Gardner W.K., Barber D.A. et Parbery D.G. (1982)** Effect of microorganisms on the formation and activity of proteoid roots of *Lupinus albus* L. *Aust. J. Bot.* 30: 303-309.
- Gardner W.K., Parbery D.G. et Barber D. A. (1982a)** The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interface. *Plant Soil* 68: 19-32.
- Gardner W.K., Parbery D.G. et Barber D. A. (1982b)** The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. II. The effect of varying phosphorus supply and soil type on some characteristics of the soil/root interface. *Plant Soil* 68: 33-41.
- Gardner W.K. et Boundy K.A. (1983)** The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. IV. The effect of interplanting wheat and white lupin on the growth and mineral composition of the two species. *Plant Soil* 70: 391-402.
- Gardner W.K., Barber D.A. et Parbery D.G. (1983a)** The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. *Plant Soil* 70: 107-124.
- Gerber E., Krebs C., Murrell C., Moretti M., Rocklin R. et Schaffner U. (2008).** Exotic invasive knotweeds (*Fallopia spp*) negatively affect native plant and invertebrate assemblages in European riparian habitats. *Biol. Conserv.* 141: 646-654.
- Gianinazzi S., (1982)** L'endomycorhization contrôlée en agriculture, horticulture et arboriculture: problèmes et progrès. Les mycorhizes, partie intégrante de la plante: biologie et perspectives d'utilisation, Colloques de l'I.N.R.A., France, .11: 231-237.
- Gianinazzi-Pearson V. (1982)** Importance des mycorhizes dans la nutrition et la physiologie des plantes. In: Les mycorhizes, biologie et utilisations, Gianinazzi-Pearson, V. et Gianinazzi, S. (Eds. INRA), Pub., pp. 51-59.
- Gianinazzi-Pearson V., (1986)** Les mycorhizes: moyen d'améliorer l'utilisation des engrais phosphatés. Fertilisants et Agriculture. *BFT*, France, 21- 33.
- Gibson A.H. (1963)** Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* L. plant. *Aust. J. Biol. Sci.* 16: 2842.

- Glick B.R., Patten C.L., Holguin G. et Penrose D.M., (1999)** Bio-chemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, London, UK.
- Godron M., Daget Ph., Emberger L. Long G., Le Floc'h E., Poissonet J., Sauvage C. et Wacquant J.P. (1983)** Code pour le relevé méthodique de la végétation et du milieu. C.N.R.S. Paris. 296p.
- Goldstein A.H., Beartlein D.A. et McDaniel R.G. (1988a)** Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*: I. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension cultured cells. *Plant Physiol.* 87: 711-715.
- Goldstein A.H., Danon A., Beartlein D.A. et McDaniel R.G. (1988b)** Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*: II. Characterization of the phosphate starvation inducible-excreted acid phosphatase. *Plant Physiol.* 87: 716-720.
- Goodman S. M. et Benstead J. P. (2003)** The natural history of Madagascar. Chicago, Londres. *The University of Chicago Press*.
- Gratton C. et Denno R.F. (2005)** Restoration of anthropoid assemblages in a *Spartina* salt marsh following removal of the invasive plant, *Phragmites australis*. *Restor. Ecol.* 13: 358.
- Grierson P.F. et Attiwill P.M. (1989)** Chemical characteristics of the proteoid root mat of *Banksia integrifolia* L. *Aust. J. Bot.* 37: 137–143.
- Groves, Theodore, Yongmiao Hong, John McMillan et Barry Naughton (1994)** "Autonomy and Incentives in Chinese State Enterprises, *Quart. J. Econ.* 109 (1): 183-209.
- Grubb P.J. et Whittaker J.B. (1989)** Toward a More Exact Ecology. Blackwell Scientific, Oxford.
- Gyaneshwar P., Kumar G.N., Parekh L.J. et Poole P.S. (2002)** Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245: 83–93.
- Haas D. et Défago G. (2005)** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307–319.
- Hagen R. (2001)** Analyse préliminaire de Taolagnaro ent atnt que Ste de Candidat pour une Meilleure Gouvernance dans le Secteur Forestier. Madagascar, USAID :74p.
- Hagen-Thorn A., Callesen I., Armolaitis K. et Nihl-Gård B. (2004)** The impact of six European tree species on the chemistry of mineral topsoil in forest plantations on former agricultural land. *Forest Ecol. Manag.* 195: 373–384.

- Hall T. A. (1999)** "The phonological word: a review" In: Studies on the Phonological Word. (Eds. Hall T. A. et Ursula Kleinhenz) 1-22. *Amsterdam: John Benjamins*.
- Hamilton J.G., Holzapfel C. et Mahall B.E. (1999)** Coexistence and interference between native perennial grass and non-native annual in California. *Oecologia* 121: 518-526.
- Handreck K. A. (1991a)** "Iron can Partly Prevent Phosphorus Toxicity". *Aust. Hort.* June-july 1991 *Rural Press Vic.* pp 24-27.
- Handreck K. A. (1991b)** "Effective Iron Sources for Iron-inefficient Plants." *Aust Hort* July 1991. *Rural Press Vic.* pp 26-28.
- Hardie et Leyton L. (1981)** The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. *New Phytol.* 89: 599-608.
- Hartnett D.C., Samenus R.J., Fischer L.E et Hetrick B.A. (1994)** Plant demographic responses to mycorrhizal symbiosis in tallgrass prairie. *Oecologia* 99: 21-26.
- Haubensak W., Attardo A., Denk W. et Huttner W. B. (2004)** Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3196-3201.
- Hawkes C. V., Wren I. F., Herman D. J. et Firestone M. K. (2005)** Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. *Ecol. Lett.* 8: 976-985.
- Hawkes L.A., Broderick A.C., Coyne M.S. et Godfrey M.H. (2006)** Phenotypically linked dichotomy in sea turtle foraging requires multiple conservation approaches. *Curr. Biol.* 16: 990–995.
- Hayman D.S. (1978)** Endomycorrhizae. In: interaction between non pathogenic soil microorganisms and plants (Eds. Domergues Y.R. et Krupa S.V.). *Elsevier scientific publishing company, Amsterdam*, 401-442.
- Herrera M.A., Salamanca C.P. et Barea J. (1993)** Inoculation of woody legumes with selected arbuscular Mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean Ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 129-133.
- Herrera A. M. et Dudley T. L. (2003)** Reduction of riparian arthropod abundance and diversity as a consequence of giant reed (*Arundo donax*) invasion. *Biol. Invasions* 5: 167–177.
- Hiltner L. (1904)** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache (On recent insights and problems in the area of soil bacteriology under special

- consideration of the use of green manure and fallowing). *Arb. Dtsch. Landwirt. Ges.* 98: 59–78.
- Hinsinger P. (2001)** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237: 173–195.
- Hobbie S. E. (1992)** Effects of plant species on nutrient cycling. *Trends Ecol. Evol.* 7: 336–339.
- Hobbs R. J. et Huenneke L.F. (1992)** Disturbance, diversity and invasion: Implications for conservation. *Conserv. Biol.* 6: 324–337.
- Hodkinson D.J. et Thompson K. (1997)** Plant dispersal: the role of man. *J. Appl. Ecol.* 34: 1484–1496.
- Hong-bang N., L. Wan-xue, W. Fang-hao et Bo L. (2007)** An invasive aster (*Ageratina adenophora*) invades and dominates forest understories in China: altered soil microbial communities facilitate the invader and inhibit natives. *Plant Soil* 294: 73–85.
- Honig B., Diamond L., Gutlohn L., et Mahler J. (2000)** Core Teaching Reading Sourcebook: for Kindergarten through Eighth Grade. Novato, CA: Arena Press.
- Jayachandran K., Schwab A.P. et Hetrick B.A.D. (1992)** Mineralization of organic phosphorus by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 24: 897–903.
- Jager H., Tye A. et Kowarik I. (2007)** Tree invasion in naturally treeless environments: impacts of quinine (*Cinchona pubescens*) trees on native vegetation in Galapagos. *Biol. Conserv.* 140: 297–307.
- Jeffrey D.W. (1967)** Phosphate nutrition of Australian heath plants. I. The importance of proteoid roots in Banksia (Proteaceae). *Aust. J. Bot.* 14: 403–411.
- John T.V. et Coleman D.C. (1983)** The role of mycorrhizae in plant ecology. *Can. J. Bot.* 61: 1005–1014.
- Johnson N.C., Graham J.H. et Smith F.A. (1997)** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytol.* 135: 575–585.
- Jones D.L. (1998)** Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant Soil* 205: 25–44.
- Kanchan S.D. et Jayachandra (1979)** Allelopathic effects of *Parthenium hysterophorus* L. I. Exudation of inhibitors through roots. *Plant Soil* 53: 27–35.
- Kang H., Rachen J. P. et Biermann P. L. (1997)** Contributions to the cosmic ray flux above the ankle: clusters of galaxies. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 286: 257–267.
- Kardol P., Bezemer T.M. et Van Der Putten W.H. (2006)** Temporal variation in plant–soil feedback controls succession. *Ecol. Lett.* 9: 1080–1088.

- Kardol P., Cornips N.J., Van Kempen M.M.L., Tanja Bakx-Schotman J.M. et Van Der Putten W.H. (2007)** Microbe mediated plant-soil feedback causes historical contingency effects in plant community assembly. *Ecol. Monogr.* 77: 147-62.
- Kareiva P. (1996)** Developing a predictive ecology for non-indigenous species and ecological invasions. *Ecology* 77(6): 1651-1652.
- Keane R.M. et Crawley M.J. (2002)** Exotic plant invasions and the enemy-release hypothesis. *Trends Ecol. Evol.* 17: 164–170.
- Klironomos J.N. (2002)** Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature* 417: 67–70.
- Koffa S. N. et De La Cruz R. E. (1995)** Screenhouse performance of VAM inoculated seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit. In phosphorus-deficient and aluminium sulfate-treated medium. *New For.* 9: 273–9.
- Konstantinov S.R., Zhu W.Y. et Williams B.A. (2003)** Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *Microb. Ecol.* 43: 225-235.
- Kothari S.K., Marschner H., Romheld V. (1990)** Direct and indirect effects of VA mycorrhizae and rhizosphere microorganisms on mineral nutrient acquisition by maize (*Zea mays* L.) in a calcareous soil. *New phytol.* 116: 637-645.
- Kourtev P.S., Ehrenfeld J.G. et Häggblom M. (2002a)** Exotic plant species alter the microbial community structure and function in soil. *Ecology* 83: 3152-3166
- Kourtev P.S., Ehrenfeld J.G. et Häggblom M. (2003)** Experimental analysis of the effect of exotic and native plant species on the structure and function of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 35: 895-905.
- Kowarik I. (1995)** Time lags in biological invasions with regard to the success and failure of invasive species. Plant Invasions: General Aspects and Special Problems (Eds. Pysek P., Prach K., Rejmánek M. et Wade M.), pp. 15–38. SPB Academic Publishing, Amsterdam.
- Kull C. A., Tassin J., Moreau S., Rakoto Ramiarantsoa H., Blanc-Pamard C. et Carrière S. M. (2012)** The introduced flora of Madagascar. *Biol. Invasions* (14): 875-888.
- Kuske C.R., Ticknor L.O., Miller M.E., Dunbar J.M., Davis J.A., Barns S. et Belnap J. (2002)** Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl. Environ. Microb.* 68: 1854–1863.

- Lal B. et Khanna, S. (1993)** Renodulation and nitrogen fixing potential of *Acacia nilotica* inoculated with Rhizobium isolates. *Can. J. Microbiol.* 39: 87–91.
- Lal R. (1990)** Soil erosion and land degradation: The global risks. *Adv. In Soil. Sci.* 11: 129-172.
- Lamaze T., Khamis S., Foyer C., Farineau J., Valadier M.H. et Morot-Gaudty J.F. (1990)** Effet d'une limitation en N sur la photosynthèse chez le maïs. In: *Physiologie et production du maïs*. INRA, Paris, 113-121.
- Lambert D.M., Cooper M.C. et Pagh J.D. (1998)** Supply chain management: implementation issues and research opportunities, *Int. J. Log. Manag.* 9 (2): 1-19.
- Lamont B. (1971)** The effect of soil nutrients on the production of proteoid roots by *Hakea* species. *Aust. J. Bot.* 20: 27–40.
- Lamont B. (1972a)** The effect of soil nutrients on the production of proteoid roots by *Hakea* species. *Aust. J. Bot.* ZQ: 27-40.
- Lamont B.B. et McComb A.J. (1974)** Microorganisms and the formation of proteoid roots. *Aust. J. Bot.* 22: 681-688.
- Lamont B.B. (1980)** Specialized roots of non-symbiotic origin in heathlands. In *Ecosystems of the World. Heathlands and Related Shrublands* (Eds. R. L. Specht.) *Elsevier Sci. Pub.: Amsterdam*. Pp. 183-195.
- Lamont B., (1982)** Mechanisms for enhancing nutrient uptake in plants, with particular reference to mediterranean South Africa and Western Australia. *Bot. Rev.* 48 (3): 1-689.
- Lankau R. A. (2011)** Resistance and recovery of soil microbial communities in the face of *Alliaria petiolata* invasions. *New Phytol.* 189: 536–548.
- Laurance W. F., Nascimento H. E. M., Laurance S. G., Andrade A., Fearnside P. M. et Ribeiro J. E. L. S. (2006)** Rain forest fragmentation and the proliferation of successional trees. *Ecology* 87: 469-482.
- Lazarides M., Cowley K. et Hohnen P. (1997)** *CSIRO* handbook of Australian weeds. Collingwood, Victoria, Australia: *CSIRO Publishing*.
- Le Bourgeois T. et Camou R. (2006)** Analyse de risque phytosanitaire de *Grevillea banksii* R.Br. dans une zone de ARP Antilles. *Fiche technique*, référence W-24. 6p.
- Le Tacon F. (1985)** Les mycorhizes: une coopération entre plantes et champignons. *La Recherche*, Paris, p. 624-632.
- Le Tacon F. et Bouchard D. (1986)** Effects of different ectomycorrhizal fungi on growth of Larch, Douglas fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nurse soil. *Acta Oecol. Oec. appl.* 7: 389-402.

- Le Tacon F. (1992)** Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. In *Mycorrhizas in ecosystems* (Eds. Read D. J., Lewis D.H., Fitter A. H. et Alexander I. J.). *CAB International, Wallingford*, p. 119-154.
- Le Tacon F. (1997)** Mycorhizes, pépinières et plantations forestières en France. *Rv. For. Fr. XLIX*. 131-154.
- Leger E.A. et Rice K.J. (2003)** Invasive California poppies (*Eschscholzia californica* Cham.) grow larger than native individuals under reduced competition. *Ecol. Lett.* 6: 257-264.
- Lemanceau P. (1992)** Beneficial effects of rhizobacteria on plants: example of *fluorescent Pseudomonas* spp. *Agronomie* 12: 413-437
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C. et Dénarié J. (1990)** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784.
- Levine J.M., Vilà M., D'Antonio C.M., Dukes J.S., Grigulis K., Lavorel S. (2003)** Mechanisms underlying the impacts of exotic plant invasions. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 270: 775-781.
- Li W.H., Zhang C.B., Jiang H.B., Xin G.R. et Yang Z.Y. (2006)** Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed, *Mikania micrantha* HBK. *Plant Soil* 281: 309-324.
- Lindström E.S. 1998.** Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 163-174.
- Lockwood J.L., Cassey P. et Blackburn T. (2005)** The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends Ecol. Evol.* 20 (5): 223-228.
- Lockwood J.L., Hoopes M.F. et Marchetti M.P. (2007)** *Invasion Ecology. Blackwell Scientific Press, UK.*
- Lodge D.M. (1993)** Biological invasions: lessons for ecology. *Trends Ecol. Evol.* 8, 133-137. Ltd., Oxford, pp. 73-97.
- Lorenzo P. Rodriguez-Echeverria S. et Gonzalez L. (2010)** Effect of invasive *Acacia dealbata* Link on soil microorganisms as determined by PCR-DGGE. *App. Soil Ecol.* 44: 245-251.
- Louis I., Racette S., Torrey J.G. (1990)** Occurrence of cluster roots on *Myrica cerifera* L. (Myricaceae) in water culture in relation to phosphorus nutrition. *New Phytol.* 115: 311-317.

- Lyons K. G., et Schwartz M. W. (2001)** Rare species loss alters ecosystem function invasion resistance. *Ecol. Lett.* 4: 1–8.
- MacDonald L.H., Smart, A. et Wissmar R.C. (1991)** Monitoring guidelines to evaluate effects of forestry activities on streams in the Pacific Northwest and Alaska. EPN 910/9-91-001, NPS section, U.S. EPA region 10, seattle, WA 166pp.
- Mack R.N., Simberloff D., Lonsdale W.M., Evans. H., Clout M. et Bazzaz F.A. (2000)** Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecol. Appl.* 10: 689–710.
- Malajczuk N., Pearse M., et Litchfield R.T. (1984)** Interactions between *Phytophthora cinnamoni* and *Rhizobium* isolates. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82: 491–500.
- Manjunath A., Bagyaraj D.J. et Gowda H.S.G.(1984)** Dual inoculation with VA mycorrhiza and *Rhizobium* is beneficial to leucaena. *Plant Soil* 78: 445-448.
- Marler M.J., Zabinski C.A. et Callaway R.M. (1999)** Mycorrhizae indirectly enhance competitive effects of an invasive forb on a native bunchgrass. *Ecology* 80: 1180-1186.
- Marques J.C., Pardal M.A., Nielsen S.N. et Jorgensen S.E. (1997)** Analysis of the properties of exergy and biodiversity along an estuarine gradient of eutrophication. *Ecol. Model.* 102: 155-167.
- Marques M.S., Pagano M. et Scotti M.R.M.M.L. (2001)** Dual inoculation of a woody legume (*Centrolobium tomentosum*) with rhizobia and mycorrhizal fungi in south-eastern Brazil. *Agroforest Syst.* 52: 107-117.
- Marschner H., Römheld V. et Kissel M. (1986)** Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9: 695-713
- Marschner H., Römheld V. et Cakmak I. (1987)** Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *J. Plant Nutr.* 10: 1175-1184.
- Marschner H. (1991a)** Plant-soil relationships: acquisition of mineral nutrients by roots from soils. In: Plant growth: interactions with nutrition and environment. (Eds. Porter, J.R. et Lawlor, D.H.). *Camb*: Cambridge University Press, 125-155.
- Marschner H. (1995)** Mineral Nutrition of higher plants, 2nd eds. *Academic Press, London, U.K.*
- Marscher H. (1997)** Mineral nutrition of higher plant. 2nd eds. *Academic Press, London.* 889p.
- Martin F. et Lorillou. (1997)** Nitrogen acquisition and assimilation in ectomycorrhizal systems. In: Trees-contributions to modern tree physiology (Eds. H. Rennenberg, Eschrich, W. et Ziegler, H.) SPB Academic Publ., La Haye, Pays-Bas, p. 423-439.

- Marx D. H. (1969)** The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Marx D.H. (1972)** Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infection. *Annu Rev Phytopathol* 10: 429-454.
- Marx D.H. (1973)** Mycorrhizae and feeder root diseases. In: Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology (Eds. Marks, G.C. et Kozlowski, T.T.), pp. 351-382. *Academic Press, New York*.
- Marx D.H., Cordell C.E. et Clark A. III. (1988)** Eight years performance of loblolly pine with *Pisolithus* ectomycorrhizae on a good-quality forest site. *South J. Appl. For.* 12: 275-280.
- McKinney M.L. et Lockwood J.L. (1999)** Biotic Hogeinization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends Ecol. Evol.* 14: 450-453.
- Medd (2004)** Stratégie nationale pour la biodiversité: enjeux, finalités, orientations, Ministère de l'Ecologie et du développement Durable. République Française, Paris.
- Meerts P., Dassonville N., Vanderhoeven S., Chapuis-Lardy L., Koutika L.S. et Jacquemart A.L. (2004)** Les plantes exotiques envahissantes et leurs impacts. In Biodiversité: Etat enjeux et perspectives, De Boek Universite, Bruxelles, 238p.
- Menge J. A., Johnson E.L.V. et Platt R.G. (1978)** Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. *New Phytol.* 80: 553-559.
- Mengel K. et Kirkby E.A. (1978)** Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Bern
- Meyer J. Y. (2000)** Preliminary review of the invasive plants in the Pacific Islands (SPREP Member Coutries). In Invasive Species in the Pacific: a technical review and draft regional strategy (Eds. Sherley G.). pp 85-114. Samoa: *South Pacific Regional Environmental Programme*.
- Miki T. et Kondoh M. (2002)** Feedbacks between nutrient cycling and vegetation predict plant species coexistence and invasion. *Ecol. Lett.* 5: 624-633.
- Miller R.M. (1979)** Some occurrences of vesicular-arbuscular mycorrhizal in natural and disturbed ecosystems of the Red Desert. *Can. J. Bot.* 57: 619-623
- Mooney H.A. et Hobbs R.J. (2000)** Invasive species in a changing world. Island Press, Washington, DC plant. *Ecol. Lett.* 7: 346-353.
- Mooney H.A. et Cleland E.E. (2001)** The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98: 5446-5451.

- Mortimer P.E., Le Roux M.R., Pérez Fernández M.A., Benedito V.A., Kleinert A., Xu J. et Valentine A.J. (2012)** The dual symbiosis between arbuscular mycorrhiza and nitrogen fixing bacteria benefits the growth and nutrition of the woody invasive legume *Acacia cyclops* under nutrient limiting conditions. *Plant Soil* 366(1-2): 229-241.
- Mosse B. (1981)** Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Research for Tropical Agriculture. *Research Bull.* 194. College of Tropical Agriculture and Human Resources. *University of Hawaii. Honolulu. USA.* 82p.
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B. et Boivin-Masson C. (2001)** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411: 948–950.
- Moulin L. (2002)** Etude moléculaire de la diversité symbiotique des rhizobia: de l'analyse du gène nodA à l'identification de rhizobia au sein des bêta-Protéobactéries. Thèse de doctorat des sciences biologie. Université Claude Bernard-Lyon I. France. pp.289.
- Mousain D. et Salsac L.(1982)** Nutrition phosphatée et activités phosphatases acides des symbioses ectomycorhiziens cultivés isolément ou en association. In: Les Mycorrhizes: Biologie et utilisation (Eds. INRA). *Colloq. INRA 13, Paris*, pp. 87-95.
- Mousain D. (1989)** Etude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse de Doctorat d'Etat, USTL Montpellier II, 279p.
- Mummey D.L., Rillig, M.C. et Holben W.E. (2005)** Neighboring plant influences on arbuscular mycorrhizal fungal community composition as assessed by T-RFLP analysis. *Plant Soil* 271: 83–90.
- Munns D.N. (1977)** Soil acidity and related matters. In exploiting the Legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture. (Eds. Vincent, J.M., Whitney, A.S. et Bose, J). pp 211-236. Univ. Hawaii coll. *Trop. Agr. Misc. Publ.* 145.
- Murray A.E., Hollibaugh J.T. et Orrego C. (1996)** Phylogenetic comparison of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* pp. 2676-2680.
- Murthy M.S. et Nagodra M.T. (1997)** Allelopathic effects of *Aristita adscensionalis* on rhizobium. *J. Appl. Ecol.* 14: 279-282.
- Muyzer G., Hottentrager S., Teske A., Wawer C. (1996)** Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Molecular Microbial Ecology Manual (Eds. Akkermans ADL, van Elsas JD et de Bruijn FJ), *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.* 3.4.4, 1–23.

- Nasholm T., Ekblad A., Nordin A., Giehler R., Hogberg M. et Hogberg P. (1998)** Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392: 914-916.
- Neumann G. et Martinoia E. (2002)** Cluster roots: an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* 7 (4): 162-167.
- Ngom A., Nakagawa Y., Sawada H., Tsukahara J., Wakabayashi S Uchiumi T., Nuntagij A., Kotepong S., Suzuki A., Higashi S. et Abe M. (2004)** A novel symbiotic nitrogen-fixing members of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50: 17-27.
- Normand P., Coumoyer B., Simonet P. et Nazaret S. (1992)** Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete Frankia. *Gene* (Amsterdam), 111: 119-124.
- Nuzzo V.A. (2000)** Element Stewardship Abstract for *Alliaria Petiolata* (*Alliaria Officinalis*) Garlic Mustard. The Nature Conservancy, Arlington, VA.
- Nwaga D. et Ngo Nkot L.(1998)** Tolérance à l'acidité in vitro de rhizobia isolées de *Vigna unguiculata* au Cameroun en comparaison avec *Bradyrhizobium japonicum*. *Cahiers agricultures*, 7: 407-410.
- Obaton M. (1992)** Facteurs pédoclimatiques limitant la fixation de l'azote chez les légumineuses. In Biological nitrogen fixation and sustainability of tropical agriculture. Ibadan IITA: pp 57-66.
- Odum E.P. (1959)** Fundamentals of Ecology. Saunders, Philadelphia, 546 pp.
- Ohtonen R., Fritze H., Pennanen T., Jumpponen A. et Trappe J. (1999)** Ecosystem properties and microbial community changes in primary succession on a glacier forefront. *Oecologia* 119: 239–246.
- Osvald H. (1948)** Toxic exudates from the roots of *Agropyron repens*. *J. Ecol.* 39: 192-193.
- Palardé J., Pera J. et Alvarez I.F. (1997)** La mycorhization contrôlée du Douglas dans le Nord de l'Espagne. Premiers résultats en plantation. *Revue forestière française*. N° spéciale: 163-173.
- Parker I.M., Simberloff D., Lonsdale W.M., Goodell K., Wonham M., Kareiva P.M., Williamson M.H., Von Holle B., Moyle P.B., Byers J.E. et Goldwasser L. (1999)** Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. *Biol. Invasions* 1: 3-19.
- Pascal M., Lorvelec O. et Vigne J.D. (2006)** Invasions biologiques et extinctions: 11000 ans d'histoire des Vertébrés en France. Coédition Belin - Quæ, Paris: 350 p.

- Pascal M., Vigne J.D. et Tresset A., (2009)** L'homme, maître d'œuvre des invasions biologiques. In: La conquête des espèces. *Dossier Pour la science*, 65: 8-13
- Pauwels J. M., Van Ranst E. et Verloo M. (1992)** Manuel de laboratoire de pédologie: méthodes d'analyse de sols et de plantes, équipement, gestion de stocks de verrerie et de produits chimiques (Eds. AGCD). 265p.
- Payakapong W., Tittabutr P., Teaumroong N., Boonkerd N., Singleton P., et Borthakur, D. (2006)** Identification of two clusters of genes involved in salt tolerance in *Sinorhizobium* sp. Strain BL3. *Symbiosis* 41: 47-53.
- Pendleton R.M. et Smith B.N. (1983)** Vesicular–arbuscular mycorrhizae of weedy and colonizer plant species at disturbed sites in Utah. *Oecologia* 59: 296–301.
- Peret B. (2007)** Transport de l'auxine et développement du nodule actinorhizien chez l'arbre tropical *Casuarina glauca*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier III (France).
- Perrings C., Dehnen-Schmutz K., Touza J. et Williamson M. (2005)** How to manage biological invasions under globalizatton. *Trends Ecol. Evol.* 20: 212-215.
- Peters H. A. (2001)** *Clidemia hirta* invasion at the Pasoh Forest Reserve: an unexpected plant invasion in an undisturbed tropical forest. *Biotropica* 33: 60-68.
- Phillips J. M. et Hayman D. S. (1970)** Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *T. British Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Pimentel D. (2002)** *Biological invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Pimentel D., Zuniga R et Morrison D. (2005)** Update on the environmental and economic costs associated with alien invasive species in the U.S. *Ecol. Econ.* 52(3): 273-288.
- Pitelka L.F. (1997)** Plant migration and climate change. *Am. Sci.* 85 (5): 464–473.
- Plenchette C., Fortin J.A., Furlan V. (1982)** Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. *J. Am. Soc. Hor. Sci* 107: 535-538.
- Plenchette C., Perrin R. et Duvert P. (1989)** The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to Endomycorrhizas. *Can. J. Bot.* 67: 112-115.
- Poynton R.J. (1979)** The pines. In: Tree planting in southern Africa. Pretoria, South Africa: *Department of Forestry*. 1–576.

- Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A. (2002)** Microbiology, 5th eds. NY, USA: McGraw-Hill.
- Purnell H.M. (1960)** Studies of the family Proteaceae. I. Anatomy and morphology of the roots of some Victorian species. *Aust. J. Bot.* 8: 38-50
- Raaijmakers J.M., Vlami M. et de Souza J.T. (2002)** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Anton Leeuw.* 81: 537-547.
- Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C et Moënné L. Y. (2009)** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321: 341-361.
- Raizada P., Raghubanshi A.S. et Singh J.S. (2008)** Impact of invasive alien plant species on soil processes: a review. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 288–98.
- Rajaonarimamy E. (2010)** Influence de la diversité mycorhizienne sur la symbiose *Dalbergia trichocarpa* - rhizobia et sur la structure de la microflore tellurique. Mémoire de Fin d'étude pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies en Biochimie. Faculté des Sciences Université d'Antananarivo. 52p.
- Rajoelison L.G. (1987).** Etude monographique du *Grevillea banksii* et tentative de recherche sur la possibilité de l'utiliser en semis direct par avion. Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Département des Eaux et Forêts. Antananarivo, Université d'Antananarivo: 104
- Rakotoarimanga N. C. (2010)** Structure et fonctionnement de la microflore rhizosphérique associée à la symbiose mycorhizienne en faveur de *Intsia bijuga*, plante autochtone malgache de la forêt de Tampolo. Thèse de Doctorat en Sciences de la vie (Biochimie). Faculté des Sciences Université d'Antananarivo Madagascar. 176p.
- Rakotoarisoa J.A., (1997)** A cultural history of Madagascar. In: Natural change and human impact in Madagascar. (Eds. Goodman S. M. et Patterson B. D.). Washington, Londres, *Smithsonian Institution Press*, 331-341.
- Ramanankierana N., Rakotoarimange N., Thioulouse J., Kisa M., Randrianjohany E., Ramaroson L. et Duponnois R. (2006)** The Ectomycorrhizosphere effect influences functional diversity of soil microflora. *Int. J. Soil Sci.* 1: 8-19.
- Randrianasolo H. E. (2006)** Etude d'une espèce envahissante dans le corridor forestier Ranomafana Andringitra Ivohibe en vue de proposition de lutte contre son invasion : cas de *Psidium cattleianum* (Sabine). Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques. Département des Eaux et forêts. Antananarivo, Université d'Antananarivo : 84p.

- Randrianatoandro M. R. S. (2003).** Intégration de *Grevillea banksii* comme espèce de jachère améliorée en fin de rotation dans la pratique du système de cultures sur brulis (tavy). Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques, Département Agriculture. Antananarivo, Université d'Antananarivo: 81.
- Rao A.V. et Tak. R. (2002)** Growth of different tree species and their nutrient uptake in limestone mine spoil as influenced by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in Indian arid zone. *J. Arid Environ.* 51: 113-119.
- Rasolomampianina R., Bailly X., Fetiaron R., Rabevohitra R., Bena G., Ramaroson, L., Raherimandimby M., Moulin I., De Lajudie P., Dreyfus B. et Avarre J.C. (2005)** Nitrogenfixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia spp.*) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to α - and β -Proteobacteria. *Mol. Ecol.* 14: 4135-4146.
- Ratovomanana Y. R. (2006)** Etude écologique des espèces exotiques envahissantes dans la RNI No 1 de Betampona dans le Faritany de Toamasina. Mémoire DEA, Département d'Ecologie Végétale, Université d'Antananarivo, Madagascar.
- Read D.J., Leake J.R. et Perez-Moreno J. (2004)** Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Can. J. Bot.* 2: 1243–1263.
- Reeves F.B., Wagner D., Moorman T. et Kiel J. (1979)** The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid west. I. A comparison of incidence of mycorrhizae in severely disturbed vs natural environments. *Am. Jo. Bot.* 66: 6–13.
- Reinhart K.O., Packer A., Van Der Putten W.H., Clay K. (2003)** Plant–soil biota interactions and spatial distribution of black cherry in its native and invasive ranges. *Ecol. Lett.* 6: 1046–1050.
- Reinhart K.O. et Callaway R.M. (2006)** Soil biota and invasive plants. *New Phytol.* 170: 445–457.
- Rejmánek M. (1989)** Invasibility of plant communities. *Biological Invasions: a Global Perspective* (Eds. Drake J.A., Mooney H.A., di Castri F., Groves R.H., Kruger F.J., Rejmánek M. et Williamson M.), pp. 369–388. *John Wiley et Sons*, New York.
- Rejmanek M. (2000)** Invasive plants: approaches and predictions. *Aust. Ecol.* 25: 497-506.
- Rejmanek M. (2003)** The rich get richer responses. 2003. *Front. Ecol. Environ.* 1(3): 122-123.

- Requena N., Perez-Solis E., Azcón-Aguilar C., Jeffries P. et Barea J.M. (2001)** Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified. *Appl Environ. Microbiol.* 67: 495–498.
- Reynolds H.L., Packer A., Bever J.D. et Clay K. (2003)** Grassroots ecology: plant-microbe-soil interactions as drivers of plant community structure and dynamics. *Ecology* 84: 2281–2291
- Rice E.L. (1964)** Inhibition of nitrogen-fixing and nitrifying bacteria by seed plants (I.). *Ecology* 45: 824–837.
- Rice E.L. (1984)** *Allelopathy*. 2è eds. Orlando: Academic Press, 422p.
- Richardson D.M., Allsopp N., D’Antonio C.M., Milton S.J. et Rejmanek M. (2000)** Plant invasions—the role of mutualisms. *Biol. Rev.* 75: 65–93.
- Richardson D.M., Binggeli P. et Schroth G. (2004).** Invasive agroforestry trees: problems and solutions. In: *Agroforestry and Biodiversity Conservation in Tropical Landscapes* (Eds. Schroth G., de Fonseca G.A.B., Harvey C.A., Gascon C., Vasconcelos H. et Izac A.M.N.),. *Island Press*, Washington DC, pp. 371–396.
- Richardson D.M. et Pyšek P. (2008)** Fifty years of invasion ecology-the legacy of Charles Elton. *Divers Distrib* 14: 161–168.
- Ridenour W. M. et Callaway R.M. (2001)** The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass. *Oecologia* 126: 444–450.
- Rivas R., Velazquez E., Willems A., Vizcaino N., SubbaRao N.S., Mateos P. F., Gillis M., Dazzo F. B. et Martinez- Molina E. A. (2002)** New species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5217–5222.
- Roberts K.J. et Anderson R.C. (2001)** Effect of garlic mustard [*Alliaria petiolata* (Beib. Cavara et Grande)] extracts on plants and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Am. Midl. Nat.* 146: 146–52.
- Roskoski J.P., Pepper I. et Pardo E. (1986)** Inoculation of leguminous trees with Rhizobia and VA Mycorrhizal fungi. *Forest. Ecol. Manag.* 16: 57–68.
- Ruiz G.M., Carlton J.T., Grosholz E.D. et Hines A.H. (1997)** Global invasions of marine and estuarine habitats by non-indigenous species: mechanisms, extent, and consequences. *Am. Zool.* 37(6): 621–632.

- Saara J. D. (2003)** The invasive tropical shrub *Clidemia hirta* (Melastomatacea) in its native and introduced rangers: Tests of hypotheses of invasion. Theses in the department of biological sciences. Brown University.
- Saccone S., Bolze R., Thomas P., Quan J., Mehta G., Deelman E., JA J.T. et Rice J., (2010)** SPOT: a web-based tool for using biological databases to prioritize SNPs after a genome-wide association study. *Nucleic Acids Research* (Epub ahead of print).
- Sadowsky M.J. (2005)** Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In: Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment (Eds. Werner D, Newton WE). *Springer, the Netherlands*, pp 89-112.
- Safir G. R., Boyer J.S. et Gerdemann J.W. (1971)** Mycorrhizae enhancement of water transport in soybean. *Science* 172: 581-583.
- Sala O.E., Chapin III F.S., Armesto J.J., Berlow E. et Bloomfield J. (2000)** Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.
- Sanon A., Be' guiristain T., Cebon A., Berthelin J., Ndoeye I., Leyval C., Sylla S., Schroth M.N. et Hancock J.G. (1981)** Selected topics in biological control. *Ann. Rev. Microbiol.* 35: 453 - 476.
- Sanon A., Beguiristain T., Cebon A., Berthelin J., Ndoeye I., Leyval C., Sylla S. et Duponnois R. (2009)** Changes in soil diversity and global activities following invasions of the exotic invasive plant, *Amaranthus viridis* L., decrease the growth of native sahelian *Acacia* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70 (1): 118–131.
- Sarah R. B., Kitajima K. et Sylvia M.D. (2003)** Mycorrhizae differentially alter growth, physiology, and competitive ability of an invasive shrub. *Eco. Appl.* 13(3): 565-574.
- Scheublin T. R., Van Logtestijn R. S. P. et Van Der Heijden M. G. A. (2007)** Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. *J. Ecol.* 95: 631–638.
- Schnurer J. et Rosswall T. (1982)** Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1256-1261.
- Schroth M.N. et Hancock J.G. (1982)** Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216: 1376-1381.
- Schultze M. et Kondorosi A. (1998)** Regulation of symbiotic root nodule development. *Ann. Rev. Genet.* 32: 33-57.
- Selosse M.A., Jacquot D., Bouchard D., Martin F. et Le Tacon F. (1998)** Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the

- ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. *Mol. Ecol.* 7: 561-573.
- Selosse M. A., Martin F. et Le Tacon F. (1999)** Structure and dynamic of arti@cially introduced and naturally occurring *Laccaria* sp. discrete genotypes in a European Douglas plantation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2006-2014.
- Shah M. A. et Rashid I. (2008a)** Mycorrhizal source and neighbour identity differently influence *Anthemis cotula* L. invasion in the Kashmir Himalaya, India. *Appl. Soil Ecol.* 40: 330–337.
- Shah M. A. et Rashid I. (2008b)** Mycorrhizosphere mediated Chamomile invasion in the Kashmir Himalaya, India. *Plant Soil* 312: 219–225.
- Shah M. A. et Damase K. P (2009a)** Arbuscular mycorrhizal status of some Kashmir Himalayan alien invasive plants. *Mycorrhiza* doi: 10.1007/s00572-009-0258-x.
- Shah M. A. et Damase K. P (2009b)** Plant invasion induced shift in Glomalean spore density and diversity. *Trop. Ecol.* 3 (In press).
- Shah M. A. Reshi A. Z. et Damase K. P. (2009)** Arbuscular Mycorrhizas: Drivers or Passengers of Alien Plant Invasion. *Bot. Rev.* 75: 397-417.
- Shah A. M., Reshi A. Z. et Rasool N. (2010)** Plant invasions induce a shift in Glomalean spore diversity. *Trop. Ecol.* 51(2S): 317-323.
- Shane M.W. et Lambers H. (2005a)** Cluster roots: a curiosity in context. *Plant Soil* 274 (1/2), 101125.
- Shane M.W. et Lambers H. (2005b)** Manganese accumulation in leaves of *Hakea prostrata* (Proteaceae) and the significance of cluster roots for micronutrient uptake as dependent on phosphorus supply. *Physiol. Plantarum* 124 (4): 441-450.
- Sharma A.K., Johri B.N. et Gianinazzi (1992)** Vesicular arbuscular mycorrhizae in relation to plant disease. *World J. Microb. Biot.* Vol. 8: 559-563.
- Sharma M.P. et Adholeya A. (2000)** Sustainable management of arbuscular mycorrhizal fungi in the biocontrol of soil-borne plant diseases. In: Biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture, Vol. I. (Eds. Updhyay, R.K. Mukerji, K.G. et Chamola, B. P.). *Crop diseases. Kluwer Academic Plenum Publishers*, New York, 117-138.
- Sieverding E. (1988)** Effect of soil temperature on performance of different VA mycorrhizal isolates with cassava. *Angew. Bot.* (62) n° 5-6: 295-300.
- Simberloff D. (2003)** Confronting introduced species: a form of xenophobia? *Biol. Invasions* 5: 179-192.

- Singh S. et Kapoor, K. K. (1999)** Inoculation with phosphate-solubilising microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in sandy soil. *Biol. and Fert. of Soils*, 28: 139-144.
- Siqueira J.O., Saggin-junior O.J., Floreas-Aylas W.W. et Guimaaes, P.T.G. (1998)** Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brasil. *Mycorrhiza* 7: 293-300.
- Skene K.R., Kierans M., Sprent J.I. et Raven J.A. (1996)** Structural aspects of cluster root development and their possible significance for nutrient acquisition in *Grevillea robusta* (Proteaceae). *Ann. Bot.* 77: 443-451.
- Skene K.R. (1998)** Cluster roots: some ecological considerations. *J. Ecol.* 86: 1060-1064.
- Slankis V. (1974)** Soil factors influencing formation of ectomycorrhizae. *Ann. Rev. Phytopathol.* 12: 437-457.
- Smith S.E. et Read D.J. (1997)** Mycorrhizal Symbiosis, 2nd Eds. Academic Press, San Diego. 605p.
- Smith S.E. et Read D.J. (2008)** Mycorrhizal Symbiosis. San Diego: Academic. 3rd Eds.
- Sorensen T. (1948)** A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application on Danish Commons. K. Danske Vidensk. Selsk. *Biol. Skr.* 5: 1-34.
- Stade-Miller S., Liu J., Allan D.L., Menhuber C. J., Fedorova M. et Vance C. P. (2001)** Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus stressed white lupin. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 127: 594-606.
- Stevenson F.J. (1986)** Cycles of soil. New York: John Wiley et Sons, 231-284.
- Stinson K.A., Campbell S.A., Powell J.R., Wolfe B.E., Callaway R.M., Thelen G.C., Hallett S.G., Prati D. et Klironomos J.N. (2006)** Invasive plant suppresses the growth of native tree seedlings by disrupting belowground mutualisms. *Plos Biol.* 4: 727-731.
- Stinson K.A., Kaufman S., Durbin L. et Lowenstein F. (2007)** Impacts of garlic mustard invasion on a forest understory community. *Northeast. Nat.* 14: 73-88.
- Strayer D.L., Eviner V.T., Jeschke J.M. et Pace M.L. (2006)** Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends Ecol. Evol.* 21: 645-651.
- Strullu D. G. (1985)** Les Mycorhizes. Handbuch der Pflanzen anatomie. Gebruder Borntraeger, Berlin and Stuttgart.

- Strullu D.G. (1991)** Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. *Techniques et Documentation Lavoisier*. Paris. 242 p.
- Subramanaian K.S. et Charest C. (1995)**. Influence of arbuscular mycorrhizae on the metabolism of maize under drought stress. *Mycorrhiza* 5: 273-8.
- Sun X.Y., Gao C. et Guo D. (2013)** Changes in soil microbial community and enzyme activity along an exotic plant *Eupatorium adenophorum* invasion in a Chinese secondary forest. *Chin Sci. Bull.* 58: 4101- 4108, doi: 10.1007/s11434-013-5955-3.
- Sutter E. et Rakotonjoely (1989)** Synthèse sur le projet inventaire des ressources ligneuses. Ctft-Fofifa 23 p.
- SY A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., De Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C. et Dreyfus B. (2001)** Methylo trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214-220.
- Symstad A. (2004)** Secondary Invasion Following the Reduction of *Coronilla varia* (Crownvetch) in Sand Prairie. *Am. Midl. Nat.* 152(1): 183-189 p.
- Tabacchi E., Marie A., Tabacchi P. et Muller S. (2010)** Incidences sur les communautés et les écosystèmes In *Invasions biologiques, une question de natures et de sociétés* par Robert Barbault et Martine Atramentowicz. (Eds. Quae), *Amzon France*. p 45-62.
- Tabatabai M. A. (1982)** Soil enzymes. In *Methods of Soil Analysis. Part 2.* (Eds. Page A. L., Miller R. H. et Keeney D. R.). *Agronomy* 9: 903-947.
- Tarkka, M.T., Lehr N.A., Hampp, R. et Schrey, S.D. (2008)** Plant Behaviour upon contact with strptomycetes. *Plant Signaling et Behaviour* 3: 1-3.
- Tassin J. (1995)** Bilan de la protection des bassins versants au Lac Alaotra (Madagascar). *BFT* 246: 7-22.
- Tassin J., Bellefontaine R., Roger E., Kull C.A. (2009a)** Evaluation preliminaire des risques d'invasion par les essences forestières à Madagascar. *BFT* 299: 27–36.
- Tchabi A., Coyne D., Hountondji F., Lawouin L., Wiemken A. et Oehl F. (2010)** Efficacy of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi for promoting white yam (*Dioscorea rotundata*) growth in West Africa. *App. Soil Eco.* 45: 92-100.
- Thébault A. (2009)** Resistance of Plant Communities to Invasive Species – Disentangling.
- Thibault J.R. (1982)** Allelopathic growth inhibition of nodulated and unnodulated *Alnus crispa* seedlings by *Populus balsamifera*. *Am. J. Bot.* 1213-1223.

- Thiebaut G. (2007)** Invasion success of exotic aquatic plants in their native and introduced ranges. A comparison between their invasiveness in North America and in France. *Biol. Invasions* 9 (1): 1-12.
- Thiele J., Iserman M., Otte A et Kollmann J. (2010)** Competitive displacement or biotic resistance? Disentangling relationships between community diversity and invasion success of tall herbs and shrubs. *J. Veg. Sci.* 21: 123–220
- Thomson B.D., Hardy G.E.St.J., Malajczuk N. et Grove T.S. (1996).** The survival and development of inoculant fungi on the roots of outplanted *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Soil* 178: 247-253.
- Tinker P. B. (1984)** The role of microorganisms in mediating and facilitating the uptake of plant nutrients from soil. *Plant Soil* 76: 77-91.
- Toro M., Azcón R., Herrera R. (1996)** Effects of yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *Pueria phaseoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. *Biol. Fert. Soils* 21: 23–29.
- Trochain J. L. (1957)** Accord interafricain sur la définition des types de végétation de l'Afrique tropicale. *Bulletin de l'institut d'études centrafricain*, nouvelle série, 13-14: 55-94.
- Tyser R. W. et Worley C. A. (1992)** Alien Flora in Grasslands Adjacent to Road and Trail Corridors in Glacier National Park, Montana (U.S.A). *Conserv. Biol.* 6 (2): 253-262.
- Umali-Garcia M., Libuit J.S. et Baggyan R.L. (1988)** Effects of *Rhizobium* inoculation on growth and nodulation of *Albizia falcataria* (L.) Fosb. and *Acacia mangium* Willd. in the nursery. *Plant Soil* 108: 71–78.
- Union of Concerned Scientists (2001)** The science of invasive species. *An information update by the union of concerned scientist.* 12p.
- Valverde A., Velazquez E., Gutierrez C., Cervantes E., Ventosa A. et Igual J. M. (2003)** *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1979–1983.
- Van Der Heijden M.G.A., Boller T., Wiemken A. et Sanders I.R. (1998)** Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79: 2082–2091.
- Van Der Heijden M. G. A. (2008)** The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11: 651.
- Van Der Putten W.H., Van Dijk C. et Peters B.A.M. (1993)** Plant-specific soil-borne diseases contribute to succession in foredune vegetation. *Nature* 362: 53-56.

- Van Der Putten W.H., Klironomos J.N. et Wardle D.A. (2007)** Microbial ecology of biological invasions. *ISME J.* 1: 28–37.
- Van Hulten M., Pelser M., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. et Ton J. (2006)** Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 5602–5607.
- Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. (2003)** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource. *New Phytol.* 157: 423–447.
- Vandenkoornhuyse P., Husband R., Daniell T.J., Watson I.J., Duck J.M., Fitter A.H., Young J.P.W. (2002)** Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol. Ecol.* 11: 1555–1564.
- Vanderhoeven S., Dassonville N., Chapuis-Lardy L., Hayez M. et Meerts. P. (2006)** Impact of the invasive alien plant *Solidago gigantea* on primary productivity, plant nutrient content and soil mineral nutrient concentrations. *Plant Soil* 286: 259–268.
- Vaughn S.F. et Berhow M.A. (1999)** Allelochemicals isolated from tissues of the invasive weed garlic mustard (*Alliaria petiolata*). *J. Chem. Ecol.* 25: 2495–2504.
- Vessey J.K. (2003)** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571–586.
- Vincent J.M. (1970)** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme. Handbook N°15. Blackwell, Oxford. UK.
- Vitousek P. M., Walker L. R., Whiteaker L. D., Muellerdombois D. et Matson P. A. (1987)** Biological Invasion by *Myrica Faya* Alters Ecosystem Development in Hawaii. *Science* 238: 802–804.
- Vitousek P.M., D’Antonio C.M., Loope L.L. et Westbrooks R. (1996)** Biological invasions as global environmental change. *Am. Sci.* 84: 468–487.
- Vitousek P.M., D’Antonio C.M., Loope L.L., Rejmánek M. et Westbrooks R. (1997)** Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zeal. J. Ecol.* 21: 1–16.
- Vogelsang K. M., Bever J. D., Griswold M. et Schultz P. A. (2004)** The use of mycorrhizal fungi in erosion control applications. Final report for Caltrans. California Department of Transportation Contract no. 65A0070, Sacramento (California). 150p.
- Vogelsang K.M., Bever J.D., Griswold M. et Schultz P.A. (2005)** The Use of Mycorrhizal Fungi in Erosion Control Applications. Sacramento, CA, USA. *California Department of Transportation*.

- Waksman S.A. (1961)** The Actinomycetes, Classification, Identification and Description of Genera and Species. Baltimore: W. et W. Comp. 2: 61-292.
- Walker C. (1983)** Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall concepts in species descriptions. *Mycotaxon* 18: 443-455.
- Walker B.A. et Pate J.S. (1986)** Morphological variation between seedling progenies of *Viminaria juncea* (Schrader et Wendl.) Hoffmanns. (Fabaceae) and its physiological significance. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 305–319.
- Wardle P. (1991)** Vegetation of New Zealand. Cambridge University Press, Camb., U.K.
- Watt M. et Evans J.R. (1999)** Linking development and determinacy with organic acid efflux from proteoid roots of *Lupinus albus* L. grown with low phosphorus and ambient or elevated atmospheric CO₂ concentration. *Plant Physiol.* 120: 705-716
- Wedin D.A. et Tilman D. (1996)** Influence of nitrogen loading and species composition on the carbon balance of grasslands. *Science* 274: 1720-1723.
- Weir T.L., Sang-Wook P. et Vivanco J.M. (2004)** Biological and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 472-479.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. et Lane D.J. (1991)** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Weisskopf L., Heller S. et Eberl L. (2011)** *Burkholderia* species are major inhabitants of white lupin cluster roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 7715-7720.
- Wenzel T.J., Zuurmond A.M., Bergmans A., Van den Berg J.A. et Steensma H.Y. (1994)** Promoter analysis of the PDA1 gene encoding the E1 α subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 297-308.
- Wester L. L. et H. B. Wood. (1977)** Koster's curse (*Clidemia hirta*), a weed pest in Hawaiian forests. *Environ. Conserv.* 4: 35-41
- Whipps J.M. (2001)** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487–511.
- White P. et Robson A. (1990)** Response of lupins (*Lupinus angustifolius* L.) and peas (*Pisum sativum* L.) to Fe deficiency induced by low concentrations of Fe in solution or by addition of HCO. *Plant Soil* 125: 39-47.
- Wilcove D.S., Rothstein D., Dubow J., Phillips A. et Losos E. (1998)** Quantifying threats to imperiled species in the United States. *BioScience* 48: 607–615.
- Williamson M. et Fitter A. (1996)** The varying success of invaders. *Ecology* 77: 1666 - 1670.

- Wilson G.W.T., Hickman K.R., Williamson M.M. (2012)** Invasive warm-season grasses reduce mycorrhizal root colonisation and biomass production of native prairie grasses. *Mycorrhiza* 22: 327-336.
- Wolde-Meskel E. et Sinclair F.L. (1998)** Variations in seedling growth, nodulation and nitrogen fixation of *Acacia nilotica* inoculated with eight rhizobial strains. *Forest Ecol. Manag.* 104: 239-247.
- Wolfe B.E., Rodgers V.L., Stinson K.A. et Pringle A. (2008)** The invasive plant *Alliaria petiolata* (garlic mustard) inhibits ectomycorrhizal fungi in its introduced range. *J. Ecol.* 96: 777-83
- Wolfe B.E. et Klironomos J.N. (2005)** Breaking New Ground: Soil Communities and Exotic Plant Invasion. *BioScience* 55: 477-487.
- Yazid S. M., Lee S. S. et Lapeyrie F. (1994)** Growth stimulation of *Hopea spp.* (Dipterocarpaceae) seedlings following ectomycorrhizal inoculation with an exotic strain of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Ecol. Manag.* 67: 339-343.
- Yelenik S.G., Stock W.D. et Richardson D.M. (2004)** Ecosystem level impacts of invasive *Acacia saligna* in the South African fynbos. *Restor. Ecol.* 12: 44-51.
- Yu X., Yu D., Zhijun L., Keping M.A. (2005)** A new mechanism of invader success: Exotic plant inhibits natural vegetation restoration by changing soil microbe community. *Chinese Sci. Bull.* 50 (11): 1105—1112.
- Zabinski C.A., Quinn L. et Callaway R.M. (2002)** Phosphorus uptake, not carbon transfer, explains arbuscular mycorrhizal enhancement of *Centaurea maculosa* in the presence of native grassland species. *Funct. Ecol.* 16: 758 -765.
- Zahran H. H et Sprent J. I. (1986)** Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167: 303-309.
- Zakhia F., DeLajudie P (2001)** Taxonomy of rhizobia. *Agronomie* 21: 569-576.
- Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel C.J., Gillis M., Dreyfus B. et De Lajudie P. (2004)** Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra arid zone of Tunisia. *Syst Appl Microbiol* 27: 380-395.
- Zhang Y., Wallace J. M. et Iwasaka N. (1996)** Is climate variability over the North Pacific a linear response to ENSO. *J. Climate* 9: 1468-1478.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Composition des milieux de culture (en g/l)

- **TSA (Tryptic Soy Agar)**: c'est un milieu de la marque DIFCO préalablement préparé

Peptone de caséine	15g
Peptone de soja	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
ED qsp	1l
pH	7,3

- **Milieu King B:**

Polypeptone	20g
Glycerol	10g
Phosphate bipotassique anhydre	1,5g
Sulfate de 160agnesium, 7H ₂ O	1,5g
ED qsp	1l
Agar	15g

- **Milieu de Norkrans et Melin(MNM) modifié par Marx :**

CaCl ₂ 2H ₂ O	0,05g
NaCl	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,5g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,15g
Citrate ferrique 1%	1,2ml
Thiamine hydrocharidacée 1mg/ml	1ml
Extrait de malt	3g
Glucose	10g
Agar	20g
ED qsp	1l

- **Milieu Waksman:**

Glucose	20g
Casitone	5g
NaCl	5g
Beef extract	3g
ED qsp	1l
Agar	20g

- **Milieu TCP (Phosphate TriCalcique):**

NH ₄ Cl	5g
NaCl	1g
MgSO ₄	1g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	4g
Glucose	10g
ED qsp	1l
Agar	20g

- **YMA (Yeast Mannitol Agar):**

Mannitol	10g
K ₂ HPO ₄	0.5g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1g
NaCl	0,05g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,04g
Extrait de levure	01g
Glutamate de sodium	0,5g
ED qsp	1l
Agar	10g
pH	6,8

ANNEXE 2. Préparation de la solution tampon potassium phosphate

- **Préparation de la solution tampon phosphate (pour analyse de FDA)**
 - Dissoudre 8,7g de K₂HPO₄ et 1,3g de KH₂PO₄ dans 800ml d'eau distillée
 - Ajuster le pH à 7,6 avec de NaOH
 - Compléter à 1000ml avec de l'eau distillée et conserver à 4°C
- **Préparation de la solution tampon (pour les activités phosphatasiques)**
 - **Tampon Mc Ilvain :**

Solution A à 0,1M : Dissoudre 19,21g d'acide citrique dans 1000ml d'eau déminéralisée.

Solution B à 0,2M : Dissoudre 53,65g de Na₂HPO₄ · 5H₂O (Dibasic Sodium Phosphate) ou dissoudre 71,7g de Na₂HPO₄ · 12H₂O dans 1000ml d'eau déminéralisée.

Pour préparer le tampon proprement dit au pH voulu, on mélange les deux solutions A et B selon le tableau ci-après

Exemple : x ml d'A + y ml de B dilué à un volume total de 100 ml.

Voir tableau de correspondance ci-dessous.

A(X)	44,6	42,2	39,8	37,7	35,9	33,9	32,3	30,7	29,4	27,8	26,7	25,2	24,3	23,3	22,2	21	19,7	17,9	16,9	15,4	13,6	9,1	6,5
B(Y)	5,4	7,8	10,2	12,3	14,1	16,1	17,7	19,3	20,6	22,2	23,3	24,8	25,7	26,7	27,8	29	30,3	32,1	33,1	34,6	36,4	40,9	43,6
pH	2,6	2,8	3	3,2	3,4	3,6	3,8	4	4,2	4,4	4,6	4,8	5	5,2	5,4	5,6	5,8	6	6,2	6,4	6,6	6,8	7

ANNEXE 3. Réactifs pour la coloration des racines

- **Bleu trypan**
 - Acide lactique 333ml
 - Glycérol 333ml
 - Bleu trypan 0.5g
 - Eau distillée 333ml
- **Potasse hydroxyde (10%)**
 - KOH 200g
 - Eau distillée 2000ml

ANNEXE 4. Exemple de calcul des MPN

Un exemple de résultats est donné dans le tableau suivant.

Tableau : Présence de structures mycorhiziennes pour chaque plant et pour chaque dilution
(+ : plant mycorhizé)

Dilution	Rep I	Rep II	Rep III	Rep IV	Rep V	Total des godets avec plant mycorhizé
1	+	+	+	+	+	5
1/4	+	+	+	+	+	5
1/16	+	+	+	+	+	5
1/64	-	+	-	+	+	4
1/256	-	+	-	-	+	3
1/1024	-	-	-	-	+	1

$\text{Log}_{10} \text{MPN} = (x \log a) - K$, avec x = moyenne des godets mycorhizés soit dans ce cas :

$23/5 = 4.6$ et a est le facteur de dilution soit ici 4.

$y = s - x$ y est requis pour trouver K ; s est le nombre de dilution, dans l'exemple, $s = 6$, K est donné dans la table de Fischer et Yates (1948 ; 1970)

$y = 6 - 4,6 = 1.4$

x est supérieur à 2,5, mais y est inférieur à 3,5, donc on cherche K dans la table pour $y = 1,4$; on trouve $K = 0,515$ d'où $\text{Log}_{10} \text{MPN} = 4,6 (0,602) - 0,515 = 2.254$ et $\text{MPN} = 179.47$ propagules pour 100 g de sol

Table d'estimation des organismes estimés par la méthode de dilution

Facteur de dilution $a = 4$

x	Nombre de dilution (s)		
	4	5	6 et plus
0.4	.704	.706	.707
0.6	.615	.617	.618
0.8	.573	.576	.577
1.0	.555	.558	.559
1.5	.545	.551	.553
2.0	.537	.548	.551
2.5		.545	.552
y			.552*
3.5			.55
3.0			.548
2.5		.545	.545
2.0	.537	.537	.537
1.5	.522	.522	.522
1.0	.488	.488	.488
0.8	.464	.464	.464
0.6	.431	.431	.431
0.4	.375	.375	.375

Source : Isabelle CORPRON (1986)

ANNEXE 5. Milieu de culture des plantes en tubes

- **Milieu de Jensen (ml/l)**

Solution P (K_2HPO_4 à 20g/l ; $MgSO_4$, $7H_2O$ à 20 g/l)	10
Solution Q ($NaCl$ a 20g/l)	10
Solution R ($CaHPO_4$ a 50g/l)	20
Solution D ($FeCl_3$, $6H_2O$ a 4g/l ou 11,5ml de $FeCl_3$ $6H_2O$ en solution)	10
Oligoéléments de Jensen*	01
Agar	20g
- ***Solution d'oligoéléments de Jensen en g/l**

H_3BO_4	2,86
$MnSO_4$, H_2O	2,03
$ZnSO_4$, $7H_2O$	0,22
$CuSO_4$, $5H_2O$	0,08
Na_2MoO_4 , $2H_2O$	0,09
pH	6,7

ANNEXE 6. Extraction d'ADN rhizobium : Méthode décrite par Sritharan et Barker 1991

- Culture des bactéries dans le milieu de culture YMA (Yeast Mannitol Agar)
- Préparer une solution de TTE (Tris, Triton, EDTA) :
 - 20mM Tris-HCl 1M, pH8 : 20ml/l
 - 2mM EDTA 0.5M : 4ml/l
 - Triton X-100 1% : 10ml/l
 - Eau : 966ml
- Suspendre une colonie des bactéries dans 100µl de TTE
- Chauffer la solution pendant 5mn

ANNEXE 7.

Articles et communications scientifiques



3rd International Symposium



Environmental Weeds and Invasive Plants



October 2nd to 7th, 2011

Monte Verità, Ascona, Switzerland



Abstracts



Editors

Christian Bohren, Mario Bertossa, Nicola
Schoenenberger,
Marta Rossinelli, Marco Conedera

Propagation of *Grevillea banksii*, an invasive exotic plant species: impacts on structure and functioning of mycorrhizal community associated with natives tree species in eastern part of Madagascar

Andrianandrasana, Martial Doret (1); Ramanankierana, Heriniaina (1); Baohanta, Rondro Harinisainana (1, 2); Raherimandimby, Marson (2); Rakotoniaina, Henintsoa Volatiana (2); Duponnois, Robin (3)

1: National Center of Researches on the Environment, Madagascar

2: Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie university of Antananarivo

3: Laboratoire d'Ecologie et Environnement Marrakech-Maroc UMR 113 IRD/CIRAD/AGRO-M/UM2 USC INRA 1242

martialdoreta@gmail.com

Propagation of exotic plant species is found in many regions of Madagascar Island. This work aims to describe the impacts of propagation of *Grevillea banksii* on soil microbial activities and on the regeneration of two native tree species (*Intsia bijuga* and *Dalbergia trichocarpa*) in the eastern part of Madagascar. The study was conducted within Ianjomara forest where some structure of the vegetation are observed such as an area characterized by grassland (P1), by homogeneous population of *Grevillea banksii* (P2) and by a natural forest composed mainly by *Intsia bijuga* or *Dalbergia trichocarpa* (P3 and P4). Structure of mycorrhizal fungi communities and associated microorganisms were described on soils from each study plots. Cultivated on P1, P2, P3, P4 soils previously colonized by *Grevillea banksii* during 4 months, the development of *Intsia bijuga* and *Dalbergia trichocarpa*, was evaluated after 4 months culturing. According to the nutrients availability on each soil types, the development of *Grevillea banksii* was accompanied or not by a high formation of proteoid roots. Our results showed also that soil occupation by *Grevillea banksii* decreased the total microbial and phosphatases activities of soil especially on soil within a high density of proteoid roots. Slightly mycotrophic, *Grevillea banksii* disturb the structure and the dynamics of symbiotic microflora such as endomycorrhizal fungi (MA) and rhizobia associated with the two native tree species. Those findings illustrated the negative impact of *G. banksii* propagation on the regeneration and the conservation of native tree species in Madagascarian forest.

Keywords : Invasive plant, *Grevillea banksii*, microbial community, proteoid roots, native tree species

Dual or single inoculation *Rhizobium-Glomus* mitigate the negative effects of *Grevillea banksii* on the development of an endemic tree species, *Dalbergia trichocarpa*

¹²ANDRIANANDRASANA Martial Doret*; ²BAOHANTA Rondro Harinisainana; ²RANDRIAMBANONA Herizo; ³Marie-Eve Beaulieu, ¹RAHERIMANDIMBY Marson; ³Damase KHASA et ²RAMANANKIERANA Heriniaina

¹Laboratoire de Biotechnologie-Microbiologie, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Université d'Antananarivo, BP 906, Madagascar

²Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, Département « Ecosystèmes terrestres », Centre National de Recherches sur l'Environnement, BP 1739 Antananarivo, Madagascar

³Centre d'étude de la forêt et Institut Biologique et Intégrative des Systèmes, Université Laval, Québec G1V0A6, Canada

*E-mail : martialdoreta@yahoo.fr

Abstract

The exotic shrub, *Grevillea banksii*, has spread rapidly in the eastern part of Madagascar especially on disturbed areas previously occupied by forest ecosystems. This exotic plant species modified to its own benefits the structure and the functioning of soil microbial community, so that the soil has become unsuitable for the development of other forest plant species. Thus, the artificial supply of effective microbial community such as mycorrhizal fungi, rhizobial strains could stimulate positively the regeneration of native species and rehabilitate soil properties of the invaded ecosystems. The aim of this study was to improve the development of *Dalbergia trichocarpa*, a Malagasy native tree species, on the soil invaded by *G. banksii* by inoculating plantlets with rhizobial, coded as STM609, or mycorrhizal, *Rhizophagus irregulare*, or a mixed rhizobial-mycorrhizal strains. After five months of growth, the results showed that single or dual inoculation boosted significantly the development of *D. trichocarpa*, compared to control treatments. Indeed, the dry mass of aerial biomass was significantly high in inoculated seedlings. It was also observed that the number of nodules and the endomycorrhization rates of *D. trichocarpa* have increased significantly with inoculated plantlets. However, soil inoculated with the rhizobial strain STM609 alone showed a significantly high global soil microbial activity and the dual inoculation has promoted the soil acid phosphatase activity. These results suggest that dual inoculation with rhizobial and arbuscular mycorrhizal strains was significantly beneficial to the growth, nodulation and mycorrhizal rates of *D. trichocarpa* in the soil overgrown by *G. banksii*. They can be used for degraded ecosystems restoration in Madagascar with native species.

Key words: Inoculation, Invasive plant, Mycorrhizae, Rhizobium, Soil microbes, Madagascar



Espèces exotiques envahissantes des îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien



« Les espèces exotiques envahissantes des îles de l'Océan Indien: capitalisation des acquis,
identification des lacunes dans leurs connaissances actuelles et des besoins pour leur évaluation
et leur gestion »

Impacts de la propagation de *Grevillea banksii*, un arbre exotique, sur la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol associés aux essences natives de Madagascar

^{1,2}ANDRIANANDRASANA Martial Doret, ²BAOHANTA Rondro H., ²RANDRIAMBANONA Herizo
Andrianatoandro, ³Damase KHASA, ¹RAHERIMANDIMBY Marson, ²RAKOTOARIMANGA Nirina
²RAMANANKIERANA Heriniaina

¹Université d'Antananarivo-Madagascar, Faculté des Sciences, Département de Biochimie Fondamentale et
Appliquée, Laboratoire de biotechnologie-microbiologie

²Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE), Département Ecosystèmes Terrestres, Laboratoire
de Microbiologie de l'Environnement (LME),

³Université de Laval-Canada, Département de Foresterie et Géomatique, Laboratoire de l'Institut Biologique et
Intégrative des Systèmes (IBIS)

Ces dernières années, l'installation des espèces végétales allogènes ainsi que leurs impacts sur la conservation de la biodiversité a attiré l'attention de nombreux scientifiques. En effet, l'invasion par ces espèces constitue une menace grave pour la biodiversité étant donnée leur aptitude à modifier les propriétés des sols et à perturber par la même occasion la régénération des espèces de plantes natives. L'objectif de cette étude est de décrire les principales modifications induites par la propagation de *Grevillea banksii*, une espèce envahissante dans plusieurs endroits de Madagascar, aussi bien au niveau de la structure et du fonctionnement des communautés de champignons mycorhiziens qu'au niveau du développement de deux essences ligneuses autochtones (*Intsia bijuga* et *Dalbergia trichocarpa*). Les impacts de l'invasion biologique ont été évalués sur trois parcelles caractérisées respectivement par une végétation constituée par des pseudo-steppes, une population homogène de *G. banksii* et une formation forestière naturelle caractéristique de la région Est de Madagascar. L'approche méthodologique consiste à réaliser des analyses physico-chimiques et microbiologiques classiques des échantillons de sol dans un premier temps et puis à évaluer le développement des deux essences ligneuses. Les résultats obtenus ont montré que les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du sol sous l'espèce envahissante est proches de ceux du sol dégradé sous pseudo-steppe. L'évaluation du développement de *G. banksii* sur les trois types du sol illustre le caractère envahissant de *G. banksii* par sa capacité à former des racines protéoïdes surtout sous des conditions de sol pauvres en éléments nutritifs. Les sols fortement adhérents à ces racines abritent plusieurs microorganismes telluriques bénéfiques pour le développement de la plante exotique. Une perturbation du fonctionnement et de la structure de la microflore symbiotique et de leurs microorganismes associés s'est produite durant l'installation de *G. banksii*. Cette perturbation a inhibé le développement des deux essences ligneuses natives.

Mots clés: Plantes envahissantes, *Grevillea banksii*, essences natives, racines protéoïdes, communauté microbienne du sol

Communication affichée au cours de l'atelier mi-parcours du projet Madasym (Madagascar Symbiose) Décembre 2010, Antananarivo

Dynamisme des microorganismes du sol sous l'influence de *Grevillea banksii*, une espèce exotique invasive : impacts sur la communauté mycorhizienne associée aux essences autochtones à Madagascar

^{1,2}ANDRIANANDRASANA, M. D., ²RAMANANKIERANA, H., ^{1,2}RAKOTONIAINA, H. V., ¹RAHERIMANDIMBY, M., ^{1,2}BAOHANTA, R. H., ³DUPONNOIS, R., ²RANDRIAMBANONA, H.

¹Laboratoire de Biotechnologie - Microbiologie, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo - Madagascar

²Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME), Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE) Antananarivo - Madagascar

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



Introduction

Ces dernières années, l'installation des espèces végétales allogènes et leurs impacts sur la conservation de la biodiversité Malagasy a attiré l'attention de nombreux scientifiques (Binggeli, 2003, Carrière *et al.*, 2008). En effet, l'invasion par ces espèces constitue une menace sérieuse pour plusieurs écosystèmes étant donné leur aptitude à modifier les propriétés physico-chimiques et microbiologiques des sols et à perturber par la même occasion la régénération des espèces natives (Pimentel *et al.*, 2000 ; Cabin *et al.*, 2002 ; CBD, 2006 ; Meiners, 2007).

L'hypothèse pour laquelle ce travail repose est que « dans les parties orientales de Madagascar, l'occupation du sol par *Grevillea banksii* (Proteaceae) pourrait créer des modifications au niveau de la structure et du fonctionnement des communautés microbiennes symbiotiques associées aux essences forestières indigènes ».

L'objectif de ce travail est de décrire les effets de *G. banksii* sur la structure et le fonctionnement de la communauté mycorhizienne et de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sur trois parcelles dont la couverture végétale est caractérisée respectivement par des prairies (P1), par une population homogène de *G. banksii* (P2) et par des forêts naturelles à *Intsia bijuga* et *Dalbergia trichocarpa* (P3).



Figure 1. Population de *G. banksii*



RESULTATS ET DISCUSSION

- Le système racinaire de *G. banksii* renferme des racines protéoïdes qui sont particulièrement nombreuses sur P1 et P2. Pourtant le développement de la partie aérienne de cette plante est faible par rapport à celui enregistré sur P3.
- Une stimulation des activités phosphatases a été observée notamment sur le sol en contact direct avec les racines protéoïdes. En effet, les Proteaceae ont la particularité de pouvoir extraire le phosphore dans le sol pauvre grâce à l'activité de l'enzyme phosphatase en milieu acide (Gilbert *et al.*, 1999; Lambers *et al.*, 2006).
- L'installation préalable de *G. banksii* a provoqué une diminution significative de l'activité globale des microorganismes du sol (figure 3) et le nombre de la flore totale cultivable.
- La pré-colonisation de *G. banksii* déstabilise le fonctionnement et la structure de la flore symbiotique associée à ces deux essences natives (tableau 1).



Figure 2. Structure du système racinaire chez *G. banksii*

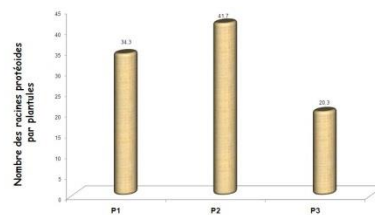


Figure 5. Nombre de racines protéoïdes

Tableau 1. Nombre de nodules et taux de mycorhization

	Nombre de nodule chez <i>D. trichocarpa</i> (Nb/plantule)	Taux d'endomycorhization chez <i>D. trichocarpa</i> (%)	Taux d'ectomycorhization chez <i>I. bijuga</i> (%)
P1	5	25	37
P2	1	0	13
P3	5	50	69

Conclusion

Les résultats illustrent l'aspect envahissant de *G. banksii* par sa capacité à former des racines protéoïdes surtout dans les conditions de sol pauvre en éléments nutritifs. Ces racines étant à l'origine d'une forte activité phosphatase au niveau du sol.

Une perturbation du fonctionnement de la microflore symbiotique et de ses microorganismes associés garant du bon développement des essences natives s'est produit suite à l'installation de *G. banksii*.

References

- Binggeli, P. 2003. Introduced and invasive plants. In Goodman, S.M. & Benstead, J.P. (Eds.), *The natural history of Madagascar*. Chicago press, London, pp 257-268.
- Carrière, S.M., Randrianasolo E., Hennenfent J. 2008. Aires protégées et lutte contre les bioinvasions : des objectifs antagonistes? Le cas de *Pinus caribaea* Sabine (Myrtaceae) autour du parc national de Banamafana. Vertigo, vol 8, 1: 1-14.
- Gilbert, G.A., Knight, T.D., Vance, C.T., Allen, S.E. 1999. Acid phosphatase activity in phosphorus-deficient white lupin roots. *Plant Cell Environ* 22, 801-810.
- Lambers, H., Shane, M.W., Cramer, M.D. 2006. Root structural and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Annals of Botany*, 98(4), 693-713.

METHODOLOGIE

Partie I:

Prélèvement d'échantillons de sol (3 parcelles)

Répartition des sols dans des pots en plastiques de 1l

Culture des plantules de *Grevillea banksii*

Evaluation des résultats après 4 mois :

- Description de la densité des racines protéoïdes
- Dénombrement de la microflore totale cultivable du sol
- Mesure des activités enzymatiques des sols (activité microbienne globale et activité des enzymes phosphatases)

Partie II:

Culture de *Dalbergia trichocarpa* et d'*Intsia bijuga* sur des sols pré-colonisés par *G. banksii*

Evaluation des résultats après 4 mois :

- Détermination du taux de mycorhization
- Dénombrement des nodules fixateurs d'azote

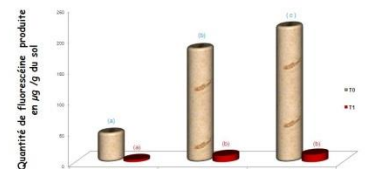


Figure 3. Activité microbienne globale des sols (hydrolyse de la fluorescéine diacétate) avant (To) et après (T1) l'installation de *G. banksii*

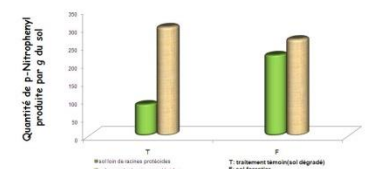


Figure 4. Activités des phosphatases acides du sol



Figure 6. Développement de *G. banksii* sur les sols des trois parcelles

Propagation of *Grevillea banksii* Affects the Dynamic of Mycorrhizal Fungi Communities Associated with Native Tree Species of Madagascar

Martial Doret Andrianandrasana^{1,2}, Rondro Harinisainana Baohanta², Herizo Randriambanona², Marson Raherimandimby¹, Damase Khasa³, Robin Duponnois⁴ and Heriniaina Ramanankierana²

1. Laboratoire de Biotechnologie-Microbiologie, Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Université d'Antananarivo, BP 906, Madagascar

2. Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, Département «Ecosystèmes terrestres», Centre National de Recherches sur l'Environnement, Antananarivo, BP 1739, Madagascar

3. Institut Biologique et Intégrative des Systèmes, Université Laval, Québec G1V0A6, Canada

4. Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 113 IRD/CIRAD/INRA/SupAgro/UM2 Campus International de Baillarguet, TA A-82/J, Montpellier, France

Received: April 17, 2014 / Accepted: May 15, 2014 / Published: June 30, 2014.

Abstract: Propagation of exotic plant species is found in many regions of Madagascar Island. This work aims to describe the impacts of the propagation of *Grevillea banksii* on soil microbial activities and on the regeneration of two native tree species (*Intsia bijuga* and *Dalbergia trichocarpa*) in the eastern part of Madagascar. The study was conducted within Ianjomara forest where some types of the vegetation are observed such as an area characterized by grassland (P1), by homogeneous population of *G. banksii* (P2) and by a natural forest composed mainly of *I. bijuga* or *D. trichocarpa* (P3 and P4). Structure of mycorrhizal fungi communities and associated microorganisms were described on soils from each study plot. The development of *I. bijuga* and *D. trichocarpa*, was evaluated 4 months after planting on P1, P2, P3, P4 soils formerly colonized by *G. banksii*. According to the nutrients availability on each soil type, the development of *G. banksii* was accompanied or not by a high formation of cluster roots. The authors' results also show that soil occupied by *G. banksii* decreased the global microbial and phosphatase activities of soil especially on soil within a high density of cluster roots. Moderately mycotrophic, *G. banksii* disturbs the structure and the dynamics of symbiotic microflora such as endomycorrhizal fungi (MA) and rhizobia associated with the two native tree species. The findings illustrate the negative impact of *G. banksii* propagation on the regeneration and the conservation of native tree species in Madagascan forest.

Key words: *Grevillea banksii*, invasive plant, microbial community, native tree species, cluster roots.

1. Introduction

In recent years, naturalization and invasion of alien plant species and their impacts on the conservation of Madagascan biodiversity have attracted the attention of many scientists [1, 2]. Indeed, the invasion of exotic species constitutes a serious threat to native ecosystems and economics [3], and is the second cause

of biodiversity losses after habitat destruction [4].

Recent studies have demonstrated that introduced species encounter less inhibitory effects of soil biota where they are introduced than in their home range [5-7]. They have the ability to modify soil physico-chemical characteristics and to disrupt at the same time the regeneration of native species [8-11]. Since *G. banksii* dominates the forest land in eastern part of Madagascar, it was thought that this exotic species could create a new structure and functioning

Corresponding author: Ramanankierana Heriniaina, research field: ecology of mycorrhizal symbiosis in tropical ecosystems. E-mail: naina.ramanankierana@yahoo.fr.

Propagation of *Grevillea banksii* Affects the Dynamic of Mycorrhizal Fungi Communities Associated with Native Tree Species of Madagascar

of soil microbial communities which become favorable for the propagation of the alien plant and inhibit the development of native plant species.

The main objective of this study is to describe the effects of *G. banksii* propagation on the structure and functioning of the soil mycorrhizal community and the symbiotic nitrogen-fixing bacteria on three plots where the vegetation cover is characterized respectively by grasslands, (P1), by homogeneous population of *G. banksii* (P2) and by natural forests of *Dalbergia trichocarpa* and *Intsia bijuga* (P3).

2. Materials and Methods

2.1. Field Site Description

The study was conducted within relics of natural forest situated in eastern part of Madagascar (19°07' S; 48°54' E). This forest formation is largely surrounded by *G. banksii* where the small cluster of natural forest consists of mixed *D. trichocarpa* and *I. bijuga* native stands. Study areas were selected among the surface areas where little anthropogenic disturbance occurred during at least the last five years. Different plots were identified on the basis of plant composition including a mixed population of *D. trichocarpa* and *I. bijuga*, an invaded area by *G. banksii* and a control area at forest edge devoid of forest plant species.

2.2. Greenhouse Experiment

Soil samples collected from each plot were sieved through a 2 mm mesh sieve and packed in 1 L plastic bags. Pots were arranged in a randomized complete block design with 30 replicates per soil type. Seeds of *G. banksii* were surface-sterilized by immersion in 70% ethanol and in sodium hypochlorite during 2 min and 20 min, respectively. They were then imbibed in sterile distilled water during 12 h and germinated on 1% agar. After 15 days of incubation at 30 °C, one pre-germinated seed was planted per pot. Seedlings were screened from the rain, grown under natural light (day length approximately 12 h, average daily temperature 25 °C) and watered three times a week

with tap water during 4 months of culture.

A second experiment was conducted on the same soil types after 4 months of *G. banksii* growth. In order to assess the growth of *D. trichocarpa* and *I. bijuga* on each soil type precolonized by *G. banksii* and within or without this alien plant, the authors developed a device scheme according to which each native plant species was planted alone or accompanied by the alien plant. After 4 months, the growth of the native plant and functioning of soil microbial communities were assessed.

2.3 Laboratory Analysis

2.3.1 Assessment of *G. banksii* development

After 4 months of culture, plants were harvested and the oven-dried mass (1 week at 65 °C) of shoot was measured. Their entire root system was washed under tap water and cluster roots per seedling of *G. banksii* were separated. The density of cluster roots was assessed by from the root system of each plant.

2.3.2 Mycorrhizal communities associated with each plant species

On each plant, the root system was gently washed, cleared and stained according to the method of Phillips and Hayman in 1970 [12]. The extent of mycorrhizal colonization was expressed as $[\frac{\text{the number of mycorrhizal root pieces}}{\text{total number of observed root pieces}}] \times 100$. The number of root nodules per plant was determined.

Numbers of ectomycorrhizal roots and non-ectomycorrhizal roots were determined under a stereomicroscope (magnification $\times 60$) for each root system to determine the percentage of ectomycorrhizal colonization (number of ectomycorrhizal short roots/total number of short roots). Remaining roots were oven-dried (1 week at 65 °C) and weighed.

2.3.3 Enzymatic activity of soils

Total microbial activity of each soil sample was measured before and after *G. banksii* cultivation by using the fluorescein diacetate (3',6',-diacetylfluorescein [FDA]) hydrolysis assay according to the method of

Propagation of *Grevillea banksii* Affects the Dynamic of Mycorrhizal Fungi Communities Associated with Native Tree Species of Madagascar

Alef in 1998 [13]. This enzymatic conversion released a final product that can be determined colorimetrically at 490 nm, after 1 h of soil incubation. Total microbial activity was expressed as μg of hydrolysis product corrected for background fluorescence per hour and per gram of soil.

Phosphatase activity of rhizospheric soils of cluster roots and no cluster roots was measured in acid condition by absorbance readings at 400 nm following the method of Kuperman and Carreiro in 1979 [14] with p-Nitrophenol Phosphate (p-NPP) as a substrate of the enzymatic reaction and p-Nitrophenol (p-NP) as a final product.

2.3.4 Description of microbial population structure

Rhizospheric soil of each plant species was separated and dried at room temperature (25 °C). Number of total cultivable flora was assessed on Tryptose Soy agar medium after multiple dilution of soil solution. Total number of cultivable flora was expressed as number of Colony Forming Unit (CFU) per g of dried soil.

2.4 Data Analyses

Data were analyzed with one-way ANOVA. Means were compared using the Newman-Keuls test ($P < 0.05$). Percentages of the mycorrhizal colonization were transformed by arcsin (sqrt) before the statistical analysis.

3. Results

3.1 Development and Description of the Symbiotic Status of *G. banksii*

After 4 months of development, seedlings of *G. banksii* were moderately endomycorrhized on the three types of soil. However, cluster roots were highly developed (Fig. 1) particularly on soils from P1 and P2 (Fig. 2).

Assessed by the shoot dry mass, the development of *G. banksii* was significantly higher on soil forest than on the two other soils where no significant difference was found (Fig. 3). However, seedlings of this alien

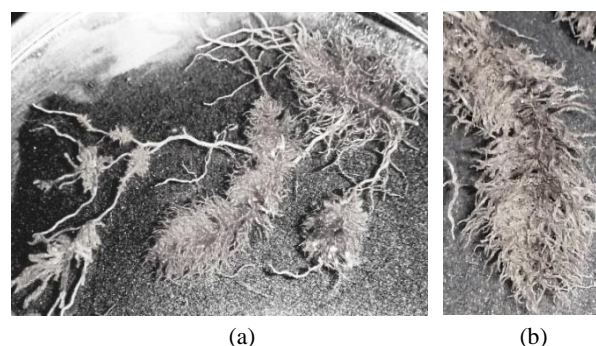
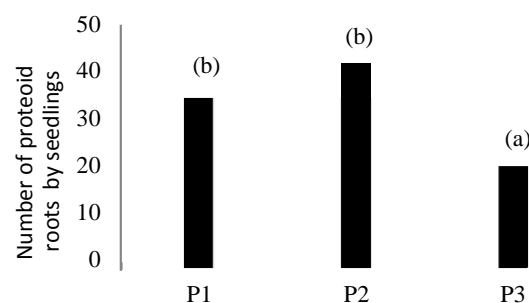


Fig. 1 Roots system of *G. banksii* (a), cluster roots of *G. banksii* (b).



P1: Vegetation cover characterized by grasslands (Control)

P2: Homogeneous population of *G. banksii*

P3: Natural forest with the two native plant species

Fig. 2 Number of cluster roots by seedlings of *G. banksii* under 3 types of soil (Means followed by the same letter are not significantly different according to the Newman-Keuls test ($p < 0.05$)).

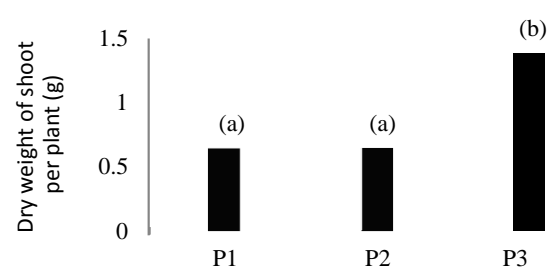
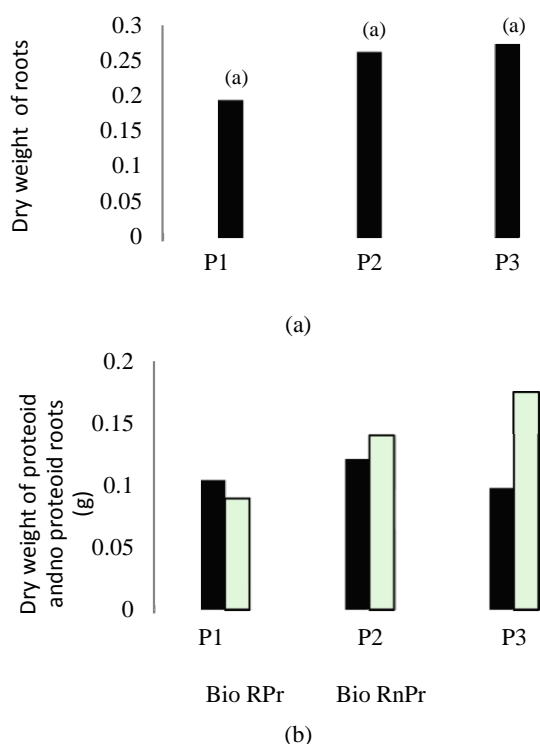


Fig. 3 Development of seedlings of *G. banksii* on three types of soil.

plant produced a similar root biomass on all three soil types (Fig. 4a).

The proportion of biomass cluster roots and non-cluster roots per seedling of *G. banksii* varied moderately depending on soil type. It was almost the same level in P1 and P2. However, development of cluster roots was stimulated more than 2 times compared to no cluster roots on soil from P3 (Fig. 4b).

Propagation of *Grevillea banksii* Affects the Dynamic of Mycorrhizal Fungi Communities Associated with Native Tree Species of Madagascar



Bio RPr: Biomass cluster roots
Bio RnPr: Biomass no cluster roots

Fig. 4 Root biomass of *G. banksii* on three soil types (a). Biomass of cluster roots and no cluster (b).

3.2 Soil Microbial Activities

After four months of soil colonization by *G. banksii*, total microbial activity has significantly decreased on all soil types. Between the three types of soil, the amount of fluorescein produced was significantly lower on the control soil (P1) compared to those observed on the other soil types (P2 and P3) (Fig. 5). Generally, the installation of the exotic plant strongly inhibited the total microbial activity.

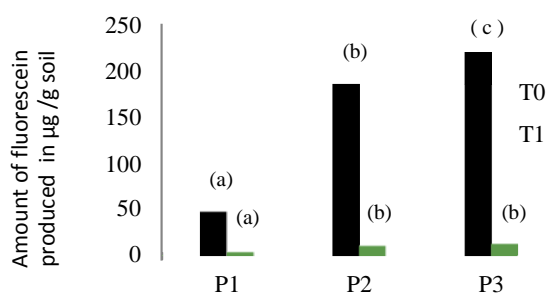


Fig. 5 Overall soil microbial activity (hydrolysis of fluorescein diacetate) before (To) and after the installation of *G. banksii* (T1).

Soil phosphatase activity was significantly higher on the forest soil (P3) than that recorded in the other two soil types (Fig. 6). After four months of colonization by *G. banksii*, this activity phosphatase was generally stimulated in the three soil types (Fig. 6). This stimulation was significantly higher on the soil adhering with cluster roots of *G. banksii*.

3.3. Number of Total Cultivable Microflora

At the beginning of the experiment, the number of total cultivable flora on each soil type was significantly lower on the forest soil compared to that recorded on the other two soil types (Fig. 7). The number of total cultivable microflora was not significantly modified by the colonization of land by *G. banksii* for the soil from colonized area by this plant and the control (Fig. 7). However, the propagation of this alien plant largely reduced the number of total cultivable microflora on soil from natural forest (P3).

3.4. Impacts of the Soil Colonisation by *G. banksii* on the Regeneration *D. trichocarpa* and *I. bijuga*

The shoot and the root growth of the seedling, the number of ECM morphotypes, the number of nodule per plant and the AM colonization rate of *D. trichocarpa* were significantly reduced by the colonization of soil by *G. banksii* (Table 1). On soil originally from colonized area by this alien plant, no structure of vesicular or arbuscular mycorrhize was

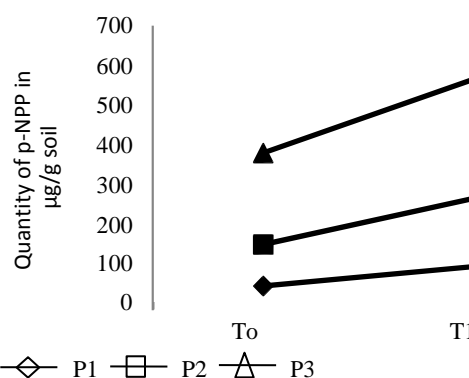
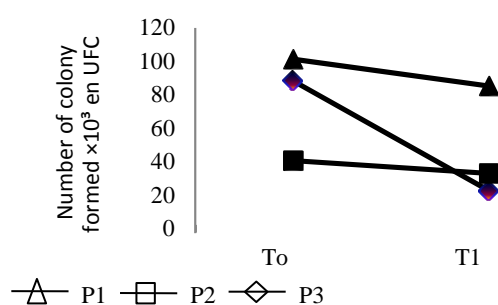


Fig. 6 Activity of soil phosphatase.

Propagation of *Grevillea banksii* Affects the Dynamic of Mycorrhizal Fungi Communities Associated with Native Tree Species of Madagascar



△ P1 □ P2 ◇ P3

To: Initial state

T1: After 4 months of culture *G. banksii*

Fig. 7 Enumeration of total cultivable flora before (To) and after the installation of *G. banksii* (T1).

Table 1 Nodule number and mycorrhizal rate on root system of *Dalbergia trichocarpa* and *Intsia bijuga*.

	Number of nodules in <i>D. trichocarpa</i> (Nb / seedling)	Endomycorrhizal rates in <i>D. trichocarpa</i> (%)	Ectomycorrhizal rates in <i>I. bijuga</i> (%)
P1	5	25	37
P2	1	0	13
P3	5	50	69

found on root system of seedling. However, the soil colonization by *G. banksii* modified slightly the mycorrhizal rate (ECM and VAM) of seedling on forest soil (P3).

4. Discussion

The results of this study show that *G. banksii*, a plant species moderately mycotrophic, develops a high density of cluster roots in order to satisfy its nutrients needs on native ecosystems. The density of cluster roots varies considerably within the level of soil degradation and/or the composition of plant cover. The naturalization and invasion of this exotic plant has led to a high degree of disturbance on Malagasy forest ecosystems.

Some authors have already shown that development of invasive plants is better than that of native plant species in ecosystems with high nutrient availability [15-17]. On the first hand, the results of this study indicate that *G. banksii* grows within the forest landed in eastern part of Madagascar. On the other hand this exotic plant was also able to grow on degraded environment through the development of cluster roots

that help the nutrition of the plant. This mechanism makes this alien plant more competitive than the native plants in low nutrient availability condition.

In addition, the propagation of the invasive plant induces profound changes in the development and the activity of soil microbial communities. It has been demonstrated that the disturbance can inhibit the development of soil symbiotic microorganism communities [18, 19]. The authors' results clearly demonstrate that *G. banksii* does disturb the development of these groups of soil microorganisms and the formation of symbiosis such as arbuscular mycorrhizal, ECM and nitrogen fixing symbioses with native plant species. These results corroborate the previous observations of Stinson et al. in 2006 [20] who documented that the invasive plant *Alliaria petiolata* inhibits the growth of native tree seedlings through interference with the soil biota.

5. Conclusions

The authors' results illustrate the pervasive characteristic of *G. banksii* by its ability to form cluster roots, especially in conditions of poor soil nutrients. These root types are surrounded by a high phosphatase activity. The development of these root types induces a strong disturbance within the functioning and the structure of symbiotic microflora communities and its associated microorganisms. This situation constitutes a real threat for the regeneration of Malagasy native plant species and the conservation of Madagascarian biodiversity.

Acknowledgments

The authors acknowledge the International Foundation for Sciences which supported financially this work through research grant accorded to Martial Doret ANDRIANANDRASANA as well as NSERC Discovery (DPK).

References

- [1] Binggeli, P. 2003. "Introduced and Invasive Plants." In *The natural history of Madagascar*, edited by Goodman, S. M. & Benstead, J. P., London: Chicago press.

Propagation of *Grevillea banksii* Affects the Dynamic of Mycorrhizal Fungi Communities Associated with Native Tree Species of Madagascar

- [2] Carrière, S. M., Randrianasolo, E., and Hennenfent, J. 2008. "Aires protégées et lutte contre les bioinvasions: des objectifs antagonistes?", Le cas de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) autour du parc national de Ranomafana." *Vertigo* 8: 1-14.
- [3] Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, J., Simmonds, C., O'Connell, C., Wong, E., Russel, L., Zern, J., Aquino, T., and Tsomondo, T. 2002. *Economic and Environmental Threats of Alien Plant, Animal and Microbe Invasions*, edited by Pimentel D., London: CRC Press.
- [4] Vitousek, P. M., D'Antonio, C. M., Loope, L. L., Rejmanek, M., and Westbrooks, R. 1997. "Introduced species: A significant component of human-caused global change." *New Zealand Journal of Ecology* 21: 1-16.
- [5] Callaway, R. M., Thelen, G. C., Rodriguez, A., and Holben, W. E. 2004. "Soil biota and exotic plant invasion." *Nature* 427: 731-733.
- [6] Hierro, J. L., Maron, J. L., and Callaway, R. M. 2005. "A biogeographical approach to plant invasions: The importance of studying exotics in their introduced and native range." *Journal of Ecology* 93: 5-15.
- [7] Grunsvan, R. H. A. Van, Putten, W. H. van der, Bezemer, T. M., Berendse, F., and Veenendaal, E. M. 2010. "Plant-soil interactions in the expansion and native range of a poleward shifting plant species." *Glob Change Biol.* 16: 380-385.
- [8] Pimentel, D., Lach, L., Zuniga, R., and Morrison, D. 2000. "Environmental and economic cost of non indigenous species in the United States." *Bioscience* 50: 53-65.
- [9] Cabin, R. J., Weller, S. G., Lorence, D. H., Cordell, S., Hadway, L. J., Montgomery, R., Goo, D., and Urakami, A. 2002. "Effects of light, alien grass and native species additions on Hawaiian dry forest restoration." *Ecological Applications* 12: 1595-1610.
- [10] CBD [Convention on Biological Diversity], Invasive Alien Species, Convention on Biological Diversity, (2006), Accessed December 17, 2012. <http://www.biodiv.org/programmes/cross-cutting/alien/>.
- [11] Meiners, S. J. 2007. "Apparent competition: An impact of exotic shrub invasion on tree regeneration." *Biological Invasions* 9: 849-855.
- [12] Phillips, J. M., and Hayman, D. S. 1970. "Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment if infections." *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- [13] Alef, K. 1998. "Estimation of the Hydrolysis of Fluorescein Diacetate." In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, edited by Alef K., and Nannipieri P., London: Academic Press.
- [14] Kuperman, R. G., and Carreiro, M. M. 1979. "Relationships between soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem." *Soil Biol. Biochem.* 29: 179-190.
- [15] Burke, M. J. W., Grime, J. P. 1996. "An experimental study of plant community invisibility." *Ecology* 77: 776-790.
- [16] Wedin, D. A., and Tilman, D. 1996. "Influence of nitrogen loading and species composition on the carbon balance of grasslands." *Science* 274: 1720-1723.
- [17] Dukes, J. S., and Mooney, H. A. 1999. "Does global change increase the success of biological invaders?" *Trends in Ecology & Evolution* 274: 135-139.
- [18] Vincent, J. M., 1970. *A manual for the pratical study of root-nodule bacteria*, International Biological Programme, Handbook N15, Blackwell, Oxford. UK.
- [19] Smith, S. E., and Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis, 2nd edition*, San Diego: Academic Press.
- [20] Stinson, K. A., Campbell, S. A., Powell, J. R., Wolfe, B. E, Callaway, R. M., Thelen, G. C., Hallett, S. G., Prati, D., and Klironomos, J. N. 2006. "Invasive plant suppresses the growth of native tree seedlings by disrupting belowground mutualisms." *Plos. Biol.* 4: 727-731.

DES CHAMPIGNONS SYMBIOTIQUES CONTRE LA DESERTIFICATION

ECOSYSTEMES MEDITERRANEENS, TROPICAUX ET INSULAIRES

Editeurs scientifiques

**ROBIN DUPONNOIS^{1,2,4}, MOHAMED HAFIDI², IBRAHIMA NDOYE^{3,4},
HERINIAIRANA RAMANANKIERANA⁵, AMADOU M. BÂ^{1,4}**

¹ IRD. UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/AGRO-M/UM2. Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes (LSTM). Campus international de Baillarguet, Montpellier. France.

² Laboratoire Écologie & Environnement (Unité associée au CNRST, URAC 32). Faculté des sciences Semlalia. Université Cadi Ayyad. Marrakech. Maroc.

³ Université Cheikh Anta Diop. Département de Biologie végétale. Dakar. Sénégal.

⁴ IRD. Laboratoire commun de microbiologie IRD/ISRA/UCAD. Centre de recherche de Bel Air. BP 1386. Dakar. Sénégal.

⁵ Laboratoire de microbiologie de l'environnement. Centre national de recherches sur l'environnement. BP 1739. Antananarivo. Madagascar.

IRD Editions

INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT

Marseille, 2013

PARTIE 3

SYMBIOSE MYCORHIZIENNE ET ECOSYSTEMES INSULAIRES

CHAPITRE 1

**SYMBIOSE MYCORHIZIENNE ET ECOSYSTEMES
INSULAIRES**

EXEMPLES D'ETUDES REALISEES A MADAGASCAR

**COMMUNAUTES MYCORHIZIENNES : STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT SELON
L'ETAT DE DEGRADATION DES ECOSYSTEMES FORESTIERS DU HAUT PLATEAU
ET DE LA RÉGION EST DE MADAGASCAR**

Par Ramanankierana H.¹, Randriambanona H.¹, Baohanta R. H.^{1, 2}, Sanon A.³,
Andrianandrasana D. M.², Rajaonarimamy E.², Duponnois R.⁴

¹ Laboratoire de microbiologie de l'environnement. Centre national de recherches sur l'environnement. Antananarivo. Madagascar

² Laboratoire de biotechnologie. Microbiologie, département de Biochimie fondamentale et appliquée. Université d'Antananarivo, Madagascar

³ IRD. Laboratoire commun de microbiologie IRD/Isra/Ucad. Centre de recherche de Bel Air. Dakar. Sénégal

⁴ IRD. UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/AGRO-M/UM2. Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM). Campus International de Baillarguet. Montpellier. France.

1. INTRODUCTION

Madagascar est classé parmi les pays qualifiés de « hottest-hotspots » de biodiversité (Myers *et al.*, 2000 ; Mittermeier *et al.*, 2004) grâce à son taux d'endémisme avoisinant 80 % pour la faune et la flore (Goodman et Benstead, 2003). Durant ces dernières années, une vitesse alarmante de dégradation de la couverture forestière menace cette diversité unique au monde. Entre 2000 et 2005, la Grande Île a perdu 236 560 ha de forêts avec un taux de déforestation de 0,53 % par an (MEFT, USAID et CI, 2009). Vers la fin de l'année 2005, la couverture forestière malgache n'était plus que de 9 216 617 ha (Rasolohery *et al.*, 2007), soit 15 % du territoire.

Depuis plusieurs décennies, la majorité des études sur la forêt et les écosystèmes forestiers sont focalisées essentiellement sur l'inventaire biologique à Madagascar (Goodman et Razafindratsita, 2001 ; Rakotondrainibe, 2002 ; Phillipson *et al.*, 2006). Peu d'études traitent ainsi le fonctionnement et la dynamique des écosystèmes impliquant les microorganismes du sol. Particulièrement pour les champignons mycorrhiziens, bien que leur présence au sein de la flore de Madagascar ait déjà été signalée (Heims, 1937 ; Ducouso *et al.*, 2004), les travaux de recherche visant à comprendre l'implication de ces microorganismes symbiotiques dans la conservation des ressources forestières malgaches n'ont commencé que vers les années 2000 (Ramanankierana *et al.*, 2007 ; Ducouso *et al.*, 2008). Pourtant, il a déjà été clairement démontré que la gestion de la symbiose ectomycorhizienne associée aux espèces forestières indigènes, grâce à son impact sur le développement de la plante hôte et sur certaines caractéristiques physico-chimiques du sol pourrait faciliter la recolonisation du milieu par ces arbres et ainsi, outre la préservation d'essences ligneuses surexploitées, réhabiliter ces sols dégradés (Duponnois *et al.*, 2001, 2005 ; Founoune *et al.*, 2002).

Ce chapitre se propose de présenter les principaux résultats obtenus à Madagascar relatifs (i) à la description du statut symbiotique des espèces d'arbres et d'arbustes natives de la région orientale et centrale de Madagascar, (ii) à l'importance des arbustes ectotrophes (*Leptolaena bojeriana* et *Sarcolaena oblongifolia* F. Gérard) sur la régénération des espèces ligneuses endémiques des hauts plateaux malgaches, (iii) aux impacts de la prolifération d'une espèce exotique *Grevillea banksii* sur le fonctionnement des symbiotes fongiques associés à *Dalbergia trichocarpa*, un arbre de valeur socio-économique et environnementale endémique malgache.

2. LES ECOSYSTEMES FORESTIERS ETUDIES

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus dans deux types d'écosystèmes forestiers malgaches situés respectivement sur le haut plateau et dans la forêt orientale de basse altitude.

Les hauts plateaux malgaches sont caractérisés par une grande étendue de formations herbeuses, classifiée par Humbert et Cours Darne (1965), de savane et de savane arborée. À part quelques lambeaux forestiers souvent isolés dans des endroits loin des habitations, les forêts naturelles y sont rares. Par contre, des formations forestières naturelles restent encore éparpillées dans différents endroits de la partie orientale de Madagascar. Toutes ces catégories de forêts naturelles subissent pourtant des pressions d'origine différente dont les plus connus proviennent des activités humaines (feux de brousse, culture sur abatis brûlis, exploitation illicite des arbres...).

2.1. LA FORET SCLEROPHYLLE A TAPIA DU HAUT PLATEAU MALGACHE

C'est une forêt basse sclérophylle des pentes occidentales (Humbert et Cours Darne, 1965). Elle couvre une superficie de 1 319 km², une surface qui a diminué de 43 % depuis les années 1970 (Moat et Smith, 2007). Cette formation forestière est localisée sur les pentes occidentales des hauts plateaux sur une altitude de 800 à 1 300 m où la saison sèche dure jusqu'à sept mois. Elle repose sur du grès et du socle avec gneiss, quartzite, schiste.

Cette formation végétale présente une canopée sempervirente d'une hauteur de 6 à 10 m constituée par *Uapaca bojeri* (Euphorbiaceae) avec un sous-bois constitué de buissons éricoïdes (*Erica* aff. *gracilis*, *E. cryptoclada* (Baker) Dorr & E.G.H. Oliv., *Erica trichoclada* Guthrie & Bolus) et une strate herbacée dominée par des graminées (*Aristida rufescens* Steud., *Sporobolus festivus* Hochst. ex A. Rich.). L'*Uapaca bojeri*, appelé localement *tapia*, est l'espèce ligneuse dominante de la strate arborée. Cette essence ligneuse endémique de Madagascar joue un rôle socio-économique important dans cette zone étant donné qu'elle fournit des graines comestibles et des bois de chauffe à pouvoir calorifique élevé et qu'elle fait partie des rares plantes hôtes du ver à soie (*Boroceras madagascariensis*).

Selon la répartition de deux espèces arbustives ectotrophes [*Leptolaena bojeriana* (Bail.) cavaco et *Sarcolaena oblongifolia* F. Gérard] dominantes de la forêt, deux endroits ont fait l'objet de cette étude. En effet, *L. bojeriana* est dominante dans la strate arbustive de la partie nord de la forêt, tandis qu'elle est remplacée par *S. oblongifolia* dans la partie centrale et centre-sud.

La forêt de tapia étudiée est située à 50 km à l'ouest d'Antananarivo, dans la commune rurale d'Arivonimamo II (S 19° 00' 15'', E 47° 07' 00'', 1 279 m). Cette commune a une superficie de 312 km² et est couverte à 8 % de forêts de tapia, soit sur 2 500 ha environ (Randrianarisoa *et al.*, 2008). Des communautés de base ont été créées en 2000 afin de protéger la forêt. Mais la menace pèse toujours sur cette forêt à cause de diverses pressions anthropiques telles que la collecte de bois d'œuvre, la fabrication de charbon...

2.2. LA FORET ORIENTALE

Les forêts littorales sont situées à moins de 800 m d'altitude sur la côte est de Madagascar. Elles sont sous l'influence de l'alizé austral qui souffle en permanence et déverse des masses d'eau abondantes sur la côte orientale durant toute l'année. De ce fait, cette région ne compte aucun mois sec. Moat et Smith (2007) rapportent que ces forêts littorales sont les plus touchées par la déforestation ayant perdu 22,5 % de sa superficie depuis les années 1970. La conversion de la forêt en terres agricoles par la culture sur brûlis est la principale cause de cette déforestation. Or cet écosystème forestier recèle beaucoup d'espèces endémiques de valeur telles que *Dalbergia trichocarpa* Baker (Fabaceae), une espèce de palissandre caractérisée par la qualité de son bois ; *Intsia bijuga* (Colebr.) Kuntze (Fabaceae), une espèce utilisée à différentes fins (construction de case et de pirogue...).

L'étude a été menée dans la forêt littorale d'Ianjomara (S 19° 07' 59,5'', E 48° 54' 51,4'', 86 m) située à 200 km à l'est d'Antananarivo. Cette forêt est actuellement fragmentée. Mais les reliques forestières gardent encore la structure des forêts naturelles, avec plusieurs strates distinctes et des émergents comme *Dalbergia madagascariensis* Vatke, *Symphonia fasciculata* (Noronha ex Thouars) Vesque qui peuvent atteindre 12 m.

La forêt d'Analalava (S 17° 42' 30,4'', E 49° 27' 25'', 71 m) présente la même structure que celle d'Ianjomara. Elle porte les stigmates des anciennes activités anthropiques (culture sur brûlis, prélèvement de bois). *Ravenala madagascariensis* (Strelitzaceae) est l'espèce d'arbre la plus abondante.

3. ASSOCIATION MYCORHIZIENNE AU SEIN DES ESPECES D'ARBRES ET D'ARBUSTES DOMINANTES DE LA REGION ORIENTALE ET CENTRALE DE MADAGASCAR

3.1. APPROCHE D'ETUDE

La description du statut symbiotique des plantes a concerné toutes les espèces dominantes des trois types de formation forestière (Analalava et Ianjomara dans la partie est et Arivonimamo

dans la partie centrale de Madagascar). Afin de s'assurer de l'identité des échantillons, le prélèvement a été effectué selon la méthode de suivi racinaire dans des endroits les moins dégradés de chaque forêt durant la saison pluvieuse en décembre 2007, février 2008 et mars 2009. Pour chaque espèce de plante, 1 à 5 g de racines fines fraîches ont été prélevées et conservées dans un volume égal d'eau, d'éthanol et de glycérol pour des observations histologiques au laboratoire (Ducousso *et al.*, 2004). L'identification des plantes a été basée sur les caractères morphologiques de la tige, des feuilles et si possible des fruits en se référant aux herbiers de référence du parc botanique et zoologique de Tsimbazaza (Antananarivo).

Les échantillons de racines ont été préparés et colorés selon la méthode de Phillips et Hayman (1970) pour observer la présence de champignons mycorhiziens. Pour chaque échantillon, 30 fragments racinaires longs de 10 mm ont été examinés sous microscope. Les racines sont considérées MA dès qu'on observe des structures arbusculaires et/ou vésiculaires et/ou des fragments d'hyphes intracellulaires. Le degré d'infection des racines a été évalué selon quatre niveaux : ND lorsqu'on n'est pas arrivé à établir le statut symbiotique, faiblement mycorhizées ou (MA) lorsque seulement un à trois fragments racinaires présentent des structures arbusculaires, colonisées par MA (désigné sous le terme MA) pour les échantillons dont 4 à 29 fragments présentent des structures arbusculaires et MA+ pour les échantillons où les 30 fragments racinaires présentent des structures arbusculaires.

3.2. STATUT MYCORHIZIEN DES ESPECES D'ARBRES ET D'ARBUSTES DOMINANTES DE LA REGION ORIENTALE ET CENTRALE DE MADAGASCAR

Le statut mycorhizien des espèces d'arbres et arbustes dans les deux formations forestières de la partie orientale et la forêt sclérophylle du haut plateau de Madagascar est donné dans le tableau 1. Seulement quatre espèces (*Mascarenhasia arborescens* et *Tabernaemontana coffeoides* pour la forêt d'Analalava, *Landolphia* sp. et *Voacanga thouarsii* pour la forêt d'Ianjomara) n'ont présenté aucune structure mycorhizienne au niveau de leur système racinaire. Ces quatre espèces de plantes appartiennent toutes à la famille des Apocynaceae. Parmi les 111 espèces observées, 12 sont faiblement mycorhizées (MA), 62 espèces présentent des structures bien visibles de symbiose mycorhizienne à arbuscules, 27 espèces sont fortement mycorhizées et 6 sont associées à la fois avec des champignons mycorhiziens à arbuscules et des champignons ectomycorhiziens.

Dans la famille des Sarcolaenaceae, une famille botanique entièrement endémique de Madagascar, les données obtenues sur les trois espèces étudiées confirment les résultats de Ducousso *et al.* (2008) qui ont établi pour la première fois le statut symbiotique de cette

famille. En effet, ces trois espèces sont à la fois associées avec des champignons mycorhiziens à arbuscules et des champignons ectomycorhiziens.

Tableau 1. Statut symbiotique des espèces d'arbres et arbustes dominantes dans les trois sites d'étude : Analalava, Ianjomara et Arivonimamo

Espèces de plante	Famille	Sites	Statut symbiotique
<i>Amyrea</i> sp. (?)	Euphorbiaceae	Ana.	MA
<i>Anthostema madagascariense</i> Baill. (E)	Euphorbiaceae	Ana.	MA
<i>Breonia havilandiana</i> Homolle (?)	Rubiaceae	Ana.	MA
<i>Canarium madagascariense</i> Engl. (E)	Burseraceae	Ana.	MA
<i>Casearia nigrescens</i> Tul. (E)	Salicaceae	Ana.	MA
<i>Cynometra capuronii</i> Du Puy et R. Rabev. (E)	Fabaceae	Ana.	MA
<i>Clitoria lasciva</i> Bojer ex Benth. (E)	Fabaceae	Ana.	MA
<i>Colubrina</i> sp. (?)	Rhamnaceae	Ana.	MA
<i>Conchopetalum madagascariense</i> Radlk. (E)	Sapindaceae	Ana.	MA
<i>Croton lepidotus</i> Aug. DC. (E)	Euphorbiaceae	Ana.	MA+
<i>Cryptocarya acuminata</i> Schinz (?)	Lauraceae	Ana.	MA
<i>Dicoryphe</i> sp. (?)	Hamamelidaceae	Ana.	MA
<i>Dillenia triquetra</i> (Rottb.) Gilg (?)	Dilleniaceae	Ana.	MA
<i>Diospyros bernieri</i> Hiern (?)	Ebenaceae	Ana.	MA+
<i>Diospyros</i> sp. (?)	Ebenaceae	Ana.	MA+
<i>Dracaena reflexa</i> Lam. (n)	Asparagaceae	Ana.	MA+
<i>Dyopsis</i> sp. (?)	Arecaceae	Ana.	MA
<i>Ellipanthus madagascariensis</i> (G. Schellenb.) Capuron ex Keraudren (E)	Connaraceae	Ana.	MA
<i>Erythroxylum</i> sp. (?)	Erythroxylaceae	Ana.	MA+
<i>Eugenia louvelii</i> H. Perrier (?)	Myrtaceae	Ana.	MA+
<i>Fernelia</i> sp. (?)	Rubiaceae	Ana.	MA
<i>Ficus cocculifolia</i> Baker (n)	Moraceae	Ana.	MA+
<i>Ficus lutea</i> Vahl. (n)	Moraceae	Ana.	MA+
<i>Gaertnera macrostipula</i> Baker (?)	Rubiaceae	Ana.	MA
<i>Harungana madagascariensis</i> Lam. ex Poir. (?)	Hypericaceae	Ana.	MA+
<i>Homalium involucratum</i> (DC.) O. Hoffm. (E)	Salicaceae	Ana.	MA
<i>Landolphia nitens</i> Lassia (E)	Apocynaceae	Ana.	(MA) MA &
<i>Leptolaena multiflora</i> Thouars (E)	Sarcolaenaceae	Ana.	ECM MA+
<i>Macaranga cuspidata</i> Boivin ex Baill (?)	Euphorbiaceae	Ana.	
<i>Macphersonia madagascariensis</i> Blume (E)	Sapindaceae	Ana.	MA
<i>Malleastrum minutifoliolatum</i> J.-F. Leroy (E)	Meliaceae	Ana.	MA
<i>Mascarenhasia arborescens</i> A. DC. (n)	Apocynaceae	Ana.	ND
<i>Memecylon xiphophyllum</i> R. D. Stone (?)	Memecylaceae	Ana.	MA
<i>Nesogordonia macrophylla</i> Arènes (E)	Malvaceae	Ana.	MA
<i>Paropsia madagascariensis</i> (Mast.) H. Perrier (E)	Passifloraceae	Ana.	MA
<i>Psiadia</i> sp. (?)	Asteraceae	Ana.	MA+

<i>Psidium cattleianum</i> Sabine (n) (n)	Myrtaceae	Ana.	(MA)
<i>Psorospermum lanceolatum</i> (Choisy) Hochr. (E)	Hypericaceae	Ana.	MA
<i>Ravenala madagascariensis</i> Sonn. (E)	Strelitzaceae	Ana.	(MA)
<i>Ravenea julietiae</i> Beentje (E)	Arecaceae	Ana.	MA
<i>Rhodocolea racemosa</i> (Lam.) H. Perrier (E)	Bignoniaceae	Ana.	MA
<i>Rhopalocarpus thouarsianus</i> Baill. (E)	Sphaerosepalaceae	Ana.	MA
<i>Saldinia proboscidea</i> Hochr. (E)	Rubiaceae	Ana.	MA
<i>Suregada boiviniana</i> Baill. (?)	Euphorbiaceae	Ana.	MA
<i>Symphonia tanalensis</i> Jum. & H. Perrier (E)	Clusiaceae	Ana.	MA
<i>Syzygium emirnense</i> (Baker) Labat & G. E. Schatz (?)	Myrtaceae	Ana.	MA
<i>Tabernaemontana coffeoides</i> Bojer ex A. DC. (n)	Apocynaceae	Ana.	ND
<i>Tambourissa purpurea</i> (Tul.) A. DC. (E)	Monimiaceae	Ana.	MA
<i>Tina fulvinervis</i> Radlk. (E)	Sapindaceae	Ana.	MA
<i>Uapaca louvelii</i> Denis (E)	Euphorbiaceae	Ana.	MA & ECM
<i>Vepris</i> sp. (?)	Rutaceae	Ana.	MA
<i>Zanthoxylum tsihanimposa</i> H. Perrier (E)	Rutaceae	Ana.	MA
<i>Aphloia theiformis</i> (Vahl) Benn. (n)	<u>Aphloiaceae</u>	Ian.	MA+
<i>Aristida similis</i> Steud. (?)	Poaceae	Ian.	MA+
<i>Burasaia madagascariensis</i> DC. (E)	Menispermaceae	Ian.	MA
<i>Cinnamomum camphoratum</i> Blume (n)	Lauraceae	Ian.	MA+
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume (n)	Lauraceae	Ian.	MA+
<i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don (n)	Melastomataceae	Ian.	(MA)
<i>Colubrina decipiens</i> (Baill.) Capuron (n)	Rhamnaceae	Ian.	MA
<i>Commelina</i> sp. (?)	Commelicaceae	Ian.	MA+
<i>Dactyloctenium</i> sp. (?)	Poaceae	Ian.	MA
<i>Dalbergia madagascariensis</i> Vatke (E)	Fabaceae	Ian.	MA+
<i>Dombeya dolichophylla</i> Arènes (?)	Malvaceae	Ian.	MA
<i>Dracaena reflexa</i> Lam. (n)	<u>Asparagaceae</u>	Ian.	(MA)
<i>Dichapetalum leucosia</i> (Spreng.) Engl. (E)	Dichapetalaceae	Ian.	MA
<i>Dypsis</i> sp. (?)	Arecaceae	Ian.	(MA)
<i>Dypsis nodifera</i> Mart. (E)	Arecaceae	Ian.	(MA)
<i>Agelaea pentagyna</i> (Lam.) Baill. (?)	Connaraceae	Ian.	MA
<i>Gaertnera macrostipula</i> Baker (?)	Rubiaceae	Ian.	MA
<i>Gaertnera obovata</i> Baker (?)	Rubiaceae	Ian.	MA
<i>Grevillea banksii</i> R. Br. (n)	Proteaceae	Ian.	(MA)
<i>Harungana madagascariensis</i> Lam. Ex Poir.	Hypericaceae	Ian.	MA+
<i>Hugonia</i> sp. (?)	Linaceae	Ian.	MA
<i>Landolphia myrtifolia</i> (Poir.) Markgr. (E)	Apocynaceae	Ian.	MA
<i>Landolphia</i> sp. (?)	Apocynaceae	Ian.	ND
<i>Landolphia gummifera</i> (Poir.) K. Schum. (E)	Apocynaceae	Ian.	(MA)
<i>Macaranga cuspidata</i> Boivin ex Baill. (?)	<u>Euphorbiaceae</u>	Ian.	MA+
<i>Macarisia lanceolata</i> Baill. (?)	Rhizophoraceae	Ian.	MA
<i>Machaerina flexuosa</i> (Boeckeler) J. Kern (?)	<u>Cyperaceae</u>	Ian.	MA
<i>Macphersonia madagascariensis</i> Blume (E)	Sapindaceae	Ian.	MA
<i>Merremia tridentata</i> (L.) Hallier f. (n)	Convolvulaceae	Ian.	MA
<i>Noronhia emarginata</i> (Lam.) Thouars (E)	<u>Oleaceae</u>	Ian.	MA+

<i>Osmunda regalis</i> L. (?)	Osmondaceae	Ian.	MA
<i>Ouratea</i> sp. (?)	Ochnaceae	Ian.	MA
<i>Panicum luridum</i> Hack. (?)	Poaceae	Ian.	MA
<i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn. (n)	Phyllanthaceae	Ian.	(MA)
<i>Poupartia chapelieri</i> (Guillaumin) H. Perrier (E)	Anacardiaceae	Ian.	MA+
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine (n)	<u>Myrtaceae</u>	Ian.	(MA)
<i>Psorospermum fanerana</i> Baker (E)	Clusiaceae	Ian.	MA
<i>Ravenala madagascariensis</i> Sonn. (E)	Strelitzaceae	Ian.	(MA)
<i>Rubus</i> sp. (?)	Rosaceae	Ian.	MA+
<i>Sauvagesia erecta</i> L. (n)	Ochnaceae	Ian.	MA
<i>Scolopia maoulidae</i> S. Hul, Labat & O. Pascal (?)	Salicaceae	Ian.	MA
<i>Streblus dimepate</i> (Bureau) C. C. Berg (?)	Moraceae	Ian.	MA
<i>Symphonia fasciculata</i> (Noronha ex Thouars) Vesque (E)	Clusiaceae	Ian.	MA
<i>Tacca leontopetaloides</i> (L.) Kuntze (?)	Discoreaceae	Ian.	MA
<i>Trema orientalis</i> (L.) Blume (?)	<u>Cannabaceae</u>	Ian.	MA+
<i>Tristemma virusanum</i> Juss. (n)	Melastomataceae	Ian.	MA
<i>Trophis montana</i> (Leandri) C. C. Berg (?)	Moraceae	Ian.	MA
<i>Uapaca ferruginea</i> Baill. (E)	<u>Euphorbiaceae</u>	Ian.	MA & ECM
<i>Urena lobata</i> L. (n)	Malvaceae	Ian.	MA
<i>Voacanga thouarsii</i> Roem. & Schult. (n)	Apocynaceae	Ian.	ND
<i>Uapaca bojeri</i> L. (E)	Euphorbiaceae	Ariv	MA & ECM
<i>Leptolaena bojeriana</i> (E)	Sarcolaenaceae	Ariv	MA & ECM
<i>Trema</i> sp. (n)	Ulmaceae	Ariv	MA
<i>Aphloia theaeformis</i> (Vahl.) Benn. (n)	Flacourtiaceae	Ariv	MA+
<i>Rhus taratana</i> (Baker.) H. Perrier (n)	Anacardiaceae	Ariv	MA+
<i>Helychrysum rusillonii</i> Hochr. (?)	Asteraceae	Ariv	MA+
<i>Psiadia altissima</i> (D. C.) Drake. (?)	Asteraceae	Ariv	MA+
<i>Rubus apetalus</i> Poir. (n)	Rosaceae	Ariv	MA

(E) : endémique, (n) : non endémique, (?) : pas d'information, Sites : **Ana** : Analalava, **Ian.** : Ianjomara, **Ariv** : Arivonimamo, **AM** : mycorhize à arbuscules, **(MA)** : faiblement mycorhizé, **MA+** : fortement mycorhizé, **MA & ECM** : coexistence de mycorhize à arbuscule et d'ectomycorhize, **ND** : non déterminé.

Pour le genre africano-malgache *Uapaca*, les deux types de symbiose mycorhizienne ont été également observés en même temps au niveau des systèmes racinaires des trois espèces étudiées (*U. bojeri*, *U. louvelii*, *U. ferruginea*). Par ailleurs, nos résultats illustrent l'abondance de la structure mycorhizienne à arbuscule au sein de la flore malgache et plus particulièrement au niveau de la flore endémique. En effet, les 42 espèces étudiées et identifiées endémiques sont associées aux champignons mycorhiziens. De plus, les données rapportées dans cette partie qui concernent trois écosystèmes forestiers différents montrent que la plupart des espèces arbres et d'arbustes dans ces écosystèmes sont associées aux

champignons mycorhiziens. Ces résultats constituent ainsi une base solide des stratégies de conservation ou de gestion durable de la riche diversité floristique de Madagascar.

4. FACILITATION DE L'ÉTABLISSEMENT ET DU DÉVELOPPEMENT DES PLANTULES DE *UAPACA BOJERI* PAR LES ARBUSTES PIONNIERS DES ZONES DÉGRADÉES DU HAUT PLATEAU MALGACHE : IMPORTANCE DE LA SYMBIOSE ECTOMYCORHIZIENNE

L'établissement et le développement des plantules des essences forestières peuvent être inhibés ou stimulés par les espèces arbustives pionnières qui colonisent en premier lieu les zones dégradées et/ou perturbées par les espèces exotiques. Un cas de ces phénomènes a été observé dans l'écosystème de la forêt sclérophylle à *Uapaca bojeri* du haut plateau de Madagascar. En effet, deux espèces arbustives (*Sarcolaena oblongifolia* F. Gérard et *Leptolaena bojeriana* (Baill.) Cavaco) endémiques se sont montrées capables de favoriser le développement des plantules d'*U. bojeri* dans différents endroits de la forêt et surtout dans les zones dégradées ou anciennement envahies par *Eucalyptus camaldulensis* ou *Pinus Patula*. Dans ce phénomène de facilitation du développement des plantules, la communauté de champignons ectomycorhiziens hébergée par le système racinaire des deux arbustes a été fortement impliquée.

Les investigations ont été effectuées dans l'écosystème forestier d'Arivonimamo et d'Ambatofinandrahana où les deux arbustes cités ci-dessus sont respectivement dominants. L'objectif principal étant de décrire le comportement de ces deux espèces arbustives vis-à-vis à la fois des conditions pédoclimatiques des sols dégradés ou perturbés par la propagation des espèces exotiques et du développement des plantules d'*U. bojeri*. Deux dispositifs expérimentaux ont été ainsi établis.

4.1. EXPERIMENTATION (1) : PARTAGE DE SYMBIOTES ECTOMYCORHIZIENS ENTRE *S. OBLONGIFOLIA* ET *U. BOJERI* IN SITU

La communauté de champignons ectomycorhiziens associée à *U. bojeri* et à *S. oblongifolia* a été décrite en adoptant des critères morphologiques tels que la couleur du manteau, la ramification et la profondeur du réseau de hartig et des analyses moléculaires des représentants de chaque groupe morphologique ou morphotype. Le dispositif d'échantillonnage est donné par le tableau 2. Il s'agit de récolter des morphotypes d'ectomycorhize associés uniquement à *U. bojeri* ou *S. oblongifolia* dans un premier temps et des morphotypes associés aux deux plantes par la suite.

Tableau 2. Dispositif d'échantillonnage et diversité de champignons ectomycorhiziens au niveau du système racinaire d'*U. bojeri* et de *S. oblongifolia*

	Origines		
	<i>U. bojeri</i>	<i>S. oblongifolia</i>	Végétation mixte
Nombre d'échantillons de sol	5	5	5
Nombre de bouts racinaires ectomycorhizés	665	580	780
Nombre de types RFLP (Sans comparaison des sols)	38	46	53
Pourcentage des taxons* identifiés et partagés par les deux plantes hôtes (%)	60	58,33	76,92
Indice de diversité de Simpson	6,75	10,58	11,22
Indice d'information de Shannon-Wiener	0,87	1,05	1,07

*Les taxons ont été identifiés comme types RFLP en se basant sur la similarité de la région ITS par rapport aux séquences disponibles dans la banque de donnée GenBank.

Les échantillons, composés par le système racinaire de chaque plante prélevé avec le sol rhizosphérique, ont été collectés en décembre 2006 dans les trois microhabitats différents ci-après selon la composition de la plante hôte : (i) une population homogène d'*U. bojeri*, (ii) une population homogène de *S. oblongifolia* et (iii) une formation mixte des deux plantes ou des plantules d'*U. bojeri*. Pour chaque composition de plante hôte, cinq points de prélèvement ont été identifiés dans cinq endroits différents et chaque échantillon a été prélevé à l'aide d'une tarière de 10 cm de diamètre enfoncée à 30 cm de profondeur à partir de l'humus. Afin d'éviter le mélange des échantillons provenant de plantes hôtes différentes, l'indésirable plante hôte la plus proche est située à au moins 25 m du point de prélèvement. Pour la végétation mixte, l'échantillon a été prélevé avec une plantule d'*U. bojeri* poussant entre deux ou trois pieds de *S. oblongifolia*. Au total, 15 échantillons ont été prélevés et classés en trois groupes selon la composition de la plante hôte. Les critères morphologiques établis par Agerer (1987-1996) ont été adoptés pour grouper les bouts racinaires ectomycorhizés dans différents morphotypes. Ces critères concernent la structure et la couleur du manteau, la ramification des racines mycorhizées et les caractères des rhizomorphes. Trois ectomycorhizes ont été prélevées au hasard dans chaque morphotype pour des analyses RFLP en ciblant la région ITS de l'ADN mitochondrial du champignon et en utilisant les enzymes de restriction *HaeIII* et *HinfI*. Pour les échantillons provenant de la végétation mixte, l'identification de la plante hôte a été réalisée par séquençage du gène chloroplastique ribulose-biphosphate carboxylase (*rbcL*) selon la méthode de Käss et Wink (1997). La position taxonomique de chaque type RFLP identifié a été établie par séquençage de la même région ITS fongique.

Au total, 2 025 fragments de racines ectomycorhizées ont été récoltés et classés en 165 morphotypes d'ectomycorhizes à partir des 15 échantillons. Entreprises sur 496 ectomycorhizes, l'extraction d'ADN et l'analyse RFLP ont donné 137 types RFLP sans mélanger les échantillons (tabl. 2). Après comparaison des types RFLP de la même composition de plante hôte, 10 types RFLP ont été récoltés chez *U. bojeri*, 12 sur *S. oblongifolia* et 13 au niveau de la végétation mixte. Parmi ces différents types RFLP, 21 individus ont été identifiés en se basant sur la similarité de la séquence de la région ITS avec des séquences dans la GenBank (tabl. 3). Sauf pour un type RFLP identifié comme Thelephoroid mycorrhizal, les types RFLP ont été identifiés au niveau genre (3 types RFLP) ou au niveau espèce (17 types RFLP) (fig. 1). Au niveau genre, *Russula* a été le plus dominant avec 8 types RFLP suivi par *Bondarcevomyces* (5 types RFLP), *Scleroderma* (2 types RFLP) et *Amanita*, *Topinella* et *Tomentella* avec respectivement un type RFLP.

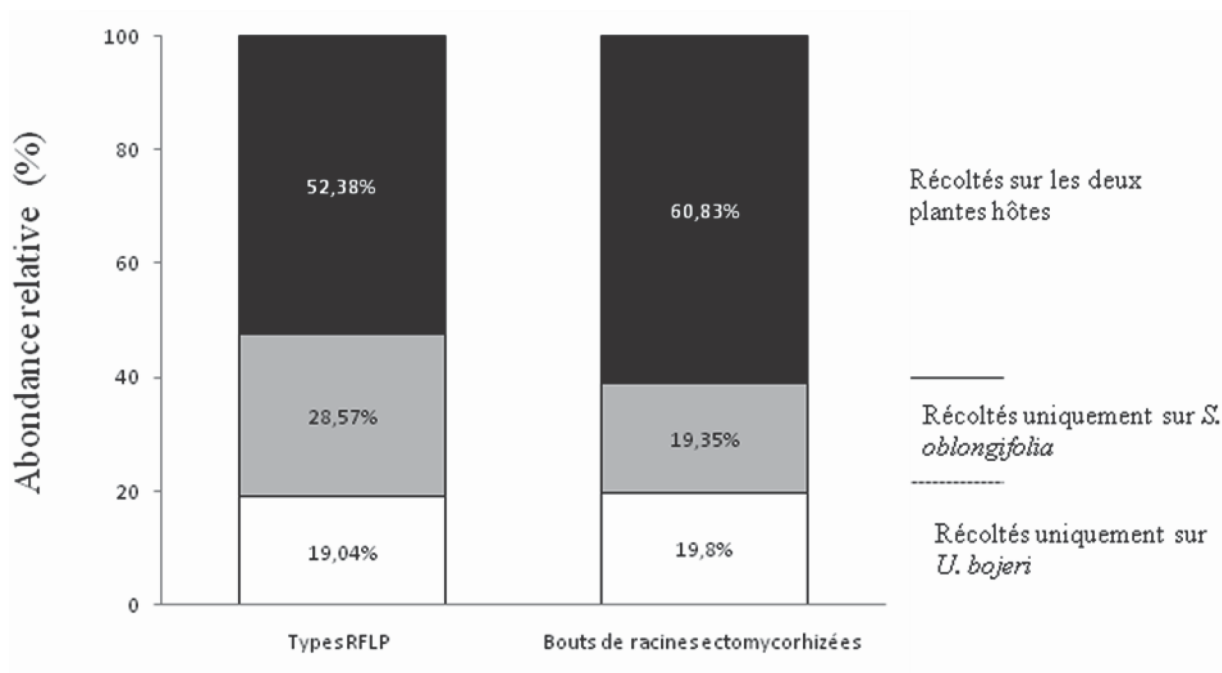
Tableau 3. Identification par séquençage de la région ITS des principaux types RFLP récoltés sur *U. bojeri* et/ou *S. oblongifolia*

Types RFLP	Espèce la plus proche au GenBank	Numéro d'accension au GenBank	Valeur attendue du BLAST	Plante hôte identifiée
Ja c	<i>Russula earlei</i>	AF518722	2e-142	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
Bl c	<i>Amanita</i> sp. C322	AM116759	0,0	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
Ja a	<i>Boletellus projectellus</i>	DQ534582	0,0	<i>U. bojeri</i>
Br a	<i>Bondarcevomyces taxi</i>	DQ534583	2e-169	<i>S. oblongifolia</i>
Mr d	<i>Bondarcevomyces taxi</i>	DQ534583	0,0	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
Mr e	<i>Bondarcevomyces taxi</i>	DQ534583	0,0	<i>S. oblongifolia</i>
Nr b	<i>Bondarcevomyces taxi</i>	DQ534583	0,0	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
Nr a	<i>Bondarcevomyces taxi</i>	DQ534583	0,0	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
Br b	<i>Boletellus projectellus</i>	DQ534582	0,0	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
Bl b	<i>Scleroderma dictyosporum</i>	AJ509787	2e-175	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
Bl a	<i>Scleroderma citrinum</i>	AF393149	2e-175	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
	<i>Tapinella panuoides</i>	DQ534594	2e-98	<i>S. oblongifolia</i>
Ja f	<i>Russula exalbicans</i>	AY293269	9e-167	<i>U. bojeri</i>
Mr c	<i>Russula fulvo-ochrascens</i>	AM117671	2e-169	<i>S. oblongifolia</i>
Ja b	<i>Russula earlei</i>	AF518722	9e-154	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
Ja d	<i>Russula earlei</i>	AF518722	7e-143	<i>U. bojeri</i>
Mr a	<i>Russula earlei</i>	AF518722	2e-144	<i>U. bojeri</i>
Bl d	<i>Russula</i> sp. C353gn	AM117670	2e-110	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>

Bl <i>e</i>	<i>Russula earlei</i>	AF518722	4e-158	<i>S. oblongifolia</i>
Mr <i>b</i>	<i>Tomentella</i> sp.	U86859	1e-152	<i>S. oblongifolia</i> & <i>U. bojeri</i>
Ja <i>g</i>	<i>Thelephoroid mycorrhizal</i> sp.	AJ509798	3e-154	<i>S. oblongifolia</i>

Plus de 52,38 % des types RFLP identifiés ont été associés à la fois avec les systèmes racinaires d'*U. bojeri* et *S. oblongifolia* (fig. 1). Les autres types RFLP restant ont été trouvés soit avec *U. bojeri* (19,04 %), soit avec *S. oblongifolia* (28,57 %). Au niveau de la diversité de symbiotes fongiques, l'arbuste *S. oblongifolia* et la végétation mixte ont présenté des indices de diversité de Simpson similaires. Par contre, cet indice de diversité a été faible pour *U. bojeri* suggérant que cet arbre héberge une communauté mycorhizienne moins riche en diversité en population homogène qu'en population mixte. Une similarité entre les trois compositions de plante hôte a été révélée par l'indice de diversité de Shannon-Wiener (tabl. 2).

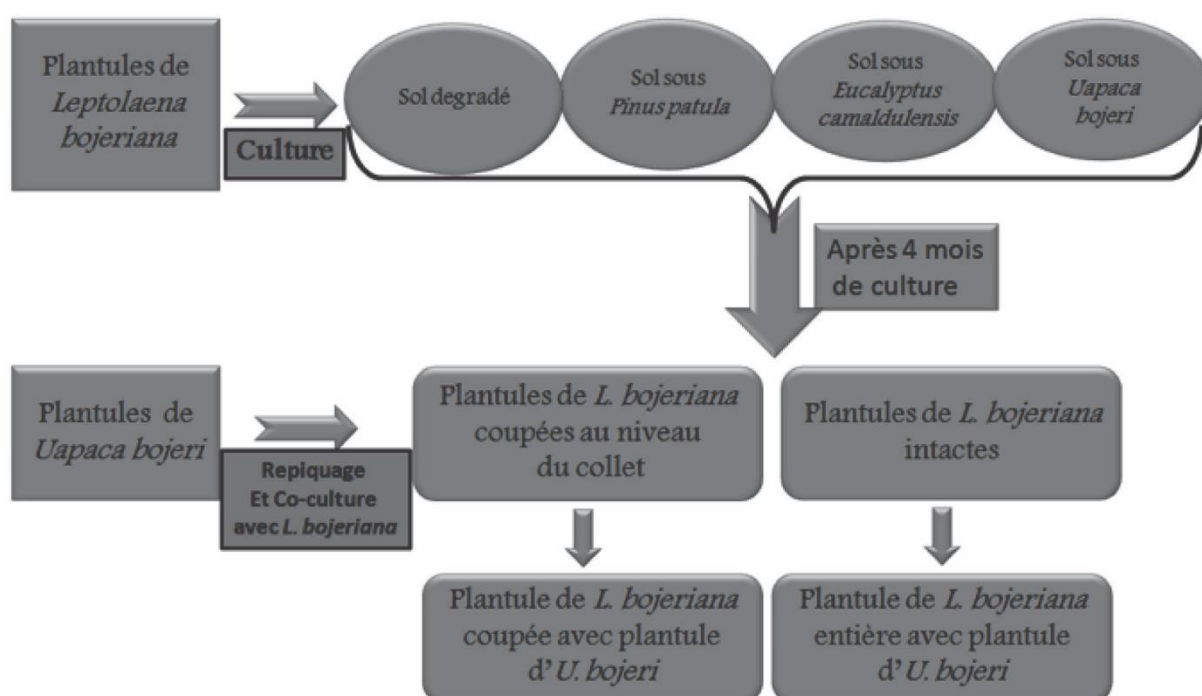
Figure 1. Distribution des symbiotes ectomycorhiziens entre *Uapaca bojeri* et *Sarcolaena oblongifolia* exprimés par le pourcentage de types RFLP et par le pourcentage du nombre total des bouts racinaires ectomycorhizés.



4.2. EXPERIMENTATION (2) : STIMULATION DU DEVELOPPEMENT DES PLANTULES DE *U. BOJERI* PAR DES SYMBIOTES ECTOMYCORHIZIENS FOURNIS PAR LES DEUX ESPECES ARBUSTIVES

Les échantillons de sol ont été prélevés dans la partie nord et centre-sud de la forêt sclérophylle à *U. bojeri* pour les expérimentations respectivement avec *L. bojeriana* et *S. oblongifolia*. Les expérimentations avec *L. bojeriana* ont été réalisées sur trois types de sol préconditionnés respectivement par *Eucalyptus camaldulensis*, *Pinus patula* et *U. bojeri*. Le sol témoin a été constitué par un sol dégradé prélevé en dehors de la forêt et sans influence des plantes ectotrophes. Après le développement de l'arbuste dans chaque type de sol pendant 4 mois, des graines prégermées d'*U. bojeri* y ont été repiquées en présence ou non de l'arbuste selon le dispositif expérimental donné par la figure 2. Les paramètres suivants ont été évalués après cinq mois de développement des plantes : biomasse aérienne et racinaire et taux d'ectomycorhization des plantules d'*U. bojeri*, activité microbienne globale et activité des enzymes phosphatasiques du sol. Au niveau du système racinaire des plantules, une étude comparative des morphotypes d'ectomycorhizes observés chez les plantules d'*U. bojeri* de chaque type de sol a été effectuée par séquençage de la région ITS de chaque type RFLP.

Figure 2. Dispositif expérimental de co-culture visant à décrire les impacts de *L. bojeriana* sur le développement des plantules d'*U. bojeri*, sur le fonctionnement de la communauté microbienne du sol.



Des expérimentations similaires ont été entreprises avec *S. oblongifolia* où les sols de culture ont été prélevés à différentes distances (0, 1, 5, 10 et 20 m) d'un pied adulte d'*U. bojeri* situé à la périphérie de la forêt. Le choix de ces points de prélèvement a été basé sur la variation de la composition du couvert végétal. En effet, les sols à 0 et à 1 m sont sous l'influence du pied adulte d'*U. bojeri*, tandis qu'à 5 et à 10 m, la couverture végétale est constituée par des touffes de *S. oblongifolia*. Cette couverture végétale est généralement transformée en prairie à 20 m de la périphérie de la forêt. Le sol témoin a été prélevé en dehors de la forêt et loin de toute autre végétation. Des graines prégermées d'*U. bojeri* ont été repiquées dans chaque type de sol à raison d'une graine par pot et 25 répétitions ont été établies par traitement. Les expérimentations ont été menées sous serre (arrosage 2 fois par semaine à l'aide de l'eau du robinet, photopériode 12 h, température environ 15 °C la nuit et 25 °C le jour). Le développement des plantules, le taux d'ectomycorhization et la diversité de communauté ectomycorhizienne associée aux plantules d'*U. bojeri* ont été évalués après cinq mois de culture dans chaque type de sol.

La précolonisation du sol par *L. bojeriana* suivie de la co-culture avec cet arbuste a eu beaucoup d'impacts sur le développement des plantules d'*U. bojeri*. En effet, le développement aérien des plantules d'*U. bojeri*, le taux d'ectomycorhization, la quantité d'azote et de phosphate minéral dans la partie aérienne des plantes sont tous significativement élevés par rapport à ceux enregistrés dans les traitements témoins (sans la pré-culture et la co-culture) dans tous les types de sols utilisés (tabl. 4). Particulièrement, la co-culture d'*U. bojeri* avec *L. bojeriana* dépourvue de sa partie aérienne a favorisé le développement des plantules de l'arbre et le taux de colonisation des racines par les champignons ectomycorhiziens. Des profondes modifications du fonctionnement de la communauté microbienne du sol ont également été enregistrées chez les traitements avec *L. bojeriana*. À l'exception du sol dégradé et du sol prélevé sous *U. bojeri* où l'activité des phosphatases alcalines a été similaire chez les trois traitements, la co-culture d'*U. bojeri* avec *L. bojeriana* a provoqué des augmentations significatives de l'activité microbienne globale et de l'activité des enzymes phosphatasiques du sol. Les résultats ont montré que ces activités microbiennes et enzymatiques ont été fortement affectées par le traitement avec *L. bojeriana* sans la partie aérienne.

Les mêmes tendances de résultats ont été obtenues avec *S. oblongifolia*. Le développement des plantules d'*U. bojeri* a été fortement stimulé sur le sol anciennement colonisé par l'arbuste *S. oblongifolia* (sol 5 et 10 m) (tabl. 5). Ce bon développement des plantules a été

accompagné par un taux d'ectomycorhization significativement élevé et un taux de mortalité faible (fig. 3) par rapport à ceux enregistrés sur les autres types de sol. Après cinq mois de culture, le nombre de plantules mortes diminue du sol prélevé à 5 m au sol témoin dans le sens : sol 5 m < sol 10 m < sol 1 m < sol 0 m < sol 20 m < sol témoin.

Au niveau de la composition des symbiotes ectomycorhiziens, une richesse taxonomique nettement plus élevée a été enregistrée chez les plantules d'*U. bojeri* du sol de 5 et 10 m par rapport aux plantules des autres types de sol. Tous ces résultats suggèrent que le partage de symbiotes fongiques entre les deux plantes, décrit lors de la première expérimentation, est à l'origine de cette facilitation de l'établissement et stimulation du développement des plantules d'*U. bojeri*. Ce phénomène de facilitation « plante-plante » par l'intermédiaire des symbiotes fongiques partagés a déjà été mentionné par certains auteurs qui ont travaillé dans des écosystèmes forestiers tempérés (Dickie *et al.*, 2004 ; Borchers et Perry, 1990 ; Horton *et al.*, 1999).

Figure 3. Taux de mortalité des plantules d'*Uapaca bojeri* sur des sols récoltés à différentes distances d'un pied adulte de cette plante après 5 mois de culture (● : témoin ; ▲ : sol prélevé à 20 m ; × : sol prélevé à 10 m ; ▲ : sol prélevé à 5 m ; ■ : sol prélevé à 1 m ; ◆ : sol prélevé à 0 m).

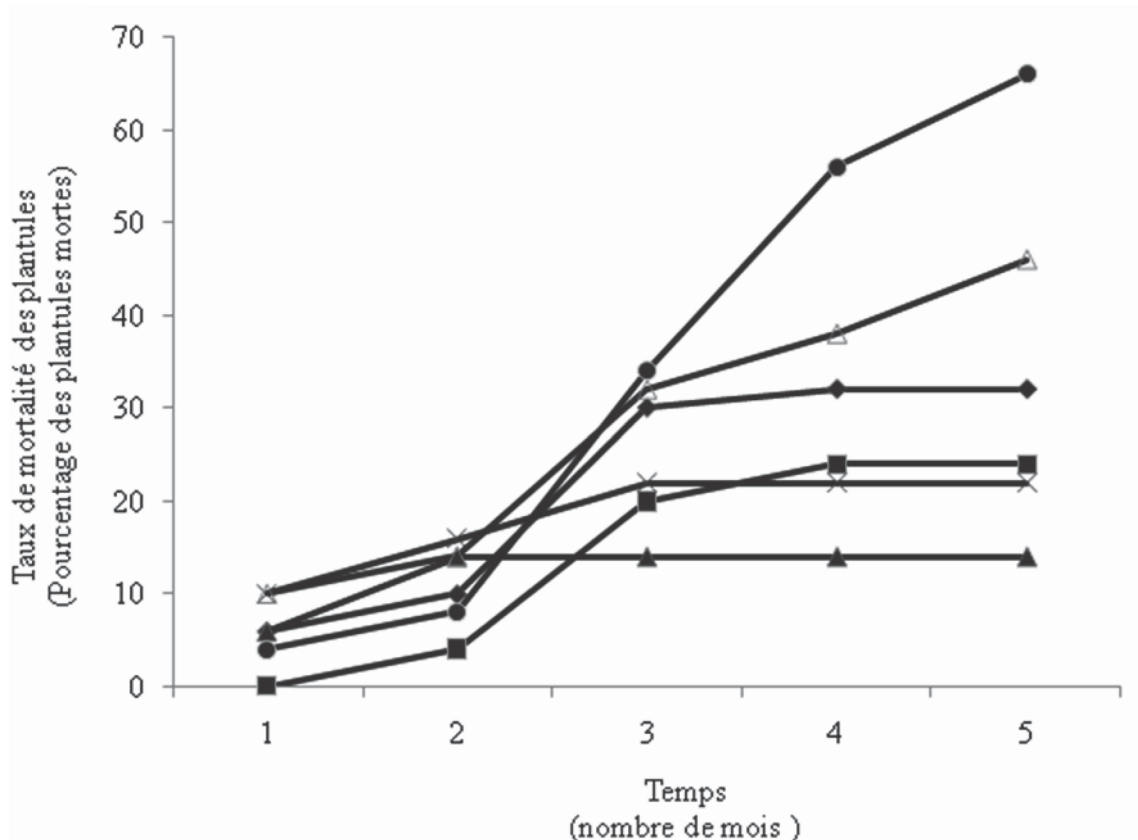


Tableau 4. Poids sec (en g) de la biomasse aérienne et racinaire et taux d'ectomycorhization d'*U. bojeri* sur les quatre types de sol avec ou sans la co-culture après cinq mois de culture

Traitements	BA ⁽⁴⁾	BR ⁽⁵⁾	RB : BA ⁽⁶⁾	N ⁽⁷⁾	P ⁽⁸⁾	ECM ⁽⁹⁾
Sol dégradé						
Témoin ⁽¹⁾	131 (11) ⁽¹⁰⁾ a ⁽¹¹⁾	113 (12) a	0,88 (0,13) b	0,89 (0,06) a	71,1 (7,3) a	36 (2,1) a
<i>L. bojeriana</i> ⁽²⁾	277 (11) b	140 (10) ab	0,51 (0,04) a	3,02 (0,12) b	253,4 (10,9) b	42 (6) a
<i>L. bojeriana</i> SA ⁽³⁾	309 (26) b	166 (3) b	0,55 (0,04) ab	3,08 (0,27) b	332,1 (29,1) b	90,3 (3,2) b
Sol d'<i>U. bojeri</i>						
Témoin	125 (15) a	295 (35) a	2,37 (0,16) b	0,85 (0,1) a	94,1 (9,9) a	73,7 (3,2) a
<i>L. bojeriana</i>	222 (38) ab	242 (38) a	1,21 (0,33) a	2,14 (0,32) b	197,7 (34,1) b	78 (2,1) a
<i>L. bojeriana</i> SA	332 (19) b	219 (39) a	0,67 (0,14) a	3,58 (0,19) c	303,9 (14,1) c	90,7 (2,4) b
Sol d'<i>E. camaldulensis</i>						
Témoin ⁽¹⁾	83 (0,9) a	27 (4) a	0,34 (0,08) a	0,65 (0,07) a	62,3 (7,3) a	16,3 (2,4) a
<i>L. bojeriana</i> ⁽²⁾	233 (41) b	99 (6) b	0,45 (0,09) a	2,30 (0,41) b	194,6 (35,5) b	65,3 (3,3) b
<i>L. bojeriana</i> SA ⁽³⁾	250 (42) b	129 (12) b	0,57 (0,17) a	3,17 (0,57) b	268,6 (44,9) b	79,3 (4,1) b
Sol de <i>P. patula</i>						
Témoin	85 (12) a	119 (10) a	1,42 (0,12) b	0,65 (0,09) a	58,9 (8,7) a	29,3 (5,5) a
<i>L. bojeriana</i>	233 (9) b	146 (27) a	0,62 (0,11) a	2,28 (0,10) b	181,3 (5,7) b	30,3 (2,4) a
<i>L. bojeriana</i> SA	333 (66) b	127 (7) a	0,41 (0,08) a	3,90 (0,78) b	278,1 (53,9) b	65,3 (1,5) b

⁽¹⁾ *U. bojeri* sans la pré-culture et la co-culture de *L. bojeriana*. ⁽²⁾ Précolonisation de *L. bojeriana* and co-culture avec des plantules de *L. bojeriana* avec la partie aérienne. ⁽³⁾ Précolonisation de *L. bojeriana* et co-culture avec des plantules de *L. bojeriana* sans la partie aérienne. ⁽⁴⁾ Biomasse aérienne (mg de poids sec). ⁽⁵⁾ Biomasse racinaire (mg de poids sec). ⁽⁶⁾ Rapport biomasse racinaire/biomasse aérienne. ⁽⁷⁾ Taux d'azote minéral dans les feuilles (mg par plante). ⁽⁸⁾ Taux de phosphate minéral dans les feuilles (mg par plante) ⁽⁹⁾ Pourcentage d'ectomycorhization (%). ⁽¹⁰⁾ Écart type par rapport à la moyenne. ⁽¹¹⁾ Les données dans la même colonne, pour chaque type de sol, suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls (p < 0,05).

Tableau 5. Développement et taux d'ectomycorhization des plantules d'*U. bojeri* après 5 mois de culture sur des sols prélevés à différentes distances d'un pied adulte de cette plante

		Distances à partir d'un pied adulte d' <i>U. bojeri</i>				
	Témoin	20 m	10 m	5 m	1 m	0 m
Développement des plantules						
Biomasse aérienne (mg par plante)	92 a ⁽¹⁾	120 a	313 c	335 c	199 b	183 b
Biomasse racinaire (mg par plante)	61 a	75 a	168 bc	211 c	128 b	137 b
Biomasse totale (mg par plante)	154 a	195 a	481 c	546 c	328 b	320 b
Rapport biomasse aérienne/racinaire	1,53 ab	1,65 ab	1,86 b	1,59 ab	1,64 ab	1,42 a
Nombre de bouts racinaires par mg de biomasse racinaire	0,83 b	0,73 b	0,51 ab	0,39 a	0,63 ab	0,49 a
Taux d'ectomycorhization (%)	3,19 a	5,88 ab	21,06 c	22,05 c	11,70 bc	10,49 bc
Diversité ectomycorhizienne						
Richesse taxonomique (exprimée comme types RFLP)	0,5 a	0,8 a	3 c	3,5 c	1,6 ab	2 b

⁽¹⁾ Les données dans la même ligne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Dans cette partie, il est clairement établi que la communauté de champignons ectomycorhiziens est fortement impliquée dans le phénomène de facilitation qui s'est déroulé entre deux espèces arbustives, d'une part et une espèce d'arbre toutes endémiques de Madagascar, d'autre part. Pourtant, il a également été signalé que les espèces arbustives qui colonisent en premier lieu les zones dégradées, contribuent à l'amélioration physico-chimique et biologique du sol (Aguilera *et al.*, 1999) ou à la stimulation de l'activité microbienne globale et de l'activité des phosphatases du sol (Gómez-Aparicio *et al.*, 2005a, b). Dans notre cas, l'espèce arbustive *L. bojeriana* a pu modifier les conditions pédoclimatiques des sols anciennement envahis par les espèces exotiques (*Eucalyptus* sp. et *Pinus patula*) au profit du développement des plantules d'*U. bojeri*. Ce qui fait de cet arbuste un candidat potentiel pour la restauration des sites envahis par les plantes exotiques et pour la plantation des arbres natifs. Dans ce sens, l'incompatibilité de symbiotes fongiques des plantes exotiques avec les espèces de plantes natives a déjà été démontrée (Saunders et Norton, 2001) et cette situation constitue souvent un handicap dans les programmes de plantation des essences natives.

5. FRAGILITE DE LA FLORE MALGACHE ET INVASION BIOLOGIQUE

L'invasion des plantes exotiques est actuellement responsable de la perte de biodiversité, de la réduction de la productivité et la dégradation des habitats naturels, le déplacement des plantes natives et l'altération du fonctionnement des écosystèmes (Simberloff, 2005 ; Masters et Sheley, 2001). Selon le MEED en 2004, l'introduction d'espèces allogènes est aujourd'hui considérée comme la deuxième cause directe de déséquilibre de la structure végétale au niveau mondial après la destruction de l'habitat. Les espèces invasives constituent dans le monde et plus particulièrement sur les îles une menace pour tous les composants d'un milieu, pour les processus à l'échelle de l'écosystème (Vitousek et Walker, 1989), elles peuvent également influencer la répartition spatiale de la biodiversité (Brown et Gurevitch, 2004) et modifier la structure des communautés végétales et animales (Gratton et Denno, 2005). La flore insulaire est donc fragile. Les causes cette fragilité sont d'ordre génétique et démographique : (i) elle relève en premier lieu de la séparation avec la population d'origine et de la colonisation par un certain nombre restreint d'individus ne possédant qu'une partie de la variabilité génétique, (ii) les espèces ont évolué dans un système fermé pendant plusieurs millions d'années en l'absence de sélection exercée par les prédateurs, les grands herbivores, les maladies ou les perturbations (incendie), en effet, elles ne possèdent pas un système d'adaptation élevé pour la compétition et résistent mal à l'entrée d'éléments nouveaux, (iii) la

petite superficie terrestre ne permet pas aux peuplements de s'étendre et de diversifier, il y a un grand risque d'extinction.

Madagascar n'est pas épargné par ce fléau mondial. Depuis quelques années les espèces envahissantes dans différents écosystèmes de la Grande Île commencent à attirer l'attention des scientifiques (Binggeli, 2003 ; Kull *et al.*, 2007 ; Carrière *et al.*, 2008). Ainsi, une liste de quelques espèces exotiques envahissantes (*Opuntia* sp., *Psidium cattleianum* Sabine, *Grevillea banksii* R. Br., *Lantana camara*...) qui menacent la flore malgache a été dressée par Binggeli (2003) dont certaines d'entre elles ont fait l'objet récemment d'études plus approfondies (Carrière *et al.*, 2008).

5. 1. PROPAGATION DE *GREVILLEA BANKSII* R. BR. ET SES IMPACTS SUR LA COMMUNAUTE DE CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS

5.1.1. DESCRIPTION DE LA STRUCTURE DE LA COMMUNAUTE DE CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS

À Madagascar, dans les années 1950, certains auteurs ont déjà signalé la menace d'invasion des espèces exotiques (Aubreville, 1953). Cependant, les risques liés à leurs caractères invasifs sur les ressources forestières endémiques n'ont pas été considérés. Cette partie décrit les impacts de la propagation de *G. banksii* dans la partie orientale de Madagascar sur le développement d'une essence forestière de cette zone, à savoir *D. trichocarpa*. Il est à rappeler que *G. banksii* (Proteaceae) est une espèce introduite qui figure dans la liste des espèces envahissantes à Madagascar, notamment sur la côte est (Binggeli, 2003). Dans différents endroits des zones envahies ou non par cet arbre exotique, la structure de la communauté de champignons mycorhiziens a été déterminée par la description morphologique et le dénombrement des spores, ainsi que par la mesure du nombre le plus probable de propagules. Les spores et les propagules de champignons mycorhiziens à arbuscule (CMA) ont été extraites à partir du sol rhizosphérique de *G. banksii* (prélevé dans la zone envahie par cette plante), du sol rhizosphérique de *D. trichocarpa* (sol forestier), une essence forestière native et du sol témoin (prélevé sous la prairie en dehors des formations forestières) selon la méthode de centrifugation sur saccharose (Sieverding, 1991). Les spores ont été dénombrées sous stéréomicroscope et groupées selon les caractéristiques morphologiques observées sous microscope optique. L'identification des spores jusqu'au niveau genre a été basée principalement sur leur taille et couleur, aspect du contour et la forme des hyphes (Walker, 1983 ; INVAM, 1997).

5.1.2. STRUCTURE DES COMMUNAUTES DE CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS DANS LE SOL SOUS L'INFLUENCE OU NON DE *G. BANKSII*

La structure des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules dans trois types de sols envahis ou non par *G. banksii* est présentée dans le tableau 6. Le nombre total de spores observées autour du système racinaire de *G. banksii* est significativement élevé par rapport à ceux enregistrés dans le sol témoin et le sol rhizosphérique de *D. trichocarpa* (tabl. 6). Par contre, aucune différence significative n'a été observée entre le nombre total de spores de CMA dans le sol témoin et le sol rhizosphérique de l'essence native. Trois genres de CMA (*Scutellospora*, *Glomus*, *Entrophospora*) ont été récoltés dans les trois types de sol (tabl. 6). Chaque type de sol présente chacun au moins un genre de CMA caractéristique en considérant la différence entre le nombre des spores de chaque genre. Le nombre de spores de *Scutellospora* est significativement élevé dans le sol rhizosphérique de *D. trichocarpa* et le sol rhizosphérique de *G. banksii* comparé à celui enregistré dans le sol témoin. Par contre, seul le sol rhizosphérique de *G. banksii* a présenté un nombre significativement élevé de spores de *Glomus* sp. par rapport aux deux autres types de sol. Le sol témoin est caractérisé par le genre *Entrophospora* dont le nombre de spores a été nettement élevé comparé à ceux observés dans les deux autres types de sol.

La tendance des résultats est totalement inversée pour le nombre de propagules de CMA dans les trois types de sol. En effet, le nombre de ces propagules observées dans le sol rhizosphérique de *D. trichocarpa* est de 6 fois et de 10 fois plus élevé par rapport à ceux enregistrés respectivement dans le sol rhizosphérique de *G. banksii* et le sol témoin (tabl. 6). Pour un gramme de sol sec, ce nombre a été de 28,54 (pour le sol forestier), de 4,497 (pour le sol rhizosphérique de *G. banksii*) et de 2,716 (pour le sol témoin).

Tableau 6. Abondance des spores et nombres les plus probables de propagules de CMA dans les sols envahis ou non par *G. banksii*

	Sol de la forêt	Sol sous <i>G. banksii</i>	Sol témoin
Nombre total des spores de CMA (g ⁻¹ de sol)	(*)6,110 a	9,906 b	3,533 a
<i>Scutellospora</i> sp. (%)	75,921 b	54,486 b	33,213 a
<i>Entrophospora</i> sp. (%)	19,1902a	16,255 a	54,56 b
<i>Glomus</i> spp. (%)	4,851a	29,257 b	12,225ab
NPP de propagules de CMA (g ⁻¹ de sol sec)	28,54 b	4,497 a	2,716 a

(*) Les données dans la même ligne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5.2. PROPAGATION DE *G. BANKSII* R. BR. ET SES IMPACTS SUR LE DEVELOPPEMENT DE *D. TRICHOCARPA*, UNE ESSENCE FORESTIERE ENDEMIQUE DE MADAGASCAR

5.2.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Les expérimentations ont été réalisées sur trois types de sols récoltés respectivement dans les 3 situations suivantes : sol de la forêt récolté sous des pieds adultes de *D. trichocarpa*, une des essences endémiques de la forêt (sol de la forêt), sol sous l'influence de *G. banksii* (sol sous *G. banksii*) et sol témoin récolté sous la prairie en dehors de la forêt. Dans chaque type de sol, 20 pots de 1 litre ont été préparés et des graines prégermées de *D. trichocarpa* y ont été plantées. Après quatre mois d'élevage en serre (photopériode 12 heures, température 14 °C la nuit et 25 °C le jour), 10 plantules ont été prélevées au hasard pour chaque type de sol. Le pourcentage de colonisation des racines par les CMA a été calculé pour au moins 100 morceaux de racines fines d'environ 2 cm de long préalablement colorées selon la méthode de Phillips et Hayman (1970) pour chaque plantule. Le taux de mycorhization pour chaque traitement est calculé selon la méthode de Plenchette (1983). Le développement des plantes a été évalué par la mesure de la biomasse aérienne et racinaire. Parallèlement, l'activité microbienne globale et l'activité des enzymes phosphatasiques ont été décrites pour chaque type de sol respectivement en suivant l'hydrolyse de la fluorescéine diacétate et du *p*-nitrophényl phosphate.

5.2.2. DEVELOPPEMENT DE *D. TRICHOCARPA* SUR LES SOLS ENVAHIS OU NON PAR *G. BANKSII*

La propagation de *G. banksii* a fortement inhibé le développement des plantules de *D. trichocarpa*. La quantité de biomasse totale de cette plante produite dans les trois types de sol varie dans le sens : sol de la forêt > sol témoin > sol sous *G. banksii* (tabl. 7). Au niveau du système racinaire des plantes, la même tendance a été observée concernant le nombre de nodules formés. Aucun nodule n'a été observé sur le système racinaire des plantules élevées sur le sol envahi par *G. banksii*. Travaillant sur d'autres espèces de plantes invasives (*Gmelina arborea* et *Eucalyptus camaldulensis*), des auteurs ont déjà signalé que la propagation de ces espèces inhibe le développement de la communauté microbienne endogène (Sanon *et al.*, 2009 ; Kisa *et al.*, 2007). Ce qui a été également confirmé par les résultats relatifs aux taux de mycorhization des plantules de *D. trichocarpa*. En effet, le pourcentage de racines mycorhizées des plantules de *D. trichocarpa* a été significativement plus élevé dans le sol de la forêt par rapport à ceux enregistrés dans le sol témoin et le sol anciennement envahi par la plante exotique.

Tableau 7. Activités enzymatiques et développement de *D. trichocarpa* sur des sols envahis ou non par *G. banksii*

	Sol de la forêt	Sol sous <i>G. banksii</i>	Sol témoin
Biomasse aérienne de <i>D. trichocarpa</i>	(*)0,12 b	0,05 a	0,07 ab
Biomasse racinaire de <i>D. trichocarpa</i>	0,04 a	0,04 a	0,04 a
Biomasse totale de <i>D. trichocarpa</i>	0,16 b	0,1 a	0,12 ab
Taux de nodulation de <i>D. trichocarpa</i> (nombre de nodules par plante)	2,71 b	0 a	2,66 b
Taux de mycorhization de <i>D. trichocarpa</i> (% de racines mycorhizées par plante)	54,66 b	23,33 a	17,03 a
Activité microbienne globale (μg de di acétate de fluorescéine hydrolysée $\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ de sol sec)	18,51 a	14,07 a	12,22 a
Activité de la phosphatase alcaline (μg de p-nitrophénol. $\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de sol sec)	44,84 a	63,01 a	99,04 b
Activité de la phosphatase acide (μg de p-nitrophénol. $\text{h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de sol sec)	127,30 b	85,317 a	110,95 b

(*) Les données dans la même ligne suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Entre le sol témoin et le sol envahi par *G. banksii*, le taux de mycorhization des plantules reste similaire avec une légère augmentation dans le sol de *G. banksii* bien que la différence ne soit pas significative. Globalement, la propagation de la plante exotique suivie de la plantation de *D. trichocarpa* n'a pas provoqué d'importante modification au niveau de l'activité microbienne du sol. Les activités microbiennes globales observées dans les trois types de sol ont été similaires après la culture de *D. trichocarpa*. Par contre, la précolonisation du sol par *G. banksii* a fortement inhibé l'activité des phosphatases alcalines. Sur ce dernier point, certains auteurs ont déjà mentionné que la propagation des plantes exotiques induit la réduction du Ph du sol et limite ainsi l'activité de certains enzymes du sol (Kourtev *et al.*, 2002a ; 2002b ; 2003 ; Ehrenfeld *et al.*, 2001).

6. DISCUSSION GENERALE

Les deux écorégions concernées, à savoir l'écorégion du Centre et l'écorégion de l'Est, sont parmi les plus diversifiées des écorégions de Madagascar. Parmi les composantes biologiques de ces écosystèmes, les microorganismes du sol et plus particulièrement les champignons mycorhiziens, sont fortement impliqués dans la dynamique et la conservation du couvert végétal. En effet, une grande diversité de champignons mycorhiziens sont associés avec des nombreuses espèces d'arbres forestiers de haute importance socio-économique et avec des espèces arbustives natives des écosystèmes étudiés. Par ailleurs, des formes d'interaction positive s'observent également entre les différentes espèces végétales qui coexistent, notamment entre les espèces arbustives et les espèces ligneuses qui semblent avoir des difficultés à s'adapter sur les milieux dégradés et/ou perturbés. Cependant, certaines espèces végétales peuvent avoir des impacts négatifs sur le fonctionnement biologique d'un écosystème comme c'est le cas de *Grevillea banksii*, une espèce d'arbre exotique envahissante dans la partie orientale de la Grande Île. La propagation de cette plante entraîne une réduction significative de la diversité et de l'efficacité des champignons mycorhiziens du sol au détriment des espèces autochtones dont le cycle de développement est principalement régi par la symbiose mycorhizienne (Ramanankierana *et al.*, 2007). En effet, les espèces végétales sont susceptibles de générer, *via* des « *feedbacks* » (rétroactions) positifs ou négatifs, des « niches écologiques » distinctes lors de leur développement. Ces niches écologiques générées peuvent soit favoriser la coexistence entre les espèces végétales (cas de *Uapaca bojeri* et de *Leptolaena bojeriana*), soit inhiber la croissance des autres espèces végétales et/ou à terme permettre la mise en place d'un peuplement végétal dominé par une seule espèce (cas des plantes invasives).

De ce fait, d'un côté la structure et le fonctionnement des communautés de champignons mycorhiziens dans le sol sont fortement reliés au type de végétation épigée et d'un autre côté, les espèces fongiques actives dans le sol influencent le cycle de développement des plantes et en même temps le bon déroulement de la succession végétale (Martineau et Saugier, 2006 ; Randriambanona, 2008). En effet, il y a le transfert ou le partage des symbiotes fongiques d'une plante à une autre qui tend à favoriser l'installation ou la régénération d'autres espèces végétales. Les espèces arbustives pionnières des zones dégradées sont parmi les principaux

acteurs en stimulant les microorganismes bénéfiques *via* l'amélioration de la qualité physico-chimique et microbiologique du sol (Pidwirny, 2006).

Il convient alors dans ce cas de gérer d'une manière rationnelle les communautés de champignons mycorhiziens dans leur milieu naturel et de favoriser des pratiques susceptibles de maintenir ou de restaurer le potentiel infectieux mycorhizogène des sols *via* la couverture végétale. La valorisation des plantes mycotrophes autochtones ou la technologie d'inoculation mycorhizienne est à prioriser afin d'éviter les risques d'invasion biologique par les espèces non endogènes. Dans ce sens, l'utilisation des espèces arbustives pionnières dans la restructuration des propriétés microbiologiques et chimiques du sol et dans la revégétalisation préliminaire des zones perturbées et/ou dégradées constitue une option intéressante. Cette technique pourrait être utilisée pour la conception de reboisements « multispécifiques », et permettrait d'éviter ainsi les problèmes issus des plantations « monospécifiques » ou l'appauvrissement des sols. Par la même occasion, elle augmenterait la diversité et l'hétérogénéité de la forêt restaurée et améliorerait aussi les processus de revégétalisation des zones dégradées.

7. REFERENCES

- Agerer, R. (1987-1996). Color atlas of ectomycorrhizae. Schwäbisch Gmünd: Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger
- Aguilera, L.E., Gutiérrez, J.R. & Meserve, P.L. (1999). Variation in soil micro-organisms and nutrients underneath and outside the canopy of *Adesmia bedwellii* (Papilionaceae) shrubs in arid coastal Chile following drought and above average rainfall. *Journal of Arid Environment*, 42(1): 61-70
- Aubreville, A. (1953). Il n'y aura pas de guerre de l'*Eucalyptus* à Madagascar. *Bois et Forêts des Tropiques*, 30: 3-7
- Binggeli, P. (2003). Introduced and invasive plants. In: Goodman SM, Benstead JP (ed). *The natural history of Madagascar*. The University of Chicago Press, Chicago, pp 257-268
- Borchers, S.L. & Perry, D.A. (1990). Growth and ectomycorrhiza formation of Douglas-fir seedlings grown in soils collected at different distances from pioneering hardwoods in southwest Oregon clear-cuts. *Canadian Journal of Forest Research*, 20:712-721
- Brown, K.A. & Gurevitch, J. (2004). Long term impacts of logging on forest diversity in Madagascar. *Proceeding of the National Academic Sciences USA*, 101:6045-6049

- Carrière, S.M., Randrianasolo, E. & Hennenfent, J. (2008). Aires protégées et lutte contre les bioinvasions : des objectifs antagonistes? Le cas de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) autour du parc national de Ranomafana à Madagascar. *Vertigo*, 8(1):1-14
- Dickie, I.A., Guza, R.C., Krazewski, S.E. & Reich, P.B. (2004). Shared ectomycorrhizal fungi between a herbaceous perennial (*Helianthemum bicknellii*) and oak (*Quercus*) seedlings. *New Phytologist*, 164: 375-382
- Ducousso, M., Béna, G., Bourgeois, C., Buyck, B., Eyssartier, G., Vincelette, M., Rabevohitra, R., Randrihasipara, L., Dreyfus, B. & Prin, Y. (2004). The last common ancestor of Sarcoleanaceae and Asian dipterocarp trees was ectomycorrhizal before the Indian – Madagascar separation, about 88 million years ago. *Molecular Ecology*, 13: 231-236
- Ducousso, M., Ramanankierana, H., Duponnois, R., Rabévoitra, R., Randrihasipara, L., Vincelette, M., Dreyfus, B. & Prin, Y. (2008). Mycorrhizal status of native trees and shrubs from eastern Madagascar littoral forests with special emphasis on one new ectomycorrhizal endemic family, the Asteropeiaceae. *New Phytologist*, 178: 233-238
- Duponnois, R., Founoune, H., Masse, D. & Pontanier, R. (2005). Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semi-arid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation. *Forest Ecology and Management*, 207: 351-362
- Duponnois, R., Plenchette, C. & Bâ, A.M. (2001). Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *Glomus aggregatum* in Senegal. *European Journal of Soil Biology*, 37: 181-186
- Ehrenfeld, J.G., Kourtev, P. & Huang, W. (2001). Changes in soil functions following invasions of exotic understory plant in deciduous forests. *Ecological Applications*, 11: 1287-1300
- Founoune, H., Duponnois, R., Bâ, A.M., Sall, S., Branget, I., Lorquin, J., Chotte, J.L. & Neyra, M. (2002). Evidence of Mycorrhization Helper Bacteria associated with the ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus albus* in West Africa. *New Phytologist*, 153: 81-90
- Gómez-Aparicio, L., Gómez, J.M., Zamora, R. & Boettinger, J.L. (2005a). Canopy vs. soil effects of shrubs facilitating tree seedlings in Mediterranean montane ecosystems. *Journal of Vegetation Sciences*, 16(2): 191-198

- Gómez-Aparicio, L., Valladares, F., Zamora, R. & Quero, J.L. (2005b) Response of tree seedlings to the abiotic heterogeneity generated by nurse shrubs: an experimental approach at different scales. *Ecography* 28:757-768
- Goodman, S.M. & Benstead, J.P. (2003). The natural history of Madagascar. The University of Chicago Press. Chicago
- Goodman, S.M. & Razafindratsita, V.R. (2001). Inventaire biologique du Parc National de Ranomafana et du couloir forestier qui la relie au Parc National d'Andringitra. Antananarivo, Madagascar, CIDST. Recherches pour le développement n°17
- Gratton, C. & Denno, R.F. (2005). Restoration of anthropoid assemblages in a *Spartina* salt marsh following removal of the invasive plant, *Phragmites australis*. *Restoration Ecology*, 13: 358-372
- Heims, R. (1937). Les Lactario-Russulées du domaine oriental de Madagascar. Prodrôme à une flore mycologique de Madagascar. Supplément de la revue de Mycologie. t.i. fasc.4. Paris
- Horton, T.R., Bruns, T.D. & Parker, V.T. (1999). Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. *Canadian Journal of Botany*, 77: 93-102
- Humbert, H. & Cours Darne, G. (1965). Note de la carte de Madagascar. Travaux de la section scientifique et technique de l'Institut français de Pondichéry, Hors série n°6
- INVAM (1997). [www:http://invam.caf.wvu.edu](http://invam.caf.wvu.edu)
- Käss, E. & Wink, M. (1997). Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and ncDNA (ITS1 and 2). *Molecular Phylogenetic Evolution*, 8: 65-88
- 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 Microbiology Ecology*, 62 (1): 32-44
- Kourtev, P.S., Ehrenfeld, J.G. & Haeghlom, M. (2002a). Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology*, 83(11): 3152-3166
- Kourtev, P.S., Ehrenfeld, J.G. & Huang, W.Z. (2002b). Enzyme activities during litter decomposition of two exotic and two native plant species in hardwood forests of New Jersey. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1207-1218

- Kourtev, P.S., Ehrenfeld, J.G. & Haggblom, M. (2003). Experimental analysis of the effect of exotic and native plant species on the structure and function of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 895-905
- Kull, C.A., Tassin, J. & Rangan, H. (2007). Multifunctional, Scrubby, and Invasive Forests? Wattles in the Highlands of Madagascar. *Mt Research and Development*, 27 (3): 224-231
- Martineau, Y. & Saugier, B. (2006). Comportement contre-intuitif d'un modèle mécaniste de succession végétale. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Biologie*, 329: 21-30
- Masters, R.A. & Sheley, R.L. (2001). Principles and practices for managing rangeland invasive plants. *Journal of Rangeland Management*, 54: 502-517
- MEDD (2004). Stratégie nationale pour la biodiversité : enjeux, finalités, orientations, Ministère de l'Ecologie et du développement Durable. République Française, Paris
- MEFT, USAID, CI (2009). Evolution de la couverture de forêts naturelles à Madagascar, 1990-2000-2005
- Mittermeier, R.A., Robles, G.P., Hoffmann, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C.G., Lamoreux, J. & Da Fonseca, GAB. (2004). Hotspots Revisited. Garza Garcia N.L. Mexico: CEMEX.)
- Moat, J. & Smith, P. (2007). Atlas de la végétation de Madagascar. Royal Botanic Garden, Kew, UK
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. (1970). Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55:158-161
- Phillipson, P.B. et al. (2006). A catalog of the vascular plants of Madagascar. In: Ghazanfar A, Beentje HJ (eds) *Taxonomy and ecology of African plants, their conservation and sustainable use. Proceedings of the 17th AETFAT Congress*, Addis Ababa, Ethiopia. Royal Botanical Gardens, Kew, pp 613-627
- Pidwirny, M. (2006). "Plant Succession". *Fundamentals of Physical Geography*, 2nd Edition
- Plenchette, C. (1983). Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil*, 70: 199-209
- Rakotondrainibe, F. (2002). Liste commentée des ptéridophytes de la Reserve Spéciale de Manongarivo, Madagascar. In: Gautier L et Goodman SM (eds) *Inventaire*

- floristique et faunistique de la Réserve spéciale de Manongarivo (NW Madagascar). Boissiera, 59: 81-104
- Ramanankierana, H., Ducousso, M., Rakotoarimanga, N., Prin, Y., Thioulouse, J., Randrianjohany, E., Ramaroson, L., Kisa, M., Galiana, A. & Duponnois, R. (2007). Arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas of *Uapaca bojeri* L (Euphorbiaceae): sporophore diversity, patterns of root colonisation, and effects on seedlings growth and soil microbial catabolic. Mycorrhiza, 17:195-208
- Randriambanona, H.A. (2008). Successions écologiques dans les plantations de Pinus, D'acacia et dans les forêts naturelles de la région Nord-Ouest du corridor de Fianarantsoa (Madagascar). Thèse de Doctorat en Sciences de la vie (Biologie et Ecologie Végétales). Faculté des Sciences Université d'Antananarivo Madagascar
- Randrianarisoa, A., Raharinaivosoa, E. & Kollf, H.E. (2008). Des effets de la gestion forestière par les communautés locales de base a Madagascar: Cas d'Arivonimamo et de Merikanjaka sur les Hautes Terres de Madagascar. Workshop on Forest Governance & Decentralization in Africa. 8-11 April 2008, Durban, South Africa
- Rasolohery, A., Steininger, M., Ramaroson, B., Ranaivosoa, R. & Razafindramanga, M. (2007) Madagascar, changement de la couverture des forêts naturelles 1990-2000-2005. Carte : 1/1300000. Minenvf & USAID, Madagascar
- Sanon, A., Béguiristain, T., Cébron, A., Berthelin, J., Ndoeye, I., Leyval, C., Sylla, S. & Duponnois, R. (2009). Changes in soil diversity and global activities following invasions of the exotic invasive plant, *Amaranthus viridis* L. decrease the growth of native sahelian Acacia species. FEMS Microbiology Ecology, 70:118-131
- Saunders, A. & Norton, D.A. (2001). Ecological restoration at Mainland Islands in New Zealand. Biological Conservation, 99(1) :109-119
- Scott, N.A., Tate, K.R., Ford, R.J., Giltrap, D.J. & Smith, C.T. (1999). Soil carbon storage in plantation forests and pastures: land-use change implications. Tellus Series B Chemical and Physical Meteorology, 51:326-335
- Sieverding (1991). Vesicular Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. GTZ, Eschborn, Germany
- Simberloff, D. (2005) Non-native species do threaten the natural environment. J Agric Environ Ethic 18:595-607
- Vitousek, P.M. & Walker, L.R. (1989). Biological invasion by *Myrica faya* in Hawaii: plant demography, nitrogen fixation, ecosystem effects. Ecological Monographs, 59: 247-265

Walker, C. (1983). Taxonomic concepts in the Endogonaceae. I. Spore wall characteristics in species description. *Mycotaxon*, 18: 443-445

RESUME

Structure et fonctionnement des communautés microbiennes du sol dans les zones influencées par une espèce invasive, *Grevillea banksii* R. Br: impacts sur la régénération de deux essences forestières autochtones à Madagascar

Certaines espèces végétales exotiques peuvent induire des modifications, bénéfiques ou non, au niveau du fonctionnement d'un écosystème au sein duquel elles s'installent du fait de leurs propriétés. L'objectif principal de cette étude était de décrire les impacts de l'occupation du sol par *Grevillea banksii* (Proteaceae), une plante exotique envahissante dans une zone située dans la partie Est de la Grande île en se focalisant sur la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol ainsi que le développement de deux essences ligneuses autochtones des forêts naturelles de cette zone à savoir *Intsia bijuga* et *Dalbergia trichocarpa*.

La composition floristique et les propriétés microbiologiques du sol de cette zone envahie par *G. banksii* a été décrite. Deux formations végétales se trouvant dans la même localité ont été considérées comme des témoins à savoir la forêt naturelle peu perturbée d'Ianjomara Vatomandry, et une formation de pseudo-steppe. Ensuite, les impacts de l'installation de *G. banksii* sur le fonctionnement de deux partenaires symbiotiques (champignons mycorhiziens et bactéries fixatrices d'azote) des deux espèces ligneuses autochtones ont été évalués en conditions contrôlées. Le phénomène inverse, c'est-à-dire les potentiels des symbiotes microbiens à influencer le développement des espèces autochtones sur le sol anciennement colonisé par l'espèce exotique, a été également étudié en sélectionnant des partenaires symbiotiques performants.

Les résultats ont montré que la zone occupée par *G. banksii* a été caractérisée par une faible diversité floristique (10 espèces) par rapport à la zone forestière (29 espèces). De même, la densité des communautés microbiennes du sol envahi par *G. banksii* et leurs activités ont été très faibles par rapport à celle enregistrée au niveau du sol forestier. Par ailleurs, l'invasivité de *G. banksii* a été favorisée par sa capacité à (i) modifier l'environnement biotique du milieu envahi, (ii) accaparer les éléments nutritifs, notamment le phosphore, en milieu pauvre grâce à la présence des racines protéoïdes dans leur système racinaire et (iii) exprimer des effets allélopathiques vis-à-vis des populations des rhizobia. En effet, une perturbation des associations symbiotiques (mycorhizienne et fixatrice d'azote) a été observée chez les deux essences autochtones cultivées sur le sol envahi par *G. banksii*. Cette perturbation s'est traduite principalement par un ralentissement, voire arrêt de la croissance chez les plantules. Cependant, l'inoculation des plants avec des isolats microbiens sélectionnés a permis de réduire significativement les effets négatifs de *G. banksii* sur la régénération de *I. bijuga* et de *D. trichocarpa*. Ces résultats suggèrent que la compréhension des caractères invasifs d'une espèce exotique envahissante permet de proposer des techniques d'atténuation correspondantes à leurs mécanismes d'invasion afin d'améliorer la conservation des espèces natives du milieu envahi.

Mots clés : Plantes invasives, *Grevillea banksii*, racines protéoïdes, champignons mycorhiziens, rhizobia, symbioses, activité microbienne du sol, essences autochtones.

Université d'Antananarivo, Madagascar

Directeurs de thèse: Pr RAHERIMANDIMBY Marson ; Pr Damase KHASA

ABSTRACT

Dynamic of soil microbial community in the ecosystem invaded by an alien plant species, *Grevillea banksii* R. Br: impacts on the regeneration of two Malagasy native tree species

Study was been conducted within an invaded zone located in the Eastern part of Madagascar. The aim was to describe the effects of the propagation of an exotic plant species *Grevillea banksii* on soil microbial functioning and on the development of two native tree species, *Intsia bijuga* and *Dalbergia trichocarpa*.

Floristic diversity and the dynamic of soil microbial community were described within the invaded zone. The controls were constituted by a natural forest with low disturbance and the grassland located near the invaded zone. The effects of the soil colonization by *G. banksii* on the establishment of the symbiotic associations (mycorrhizae and rhizobia) with two native plant species were studied under controlled conditions. Selected and efficient strains of these two microbial symbionts were then used to inoculate the soil previously occupied by *G. banksii*. Their ability to influence the development of *I. bijuga* and *D. trichocarpa* and the soil microbial properties was assessed.

The results showed that plots mainly colonized by *G. banksii* were characterized by low floristic diversity (10 species) compared to the natural forest containing 29 species. Density and functioning of soil microbial community in the invaded plots were also significantly low compared to the soil collected within the forest plot. Moreover, the invasiveness of *G. banksii* was enhanced by its ability to (i) change the biotic environment in the invaded areas; (ii) monopolize nutrient acquisition, especially phosphorus, by the presence of proteoid roots in their root system, and (iii) express allelopathic effects against rhizobia population. Indeed, for the two native plant species, the establishment of symbiotic associations was highly disturbed on soil previously occupied by the alien species. It was also observed that the development of native plantlets transplanted to soil previously colonized by *G. banksii* was lower compared to those cultivated on forest or grassland soils. However, plantlets inoculated with mycorrhizal fungi or with rhizobia or with mixed strains of these two symbionts were more adapted than uninoculated plantlets on *G. banksii* soil. These results suggest that it is possible to mitigate the negative effects of alien species by understanding the mechanisms that they used to invade and how native populations (plant and organisms) respond to this invasion.

Key words: Invasive plants, *Grevillea banksii*, proteoid roots, mycorrhizal fungi, rhizobia, symbiosis, soil microbial activity, native species.

University of Antananarivo, Madagascar

Directors of the thesis:

Pr RAHERIMANDIMBY Marson

Pr Damase KHASA