



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

-----  
FACULTE DES SCIENCES  
-----

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE  
-----

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DE DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES  
EN SCIENCES DE LA VIE  
OPTION : BIOTECHNOLOGIE - MICROBIOLOGIE

Présenté par :

**RAJAONARIMAMY Elinarindra**

**Maître es-sciences**

**INFLUENCE DE LA DIVERSITE MYCORHIZIENNE SUR LA  
SYMBIOSE *Dalbergia trichocarpa* - RHIZOBIA ET SUR LA  
STRUCTURE DE LA MICROFLORE TELLURIQUE**

Soutenu publiquement le 07 janvier 2010 devant les membres de jury :

**Président** : Professeur JEANNODA Victor  
**Rapporteur** : Docteur RASOLOMAMPIANINA Rado  
**Examineurs** : Docteur RANDRIANIERENANA Ando  
Docteur RANDRIANARIVO Ranjana

*À ma famille pour leur confiance et leur soutien  
de tous les instants*

## Remerciements

Ce travail a essentiellement été réalisé dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE. Que le Directeur de ce centre, Professeur RAVELONANDRO Pierre trouve ici l'expression de la gratitude de m'avoir accueilli dans leur équipe.

Je voudrais adresser tout d'abord toute ma gratitude au Professeur JEANNODA Victor chef de département de Biochimie Fondamentale et Appliquée qui, malgré ses lourdes tâches, me fait l'honneur de présider mon jury de mémoire.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également à Madame le Docteur RANDRIANIERENANA Ando et à Monsieur le Docteur RANDRIANARIVO Ranjana qui, malgré leurs nombreuses responsabilités, ont pu se rendre disponibles afin de faire partie du jury.

Un grand merci à mon encadreur, Docteur RASOLOMAMPIANINA Rado, rapporteur de ce mémoire, pour le choix du sujet ainsi que pour les précieux conseils qu'il m'a toujours prodigués tout au long de ce travail.

Une mention spéciale au Docteur RAMAMONJISOA Daniel, co-encadreur de ce mémoire, pour la confiance qu'il m'a accordée ainsi que pour son intérêt pour le déroulement de ce travail. Sa sympathie et son profond humanisme ainsi que son soutien scientifique m'ont profondément touché.

Que le Docteur RAMANANKIERANA Heriniaina et Monsieur RAKOTOARIMANGA Nirina, Chercheurs au Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement trouvent ici mes sincères remerciements pour les multiples aides et conseils qu'ils n'ont cessé de me donner durant la réalisation de ce travail.

Egalement, j'exprime ma sympathie à toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE, chercheurs, techniciens et stagiaires, pour leur soutien et leur aide. Je garderai en mémoire le climat extrêmement chaleureux qui a toujours régné dans ce laboratoire tout au long de ce stage.

Je profite de l'occasion pour remercier aussi les personnels enseignants et non enseignants du Département de Biochimie Fondamentale et Appliquée, Faculté des Sciences, pour la formation qu'ils m'ont donnée durant mes années d'étude.

Je n'aurais sans doute pas été jusqu'au bout de mon mémoire sans l'aide de mes parents et de ma famille, je tiens ici à leur exprimer toute ma gratitude pour m'avoir toujours soutenu et aidé dans les moments difficiles.

**TABLE DES MATIERES**

<u>LISTE DES FIGURES</u> -----	<u>ii</u>
<u>LISTE DES TABLEAUX</u> -----	<u>ii</u>
<u>LISTE DES PHOTOS</u> -----	<u>iv</u>
-----	<b>2</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> -----	<b>3</b>
<b><u>I. Généralités sur les plantes</u></b> -----	<b><u>3</u></b>
<u>I.1. Description du genre Dalbergia</u> -----	<u>3</u>
<u>I.2. Description de Dalbergia trichocarpa</u> -----	<u>3</u>
-----	<u>4</u>
<u>I.3. Répartition de Dalbergia trichocarpa</u> -----	<u>4</u>
<u>I.4. Impact écologique et économique de Dalbergia trichocarpa</u> -----	<u>4</u>
<b><u>II. La rhizosphère</u></b> -----	<b><u>5</u></b>
<u>II.1. Les microflores de la rhizosphère</u> -----	<u>5</u>
<u>II.1.1. Les bactéries de la rhizosphère</u> -----	<u>5</u>
<u>II.1.2. Les « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (PGPR)</u> -----	<u>5</u>
<u>II.1.3. Les Actinomycètes</u> -----	<u>6</u>
<u>II.1.4. Les champignons de la rhizosphère</u> -----	<u>6</u>
<u>II.1.5. Autres microorganismes</u> -----	<u>6</u>
<b><u>III. La symbiose mycorhizienne</u></b> -----	<b><u>7</u></b>
<u>III.1. Classe et type de champignons mycorhiziens</u> -----	<u>7</u>
<u>III.2. Le rôle de la symbiose endomycorhizienne</u> -----	<u>8</u>
<u>III.3. La gestion de la symbiose mycorhizienne: la mycorhization contrôlée</u> -----	<u>10</u>
<b><u>IV. La symbiose fixatrice d'azote</u></b> -----	<b><u>10</u></b>
<u>IV.1. Partenaire végétal : les légumineuses</u> -----	<u>11</u>
<u>IV.2. Partenaire bactérien : les rhizobia</u> -----	<u>11</u>
<u>IV.3. La spécificité de la symbiose</u> -----	<u>12</u>

IV.4. Importance de la fixation biologique d'azote en zone tropicale-----	12
<b>V. Interactions biologiques dans la rhizosphère-----</b>	<b>13</b>
V.1. Interaction entre MVA et bactéries fixatrices d'azote-----	13
V.2. Interaction entre MVA et autres composantes de la flore du sol -----	14
<b>A-MATERIELS-----</b>	<b>15</b>
<b>I. La plante - hôte-----</b>	<b>15</b>
I.1. Position systématique de la plante-----	15
<b>II. Souches microbiennes-----</b>	<b>15</b>
II.1. Souche bactérienne-----	15
II.2. Souche fongique-----	15
<b>III. Milieux d'étude-----</b>	<b>16</b>
III.1. Milieu d'isolement-----	16
III.2. Milieux de dénombrement-----	16
III.3. Milieu pour la culture des plantes-----	16
III.4. Milieu pour la préparation de l'inoculum -----	16
<b>IV. Stérilisation-----</b>	<b>17</b>
<b>B. METHODES-----</b>	<b>18</b>
<b>I. Technique de préparation et de conservation des nodules -----</b>	<b>18</b>
<b>II. Isolement des souches de rizobia à partir des nodules -----</b>	<b>18</b>
II.1. Technique d'isolement-----	18
II.2. Conservation des souches-----	18
II.3. Tests de nodulation-----	19
II.3.1. Stérilisation et germination de graines -----	19
II.3.2. Inoculation des racines-----	20
II.4. Préparation de l'inoculum-----	20
II.4.1. Préparation de l'inoculum bactérienne-----	20
II.4.1.1. Préculture.....	20
II.4.1.2. Propagation.....	20

---

II.4.2. Préparation de l'inoculum fongique-----	20
II.5. Mycorhization de <i>D. trichocarpa</i> -----	21
<b>III. Paramètres mesurés-----</b>	<b>22</b>
III.1. Croissance de la plante-----	22
III.2. Nodulation de la plante-----	23
III.3. Taux d'endomycorhization-----	23
III.4. Dépendance mycorhizienne (DM)-----	23
III.5. Teneur en phosphore total des parties aériennes-----	23
III.5. 1. Extraction-----	24
III.5. 2. Dosage du phosphore-----	24
III.6. Teneur en azote total des parties aériennes-----	24
III.6.1. Principe-----	24
III.6.2. Mode opératoire-----	25
<b>IV. Dénombrement de la microflore tellurique-----</b>	<b>26</b>
IV.1. Dénombrement des groupes spécifiques-----	26
IV.1.1. Méthode quantitative : Dénombrement par la méthode des suspensions-dilutions -----	26
IV.1.1.1. Préparation de la solution mère.....	26
IV.1.1.2. Préparation de la solution dilution.....	26
IV.1.2. Dénombrement de la flore totale cultivable-----	26
IV.1.3. Dénombrement des Actinomycètes-----	26
IV.1.4. Dénombrement des <i>Pseudomonas fluorescents</i> -----	26
IV.1.5. Méthode de dénombrement-----	27
<b>V. Mesure des activités microbiennes du sol-----</b>	<b>27</b>
V.1. Activité microbienne totale du sol-----	27
V.1.1. Mesure de l'activité microbienne totale du sol-----	27
V.1.2. Calcul du produit d'analyse-----	28
V.2. Activités des phosphatases microbiennes du sol-----	28
V.2.1. Dosage du produit d'hydrolyse-----	28
V.2.2. Calcul du produit d'analyse-----	28
<b>VI. Traitement statistique des données -----</b>	<b>29</b>

---

**Figure 2 : Histogrammes montrant le dénombrement de quelques groupes de la flore tellurique dans les traitements inoculés ou les témoins ----- 37**

**DISCUSSION----- 44**

## **GLOSSAIRE**

**Arbuscules:** sièges des échanges avec la plante.

**Bactéries délétères:** ce sont des bactéries phytopathogènes qui provoquent ainsi plusieurs maladies racinaires et aériennes.

**Bactéries saprophytes:** ce sont des bactéries qui vivent aux dépens de la racine des plantes mais ne présentent pas d'inconvénients ni de profits pour la plante.

**Communauté mycorhizienne:** population mycorhizienne autour de la plante.

**Exsudat:** le résultat d'une sorte de suintement à partir de végétaux.

**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 de 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.

**Inoculum :** mycéliums bactériens ou fongiques destinés à l'inoculation.

**Mutualiste :** relation durable entre deux espèces ou deux populations avantageuses pour toutes les deux.

**Pyoverdines:** Pigments hydrosolubles jaune vert qui fluorescent sous rayonnement UltraViolet (UV) à 230 nm.

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

**Vésicules:** organes de stockage.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>BASM</b>	: Biomasse Aérienne Sèche des plants Mycorhizés
<b>BAST</b>	: Biomasse Aérienne Sèche des plants Témoins
<b>BNL</b>	: Bactéries Nodulant les Légumineuses
<b>°C</b>	: degré Celsius
<b>CFU</b>	: Colonie Formant Unité
<b>CMA</b>	: Champignons Mycorhiziens à Arbuscules
<b>CNRE</b>	: Centre National de Recherche sur l'Environnement
<b>cm</b>	: centimètre
<b>DM</b>	: Dépendance Mycorhizienne
<b>E</b>	: Essai
<b>FDA</b>	: Fluorescéine Diacétate
<b>g</b>	: gramme
<b>h</b>	: heure
<b>LCM</b>	: Laboratoire Commun de Microbiologie
<b>L</b>	: Litre
<b>m<sup>2</sup></b>	: mètre carré
<b>mg</b>	: milligramme
<b>min</b>	: minute
<b>ml</b>	: millilitre
<b>mm</b>	: millimètre
<b>MO</b>	: Matière organique
<b>MS</b>	: Matière sèche
<b>MVA</b>	: Mycorhize à Vésicule et Arbuscule
<b>nm</b>	: nanomètre
<b>PGPR</b>	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
<b>pH</b>	: potentiel hydrogène
<b>pNPP</b>	: p-Nitrophenyl Phosphate
<b>ppm</b>	: parti par million
<b>T</b>	: Témoin
<b>TE</b>	: Témoin Enzyme

<b>TM</b>	: Taux de Mycorhization
<b>TS</b>	: Témoin Substrat
<b>V</b>	: Volume
<b>YEM</b>	: Yeast Extract Mannitol

## **LISTE DES FIGURES**

- Figure 1** : Illustration schématique des trois principaux types de mycorhizes
- Figure 2** : Histogrammes montrant le dénombrement de quelques groupes de la flore tellurique dans les traitements inoculés ou les témoins
- Figure 3** : Histogramme montrant la quantité de Fluorescéine produite pour chaque traitement
- Figure 4** : Histogramme montrant la quantité des produits de l'hydrolyse du phosphate en milieu acide et alcalin
- Figure 5** : Histogramme montrant l'effet de l'inoculation sur le nombre de nodules par plant pour chaque traitement
- Figure 6** : Projection des variables sur les 2 axes factoriels de l'ACP
- Figure 7** : Projection des traitements sur les 2 axes factoriels de l'ACP
- Figure 8** : Aspect morphologique des souches microbiennes observées sur leur milieu de culture respectif



## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1** : Conditions de stérilisation et de scarification des graines

**Tableau 2** : Quelques caractères physico-chimiques du sol prélevé sous *D. trichocarpa*

**Tableau 3** : Descriptif des différents traitements réalisés dans l'expérience en serre.

**Tableau 4**: Résumé des caractères culturaux des dix souches après observation à l'œil nu

**Tableau 5** : Résumé des caractères morphologiques des dix souches après microscopie

**Tableau 6**: Résultats des tests de nodulation sur 3 plantes différentes

**Tableau 7** : Effet de la diversité des symbiotes mycorhiziennes sur la croissance de *Dalbergia trichocarpa* dans un sol préalablement stérilisé après 4 mois de culture en serre.

**Tableau 8** : Effet de la diversité des symbiotes mycorhiziennes sur le nombre de nodules par plant, le taux de mycorhization, la dépendance mycorhizienne et sur les taux d'azote et phosphore accumulés dans les feuilles de *Dalbergia trichocarpa*, dans un sol préalablement stérilisé après 4 mois de culture en serre.

**Tableau 9** : Effet de la diversité des symbiotes mycorhiziennes sur la croissance de *Dalbergia trichocarpa* dans un sol non stérilisé après 4 mois de culture en serre.



**LISTE DES PHOTOS**

**Photo 1 :** *Dalbergia trichocarpa*

**Photo 2 :** Vésicules et arbuscules à l'intérieur de la racine mycorhizée par le *Glomus luteum*

**Photo 3:** Test de nodulation de la souche 2 sur *Macroptilium atropurpureum*



---

# **Introduction**

---

## INTRODUCTION

La surexploitation des forêts de Madagascar a entraîné une réduction drastique des surfaces boisées et une accélération de l'érosion des sols fertiles. Il subsiste encore cependant dans certaines régions, des forêts reliques caractérisées par une grande diversité d'espèces d'arbres dont beaucoup sont des espèces endémiques. Parmi celles-ci, on trouve plusieurs essences à bois précieux et de grande valeur commerciale comme les Palissandres renommés pour la qualité et la beauté de leur bois. Malheureusement, la plupart de ces espèces font actuellement l'objet d'une large surexploitation commerciale qui les menace à court terme de disparition.

Bien que ces pratiques revêtent une certaine importance pour la vie active des populations concernées, elles engendrent de graves préjudices environnementaux menaçant leur survie et entravant toute possibilité de développement durable. En effet, au sein de ces écosystèmes, la production primaire est limitée par la faible disponibilité de l'azote, et dans bien des cas, du phosphore suite à la surexploitation des écosystèmes entraînant une perte en éléments minéraux, la destruction de la faune et de la microflore tellurique difficilement compensable à long terme par les apports externes.

Des initiatives ont été prises visant à conduire à la domestication de ces espèces forestières en pépinière et en plantation. Parmi toutes les solutions proposées en sylviculture pour améliorer la production ligneuse, l'utilisation de microorganismes symbiotiques (rhizobia et/ou champignons mycorhiziens) pourrait constituer une solution durable et novatrice. En effet, il est connu que les microorganismes symbiotiques améliorent significativement le développement de ces essences forestières. Des résultats obtenus en conditions contrôlées montrent que ces symbiotes bactériens ou fongiques stimulent la croissance de la plante hôte en optimisant la nutrition minérale de la plante, en particulier au niveau de l'azote et du phosphore qui sont les principales carences minérales rencontrées dans ces régions (Duponnois et *al.*, 2001, Founoune et *al.*, 2002 ; André et *al.*, 2003).

Ces relations étroites entre ces symbiotes fongiques et bactériens ont généralement été étudiées en milieu contrôlé (sol désinfecté) en confrontant une souche de bactérie à une souche de champignon mycorhizien. Or, en milieu naturel, le cortège mycorhizien, la microflore tellurique ainsi que les peuplements de rhizobia montrent une diversité importante.

Paradoxalement, il n'existe à notre connaissance aucune référence bibliographique où l'impact de la structure de la communauté mycorhizienne associée à une légumineuse ligneuse sur la structure de peuplements de rhizobia et sur la structure de la flore du sol, a été décrit.

Dans le cadre de cette étude, nous étudions une légumineuse ligneuse, *Dalbergia trichocarpa* endémique de Madagascar, ayant un statut symbiotique complexe (symbiose fixatrice d'azote, statut endotrophe). Dans un premier temps, nous évaluons dans le cadre d'une expérience de mycorhization en serre, l'influence de la combinaison de différentes souches de champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules sur la croissance de la plante, sur le développement de la symbiose fixatrice d'azote, sur la structure de certains groupes de microflore telluriques et dans un deuxième temps, nous identifions les souches les plus performantes qui vont constituer d'inoculum en foresterie. L'aboutissement de ce travail est de vérifier l'hypothèse suivante :

*« La symbiose mycorhizienne optimise de manière significative le développement de la plante hôte et interagit significativement avec d'autres composantes de la microflore rhizosphérique comme le Pseudomonas et les rhizobia. Cette stimulation est dépendante du degré de colonisation du système racinaire par les champignons mycorhiziens et de la diversité des symbiotes fongiques associés ».*

Cette étude se divise en quatre parties : la première partie résumera les données bibliographiques, la deuxième partie décrira les matériels et méthodes utilisés, la troisième partie exposera les résultats obtenus, et la dernière partie présentera l'interprétation des résultats ainsi que la conclusion et perspectives.

---

S y n t h è s e b i b l i o g r a p h i q u e

---



## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Généralités sur les plantes

#### I.1. Description du genre *Dalbergia*

Dans la classification botanique, les Palissandres (*Dalbergia* spp.) appartiennent à la famille des légumineuses, sous-famille des Papilionaceae et à la tribu des Dalbergiacea qu'ils partagent avec le genre *Pterocarpus* (Du Puy et al., 2000).

Les *Dalbergia* sont des arbres, ou moins fréquemment des lianes avec des pousses enroulées. Les fleurs sont généralement de couleur blanche à crème parfois nuancées de mauve ou violet, avec des pétales aux ailes étroites à texture épaisse (bec apical, si présent). Les fruits sont allongés, ovales, elliptiques, avec une aile à texture épaisse.

A Madagascar, leur biodiversité est exceptionnelle. La flore malgache comprend 43 espèces de *Dalbergia* dont 42 sont endémiques et une seule africano-malgache (*Dalbergia bracteola*). Les espèces de *Dalbergia* se trouvent à travers tout Madagascar, dans tout type de végétation, excepté au delà de 1600 à 1800m d'altitude.

Ces essences forestières, comme la majorité des plantes terrestres, sont associées en conditions naturelles à des microorganismes symbiotiques. Deux types de symbioses (statut symbiotique complexe) ont été signalés chez ces plantes : symbiose fixatrice d'azote (Rasolomampianina et al., 2005) et mycorhizes à vésicules et arbuscules (Rasolomampianina, comm pers., 2007).

Parmi les 42 espèces endémiques, nous nous sommes intéressés à l'espèce de *Dalbergia trichocarpa* qui est l'une des 5 espèces de *Dalbergia* capables de se développer en milieu ouvert (hors forêts). Cette caractéristique permet de suggérer qu'il serait possible de l'utiliser comme essence de reboisement pour la production locale de bois de construction.

#### I.2. Description de *Dalbergia trichocarpa*

*Dalbergia trichocarpa* est un arbre caducifolié de 4 à 15m de haut. L'écorce blanchâtre à gris, lisse sur les jeunes arbres, devient plus ou moins rugueuse. Les tiges sont pubescentes à rameaux glabres, bruns, striés longitudinalement. Les feuilles, longues de 6 à 10cm, avec 15 à 19 folioles alternes (quelquefois sub-opposées). Les pétioles et les rachis sont densément pubescents. Les inflorescences en panicules terminales portent quelquefois des feuilles réduites. Le fruit, oboval à oblong, se rétrécissant à la base, renferme 1 à 2 graines ; l'apex étant arrondi ou se rétrécissant légèrement.



**Photo 1 :** *Dalbergia trichocarpa* (Source : Du Puy et al., 2000)

### **I.3. Répartition de *Dalbergia trichocarpa***

Cette espèce ligneuse est distribuée dans les différentes régions de Madagascar:

Ouest de Madagascar : abondant dans les régions de Boina et d'Ambongo

Dans le Nord : région d'Analalava et d'Antsohihy

Dans le Sud : région de Morondava

### **I.4. Impact écologique et économique de *Dalbergia trichocarpa***

Comme beaucoup d'espèces de *Dalbergia* endémiques, *Dalbergia trichocarpa* présente un intérêt économique et écologique considérable. Cette espèce appelée communément "Manary kiboty, Manary mena, Manary toloho et Manipika" à l'Ouest de Madagascar a été identifiée comme bois de haute qualité. Il est très recherché localement pour la qualité technologique et esthétique de leur bois. Il est utilisé en ébénisterie, en menuiserie, pour la fabrication de manches d'outil mais aussi en pharmacopée locale (l'écorce est utilisée pour le traitement de diarrhée dans la région de Befandrina Nord) et comme plantes mellifères.

Grâce aux 2 types de symbioses associées à *Dalbergia trichocarpa*, cette légumineuse peut se développer dans des sols très carencés en éléments minéraux (en particulier au niveau de l'azote et du phosphore) et jouer un rôle important dans le maintien de la fertilité des sols. Ainsi, cette espèce de Palissandre représente non seulement une essence précieuse, mais elle participe à la restauration de la fertilité des sols en les enrichissant en azote et en phosphore.

## **II. La rhizosphère**

La rhizosphère est définie comme la portion de sol immédiatement en contact avec la racine. Elle est caractérisée par une forte activité microbienne due au renouvellement des composés organiques assimilables issus des exsudats racinaires, des mucilages et des cellules épidermiques mortes (Keith et *al.*, 1986).

La communauté bactérienne rhizosphérique est différente tant au niveau qualitatif que quantitatif que celle colonisant le sol non rhizosphérique (Duponnois, 1992).

L'effet rhizosphère (Katznelson et *al.*, 1962) est un processus dynamique résultant d'interactions entre la plante hôte, le sol, les conditions climatiques, les pratiques culturales et les interactions au sein des communautés microbiennes. L'ensemble de ces processus induit des caractéristiques physico-chimiques et biologiques différentes du sol non rhizosphérique (Garbaye, 1991).

### **II.1. Les microflores de la rhizosphère**

#### **II.1.1. Les bactéries de la rhizosphère**

Dans la rhizosphère, les bactéries constituent les microorganismes le plus nombreux (leur densité est de l'ordre de  $10^9$ /g de sol) et les plus variés. Elles sont plus fortement stimulées par l'effet rhizosphérique que les Actinomycètes, les champignons, les algues et les protozoaires (Dommergues et Mangenot, 1970).

Ces bactéries ont des relations directes ou indirectes avec la plante et selon leur relation, les bactéries peuvent être saprophytes, délétères, bénéfiques pour la plante dont les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (dans ce groupe se trouvent aussi les bactéries fixatrices d'azote, symbiotiques des plantes, les rhizobia).

#### **II.1.2. Les « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (PGPR)**

Les PGPR sont des microorganismes rhizosphériques intervenant dans la stimulation de la croissance de la plante. En effet, les PGPR déploient divers mécanismes qui influent directement ou indirectement sur la croissance de la plante. L'effet direct concerne l'amélioration de la nutrition minérale de la plante. Le phosphore est un élément essentiel à la croissance de la plante alors que sa disponibilité dans le sol est généralement faible. De ce fait, les PGPR produisent des enzymes solubilisant le phosphate peu soluble dans le sol qui, par la suite, devient disponible pour la plante (Glick, 1995).

### II.1.3. Les Actinomycètes

Les bactéries filamenteuses ou Actinomycètes, peuvent atteindre  $10^7$  unités par gramme de sol et elles manifestent souvent un antagonisme vis-à-vis des bactéries et des champignons voisins. Cet antagonisme résulte de la sécrétion de substances antibiotiques. Les Actinomycètes interviennent également dans la dégradation des matières organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries. De plus les Actinomycètes sont capables de produire des substances probiotiques dont les vitamines B1, B2, B6, B12, la biotine et l'acide folique (Morel, 1996 ; Dommergue et *al.*, 1970) qui sont favorables à la croissance et à la survie de la plante.

### II.1.4. Les champignons de la rhizosphère

Comme dans le cas des bactéries, dans le sol et dans la rhizosphère, les champignons sont présents en masse dont la densité est estimée de  $10^5$  à  $10^6$ /g de sol. Suivant leur mode de vie, ils sont classés en saprophytes, parasites ou symbiotiques (Strullu, 1991).

Les champignons saprophytes interviennent dans la dégradation de substances résistantes comme la lignine. Cette association est bénéfique tant pour la plante que pour le champignon en matière de nutrition.

Les champignons symbiotiques s'unissent avec la plante et des échanges réciproques entre les deux s'établissent. En effet, selon Strullu (1991), la symbiose désigne les unions harmonieuses basées sur des échanges réciproques entre les deux partenaires.

D'autres champignons sont parasites de la racine des plantes, ce sont les champignons phytopathogènes (exemple : *Plasmopara viticola*, *Venturia inaequalis* ou les oïdiums de certains Angiospermes (Strullu, 1991).

### II.1.5. Autres microorganismes

Les protozoaires et les algues sont les moins nombreux, leur densité est de l'ordre de  $10^4$ /g de sol. Les algues sont représentées par des espèces de chlorophyceae (algues vertes), Cyanophyceae (algues bleues vertes) et les Diatomées. Leurs principaux rôles sont la fixation de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{N}_2$ . La fixation de  $\text{CO}_2$  peut atteindre  $39 \text{ mg/m}^2/\text{heure}$  (Morel, 1996).

### III. La symbiose mycorhizienne

La symbiose mycorhizienne est un phénomène général chez la plupart des végétaux terrestres. Elle se traduit au niveau du système racinaire par la formation d'un organe nouveau appelé mycorhize résultant de l'association intime d'une racine et d'un champignon (myco = champignon; rhize = racine). Ces 2 partenaires réalisent ensemble une symbiose vraie, mutualiste ou eusymbiose (Dommergues et Mangenot, 1970).

Cette interaction régule les gains et pertes d'éléments essentiels intervenant à la fois dans la production végétale et dans l'évolution de la fertilité du sol (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Brussaard, 1998).

#### III.1. Classe et type de champignons mycorhiziens

Deux principaux types de mycorhizes sont généralement distingués selon les caractéristiques de la plante hôte et des champignons impliqués et selon les critères morphologiques et structuraux : les endomycorhizes (forme endotrophe) et les ectomycorhizes (forme ectotrophe) (**figure 1**).

**Les ectomycorhizes:** Les ectomycorhizes sont caractérisées par un manteau de mycélium fongique, qui entoure les racines nourricières de la plante hôte et à partir duquel des hyphes pénètrent entre les cellules corticales du végétal pour former le réseau de Hartig.

Ce type de symbiose concerne seulement 5% des plantes vasculaires et n'a jamais été observé chez les monocotylédons. Contrairement aux mycorhizes à arbuscules, les partenaires fongiques qui sont des champignons supérieurs, Basidiomycètes et Ascomycètes, peuvent fructifier dont l'identification, basée sur la morphologie des carpophores, est aisée. Ces champignons sont cultivables en l'absence de leur hôte.

**Les endomycorhizes:** dans ce type de mycorhizes le mycélium colonise les cellules corticales. Deux groupes sont distingués: les mycorhizes à arbuscules et les mycorhizes à pelotons d'hyphes cloisonnés.

- *les mycorhizes à pelotons*

Le champignon mycorhizien de ce type colonise les cellules corticales des racines et y développe des pelotons formés d'hyphes cloisonnés. Au sein de ce groupe, on distingue les mycorhizes des Ericacées ou éricoïdes et les mycorhizes des orchidées.

- *les mycorhizes à arbuscules*

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sont connus depuis la fin du

siècle dernier; Frank, (1887) ayant donné le nom de mycorhizes à l'association plante/champignon. Ils sont ubiquistes et colonisent le système racinaire de la majorité des familles de plantes depuis les bryophytes jusqu'aux angiospermes (Boullard, 1990; Demars et Broener, 1995) et particulièrement les plantes à intérêts économiques. C'est le type le plus répandu notamment chez les plantes herbacées et beaucoup d'espèces ligneuses (Morton et Benny, 1990). Le mycélium se ramifie et se développe dans le parenchyme cortical des racines et forme des arbuscules, des vésicules (**figure 2**) et des pelotons au sein des cellules. Le mycélium externe est abondant avec des spores microscopiques au niveau du sol. Ces champignons sont des symbiotes obligatoires non cultivables en l'absence de la plante hôte.

Un troisième type de mycorhize pourrait être défini, « l'Ectendomycorhize ». Il s'agit d'une structure intermédiaire entre les deux premiers. Le manteau fongique est bien développé, mais le réseau d'hyphes pénètre à l'intérieur des cellules corticales. Ce type de mycorhizes pourrait être formé par des souches ectomycorhiziennes (Founoune, 2001).

### **III.2. Le rôle de la symbiose endomycorhizienne**

Les champignons endomycorhiziennes sont particulièrement impliqués dans le fonctionnement des principaux cycles biogéochimiques du sol (N, P et C). Ils sont considérés comme des éléments clés dans le maintien durable de la fertilité des sols et, en conséquence, dans les processus biologiques régissant l'évolution de l'écosystème épigé tant au niveau de sa structure que de sa productivité (van der Heijden *et al.*, 1998).

Ces effets bénéfiques, induits par la symbiose endomycorhizienne, concernent aussi d'autres aspects du développement de la plante dans son environnement naturel.

Le champignon peut agir sur une meilleure tolérance de la plante hôte à des contraintes hydriques (Sylvia et Williams, 1992) ou toxiques (pollutions par des éléments métalliques (Al, Mn, etc.) (Khan, 2001). L'établissement de la symbiose endomycorhizienne atténue l'effet néfaste de différents pathogènes comme les champignons ou les nématodes phyto-parasites (Duponnois et Cadet, 1994; Linderman, 1992).

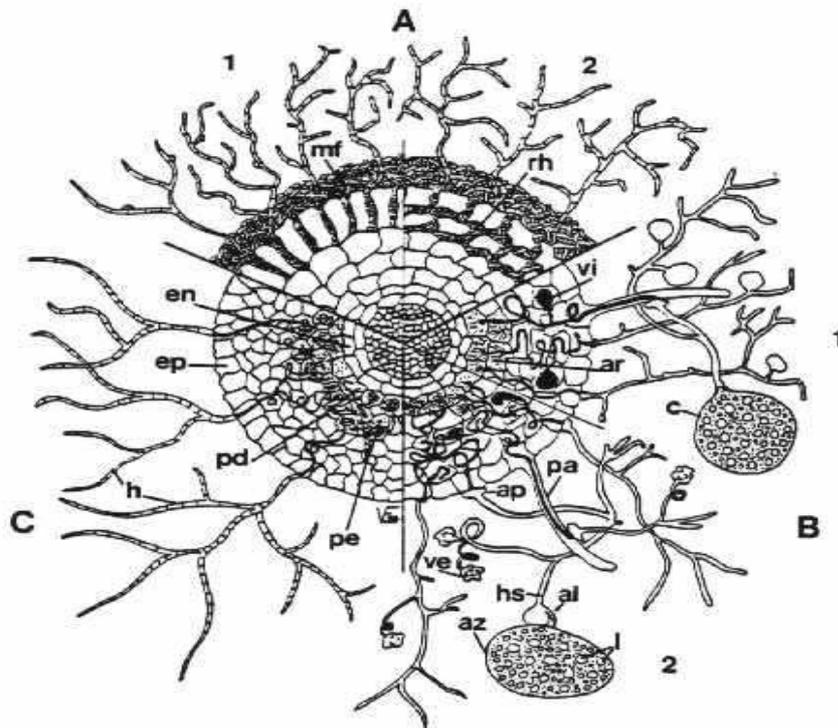


Illustration schématique des 3 principaux types de mycorhizes

A : ectomycorhizes; typiques des Bétulacées (1) et des Pinacées (2)

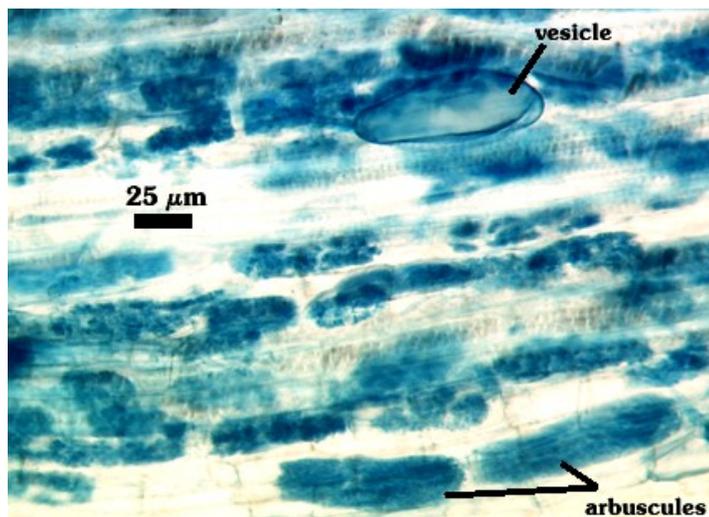
B : endomycorhizes à vésicules et arbuscules (VA); formes chlamydosporique (1) et azygosporique (2)

C : endomycorhizes des Orchidées

al : appendice latéral  
 ap : appressorium  
 ar : arbuscule  
 az : azygospore  
 c : chlamydospore  
 en : endoderme  
 ep : épiderme  
 h : hyphe  
 hs : hyphe suspenseur

l : Gouttelettes lipidiques  
 mf : manteau fongique  
 pa : poil absorbant  
 pd : peloton fongique digéré  
 pe : peloton fongique  
 rh : réseau de Hartig  
 ve : vésicule externe ou cellule auxiliaire  
 vi : vésicule interne

**Figure 1** : Illustration schématique des trois principaux types de mycorhizes, d'après Furlan V. (1981).



**Photo 2** : Vésicules et arbuscules à l'intérieur de la racine mycorhizée par *Glomus luteum* (source : [http:// invam.caf.wvu](http://invam.caf.wvu))

### III.3. La gestion de la symbiose mycorhizienne: la mycorhization contrôlée

La mycorhization contrôlée est un ensemble de techniques (culture, sélection, multiplication, incorporation au sol et suivi du champignon) permettant la production de plants « biologiquement améliorés » grâce aux symbioses mycorhiziennes. Cette pratique peut influencer fortement le succès d'un semis ou d'une plantation (Dommergues et Mangenot, 1970). Elle permet d'améliorer considérablement la production végétale, notamment en sylviculture, où la plupart des essences forestières utilisées pour les régénérations artificielles et le reboisement mondial sont très dépendantes de la symbiose mycorhizienne. Son intérêt reste cependant limité dans les sols riches et équilibrés. A l'inverse, dans les sols pauvres, les arbres mycorhizés sont plus avantagés que les non contaminés car les champignons facilitent l'absorption des éléments minéraux (Garbaye, 1991). La mycorhization contrôlée réduit la mortalité des plants forestiers, en limitant la crise de transplantation et en accélérant leur croissance initiale.

### IV. La symbiose fixatrice d'azote

La symbiose légumineuse-*Rhizobium*, décrite pour la première fois par Frank (1889), présente un modèle d'étude d'association entre eucaryote et procaryote. Elle constitue une association extrêmement importante du point de vue écologique et agronomique. La symbiose se traduit chez la plante-hôte par la formation de structures différenciées et spécialisées, appelées nodules ou nodosités, localisées le plus souvent au niveau des racines et dans certains cas au niveau des tiges (Dreyfus et *al.*, 1988). Ces nodules représentent de véritables

organes d'échanges métaboliques entre les bactéries et la plante. A l'intérieur du nodule, les rhizobia se différencient en bactéroïdes, forme sous laquelle ils fixent l'azote de l'air et le transforment via le complexe nitrogénase en ammonium, qu'ils échangent avec la plante contre des photosynthétas.

Nous présentons ici les deux partenaires de la symbiose : le partenaire végétal et le partenaire bactérien.

#### **IV.1. Partenaire végétal : les légumineuses**

Les légumineuses sont des végétaux supérieurs qui appartiennent à la famille Leguminosae (ou Fabaceae), de l'ordre de Fabales. Elles forment l'une des plus grandes familles de plantes (Broughton, 1983). On y trouve 674 genres (VanBerkum et Eardly, 1998) et approximativement 19700 espèces (Polhill et Raven, 1981). Cette famille comprend aussi bien des plantes herbacées annuelles que des plantes ligneuses, et colonise aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre (Young et Johnston, 1989). Elles sont subdivisées en trois sous-familles inégales à la fois en nombre d'espèces, mais aussi en pourcentage d'espèces nodulées: les Caesalpinaceae, les Mimosaceae et les Papilionaceae. Sur la totalité des légumineuses recensées, 20% seulement ont été étudiées du point de vue de leur nodulation. 97% des espèces examinées chez les Papilionacées (pois, haricot, fève, lentille,...), 90% chez les Mimosacées (robinier, *Glycine*, *Acacia*,...) et 23% chez les Césalpiniacées sont capables de noduler (Dommergues et *al.*, 1998).

#### **IV.2. Partenaire bactérien : les rhizobia**

Le terme de *Rhizobium* a été utilisé en premier pour désigner ces bactéries formant des nodules sur les légumineuses. Du grec, “ Rhizo ” = racine et “ bium ” = vivant. Les bactéries fixatrices d'azote associées aux légumineuses ou BNL (Bactéries Nodulant les Légumineuses) sont des bactéries strictement aérobies, Gram négatives, mobiles, non sporulées (Jordan, 1984). Phylogénétiquement, les BNL font partie de la sub-division alpha des protéobactéries (Stackebrandt et *al.*, 1988) ou bêta des protéobactéries (Moulin et *al.*, 2001). Les BNL se mêlent avec les genres *Agrobacterium* et *Phyllobacterium* qui sont tous impliqués dans des interactions spécifiques avec des plantes (Jordan, 1984). Certaines souches de *Phyllobacterium* ont un effet améliorateur de la croissance de certaines plantes (PGP Plant

Growth Promoting) (Larcher et al., 2003), alors que les souches d'*Agrobacterium* induisent des tumeurs sur les racines et les tiges de plusieurs plantes.

### IV.3. La spécificité de la symbiose

L'une des propriétés majeures de la symbiose légumineuse-*Rhizobium* est sa spécificité. En effet un *Rhizobium* donné n'est capable d'établir une symbiose fixatrice d'azote qu'avec un nombre limité d'espèces végétales, appelé spectre d'hôte. Inversement, une espèce de légumineuse donnée pourra établir une association symbiotique qu'avec une ou plusieurs espèces ou genres de rhizobia, définissant ainsi un spectre d'hôte de la légumineuse. Les variations d'amplitude du spectre d'hôte bactérien et des légumineuses sont très importantes. On observe des associations très spécifiques pour le partenaire bactérien, tel *Azorhizobium caulinodans* qui ne s'associe qu'avec *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988), alors que cette légumineuse possède d'autres partenaires bactériens (*Sinorhizobium saheli* et *S. teranga* Boivin et al., 1997). D'autres symbiotes bactériens présentent un spectre d'hôte modérément spécifique, comme *Sinorhizobium meliloti* qui s'associe avec les espèces des genres *Medicago*, *Melilotus* et *Trigonella* (Krishnan et Pueppke, 1991). Enfin certains symbiotes à large spectre d'hôte sont capables de noduler un très grand nombre de légumineuses, tel *Sinorhizobium fredii* USDA257 capable de noduler plus de 77 genres de légumineuses ou *Sinorhizobium* spp. NGR234 qui s'associent avec près de 120 genres (Pueppke et Broughton, 1999). Du côté du partenaire végétal, alors que certaines légumineuses comme le pois afghan ou *Galega* nécessite des dispositions particulières à la symbiose, d'autres espèces, telles *Macroptilium atropurpureum* (siratro) ou *Vigna unguiculata*, sont capables de s'associer avec de nombreuses espèces de rhizobia, et ont parfois été utilisées pour le piégeage et la caractérisation d'isolats de nodules (Somasegaran et Hoben, 1985; Lewin et al., 1987).

### IV.4. Importance de la fixation biologique d'azote en zone tropicale

La progression de l'utilisation des engrais azotés, qui a permis dans les pays développés une très forte croissance du rendement des cultures agricoles, est amenée à s'atténuer, à cause d'une part des menaces de pollution des nappes phréatiques par les nitrates et de l'atmosphère par des oxydes d'azote volatiles, et d'autres part de leur coût qui interdit leur généralisation dans les pays en voie de développement.

La fixation biologique d'azote permet un enrichissement naturel du sol en azote et son exploitation à des fins agronomiques comme alternative aux engrais azotés semble très

prometteuse pour l'avenir. Nombreux sont les axes de recherche visant à développer une telle stratégie (Vance et Graham, 1995, pour revue).

Les légumineuses enrichissent en azote les végétaux qui leur sont associés (Skerman, 1982). Associées aux céréales, elles augmentent la valeur nutritionnelle de celles-ci tout en augmentant les rendements (Ndiaye, 1994). Sur des terrains pauvres en azote, les légumineuses s'alimentent pour une bonne partie à partir de l'azote atmosphérique et peuvent fixer 180 kg d'azote par hectare et par an (FAO, 1990). Utilisée comme plante de couverture, la légumineuse joue un triple rôle en réduisant l'action mécanique des pluies, en améliorant la fertilité du sol par minéralisation de la litière, et en apportant de l'azote via ses nodules.

L'enfouissement de plantes fixatrices d'azote joue le rôle d'engrais organique, et améliore la structure du sol, et protège le sol de l'érosion.

Par ailleurs, les légumineuses, comme les plantes actinorhiziennes, sont utilisées pour la végétalisation des sites miniers après exploitation à ciel ouvert en Nouvelle Calédonie (Jaffré et *al.*, 1995), au Brésil (Franco et de Faria, 1997), au Kenya, en Australie, au Zimbabwe, en Inde (Dommergues et *al.*, 1998, pour une revue), à Madagascar et en Guinée (B. Dreyfus, comm pers).

## **V. Interactions biologiques dans la rhizosphère**

Outre les modifications apportées par la nature des exsudats racinaires au niveau des populations de la rhizosphère, l'établissement de la symbiose mycorhizienne a beaucoup d'influence aussi sur certains groupes de microorganismes rhizosphériques. D'une manière générale, les interactions entre la symbiose mycorhizienne et la population de la rhizosphère tendent toujours vers le bénéfice de la plante.

### **V.1. Interaction entre MVA et bactéries fixatrices d'azote**

Les interactions entre les champignons endomycorhiziens et les bactéries fixatrices d'azote sont beaucoup plus étudiées bien que le mécanisme d'action de cet élément ne soit pas encore bien établi. De nombreux travaux ont démontré que ces deux types de symbiose interagissaient étroitement (Cornet et Diem, 1982; Duponnois et Plenchette, 2003). Cette synergie se traduit généralement par une augmentation du nombre et du poids de nodules rhizobiens par plant lorsque les plants sont mycorhizés (Cornet et *al.*, 1982). Ce phénomène est généralement attribué à l'amélioration de la nutrition phosphatée de la plante hôte induite par le champignon mycorhizien qui profite au développement et au fonctionnement de la symbiose rhizobienne. Toutefois, d'autres mécanismes pourraient intervenir dans ces

phénomènes interactifs (ex : modification des dialogues moléculaires entre la plante et la bactérie, ....) (André et *al.*, 2003).

## V.2. Interaction entre MVA et autres composantes de la flore du sol

Plusieurs études ont démontré l'existence d'interactions entre les champignons mycorhiziens à arbuscules et les autres composantes de la flore du sol.

Vázquez et *al.*, (2000) ont étudié la double inoculation avec les *Glomus mosseae*, *G. deserticola* d'une part et quelques phytostimulateurs comme l'*Azospirillum* ou quelques agents de lutte contre des champignons pathogènes comme les *Pseudomonas* et *Trichoderma*. Ils ont montré que cette association est bénéfique pour la croissance du Maïs. L'inoculation par ces MVA a affecté quantitativement et qualitativement les communautés microbiennes dans la rhizosphère de la plante. L'activité enzymatique (esterase, phosphatase, trehalase et chitinase) est utilisée comme indicateur pour détecter les changements dans le fonctionnement microbien dans le sol.

Plusieurs bactéries colonisatrices de la rhizosphère comme *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium* et *Pseudomonas* produisent des substances typiques qui stimulent la croissance des plantes et inhibent les agents pathogènes des racines (Glick, 1995).

Cependant, ces agents de lutte présentent une compatibilité avec les champignons mycorhiziens à arbuscules (Barea et *al.*, 1997). Cette synergie suppose l'existence de compatibilité fonctionnelle entre les microorganismes saprophytiques et symbiotiques.

---

## M a t é r i e l s e t m é t h o d e s

---



## A-MATERIELS

### I. La plante - hôte

Les nodosités sont prélevées sur les racines d'une plante-hôte non inoculée appelée *Dalbergia trichocarpa* issue, de la station forestière de Tsaramandroso Ouest.

#### I.1. Position systématique de la plante

Règne	: VEGETAL
Embranchement	: ANGIOSPERMES
Classe	: DICOTYLEDONES
Sous-classe	: ROSIDAE
Ordre	: FABALES
Famille	: FABACEAE
Sous-famille	: FABOIDEAE
Tribu	: DALBERGIEAE
Genre	: <i>Dalbergia</i>
Espèce	: <i>trichocarpa</i>

## II. Souches microbiennes

### II.1. Souche bactérienne

Les souches bactériennes sont constituées par la collection de 10 nouveaux isolats de nodules racinaires de *Dalbergia trichocarpa* endémique de Madagascar. Deux souches de référence de *Dalbergia* sont incluses dans notre étude : une souche à croissance lente *Bradyrhizobium elkanii* (STM 609) isolée de *D. purpurascens* et une souche à croissance rapide *Mesorhizobium plurifarum* (STM 601) isolée de *D. madagascariensis*.

### II.2. Souche fongique

Trois souches de MVA (*Glomus intraradices*, *G. mosseae* et *G. fasciculatus*) ont été utilisées et ont été fournies par le LCM, Dakar, Sénégal.

### III. Milieux d'étude

#### III.1. Milieu d'isolement

- Milieu YEM (Yeast Extract Mannitol)

Le milieu nutritif agar YEM est un milieu de culture solide, mis au point par Vincent (1970). Ce milieu est utilisé pour isoler et conserver les souches de bactéries fixatrices d'azote dans les nodules.

#### III.2. Milieux de dénombrement

- Milieu TSA (Tryptic Soy Agar)

Ce milieu solide est habituellement employé pour la culture et le dénombrement de la flore totale cultivable.

- Milieu KING B

C'est un milieu de culture solide caractérisé par l'abondance de phosphate. Ce milieu est utilisé pour rechercher et dénombrer les souches de *Pseudomonas* fluorescents.

- Milieu WAKSMAN

C'est un milieu solide contenant comme source de carbone le glucose (Waksman, 1961). Ce milieu permet de rechercher et dénombrer les souches d'Actinomycètes.

#### III.3. Milieu pour la culture des plantes

- Milieu JENSEN

Ce milieu solide mis au point par Vincent (1970), est utilisé pour la culture des plantes en tube Gibson lors des tests de nodulation pour la détermination du spectre d'hôte des différentes souches de rhizobia.

#### III.4. Milieu pour la préparation de l'inoculum

- Milieu G5

C'est un milieu nutritif liquide dépourvu d'agar mis au point par Singleton (2000). Le milieu est utilisé pour la préparation de l'inoculum liquide des souches de rhizobia.

La composition de chaque milieu est donnée en annexes 1 et 2.

#### **IV. Stérilisation**

Tous les milieux, dont le pH a été neutralisé par NaOH N et du HCl M suivant le cas, sont stérilisés à 121°C pendant 20min dans une autoclave. La verrerie est stérilisée à 180°C dans une étuve universelle pendant 30min.

Il est à noter que toutes les manipulations microbiologiques sont effectuées dans des conditions stériles c'est-à-dire autour de la flamme du bec Bunsen et sous hotte à flux laminaire.

## **B. METHODES**

### **I. Technique de préparation et de conservation des nodules**

La récolte des nodules s'effectue en les détachants un à un des racines des légumineuses. Les nodosités récoltées sont introduites dans des tubes contenant du  $\text{CaCl}_2$  (Date, 1982), bouchés avec une couche de 1cm de coton cardé.

Ainsi conditionnés, les nodules peuvent être conservés pendant plus d'un an au réfrigérateur à  $+4^\circ\text{C}$  (Cleyet-Marel, 1989). Les nodosités d'une même plante doivent être mises dans un même tube.

### **II. Isolement des souches de rizobia à partir des nodules**

#### **II.1. Technique d'isolement**

La technique classique d'isolement des souches de *Rhizobium* décrite par Cleyet-Marel (1989) a été adoptée.

Chaque nodule est réhydraté dans de l'eau distillée stérile pendant 30min, puis stérilisé superficiellement par immersion dans  $\text{H}_2\text{O}_2$  (35%) pendant 3min. Le nodule est rincé abondamment à l'eau distillée stérile, puis écrasé dans une goutte d'eau stérile. La suspension obtenue, est étalée par épuisement sur boîte de Pétri contenant le milieu YEM gélosé au rouge Congo à la concentration finale de 0.025g/l. Notons que le rouge Congo est utilisé afin d'éviter toute contamination par les bactéries (*Actinomycètes*, *Agrobacter*, ...). Les colonies apparaissent après 3 à 7 jours d'incubation à  $28^\circ\text{C}$  dans des conditions aérobies. La pureté des souches est vérifiée par repiquage successif sur milieu YEM gélosé au rouge Congo. L'identification des souches de *Rhizobium* a été faite par un examen macroscopique (caractères culturels sur milieu YEM gélosé au rouge Congo) et par une observation microscopique (coloration de Gram et examen à l'état frais des cellules vivantes) par comparaison avec les deux souches de référence.

#### **II.2. Conservation des souches**

Dans des tubes à vis contenant le milieu YEM incliné, les souches pures obtenues ont été repiquées par des stries d'épuisement parallèles de manière avoir des colonies abondantes. Les tubes de collection sont ensuite enveloppés de papier aluminium et conservés à  $4^\circ\text{C}$  en évitant le plus possible tout risque de contamination.

### II.3. Tests de nodulation

La capacité des isolats à noduler et fixer l'azote est testée sur 3 espèces de plantes différentes : *D. trichocarpa*, *D. madagascariensis* et *Macroptilium atropurpureum* (siratro).

#### II.3.1. Stérilisation et germination de graines

Avant de les utiliser, les graines sont scarifiées et stérilisées superficiellement par immersion soit dans de l'acide sulfurique concentré, soit dans de l'eau de javel pendant une durée déterminée selon la dureté de l'enveloppe propre de chaque espèce (sauf pour le cas de *D. madagascariensis*) (**tableau 1**). Les graines sont ensuite abondamment rincées à l'eau distillée, puis déposées dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée 8% et mises à germer à 30°C à l'obscurité et en atmosphère humide, les boîtes étant renversées afin que la radicule ne s'enfonce pas dans l'agar. Lorsque la radicule atteint 1 à 2cm de long au bout d'environ 2 à 7 jours, les jeunes plantules sont mises en tube contenant une gélose inclinée (Jensen) et muni d'un capuchon constitué par une double feuille d'aluminium percée d'un trou (Gibson, 1963). La racine est introduite dans le tube de façon à être en contact avec la gélose, la tige restant à l'air libre.

Tableau 1 : Conditions de stérilisation et de scarification des graines

Graine	Stérilisation	Scarification	Pré-germination
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *, 20min	-	Eau gélosée Chambre noire, 30°C, 2 jours
<i>Dalbergia trichocarpa</i>	Eau de javel**, 15min	-	Eau gélosée Chambre noire, 30°C, 4 jours
<i>Dalbergia madagascariensis</i>	Hypochlorite de Calcium***, 7min	Aiguille flambée à incandescence	Eau gélosée Chambre noire, 30°C, 7 jours

\* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré à 96 %

\*\* Eau de javel 12 %

\*\*\* Hypochlorite de Ca à 70 %

### **II.3.2. Inoculation des racines**

Les racines des plantes sont inoculées avec 1ml de culture de *Rhizobium* en milieu liquide ( $10^8$  bactéries/ml) et provenant d'une culture en phase exponentielle de croissance sur milieu YEM.

L'inoculation des racines est effectuée 3 jours après la mise en place de la plantule dans le tube. Le tube est rempli d'eau distillée stérile jusqu'au bord supérieur afin que toute la surface des racines soit en contact avec les rhizobia en suspension dans la solution nutritive. Cinq répétitions ont été effectuées pour chaque traitement.

Les plantes sont cultivées dans des conditions de lumière continue ( $20\text{W/m}^2$ ) à  $30^\circ\text{C}$  et observées pour la formation des nodules durant 6 à 8 semaines. La fixation d'azote est estimée par l'état de la plante (taille et couleur) par rapport aux plantes témoins non inoculées.

## **II.4. Préparation de l'inoculum**

### **II.4.1. Préparation de l'inoculum bactérienne**

#### **II.4.1.1. Préculture**

Une souche à croissance lente (souche 10) la plus effective d'après les résultats des tests de nodulation sur les plantes étudiées est repiquée dans un tube stérile de 50ml contenant 20ml de milieu G5 chacun. Le tube est incubé sous agitation à une température de  $28^\circ\text{C}$  pendant 7 jours.

#### **II.4.1.2. Propagation**

La culture est menée dans un erlenmeyer de 500ml avec un volume réactionnel de 200 ml,ensemencée avec une préculture de 7 jours. L'inoculation de culture est faite à 10% volume/volume.

### **II.4.2. Préparation de l'inoculum fongique**

Les trois souches de MVA ont été cultivées sur des plantules de mil sous serre, pendant 6 semaines dans des sols sableux préalablement stérilisés à  $140^\circ\text{C}$  pendant 40min. Avant d'inoculer les jeunes plants de *Dalbergia trichocarpa*, les plants sont dépotés et leurs systèmes racinaires découpés en fragments de 1cm. Ces bouts de racines de mil qui ont servi d'inoculum sont caractérisés par un taux de mycorhization de 75% selon la méthode de

Trouvelot et *al.*, (1986) avec environ 250 vésicules/cm. Les racines de plant non mycorhizées, préparées selon la méthode précédemment décrite, sont utilisées pour le traitement témoin non inoculé.

## II.5. Mycorhization de *D. trichocarpa*

La mycorhization de *D. trichocarpa* a été réalisée sous deux conditions bien distinctes du sol de culture : sur sol préalablement stérilisé afin de déterminer la dépendance mycorhizienne de la plante, sur sol non stérilisé pour évaluer la réceptivité du sol à l'inoculation et la compétitivité des souches fongiques utilisées vis-à-vis des microorganismes natifs du sol.

### II.5.1. Le sol de culture

Le sol utilisé a été prélevé sous *D. trichocarpa* de la station forestière de Tsaramandroso Ouest. Les caractères physico-chimiques de ce sol sont donnés dans le tableau ci après (**tableau 2**). Le sol a été tamisé à travers un tamis de 2mm de diamètre, puis stérilisé à l'autoclave à une température de 140°C pendant 40min pour la mycorhization contrôlée.

**Tableau 2** : Quelques caractères physico-chimiques du sol prélevé sous *D. trichocarpa*

pH (H2O)	pH (KCl)	C (g/Kg)	N (%)	MO total (%)	P total (ppm)	C/N	K mg (K/Kg)	K total mg (K/Kg)
5,01	4,55	9,25	0,043	1,05	0,11	16,81	5,12	7023,4

### II.5.2. Dispositif expérimental

Le sol (stérile ou non) est distribué dans des sachets en polyéthylène de un litre et arrosés à l'eau de robinet. Afin de mettre en évidence l'effet de la diversité du cortège mycorhizien associé à *D. trichocarpa* sur la structure de la communauté de rhizobia et de la microflore tellurique, les plantes ont été inoculées (avec 1g de racines de mil mycorhizé versé dans un trou de 1x5cm pour chaque pot) selon les traitements présentés par le **tableau 3**.

Une graine de *D. trichocarpa* prégermée est ensuite placée dans chaque pot et 5ml de l'inoculum de *Rhizobium* ont été injectés au niveau du trou de plantation. Les traitements témoins (sans inoculation de *Rhizobium*) ont reçu 5ml de sulfate de magnésium 0,1M préalablement stérilisé à 120°C pendant 20min.

Les cultures ont été disposées sur une tablette métallique sous les conditions de la serre du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (température moyenne journalière

22-28°C, photopériode environ 12h). Les plantes ont été arrosées deux à trois fois par semaine sans fertilisation.

Dix répétitions ont été effectuées pour chaque traitement et l'évaluation a été faite après quatre mois de culture sous serre.

**Tableau 3** : Descriptif des différents traitements réalisés dans l'expérience en serre.

Traitements	Volume d'inoculum fongique
<b>T</b>	1g <sup>(1)</sup>
<b>A</b>	1g
<b>B</b>	1g
<b>C</b>	1g
<b>A+B</b>	0,5g+0,5g
<b>A+C</b>	0,5g+0,5g
<b>B+C</b>	0,5g+0,5g
<b>A+B+C</b>	0,333g+0,333g+0,333g

**A** : *Glomus mosseae* ; **B** : *Glomus fasciculatus* ; **C** : *Glomus intraradices* ; **T** : Témoin non inoculé ; <sup>(1)</sup> Fragments de racines non mycorhizées

### III. Paramètres mesurés

L'échantillonnage est effectué en prenant cinq plantes au hasard pour chaque traitement et les paramètres suivants ont été évalués.

#### III.1. Croissance de la plante

La croissance de la plante a été évaluée selon la hauteur, la masse de la partie aérienne et souterraine mesurée après séchage à l'étuve pendant une semaine à 65°C.

Les plantes de *Dalbergia trichocarpa* ont été déracinées pour chaque traitement. Les sols rhizosphériques ont été récupérés en secouant les racines et éventuellement par rinçage à l'eau courante. Les substrats obtenus ont été séchés à l'air libre et laissés à la température ambiante du laboratoire pour les analyses microbiologiques ultérieures.

### III.2. Nodulation de la plante

La nodulation de la plante a été évaluée par le dénombrement de nodules par plant, puis pesage de poids sec total après séchage à l'étuve pendant une semaine à 65°C.

### III.3. Taux d'endomycorhization

Les racines fines de chaque système racinaire ont été soigneusement prélevées et colorées suivant la technique de Phillips et Hayman (1970). Dans un premier temps, les racines ont été trempées dans une solution de KOH 10% à 90°C pendant une heure et 30min. Après des séries de lavage à l'eau distillée et acidification par quelques gouttes d'acide lactique, les racines ont été colorées dans une solution de bleu de trypan 0,5% pendant 15 min à 90°C (la préparation de la solution de bleu trypan est décrite dans l'**annexe 3**). Elles sont ensuite lavées à l'eau de robinet.

Les racines ont été alors découpées en morceaux de 1cm et déposées entre lame et lamelle à raison de 10 fragments par lame et observées sous microscope optique (grossissement x 40) (ZEISS, standard 20) (Brundrett et *al.*, 1985).

La présence des arbuscules et vésicules indique la colonisation des racines de la plante par le champignon endomycorhizien.

Environ 100 fragments ont été observés pour chaque système racinaire. Le taux de mycorhization (TM) a été donné par la formule suivante :

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

### III.4. Dépendance mycorhizienne (DM)

La dépendance mycorhizienne est le résultat de modifications morphologiques et physiologiques de la plante et exprime l'efficacité de l'association plante hôte-champignon mycorhizien. Elle est calculée à partir du dénombrement de la biomasse aérienne sèche.

$$DM = (BASM - BAST/BASM) * 100$$

BASM est la biomasse aérienne sèche des plants mycorhizés et BAST est la biomasse aérienne sèche des plants témoins.

### III.5. Teneur en phosphore total des parties aériennes

La teneur en phosphore total a été déterminée par la méthode de Bray II. Elle comprend deux étapes : une phase d'extraction et une phase de dosage.

Des échantillons de feuilles ont été séchés, puis broyés au tamis de 0,5mm. Après une extraction à chaud par l'acide, les orthophosphates, en présence de molybdate d'ammonium et de vanadate d'ammonium, donnent du vanadate-molybdate phosphorique d'ammonium jaune.

### **III.5. 1. Extraction**

Il s'agit d'une extraction à chaud par l'acide.

Une quantité de 20ml de HCl sont versés progressivement dans un erlenmeyer de 50ml contenant 1g de poudre feuille tamisée. L'erlemeyer est ensuite bouché avec de la laine de verre puis chauffé pendant 2h sur une plaque chauffante. Après refroidissement à la température ambiante le mélange est filtré. Le filtrat est recueilli dans une fiole jaugée et ajusté à 50ml avec de l'eau distillée.

### **III.5. 2. Dosage du phosphore**

Une solution fille de 100ml à 100ppm est préparée.

Une gamme de concentrations respectives de 5, 10, 20, 40 et 50ppm est préparée à partir d'une solution mère de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  équivalent à 1000ppm de phosphore.

Un volume (1ml) de la gamme étalon est additionné de 8 volumes d'eau distillée et un volume de réactif de dosage (Vanado molybdique). La même opération est effectuée pour 1 ml de filtrat de l'échantillon. L'ensemble est agité au vortex, puis laissé reposer 5min avant la lecture de la densité optique à la longueur d'onde 420nm.

## **III.6. Teneur en azote total des parties aériennes**

### **III.6.1. Principe**

La détermination de la teneur en azote total est réalisée suivant la méthode classique de KJELDHAL. L'acide sulfurique concentré à chaud détruit la matière organique. L'hydrogène et le carbone vont se dégager sous forme de gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) et d'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ), tandis que l'azote organique est transformé en sulfate d'ammonium  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

L'utilisation des catalyseurs :  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{K}_2\text{SO}_4$  est nécessaire par le fait que l'acide sulfurique bouillant attaque difficilement certains nitrates.

### III.6.2. Mode opératoire

Dans un matras de minéralisation sont introduits successivement 0,1g d'échantillon de plante, 10ml d'acide sulfurique concentré, 2g de catalyseur et de billes de verre pour régulariser l'ébullition.

Pour que la condensation des vapeurs ne pose pas de problème, on met un entonnoir dans l'ouverture du matras incliné à 45°C. On chauffe le tout sur une petite flamme jusqu'à ébullition de l'acide sulfurique et décoloration de la liqueur. Dès que la coloration est verte, on n'a plus que 15min pour maintenir l'ébullition.

Après refroidissement, la liqueur est transvasée dans le ballon à distiller avec les eaux de rinçage. On y verse respectivement 15 ml de soude concentrée, quelques gouttes d'alizarine, et les eaux de rinçage. La distillation se fait lentement, l'ammoniac libéré est recueilli dans un bécher contenant 10 ml d'acide borique 4 %, et 2 gouttes de réactif de Tashiro.

Dès la décoloration de la solution, la distillation est terminée. On passe au titrage de l'ammoniac avec l'acide sulfurique 0,1N.

La teneur en azote total, exprimée en gramme pour 100g d'échantillon, est donnée par la relation :

$$N\% = V/M \times T \times 0,014 \times 100$$

Avec N : teneur en azote total

V : volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilisé pour titrer le distillat

T : normalité de l'acide sulfurique = 0,1 N

M : masse de l'échantillon à analyser = 0,1g

## **IV. Dénombrement de la microflore tellurique**

### **IV.1. Dénombrement des groupes spécifiques**

#### **IV.1.1. Méthode quantitative : Dénombrement par la méthode des suspensions-dilutions**

##### **IV.1.1.1. Préparation de la solution mère**

Pour chaque traitement, 10g de sol sont mis en suspension dans 95ml de solution stérile de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1M. La solution est agitée pendant 10min sur un agitateur magnétique puis laissée décanter une à 2min.

##### **IV.1.1.2. Préparation de la solution dilution**

Un ml de la solution mère est versé dans un tube contenant 9ml d'eau distillée stérile. Après agitation 1ml de la solution est prélevé stérilement, puis transféré dans un deuxième tube contenant comme le premier, 9ml d'eau distillée stérile. La dilution se fait ainsi jusqu'à  $10^{-4}$ .

##### **IV.1.2. Dénombrement de la flore totale cultivable**

La flore totale est constituée, en grande partie, par des bactéries qui peuvent se développer sur le milieu TSA (Tryptic Soy Agar).

A l'aide d'une pipette stérile, 0,1ml de chaque dilution décimale  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  sont ensemencés sur milieu TSA avec trois répétitions. La culture est incubée à l'obscurité à  $28^\circ\text{C}$ . La lecture est faite après 24 h, 48 h et 72 h d'incubation et toutes les colonies formées sont dénombrées.

##### **IV.1.3. Dénombrement des Actinomycètes**

Les Actinomycètes sont des microorganismes saprophytes à parois Gram (+). La plupart produisent des antibiotiques (Dommergue et *al.*, 1970). Le dénombrement des Actinomycètes est réalisé sur milieu Waksman (Waksman, 1961). Les dilutions  $10^{-1}$  jusqu' à  $10^{-4}$  sont ensemencées sur milieu Waksman avec trois répétitions. L'incubation des boîtes de Pétri ensemencées dure 7 jours à  $30^\circ\text{C}$ .

##### **IV.1.4. Dénombrement des *Pseudomonas* fluorescents**

Les *Pseudomonas* fluorescents ont été dénombrés selon la technique décrite par King et *al.*, (1954). Cette technique est basée sur l'observation sous lumière ultra violette de la pyoverdine, un pigment fluorescent qui représente la majeure partie des sidérophores

produites par ces bactéries. L'ensemencement est effectué en surface, les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C. Après 48h d'incubation, toutes les colonies fluorescentes sont dénombrées.

#### **IV.1.5. Méthode de dénombrement**

Le dénombrement consiste à compter les colonies présentes sur les boîtes en Unité Formant Colonie (UFC). Le comptage se fait macroscopiquement. En tenant compte des caractéristiques des colonies sur son milieu approprié, seules les boîtes ayant 30 à 300 UFC sont retenues. Le nombre d'Unité Formant Colonie est déterminé selon la formule :

$$\text{UFC} = \frac{\text{Nombre de colonies} \times \text{Facteur de dilution finale}}{\text{Poids sec du sol}}$$

### **V. Mesure des activités microbiennes du sol**

#### **V.1. Activité microbienne totale du sol**

L'activité microbienne totale dans les échantillons de sol est déterminée par hydrolyse de Fluorescéine DiAcétate (FDA). La Fluorescéine DiAcétate (Sigma, Aldrich Chemie, France) est dissoute dans l'acétone à raison de (5 mg/ml) et conservée à - 20°C.

##### **V.1.1. Mesure de l'activité microbienne totale du sol**

Un gramme du sol tamisé à 2mm est mis en suspension dans 200µl de FDA et 15ml de tampon phosphate de sodium 60mM stérile (pH 7,6). Le protocole détaillé pour la préparation de la solution tampon phosphate est présenté en **annexe 4**. Pour le témoin, deux témoins ont été préparés : un témoin sans substrat (TE) constitué par 1g de sol, 15ml de tampon pH et 200 µl de H<sub>2</sub>O pour chaque échantillon, et un témoin substrat constitué de 15ml de tampon et 200 µl de FDA.

Au bout d'une heure d'incubation sous agitation à 30°C, la réaction a été arrêtée en ajoutant 0,5ml d'acétone dans des tubes eppendorfs contenant préalablement 0,5ml du mélange. Les suspensions de sol sont centrifugées pendant 5min à 10000 tours/min et le surnageant est récupéré et filtré à l'aide d'un filtre millipore de 45µm de diamètre.

### V.1.2. Calcul du produit d'analyse

La lecture de la densité optique se fait à 490nm. Pour chaque échantillon de sol, trois répétitions ont été réalisées. Une gamme étalon de la solution Fluorescéine de concentrations allant de 0 à 0,5mg.l<sup>-1</sup> est préparée en utilisant de la solution de Fluorescéine DiAcétate dans du tampon phospahte de sodium. Le taux d'hydrolyse de Fluorescéine DiAcétate est calculé (en µg de produit Fluorescéine par gramme de sol sec par heure) afin de déterminer l'activité microbienne totale de chaque sol.

## V.2. Activités des phosphatases microbiennes du sol

La méthode consiste à mesurer l'hydrolyse de p-Nitrophenyl Phosphate (p-NPP) (référence 104-0 Sigma Phosphatase Substrate). Cent milligrammes de p-NPP en pastille sont dissous dans un flacon contenant 10ml d'eau déminéralisée. Le flacon est ensuite enveloppé de papier aluminium et conservé à - 20°C.

### V.2.1. Dosage du produit d'hydrolyse

Pour les deux types de phosphatases (phosphatases acides et phosphatase alcalines) à doser, les pH des tampons sont différents : pH 6 pour les phosphatases acides et pH 11 pour les phosphatases alcalines.

Les échantillons de sol (20mg équivalent poids sec) sont mis en suspensions dans 100µl de p-NPP et 400µl de tampon Mc Ilvain (tampon citrate phosphate) stérile (pH 7). Le tampon Mc Ilvain est préparé suivant le protocole présenté en annexe 4. Le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant 1h et sous agitation. Après incubation, la réaction d'hydrolyse a été arrêtée en ajoutant 100µl de la solution CaCl<sub>2</sub> à 0,5 M et 400µl de NaOH à 0,5M.

### V.2.2. Calcul du produit d'analyse

Trois exemplaires et deux témoins (témoin substrat (TS) et témoin enzyme (TE)) ont été préparés pour chaque essai. La lecture de la densité optique se fait à 400 nm en prenant comme référence un témoin blanc H<sub>2</sub>O. La quantité des produits d'hydrolyse du phosphate en milieu acide et alcalin est calculée (en µg de p-Nitrophénol par gramme de sol sec par heure) afin de déterminer l'activité de phosphatase microbienne de chaque sol.

## **VI. Traitement statistique des données**

Afin de comparer les différentes données des paramètres mesurés de chaque traitement, le test de comparaison de moyennes par paire de Newman Keuls au seuil de probabilité 0,05 a été appliqué en exploitant le logiciel de statistique STATISTICA.

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisé avec le logiciel SPSS 13,0 pour analyser les interrelations entre les paramètres mesurés et les traitements. L'ACP est une méthode classique qui a pour objectif de présenter sous forme de graphique le maximum d'informations contenues dans le tableau de données.



---

## R é s u l t a t s

---

## RESULTATS

### I. Isolement des souches de rhizobia à partir des nodules de *Dalbergia trichocarpa*

La vitesse de croissance, les aspects des cultures sur milieu YEM gélosé au rouge Congo et l'examen microscopique des nouveaux isolats permettent de distinguer 10 souches de rhizobia. Les dix souches de *Rhizobium* ont les mêmes caractères que les souches de référence : des bacilles, Gram négatif, isolés, mobiles grâce à une ciliature témoignée par leurs mouvements browniens. Les **tableaux 4** et **5** montrent les caractères cultureux et morphologiques des dix souches de *Rhizobium* isolées.

Les isolats sont conservés dans des tubes de collection à une température de 4°C et seront utilisées pour d'autres études ultérieures comme le test de nodulation et l'essai de l'inoculation en serre.

**Tableau 4:** Résumé des caractères cultureux des dix souches après observation à l'œil nu

Souches	1	2	3	STM 601
<b>Caractères</b>				
<b>Diamètre de colonie</b>	< 2mm	>2mm	<2mm	< 2mm
<b>Forme</b>	arrondie, circulaire	arrondie, circulaire, colonie volumineuse	arrondie, volumineuse	arrondie, circulaire
<b>Surface</b>	lisse	lisse humide	lisse	lisse
<b>Hauteur</b>	bombée	légèrement bombée	bombée	bombée
<b>Contour</b>	net, régulier	bord régulier	bord régulier	net, régulier
<b>Consistance</b>	Visqueuse, mucilagineuse	muqueuse	visqueuse	visqueuse, mucilagineuse
<b>Caractères optiques</b>	translucide	Semi translucide opaque	translucide opaque	translucide
<b>Couleur</b>	blanche	blanche laiteuse	blanche	blanche
<b>Croissance à 28°C</b>	rapide	rapide	rapide	rapide

Tableau 4 : Suite

Souches	4	5	6	7	8	9	10	STM 609
<b>Caractères</b>	4	5	6	7	8	9	10	STM 609
<b>Diamètre de colonie</b>	>2mm	>3mm	<2mm	>2mm	>2mm	> 3 mm	>2mm	>3mm
<b>Forme</b>	arrondie, circulaire	arrondie, volumineuse	arrondie, circulaire, colonie volumineuse	arrondie, circulaire	arrondie, circulaire	arrondie, circulaire, colonie volumineuse	arrondie, circulaire	arrondie, volumineuse
<b>Surface</b>	lisse	lisse	lisse humide	lisse	lisse	lisse	lisse humide	lisse
<b>Hauteur</b>	bombée	légèrement bombée	bombée	bombée	légèrement bombée	légèrement bombée	bombée	légèrement bombée
<b>Contour</b>	bord régulier	bord régulier	net, régulier	bord régulier	net, régulier	bord, régulier	net, régulier	bord régulier
<b>Consistance</b>	muqueuse	visqueuse	visqueuse	visqueuse, mucilagineuse	visqueuse	visqueuse	muqueuse	visqueuse
<b>Caractères optiques</b>	Translucide, opaque	Semi translucide, opaque	Semi-translucide	translucide	translucide, opaque	translucide	translucide	Semi translucide, opaque
<b>Couleur</b>	blanche	blanche laiteuse	blanche	blanche laiteuse	blanche	blanche	blanche	blanche laiteuse
<b>Croissance à 28°C</b>	lente	lente	lente	lente	lente	lente	lente	lente

Tableau 5 : Résumé des caractères morphologiques des dix souches après microscopie

Souches	1	2	3	STM 601	4	5	6	7	8	9	10	STM 609
<b>Mobilité</b>	++	+	+	++	++	++	+	++	+	++	+	++
<b>Forme</b>	bâtonnet long	bâtonnet court	bâtonnet court	bâtonnet long	bâtonnet long	bâtonnet court	bâtonnet long	bâtonnet long	bâtonnet long	bâtonnet long	bâtonnet court	bâtonnet court
<b>Mode de regroupement</b>	isolé	isolé	isolé	isolé	isolé	isolé	isolé	isolé	isolé	isolé	isolé	isolé
<b>Cellule</b>	longue petite	grosse large	longue petite	longue	grosse large	longue petite	longue petite	longue large	grosse large	longue petite	longue large	longue
<b>Gram</b>	négatif	négatif	négatif		négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
<b>Ciliature</b>	péritriche	péritriche	péritriche		péritriche	péritriche	péritriche	péritriche	péritriche	péritriche	péritriche	péritriche

++ : Très mobile ; + : mobile

## II. Caractérisation symbiotique des isolats

Afin de vérifier les propriétés symbiotiques des souches de *Dalbergia trichocarpa* c'est à dire la capacité à noduler et à fixer l'azote, nous avons étudié le spectre d'hôte de l'ensemble de souches de la nouvelle collection. Nous avons testé nos souches sur 2 espèces de *Dalbergia* (*D. trichocarpa* et *D. madagascariensis*) et sur siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Siratro, qui présente un large spectre d'hôtes, est bien connu pour son aptitude à noduler avec un grand nombre de rhizobia.

Pour ce test, nous avons utilisé les deux souches types de *Dalbergia* comme témoins positifs.

Les résultats des tests d'infectivité et d'effectivité menés sur 3 plantes différentes (cf matériels et méthodes): *Macroptilium atropurpureum*, *D. trichocarpa* et *D. madagascariensis*, à partir de nouveaux isolats sont présentés dans les **tableaux 6**.

**Tableau 6:** Résultats des tests de nodulation sur 3 plantes différentes

Souches	<i>Macroptilium</i>	<i>Dalbergia</i>	<i>Dalbergia</i>
	<i>atropurpureum</i>	<i>trichocarpa</i>	<i>madagascariensis</i>
4, 5, 9, 10, STM 609	E	E	O
7	E	E	I
6, 8	I	I	O
1, 2	O	O	O
3	E	E	O
STM601	O	O	E

E = nodules effectifs; I = nodules ineffectifs; O = pas de nodulation

STM 609 : Souche à croissance lente; STM 601: Souche à croissance rapide ; 1 à 10: Nouveaux isolats

L'apparition de nodosités (infectivité) est suivie. La capacité de ces nodules à fixer l'azote (effectivité) est estimée par l'état de la plante (taille, couleur des feuilles) et par comparaison avec des plantes témoins non inoculées.

La réponse à l'inoculation sur 2 espèces de plante montre que, 4 semaines après l'inoculation, 4 nouveaux isolats à croissance lente sont effectifs sur *Dalbergia trichocarpa* et

*Macroptilium atropurpureum*. La vitesse de nodulation de ces 4 souches est comparable à celle de la souche référence STM 609.

Deux autres isolats à croissance lente forment des nodules ineffectifs sur ces deux plantes. Pour les souches à croissance rapide, seule la souche 3 forme des nodules effectifs sur *D. trichocarpa* et siratro. Les 2 autres souches ne forment aucun nodule, ni même de pseudonodules ou de légers renflements sur les racines de *Macroptilium atropurpureum* et *Dalbergia trichocarpa*. Cependant, il est à noter que pour certaines plantes de *Macroptilium atropurpureum* inoculées avec la souche 2, les feuilles sont de couleur verte par rapport aux plantes non inoculées (**Photo 3**).

Pour le cas de *D. madagascariensis*, à l'exception de la souche type STM 601, la majorité des souches testées ne forment pas de nodules. Cela peut être dû au manque de spécificité entre les souches et la plante. Néanmoins, nous avons observé de nodules ineffectifs induits par la souche 7 à croissance lente.



**Photo 3:** Test de nodulation de la souche 2 sur *Macroptilium atropurpureum*

## A. EXPERIENCE SUR SOL STERILISE

### I. Influence de la diversité des symbiotes mycorhiziennes sur le développement et sur le sur la symbiose fixatrice d'azote *Dalbergia trichocarpa*-rhizobia

#### I.1.Effet de l'endomycorhization mono-souche sur le développement de la plante et sur la symbiose fixatrice d'azote *Dalbergia trichocarpa*-rhizobia

Après 4 mois de culture sur un sol stérilisé, l'inoculation par chacune de trois souches endomycorhizes à vésicules et arbuscules (*G. intraradices*, *G. mosseae* et *G. fasciculatus*) a une influence positive sur la croissance en hauteur et sur la biomasse aérienne et racinaire des

jeunes plantes de *Dalbergia trichocarpa* (**tableau 7**). En effet, une différence significative entre la hauteur, la biomasse aérienne et racinaire des plantes inoculées et les plantes non inoculées ont été observées lors de traitement avec les 3 souches de *Glomus*. Cette tendance est observée dès le deuxième mois après l'inoculation.

**Tableau 7** : Effet de la diversité des symbiotes mycorhiziennes sur la croissance de *Dalbergia trichocarpa* dans un sol préalablement stérilisé après 4 mois de culture en serre.

Traitements	Hauteur (cm)	Biomasse aérienne (g poids sec)	Biomasse racinaire (g poids sec)	Biomasse totale (g poids sec)
T	4,03 a <sup>(*)</sup>	0,127 a	0,070 a	0,191 a
A	25,77c	0,419 c	0,286 c	0,705 bc
B	19,94 b	0,359 b	0,229 b	0,584 b
C	37,89 e	0,722 e	0,422 e	1,145 d
A+B	20,01 b	0,388 b	0,234 b	0,600 b
A+C	42,31 f	0,873 f	0,486 f	1,260 e
B+C	33,90 d	0,523 d	0,393 d	0,930 c
A+B+C	48,28 g	0,967 g	0,685 g	1,653 f

(\*)Pour chaque paramètre mesuré, les données dans la même colonne suivies par les mêmes lettres n'ont pas de différence significative selon le test de Newman Keuls ( $P < 0,05$ ).

**T** : Témoin non inoculé ; **A** : *Glomus mosseae* ; **B** : *Glomus fasciculatus* ; **C** : *Glomus intraradices*

Notons aussi une augmentation significative de nombre de nodules par plant par rapport aux témoins non inoculés (**tableau 8**). Comme la taille de nodules est très petite (difficile à peser), nous avons compté seulement le nombre de nodules par plant. Outre la différence entre le témoin et les plantes inoculées, l'influence de chaque souche endomycorhizienne au niveau du développement de la plante a montré également des différences significatives. Ainsi, l'effet positif de l'inoculation mycorhizienne le plus élevé a été enregistré pour le traitement avec la souche *G. intraradices*.

Par rapport au témoin, la hauteur, le nombre de nodules par plant et la biomasse totale des plants inoculés par la souche de *G. fasciculatus* étaient significativement élevés mais inférieurs à ceux mesurés pour les traitements avec *G. intraradices* et *G. mosseae*. Il en est de même pour les quantités d'azote et phosphore accumulés dans les feuilles des plantes et le taux de mycorhization (**tableau 8**). En effet, le taux de mycorhization le plus élevé a été enregistré chez les plantes mycorhizées par la souche *G. intraradices* (68,19%).

**Tableau 8** : Effet de la diversité des symbiotes mycorhiziennes sur le nombre de nodules par plant, le taux de mycorhization, la dépendance mycorhizienne et sur les taux d'azote et phosphore accumulés dans les feuilles de *Dalbergia trichocarpa*, dans un sol préalablement stérilisé après 4 mois de culture en serre.

Traitements	Nombre de nodules par plant	Taux de mycorhization (%)	Dépendance mycorhizienne (%)	N (% par plant)	P (ppm par plant)
T	0 a <sup>(*)</sup>	0 a	0 a	1,08 a	286,8 a
A	61c	47,59 c	29,2 d	2,38 b	936,8 bc
B	43 b	34 b	23,2 b	2,06 ab	772,9 b
C	85 e	68,19 e	59,5 f	3,18 c	1078,3 c
A+B	46 b	36,79 b	26,1 c	2,10 ab	789,8 b
A+C	91 f	73,40 f	74,6 g	3,65 d	1162,6 c
B+C	66 d	54,20 d	39,6 e	2,97 bc	983,3 bc
A+B+C	112 g	88,80 g	84 h	4,03 e	1376,5 d

(\*)Pour chaque paramètre mesuré, les données dans la même colonne suivies par les mêmes lettres n'ont pas de différence significative selon le test de Newman Keuls ( $P < 0,05$ ).

T : Témoin non inoculé ; A : *Glomus mosseae* ; B : *Glomus fasciculatus* ; C : *Glomus intraradices*

## I.2. Effet de l'endomycorhization multi-souche sur le développement de la plante et sur la symbiose fixatrice d'azote *Dalbergia trichocarpa*-rhizobia

Comme ceux des expériences précédentes (inoculation mono-souche), des différences significatives ont été observées entre les plantes inoculées et les plantes non inoculées lors de la double et la triple inoculation.

Comparé avec la croissance en hauteur et la biomasse totale des plantes témoins non inoculées, celles des plantes inoculées avec deux ou trois souches de *Glomus* sont significativement élevées. Cependant, il est à noter que pour certaines plantes inoculées par la combinaison de deux souches, les résultats sont significativement moins élevés que ceux enregistrés dans le traitement uniquement avec une souche de *Glomus*. La mycorhization par la combinaison de deux souches *G. fasciculatus* et *G. mosseae* sur la croissance en hauteur, la biomasse aérienne et racinaire, bien que comparable à celle obtenue avec la souche *G. fasciculatus*, est significativement moins faible que celle obtenue avec la souche *G. mosseae* et la souche *G. intraradices* (**tableau 7**). Cette tendance a également été observée pour le nombre de nodules par plant, la biomasse totale, les quantités d'azote et phosphore accumulés dans les feuilles, le taux de mycorhization et les dépendances mycorhiziennes relatives (DMR) (**tableau 8**). Pour tous les paramètres mesurés, aucune différence significative n'a été décelée entre le traitement par combinaison de deux souches *G. fasciculatus* et *G. mosseae* et le traitement uniquement avec la souche *G. fasciculatus*. Pourtant, les variables de croissance (hauteur, biomasse aérienne et racinaire), les teneurs en azote et phosphore et le taux de mycorhization étaient significativement élevés lorsque la souche de *G. mosseae* et la souche de *G. fasciculatus* sont combinées avec la souche de *G. intraradices*. Enfin, les variables de croissance et le taux de mycorhization les plus élevées ont été enregistrés pour le traitement mélangeant les trois souches de mycorhizes.

## II. Effet de l'endomycorhization sur la structure de la microflore tellurique

La diversité des souches endomycorhiziennes affecte la structure de la communauté microbienne du sol.

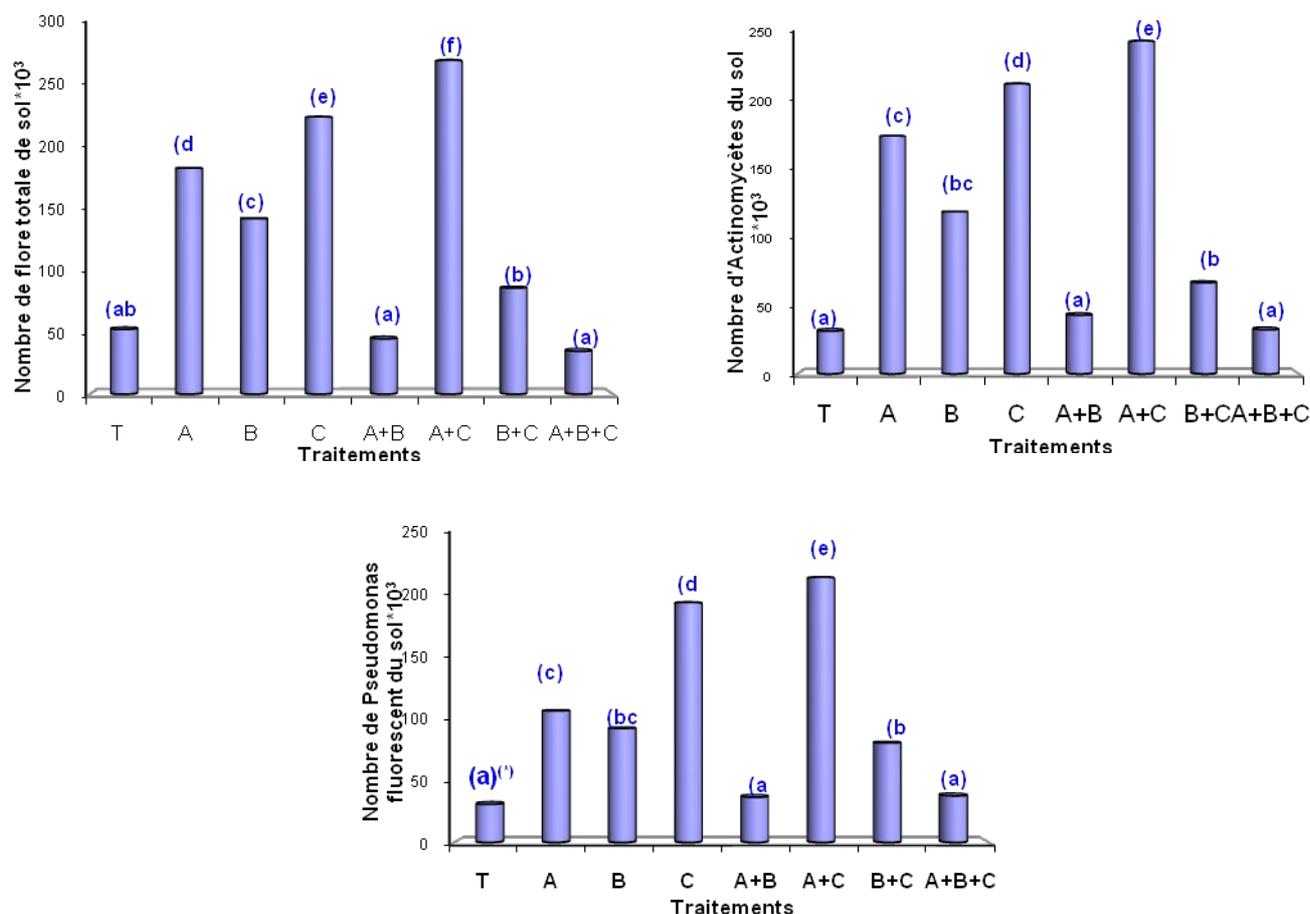
### II.1. Flore totale cultivable du sol

La flore totale cultivable regroupe tous les microorganismes (champignon et bactérie) capables de pousser sur le milieu solide synthétique (Tryptose Soy Agar). Les résultats ont montré que des différences significatives du nombre la population microbienne ont été observées lorsque les plantes sont inoculées par chacune des trois souches de *Glomus* (**figure 3**). Pourtant, les UFC par gramme de sol de la flore totale varient selon les types de combinaison des souches endomycorhiziennes. En effet, les UFC les plus élevées ont été enregistrées dans le traitement associant *G. mosseae* et *G. intraradices*. Aucune différence n'a été observée entre le nombre de flore totale pour le traitement combinant *G. mosseae* et

*G. fasciculatus* ou le traitement associant les trois souches de *Glomus*. Par rapport au témoin, le nombre de flore totale formée lors de ces deux traitements a été significativement faible.

## II.2. Actinomycètes

Des résultats similaires à ceux du dénombrement de la flore totale cultivable ont été observés chez les Actinomycètes lorsque les plantes sont inoculées par chacune des trois souches de MVA. Le traitement uniquement avec la souche *G. intraradices* ou le traitement associant *G. intraradices* et *G. mosseae* a donné un nombre d'Actinomycètes significativement supérieur à celui des autres traitements (**figure 2**).



**Figure 2** : Histogrammes montrant le dénombrement de quelques groupes de la flore tellurique dans les traitements inoculés ou les témoins

(\*) : 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

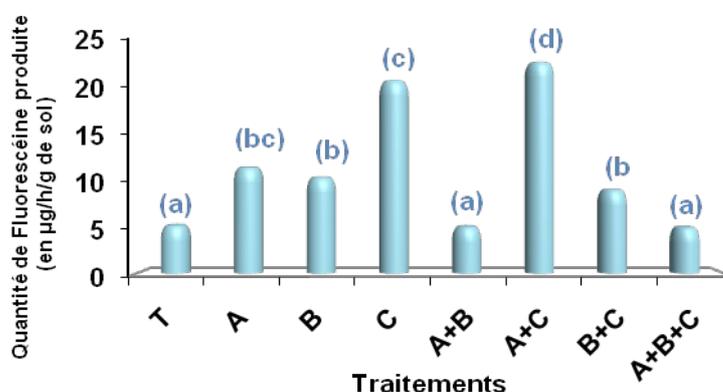
**T** : Témoin non inoculé ; **A** : *Glomus mosseae* ; **B** : *Glomus fasciculatus* ; **C** : *Glomus intraradices*

### II.3. *Pseudomonas* fluorescents

Les nombres de *Pseudomonas* de groupe fluorescent sont faibles dans tous les traitements inoculés ou témoins. Seuls les traitements avec la souche *G. intraradices* ou l'inoculum composé de *G. intraradices* et *G. mosseae* ont donné un nombre de *Pseudomonas* assez élevé.

### II.4. Activité microbienne totale mesurée par l'hydrolyse de la FDA

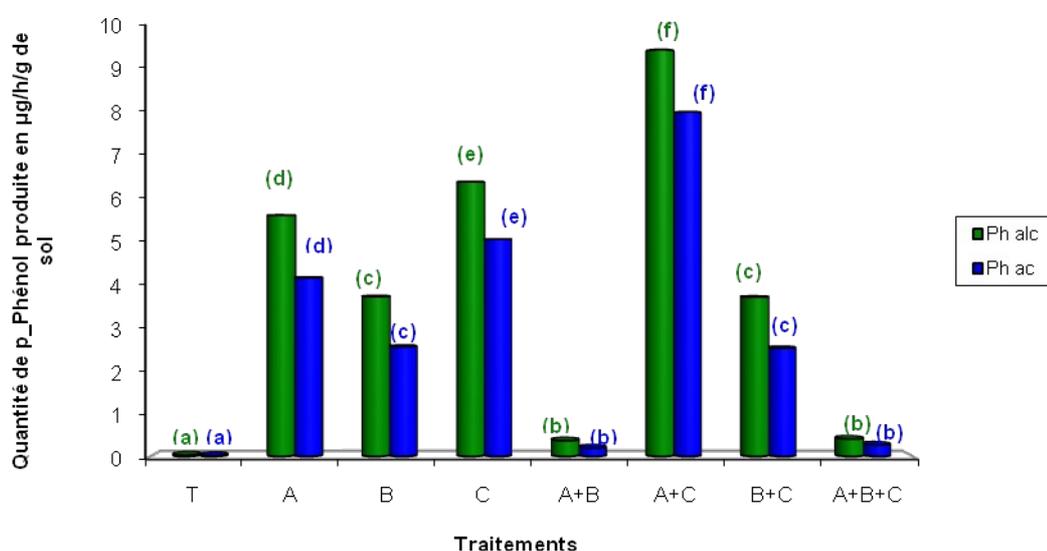
Le résultat de la quantité de fluorescéine produite par les souches de *Glomus* est présenté dans la **figure 3** ci-après. Seuls les traitements uniquement avec la souche *G.intraradices* ou combinant *G. intraradices* et *G. mosseae* ont donné une quantité élevée de fluorescéine élevée. Ainsi, l'inoculation par ces souches a permis d'obtenir des quantités de produit d'hydrolyse (Fluorescéine) quatre fois plus que celles des traitements témoins. Étant donné que dans cette réaction d'hydrolyse, la quantité du produit d'hydrolyse exprime l'activité microbienne totale au niveau du sol, les traitements associant *G. intraradices* et *G. mosseae* ont donc nettement stimulé l'activité totale des microorganismes après leur introduction dans le sol. Toutefois, ces données ne renseignent pas sur les groupes ou les types de microorganismes stimulés.



**Figure 3** : Histogramme montrant la quantité de Fluorescéine produite pour chaque traitement  
 T : Témoin non inoculé ; A : *Glomus mosseae* ; B : *Glomus fasciculatus* ; C : *Glomus intraradices*

### II.5. Activités des enzymes phosphatasiques du sol

Les activités des deux enzymes (phosphatase alcaline et phosphatase acide) ont été toutes bien décelées dans tous les traitements de *D. trichocarpa* en culture. Pour tous les traitements, la quantité du produit de l'hydrolyse obtenu (p-Nitrophenol) a été élevée par rapport à celle observée chez les traitements témoins et cette quantité a été plus élevée chez l'hydrolyse en milieu alcalin que celle en milieu acide (**figure 4**). Comme ceux des résultats de dénombrement de la microflore tellurique, aucune différence n'a été observée entre la quantité de p-Nitrophenol produite pour le traitement combinant *G. mosseae* et *G. fasciculatus* ou le traitement associant les trois souches de *Glomus*. La quantité de p-Nitrophenol produite le plus élevée a été mesurée dans le traitement mélangeant *G. intraradices* et *G. mosseae*.



**Figure 4** : Histogramme montrant la quantité des produits d'hydrolyse du phosphate en milieu acide et alcalin

T : Témoin non inoculé ; A : *Glomus mosseae* ; B : *Glomus fasciculatus* ; C : *Glomus intraradices*

## B. EXPERIENCE SUR SOL NON STERILISE

### I. Influence de la diversité des symbiotes mycorhiziennes sur la croissance et sur le développement de la symbiose fixatrice d'azote

Contrairement aux résultats observés sur sol stérilisé, l'inoculation des plantes par chacune des souches de MVA ou les traitements par la combinaison de ces souches n'a aucun effet sur

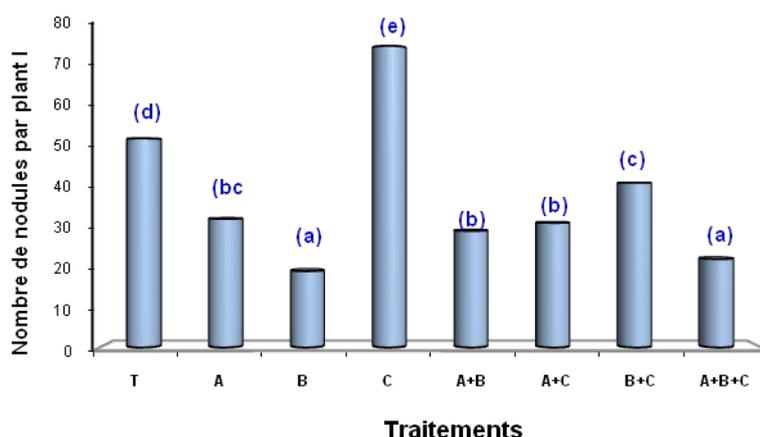
la variable croissance des plants lorsque le sol n'a pas été au préalable stérilisé.

Cependant, des résultats significatifs par rapport au témoin ont été observés pour les plantes inoculées avec *G. intraradices* (**tableau 9**). De même, des résultats similaires ont été observés pour la nodulation de la plante (**figure 5**).

**Tableau 9** : Effet de la diversité des symbiotes mycorhiziennes sur la croissance de *Dalbergia trichocarpa* dans un sol non stérilisé après 4 mois de culture en serre

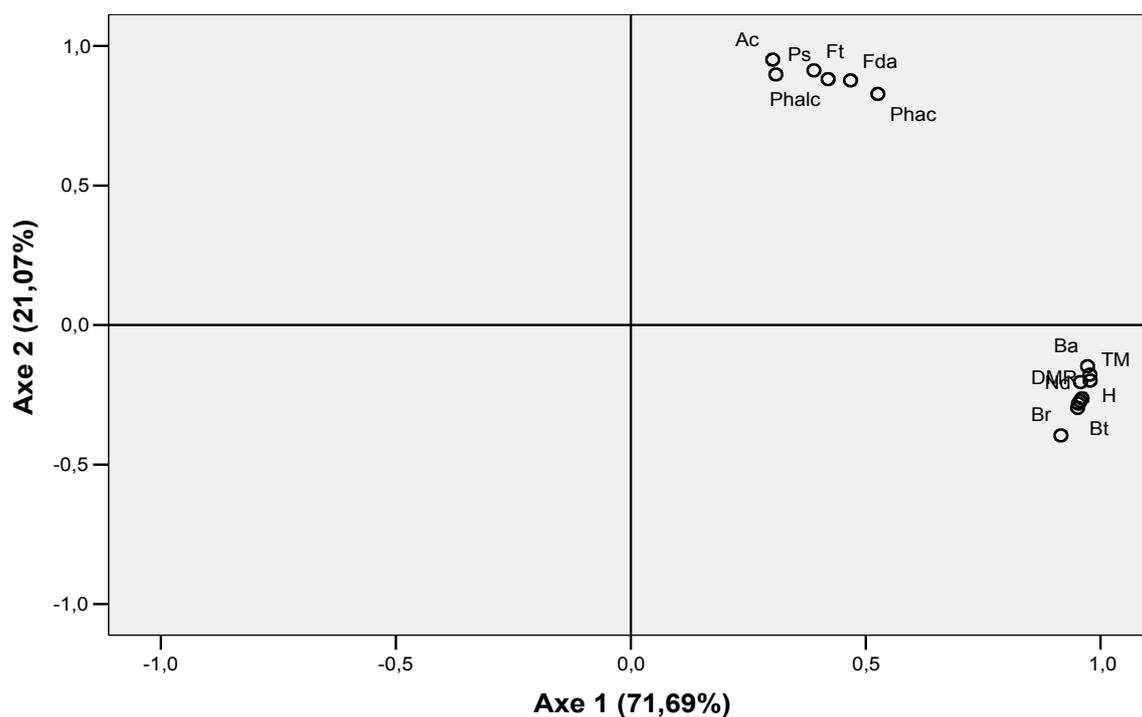
Traitements	Hauteur (g poids sec)	Biomasse aérienne (g poids sec)	Biomasse racinaire (g poids sec)	Biomasse totale (g poids sec)	Nombre de nodules
<b>T</b>	15,024 e	0,992 e	0,999 f	1,991 d	52 d
<b>A</b>	7,51 c	0,476 c	0,347 d	0,823 bc	32 bc
<b>B</b>	4,653 a <sup>(*)</sup>	0,227 a	0,089 a	0,316 a	19 a
<b>C</b>	18,125 f	1,051 f	1,086 g	2,137 e	75 e
<b>A+B</b>	5,45 ab	0,248 a	0,095 a	0,343 a	29 b
<b>A+C</b>	10 d	0,561 d	0,471 e	1,032 c	31 b
<b>B+C</b>	8,96 c	0,304 b	0,254 c	0,558 b	41 c
<b>A+B+C</b>	6,28 b	0,312 b	0,189 b	0,501 b	22 a

<sup>(\*)</sup>: 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



**Figure 5** : Histogramme montrant l'effet de l'inoculation sur le nombre de nodules par plant pour chaque traitement.

**T** : Témoin non inoculé ; **A** : *Glomus mosseae* ; **B** : *Glomus fasciculatus* ; **C** : *Glomus intraradices*



**Figure 6** : Projection des variables sur les 2 axes factoriels de l'ACP

**H**: Hauteur

**Ba** : Biomasse aérienne

**Br** : Biomasse racinaire

**Bt** : Biomasse totale

**TM**: Taux de mycorhization

**Nod**: Nombre de nodules par plant

**P** : Taux de phosphore

**N** : Taux d'azote

**DMR** : Dépendance Mycorhizienne Relative

**Phalc** : Phosphatase alcaline

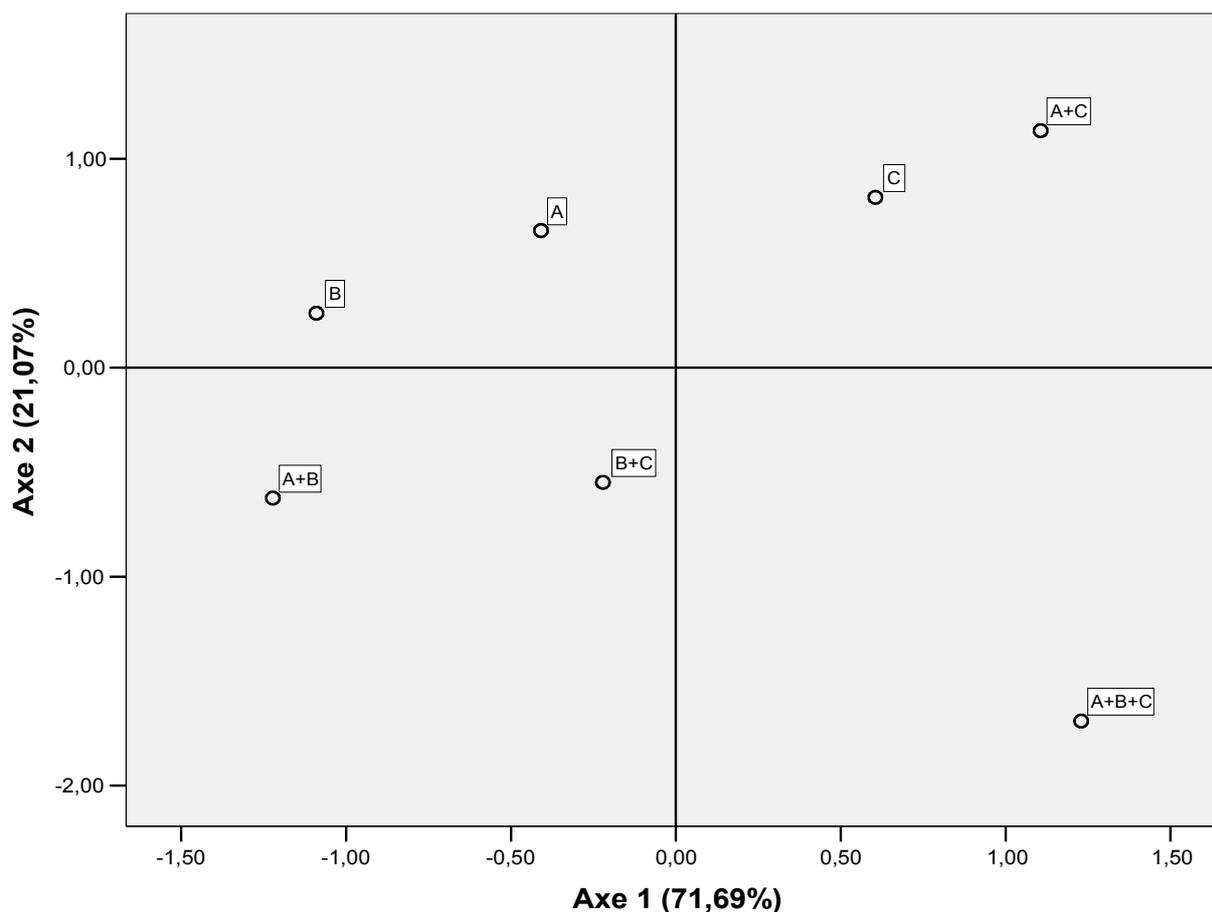
**Phac** : Phosphatase acide

**Fda** : Fluorescéine diacétate

**Ps** : *Pseudomonas fluorescens*

**Ac** : Actinomycètes

**Ft** : Flore totale



**Figure 7** : Projection des traitements sur les 2 axes factoriels de l'ACP

**B** : *Glomus mosseae*

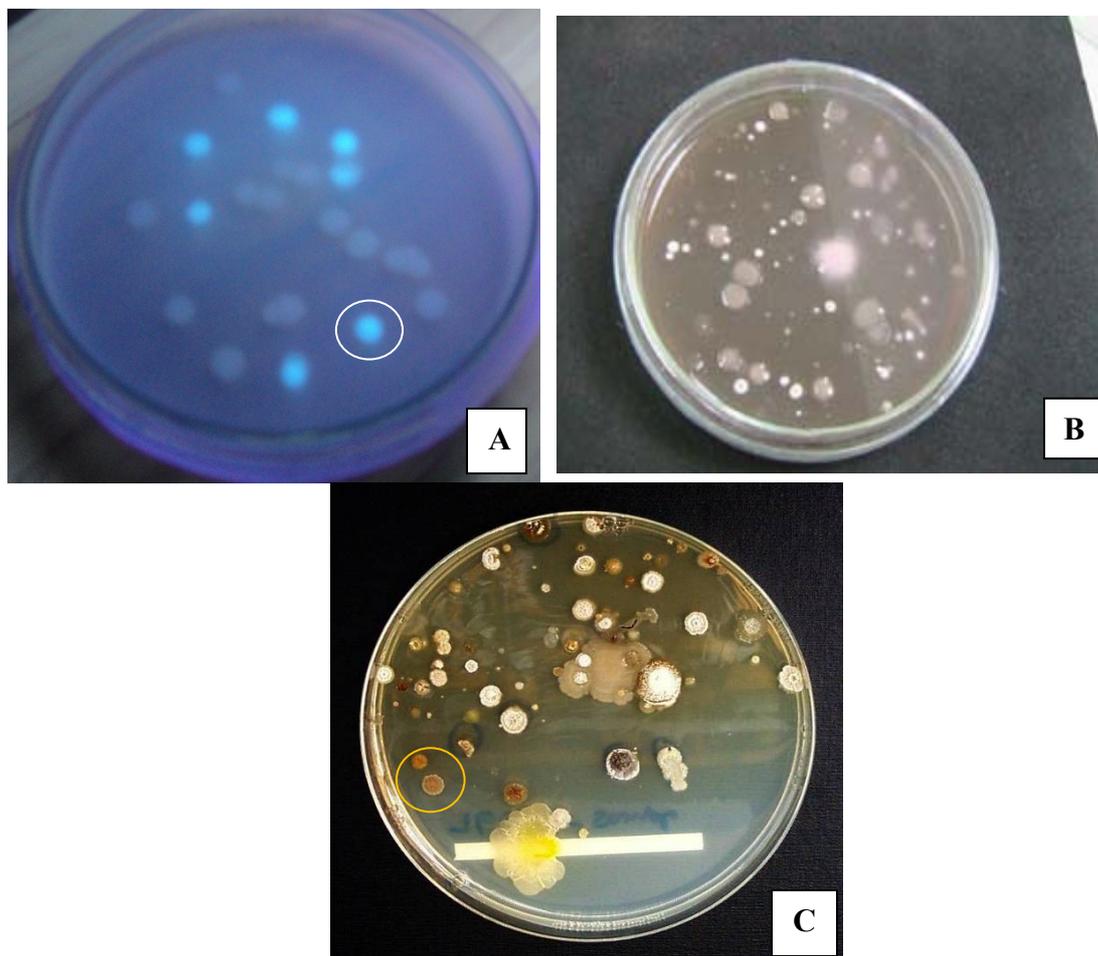
**B** : *Glomus fasciculatus*

**C** : *Glomus intraradices*

L'analyse en composantes principales (ACP) présentée à la **figure 6** montre que l'axe 1 absorbe les 71,69 % de l'information de données et caractérisé sur la partie positive par deux groupes de variables. Le groupe 1 se trouve dans la partie négative de l'axe 2 et ce sont les variables de croissance (H, Br, Ba, Nod et Bt), le taux d'endomycorhization (TM), les taux d'azote et de phosphore accumulés dans les feuilles et le DMR contribuent à la constitution de cet axe, et ils sont positivement corrélés entre eux alors que les autres variables (groupe 2), activité phosphatasique (phosphatase acide et phosphatase alcaline), activité microbienne totale (Fluorescéine Diacétate) et certaines composantes microbiologiques (Flore totale, Actinomycètes et *Pseudomonas fluorescents*) sont dans le coté positif de l'axe 2.

Pour le plan factoriel correspondant aux traitements (**figure 7**), leur distribution montre que les traitements combinant les trois souches de *Glomus* sont liés à une forte croissance des plants alors que le traitement uniquement avec souche *G. intraradices* ou le traitement par la

combinaison de deux souches de *Glomus* : *G. mosseae* et *G. intraradices* caractérisent la variation des activités enzymatiques et de certaines composantes microbiologiques. Ces résultats d'ACP confirment les résultats obtenus par traitement statistique des différents paramètres.



**Figure 8** : Aspect morphologique des souches microbiennes observées sur leur milieu de culture respectif

**A** : *Pseudomonas* fluorescents sur milieu King B

**B** : Flore totale sur milieu TSA

**C**: Actinomycètes sur milieu Waksman

---

## D i s c u s s i o n

---



## DISCUSSION

A Madagascar, très peu d'études étaient connues sur l'impact de la structure de cortège mycorhizien associé à une légumineuse ligneuse sur la structure de peuplements de rhizobia et sur la structure de la communauté de la microflore tellurique. Nous contribuons, à travers ce travail, à l'étude de l'influence de la combinaison de différentes souches de champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules sur la croissance de la plante, sur la symbiose fixatrice d'azote et sur la structure de certains groupes de microflores telluriques.

Une collection de 10 nouveaux isolats a été constituée à partir d'une espèce d'arbre de *Dalbergia trichocarpa* endémique de Madagascar. De nombreuses études ont révélé que les arbres de légumineuses sont nodulés par des souches à croissance lente. Cependant, des études plus tardives ont montré que de nombreux arbres de légumineuses sont nodulés par des rhizobia à croissance rapide (Dreyfus et Dommergues, 1981; Zhang et al., 1991).

La majorité de nouveaux isolats de *Dalbergia trichocarpa* dont 7 sont des souches à croissance lente communes à la plupart des légumineuses tropicales y compris les arbres (Parker, 2003). Les trois (3) derniers isolats sont des souches à croissance rapide. Ce résultat est concordant à celui de Rasolomampianina et al. en 2005 selon lesquels des rhizobia à croissance rapide appartenant à six genres sont isolés des nodules de six espèces de *Dalbergia* endémiques de Madagascar (*D. madagascariensis*, *D. monticola*, *D. chapelieri*, *D. baroni*, *D. louvelii* et *D. sp.*).

La capacité des isolats à induire des nodules est testée en fonction des graines disponibles. En effectuant des tests de nodulation sur 3 espèces de plantes différentes, nous avons observé au niveau des rhizobia de *D. trichocarpa* deux groupes de spécificité de nodulation différents.

Le premier groupe, capable de renoduler *D. trichocarpa* et *Macroptilium atropurpureum* comprend la plupart des souches à croissance lente. Le deuxième groupe correspond aux bactéries incapables de former des nodules sur les racines de *D. trichocarpa*, *Macroptilium atropurpureum* et *D. madagascariensis*.

D'autre part, il a été observé qu'il existe apparemment une certaine spécificité d'hôte chez les *Dalbergia*. Si l'espèce *Dalbergia trichocarpa* (plante hôte) était nodulée par la majorité des souches testées, il est à noter que l'espèce *D. madagascariensis* montre une forte spécificité avec les nouveaux isolats.

Si nous avons pu identifier des souches symbiotiques de la nouvelle collection (souches isolées des nodules de *D. trichocarpa*) par les tests de nodulation. Il est à noter que certains nouveaux isolats ne sont pas symbiotiques. C'est le cas des 2 souches à croissance rapide qui ne sont pas capables de renoduler leur plante d'isolement, ni même le siratro (plante à large spectre bactérien) (Yattara, 2000). L'impact (s'il existe) de la présence de ces bactéries sur la nodulation n'est pas clair, mais il est possible qu'elles jouent le rôle de « helper » pour la nodulation (par exemple en dégradant des composés bactéricides produits par la plante), ou qu'elles facilitent la nutrition minérale des plantes (Yattara, 2000).

La présence des souches non-symbiotiques dans les nodules de *Dalbergia* est à rapprocher de diverses associations connues des bactéries avec des plantes-hôtes. Par exemple, les souches d'*Agrobacterium* sont isolées de nodules de beaucoup d'espèces de légumineuses (de Lajudie et al., 1999), mais aucune explication définitive de la présence de ces bactéries à l'intérieur de nodules ne pourrait être démontrée. La présence de ces souches dans les nodules pourrait donc être opportuniste, comme il a été déjà décrit par Tan et al., (1999).

Parmi ces souches non-symbiotiques, certaines souches à croissance rapide ont attiré notre attention. C'est le cas de la souche 2. Cette souche n'induit aucun nodule ni sur *Macroptilium atropurpureum*, ni sur *Dalbergia trichocarpa*, ni sur *Dalbergia madagascariensis*. Cependant, il est à noter que pour certaines plantes de *Macroptilium atropurpureum*, les feuilles sont de couleur verte par rapport aux plantes non inoculées, ce qui suggère que cette souche a un effet endophytes PGP (Plant Growth Promoting). Ayant un doute sur la pureté de cette souche, nous avons procédé à des observations microscopiques minutieuses (état frais et coloration de Gram) et refaire le test de nodulation sur siratro. Tous ces résultats ont montré que la souche en question est pure.

Des résultats similaires ont été mis en évidence par Zahkia (2004) chez les souches non symbiotiques de *Microbacterium*, *Starkeya*, *Agromyces-like* et *Phyllobacterium-like* en effectuant de test de nodulation sur *Macroptilium atropurpureum*.

Une étude moléculaire incluant les souches de référence de *Microbacterium*, *Starkeya*, *Agromyces-like* et *Phyllobacterium-like* doit être entreprise pour voir si cette souche de *Dalbergia trichocarpa* représente une nouvelle espèce.

Les résultats les plus marquants au cours de l'endomycorhization de la plante de *Dalbergia trichocarpa* peuvent être discutés et interprétés selon les points principaux suivants : (i) la diversité des symbiotes mycorhiziennes stimule le développement de la plante. Cette stimulation est significativement améliorée lorsque la plante est inoculée par la combinaison de deux ou trois souches de MVA (iii) la nodulation de la plante est significativement améliorée lorsque la plante est inoculée par le mélange de l'inoculum de deux ou trois souches de MVA (iii) les différentes combinaisons de l'inoculum fongique induisent de modifications sur la communauté microbienne du sol révélée par la numération de l'UFC par gramme sol et de la mesure de l'activité microbienne totale du sol.

Nos résultats montrent que la combinaison de deux ou trois souches de *Glomus* influence positivement les biomasses de *Dalbergia trichocarpa* et sa capacité nutritionnelle. Cet effet positif pourrait être attribué à la complémentarité fonctionnelle entre les souches de *Glomus*. Cependant, il est à noter que pour certains traitements associant deux souches de MVA, la croissance de la plante est moins élevée par rapport au traitement uniquement avec une seule souche de MVA. La combinaison des souches de *G. fasciculatus* et *G. mosseae* n'a pas d'influence sur les biomasses, tandis que *G. mosseae* seule augmente significativement les biomasses. De même pour le taux d'azote et le taux de phosphore accumulés dans les feuilles. Cet effet négatif pourrait être attribué à la compétition entre les souches de *Glomus*. Pourtant la combinaison de ces deux souches avec la souche de *G. intraradices* augmente significativement le taux d'azote et de phosphore, ce qui laisse suggérer que la compétition n'affecte pas la souche *G. intraradices* mais reste entre les deux souches de *Glomus* : *G. fasciculatus* et *G. mosseae*. Au niveau du système racinaire des plantes inoculées par deux ou trois souches fongiques, la souche *G. intraradices* s'est montrée significativement dominante par rapport aux autres.

Ces résultats corroborent avec ceux de certains auteurs (Baxter et Dighton 2001, Reddy et Natajara 1997) en suggérant que la co-inoculation des souches de champignons endomycorhiziennes n'influence pas forcément positivement le développement de la plante. van der Heijden., 1998 ont étudié la co-inoculation avec 4 champignons mycorhiziens à arbuscules appartenant au genre *Glomus* (3 souches de *Glomus*. sp et une souche de

*G.geosporum*) sur 11 espèces de plantes différentes. Ils ont montré que la diversité de l'inoculum fongique peut selon le cas affecter, sans effet les biomasses de la plante et les teneurs en azote et phosphore des parties aériennes des plantes. L'inoculum composé de 4 souches de *Glomus* affecte positivement les biomasses de plantes de *Lotus corniculatus*, *Trifolium pratense*, *Prunella grandiflora*, mais diminue les biomasses des autres plantes comme *Carex flacca*, *Centaureum erythrea* et *Prunella vulgaris*. La compétition entre les souches endomycorhiziennes pourraient affecter négativement la relation nutritionnelle de la souche avec la plante (van der Heijden, 2006). Nos résultats sur *Dalbergia trichocarpa* confortent les résultats de ces auteurs.

Contrairement à ce que nous avons observé sur sol stérilisé, l'inoculation avec les souches de *Glomus* n'a eu aucun effet significatif sur la croissance des plants lorsque le sol n'a pas été au préalable stérilisé. Seule, l'inoculation avec la souche *G. intraradices* a donné des résultats significatifs par rapport au témoin. Ce qui permet de penser à la capacité d'adaptation de cette souche aux conditions du milieu naturel (conditions abiotiques et biotiques définies par le sol) ainsi que son impact sur le fonctionnement et la structure de la population microbienne du sol. Le fait que les témoins soient totalement infectés par les champignons indigènes du sol indique que son potentiel infectieux est élevé. Or les propagules des champignons indigènes sont répartis dans toute la masse du sol, ce qui lui confère un avantage important sur le champignon introduit, ce qui est appliqué en un seul point du système racinaire. Il semble donc difficile pour les souches de s'installer dans le cortex des racines déjà colonisé par les champignons ou rhizobia indigènes. En pratique, la compétition exercée par les champignons indigènes risque donc bien souvent de limiter les possibilités d'introduction de souches plus efficaces.

Le traitement avec les combinaisons de l'inoculum MVA affecte positivement la nodulation de *Dalbergia trichocarpa*.

De nombreux auteurs rapportent l'effet positif de la double inoculation avec les champignons à vésicules et arbuscules et avec une bactérie du genre *Rhizobium*. Ces interactions sont de grande importance dans les écosystèmes dégradés, où les ressources en phosphore et en azote sont rares (Duponnois et al., 2001, Founoune et al., 2002 ; André et al., 2003).

La réponse des légumineuses à l'inoculation par des champignons du genre *Glomus* a été largement améliorée par la double inoculation ; *Rhizobium* – *Glomus mosseae* chez *Acacia holosericea* (Cornet et al., 1982) ; *Rhizobium* – *Glomus fasciculatus* chez *Acacia mangium* et *A.auriculiformis* (Dela-Cruz, 1988).

Requena et al. (2001), en travaillant sur l'impact de la double inoculation des souches de *Glomus* et de la souche de *Rhizobium* associée à *Anthyllis cytisoides*, ont montré que les teneurs du sol en azote sont élevées dans la double inoculation, et que le transfert d'azote de la plante fixatrice (*Anthyllis cytisoides*) vers une plante non fixatrice *Lavandula* spp. est significativement améliorée. Dans nos résultats, la combinaison de deux ou trois souches de MVA augmentent significativement le nombre de nodules par plant, excepté le cas de la souche *G. fasciculatus* où le nombre de nodules obtenu n'est pas influencé par la présence d'autres souches de *Glomus*.

A la place de la compétition classiquement observée en inoculant simultanément deux ou trois souches endomycorhiziennes et de *Rhizobium*, une synergie entre les deux types de symbiotes est observée avec *Dalbergia trichocarpa*, ce qui entraîne une conjugaison de leur effet au profit de l'hôte (Founoune et al., 2002). Des augmentations de nombre de nodules de l'ordre de 7,40 % sont obtenues lorsque la plante est inoculée par le mélange de l'inoculum de trois souches de *Glomus*. Cela revêt une importance particulière pour le développement de la plante. D'autre part, il s'ajoute à la stimulation de la nutrition phosphorée induite par les champignons endomycorhiziens, l'amélioration de la nutrition azotée consécutive aux interactions positives entre *Rhizobium* et la symbiose endomycorhizienne (Duponnois et Bâ, 1999; Duponnois, 2000; Founoune et al., 2002).

Un autre aspect intéressant de ce travail est la modification induite par la diversité des symbiotes mycorhiziens sur la structure de la microflore tellurique.

Plusieurs études ont montré que la diversité du cortège mycorhizien associé à une espèce de plante modifie la qualité et la quantité des microorganismes rhizosphériques. Le mécanisme de cette modification n'est pas très clair mais certains auteurs ont pu émettre des suggestions d'après leurs études.

La colonisation d'une ou plusieurs souches mycorhiziennes peut influencer la composition spécifique de la communauté microbienne en augmentant quelques groupes (Krishnaraj et Sreenivasa, 1992) et en réduisant d'autres (Christensen et Jakobsen, 1993). Dans notre étude, l'inoculation par la combinaison de deux souches *G. mosseae* et *G. fasciculatus* ou *G. intraradices* et *G. fasciculatus* ou trois souches de MVA entraîne une diminution du nombre des microorganismes dans la rhizosphère.

Trois hypothèses pourraient expliquer cette modification induite par la diversité du cortège mycorhizien sur la structure de la communauté microbienne du sol.

La première hypothèse serait que la colonisation des racines de la plante par les souches de MVA entraîne une compétition entre les microorganismes rhizosphériques (effet indirect). Cette compétition pourrait être attribuée à l'utilisation des éléments nutritifs par les microflore telluriques. Les exsudats fongiques importants pour le développement de la plante étaient essentiellement utilisés par les microorganismes telluriques pour leur nutrition. Selon la quantité en éléments nutritifs dont chaque groupe de microorganismes a besoin, et étant donné que les éléments nutritifs apportés par les souches de MVA au niveau des microorganismes rhizosphériques ne sont pas suffisants pour couvrir leur besoin, il est certain que la distribution de ces éléments apportés par les souches de MVA au niveau des microorganismes rhizosphériques n'est pas identique, ce qui expliquerait ainsi la variation de leur nombre.

Jonhson et *al.*, (2002) ont montré que, pour les plantes mycorhizées par MVA, 10 à 20% du carbone qu'elles ont utilisés pour la photosynthèse viennent de l'hyphe du MVA et que cela est crucial pour les autres microorganismes dans le mycorhizosphère.

La seconde hypothèse serait la compétition entre les souches fongiques et les souches microbiennes du sol sur l'utilisation des éléments minéraux (effet direct). Les deux types de microorganismes ont besoin d'éléments nutritifs pour se développer, la quantité de leur besoin pourrait ainsi influencer le nombre de microflore tellurique.

La troisième hypothèse serait la compétition entre les souches endomycorhiziennes (effet antagoniste). Certaines souches de MVA stimulent des substances inhibitrices empêchant l'aptitude des autres souches MVA à stimuler l'augmentation du nombre de la microflore tellurique. Le fait que la combinaison de la souche *G. mosseae* et *G. intraradices* soit affectée positivement le nombre des microflore telluriques peut suggérer que *G. intraradices* résiste à la compétition et entrave l'aptitude de la souche *G. mosseae* à stimuler

le développement de la flore totale cultivable, l'Actinomycète et le *Pseudomonas* fluorescents. De plus, nos résultats sur les interrelations entre les traitements et les paramètres mesurés (activités microbiennes du sol et la numération des microorganismes du sol) montrent que seul le traitement avec *G. intraradices* ou la combinaison de *G. intraradices* et *G. mosseae* est liée à l'augmentation du nombre de la microflore tellurique.



---

C o n c l u s i o n   e t   p e r s p e c t i v e s

---

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En guise de conclusion, les travaux de recherche que nous avons menés sur les symbioses mycorhiziennes et fixatrices d'azote chez *Dalbergia trichocarpa* ont permis :

- de maîtriser les techniques usuelles en microbiologie ;
- d'isoler des souches de *Rhizobium* issues de nodules racinaires de *Dalbergia trichocarpa* ;
- d'étudier leurs caractères culturels, morphologiques et de collectionner de nouveaux isolats ;
- d'étudier le spectre d'hôte des nouveaux isolats en testant leur infectivité et leur efficacité sur 3 espèces de plantes à savoir *D. trichocarpa* (plante hôte), *D. madagascariensis* et *Macroptilium atropurpureum* ;
- de mettre en évidence l'importance des relations plantes-microorganismes dans la productivité du couvert végétal ;
- d'étudier dans le cadre de la mycorhization en serre l'effet de l'endomycorhization mono-souche, multi-souche sur le développement de la plante de *D. trichocarpa*, sur le développement de la symbiose fixatrice d'azote et sur la structure de la microflore tellurique ;
- de disposer de souches sélectionnées, utilisables comme inoculum en pépinière ou en plantation.

Ces techniques simples, peu onéreuses permettent une bonne croissance de la plante et un meilleur rendement de production de biomasse en serre. Cependant, cette étude est loin d'être finie. Dans l'avenir, nous envisagerons d'entreprendre des travaux de recherches visant à l'application et à la vulgarisation des techniques mises au point.

Aussi axerons-nous nos travaux ultérieurs sur :

- L'étude du spectre d'hôte à plusieurs espèces de *Dalbergia* endémiques ;
- La caractérisation moléculaire en incluant des souches de référence de la souche à croissance rapide (souche 2) qui a un effet endophytes PGP (Plant Growth Promoting) ;
- L'élargissement de l'essai d'inoculation en pépinière à plusieurs espèces de *Dalbergia* endémiques dont une collection de graines doit être constituée ;

- L'isolement de souches de champignons mycorhiziens à arbuscules fongiques natifs des espèces de *Dalbergia* ;
- La détermination de l'impact de la diversité des cortèges mycorhiziens natifs sur la structure des peuplements indigènes de rhizobia, sur le fonctionnement et la structure des communautés de la microflore tellurique ;
- L'étude du comportement et l'adaptation des dites plantules inoculées une fois transférées en milieu naturel, c'est-à-dire dans différents types de milieu ;
- L'étude de la compétitivité des souches introduites vis-à-vis d'autres microorganismes du sol.

---

R é f é r e n c e s   b i b l i o g r a p h i q u e s

---



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- André, S.**, Neyra, M. et Duponnois, R. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis changes the colonization pattern of *Acacia tortilis* spp. *raddiana* rhizosphere by two strains of rhizobia. *Microbial Ecology*, 45: 137-144.
- Barea, J.M.**, Azcón-Aiguilar, C. and Azcón, R. (1997). Interactions between mycorrhizal fungi and micro-organisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: Gange, A.C., Brown, V.K. (Eds), *Multitrophic interactions in Terrestrial Systems*. Blackwell science, Cambridge, pp. 67-77.
- Baxter J.W.** and Dighton J. (2001). Ectomycorrhizal diversity alters growth and nutrient acquisition of grey birch (*Betula populifolia*) seedlings in host-symbiont culture conditions. *New Phytol.* 152:139-149
- Bethlenfalvay G.J.**, Linderman RG (1992). *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. ASA Special Publication, Madison, WI, 124 pp.
- Biermann B.** et Linderman R.G. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 1983; 95: 97-105.
- Boivin, C.**, Ndoye, I., Moulouba, F., de Lajudie, P., Dupuy, N. and Dreyfus, B. (1997). Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms, and unusual characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 16: 1-30.
- Bonfante-Fasolo P.** (1984). Anatomy and morphology of VA Mycorrhizae. In: BOCA RATON. VA mycorrhiza. Florida: CRC Press: 5-33
- Boullard, B.** (1990). *Guerre et paix dans le règne végétal*. Edition marketing, P.336.
- Broughton, D.J.** (1983). *Legumes. Nitrogen. Fixation*, Oxford University Press. 3: 339
- Brundett, M.C.** Piche, Y. Peterson, R.L. (1985). A developmental study of the early stages in vesicular arbuscular mycorrhizal formation. *Can. Bot.* 63: 184-194.
- Brussaard** (1998). *Soil Biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems*. CABI 2005; 280 pages.
- Christensen, H.**, Jakobsen, I. (1993). Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biol. Fert. Soils*.15: 253-258

- Cleyet-Marel, J.C.**(1989). Protocole de prélèvement et de conservation de nodosités récoltés sur les racines de Légumineuses. In : fichier technique de fixation symbiotique de l'azote, II RHIZ 1C. Rome: FAO.
- Cleyet-Marel, J.C.** (1989). Isolement de souche de *Rhizobium*. In : fichier technique de fixation symbiotique de l'azote, II RHIZ 1C. Rome: FAO.
- Cornet, F**, Diem, HG. (1982). Etude comparative de l'efficacité des souches de *Rhizobium* d'*Acacia* isolées de sols du Sénégal et effet de la double symbiose *Rhizobium Glomus mosseae* sur la croissance de *Acacia holosericea* et *A. raddiana*. Bois et Forêts des Tropiques, 198: 3-15.
- Date, R.A.**. (1982). Collection, Isolation, Characterization and conservation of *Rhizobium*, In: Nitrogen fixation in legumes (J.M. Vincent, ed), Academic Press Publishers: pp. 95-109.
- De Lajudie, P.**, Willems, A., Nick, G., Mohamed, S.H., Torck, U., Coopman, R., Filali-Maltouf, A., Kerters, K., Dreyfus, B., Lindström, K. and Gillis, M. 1999. *Agrobacterium* by. 1 strain isolated from nodules of tropical legumes. System Appl. Microbiol., 22: 119-132.
- Dela-Cruz** (1988). Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. ISBN1996; 489 pages.
- Demars, B.D.** and Broener, R.E.J. (1995). A simple method for observing VAM with suggestions for designing class activities. Journal of Biological education. 29: 209-214.
- Dommergues, Y.**, Mangenot, F. (1970) .Ecologie microbienne du sol. Paris : Masson, 76p.
- Dommergues, Y.R.** and Bosco, M., 1998. The contribution of N<sub>2</sub> fixing trees to soil productivity and rehabilitation in tropical, subtropical and mediterranean regions, in Microbial interactions in agriculture and forestry, N.S. SubbaRao and Dommergues, Y.R., Editors. Oxford et IBH Publishing. p. 65-96.
- Dreyfus, B.**, Dommergues, Y.R. (1981). Nodulation of *Acacia species* by fast and slow-growing tropical strain of *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol., 41: 97-99.
- Dreyfus, B.**, Garcia, J.L. and Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol., 38 (1): p. 89-98.
- Du Puy, D.J.**, Labat, J.N., Rabevohitra, R., Villiers, J.F., Bossier, J. et Moat, J.(2000). The leguminosae of Madagascar. Royal. Bot. Gardens. 737p.

- Duponnois, R.** (1992): Les bactéries auxiliaires de la mycorhization du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) par *Laccaria laccata* souche S 238. Thèse de Docteur en Biologie Forestière. Université de Nancy 1: 244 p.
- Duponnois, R.**, Founoune, H. et Lesueur D. (2002). Influence of the controlled dual ectomycorrhizal and rhizobal symbiosis on the growth of *Acacia mangium* provenances, the indigenous symbiotic microflora and the structure of plant parasitic nematode communities. 109: 85-102.
- Duponnois, R.**, Founoune, H., Masse, D. et Pontanier, R. (2005). Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semi-arid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation. Forest Ecology et Management. 207: 351-362.
- Duponnois, R.**, Plenchette, C and Bâ, A.M. (2001). Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *Glomus aggregatum* in Senegal. European Journal of Soil Biology 37: 181-186.
- Duponnois, R.** et Plenchette, C. (2003). A mycorrhiza helper bacterium (MHB) enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. Mycorrhiza, 13: 85-91.
- Duponnois, R.**, Founoune, H., Lesueur, D. et Neyra, M. (2000). Ectomycorrhization of six *Acacia auriculiformis* provenances from Australia, Papua New Guinea and Senegal in glasshouse conditions: effect on the plant growth and on the multiplication of plant parasitic nematodes. Australian Journal of Experimental Agriculture. 40: 443-450.
- Founoune, H.** (2001). La symbiose ectomycorhizienne des acacias australiens en Afrique de l'Ouest : impact sur le développement de la plante hôte et sur le biofonctionnement du sol. Thèse de Doctorat. Université Moulay Ismaïl. Maroc. 186 pages.
- Founoune, H.**, Duponnois, R., Bâ AM and El Bouami F. (2002a). Influence of the dual arbuscular endomycorrhizal / ectomycorrhizal symbiosis on the growth of *Acacia holosericea* (A. Cunn. Ex G. Don) in glasshouse conditions. Annals of Forest Science, 59: 93-98.
- Franck, B.** (1889). Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ber. Deut. Bot. Ges., 7: 332-346.
- Franck, A.B.**, (1887). Ueber neue Mycorrhiza-Formen. Ber.d.Deut. Bot.Gessel. 5: 395-422.
- Furlan, V.** (1981). Programm and abstracts. Fifth North American Conference en mycorrhizae. University Laval, Quebec, Canada.

- Galiana, A.**, Chaumont J, Diem, HG and Dommergues, YR. 1990. Nitrogen fixing potential of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* spp. *Biology et Fertility Soils*, 9: 261-267.
- Galiana, A.**, N'Guessan, Kanga, A., Gnahoua, G.M., Balle, P., Dupuy, B., Domenach, AM and Mallet, B. (1996). Fixation de l'azote chez *Acacia mangium* en plantation. *Bois et Forêts des Tropiques*, 249 : 51-62.
- Galiana, A.**, Prin, Y., Mallet, B., Ghahona, G.M., Poitel, M and Diem, HG. (1994). Inoculation of *Acacia mangium* with alginate beads containing *Bradyrhizobium* strains under field conditions: Long-term effect on plant growth and persistence of the introduced strain in soil. *Applied et Environmental Microbiology*, 60: 3974-3980.
- Garbaye, J.**, (1991). Biological interactions in the mycorrhizosphere. *Experientia*, 47: 370-375.
- Garbaye, J.**, (1991): Formation of endomycorrhiza by *Endogone alospora* on *Allium cepa* under three temperature regimes. *Naturalist Canadian* 100: 589-593.
- Glick, B.R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- INVAM.** (1997). International Culture collection of (vesicular) Arbuscular mycorrhizae. <http://www.invam.cafwvu.edu>.
- Jaffré T.**, Mc Coy .S. Rigault F., and Dagostine G. (1995). Quelle méthode de végétalisation pour la réhabilitation des anciens sites miniers de Nouvelle-Calédonie, P.285-288. Conférence Ecologie des milieux sur roches- ultramatiques et sur sols métallifères.
- Johnson, D.**, Leake, J.R., Ostle, N., Ineson, P. And read, D.J. (2002). In situ (CO<sub>2</sub>)-C-13 pulse-labelling of upland grassland demonstrates a rapid pathway of carbon flux from arbuscular mycorrhizal mycelia to the soil.
- Jordan, J.C.** 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn. (1938), 321 AL. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Krieg N.R.a.H., J.C. Baltimore, Williams and Wilkins Co: 1: 234-236.
- Katznelson, H.**, Rouatt, J.W. et Peterson E. A. (1962). The rhizosphere effect of mycorrhizal and non mycorrhizal roots of yellow birch seedlings. *Canadian Journal of Botany* 40: 337-382.
- Keith, H.**, Oades, J.M. et Martin, J. K. (1986): Input of carbon to soil from wheat plants. *Soil Biology et Biochemistry* 18: 445-449.

- King E.O.**, Ward M.K and Raney D.E (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44: 301–307.
- Krishnaraj, P.V.** and Sreenivasa, M.N. 1992. Increased root colonization by bacteria due to inoculation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in Chilli (*Capsium annuum*). *Zentralblatt Für Microbiologie*. 147: 131-133
- Krishnan, H.B.** and Pueppke, S.G. (1991). Sequence and analysis of the *nodABC* region of *Rhizobium fredii* USDA257, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Mol Plant Microbe Interact.*, 4(5): p. 512-20.
- Larcher, M.**, Muller, B., Mantelin, S., Rapior, S. and Cleyet-Marel, J.C. (2003). Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. *New Phytol.* 160: 119-125.
- Le Tacon F** (1982a). Perspective de la maîtrise de la mycorhization en sylviculture. In: Gianinazzi S. Les mycorhizes: biologie et utilisation. Paris: INRA Press.: 273-283.
- Lewin, A.C.**, Rosenberg, C., Meyer, Z.A., Wong, C.-H., Nelson, L., Manen, J.-F., Stanley, J., Dowling, D.N. (1987). Multiple host-specificity loci of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Mol. Biol.*, 8: 447-459.
- Morton, J.B.** and Benny, G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families. Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae, *Mycotaxon*. 37: 471-491.
- Moulin, L.**, Munive, A., Dreyfus, B. and Boivin-Masson, C.(2001). Nodulation of legumes by members of the Beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*. 411: 948-950.
- Ndiaye, M.** (1984). Place des légumineuses pérennes dans les systèmes de production des zones arides et semi-arides du Sénégal. 76p. Diplôme d'études Supérieures spécialisés. Université Abdou Moumoune de Niamey (Niger).
- Parker, M. A.** (2003). Genetic markers for analysing symbiotic relationships and lateral gene transfer in Neotropical bradyrhizobia. *Molecular Ecology.*, 12: 2447-2455.
- Perret, X.**, Staehelin, C. and Broughton, W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(1): 180-201.

- 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. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Pueppke, S.G.** and Broughton, W.J. (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **12**(4): p. 293-318.
- Rasolomampianina, R.**, Bailly, X., Fetiarison, R., Rabevohitra, R., Avarre, J.C., Benna, G., Ramaroson, L., Raherimandimby, M. and Dreyfus, B. (2005). Nitrogen-fixing nodules Rose wood (*Dalbergia* sp.) legumes endemic to Madagascar host seven different nodulating genera of  $\alpha$ -subclass and  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Molecular Ecology*. 14: 4135-4146.
- Rasolomampianina, R.**, Duponnois, R., DREYFUS, B. (2007). Safeguard of the biodiversity of *Dalbergia* or Rose Wood of endemic tree species in Madagascar: importance of root symbiosis. Oral communication. IFS Work shop. University of Pretoria – South Africa
- Reddy et Natajaran.** (1997). Competitive interactions among three ectomycorrhizal fungi and their relation to host plant performance. 95: 1338-1345.
- Requena.** (2001). Potentialité des associations symbiotiques plantes - microorganismes pour réhabiliter des sites fortement dégradée sen milieu méditerranéen. 16 : 324
- Singleton, P.**, Sande, E., Haines, G., Keyser, H. (2000). Development and evaluation of liquid inoculants. Ninth Congress of Africa Association for Biological Nitrogen Fixation. Nairobi, Kenia. 142-144.
- Skerman P.J.** (1982). Les légumineuses tropicales, 666P. FAO. Rome.
- Somasegaran, P.** and Hoben, H.J. (1985), Methods in legume-*Rhizobium* technology. MIRCEN, ed. NIIFAL. Maui: University of Hawaii Press.
- Sprent, J.** and Raven, P.H. Evolution of nitrogen-fixing symbiosis. In *Biological nitrogen fixation*. (1992). London: Chapman and Hall.
- Staeckebandt, E.**, Murray, R.G.E., and Trüper, H.G. 1988. Proteobacteria classic Nov., a name for the phylogenetic taxon that includes "the purple bacteria and their relatives" *Int. J. Bacteriol.*, 38: 321-325.
- Strullu, D, G.** (1991). Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Technique et Documentation. Lavosier. Paris. 3<sup>e</sup> Ed., 250p.

**Sylvia, D.M.** et Williams, S.E. (1992). Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: Bethlenfalvay, G.J., Linderman, R.G. (Eds). *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*. American Society of Agronomy. Madison, WI, pp. 101-124.

**Tan, Z.Y.**, Wang, E.T., Peng, G.X., Zhu, M.E., Martinez-Romero, E. and Chen, W.X. 1999. Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 1457-1469.

**Trouvelot, A.**, Kough, J.L., Gianninazzi-Perason, V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In : Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (eds). *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. INRA, Paris pp. 217-221.

**Vance C.P.** and Graham P.H. (1985). Nitrogen Fixation in agriculture: applications and perspectives, P-77-86. In: *Nitrogen Fixation: fundamentals and applications* (Tikhonovitch I.A., Provoro N.A., Romanov V.I. and Newton W.E. eds). Kluwer Academic Publishers (the Netherlands).

**van der Heidjen, M.G.A.**, Street wolf-Engel, R., Rield, R., Siegrist, S., Nevdecker, A. Ineichenk, Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R. (2006). The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New phytol.* 172: 739-752.

**VanBerkum, P.**, Beyene, D., Bao, G.P., Campbell, T.A. and Eardly, B.D. (1998). *Rhizobium mongoleuse* sp.nov; is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen –fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int J syst Bact.* 48(1): 13-22.

**van der Heijden M.G.A.** (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396: 69–72.

**Vázquez, M. Mar.**, Cèsar, S., Azcon, R. and Barea, J.M. (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied soil Ecology.* 15: 261-272.

**Vincent, J.M.**, (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*, ed. I.b.P. Handbook. Vol. 15: Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford.

**Waksmans, A.** (1961). *The Actinomycetes. Classification, identification and description of genera and species*. Baltimore Williams and Wilkins, Vol1.

**Yattara, I.I.** (2000). Etude de la diversité et de l'écologie des bactéries rhizosphériques de *Dolichos lablab* Linn en vue de l'optimisation de sa croissance en zone sahélienne d'Afrique de l'Ouest., in Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée. Université du Mali.

**Young, J.P.W.** and Johnston, A.W.B. (1989). The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. Trends Ecol. Evol., 4: 331-349.

**Zakhia, F.** (2004). Diversité des bactéries hôtes de légumineuses Méditerranéennes en Tunisie et au Liban. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II. 202 p.

**Zhang, X.X.,** harper, R., Karsisto, M. Lindström, K. (1991). Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees. Int. J. System. Bacteriol. 41: 104-113.

---

## A n n e x e s

---

---

## Annexe 1. Composition des milieux de culture

### 1. Milieu d'isolement des souches de *Rhizobium*

#### YEM (Yeast Extract Mannitol) en g/l:

Mannitol	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1
NaCl	0,05
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,04
Extrait de levure	01
Agar	10
pH :	6,8

Pour avoir un milieu YEM gélosé au rouge Congo, il est nécessaire d'ajouter 0.025 g/l de rouge Congo.

### 2. Milieu de dénombrement

#### 2-1. Dénombrement de flore totale cultivable

#### TSA (Tryptic Soy Agar) en g/l

Peptone de caséine	15
Peptone de Soja	05
Chlorure de sodium	05
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.04
Agar	15

---

pH : 7.3

## 2-2. Dénombrement des *Pseudomonas* fluorescents

### Milieu King B (King et al., 1954) en g/l

Mannitol casamino-acide	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	01
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	01
Saccharose	10
Gélatine	10
Glycérol	10
Agar	18

## 2-3. Dénombrement des Atinomycètes

### Milieu Waksman (Waksman, 1961) en g/l

Glucose	20
Casitone	05
NaCl	05
Extrait de viande	03
Agar	20

## 3. Milieu pour la préparation de l'inoculum liquide de la souche de *Rhizobium*

### Milieu G5 (Singleton, 2000) en g/l

Mannitol	01	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.5
Glutamate de sodium	0.5	
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.2	
NaCl	0.1	
Glucose	01	
Extrait de levure	01	
PVP-40, 200 mM de FE-EDTA	20	
Glycérol	04	

---

pH : 6,8

## Annexe 2. Milieu de culture des plantes en tubes

### Milieu de Jensen (Vincent, 1970) en ml/l

Solution P ( $K_2HPO_4$ à 20 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ à 20 g/l)	10
Solution Q (NaCl à 20 g/l)	10
Solution R ( $CaHPO_4$ à 50 g/l)	20
Solution D ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ à 4 g/l ou 11.5 ml de $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ en solution)	10
Oligoéléments de Jensen*	01
Agar	20 g

### \* Solution d'oligoéléments de Jensen en g/l

$H_3BO_4$	2.86
$MnSO_4, H_2O$	2.03
$ZnSO_4, 7H_2O$	0.22
$CuSO_4, 5H_2O$	0.08
$Na_2MoO_4, 2H_2O$	0.09
pH :	6,7

### **Annexe 3. Réactifs**

#### **1. Réactifs pour la coloration des racines**

##### **Bleu trypan**

Acide lactique	333ml
Glycérol	333ml
Bleu trypan	0.5g
Eau distillée	333ml

##### **Potasse hydroxyde**

KOH	200g
Eau distillée	2000ml

## **Annexe 4. Préparation de la solution tampon potassium phosphate**

### **1. 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.

### **2. Préparation de la solution tampon Universel Modifié**

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

12.1g de Tris (hydroxymethyl) aminométhane

11.5g d'acide maléique

14g d'acide citrique monohydrate

6.3g d'acide borique

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<sub>2</sub>O 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<sub>2</sub>O distillée, ajuster le pH à 11 avec du NaOH et compléter à 1litre.

Name : RAJAONARIMAMY

Firstname: Elinarindra

Titre : *Influence of the mycorrhizal diversity on Dalbergia trichocarpa – rhizobia symbiosis and telluric microflora structures*

## ABSTRACT

A collection of 10 strains isolated from *Dalbergia trichocarpa* root nodules, Malagasy endemic specie was established for their particularity to fix atmospheric nitrogen. Majority of novel isolates are slow growth strains.

The study of their host range on 3 different plants was may identified two groups on different nodulation specificity. It showed evenly that *Dalbergia madagascariensis* specie has high specificity with the novel isolates.

Greenhouse inoculation in controlled condition by endomycorrhizal strains may obtain a significant increase (more than 45%) of *Dalbergia trichocarpa* plants growth. This positive effect was obvious in the treatment combining two or three MVA strains.

The co-inoculation *Rhizobium*-MVA (associated or not) stimulates significantly the development of nitrogen fixation symbiosis. The number of nodules per plant was significantly improved in the treatment associating the three MVA strains with an increasing of 7.40 %.

The diversity of the mycorrhizal cortege modified telluric microflora structure. This modification was dependant of the diversity of associated fungal symbiote. In fact, the highest numbers of telluric microflora were recorded in the treatment associating *G. intraradices* and *G. mosseae*.

**KEY WORDS:** *Dalbergia trichocarpa*, Mycorrhize, Rhizobia, Telluric microflora

**ADVISORS:** Dr RASOLOMAMPIANINA Rado and Dr RAMAMONJISOA Daniel



Nom : RAJAONARIMAMY

Prénom : Elinarindra

Titre : *Influence de la diversité mycorhizienne sur la symbiose Dalbergia trichocarpa – rhizobia et sur la structure de la microflore tellurique*

## RESUME

Une collection de 10 souches issues de nodules racinaires de *Dalbergia trichocarpa*, une espèce endémique de Madagascar a été constituée grâce à leur particularité de fixer l'azote atmosphérique. La majorité de nouveaux isolats de *Dalbergia trichocarpa* sont des souches à croissance lente.

L'étude de leur spectre d'hôte sur 3 plantes différentes a permis d'identifier deux groupes de spécificités de nodulation différents. Elle révèle également que l'espèce *Dalbergia madagascariensis* montre une forte spécificité avec les nouveaux isolats.

L'inoculation en serre par les souches endomycorhiziennes en condition contrôlée a permis d'obtenir une augmentation significative (plus de 45%) de la croissance des plantes de *Dalbergia trichocarpa*. Cet effet positif est évident dans le traitement combinant deux ou trois souches de mycorhizes à vésicules et arbuscules.

La co-inoculation *Rhizobium*-MVA (associé ou non) stimule de manière significative le développement de la symbiose fixatrice d'azote. Le nombre de nodules par plant est significativement amélioré dans le traitement associant les trois souches de MVA avec l'augmentation de l'ordre de 7,40%.

La diversité du cortège mycorhiziens modifiait la structure de la microflore tellurique. Cette modification est dépendante de la diversité des symbiotes fongiques associés. En effet, les nombres de la microflore tellurique les plus élevés ont été enregistrés pour le traitement associant *G. intraradices* et *G. mosseae*.

**MOTS CLES** : *Dalbergia trichocarpa*, Mycorhize, Rhizobia, Microflore tellurique

**ENCADREURS**: Dr RASOLOMAMPIANINA Rado, Dr RAMAMONJISOA Daniel