



## Projet PARRUR

Appui à l'Enseignement Supérieur et à la Recherche

### *RAPPORT D'ACTIVITES*

**Financement de la coopération française  
pour les doctorants malgaches**

*Titre du projet:*

---

**Evaluation des effets de l'installation de l'espèce invasive, *Grevillea banksii* sur le développement des essences natives de Madagascar, *Dalbergia trichocarpa* et *Intsia bijuga***

---

**Par**

**ANDRIANANDRASANA Martial Doret**

**Septembre 2013 - juin 2014**

**ENCADRANTS : RAHERIMANDIMBY Marson, Professeur titulaire**

**RAMANANKIERANA Heriniaina, Docteur HDR**

## SOMMAIRE

Remerciement .....	1
I. Introduction .....	2
II. Mise en œuvre du projet .....	3
II.1 Descente sur terrain.....	3
II.2 Expérimentation en Laboratoire .....	3
II.2.1 Culture en serre .....	3
II.2.2 Evaluation des effets de l'installation de <i>G. banksii</i> .....	4
II.2.3 Traitement statistique des données .....	4
II.2.4 Résultats.....	5
II.2.5 Conclusion .....	9
Littérature citée.....	9
Rapport financier .....	10

## REMERCIEMENT

Je tiens à remercier et à témoigner tout particulièrement toute ma reconnaissance aux personnes citées ci-après :

- ❖ Professeur REJO FIENENA Félicitée, Directeur du Centre National de Recherches sur l'Environnement, d'avoir accordé de réaliser mon projet de thèse dans leur institution.
- ❖ Professeur RAHERIMANDIMBY Marson et Dr RAMANANKIERANA Heriniaina, de m'avoir guidé et encadré avec patience.
- ❖ Toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE Antananarivo Madagascar, pour leur support moral, technique et matériel. Merci pour ce travail d'équipe exceptionnel.

Un grand remerciement aussi au **projet PARRUR** pour le soutien financier, très précieux, de ce travail.

## I. INTRODUCTION

Ce projet constitue l'une des chapitres de mon projet de thèse intitulé: *Structure et fonctionnement des communautés de champignons mycorhiziens dans les zones influencées par Grevillea banksii: impacts sur la régénération des essences forestières autochtones à Madagascar*. Face à la propagation rapide de *G. banksii* dans l'Est de Madagascar et dans le cadre de régénération forestière, une évaluation des modifications induite par cette plante invasive au niveau des communautés microbiennes du sol, particulièrement les communautés microbiennes symbiotiques (Champignons mycorhiziens, Bactéries nodulant les légumineuses) de *D. trichocarpa* et d'*I. bijuga*, a été l'objectif principal du projet. Notre hypothèse stipulait que la propagation de *G. banksii* affecte les champignons mycorhiziens et ses microorganismes associés, il pourra se traduire par des modifications de la structure spécifique et fonctionnelle des communautés microbiennes du sol garant du bon développement et de la conservation des essences ligneuses autochtones.

Il s'agit dans ce travail de déterminer la diversité des microorganismes symbiotiques présents dans le différent état de dégradation de sol (issu des trois parcelles d'étude) suivi d'une évaluation de développement des essences natives de Madagascar sous les conditions de ces types du sol. La culture des plantules de *I. bijuga* et *D. trichocarpa* sur ces sols permet de piéger les microorganismes symbiotiques (mycorhiziens ou fixatrice d'azote) associés respectivement à ces deux plantes. Ces microorganismes sont par la suite caractérisés pour déterminer globalement la modification induite par la pré-installation de l'espèce invasive, *G. banksii*.

Les objectifs spécifiques de ce travail sont :

- D'évaluer le développement de la plante native cultivé sur le sol envahi par *G. banksii* par la mesure de poids secs des biomasses aérienne et racinaire.
- De déterminer la diversité des symbiotes associés aux essences natives sur le sol envahi par *G. banksii*.
- De déterminer le dynamisme des microorganismes du sol régissant le bon développement des essences natives sur le sol envahi
- De sélectionner des symbiotes fongiques et bactériennes compatible avec nos essences natives provenant de la zone d'étude

## **II. MISE EN ŒUVRE DU PROJET**

La réalisation du présent projet comprend deux phases :

- Descente sur terrain
- Expérimentation en Laboratoire

### **II.1 Descente sur terrain**

Le site d'étude du projet se trouve dans la partie Est de Madagascar, Ianjomara-Vatomandry (19° 07'S; 48° 54'E). Une descente sur terrain a été effectuée avec l'équipe du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du Centre Nationale de Recherches sur l'Environnement (CNRE) pendant la période de pluie (mois de janvier 2014).

Le principal objectif de cette descente a été de caractériser les différentes parcelles dans la zone d'étude et de collecter des matériels biologiques nécessaires aux expériences en Serre et au Laboratoire ainsi que la collection des souches microbiennes provenant de la zone d'étude.

Le principal critère de choix de l'emplacement des parcelles a été la physionomie de la végétation et la composition floristique. Ainsi, trois parcelles ont été identifiées dont une parcelle forestière non influencée par *G. banksii*, une parcelle complètement envahie par *G. banksii* et une dernière parcelle en dehors de la formation forestière et dépourvue de *G. banksii* (zone recouverte généralement par des espèces herbacées sous forme de pseudo-steppe). Trois échantillonnages du sol ont été effectués pour chaque parcelle. Les trois échantillons de sols ont été mélangés pour chaque parcelle afin d'obtenir un sol composite. Les sols ont été conservés à l'air libre pour les analyses microbiologiques et à -20°C pour les analyses moléculaires.

### **II.2 Expérimentation en Laboratoire**

#### **II.2.1 Culture en serre**

##### **II.2.1.1 Sol de culture**

Trois types du sol, à savoir le sol sous *G. banksii*, le sol sous pseudo-steppe et le sol forestier, provenant de site d'étude, ont été préparé pour la culture en Serre de deux espèces de plantes. Les sols ont été partagés dans des pots plastiques de 1L. Vingt et cinq répétitions ont été effectués pour chaque espèce de plante soit et pour chaque type de sol.

##### **II.2.1.2 Mise en place de l'expérience**

Une graine pré-germée de nos essences natives (*I. bijuga* ou *D. trichocarpa*) a été plantée dans chaque pot plastique de 1L. Vingt-cinq répétitions ont été effectuées par traitement (3 types du sol). Les pots ont été placés en randomisation totale partagé dans deux blocs de même composition et entretenus sous la serre du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement du CNRE avec environ 12h de lumière naturelle par jour, à 28°C de température moyenne du jour et 18°C de température moyenne de la nuit. Les plants ont été arrosés deux fois par semaine avec de l'eau du robinet sans les fertiliser.

### **II.2.2 Evaluation des effets de l'installation de *G. banksii***

Les effets de l'installation de *G. banksii* sur le développement de deux essences ligneuses, native (*D. trichocarpa*) et autochtone (*I. bijuga*) de Madagascar ont été évalués après quatre mois de culture en serre, en mesurant les paramètres suivants:

1. Développement de la plante par la mesure de poids secs des biomasses aériennes et racinaire.
2. Diversité morphotypique des ectomycorhizes chez les racines de *I. bijuga* et taux d'ectomycorhization des plants d'*I. bijuga* (Agerer 1991).
3. Taux d'endomycorhization (Phillips et Hayman 1970) et nombre de nodules sur les racines de *D. trichocarpa*
4. Caractères microbiologiques des sols, associés au développement des deux essences natives:
  - Nombre de la flore totale cultivable du sol
  - Nombre de la flore totale capable de solubiliser le phosphate
  - Nombre des actinomycètes
  - Activité globale des microorganismes du sol par la mesure de l'hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA) (Schnurer & Rosswall, 1982)
  - Activités phosphatasiques en milieu acide et alcalin (Tabatabai 1982)

### **II.2.3 Traitement statistique des données**

Toutes les données obtenues ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA/MANOVA) à l'aide du logiciel **Statistica**. Le test de Newman Keuls ( $p < 0,05$ ) a été effectué pour mettre en évidence les différences entre les moyennes de valeurs obtenues pour chaque traitement.

## II.2.4 Résultats

### II.2.4.1 Développement de la plante et taux de mycorhization

Les résultats de l'évaluation du développement des deux essences natives de Madagascar sur les 3 types du sol sont donnés dans le tableau ci-après (Tableau 1). Ces résultats ont montré que les deux essences natives se développent moins sur le sol sous *G. banksii* et sous pseudo-steppe que sous le sol forestier (développement de la biomasse aérienne et racinaire). De même, ce faible développement des plantes a été accompagné par des très faibles taux d'ectomycorhization pour *I. bijuga*. Par contre, il n'y a pas de différence significative pour le taux de mycorhization de *D. trichocarpa* sur les trois types du sol.

**Tableau 1** Biomasses et taux de mycorhization de *I. bijuga* et *D. trichocarpa* sur les trois types du sol

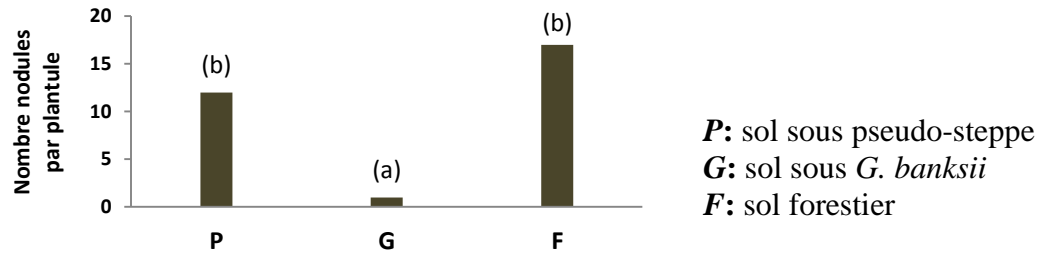
(Ps) sol sous prairie, (Gb) sol sous *G. banksii*, (Fr) sol forestier

	Biomasse aérienne		Biomasse racinaire		Taux de mycorhization (%)	
	<i>I. bijuga</i>	<i>D. trichocarpa</i>	<i>I. bijuga</i>	<i>D. trichocarpa</i>	<i>I. bijuga</i>	<i>D. trichocarpa</i>
<b>Ps</b>	<b>2,28 a</b>	<b>0,08 a</b>	<b>0,89 a</b>	<b>0,09 a</b>	<b>18,4 a</b>	<b>63,4 a</b>
<b>Gb</b>	<b>3,58 a</b>	<b>0,07 a</b>	<b>1,10 a</b>	<b>0,07 a</b>	<b>12,6 a</b>	<b>64,3 a</b>
<b>Fr</b>	<b>4,72 b</b>	<b>0,14 b</b>	<b>1,60 b</b>	<b>0,13 b</b>	<b>45,2 b</b>	<b>73,4 a</b>

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

### II.2.4.2 Nodosités chez *D. trichocarpa* sur les trois types du sol

Après cinq mois de culture de *D. trichocarpa* sur les sols d'étude, une différence significative du nombre de nodules par plantule a été observée entre les 3 types du sol, selon le test de Newman Keuls au seuil de probabilité inférieur à 5. Un nombre très bas a été enregistré sur le sol sous invasion de *G. banksii*; il n'y a pas de différence significative entre le sol sous pseudo-steppe et sol forestier mais ce dernier présente quand même un nombre élevé de nodules (fig. 1). Ce résultat suggère que la nodulation de *D. trichocarpa* est perturbée sur le sol envahi par *G. banksii* ce qui pourra être une raison qui explique le faible développement de cette essence native sur ce sol.



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

**Figure 1** Nombre de nodules par plantule de *D. trichocarpa* sur trois types du sol

A partir de nodules collectés sur les racines de *D. trichocarpa* cultivé sur les trois types du sol, nous avons permis d'isoler 20 isolats de rhizobium. L'identité moléculaire de ces isolats ont été déterminé au sein de laboratoire de l'Institut Biologique et Intégrative des Systèmes (IBIS) de l'Université Laval Québec-Canada. Ainsi nous avons pu identifier 13 sur 20 isolats et parmi ces 13 souches 11 sont de genre *Burkholderia spp.*; 1 *Mesorhizobium spp.* et 1 *Rhizobium tropici* (Tableau 2).

**Tableau 2.** Identité moléculaire des isolats de rhizobium piégé dans les 3types du sol avec *D. trichocarpa*

Code	Numéro d'accession	% Identités	Espèces
<b>R4</b>	JF792427	766/826(93%)	<i>Burkholderia arboris</i>
<b>R5</b>	AY677088	643/683(94%)	<i>Burkholderia cepacia</i>
<b>R6</b>	JX868558	539/557(97%)	<i>Burkholderia arboris</i>
<b>R8</b>	JX987284	252/281(90%)	<i>Burkholderia sp.</i>
<b>R10</b>	JX986975	711/748(95%)	<i>Burkholderia contaminans</i>
<b>R12</b>	JQ885929	700/760(92%)	<i>Mesorhizobium sp</i>
<b>R13</b>	AB015606	434/498(87%)	<i>Burkholderia cepacia</i>
<b>R14</b>	JX868558	689/746(92%)	<i>Burkholderia arboris</i>
<b>R15</b>	JX987284	354/384(92%)	<i>Burkholderia sp.</i>
<b>R16</b>	JX010975	687/787(87%)	<i>Rhizobium tropici</i>
<b>R17</b>	JX987284	694/706(98%)	<i>Burkholderia sp.</i>
<b>R18</b>	JX868558	588/599(98%)	<i>Burkholderia arboris</i>
<b>R19</b>	JX868558	698/699(99%)	<i>Burkholderia arboris</i>



### II.2.4.3 Caractères morphologiques des ectomycorhizes chez *I. bijuga* sur les trois types du sol

La caractérisation morphologique des ectomycorhizes chez les racines de *I. bijuga* a été basé sur les quatre critères suivants: (i) couleur du manteau, (ii) texture du manteau, (iii) ramification du fragment mycorhizé, (iv) couleur des hyphes fongiques. Selon ces critères, le sol forestier a présenté 10 morphotypes, 5 morphotypes sur le sol sous *G. banksii* et 5 morphotypes sur le sol sous pseudo-steppe (Tableau 3). Au totale, 11 morphotypes ont trouvés dans les 3 types du sol c'est-à-dire qu'il y a des morphotypes semblables entre deux ou trois types du sol. Par exemple, les morphotypes M1, M2, M8, M10 sont observés à la fois dans le sol forestier et le sol sous *G. banksii* et M11 est trouvé dans le sol sous *G. banksii* et sol sous prairie. Trois morphotypes (M3, M5 et M6) ne sont trouvés que dans le sol forestier. Ces résultats illustrent la faible diversité morphotypique des ectomycorhizes de *I. bijuga* sur le sol sous *G. banksii*.

**Tableau 3** Caractères morphologiques des ectomycorhizes de *I. bijuga* sur les 3 types du sol

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

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

#### II.2.4.4 Activités microbiologique et enzymatique de sols après culture de deux essences ligneuses de Madagascar (*I. bijuga* et *D. trichocarpa*)

Les résultats des analyses microbiologiques ont montré un faible développement des microflores bénéfiques sur les sols anciennement colonisés par *G. banksii* (**Gb**) et sur le sol sous pseudo-steppe (**PS**) (Tableau 5). Il en est de même pour les activités enzymatiques, le sol sous *G. banksii* et sous pseudo-steppe présentent des activités microbiennes globales et des activités phosphatasiques plus faibles que celles enregistrées chez les sols forestiers (**FR**) (Tableau 4). La faiblesse à la fois au niveau du nombre des microorganismes bénéfiques et ses activités, observés sur le sol sous *G. banksii* et sol sous pseudo-steppe pourra être un des causes de faible développement de ces deux plantes natives sur ces deux types du sol.

**Tableau 4** Activité enzymatique des microorganismes du sol

	$\mu\text{g de Fluorescéine. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	$\mu\text{g de p-Nitrophenol. h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	
	Activité microbienne globale	Phosphatase acide	Phosphatase alcaline
<b>Ps</b>	<b>928,30 a</b>	<b>136,42 a</b>	<b>6,11 a</b>
<b>Gb</b>	<b>1288,02 a</b>	<b>120,55 a</b>	<b>7,46 a</b>
<b>Fr</b>	<b>1529,69 b</b>	<b>163,01 b</b>	<b>39,05 b</b>

**Tableau 5** Nombre de microflores bénéfiques du sol

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

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

## II.2.5 Conclusion

Les résultats obtenus par ce projet nous ont permis de décrire l'impact de l'installation de *G. banksii* sur la régénération des essences autochtones et natives de Madagascar. Ainsi nous avons démontré une perturbation du fonctionnement et de la structure de la microflore symbiotique (mycorhizienne et fixatrice d'azote) ainsi que ceux de leurs microorganismes associés s'est produite durant l'installation de *G. banksii*. Cette perturbation pourrait inhiber par la suite le développement des deux essences natives testées (*D. trichocarpa* et *I. bijuga*).

Ce projet nous a permis également de sélectionner des souches fongiques et bactériennes du sol compatibles avec nos essences natives. Ces souches seront utilisées pour améliorer le développement de nos essences natives sur le sol pré-colonisé par l'espèce invasive, *G. banksii* en utilisant la technique de l'inoculation contrôlée. Ce dernier constitue la suite de travail de mon projet de thèse.

## Littérature citée

- Agerer, R. 1991.** Characterization of ectomycorrhiza. In Methods in microbiology. Vol. 23. Edited by J.R. Norris, D.J. Read, and A.K. Varma. Academic Press, New York. pp. 25–73.
- Gibson, A.H. (1963).** Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of root temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* L. plants. Aust. J. Biol. Sci. 16: 28-42.
- 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.
- Schnurer, J. and Rosswall. T. (1982).** Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Appl. Environ. Microbiol. 43:1256-1261
- Tabatabai MA. (1982).** Soil enzymes. in Methods of Soil Analysis. Part 2. (A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney, eds.). Agronomy 9: 903-947.
- 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.

## RAPPORT FINANCIER

Le montant total de cette allocation de recherches pour une durée de 10 mois (Septembre 2013- Juin 2014) est de 2 743 000 Ar dont les détails des dépenses sont consignés dans le tableau ci-après.

**Tableau 6.** Relevé des dépenses

<b>Rubrique</b>	<b>Montant (en AR)</b>	<b>Pièce justificative</b>
<b>Mission sur terrain</b>		
Carburant pour déplacement sur terrain	370 000	Facture station LORANJY (Brickaville) Facture station IMANGA (Moramanga)
Hébergement (5 nuitées)	300 000	Facture Bungalows Le Palmier
Guide sur terrain	45 000	Facture n°1
Matériels de mesure et de prélèvement sur terrain	93 500	Facture n°2924/14
<b>Analyse des sols</b>		
Analyse chimique du sol	340 000	Facture LaboPédo
Consommable et matériels de laboratoire	1 181 500	Facture n°2924/14 Facture n°3715 Facture n°75
<b>Culture en serre</b>		
Graines	45 000	Facture 005795 (SNGF)
Gaine plastique de 10kg	60 000	Facture n°2924/14
<b>Documentation</b>		
Consommable informatique	308 000	Facture n°3715/AR/F-3
<b>TOTAL</b>	<b>2 743 000</b>	

Arrêté la présente dépense à la somme de deux millions sept cent quarante-trois mille Ariary