UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN SCIENCES DE LA VIE

Option: *BIOTECHNOLOGIES*

Structure et fonctionnement des champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules associés aux plantes pionnières de la forêt de Ranomafana-Est

Présenté par:

ANDRIATAHIANA Lantoniaina Eric

Maître ès Sciences

Soutenu publiquement le 18 Décembre 2015 devant la commission d'examen composée de:

Président : Professeur RALISON Charlotte

Examinateurs : Docteur RAMAROSON Roseline
Docteur RAMAMONJISOA Daniel

Rapporteurs : Docteur BAOHANTA Rondro Harinisainana
Docteur RANDRIAMBANONA Herizo Andrianantoandro

REMERCIEMENTS

Mes premières pensées vont à DIEU tout puissant, qui était toujours présent à nos cotés. Nous Lui rendons grâce d'avoir veillé sur nous tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Le présent travail a été réalisé grâce à une collaboration entre:

- Le Laboratoire de Biotechnologie-Microbiologie (Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo);
- Le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE (Centre National de Recherche sur l'Environnement).

Je remercie Madame le Docteur RANDRIANIERENANA Ando, Chef du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée de la Faculté des Sciences de m'avoir autorisé à soutenir cette mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master.

Je souhaite remercier tout particulièrement mes encadreurs, Madame le Docteur BAOHANTA Rondro Harinisainana, Chercheur au sein du Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE) et Monsieur le Docteur RANDRIAMBANONA Herizo Andrianantoandro, Chercheur au Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE), pour avoir dirigé ce travail, pour leur disponibilité malgré leurs nombreuses occupations et pour leurs conseils judicieux durant la réalisation de ce mémoire.

Je continuerai par la suite avec Madame le Professeur RALISON Charlotte, qui, malgré ses nombreuses responsabilités, nous fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Tous mes sincères remerciements à Madame le Docteur RAMAROSON Roseline et à Monsieur le Docteur RAMAMONJISOA Daniel qui ont aimablement accepté de juger nos travaux.

Toute ma gratitude s'adresse aussi:

- A Madame le Professeur REJO-FIENENA Felicitée, Directeur du Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE) et Monsieur le Docteur RASOLOMAMPIANINA Rado, Chef du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherche sur l'Environnement

(CNRE) de m'avoir accueilli et qui m'ont autorisé à effectuer mon stage au sein de leur institution.

- Au professeur RAMANANKIERANA Heriniaina, Chef du Département «Ecosystèmes terrestres» du Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE), pour le choix du sujet d'étude, pour sa disponibilité, et de m'avoir offert son expertise et tout les précieux conseils scientifiques qu'il nous a prodigués pour rendre possible ce travail.
- Au Docteur RAKOTOARIMANGA Nirina Christophe, Chercheur au Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE) qui ont grandement contribué au succès de ce travail.

Je n'oublie pas l'équipe du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME) du Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE) pour leur soutien et leur aide et avec qui je vivais un climat extrêmement chaleureux. Merci pour tout, et que vous réussissiez dans tout ce que vous faite!

Je profite de l'occasion pour remercier mes amis qui était toujours là pour moi.

Je tiens à exprimer mon éternelle gratitude à mes parents et toute ma famille pour m'avoir toujours soutenu et aidé en donnant tout les moyens nécessaires pour que je réussisse à mes études. Que Dieu soit avec vous tout le temps et vous bénisse!

Merci à tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire. Que la grâce de Dieu soit avec vous!

”Hanome saina anao sy hampianatra anao izay lalan-kalehanao Aho; hitsinjo anao ny masoko ka hanolo-tsaina anao Aho.”

Salamo 32: 8

Table des matières

GLOSSAIRE ..... ***i***

LISTE DES ABREVIATIONS ..... ***ii***

LISTE DE PHOTO ..... ***iii***

LISTE DES FIGURES ..... ***iii***

LISTE DES TABLEAUX ..... ***iii***

LISTE DES ANNEXES ..... ***iii***

INTRODUCTION ***1***

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ***4***

I. LE SOL et LA RHIZOSPHERE ***4***

I.1. Définitions *4*

I.1.a. Le sol *4*

I.1.b. La Rhizosphère *4*

I.2. Les microorganismes rhizosphériques *5*

II. LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE ***6***

II.1. Les mycorhizes à vésicules et arbuscules *6*

II.2. L'importance de la symbiose mycorhizienne à vésicules et arbuscules *7*

II.3. Cycle de vie des champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules *8*

III. LE CONCEPT DE COEXISTENCE VEGETALE ET LE PHENOMENE DE FACILITATION (Plante nurse) ***9***

III.1. La coexistence végétale *9*

III.2. La facilitation plante-plante ou phénomène de plante nurse *11*

III.3. Implication des espèces pionnières dans le processus de facilitation *12*

III.3.a. Caractéristiques des espèces pionnières *12*

III.3.b. Rôles des espèces pionnières *12*

IV. BIODISPONIBILITE DU PHOSPHORE DANS LE SOL ***12***

A. MATERIELS ***14***

A.I. PRESENTATION DU SITE D'ETUDE ***14***

A.II. MATERIELS D'ETUDES ***14***

A.II.1. Matériels végétaux *14*

A.II.1.a. Les plantes pionnières *14*

A.II.1.b. Le Sorgho *16*

A.II.2. Les échantillons de sol *16*

B. METHODOLOGIE ***16***

B.I. INVENTAIRE FLORISTIQUE ***16***

B.II. DESCRIPTION DU STATUT MYCORHIZIEN DES PLANTES ***17***

B.III. EVALUATION DU POTENTIEL INFECTIEUX MYCORHIZOGENE DES SOLS ***18***

B.III.1. Détermination de l'abondance et de la diversité morphologique des spores de champignons mycorhiziens *18*

B.III.2. Mesure de la longueur des hyphes extramatriciels *18*

B.III.3. Evaluation du Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM) du sol *19*

B.IV. MESURE DES ACTIVITES MICROBIENNES DU SOL ***21***

B.IV.1. Activité microbienne globale du sol *21*

B.IV.2. Activité des phosphatases du sol *21*

C. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES ***22***

RESULTATS ***23***

I. STATUT MYCORHIZIEN DES ESPECES D'ETUDE ***23***

II. POTENTIEL INFECTIEUX MYCORHIZOGENE DES SOLS ***23***

II.1. Abondance des spores de champignon mycorhiziens (MVA) *23*

II.2. Longueur des hyphes extramatriciels *24*

II.3. Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM) des sols *25*

III. ACTIVITE MICROBIENNE DES SOLS ***25***

III.1. Activité microbienne globale des sols mesurée par l'hydrolyse de la FDA *25*

III.2. Activités des enzymes phosphatasiques des sols *26*

DISCUSSION ***28***

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ***31***

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ***33***

ANNEXES ..... ***iv***

GLOSSAIRE

Biocénose: Ensemble des êtres vivants qui peuplent un écosystème donné. Elle se compose de trois groupes écologiques fondamentaux d'organismes: les producteurs (végétaux), les consommateurs (animaux), et les décomposeurs (bactéries, champignons, etc.).

Communauté épigée: ensemble de tout ce qui croît au-dessus du sol.

Communauté hypogée: ensemble de tout ce qui se développe sous terre.

Espèces rudérales: des plantes qui poussent spontanément dans les friches, les décombres le long des chemins, souvent à proximité des lieux habités par l'homme.

Hôte: individu qui héberge un parasite ou un symbiote dont il a investi les tissus. Dans le cas des champignons parasites l'hôte est toujours spolié. Dans le cas des symbioses fongiques ou bactériennes, il y a association avec l'hôte.

Hyphe: Filament de champignon; élément constitutif de la formation morphologique de base chez les êtres vivants.

Jachère: état d'une parcelle de terre entre la récolte et le moment de la mise en place de la culture suivante.

Microbiote: ensemble des microorganismes peuplant un milieu de vie bien défini.

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

Propagules: organes de champignons capables d'établir une symbiose avec les racines des plantes (spores, fragments racinaires, hyphes mycéliens).

Phénomène de facilitation: la capacité d'une plante à favoriser le développement et l'établissement d'une autre plante.

Spore: cellule isolée, ou amas pluricellulaire pouvant contribuer, en germant, à la propagation d'une espèce par la voie végétative.

LISTE DES ABREVIATIONS

CMVA: Champignons Mycorhiziens à Vésicules et à Arbuscules

CNRE: Centre National de Recherches sur l'Environnement

FDA: Fluorescéine Di Acétate

LME: Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement

m/g: mètre par gramme

MVA: Mycorhize à Vésicules et à Arbuscules

NPP: Nombre Probable de Propagule

PIM: Potentiel Infectieux Mycorhizogène du sol

p-NPP: para Nitrophénylphosphate

LISTE DE PHOTO

Photo 1: Observation microscopique de racines endomycorhizées 7
Photo 2: Solanum torvum 15
Photo 3: Urena lobata 15
Photo 4: Clidemia hirta 15
Photo 5: Conyza sumatrensis 15

LISTE DES FIGURES

Figure 1: *Cycle de vie du champignon endomycorhizien (Source: Godfroy, 2008)* 9
Figure 2: *Densité des spores selon les types de sol rhyzosphérique.* 24
Figure 3: *Moyenne de la longueur des hyphes selon les types de sol rhyzosphérique.*..... 24
Figure 4: *Activité microbienne globale des sols sous les quatre plantes pionnières* 26
Figure 5: *Quantité des produits d'hydrolyse du phosphate en milieu acide et alcaline* 27

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Proportion des mélanges de sable stérilisés et de sols non stérilisés pour l'évaluation du Nombre le Plus Probable de propagule (NPP) dans le sol..... 20
Tableau 2: Statut mycorhizien des espèces 23
Tableau 3: Nombre le Plus Probable de propagules dans chaque type de sol 25

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Classification des plantes à étudier..... iv
Annexe 2: Classification du Sorgho iv
Annexe 3: Moyenne (±ET) des fréquences des 8 espèces pionnières dans la zone d'étude. plantes étudiées.* v
Annexe 4: Calcul du nombre le plus probable de propagule..... vi
Annexe 5: Composition de la gamme étalon préparée à partir d'une solution standard de fluorescéine..... vii
Annexe 6: Classement de pourcentage de mycorhization selon Ganon et al. (1991) vii
Annexe 7: Préparation de la solution tampon potassium phosphate vii
Annexe 8: Résultats globales..... viii

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plantes sont soumises à deux contraintes majeures pour leur développement: la lumière et la disponibilité des nutriments et de l'eau dans le sol (Besserer, 2008). De ce fait, l'adaptation est devenue un comportement indispensable, notamment pour les plantes qui poussent en milieux arides et semi-arides ou encore pour celles qui poussent dans les zones fortement perturbées par les activités humaines étant donné que le sol, très pauvre en éléments nutritifs au niveau de ces zones, peut s'avérer inhospitalier pour la plupart des espèces végétales (Bohnert *et al.,* 1995). Les associations symbiotiques avec des microorganismes bénéfiques y sont donc très courant en ne citant que les symbioses mycorhiziennes ou la symbiose rhizobienne (Lambers *et al.*, 2008). La facilitation de l'accès aux éléments nutritifs majeurs tels que le phosphore et l'azote ainsi que l'eau sont les principales raisons d'être de ces associations (Duponnois *et al*., 2005). En effet, de nombreux travaux de recherche ont montré que les champignons mycorhiziens peuvent explorer le sol jusqu'à une profondeur ou une distance assez élevée pour puiser des nutriments tout en étant capables de mobiliser les éléments peu mobiles incorporés dans les complexes du sol (Plenchette, 1982; Gobat *et al*., 2003).

Clements (1916) a proposé l'un des premiers concepts de succession basé sur le fait que les espèces présentes à chaque étape de succession modifient le milieu de telle sorte qu'il devient plus favorable à d'autres espèces qui vont s'installer. Ainsi, il existe certaines espèces végétales comme les espèces pionnières qui sont capables de s'adapter aux conditions extrêmes (zones fortement dégradées suite à des catastrophes naturelles ou des activités anthropiques) et de s'y s'établir (Bellingham *et al.,* 2001). Elles créent par la même occasion des microclimats qui leur sont propres mais qui sont susceptibles d'être bénéfiques à d'autres espèces qui vont leur succéder (Baohanta, 2011). Ce phénomène couramment appelé facilitation plante-plante existe naturellement dans la nature au même titre que les compétitions ou les neutralismes (Dormann et Brooker, 2002). Il est connu comme étant l'un des phénomènes qui assurent la résilience d'un écosystème forestier suite à des perturbations (Padilla & Pugnaire, 2006). En effet, ces espèces facilitatrices ou encore espèces nurses se retrouvent à la base du processus complexe qu'est la succession végétale (Quezel & Medail, 2003). Ces plantes préparent donc le terrain, par divers mécanismes incluant l'amélioration de la fertilité du sol, la protection contre les agresseurs, la stimulation des microorganismes bénéfiques pour les plantes, pour favoriser l'installation des autres espèces plus exigeantes (Padilla & Pugnaire, 2006).

Pour le cas d'un écosystème forestier qui possède encore sa capacité de résilience, le phénomène de facilitation se manifeste naturellement et conduit inévitablement à la reconstitution assez fidèle de la structure de la forêt (Folke *et al.,* 2004). Ce scenario est possible si aucune force extérieure ne vient intervenir dans le processus. Cependant, dans les cas où les forces de changement sont tellement puissantes et fréquentes, l'écosystème perd sa faculté de se régénérer naturellement (Matthew & Irving, 2007). Il en résulte alors des modifications plus ou moins profondes de la structure aussi bien au niveau des communautés épigées qu'hypogées qui influencent le déroulement du processus de reconstitution forestière. De ce fait, seule une intervention extérieure peut réactiver le processus et actuellement des méthodes sont disponibles pour mieux gérer ce problème (Larwanou & Saadou, 2011).

Le principe est le même pour les écosystèmes cultivés dont la gestion fait parfois intervenir la mise en jachère périodiquement et principalement dans les écosystèmes forestiers soumis aux pratiques de culture sur brulis. En effet, le sol de culture est laissé au repos sans aucun traitement pendant au moins 5 ans avant d'être réutilisé de nouveau pour les cultures. Durant ce processus, diverses espèces végétales se succéderont dans cette zone laissée au repos dont les pionnières sont les premières à coloniser le sol. Ces espèces interviennent à la fois dans la protection du sol contre l'érosion et dans l'amélioration aussi bien de la qualité physico-chimique que microbiologique du sol (Aguiar & Sala, 1999). En effet, l'utilisation de plantes nurses pour restaurer les sites dégradés est actuellement bien connue, notamment au niveau des sites hautement perturbés suite à des exploitations minières (Padilla & Pugnaire, 2006). Il peut donc être très intéressant d'utiliser le concept de plante nurse dans le cadre de l'amélioration de la qualité du sol cultivable et des rendements agricoles par la formation de réseaux mycorhiziens. La grande abondance de ces associations et leur intérêt économique a suscité de nombreuses études pour comprendre leur fonctionnement.

Certaines espèces végétales du fait de leurs propriétés écologiques très spécifiques sont relativement plus efficaces que les autres en tant que plante facilitatrices ou plantes nurses (Jones *et al.*, 1994 et 1997). La stimulation ou l'interaction des microorganismes bénéfiques pour les plantes tels que les champignons mycorhiziens, les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes, les bactéries fixatrices d'azote etc. est l'une des voies que ces plantes facilitatrices utilisent durant ce processus (Ramanankierana *et al.*, 2006 et 2007; Baohanta, 2011). Il a été clairement établi depuis quelques années que l'aspect

microbiologique du phénomène de facilitation joue un rôle capital dans le bon déroulement et l'issue de la succession végétale (Bowen et Rovira, 1999; Binelli *et al.*, 2000).

A Madagascar, la perte de la couverture forestière causée notamment par la culture itinérante sur brûlis ou *tavy* a été estimee à 236 560 ha avec un taux de déforestation de 0.53% par an entre les années 2000 et 2005 (MEFT, USAID et CI, 2009).Cette déforestation a conduit à l'extension des forêts secondaires ou *savoka* qui jouent des rôles écologiques et socio-économiques importants (Carrière *et al*., 2005) au même titre que les forêts primaires. Cependant peu d'études ont été réalisées sur leur fonctionnement particulièrement les rôles des microorganismes telluriques (mycorhize) et leur dynamique au cours de la succession post-culturale.

De ce fait, cette étude repose sur l'hypothèse qui stipulait que *«certaines des espèces pionnières au niveau des zones cultivées pourraient jouer le rôle de plantes facilitatrices (plantes nurses). En effet, ces espèces seraient des vecteurs efficaces pour la propagation des propagules de champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules du fait de leur statut symbiotiques et de leur fonctionnement».*

En ciblant quelques espèces pionnières des zones cultivées recensées sur le terrain, l'objectif principal de cette étude était donc de sélectionner des plantes pionnières, d'évaluer leur potentiel à améliorer la qualité biologique du sol, d'une part, par leur capacité à favoriser la propagation et l'efficacité des propagules de champignons endomycorhiziens à vésicules et à arbuscules dans le sol et, d'autre part, par l'activité de certains enzymes d'intérêt agronomique.

Le présent mémoire est divisé en quatre parties. La première est consacrée à une synthèse bibliographique sur le sol et la rhizosphère, la symbiose mycorhizienne, le concept de coexistence végétale et le phénomène de facilitation, qui sont les principaux objets de l'étude. La deuxième partie décrit les matériels et les méthodes utilisés pour le travail. La suivante présente les résultats obtenus. La quatrième partie est consacrée à la discussion, et la dernière partie formule la conclusion générale et les perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE SOL et LA RHIZOSPHERE

I.1. Définitions

I.1.a. Le sol

Selon André (1946), le sol est considéré comme l'épiderme vivant et vital de la terre. Par ailleurs, il joue des rôles majeurs dans la dynamique des matières indispensables aux activités humaines. En effet, le sol correspond au milieu meuble où s'ancrent les racines au travers desquelles les plantes puisent l'eau et les éléments minéraux nécessaires à la croissance et au développement des végétaux. C'est aussi un support de vie (Davet, 1996), source de matière organique et un système écologique dynamique et un garde-manger qui nourrit le monde (Gobat *et al.,* 2010).

I.1.b. La Rhizosphère

Parmi les différents compartiments du sol, une zone particulière appelée ***rhizosphère*** tient une importance capitale étant donné que c'est à ce niveau que s'effectuent les principales interactions entre les plantes et le sol avec ses différents constituants (Lemanceau et Heulin, 1998). Globalement, ce terme désigne la région du sol qui est soumise directement ou indirectement à l'influence de la racine ou encore les parties du sol adhérentes à la racine (Hartman *et al.*, 2008). Cette zone est caractérisée par une intense activité et diversité microbienne (Davet, 1996).

Dommergues et Mangenot (1970) définissent la rhizosphère comme étant un habitat favorable pour la prolifération, les activités et le métabolisme de nombreux microorganismes telluriques tel que les bactéries, champignons, algues, protozoaires. L'accroissement considérable des populations microbiennes dans la rhizosphère est principalement due à la présence, dans cette région, de substrats énergétiques riches en carbone secrétés par les racines des plantes (Rasse *et al.,* 2005; Citeau *et al.,*2008). En effet, environ la moitié du carbone fixé dans les tissus chlorophylliens est transférée vers les racines. Là, elle sera emmagasinée sous forme de réserves ou incorporée dans de nouveaux tissus ou brulée durant la respiration cellulaire avant d'être transformée en dioxyde de carbone (une partie sera rejetée dans l'atmosphère du sol et l'autre partie sera excrétée dans les milieux extérieurs par exsudation ou sécrétion et excrétion ou la lyse *via*

la rhizodéposition) (Davet, 1996). Ces substances servent à la fois de sources de nutriments pour la plupart des microorganismes et influencent par la même occasion la qualité physico-chimique du sol du fait de leur composition (Berendsen *et al.,* 2012).

I.2. Les microorganismes rhizosphériques

De ce fait, cette zone du sol abrite donc une large diversité de microorganismes qui interagissent avec les autres compartiments du sol dont la racine des plantes, les macroflores du sol, les éléments minéraux libres ou incorporés (Wieland *et al.,* 2001). Ils interagissent entre eux et avec les autres constituants par différents mécanismes tels que la compétition, la symbiose ou encore le parasitisme (Bascompte & Jordano, 2007) dont l'issue sera pour le bénéfice ou au détriment de la plante en terme de santé ou de production végétale (Bais, 2006).

Parmi les célèbres interactions, la ***symbiose*** s'établit entre la plante d'habitude chlorophyllienne et un microorganisme possédant certaines propriétés particulières comme la fixation d'azote atmosphérique (bactéries du genre *Rhizobium*) ou la mobilisation du phosphore (champignons mycorhiziens) etc. (Giri *et al.*, 2005). Durant cette association, les deux partenaires bénéficient réciproquement l'un de l'autre et peuvent coexister aussi longtemps qu'ils ont besoin l'un de l'autre.

Certains microorganismes rhizosphériques peuvent soit agir directement par antagonisme (Nyvall, 1999) soit libérer des substances qui interviennent à la fois pour la protection de celle-ci contre les agents pathogènes (Selosse *et al.,* 2004; Gentili & Jumpponen, 2006) et à la stimulation de la croissance de la plante (Hamel & Plenchette, 2007). Par ailleurs, du fait de leur activité, ces microorganismes libèrent également différents types d'enzymes qui interviennent dans le cycle biogéochimique d'une manière plus ou moins spécifique (Hofmann et Seegerer, 1951). Tels sont les cas des enzymes dites phosphatases qui participent à la mobilisation du phosphore (Gobat *et al.,* 2003), les hydrolases qui catalysent les réactions enzymatiques, les réductases pour la respiration cellulaire, etc. (Dick et Tabatabai, 1992). Ces enzymes sont couramment appelées «***enzymes d'intérêts agronomiques***» dans le système agronomique (Elvazi et Tabatabai, 1977; Yanai, 1992).

II. LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE

Parmi les microorganismes associés aux racines, les champignons qui forment les mycorhizes, tiennent une place considérable du fait de leur ubiquité et de leur importance pour la vie des plantes (Brundrett, 2002). Un champignon mycorhizien, tout seul, ne peut simplement pas exister dans la nature; il doit absolument s'associer à une plante pour se développer et survivre (Smith & Read, 2008). Ils forment alors cet organe particulier appelé ***mycorhize*** qui sert d'interface entre le champignon et la racine des plantes. Quant à la plante, elle peut certes exister en l'absence de champignons symbiotiques, mais elle sera désavantagée, poussant plus lentement et présentant une plus grande vulnérabilité aux maladies (Renaut, 2007).

Globalement, il y a trois sortes d'organes résultants de ces symbioses dont l'ectomycorhize, l'endomycorhize et l'ectendomycorhize (Bouchet *et al.*, 1999). La ***symbiose endomycorhizienne*** est la forme d'association la plus répandue et présente des anatomies très variées. L'une des caractéristiques morphologique de cette association est la formation des ***mycorhizes à vésicules et arbuscules*** (MVA). Il s'agit de la forme la plus fréquente dans la nature notamment dans les écosystèmes forestiers tropicaux humides (Smith et Read, 1997).

II.1. Les mycorhizes à vésicules et arbuscules

Le terme mycorhize, «mukes»: champignon et «rhiza»: racine, désigne un organe spécifique résultant de l'association entre les racines d'une plante et les hyphes d'un champignon mycorhizien (Smith et Gianinazzi-Pearson, 1988). L'interdépendance des deux partenaires (champignon mycorhizien - plante) implique la symbiose mycorhizienne obligatoire, du fait que leurs cycles de vie sont complémentaires. En effet, les champignons reçoivent de la plante hôte des substrats carbonés, issus de la photosynthèse, nécessaires pour boucler son cycle de vie (Smith & Read, 2008). En retour, les champignons mycorhiziens améliorent la nutrition minérale de la plante (principalement le phosphore) (Lambers *et al.,* 2008), augmentent sa tolérance à la sècheresse et réduisent l'effet des infections pathogènes (Whipps et J.M., 2004) en exerçant une pression de sélection sur les communautés bactériennes et en favorisant la croissance des microorganismes du sol potentiellement bénéfiques à la symbiose et à la plante (Frey-Klett *et al.,* 2005; Ouahmane *et al.,* 2009). De plus, la symbiose mycorhizienne augmente la surface d'absorption du système racinaire de la plante et en même temps fournit une surface plus importante pour

les interactions avec les microorganismes du sol (Smith et Read, 2008). Les relations entre la plante et le champignon symbiotique ont donc été élargies au microbiote du sol, pour créer au final un «complexe mycorhizien multitrophique» (Frey-Klett *et al.,* 2005).

Les Champignons Mycorhiziens à Vésicules et à Arbuscules (CMVA) sont capables de s'associer avec une large spectre d'hôtes c'est-à-dire avec de très nombreuses espèces végétales comprenant les gymnospermes, les angiospermes, et toutes autres plantes ayant de véritables racines (Read *et al.,* 2000). Elles sont ainsi nommées parce que les champignons pénètrent dans les cellules de l'hôte où ils se différencient en une structure ramifiée appelé «arbuscules» ou en boule appelé «vésicules» formée essentiellement d'hyphe de CMVA (photo 1). C'est au niveau de ces organes que s'effectuent en grande partie les échanges d'éléments nutritifs entre la plante et les champignons (Bonfante et Genre, 2010) et «vésicules» des organes de réserve chez les champignons (Smith & Read, 1997).

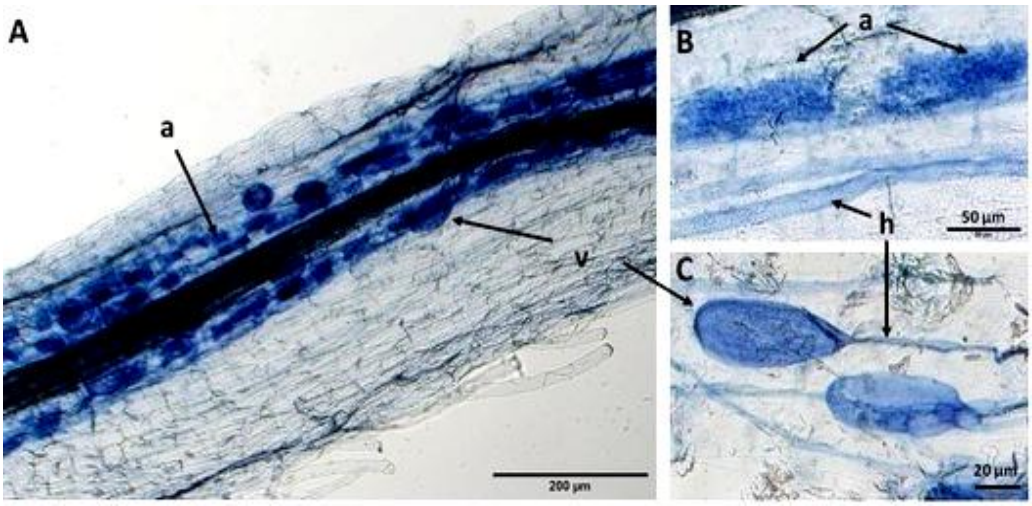

Photo 1: Observation microscopique de racines endomycorhizées colorées au bleu trypan.

a: arbuscule; v: vésicule; h: hyphe

(Source: *http://www.imbio.uni-bonn.de/molekulare-biotechnologie/forschung/Figure8.png*)

II.2. L'importance de la symbiose mycorhizienne à vésicules et arbuscules

L'interaction entre les Champignons endomycorhiziens à Vésicules et à Arbuscules (CMVA) et les plantes est extrêmement ancienne. L'apparition des mycorhizes sur terre a coïncidé avec la période d'apparition des végétaux terrestres, il y a environ 400 millions d'années (Simon *et al.,* 1993). Des structures fongiques très semblables à des arbuscules observées actuellement chez les CMVA ont été trouvées chez quelques fossiles du Dévonien inferieur (environ 415 Ma) (Remy *et al.,* 1994) et ainsi que des spores qui datent

de l'Ordovicien (environ 460Ma) (Redecker *et al.,* 2000). Plus tard, des champignons plus évolués, à filament cloisonnés et associés avec certains végétaux ont été identifiés (Stubblefield *et al.,* 1987). De là est née la considération que la symbiose avec les mycorhizes à vésicules et arbuscules est l'une des composantes les plus influentes qui régissent de la dynamique de la flore terrestre (Humphreys *et al.,* 2010).

Dans cette symbiose, le réseau dense et étendu des hyphes au niveau extra-racinaire des champignons mycorhiziens aide la plante à explorer un volume accru de sol et à accéder à des endroits inaccessible pour les racines seules d'où l'accès à des ressources supplémentaires en eau et en éléments minéraux (Smith & Read, 2008).

L'association symbiotique entre les CMVA et les plantes a été décrite comme mutualiste où les deux partenaires tirent profit de l'interaction. Les CMVA reçoivent de la plante des éléments carbonés issus de la photosynthèse. La part de photosynthétats transférée au champignon est non négligeable puisqu'elle peut atteindre jusqu'à 20% du carbone fixé lors de la photosynthèse, soit environ 5 milliards de tonnes de carbone par an (Bago *et al.,* 2000).

II.3. Cycle de vie des champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules

Les champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules sont des symbiotes obligatoires qui ne peuvent se développer qu'en présence d'une plante hôte. La colonisation des cellules corticales de la racine passe par plusieurs étapes au cours desquelles se produisent des modifications anatomiques et physiologiques importantes (Smith & Read, 1997).

L'infection de la plante hôte peut être initiée à partir de plusieurs propagules: spores, fragments racinaires mycorhizés, hyphes présents dans le sol ou même des vésicules isolées (Ouahmane, 2007).

Les chlamydospores germent en donnant un promycélium (mycélium présymbiotique) (Stade 1), qui développe un appressorium sur la surface de la racine après le premier contact physique entre les hyphes et la plante (Stade 2). Ensuite, le champignon pénètre dans la racine en formant un mycélium secondaire entre les cellules racinaires (Stade 3). Le mycélium progresse entre les cellules racinaires, parfois se renfle en vésicules ou forme des arbuscules à l'intérieur des cellules corticales (stade 4). Le mycorhize ainsi formée dévient donc une structure spécifique qui s'étend jusqu'à la surface externe de la racine et prospecte le sol environnant grâce aux hyphes du champignon mycorhizien (Bago *et al.,* 1998). Ce mycélium acquière les nutriments dans le sol qui

seront transférés à la plante. Le cycle de vie des champignons MVA est complété par la formation de spores au niveau du mycélium extraradical, qui entameront par la suite un autre processus de colonisation et un nouveau cycle de développement (Stade 5) (figure 1).

Lors de la sénescence de la racine ou des tissus corticaux, les vésicules sont libérées dans le sol et se développent selon un mode saprophytique.

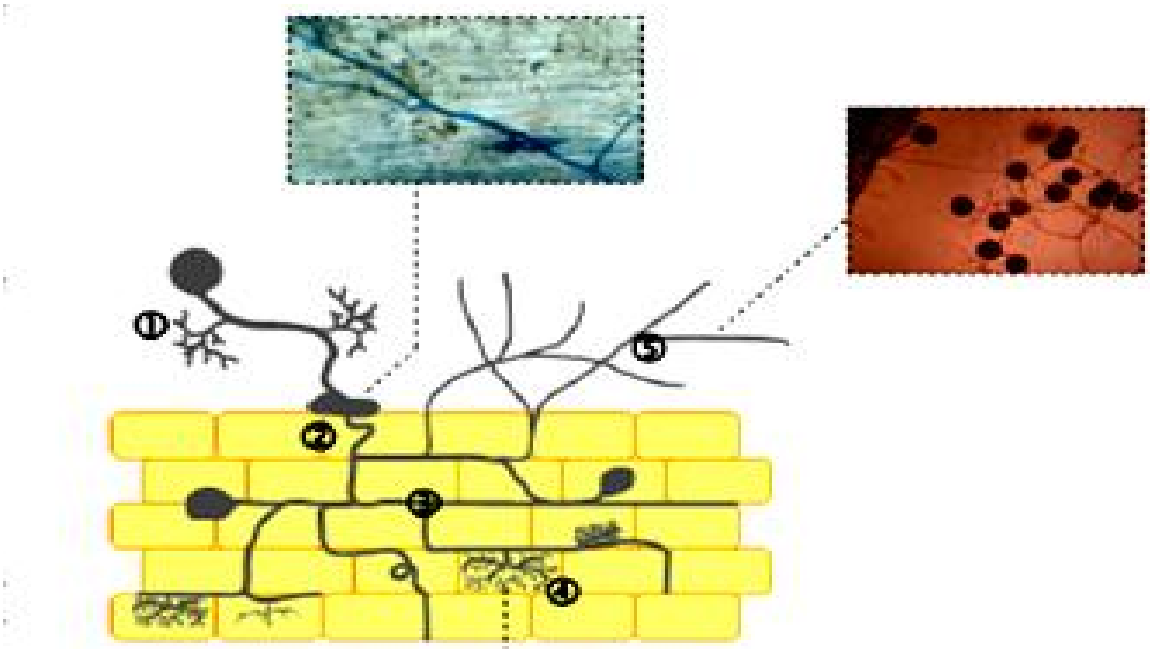

Figure 1: Cycle de vie du champignon endomycorhizien (Source: Godfroy, 2008)

1: germination d'une spore et la germination d'un mycélium présymbiotique au voisinage d'une racine;

2: formation de l'appressorium au contact de la racine, site d'entrée du champignon dans la racine;

3: développement du mycélium entre les cellules racinaires;

4: formation de structures ramifiées dans les cellules de la racine, les arbuscules, qui sont les sites d'échanges entre le champignon et la plante hôte et formation des vésicules;

5: développement de mycélium extra-racinaire qui permet le prélèvement d'éléments minéraux dans le sol, transmis à la plante.

III. LE CONCEPT DE COEXISTENCE VEGETALE ET LE PHENOMENE DE FACILITATION (*Plante nurse*)

III.1. La coexistence végétale

La «coexistence» a été définie comme une association équilibrée d'espèces végétales différentes au sein d'un écosystème (Hart *et al.,* 2003). Au milieu des associations entre les espèces végétales s'expriment également diverses relations plante-

plante, plante-organismes du sol et organismes-organismes sous l'influence des conditions environnementales (Armas *et al.,* 2004).

Parmi ces interactions, les associations mycorhiziennes jouent un rôle clef dans le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes terrestres en intervenant fortement dans les relations plante-microorganismes-plante et les relations sol-plantes (Johansson *et al.,* 2004). En général, les espèces végétales d'une même aire de distribution se partagent les sources de nutriments, de lumière et de l'air disponible (Pugnaire *et al.,* 2004). Il en résulte donc diverses formes de compétitions ou de cohabitations plus ou moins accrues selon l'espèce végétale concernée. De ce fait, les espèces les moins compétitives vont alors se raréfier jusqu'à disparaitre totalement dans certains cas (Went, 1973; Casper et Jackson, 1997). L'existence de la symbiose mycorhizienne peut améliorer la compétitivité des espèces végétales concernées vis-à-vis de la colonisation du milieu physique et de l'acquisition des éléments nutritifs (Godfroy, 2008). Par ailleurs, il a été clairement établi que la présence des plantes adultes présentant déjà des structures mycorhiziennes pourrait être un moyen très efficace pour faciliter le développement des jeunes plantules étant donné qu'un transfert de symbiote fongique est fort possible (Simard & Durall, 2004). La création d'un vaste réseau mycélien affecte cette relation entre plantes voisines (Van der Heijden *et al.,* 2003). Des auteurs ont suggéré un échange de métabolites via un pont mycélien créé par le réseau d'hyphes connectant plusieurs plantes (Yao *et al.,* 2003; Simard & Durall, 2004).

Les effets des interactions sont généralement classés en deux types, négatifs et positifs, qui se manifestent simultanément et d'une manière bidirectionnelle, respectivement désignés sous le nom de compétition ou de facilitation.

La compétition est définie comme la diminution des performances en termes de croissance, de reproduction et/ou de survie provoquée par un autre individu *via* la diminution de l'accès à la ressource (Betencourt, 2012). La compétition est la conséquence de l'utilisation active d'une même ressource nutritive ou physique par des individus d'une même espèce ou d'espèces différentes. De ce fait, il en résulte les lois de la sélection naturelle qui tend à favoriser l'espèce capable d'exploiter au maximum, et à son seul profit, les ressources disponibles.

La facilitation correspond à une augmentation des performances d'un individu suite à l'accroissement de la disponibilité de la ressource, induite par un autre individu, impliquant souvent une modification de l'environnement (Bruno *et al.,* 2003). De plus, elle

est définie comme étant la capacité d'une plante à influencer d'une manière favorable le développement d'une autre plante (Dickie *et al.,* 2005).

III.2. La facilitation plante-plante ou phénomène de plante nurse

Le phénomène de «plante nurse» ou «facilitation plante-plante» est la principale forme d'interactions positives existantes entre deux individus de la même espèce ou d'espèces différentes au sein d'un écosystème. Ce phénomène se traduit soit par l'intervention de la plante dite «nurse» à faciliter le développement ou l'installation d'autres espèces végétales (Lopez et Valvidia, 2007), soit par l'amélioration de la fertilité du sol qui impliquent des agents microbiens (Hart *et al.,* 2003; Callaway, 2007).

A l'heure actuelle, deux types de facilitation sont distingués; la facilitation directe et la facilitation indirecte.

La facilitation est dite directe lorsque la plante nurse agit directement sur la plante cible par amélioration des conditions de l'habitat (Ludwig *et al.,* 2004). Différents mécanismes peuvent être invoqués dans cette amélioration par modification des ressources comme l'intensité lumineuse, ou la richesse en nutriments. L'espèce nurse peut aussi affecter la structure physique de l'habitat en améliorant les températures, la structure ou texture du sol, ou encore en la protégeant de l'ensablement ou du vent (Zouhaier, 2010).
On parle d'interaction indirecte lorsqu'un troisième individu (végétal ou animal) intervient pour modifier les interactions entre la plante nurse et la cible (Anthelme & Michalet, 2009).

Le récent monté d'intérêt pour les interactions positives a permis de mettre la facilitation sur le devant de la scène (Brooker *et al.,* 2008). Du point de vue application, la facilitation se révèle également comme étant un outil très intéressant et innovant pour la restauration des milieux dégradés (Gómez-Aparicio, 2009) que ce soit dans les milieux méditerranéens, les forêts tropicales, les sites pollués... La facilitation peut également être une technique intéressante dans les agrosystèmes pour augmenter la production et diminuer le stress.

En outre certains auteurs s'accordent sur le fait que la facilitation est un processus essentiel dans la structuration des écosystèmes, et son effet n'est pas limité à l'amélioration de la survie ou de la croissance des plantes (Cavieres *et al.,* 2006), mais également à l'enrichissement de la fertilité du sol, de la teneur en eau du sol ainsi qu'à la modification du substrat.

III.3. Implication des espèces pionnières dans le processus de facilitation

III.3.a. Caractéristiques des espèces pionnières

Suite à des séries de perturbations (incendie, défrichement, éboulement) ou des modifications dans un écosystème (conditions édaphiques, climats difficiles), un certain nombre de plantes vont venir coloniser en premiers lieu ces espaces (Lepart et Escarre, 1983; Randriambanona, 2008). Ces plantes sont classées comme «constructeur de niche» par leur capacité à moduler la disponibilité des ressources nutritives et à engendrer des nouvelles conditions favorables pour l'installation des nouveaux individus (Laland *et al.,* 1996 et 2007; Kylafis et Loreau, 2008). A titre d'exemple, les lichens, les mousses, les espèces rudérales et bien d'autre encore sont classées comme étant des espèces pionnières.

III.3.b. Rôles des espèces pionnières

Les espèces pionnières colonisent et restaurent les propriétés du sol par la stimulation des microorganismes rhizosphériques ou par l'amélioration de la qualité physico-chimique du sol permettant ainsi l'installation des autres espèces végétales (Pidwirny, 2006). Les espèces pionnières, d'une part avec leur croissance rapide permettent l'aménagement rapide du sol et garantissent un équilibre écologique (soazigdarnay.over-blog.com); et d'autre part avec une plus courte longévité (Auger *et al.*, 2004), favorise la succession de nouvelles individus (Brassard et Chen, 2006). Les espèces pionnières interviennent dans le phénomène de succession écologique, c'est-à-dire du changement de la composition en espèces (communautés) d'un milieu à des moments donnés.

IV. BIODISPONIBILITE DU PHOSPHORE DANS LE SOL

La majorité du phosphore (P) contenu dans les sols se trouve sous des formes minérales et organiques complexes qui ne sont pas directement utilisables par les végétaux (Barber, 1984; Turner *et al.,* 2005). Seul l'orthophosphate (Pi: $H_2PO_4^-$ ou HPO_4^{2-}), forme soluble, est absorbé par les plantes. La faible mobilité du Pi dans la solution du sol, estimée de 10^{-12} à 10^{-15} $m^2.s^{-1}$ (Schachtman *et al.,* 1998), résulte de sa forte réactivité avec les constituants du sol. Seule une faible proportion de P est alors présente sous forme de Pi en solution et sa concentration est estimée pour la majorité des sols entre 0,1 et 10 µM (Hinsinger, 2001). Cette concentration est insuffisante face aux besoins nutritifs en P des végétaux et la

biodisponibilité en Pi devient alors rapidement un facteur limitant pour la production de biomasse dans les écosystèmes naturels ou anthropiques.

En réponse à la déficience en P, les plantes ont toutefois développé de nombreuses stratégies afin de répondre à leur besoin en P. La croissance et la configuration spatiale du système racinaire permettent l'exploration continue de nouveaux horizons du sol. Une augmentation significative du nombre de racines fines a été observée dans les sols pauvres en P chez le pin maritime (Achat *et al.,* 2008). La formation de structures racinaires spécialisées tels que les poils racinaires (Gahoonia & Nielsen, 1997) ou les racines en « cluster » (Lamont, 1983) permet d'augmenter considérablement la surface d'échange et le volume de sol exploré. Les plantes sont également capables de mobiliser du Pi à partir des formes de P complexées par la sécrétion d'acides organiques (Jones, 1998) et de phosphatases acides (AcPases) (Duff *et al.,* 1994) dans la rhizosphère.

MATERIELS ET METHODES

A. MATERIELS

A.I. PRESENTATION DU SITE D'ETUDE

L'étude a été effectuée aux environs de la forêt de Vohilahy, Ankorabe (Ranomafana-Est, District de Brickaville) situé à 200 km environ d'Antananarivo dans la partie orientale de la grande île (S18°56'37'', E48°46'30''). La végétation est constituée de forêt dense humide sempervirente de basse altitude, de pseudo-steppe (*roranga*) et des jachères (*savoka*).

Dans le cadre de cette étude, la perturbation en question est la culture sur brûlis du riz, de manioc qui demeure le système de culture prédominant.

Les espèces pionnières cibles ont été retenues grace aux inventaires floristiques réalisés dans 20 parcelles de jachères âgées de 7 à 8 mois au moment de l'inventaire (novembre 2014-janvier 2015) appelées localement *ramarasana*. L'âge de la mise en jachère et le passé cultural de chaque parcèlle ont été identifiés à l'aide des enquêtes auprès des proprietaires suivies de recoupements auprès des villageois. Toutes les parcelles ont fait l'objet de 3 a 4 cycles de culture sur brulis de riz pluvial avec une période de mise en jachère de 4 à 5 ans entre les cycles.

A.II. MATERIELS D'ETUDES

A.II.1. Matériels végétaux

A.II.1.a. Les plantes pionnières

Parmi les huit espèces pionnières présentes dans la zone d'étude, quatre espèces de plantes ont été choisies comme matériel d'étude dans ce travail à savoir: *Urena lobata* L. (Malvaceae) (Nom vernaculaire: besofina), *Clidemia hirta* (L.) D. Don (Melastomataceae) (Nom vernaculaire: mazambody), *Solanum torvum* Sw. (Solanaceae) (Nom vernaculaire: angivy redaka), *Conyza sumatrensis* (Retz) E. (Asteraceae) (Nom vernaculaire: maitso ririnina). La position systématique de ces plantes est donnée dans l'annexe 1.

Photo 2: *Solanum torvum*

Photo 4: *Clidemia hirta*

Photo 3: *Urena lobata*

Photo 5: *Conyza sumatrensis*

Source: auteur

A.II.1.b. Le Sorgho

Le sorgho a été utilisé en tant que plante test pour l'évaluation du nombre probable de propagules de champignons endomycorhiziens contenu dans les échantillons de sol prélevés sous les plantes à étudier. Le sorgho étant connu comme une plante fortement mycotrophe (Plenchette et Morel, 1996) c'est-à-dire qu'elle peut s'associer avec diverses espèces de champignons endomycorhiziens et avec un très fort taux de colonisation par les champignons symbiotiques.

La classification systématique du Sorgho est donnée dans l'annexe 2.

A.II.2. Les échantillons de sol

Des échantillons de sol et de racines ont été prélevés dans la rhizosphère des plantes. Pour chaque espèce végétale, 3 échantillons par types de plantes ont été prélevés et conditionnés dans des sachets de prélèvement microbiologiques jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Une fois au laboratoire, les sachets de prélèvement contenant les sols ont été ouverts puis laissé à l'air libre jusqu'aux analyses proprement dits. Par contre, les échantillons de racines débarrassés des mottes de terres qui s'y sont collés ont été nettoyés soigneusement puis déposés respectivement dans des tubes Gibbsons contenant de l'eau pour être conservés dans un réfrigérateur à +4°C.

B. METHODOLOGIE

B.I. INVENTAIRE FLORISTIQUE

Les inventaires floristiques dans les parcelles de jachères ont été réalisés suivant la méthode de placeau dans une surface de 25m² (5mx5m) qui est supérieure à l'aire minimale de 24m² proposée par Pfund (2000) pour ce type de végétation. Toutes les espèces dans le carré ont été inventoriées et comptées. Les fréquences des espèces ont été ensuite calculées. La fréquence d'une espèce est le rapport entre le nombre de l'espèce (n) et le nombre total (N) des espèces dans le carré, selon la formule:

$$F\ (\%) = \frac{n}{N} \times 100$$

Les espèces les plus fréquentes (F>50%) ont été retenues (Annexe 3). La nomenclature des plantes a été corrigée en utilisant la base de données *W3Tropicos* du

Missouri Botanical Garden (MBG) et celle d'E-floras ou catalogue des plantes vasculaires de Madagascar.

B.II. DESCRIPTION DU STATUT MYCORHIZIEN DES PLANTES

L'observation à l'œil nu des mycorhizes à vésicules et à arbuscules sur le système racinaire des plantes n'est pas possible; les composants internes des cellules racinaires et les pigments localisés dans les parois masquent les structures fongiques. Un traitement préalable est donc indispensable.

Le statut mycorhizien des quatre espèces de plantes prélevées sur terrain a été décrit en utilisant la méthode de coloration spécifique des endomycorhizes décrite par Phillips et Hayman (1970) sur prélèvements racinaires. Cette méthode se déroule en trois étapes:

1ère étape: éclaircissement des racines

Les racines fines de chaque plante prélevée sur terrain, débarrassées de toutes particules de terre, sont traitées avec une solution de KOH à 10% à 90°C pendant 35 minutes afin de détruire le cytoplasme des cellules végétales, ses inclusions et la majorité des pigments pariétaux.

2ème étape: colorations des racines

Les racines ainsi éclaircies, sont ensuite colorées dans une solution de bleu de trypan à 0,5‰ pendant 15 minutes à 90°C.

Le colorant utilisé est le bleu trypan 0,5‰ qui a été obtenu par dissolution de 5g de poudre de trypan bleu dans 1000 ml d'eau distillé suivis d'un ajout de 250 ml d'acide acétique.

3ème étape: observation microscopique

Pour chaque échantillon de racine, 100 fragments de racines fines de 1 cm de long chacun ont été montés entre lame et lamelle et examinés sous microscope optique (grossissement x 40) (Brundrett *et al.,* 1985). Les vésicules et les mycéliums de CMVA présents dans le cytoplasme sont colorés en bleu. Un morceau de racine est considéré comme mycorhizé s'il montre au moins un point d'infection. La fréquence d'infection est démontrée par le nombre de fragment de 1 cm contenant des structures mycorhiziennes sur les 10 montés entre lame et lamelle.

B.III. EVALUATION DU POTENTIEL INFECTIEUX MYCORHIZOGENE DES SOLS

B.III.1. Détermination de l'abondance et de la diversité morphologique des spores de champignons mycorhiziens

A partir de chaque échantillon de sol, 100 g ont été prélevés et mis dans un récipient dans lequel de l'eau a été ajouté. Le tout est agité vigoureusement afin de séparer les spores piégé dans les granules du sol. La solution ainsi obtenue a été filtrée par une série de tamisage (200 µm, 100 µm, 80 µm, 50 µm) réalisés sous jet d'eau. Le contenu de chaque tamis est récupéré séparément et versé dans des tubes à centrifugation. Deux séries de centrifugation ont été réalisées, la première à 3000 tours/minute pendant 5 minutes avec de l'eau afin que toutes les spores se retrouvent dans le culot. Le surnageant a été éliminé puis remplacé par une solution de saccharose à 60% (m/v) afin que les spores puissent migrer vers le surnageant par gradient de concentration, après la seconde centrifugation à 1000 tours/minute pendant 3 minutes.

Le surnageant a été récupéré puis filtré à travers une membrane filtrante (papier Wattman n°2) préalablement quadrillé pour récupérer les spores. L'observation a été effectuée sous stéreomicroscope (grossissement x 100).

Les spores ont été comptées. La densité et l'abondance de spore ont été calculées pour les trois échantillons de sol étudié et est exprimée en nombre de spore par gramme de sol.

B.III.2. Mesure de la longueur des hyphes extramatriciels

La longueur des hyphes a été déterminée après extraction et filtration sur membranes filtres quadrillées par la technique du «*Grideline intersection method*» (Newman 1966).

1ère étape: Tamisage du sol et coloration des hyphes

Pour chaque espèce, deux grammes de sol ont été tamisé sur un tamis de 50 µm et aspergés à l'aide d'une pissette contenant 500 ml d'eau distillée afin d'extraire les hyphes contenus dans les agrégats de sol ou ceux rattachées aux racines fines. Le lessivât a été récupéré dans un bécher et agité pendants 30 secondes sur un agitateur avec une agitation élevé. Cette solution a été diluée deux fois ou quatre fois lorsque la solution était trop turbide pour que pendant l'observation le quadrillage des membranes filtres soit visible.

Pendant que la solution est toujours agitées, 30 ml ont été prélevés et filtrés à travers une membrane filtre millipore (1,2 µm de diamètre de pore).

Une solution de bleu trypan à 7% est mise sur le filtre pendant 5 minutes afin de colorer les hyphes. Cette solution a par la suite été éliminée par rinçage à l'eau distillée. Le filtre a été séché par la suite.

2ème étape: Observation et comptage des hyphes

Les filtres ont été montés et observés sous stéreomicroscope (grossissement x 100) pour le comptage des intersections entre les hyphes et le quadrillage de la membrane filtre. Trois répétitions par types de sol ont été effectuées.

3ème étape: Calcul de la longueur des hyphes

La longueur R des hyphes dans 30 ml de solution a été calculée selon la formule suivante (Newman 1966) et les résultats ont été exprimés en $m.g^{-1}$ de sol sec:

$$R = \frac{\pi A n}{2H}$$

Avec:

A: surface sur laquelle les racines sont réparties exprimée en mètres carrés: $A = \pi r^2$

r: rayon du cercle sur lequel les hyphes sont comptés exprimé en mètres

n: nombre d'intersections entre lignes et hyphes

H: longueur totale des lignes dans le cercle exprimée en mètres

R: longueur des hyphes dans 30 ml de solution

B.III.3. Evaluation du Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM) du sol

Le Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM) du sol définit sa capacité d'initier des formes d'associations mycorhiziennes grâce à sa richesse en propagules fongiques (spores, mycélium, sclérote, fragments de racines portant des structures mycorhiziennes) (Liu et Luo, 1994). Ainsi, le PIM du sol est fortement lié à la structure des communautés végétales épigées. Il s'agit de déterminer en réalisant des dilutions de sol, le nombre probable des propagules capables d'infecter la plante hôte par la méthode décrite par Porter (1979). Fischer et Yates (1963) décrivaient que par la méthode de dilution, la présence ou l'absence de l'organisme peut être déterminée même si il ne peut pas être dénombré. C'est le cas des propagules fongiques. Pour cela, les échantillons de sol prélevés préalablement

tamisés à 2 mm ont été respectivement mélangés avec du sable stérilisé à l'autoclave (140°C, 40 min, 2 bars).

Six dilutions ont été réalisées pour chaque échantillon avec 5 répétitions pour chacune. Le tableau suivant résume la proportion «sol non-stérilisé et sable stérilisé» pour chaque dilution.

Tableau 1: Proportion des mélanges de sable stérilisés et de sols non stérilisés pour l'évaluation du Nombre le Plus Probable de propagule (NPP) dans le sol

Niveau de dilution	1	2	3	4	5	6
Sol non stérilisé (g)	500	125	30	5	2	0.5
Sable stérilisé (g)	0	375	470	495	498	499.5

Ces sols dilués (500 g) ont été répartis dans des pots en plastique de 150 ml à raison de 100 g de sol par pot.

1ère étape: Germination des graines de sorgho

Trois graines de sorgho ont été semées dans chaque pot. Les graines de sorgho ont été stérilisées superficiellement par immersion dans de l'alcool 95° durant 30 secondes puis rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile (5 fois) avant semis.

Les cultures ont été disposées dans une serre sous les conditions suivantes: Température moyenne variant de 18°C à 28°C et une photopériode de 12 heures. Les plantes ont été arrosées trois fois par semaine avec de l'eau du robinet.

2ème étape: Prélèvement, coloration et observation des racines

La récolte du système racinaire entier de chaque plantes a été faite après 28 jours de culture. L'évaluation de l'infection par les MVA a été effectuée par coloration des racines fines selon la méthode de Phillips et Haymann (1970).

Chaque système racinaire montrant au moins un point d'infection (pénétration d'hyphes dans la racine) est considéré comme mycorhizé.

3ème étape: Calcul du nombre le plus probable de propagule

La méthode de calcul est présentée dans l'annexe 4.

B.IV. MESURE DES ACTIVITES MICROBIENNES DU SOL

B.IV.1. Activité microbienne globale du sol

L'activité microbienne globale contenue dans les échantillons de sol est déterminée par la méthode de l'hydrolyse de la Fluorescéine Di Acétate ou FDA décrite par Alef (1998). En effet le réactif FDA peut être hydrolysée par de nombreuses enzymes appartenant au groupe des hydrolases telles que la lipase, la protéase et l'estérase. Ainsi, la solution de FDA initialement incolore vire au jaune-vert fluorescent en présence de ces enzymes qui sont connu comme étant des enzymes essentiellement d'origine microbienne (Lundgren, 1981). L'activité est donc exprimée en quantité du produit d'hydrolyse, la fluorescéine, par heure et par gramme de sol sec. La mesure de l'intensité de la couleur s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre à 490 nm.

Ainsi un gramme de sol à été mise en suspension dans 200 µl de FDA (Ref: F7378 Sigma) et 15 ml de tampon potassium phosphate (pH 7,6). Deux témoins ont été préparés: un témoin enzyme (TE) constitué par 1g de sol, 15 ml de tampon et 200 µl d'eau distillé, et un témoin substrat (TS) constitué de 15 ml de tampon et 200 µl de FDA. Au bout d'une heure d'incubation sous agitation à 30°C, 0,5 ml du mélange a été prélevé et mélangé avec 0,5 ml d'acétone dans des tubes eppendorfs pour arrêter la réaction. Les suspensions de sol ainsi obtenus ont été centrifugées pendant 5 minutes à 10000 tours/min et les surnageant ont été récupérés pour la lecture de la densité optique dans un spectrophotomètre à 490 nm de longueur d'onde. Pour chaque échantillon de sol, trois répétitions ont été réalisées. Avant la lecture de la densité optique des échantillons, le spectrophotomètre est mis à zéro avec une solution standard à 0 µl/ml de fluorescéine. La lecture se fait dans l'ordre: TS, TE suivis des trois essais de l'échantillon.

Une gamme étalon de la solution Fluorescéine a été établie à partir de la solution de FDA dans du tampon phosphate et d'acétone (Annexe 5). Le taux d'hydrolyse de FDA est calculé (en µg de produit Fluorescéine par gramme de sol sec par heure) afin de déterminer l'activité microbienne totale de chaque sol.

B.IV.2. Activité des phosphatases du sol

L'activité des phosphatases du sol a été déterminée selon la méthode décrite par Tabatabai *et al.* (1982) modifiée par Schinner *et al.* (1995). Elle consiste à mesurer

l'hydrolyse de para-NitroPhényl Phosphate (p-NPP) (Ref: 104-0 Sigma Phosphatase Substrate) en milieu acide et en milieu alcalin.

1ère étape: Préparation du réactif

Pour la préparation de 10ml de solution p-NPP à 5mM, 100mg de p-NPP en pastille ont été dissouts dans 10ml d'eau déminéralisée. La solution ainsi obtenue est conservée à l'obscurité et à -20°C.

2ème étape: Dosage du produit d'hydrolyse

Les pH des tampons utilisés sont différents: pH 6 pour les phosphatases acides et pH 11 pour les phosphatases alcalines. 100mg de sol ont été pesés et mis en suspensions dans 100µl de p-NPP et 400µl de tampon Mc Ilvain (Citrate Phosphate Buffer). Le mélange a été ensuite incubé à 37°C pendant 1 h et sous agitation. Après incubation, la réaction d'hydrolyse a été arrêtée par ajout de 100µl de la solution de $CaCl_2$ à 0,5 M et 400µl de NaOH à 0,5 M. Le contenu a été centrifugé pendant 5 mn à 1000 tours/min, et le surnageant a été récupéré pour être lu au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 400 nm en prenant comme référence un témoin blanc H_2O. La lecture a été toujours effectuée en commençant par les témoins puis les essais. Trois échantillons et deux témoins (TS et TE) ont été préparés pour chaque essai.

3ème étape: Calcul du produit d'hydrolyse

La quantité des produits d'hydrolyse du phosphate en milieu acide et alcalin a été calculée (en µg de p-Nitrophénol par gramme de sol sec par heure) afin de déterminer l'activité de phosphatase microbienne de chaque sol.

C. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

Les données obtenues ont été traitées par analyse de variance (ANOVA) qui est une comparaison multiple de moyennes dont la variable étudiée est un caractère quantitatif de type continu qui suit une loi normale. Le test de Newman-Keuls au seuil de probabilité 0.05 a été utilisé pour distinguer les groupes de moyenne statistiquement homogène. Le logiciel STATISTICA a été utilisé pour les analyses.

RESULTATS

RESULTATS

I. STATUT MYCORHIZIEN DES ESPECES D'ETUDE

L'examen anatomique des racines fines des plantes d'étude sous microscope, après différents traitements, a montré les traits caractéristiques des champignons endomycorhiziens permettant ainsi le recensement du taux de mycorhization de différentes espèces (Tableau 2). Le taux de mycorhization des racines de plantes est présenté selon Trouvelot *et al.* (1986).

Tableau 2: Statut mycorhizien des espèces

Espèce	Taux de mycorhization	Mycorhization	Statut Mycorhiziens
Urena lobata (Malvaceae)	37%	+ + +	MVA
Clidemia hirta (Melastomataceae)	30%	+ + +	MVA
Conyza sumatrensis (Asteraceae)	50%	+ + +	MVA
Solanum torvum (Solanaceae)	30%	+ + +	MVA

(- =0), + (1- 5%), + + (6-25%), + + + (26-50%), + + + + (51-75%), + + + + + (› 76%) (Trouvelot *et al.,* 1986)

L'espèce *Conyza sumatrensis* présente le taux de mycorhization les plus élevées (50%).

II. POTENTIEL INFECTIEUX MYCORHIZOGENE DES SOLS

Trois méthodes ont été adoptées pour parvenir à la caractérisation du potentiel infectieux mycorhizogène des sols: le dénombrement des spores de champignons mycorhiziens, la mesure de la longueur des hyphes contenus dans les sols et l'évaluation de la capacité des propagules mycorhiziens contenus dans les sols à coloniser le système racinaire d'une plante hautement mycotrophique.

II.1. Abondance des spores de champignon mycorhiziens (MVA)

L'extraction des spores dans les sols rhizosphériques ont permis de déterminer la densité moyenne générale de spores contenues sous chaque espèce de plante. La figure 1 montre la densité moyenne des spores par type de sol. Le sol sous l'espèce *Urena lobata* est le plus infestés avec une densité de plus de 3,5 fois supérieures à celle de l'espèce *Solanum torvum* qui est la plus faible. Malgré cette variation, il n'y a pas de différence significative entre la densité moyenne des spores dans les sols rhizosphériques de chaque plante selon le test de Newman-Keuls au seuil de probabilité 0.05.

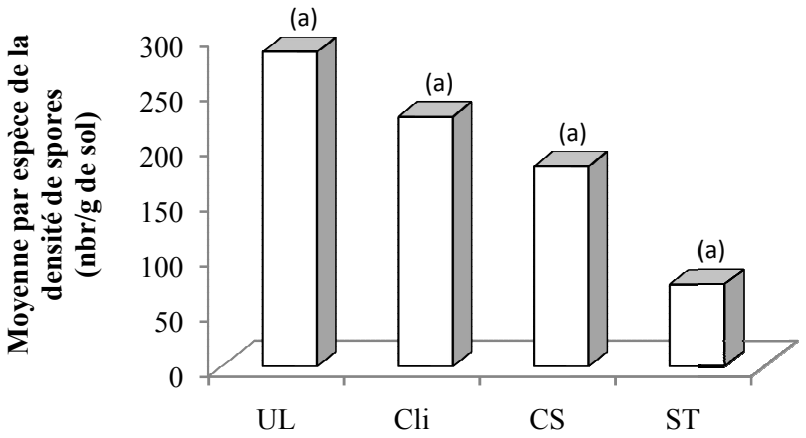

Figure 2: Densité des spores selon les types de sol rhyzosphérique. UL: *Urena lobata*, Cli: *Clidemia hirta*, CS: *Conyza sumatrensis,* ST: *Solanum torvum.* *Les histogrammes marqués par la même lettre ne présentent pas de différence significative selon le test de Newman-Keuls au seuil de probabilité 0.05.

II.2. Longueur des hyphes extramatriciels

Entre le sous sol des quatre espèces de plante d'étude, les résultats de l'évaluation de la longueur des hyphes de champignons mycorhiziens n'ont pas révélé des différences significatives. La longueur moyenne des hyphes mesurée dans chaque échantillon de sol est courte, ne dépassant pas 0.8 m/g de sol. Contrairement au nombre de spores, l'espèce *Urena lobata* présente le plus court hyphe, alors que *Clidemia hirta* et *Solanum torvum* présentent les plus longs hyphes parmi les plantes d'étude. La figure 1 montre la longueur des hyphes de champignons mycorhiziens selon les types de sol.

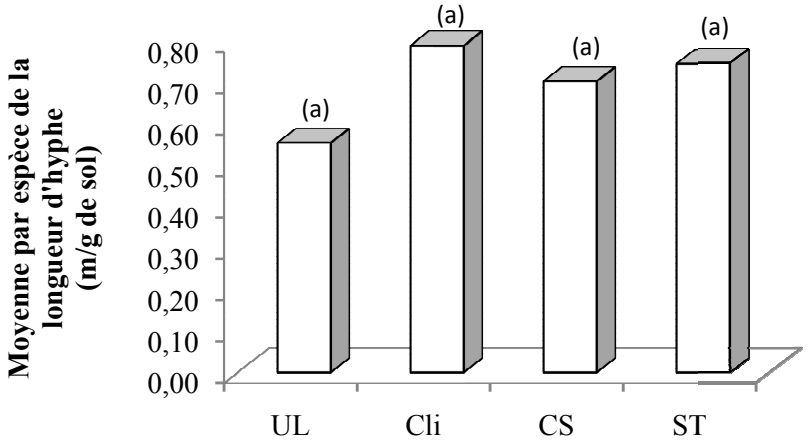

Figure 3: Moyenne de la longueur des hyphes selon les types de sol rhyzosphérique. UL: *Urena lobata*, Cli: *Clidemia hirta*, CS: *Conyza sumatrensis,* ST: *Solanum torvum.* *Les histogrammes

marqués par la même lettre ne présentent pas de différence significative selon le test de Newman-Keuls au seuil de probabilité 0.05.

II.3. Potentiel Infectieux Mycorhizogène (PIM) des sols

Le PIM des quatre types de sol a été évalué en utilisant le sorgho, une plante hautement mycotrophe. Le dénombrement des portions racinaires mycorhizées ont permis l'évaluation du PIM sous serre exprimé par le nombre le plus probable de propagule (NPP) (Tableau 3).

Tableau 3: Nombre le Plus Probable de propagules dans chaque type de sol

Espèces	NPP par 100g de sol
Urena lobata	132
Clidemia hirta	132
Conyza sumatrensis	235
Solanum torvum	132

L'établissement de la symbiose était efficace dans les racines de tous les cultivars de sorgho. Des structures fongiques typiques des MVA ont été enregistrées dans les racines pendant l'observation sous microscope. La dépendance mycorhizienne relative s'est étendue largement parmi les cultivars examinés. Cependant, les résultats ont montré un plus grand NPP (235 NPP/100g de sol) avec le sol rhizospherique de *Conyza sumatrensis* qui est plus de 1,5 fois supérieur par rapport aux autres types de sol (132 NPP/100g de sol).

Le NPP est jugé acceptable autour de 1500 par kg de sol, et trop faible en dessous de 500 par kg de sol (ITAB, 2002).Le NPP contenu dans chaque sol rhizosphérique à été considéré comme étant acceptable.

III. ACTIVITE MICROBIENNE DES SOLS

III.1. Activité microbienne globale des sols mesurée par l'hydrolyse de la FDA

Le résultat de la quantité de fluorescéine produite par l'hydrolyse de la FDA, réalisée dans chaque type de sol, est représenté par la figure 2. Etant donné que dans cette réaction d'hydrolyse, la quantité du produit d'hydrolyse exprime l'activité microbienne globale au niveau du sol, le sol sous *Clidemia hirta* présente une activité microbienne importante suivi par celui de *Conyza sumatrensis*. Pourtant, aucune différence significative

n'a été observée parmi les quatre types de sol rhyzosphérique. Toutefois, ces données ne renseignent pas sur les groupes ou les types de microorganismes stimulés.

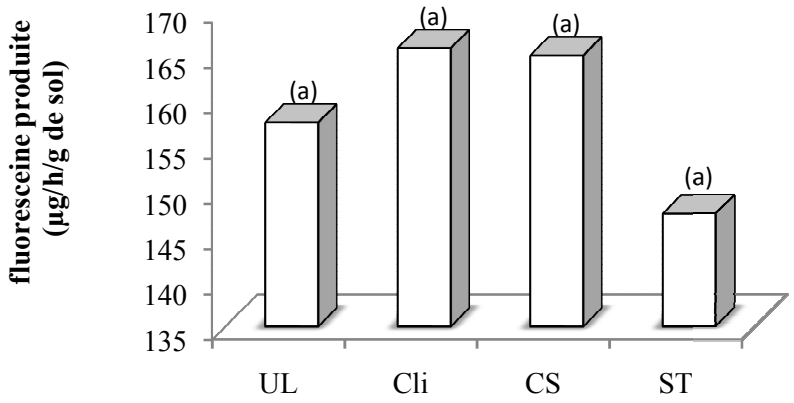

Figure 4: Activité microbienne globale des sols sous les quatre plantes pionnières. UL: *Urena lobata*, Cli: *Clidemia hirta*, CS: *Conyza sumatrensis,* ST: *Solanum torvum.* *Les histogrammes marqués par la même lettre ne présentent pas de différence significative selon le test de Newman-Keuls au seuil de probabilité 0.05

III.2. Activités des enzymes phosphatasiques des sols

Dans cette partie, l'investigation a porté sur l'activité des enzymes phosphatasiques des sols sous deux conditions de réaction soit en milieu acide, soit en milieu alcalin (figure 3). Les activités des deux enzymes (phosphatase acide et phosphatase alcaline) ont été toutes bien décelées par le suivie de l'hydrolyse du p-NitroPhényl Phosphate (p-NPP) en p-Nitrophénol. La quantité de p-Nitrophénol produite le plus élevé a été mesurée dans le sol sous *Solanum torvum*. Généralement, la quantité de p-Nitrophénol produite a été plus élevée en milieu alcaline qu'en milieu acide.

Une différence significative a été observée sur l'activité des enzymes phosphatasiques entre les différents sols rhyzosphériques.

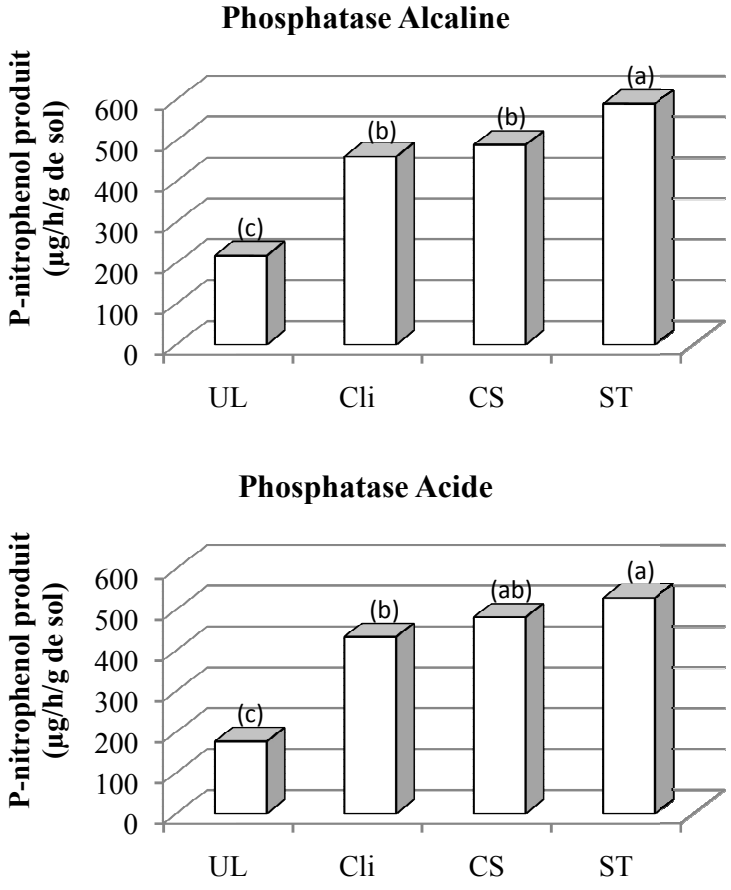

Figure 5: Quantité des produits d'hydrolyse du phosphate en milieu acide et alcaline. UL: *Urena lobata*, Cli: *Clidemia hirta*, CS: *Conyza sumatrensis*, ST: *Solanum torvum*. *Les histogrammes marqués par la même lettre ne présentent pas de différence significative selon le test de Newman-Keuls au seuil de probabilité 0.05.

DISCUSSION

DISCUSSION

L'objectif de cette étude était (i) de sélectionner des plantes pionnières, (ii) d'évaluer le potentiel mycorhizogène du sol des zones cultivées en considérant le taux de colonisation des champignons mycorhiziens à vésicule et arbuscule au niveau des racines des plantes d'étude et (iii) d'analyser les propriétés microbiologiques des sols de culture.

Evaluation du potentiel infectieux mycorhizogène du sol des zones cultivées combinées au statut mycorhizien des racines des plantes d'étude.

Nos observations ont permis d'établir le statut mycorhizien des plantes étudiées. Les résultats ont montré la capacité associative des plantes en milieu naturelle avec les CMVA et le classement des espèces comme étant moyennement mycotrophes d'après le classement de Ganon *et al*. (1991). Par ce statut, les quatre espèces peuvent potentiellement tenir le rôle en tant que plante nurse. Mais pour les différencier, ces données qualitatives doivent être complétées par des données quantitatives. Par ailleurs, *Conyza sumatrensis* atteint 50% de taux de mycorhization, cette capacité pourrait être présentée comme étant un avantage parmi les autres.

L'évaluation du PIM du sol nous contribue à la connaissance de l'efficacité de présumées plantes nurses. Les résultats de l'évaluation de la densité des spores isolées issues des sols rhizosphériques des plantes ont montré une légère différence du nombre de spores contenu dans 100g de sol rhizosphérique. La moyenne par espèce obtenue varie de 0,74 à 2,86 spores/grammes de sol. Dans la littérature, la densité des spores déterminée dans différentes expériences est très variable. Différents auteurs affirment des valeurs allant de 0,4 à 89 spores/g de sol dans des sols forestiers, site d'agriculture et des jachères (Smith & Read, 2008; Guadarama *et al.,* 2008). Les résultats obtenus se situent dans cette large gamme de valeur. *Urena lobata* et *Clidemia hirta* hébergent le plus grand nombre de spore par gramme de sol sec parmi les quatre plantes étudiées. Or, les spores sont parmi les propagules permettant une identification de l'espèce avec un certain degré de certitude (Smith & Read, 2008).

La mesure de la longueur des hyphes extraracinaires est essentielle pour les raisons qu'ils soient impliqué directement dans la recherche de plantes hôtes et dans l'acquisition des nutriments et aussi la formation des réseaux mycorhiziens (Smith & Read, 2008). L'abondance d'hyphes extraracinaires peut témoigner une forte colonisation racinaire de la

plante (Henry, 2012). Les valeurs moyennes par espèces obtenues ont été comprises entre 0,56 et 0,79m/g de sol. La littérature montre une variation énorme de la longueur des hyphes allant de 0,06m/g de sol (Smith & Read, 2008) à environ 100 m/g de sol (Mc Gonigle & Miller, 1999). Il n'y a pas de différence significative entre la longueur des hyphes par espèce étudiée dans notre cas. Malgré tout, *Clidemia hirta* se révèle être une espèce favorisant plus que les autres le développement du mycélium extraracinaire dans le sol (0,79m/g de sol).

Suite à la détermination du PIM par la méthode du Nombre le Plus Probable de propagules (NPP) (Porter, 1979), les résultats obtenus (entre 131,54 et 234,90 propagules/100 grammes de sol) sont plus proches de ceux de Guadarrama *et al.* (2008) (4 et 421 propagules/100 grammes de sol sur des jachères). L'ITAB (2002) propose comme référence le nombre probable des propagules contenu par kg de sol qui est jugé acceptable autour de 1500 par kg de sol, et trop faible en dessous de 500 par kg de sol. Les résultats obtenus tournent autour de 1500 par kg de sol. Les quatre espèces présentent un NPP acceptable. Cependant, *Conyza sumatrensis* présente plus de 1,5 fois supérieure de NPP par gramme de sol par rapport aux autres types de sol. Cette espèce peut être considérée comme plante nurse garantissant une forte production de propagules mycorhizienne dans son rhizosphère.

Malheureusement, il existe des limites à la méthode du NPP. Cette méthode ne permet pas de distinguer l'importance relative des différents types de propagules en termes de spécificité pour la plante hôte (Liu & Luo, 1994). C'est pour éviter cela que la plante utilisée comme hôte est une plante hautement mycotrophe (*Shorgum bicolor*).

L'évaluation du PIM des quatre plantes ont permis de mieux comprendre et de mieux classifier ce qui peuvent être considérées comme des plantes nurses efficaces. *Conyza sumatrensis* présente le NPP la plus élevée avec un statut mycorhizien atteignant 50%. Pourtant, le nombre de spores est faible avec une quantité d'hyphe extraracinaire moyen. *Clidemia hirta* présente un nombre de spores et longueur d'hyphe sensiblement corrélé.

Les résultats ont montré qu'il n'y a aucune relation entre le taux de mycorhization, le nombre de spores, et la longueur d'hyphe pour les quatre espèces. Mais, chaque plante est caractérisée par son propre point fort spécifique. Ce type de résultat a déjà été observé dans de nombreux travaux de recherche (Smith & Read, 2008).

Evaluation de l'activité microbienne des sols

L'évaluation de la dynamique des microorganismes du sol au niveau de la rhizosphère des quatre plantes a montré une variation considérable de l'activité microbienne. La mycorhization avait beaucoup d'influence sur la communauté microbienne cultivable du sol. Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse de la FDA sont produites par la majorité des microorganismes fonctionnels dans le sol (Guilbault et Kramer, 1964). C'est pourquoi, une activité enzymatique intense ou élevée est considérée comme synonyme d'une forte activité microbienne globale du sol. Les activités microbiennes globales n'ont pas présenté de différences significatives pour les quatre plantes étudiées. Par contre, les activités phosphatasiques ont été significativement plus élevées avec le sol prélevé sous *Solanum torvum* par rapport aux trois autres plantes. Dick et Tabatabaï (1992) ont déjà signalé que l'activité microbienne globale ne dépend pas forcement de la quantité de microorganismes présent dans le sol. Il est donc probable que l'activité intense des enzymes phosphatasiques serait due à la présence d'une population microbienne spécifique au niveau du sol de chaque espèce étudiée. En effet, des enzymes généralement impliquées dans la dégradation des matières organiques complexes pour la libération des éléments minéraux tels que l'azote, le phosphore, le potassium etc. sont mises en jeu dans cette réaction d'hydrolyse. Impliquées dans la biodisponibilité de ces minéraux, ces enzymes tiennent des rôles importants dans le développement des plantes. On peut en déduire que parmi les quatre espèces, *Solanum torvum* présente une activité phosphatasique significativement élevée. Cette activité élevée des enzymes phosphatasiques est à l'origine de l'amélioration de la nutrition minérale des plantes étant donné que le phosphore figure parmi les éléments les moins mobiles au niveau du sol (Kucey *et al.,* 1989). Et selon Barea *et al.*, 2005, la qualité biologique du sol fait référence à l'abondance, à la diversité et à l'activité des organismes vivants qu'il abrite.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif est de sélectionner des plantes pionnières et d'évaluer leur potentiel à améliorer la qualité biologique du sol, d'une part, par leur capacité à favoriser la propagation et l'efficacité des propagules de champignons endomycorhiziens à vésicules et à arbuscules dans le sol et d'autre part, par l'activité de certains enzymes d'intérêt agronomique. Après un inventaire floristique du site d'étude, les quatre espèces ont été retenues comme matériel d'étude. L'étude symbiotique de ces espèces a montré que ces plantes s'associaient avec des endomycorhizes. Des études quantitatives sur le sol ont été effectuées afin de déterminer l'espèce plus efficace. La détermination de la longueur des hyphes externes dans le sol, une étude de la densité des spores présentes dans le sol, ainsi que la détermination du potentiel infectieux mycorhizien de ces sols ont été réalisées dans un premier temps suivi de l'évaluation de l'activité de certains enzymes du sol à intérêt agronomique. Les résultats obtenus n'ont pas permis de faire ressortir une espèce en particulier car ils étaient parfois divergents. *Conyza sumatrensis* présente un statut mycorhizien et NPP plus élevé. Suivie de *Solanum torvum* avec une activité phosphatasique plus prononcée. Un grand nombre de spores pour *Urena lobata* et le plus long hyphe mesuré pour *Clidemia hirta*. Malgré cette divergence, chaque expérience permettait de mettre en évidence la capacité et les points forts de chaque espèce. Parmi les plantes testées, *Conyza sumatrensis* présente la qualité requise pour devenir une plante nurse efficace. Toutefois la combinaison de plusieurs espèces de plantes nurses pourrait permettre de cumuler les effets sur la population fongique du sol et la communauté végétale existante.

Il est essentiel de consacrer les futurs études sur plusieurs points dont:

- L'évaluation des caractéristiques physico-chimiques des sols.
- La mise en place des essais de culture associée «plante d'étude-plante cultivée».
- La considération des types de spore isolée à partir des sols rhizosphériques des plantes.
- L'augmentation des nombre d'essai pour chaque espèce pendant la mesure de la longueur des hyphes, l'isolement des spores et l'évaluation de l'activité enzymatique du sol.

Par la suite de nouvelles perspectives de recherche s'ouvrent aux voies de recherche relatives:

- à l'action de plantes associées aux autres plantes dans la restauration écologique de zones dégradées
- à la pratique de la mycorhization contrôlée en agriculture qu'en reforestation.
- à une meilleure compréhension des plantes pionnières et plantes nurses dans les différentes interactions.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Achat D, Bakker M & Trichet P. 2008. Rooting patterns and fine root biomass of Pinus pinaster assessed by trench wall and core methods. *Journal For Restoration* 13:165-175.

Aguiar MR, Sala OE. 1999. Patch structure, dynamics and implications for the functioning of arid ecosystems. *Trends in Ecology and Evolution.* 14: 273–277.

Alef K. 1998. Estimation of the hydrolysis of fluorescein diacetate. In: Alef K. and Nannipieri P. (Eds), Methods in applied soil microbiology and biochemistry. *Academic Press London*. 232 – 233.

André G. 1946. Propriétés générales des sols en agriculture. *Collection Armand Colin*. 184pp.

Anthelme, F., Michalet, R. 2009. Grass-to-tree facilitation in an arid grazed environment (Aïr Mountains, Sahara). *Basic and Applied Ecology*. 10: 437–446.

Armas C, Ordiales R, Pugnaire FI.2004. Measuring plant interactions: a new comparative index. *Ecology.* 85(10): 2682-2686.

Auger, Isabelle, Pierre Grondin, Denis Hotte, Daniel Mailly, Jean Noël, Stéphane Tremblay, Claude Gagné, François Labbé, Jacques Blouin, Frédéric Dufour et Rémi Gagnon. 2004. Détermination de l'âge approximatif d'entrée en sénescence des principaux peuplements forestiers à l'aide des placettes-échantillons temporaires. Ministère des Ressources naturelles de la Faune et des Parcs, Québec; 44 pp.

Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A,Piché Y. 1998. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 139: 375-388.

Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000. Update on Symbiosis Arbuscular Mycorrhizas. *Plant physiology.* 124: 949–957.

Bais, H.P., T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy, and J.M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology.*57: 233-266.

Baohanta, R.H. 2011. Facilitation de la régénération d'*Uapaca bojeri* par les gestions des communautés de champignons mycorhiziens associés aux espèces pionnières de la zone dégradée de la forêt sclérophylle d'Arivonimamo. Thèse de Doctorat en science de la vie. Faculté des sciences, Université d'Antananarivo; 190 pp.

Barber SA. 1984. Phosphorus. In: *Soil nutrient bioavailability*. A mechanistic approach. A Wiley Interscience Publication, John Willey & Sons, New York, 201-228.

Barea J.M., Pozo M.J., Azcon R., Azcon-Aquilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal Experimental Botany.* 56: 1761-1778.

Bascompte, J. & Jordano, P. 2007. Plant-Animal Mutualistic Networks: The Architecture of Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.* 38(1): 567-593.

Bellingham, P.J., Walker, L.R. & Wardle, D.A. 2001. Differential facilitation by a nitrogenfixing shrub during primary succession influences relative performance of canopy tree species. *Journal of Ecology.* 89: 861-875.

Berendsen R.L., Pieterse C.M., Bakker P.A. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*. 17: 478-486.

Besserer A. 2008. Etude des mécanismes d'action des strigolactones sur les champignons endomycorhiziens à arbuscules. Thèse de Doctorat en Biosciences végétales. Université de Toulouse III- Paul Sabatier. Chapitre I. 32pp.

Betencourt E. 2012. Interactions entre cereal et légumineuse en association et acquisition de phosphore du sol: processus rhizosphériques sous-jacents. Thèse de Doctorat en Ecosystème. Centre International d'études supérieures en sciences Agronomiques., Montpellier. 224pp.

Binelli EK, Gholz HL, Duryea ML. 2000. Plant Succession and Disturbances in the Urban Forest Ecosystem. SW-140, "Restoring the Urban Forest Ecosystem", Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.Ch IV. 23pp.

Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell.* 7: 1099–1111.

Bonfante P, Genre A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications.* 1(48): 11pp.

Bouchet P, Guingnard J-L, Pouchus Y-F, Villard J. 1999. Les champignons: Mycologie fondamentale et Appliquée (1eds). Masson, Paris. 183pp.

Bowen GD and Rovira AD. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*. 66: 1–102.

Brassard, B. W., et H. Y. H. Chen. 2006. «Stand structural dynamics of North American boreal forests». *Critical Reviews in Plant Sciences.* 25(2): 115-137.

Brooker, R., Kikvidze, Z. 2008. Importance: an overlooked concept in plant interaction research. *Journal of Ecology.* 96: 703–708.

Brundrett M. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist.* 154:275–304.

Brundrett, M.C. Piche, Y. Peterson, R.L. 1985. A developmental study of the early stages in vesicular arbuscular mycorrhizal formation. *Canadian Journal of Botany.* 63: 184-194.

Bruno J.F., Stachowicz J.J., Bertness M.D. 2003. Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology and Evolution.*18: 119-125.

Callaway RM. 2007. Positive Interactions and Interdependence in Plant Communities. *Springer, Dordrecth, The Netherlands.*

Carrière S. M., Andrianotahiananahary H., Ranaivoarivelo N., Randriamalala J. 2005. Savoirs et usages des recrus post-agricoles du pays betsileo : valorisation d'une biodiversité oubliée àMadagascar, Vertigo. *La revue en sciences de l'environnement*. 6(1) : 1-14.

Casper BB, Jackson RB. 1997. Plant Competition underground. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 28: 545-570

Cavieres, L.A., Badano, E.I., Sierra-Almeida, A., Gomez-Gonzalez, S., Molina-Montenegro, M.A. 2006. Positive interactions between alpine plant species and the nurse

cushion plant *Laretia acaulis* do not increase with elevation in the Andes of central Chile. *New Phytologist*. 169: 59–69.

Citeau L., Bispo A., Bardy M., King D. 2008. Gestion durable des sols. Editions Quae, Versailles.

Clements F.E. 1916. Plant succession: analysis of the development of vegetation. *Carnegie Institute Washington Publication*. 242: 1-512.

Davet P. 1996. Mieux comprendre: Vie microbienne du sol et production végétale. Paris: INRA. 206-210.

Dick, W.A., Tabatabaï M.A. 1992. Significance and potential uses of soil enzymes. In: *Soil Microbial Ecology*. Application in Agricultural and Environmental Management. F. Blaine Metting Jr, Ed, Marcel Dekker (N.Y.). 95-127.

Dickie IA, Schnitzer SA, Reich PB, Hobbie SE. 2005. Spatially disjunct effects of co-occurring competition and facilitation. *Ecology Letters*. 8: 1191–1200.

Dommergues Y., Mangenot F. 1970. Ecologie microbienne du sol. Paris: Masson, 76pp.

Dormann, C.F., Brooker, R.W. 2002. Facilitation and competition in the high Arctic: the importance of the experimental approach. *Acta Oecologica*. 23: 297–301.

Duff MG, Sarath G & Plaxton WC. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiology of Plant* 90: 791-800.

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.

Elvazi F, Tabatabai HA. 1977. Phosphatase in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 9: 167-172.

Fisher, R.A. & Yates, F. 1963. Statistical tables for biological, agricultural and medical research *6th ed*., Londres: Oliver And Boyd. 155pp.

Folke, C., Carpenter S., Walker B., Scheffer M., Elmqvist T., Gunderson L., Holling C.S. 2004. Regime shifts, resilience, and biodiversity in ecosystem management. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 35, 557–581.

Frey-Klett P, Chavatte M, Clausse ML, Courrier S, Roux CL, Raaijmakers J, Martinotti MG, Pierrat JC, Garbaye J. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist.* 165(1): 317–328.

Gahoonia TS & Nielsen NE. 1997. Variation in root hairs of barley cultivars doubled soil phosphorus uptake. Euphytica 98: 177-182.

Gagnon, J., Langlois, C.G. et Garbaye, J. 1991. Growth of ectomycorrhiza formation of container-grown red oak seedling as a function of nitrogen fertilization and inoculum type of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal For Restoration.* 21: 966-973.

Gentili F. and Jumpponen A. 2006. Potential and possible uses of bacterial and fungal biofertilizers. In Handbook of microbial biofertilizers.eds. by M.K. Rai. *The Haworth press, New York*. 543pp.

Giri B, Giang PH, Kumari R, Prasad R, Varma A. 2005. Microbial diversity in soils. In: Buscot F, Varma S, eds. Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 195-212.

Gobat JM, Aragno M, Matthey W. 2010. Le sol vivant, 3e Edition revue et augmentée. Presses Polytechniques Universitaires Romandes, Lausanne. 817pp.

Gobat, J.M., Aragno, M. & Matthey, W. 2003. Le sol vivant, 2e Edition. Presses Polytechniques Universitaires Romandes, Lausanne. 568pp.

Godfroy O. 2008. Etude génétique et moléculaire de deux gènes de Medicago truncatula, DM13 et RPG, contrôlant l'établissement de symbioses racinaires. Thèse Université P. Sabatier, Toulouse, 142pp.

Gómez-Aparicio, L., 2009. The role of plant interactions in the restoration of degraded ecosystems: a metaanalysis across life-forms and ecosystems. *Journal of Ecology*. 97: 1202-1214.

Guadarrama, P., Castillo-Argüero, S., Ramos-Zapata, J.A., Camargo-Ricalde, S.L. & Álvarez-Sánchez, J. 2008. Propagules of arbuscular mycorrhizal fungi in a secondary dry forest of Oaxaca, Mexico. *Revista de Biología Tropical.* 56(1): 269-277.

Guilbault, G.G. and Kramer D.N. 1964. Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha- and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. *Analytical Chemistry.* 36: 409-412.

Hamel C. & Plenchette C. 2007. Mycorrhizae in Crop Production, Edit. *Haworth Food & Agricultural Products Press.* 366 pp.

Hart MM, Reader RJ, Klironomos JN. 2003. Plant coexistence mediated by arbuscular mycorrhizal fungi. *Trends in Ecology & Evolution.*18: 418-423.

Hartmann A., Rothballer M., and M., Schmid. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil.* 312: 7-14.

Henry C. 2012. Identification de plantes nurses potentielles pour améliore la croissance des plantes cibles pour la réhabilitation post-exploitation de la mine d'Ambatovy à Madagascar. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur forestier. Montpellier: AgroParisTech. 90pp.

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.

Hofmann, E. et Seegerer A. 1951. Soil enzymes as factors of fertility. *Naturwissenschaften.* 38: 141-142.

Humphreys CP, Franks PJ, Rees M, Bidartondo MI, Leake JR, Beerling DJ. 2010. Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature communications*.1, 103.

ITAB (Institut Technique de l'Agriculture Biologique). Octobre 2002. Activité biologiques et fertilité des sols: Intérêts et limites des méthodes analytiques disponibles, Première édition. 28pp. [http://www.itab.asso.fr/downloads/com-agro/acti-bio-ferti-sol-8-novembre-2002.pdf], (26 Avril 2015), 158,73 Ko.

Johansson JF, Paul LR & Finlay RD. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*. 48: 1–13.

Jones CG, Lawton JH, Shachak M. 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*. 69: 373-386.

Jones CG, Lawton JH, Shachak M. 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology*. 78: 1946-1957.

Jones DL. 1998. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. Plant Soil 205: 25-44.

Kucey R.M.N. and Leggett M.E. 1989. Increased yields and phosphorus uptake by Westarcanola (Brasssica napus L.) inoculated with a phosphatesolubilizing isolate of Penicillium bilaji. *Canadian Journal of Soil Science.* 69: 425-432.

Kylafis G, Loreau M. 2008. "Ecological and evolutionary consequences of niche construction for its agent". *Ecology letters.* (11): 1072- 1081.

Laland KN, Kendal JR, Brown. GR. 2007. The niche construction perspective: implications for evolution and human behavior. *Journal of Evolutionary Psychology.* 51(4): 51–66**.**

Laland KN, Odling-Smee FJ, Feldman MW. 1996. The evolutionary consequences of niche construction; a theoretical investigation using two-locus theory. *Journal of Evolutionary Biology*. 9: 293–316.

Lambers, H., Raven, J.A., Shaver, G.R. & Smith, S.E. 2008. Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology & Evolution.* 23: 95-103.

Lamont B. 1983. Root hair dimensions and surface/volume/weight ratios of roots with the aid of scanning electron microscopy. *Plant Soil* 74: 149-152.

Larwanou M et Saadou M. 2011. The role of human interventions in tree dynamics and environmental rehabilitation in the Sahel zone of Niger. *Journal of Arid Environments.* 75: 194-200.

Lemanceau P., Heulin T. 1998. La rhizosphère. In: Sol: interface fragile. Paris: INRA. 93-106.

Lepart J, Escarre J. 1983. La succession végétale, mécanismes et modèles : analyse bibliographique. *Bulletin Ecologique*. 14 (3): 133-178.

Liu RJ, Luo XS. 1994. A new method to quantify the inoculum potential of an arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist.* 128: 89–92.

Lopez RP, Valdivia S. 2007. The importance of shrub cover for four cactus species differing in growth form in an Andean semi-desert. *Journal of Vegetation Science*. 18: 263-270.

Ludwig, F., Dawson, T.E., Prins, H.H.T., Berendse F., De Kroon H. 2004. Below-ground competition between trees and grasses may overwhelm the facilitative effects of hydraulic lift. *Ecology Letters*.7: 623-631.

Lundgren, B. 1981. Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil.*Oikos*. 36: 17–22.

Matthew, G. S., Irving, A. M. 2007. Use of experimental disturbances to assess resilience along a known stress gradient.*Ecological indicators.* 8: 181-190.

McGonigle, T.P., Miller, M.H. 1999. Winter survival of extraradical hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *Applied Soil Ecology.* 12: 41-50.

MEFT, USAID et CI. **2009.** Evolution de la couverture de forêts naturelles à Madagascar, 1990-2000-2005. *Conservation International, Madagascar.*

Newman, E. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology.* 3(1): 139-145.

Nyvall, R.F. 1999. Field Crop Diseases, 3d edition. *Iowa State University Press*.

Ouahmane L, Revel JC, Hafidi M, Thioulouse J, Prin Y, Galiana A, Dreyfus B, Duponnois R. 2009. Responses of *Pinus halepensis* growth, soil microbial catabolic functions and phosphate-solubilizing bacteria after rock phosphate amendment and ectomycorrhizal inoculation. *Plant and Soil.* 320(1-2): 169–179.

Ouahmane L. 2007. Rôles de la mycorhization et des plantes associées (lavande et thym) dans la croissance du cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica G.*) : conséquences sur la biodiversité rhizosphérique et la réhabilitation des milieux dégradés, thèse de doctorat. Universite cadi ayyad Faculté des Sciences Semlalia. 196pp.

Padilla, F. & Pugnaire, F. 2006. The role of nurse plants in the restauration of degraded environments. *Frontiers in Ecology and the Environment.* 4(4): 196-202.

Pfund, J.L. 2000. Culture sur brûlis et gestion des ressources naturelles. Evolution et perspectives de trois terroirs ruraux du versant Est de Madagascar. Thèse (EPFZ) Ecole polytechnique fédérale de Zurich n°13966, Suisse. 323pp.

Phillips J.M. and Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55: 158-161.

Pidwirny M. 2006. "Plant Succession".Fundamentals of Physical Geography, 2nd Edition.

Plenchette C. 1982. Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA). Un potentiel à exploiter en agriculture. *Phytoprotection*.63: 86-108

Plenchette C., C. Morel. 1996. External phosphorus requirement of mycorrhizal and nonmycorrhizal barley and soybean plants. *Biology Fertility Soils*. 21:303-308.

Porter WM. 1979. The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil.*Australian Journal of Soil Research.* 17: 515–519.

Pugnaire, FI, Armas C, Valladares F. 2004. Soil as a mediator in plant–plant interactions in a semi-arid community. *Journal of Vegetation Science*. 15: 85–92.

Quezel P. & Medail F. 2003 : Ecologie et biogéographie du bassin méditerranéen. *Edition scientifiques et médicales Elsevier Sas.* 571pp.

Ramanankierana H., Rakotoarimanga N., Thioulouse J., Kisa M., Randrianjohany E., Ramaroson L. & Duponnois R. 2006. The ectomycorrhizosphere effect influences functional diversity of soil microflora. *International Journal of Soil Sciences.*1 (1): 8 – 19.

Ramanankierana N., Ducousso M., Rakotoarimanga N., Prin Y., Thioulouse J., Randrianjohany E., Ramaroson L., Kisa M., Galiana A. and Duponnois R. 2007. Arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas of *Uapaaca bojeri* L. (Euphorbiaceae): sporophore diversity, patterns of root colonization, and effect on seedling growth and soil microbial catabolic diversity. *Mycorrhiza.*17: 195-208.

Randriambanona H. 2008. Successions ecologiques 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. 122pp.

Rasse D.P., Rumpel C. et Dignac M.-F. 2005. Is soil carbon mostly root carbon? Mechanisms for a specific stabilization. *Plant and soil.* 269: 341-356.

Read D.J., Duckett J.G., Francis R., Ligrone R. & Russell A. 2000. Symbiotic fungal associations in 'lower'land plants.Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B 6. *Biology Sciences*.355: 815-830.

Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science*. 289: 1920–1921.

Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 11841–11843.

Renaut S. 2007. Symbiose mycorhizienne: entre champignons et racines, c'est…donnant donnant! [http://sebastien.renaut.com/wp/wp-content/uploads/2013/10/Renaut-06-4T-small.pdf], (06 Mars 2015), 1,38 Mo.

Schachtman DP, Reid RJ & Ayling SM. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* 116: 447-453.

Schinner F, Öhlinger R, Kandeler E, Margesin R. 1995. Methods in Soil Biology, *Springer Lab Manual.*Springer, Berlin. 426pp.

Selosse M-A, Baudoin E, Vandenkoornhuyse P. 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes rendus Biologies*. 327: 639-648.

Simard SW, Durall DM. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany*.82: 1140-1165.

Simon L, Bousquet J, Lévesque C, Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*.363: 67-69.

Smith S.E., Gianinazzi-Pearson V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 39: 221–224.

Smith S.E., Read D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis, 2nd edition. *San Diego: Academic Press*. 605pp.

Smith S.E., Read D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd edition. *New York: Academic Press*. 815pp.

Stubblefield S.P., Taylor T.N.etTrappe G.M. 1987. Fossil mycorhizae: a case for symbiosis. *Science.* 237: 59-60.

Tabatabai MA. 1982. Soil enzymes. in Methods of Soil Analysis. Part 2. (A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney, eds.). *Agronomy*. 9: 903-947.

Trouvelot, A., J.L Kough, V. Gianinazzi-Pearson. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système radiculaire. Recherche et méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Dans : Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes, Dijon, 1985. INRA.217-221.

Turner BL, Frossard E & Baldwin DS. 2005. Organic phosphorus in the environment. CABI Pulishing, 875 Massachusetts Avenue, Cambrige, USA, 399 p.

Van der Heijden MGA,Wiemken A & Sanders IR. 2003. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occuring plant. *New Phytology*. 157: 569–578.

Went FW. 1973. Competition Among Plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, PNAS*. 70 (2): 585-590.

Whipps, J.M. 2004, «Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens», *Canadian Journal of Botanyl, Revue canadienne de botanique*. 82: 1198-1227.

Wieland, G., Neumann, R. & Backhaus, H. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development.*Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5849-5854.

Yanai RD. 1992. Phosphorus budget of a 70-year-old northern hardwood forest.*Biogeochemistry*. 17: 1–22.

Yao Q, Li XL, Ai WD, Christie, P. 2003. Bi-directional transfer of phosphorus between red clover and perennial ryegrass via arbuscular mycorrhizal hyphal links.*European Journal of Soil Biology*.39: 47-54.

Zouhaier N. 2010. *Acacia tortilis (Forssk.) Hayne subsp. raddiana (Savi)* Brenan en Tunisie pré-saharienne : structure du peuplement, réponses et effets biologiques et environnementaux. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques - Ecologie évolutive, fonctionnelle et des communautés. Tunisie: Faculté des Sciences de Sfax. 105pp.

Webographie:

soazigdarnay.over-blog.com

http://www.imbio.uni-bonn.de/molekulare-biotechnologie/forschung/Figure8.png

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1: Classification des plantes à étudier

Urena lobata Règne : Plantae Classe : Equisetopsida Ordre : Malvales Famille: Malvaceae Genre : *Urena* espèce : *Urena lobata* *nom vernaculaire: besofina*	*Clidemia hirta* Règne : Plantae Classe : Equisetopsida Ordre : Myrtales Famille: Melastomataceae Genre : *Clidemia* espèce : *Clidemia hirta* *nom vernaculaire: mazambody*
Solanum torvum Règne : Plantae Classe : Equisetopsida Ordre : Solanales Famille: Solanaceae Genre : *Solanum* espèce : *Solanum torvum* *nom vernaculaire: angivy redaka*	*Conyza sumatrensis* Règne : Plantae Classe : Equisetopsida Ordre : Asterales Famille: Asteraceae Genre : *Conyza* espèce : *Conyza sumatrensis* *nom vernaculaire: maitso ririnina*

(Source: http://www.tropicos.com)

Annexe 2: Classification du Sorgho

Règne : Plantae
Division : Magnoliophyta
Classe : Equisetopsida
Ordre : Poales
Famille : Poaceae
Genre : *Sorghum*
espèce : *Sorghum bicolor*

(Source: http://www.tropicos.com)

Annexe 3: Moyenne (±ET) des fréquences des 8 espèces pionnières dans la zone d'étude.* plantes étudiées.

Espèces	**Familles**	**Fréquences (%)**
**Solanum torvum* Sw.	Solanaceae	60,3±13
**Urena lobata* L.	Malvaceae	55,6±22
**Clidemia hirta* (L.) D. Don	Melastomataceae	53,8±9
Humbertacalia tomentosa (Lam) C. Jeffrey	Asteraceae	52,9±10
Psiadia altissima (DC.) Drake	Asteraceae	51,8±18
Rubus moluccanus L.	Rosaceae	51,5±6
Lantana camara L.	Verbenaceae	51,1±12
**Conyza sumatrensis* (Retz) E.	Asteraceae	50,2±10

Annexe 4: Calcul du nombre le plus probable de propagule

Le nombre le plus probable de propagules fongiques (NPP) contenu dans le pot sans dilution est donné par

$$\log 10\,\mathrm{NPP} = \mathrm{x}\log \mathrm{a} - \mathrm{K}$$

où **a** est le facteur de dilution soit 4 dans notre cas.

Donc $\log 10\,\mathrm{NPP} = 0.60206\mathrm{x} - \mathrm{K}$

x représente le niveau fertile moyen.

$$\mathrm{x} = \frac{nombre\ total\ de\ plantes\ mycorhizées}{nombre\ de\ cultures\ pour\ chaque\ dilution}$$

soit dans notre cas :

$$\mathrm{x} = \frac{nombre\ total\ de\ plantes\ mycorhyzées}{5}$$

La valeur de K doit être lue dans la table proposée par W.L Stevens (Fisher & Yates, 1963).

Valeurs du facteur k pour des dilutions de facteur 4

nombre de dilutions							
x	4	5	6 ou plus	y	4	5	6 ou plus
0.4	0.704	0.706	0.707	3.5			0.55
0.6	0.615	0.617	0.618	3			0.548
0.8	0.573	0.576	0.577	2.5		0.545	0.545
1	0.555	0.558	0.559	2	0.537	0.537	0.537
1.5	0.545	0.551	0.553	1.5	0.522	0.522	0.522
2	0.573	0.548	0.551	1	0.488	0.488	0.488
2.5		0.545	0.552	0.8	0.464	0.464	0.464
			0.552*	0.6	0.431	0.431	0.431
				0.4	0.375	0.375	0.375

La valeur K est déterminée en entrant dans la table avec x ou y.

y représente le niveau stérile moyen.

$$\mathrm{y} = nombre\ de\ niveau\ de\ dilution - \mathrm{x}$$

soit dans notre cas: $\mathrm{y} = 6 - \mathrm{x}$

Annexe 5: Composition de la gamme étalon préparée à partir d'une solution standard de fluorescéine

	N° Tube					
	0	1	2	3	4	5
Tampon phosphate (µl)	1000	990	980	970	960	950
Acétone (µl)	1000	990	980	970	960	950
Solution standard de fluorescéine (µl)	0	10	20	30	40	50

Annexe 6: Classement de pourcentage de mycorhization selon Ganon et al. (1991)

Chaque cote représente une classe de pourcentage de mycorhization:

Cote 1: 0-5%
Cote 2: 6-25% } Infection mycorhizienne faible

Cote 3: 26-50% } Infection mycorhizienne moyenne

Cote 4: 51-75%
Cote 5: 76-100% } Infection mycorhizienne forte

Annexe 7: Préparation de la solution tampon potassium phosphate

Préparation de la solution stock : K_2HPO_4 et de KH_2PO_4 à 60 mM

- Dissoudre 8.7g de K_2HPO_4 et 1.3g de KH_2PO_4 dans 800ml d'eau distillée
- Ajuster le pH à 7.6 avec du NaOH.
- Compléter à 1000ml avec de l'eau distillée et conserver à 4°C.

Préparation de la solution tampon Universel Modifié

Solution stock : dissoudre dans 500ml de NaOH 1M successivement les produits suivant:

- Tris (hydroxymethyl) aminométhane : 12,1g
- Acide maléique : 11,5g
- Acide citrique monohydrate : 14g
- Acide borique : 6,3g

Compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée et conserver à (+4°C)

Tampon à pH 6: Prélever 200ml de la solution stock + 500ml H_2O distillée, ajuster le pH à 6 avec du HCl et compléter à 1litre.

Tampon à pH 11: Prélever 200ml de la solution stock + 500ml H_2O distillée, ajuster le pH à 11 avec du NaOH et compléter à 1litre

Annexe 8: Résultats globales

espèces	Phosphatase alcaline	Phosphatase acide	Activité microbienne globale	Longueur des hyphes	Densité de spore	NPP	Statut mycorhizien
UL	219(c)	177(c)	157(a)	0,56(a)	286(a)	132	37%
Cli	461(b)	433(b)	166(a)	0,79(a)	227(a)	132	30%
CS	489(b)	481(ab)	165(a)	0,70(a)	182(a)	235	50%
ST	590(a)	528(a)	147(a)	0,75(a)	74(a)	132	30%

Structure and functioning of Arbuscular and Vesicular Mycorrhizal Fungi associated with pioneers plants in the Ranomafana-East forest

ABSTRACT

The purpose of this study was to select pioneers plants to evaluate their potential improving the soil biological quality by their capacity, in one hand, to support the propagation and the efficiency of the soil vesicular arbuscular mycorrhizal fungi propagule, and in another hand, by the activity of some enzymes of agronomic interest. Roots and rhizosphere soils of the four pioneer species (*Urena lobata, Clidemia hirta, Solanum torvum, Conyza sumatrensis*) identified in older fallows 7 to 8 months were analyzed in the vicinity of Ankorabe (Ranomafana-East, Brickaville). The status of mycorrhizal plants, the mycorrhizal soil infectivity potential (spores density, hyphal length, and propagules probable number of rhizosphere soil) and microbial soil activities (global microbial activities, phosphatasic activity) were determined.

Results showed that *Conyza sumatrensis* presented the highest rate of mycorrhizal infection (50%), whereas under *Urena lobata* was the highest density of spores (3.5 times higher of that of *Solanum torvum*). Longer hyphal were recorded under *Clidemia hirta* ($0.79 mg^{-1}$) and *Solanum torvum* ($0.75 mg^{-1}$). Propagules probable number richness was found below *Conyza sumatrensis* (235 propagules probable number/100 g of soil). For soil microbial activity, *Clidemia hirta*(166 μg fluorescein h^{-1} g^{-1} soil) and *Conyza sumatrensis* (165 μg fluorescein h^{-1} g^{-1} soil) showed an important microbial activity, whereas only *Solanum torvum* showed a significantly high value for phosphatasic activity (alkaline Phosphatase: 590 μg p-nitrophenol h^{-1} g^{-1} soil, acid phosphatase: 528 μg p-nitrophenol h^{-1} g^{-1} soil). Among the tested plants, *Conyza sumatrensis* has the necessary quality to become an effective nurse plant. However the combination of several species of nurse's plants could make it possible to cumulate the effects on the soil fungal population and the existing plant community.

Keywords: Arbuscular and Vesicular Mycorrhizal fungi, pioneer species, nurse plant, interactions, *Urena lobata, Clidemia hirta, Solanum torvum, Conyza sumatrensis.*

Structure et fonctionnement des champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules associés aux plantes pionnières de la forêt de Ranomafana-Est

RESUME

L'objectif de cette étude était de sélectionner des plantes pionnières, d'évaluer leur potentiel à améliorer la qualité biologique du sol par leur capacité à favoriser la propagation et l'efficacité des propagules de champignons endomycorhiziens à vésicules et à arbuscules dans le sol d'une part, et par l'activité de certains enzymes d'intérêt agronomique d'autre part. Des racines et des sols rhizosphériques des quatre espèces pionnières (*Urena lobata, Clidemia hirta, Solanum torvum, Conyza sumatrensis*) recensées dans des jachères âgées de 7 à 8 mois ont été prélevés aux environs d'Ankorabe (Ranomafana-Est, Brickaville) et analysés. Le statut mycorhizien des plantes, le potentiel infectieux micorhizogène du sol (densité des spores, longueur des hyphes, et le nombre probable de propagules (NPP) des sols rhizosphériques) et les activités microbiennes du sol (activités microbiennes globales, activité phosphatasique) ont été déterminés.

Les résultats ont montré que *Conyza sumatrensis* présente un taux élevé d'infection mycorhizienne (50%), alors que sous *Urena lobata* se trouvait la plus forte densité en spores (3,5 fois supérieure de celle de *Solanum torvum*). Les plus longs hyphes (0.79 $m.g^{-1}$) ont été enregistrés dans les sols sous *Clidemia hirta* et sous *Solanum torvum*. La valeur de NPP (235 NPP/100g de sol) la plus élevée a été obtenue sous *Conyza sumatrensis*. Pour l'activité microbiennes du sol, *Clidemia hirta* (166 μg de fluoresceine h^{-1} g^{-1} de sol) et *Conyza sumatrensis* (165 μg de fluoresceine h^{-1} g^{-1} de sol) ont présenté une activité microbienne globale importante, alors que seul *Solanum torvum* a montré une valeur significativement élevée pour l'activité phosphatasique (Phosphatase alcaline: 590 μg de p-nitrophenol h^{-1} g^{-1} de sol, Phosphatase acide: 528 μg de p-nitrophenol h^{-1} g^{-1} de sol). Parmi les plantes testées, *Conyza sumatrensis* présente la qualité requise pour devenir une plante nurse efficace. Toutefois la combinaison de plusieurs espèces de plantes nurses pourrait permettre de cumuler les effets sur la population fongique du sol et la communauté végétale existante.

Mots clés: Champignons mycorhiziens à vésicules et à arbuscules, espèces pionnières, plante nurse, interactions, *Urena lobata, Clidemia hirta, Solanum torvum, Conyza sumatrensis.*

Auteur : ANDRIATAHIANA Lantoniaina Eric

Encadreurs : Dr BAOHANTA Rondro Harinisainana

Dr RANDRIAMBANONA Herizo Andrianantoandro