



Rôle des interactions bactéries-nématodes bactérovores sur la disponibilité du N et P au sein de la rhizosphère du riz sur sol ferrallitique à Madagascar : mécanismes et facteurs de contrôle

Mahafaka Ranoarisoa

► To cite this version:

Mahafaka Ranoarisoa. Rôle des interactions bactéries-nématodes bactérovores sur la disponibilité du N et P au sein de la rhizosphère du riz sur sol ferrallitique à Madagascar : mécanismes et facteurs de contrôle. Science des sols. Montpellier SupAgro; Université d'Antananarivo, 2018. Français. NNT : 2018NSAM0002 . tel-01871440

HAL Id: tel-01871440

<https://theses.hal.science/tel-01871440>

Submitted on 10 Sep 2018

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

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



**THÈSE EN CO-TUTELLE POUR OBTENIR LE
GRADE DE DOCTEUR
DE MONTPELLIER SUPAGRO
ET DE L'ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES
AGRONOMIQUES D'ANTANANARIVO**



En Ecologie Fonctionnelle et Sciences Agronomiques



Ecoles doctorales

ED A2E - Agriculture, Elevage, Environnement,
portée par l'Université d'Antananarivo

ED GAIA - Biodiversité, Agriculture,
Alimentation, Environnement, Terre, Eau,
portée par l'Université de Montpellier

Unités de recherche

Laboratoire des Radio-Isotopes

**UMR Eco&Sols - Ecologie fonctionnelle et
biochimie des sols**



**Rôle des interactions bactéries-nématodes
bactérovores sur la disponibilité du N et P au sein de
la rhizosphère du riz sur sol ferrallitique à
Madagascar: mécanismes et facteurs de contrôle**

Présentée par Mahafaka Severine Patricia RANOARISOA

Le 29 janvier 2018

Sous la direction de Eric BLANCHART et Lilia RABEHARISOA

Devant le jury composé de

Dr. Sébastien BAROT, HDR, Directeur de Recherche, IRD-IEES

Rapporteur

Dr. Heriniaina RAMANANKIERANA, HDR, Directeur de Recherche associé, CNRE

Rapporteur

Pr. Brigitte BRUNEL, Professeur, Montpellier SupAgro

Examinatrice (Présidente du jury)

Dr. Bodovololona RABARY, Chercheur, FOFIFA

Examinatrice

Pr. Tantely RAZAFIMBELO, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Invitée (Rapporteur interne A2E)

Dr. Jean TRAP, Chargé de Recherche, IRD

Invité (Encadrant)

Dr. Eric BLANCHART, HDR, Directeur de Recherche, IRD

Directeur de thèse

Pr. Lilia RABEHARISOA, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Directrice de thèse

**THÈSE EN CO-TUTELLE POUR OBTENIR LE
GRADE DE DOCTEUR
DE MONTPELLIER SUPAGRO
ET DE L'ECOLE SUPERIEURE DES SCIENCES
AGRONOMIQUES D'ANTANANARIVO**

En Ecologie Fonctionnelle et Sciences Agronomiques

Ecoles doctorales

ED A2E - Agriculture, Elevage, Environnement,
portée par l'Université d'Antananarivo

ED GAIA - Biodiversité, Agriculture,
Alimentation, Environnement, Terre, Eau,
portée par l'Université de Montpellier

Unités de recherche

Laboratoire des Radio-Isotopes

**UMR Eco&Sols - Ecologie fonctionnelle et
biochimie des sols**

**Rôle des interactions bactéries-nématodes
bactérovores sur la disponibilité du N et P au sein de
la rhizosphère du riz sur sol ferrallitique à
Madagascar: mécanismes et facteurs de contrôle**

Présentée par Mahafaka Severine Patricia RANOARISOA

Le 29 janvier 2018

Sous la direction de Eric BLANCHART et Lilia RABEHARISOA

Devant le jury composé de

Dr. Sébastien BAROT, HDR, Directeur de Recherche, IRD-IEES

Rapporteur

Dr. Heriniaina RAMANANKIERANA, HDR, Directeur de Recherche associé, CNRE

Rapporteur

Pr. Brigitte BRUNEL, Professeur, Montpellier SupAgro

Examinatrice (Présidente du jury)

Dr. Bodovololona RABARY, Chercheur, FOFIFA

Examinatrice

Pr. Tantely RAZAFIMBELO, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Invitée (Rapporteur interne A2E)

Dr. Jean TRAP, Chargé de Recherche, IRD

Invité (Encadrant)

Dr. Eric BLANCHART, HDR, Directeur de Recherche, IRD

Directeur de thèse

Pr. Lilia RABEHARISOA, Professeur titulaire, Université d'Antananarivo

Directrice de thèse

***'Fa na dia hifindra aza ny tendrombohitra
Ary na dia hihetsika aza ny havoana,
Tsy mba hiala aminao ny famindrampoko,
Ary tsy hitsoaka ny faneken'ny fihavanako,
Hoy Jehovah, Mpamindra fo aminao.'*** Isaia 54, 10

Koa,

***'Ilay zavatra tsara natolotra anao dia tehirizo amin'ny
fampaherezan'ny Fanahy Masina, izay mitoetra ao
anatintsika.'*** II Timoty 1, 14

A la mémoire de Papa

Remerciements

A travers ces quelques lignes, je tiens à manifester ma profonde gratitude à tous ceux et celles qui, par leur confiance, leur sollicitude, leurs conseils, leur soutien et leurs enseignements ou tout simplement leur dévouement, leur gentillesse et leur sympathie, m'ont aidée à la réalisation de ce travail.

Me voici arrivée au terme de ces trois ans de thèse que j'ai réalisée en co-tutelle entre l'école doctorale A2E de l'Université d'Antananarivo et l'école doctorale GAIA de l'Université de Montpellier. Une thèse en alternance entre deux pays qui a été rendue possible par l'accueil chaleureux du Pr Tantely Razafimbelo et du Dr Jean-Luc Chotte dans leur laboratoire respectif. Merci de m'avoir accueillie et de m'avoir permis de travailler librement au sein du Laboratoire des Radio-Isotopes Tananarive et d'Eco&Sols Montpellier. Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à l'IRD (projet ARTS) pour son soutien financier.

Mes premiers remerciements vont évidemment à **Jean TRAP**, qui m'a encadrée en stage de Master puis en thèse, pour les nombreuses connaissances scientifiques qu'il m'a transmises, l'encadrement, les conseils, l'implication et la patience durant ces (presque) quatre années. Je suis très heureuse de l'avoir eu comme encadrant de thèse et d'avoir été sa première doctorante. Je suis certaine qu'il sera encore un meilleur encadrant/directeur de thèse pour ses nombreux doctorants à venir, j'espère qu'ils sauront apprécier son humour et sa passion pour GOT ☺ Du fond du cœur merci !!!

Je souhaiterais également dire un grand merci à mes deux directeurs de thèses **Eric BLANCHART** et **Lilia RABEHARISOA**, pour avoir accepté de diriger ma thèse à la demande de Jean et cela sans m'avoir jamais rencontrée. Merci pour le soutien, l'implication et les conseils que vous m'avez prodigués tout au long de ma thèse.

Je remercie très chaleureusement **Claude PLASSARD** pour sa gentillesse, ses nombreux conseils et l'intérêt avec lequel elle a suivi ma thèse.

Je tiens ensuite à remercier **Thibaud DECAËNS**, **Claude PLASSARD**, **Tovo RAFOLISY** et **Christian MOREL** pour avoir participé à mes trois comités de thèse. Merci pour leurs conseils avisés et avis critiques.

Merci également aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail, malgré leurs très nombreuses sollicitations et obligations. Merci aux rapporteurs **Sébastien BAROT**, **Heriniaina RAMANANKIERANA** et **Tantely RAZAFIMBELO** ainsi qu'aux examinatrices **Brigitte BRUNEL** et **Bodovololona RABARY**.

Je remercie les différentes équipes techniques, au LRI : **Marie-Paule**, **Mamy**, **Sandratra**, **Modeste**, **Ando**, **Hanta**, **Fara** pour leur soutien technique et pour ces heures de travail dans la bonne humeur. A l'UMR Eco&Sols, **Anne-Laure** pour avoir filtré ces morceaux d'agarose, **Carlos** et **Cathy** pour leur aide pour les nématodes et les nombreux milieux, **Jean-Marc** et **Najat** pour leur aide pour les analyses de phosphore, **Jean L.** et **Nancy** pour les analyses de TOC/TN et CHN et enfin **Philippe B.** pour avoir réglé tous mes problèmes informatiques.

Je remercie également les chercheurs et le personnel administratif et technique du Laboratoire des Radio-Isotopes et de l'UMR Eco&Sols pour l'accueil chaleureux, la gentillesse et la convivialité.

Je remercie également tous les partenaires pour leur appui durant mes travaux de thèse. Merci à l'**ONG Agrisud** pour m'avoir permis d'échantillonner les parcelles au sein de leur zone d'intervention à Itasy. Je tiens à remercier plus particulièrement Bruno pour nous avoir accompagnés sur le terrain. Merci au **FOFIFA** et au **CIRAD** pour avoir fourni les semences de riz pluvial que j'ai utilisées pour mes expériences en laboratoire. Un grand merci à **Cécile VILLENAVE**, responsable scientifique d'ELISOL Environnement, pour avoir identifié le nématode *Acrobelloides* sp.

Un grand merci à **Philibert**, **Mamy**, **Lala** et **Régis** pour avoir participé de bon cœur à mes campagnes d'échantillonnage à Lazaina et Imerintsiatosika. Régis aura également été d'une grande aide lors des sessions de bricolage de Jean pour préparer toutes les expériences qui ont été menées dans le cadre de ma thèse.

Je suis également reconnaissante aux étudiants et CDD qui ont participé de près ou de loin à cette thèse. Merci à **Hasina**, **Sariaka**, **Koloina**, **Eric**, et **Damase** pour leur sérieux, leur implication et les nombreux fous rires partagés. J'espère que le travail qu'ils ont effectué dans le cadre de cette thèse leur sera utile pour la suite.

Merci également aux doctorants du LRI pour les nombreuses discussions et la bonne humeur. Merci à l'équipage d'Air LRI: **Menja, Onja, Nasandratra, Fanja, Kanto et Nandrainina**. Une pensée particulière à **Kanto** dont le bureau aura été trop proche...

Merci aux djeuns d'Eco&sols pour le soutien et ces nombreux moments qu'on a partagé!!! Je remercie **Esther** pour sa joie de vivre et son optimisme, **Anne** pour sa franchise et son humour (noir un peu...beaucoup), **Damien** pour sa gentillesse et sa disponibilité – petite pensée à **Komi** et **Gabrielle** pour toutes ces fois où je suis venue l'embêter-, **Maxime** et **Thomas** (les plus grands tricheurs et mauvais perdants au tarot et à la belotte) qui m'auront été d'un grand soutien (surtout vers la fin). Merci à **Céline**, ma coloc d'algéco, qui m'aura transmis le stress de sa fin de thèse et avec qui j'ai pu partager la biblio sur mon autre thèse (still in progress). Merci à **Nancy** dont l'innocence et la bonne humeur auront été rafraichissantes dans ce monde de brutes ☺ Merci à **Christophe, Philippe B., Alain R., Elisa, Cassandre, Tanguy, Simon, Adeline, Agnès, Céline, Mathias, Kenji, Amandine, Aurélie, Manon, Jennifer, Rémi, Camille**. Je suis très heureuse d'avoir partagé ce bout de chemin avec vous.

Merci à mes amis qui n'ont cessé de me soutenir tout au long de la réalisation de ce travail même si mon sujet de thèse ne leur inspirait pas grand chose. Un merci particulier à **Mihaja, Antso, et Narindra**, chacune à leur manière elles auront été d'un grand réconfort durant toutes ces années.

Merci à ma famille et surtout à ma mère, ma sœur et mon frère pour leur soutien infaillible durant toutes ces années. **Maman, Karen, et Hervé**, merci d'avoir toujours été présents et de m'avoir toujours encouragée. A mon père, parti trop tôt, je dédie cette thèse...

Patricia

Abstract

Using *Acrobelloides* sp. (Cephalobidae) and *Oryza sativa* (Poaceae), we aimed at (i) studying the effects of bacterivorous nematodes on plant functions growing in a nutrient-poor soil in Madagascar, (ii) testing the mechanisms involved in the mutualistic activity of the bacterivorous nematodes in a strong P-depleted Ferralsol from the highlands of Madagascar, and (iii) identifying the agronomic and edaphic factors that can drive the soil microbial loop.

Two pathways have been proposed to explain the positive effects of bacterial-feeders on nutrients availability and plant functions: *mineralization pathway* and *exploration pathway*. In order to test the involvement of each pathway in the mutualistic activity of bacterivorous nematodes, we assessed the effect of nematodes inoculation on inorganic P flows from soil to plant using the ^{32}P labelling technique. When the soil pH was corrected with dolomite lime, we showed that the presence of *Acrobelloides* sp. improved net P mineralization and plant (*Oryza sativa*) functions (growth and nutrition) but did not alter lateral root growth as protists do. Indeed, in the presence of nematodes and dolomite, the shoot L-value increased by 49%, the plant total biomass increased by 22% and the plant total P amount increased by 9%. Thus, *Acrobelloides* sp. increased plant P uptake through the "*nutritional*" or "*mineralization*" pathway.

The effects of *Acrobelloides* sp. on *Oryza sativa* functions were variable (positive, neutral or negative) according to agricultural practices and soil abiotic variables. First, these effects may depend on the rice cultivar used in the experiment. Indeed, the nematodes attractancy to root-adhering soils varied according to upland rice cultivar, probably according to the amount and composition of root exudates. The mutualistic activity of nematodes is also influenced (maximized) by the presence of trees (agroforestry) in the rice field. Besides plants, the abiotic soil parameters were key drivers. The mutualistic activity of nematodes was strongly limited by the ability of Ferralsols to precipitate and chemisorb phosphates. The addition of dolomite lime limited phosphates sorption on soil and enhanced the mutualistic activity of the nematodes. Also, the high values of soil pH and Mg content tended to increase the mutualistic activity of the bacterivorous nematodes on rice growth and nutrition. To conclude, we found that it is possible to drive the mutualistic activity of bacterivorous nematodes in poor tropical soils through specific soil and agricultural practices.

Keywords: *Acrobeloides* sp., upland rice, Ferralsols, bacterivorous nematodes, dolomite lime, nitrogen and phosphorus cycling, ^{32}P labeling, agro-ecology, Madagascar.

Résumé

Les objectifs de cette thèse étaient (i) d'étudier les mécanismes par lesquels les nématodes bactériovores régulent les flux de nutriments (N et P) dans la rhizosphère du riz pluvial dans un sol ferrallitique de Madagascar, (ii) d'étudier les effets des interactions bactéries – bactériovores sur les fonctions de la plante (croissance et nutrition), et (iii) d'évaluer les principaux facteurs contrôlant la boucle microbienne des sols dans une optique d'intensification. Notre modèle biologique comprenait *Acrobelloides* sp. (Cephalobidae) et *Oryza sativa* (Poaceae).

Deux voies ont été proposées pour expliquer les effets positifs des bactériovores sur la disponibilité des nutriments et les fonctions de la plante: *voie de minéralisation* et *voie d'exploration*. Afin d'identifier l'implication de chaque voie dans les flux de P inorganique à l'interface sol-plante nous avons utilisé le radio-isotope ^{32}P comme traceur. Lorsque le pH du sol est corrigé par l'ajout de dolomie, la présence des nématodes bactériovores améliore la minéralisation nette de P, la production de biomasse et la nutrition de la plante sans modifier la ramification du système racinaire, contrairement à ce qui a été observé par certains auteurs en présence de protistes. En effet, en présence de nématodes et de dolomie, la L-value dans les parties aériennes de la plante augmente de 49%, la biomasse totale de la plante augmente de 22%, et la quantité de P total dans les tissus de la plante augmente de 9%. Ainsi, *Acrobelloides* sp. stimule le prélèvement de P par la plante via la voie nutritionnelle ou voie de minéralisation.

Les effets de *Acrobelloides* sp. sur les fonctions de la plante sont variables (positives, neutres, négatives), en fonction des pratiques agricoles et des caractéristiques abiotiques du sol. Tout d'abord, ces effets peuvent dépendre de la variété de riz puisque l'attractivité des nématodes *Acrobelloides* sp. par la rhizosphère du riz varie en fonction des variétés de riz pluvial, plus précisément en fonction de la composition et de la quantité d'exsudats racinaires libérés par la plante. Ensuite, l'activité mutualiste des nématodes est influencée (maximisée) par la présence d'arbres (agroforesterie) dans la parcelle de riz pluvial. En plus des plantes, les paramètres édaphiques étaient des facteurs clés. L'activité mutualiste des nématodes est fortement limitée par le pouvoir fixateur des Ferralsols. Ainsi, l'ajout de dolomie limite la capacité de sorption de P du sol et améliore l'activité mutualiste des

nématodes bactérivores. Enfin, l'activité mutualiste des nématodes sur la croissance et la nutrition du riz pluvial est favorisée par les valeurs élevées de pH et de teneur en Mg dans le sol. Pour conclure nous avons trouvé qu'il est possible d'intensifier l'activité mutualiste des nématodes bactérivores dans un sol tropical pauvre à travers des pratiques agricoles spécifiques (gestion des sols, agroforesterie).

Mots clés: *Acrobeloides* sp., riz pluvial, Ferralsols, nématodes bactérivores, dolomie, cycles de l'azote et du phosphore, radio-isotope ^{32}P , agro-écologie, Madagascar.

Table des matières

Introduction générale.....	- 1 -
I. Contexte et problématique	- 1 -
II. Etat de l'art	- 4 -
1. Les nématodes des sols.....	- 4 -
1.1 Ecologie des nématodes.....	- 4 -
1.2 Les groupes trophiques et stratégies de vie	- 6 -
1.3 Les nématodes bactérovores	- 8 -
2. Fonctions portées par les nématodes bactérovores.....	- 10 -
2.1 Effets sur les communautés microbiennes	- 11 -
2.2 Effets des nématodes bactérovores sur la disponibilité des nutriments.....	- 12 -
2.3 Mécanismes potentiels impliqués dans l'amélioration de la disponibilité des nutriments en présence des nématodes bactérovores	- 14 -
2.4 Effets des nématodes bactérovores sur les fonctions de la plante	- 15 -
2.5 Mécanismes potentiels impliqués dans l'amélioration des fonctions de la plante en présence de bactérovores (nématodes et protozoaires).....	- 16 -
2.6 Déterminants des effets des interactions bactéries – nématodes bactérovores sur la disponibilité des nutriments et les fonctions de la plante.....	- 17 -
3. Approches méthodologiques pour appréhender les effets des bactérovores (protistes et nématodes) sur la disponibilité des nutriments et les fonctions de la plante.....	- 19 -
III. Objectifs et hypothèses.....	- 24 -
1. Premier sous-objectif	- 24 -
2. Second sous-objectif	- 24 -
3. Troisième sous-objectif	- 25 -
IV. Organisation du manuscrit.....	- 26 -
CHAPITRE 1. Effets de <i>Acrobelloides</i> sp. sur les flux de phosphore et son acquisition par le riz dans un sol ferrallitique à forte capacité de sorption	29

I.	Présentation du chapitre 1.....	29
II.	Article 1: Analysing the effects of a bacterivore nematode on rice P uptake and root architecture in a high P-sorbing Ferrallitic soil using ³² P-labelling: testing the microbial loop and the auxiliary mechanisms.....	31
1.	Introduction.....	33
2.	Materials and methods	35
2.1	Soil sampling.....	35
2.2	Soil preparation	36
2.2.1	Soil defaunation	36
2.2.2	Mineral fertilizations and dolomite liming.....	36
2.2.3	Bacterial fertilization	37
2.3	Bacterial-feeding nematodes	38
2.4	Shoot L-value determination using the ³² P-labelled technique.....	39
2.4.1	Experimental design	39
2.4.2	Microcosms set up and ³² P labelling	39
2.4.3	Measurements at the end of the experiment.....	40
2.4.4	Measurements of the shoot L-value	41
2.5	Root architecture characterization using the rhizobox technique	41
2.5.1	The rhizobox device and experimental design.....	41
2.5.2	Root measurements	44
2.5.3	Plant nutrient content measurements.....	44
2.6	Statistical analyses.....	45
2.6.1	The ³² P-labelled soil experiment	45
2.6.2	The rhizobox experiment	45
3.	Results	46
3.1	³² P labelled soil experiment	46

3.2	Rhizobox experiment	48
4.	Discussion	51
4.1	Effect of <i>Acrobelloides</i> sp. on soil-plant ³² P flow	51
4.2	Distinct effects of dolomite and <i>Acrobelloides</i> sp. on plant functions	53
4.3	Effect of <i>Acrobelloides</i> sp. on root architecture	54
5.	Conclusion	55
III.	Synthèse du chapitre 1	58
CHAPITRE 2. Mesure in situ de l'effet de <i>Acrobelloides</i> sp. sur les fonctions du riz pluvial à l'aide d'une nouvelle méthode : effet des pratiques agricoles à Madagascar		60
I.	Présentation du chapitre 2	60
II.	Article 2: Effect of <i>Acrobelloides</i> sp. on plant functions using undisturbed soil cores from upland rice (<i>Oryza sativa</i>) fields in Madagascar	61
1.	Introduction	63
2.	Materials and methods	66
2.1	Selection of upland rice fields	66
2.2	Soil cores sampling	67
2.3	Soil analysis	67
2.4	Bacterial-feeding nematodes	68
2.5	The “I-Banema assay” set up	69
2.6	I-Banema assay design	70
2.7	Analyses at the end of the assay	70
2.8	Statistical analyses	71
3.	Results	72
3.1	Agronomic characteristic of the selected fields	72
3.2	Soil abiotic characteristics in the seventeen fields	74
3.3	Effects of <i>Acrobelloides</i> sp. on plant growth	75

3.4	Effects of <i>Acrobeloides</i> sp. on plant N and P nutrition	77
3.5	Final density of <i>Acrobeloides</i> sp.	79
3.6	Agronomical and soil abiotic parameters as potential predictors of the mutualistic activity of <i>Acrobeloides</i> sp. on plant functions	80
3.7	Development of indicators.....	83
4.	Discussion.....	84
4.1	Diversity of the upland rice systems	84
4.2	I-Banema assay: <i>Acrobeloides</i> sp. – effects on <i>Oryza sativa</i> plant growth and nutrition.....	84
4.3	Predictors of the I-Banema assay.....	85
4.4	<i>Acrobeloides</i> sp. survival rates.....	87
4.5	Development of indicators.....	90
5.	Conclusion	91
III.	Synthèse du chapitre 2.....	98
CHAPITRE 3. Attractivité des nématodes bactérivores par la rhizosphère du riz en fonction des génotypes de riz pluvial		100
I.	Présentation du chapitre 3.....	100
II.	Article 3: Attractancy of bacterivorous nematodes to root-adhering soils differs according to rice cultivars	101
1.	Introduction.....	103
2.	Pot experiment.....	103
3.	Petri dish experiment	106
4.	Results and discussion.....	107
5.	Conclusion	110
III.	Synthèse du chapitre 3.....	111
Conclusion générale et perspectives		114
1.	Objectifs de la thèse	114

2. Chapitre 1: Effets de <i>Acrobelloides</i> sp. sur les flux de phosphore et son acquisition par le riz dans un sol ferrallitique à forte capacité de sorption	114
3. Chapitre 2: Mesure in situ de l'effet de <i>Acrobelloides</i> sp. sur les fonctions du riz pluvial à l'aide d'une nouvelle méthode : effet des pratiques agricoles à Madagascar	115
4. Chapitre 3: Attractivité des nématodes bactérivores par la rhizosphère du riz en fonction des géotypes de riz pluvial.....	116
5. Bilan des effets des interactions bactéries – nématodes bactérivores sur la phytodisponibilité des nutriments dans la rhizosphère du riz.....	117
5.1 Mécanismes impliqués dans les interactions bactéries -nématodes bactérivores	117
5.2 Effets de la présence de nématodes bactérivores sur les fonctions de la plante (croissance et nutrition)	117
5.3 Relation entre le sol et les nématodes bactérivores	119
5.4 Relation entre la plante et les nématodes bactérivores.....	119
6. Valorisation des résultats	120
7. Perspectives.....	120
7.1 Utilisation d'autres organismes dans le dispositif expérimental	120
7.2 Rôle de la stœchiométrie sur les effets des interactions bactéries-bactérivores sur la nutrition du P.....	121
7.3 Rôle de la structure de la communauté sur l'activité mutualiste.....	121
7.4 Rôle des champignons endomycorhizien dans l'acquisition par le riz du P libéré par la boucle microbienne.....	122

Introduction générale

Figure 1: Densité de nématodes (individus pour 100g.sol sec ⁻¹) en soja (2005) et riz (2006) en fonction du travail du sol (L: labour conventionnel, SD: sans travail du sol) et de la fertilisation (F0: sans fertilisation, F1: fumier 5t.ha ⁻¹ , F2: 70N-30P-40K + fumier 5t.ha ⁻¹) (Villénave et al., 2009a).....	5
Figure 2: Classification des nématodes en fonction de leurs pièces buccales. a: bactérivores, b: fongivores, c: phytophages, d: carnivores et e: omnivores. (Ed Zaborski, University of Illinois).	6
Figure 3: Morphologie de la cavité buccale (ou stoma) de nématodes Rhabditida illustrée par les 4 infra-ordres les plus communs (de gauche à droite) : Rhabditomorpha, Diplogasteromorpha, Panagrolaimomorpha et Cephalobomorpha.....	9
Figure 4: Schéma conceptuel de la thèse	27

CHAPITRE 1. Effets de *Acrobelloides* sp. sur les flux de phosphore et son acquisition par le riz dans un sol ferrallitique à forte capacité de sorption

Table 1.1: Mean (SD) and two-way ANOVA statistics for plant variables measured after 28 days of growth in presence/absence of dolomite (-Dol; +Dol) and <i>Acrobelloides</i> sp. (-Nem; +Nem) in a Ferralsol from Madagascar	47
---	----

Figure 1.1: The rhizobox design included (A) the back transparent PVC plate where (B) the filter paper is deposited and then filed with (C) the 1 cm-thick soil layer. The box is then closed with (D) PVC tabs thanks to a transparent PVC plate identical to the back one. (E) The final box dimensions are 40 cm high, 20 cm wide and 3 cm deep.

Figure 1.2: Principal Component Analysis performed on root parameters. (A) Nematode treatment ordination (black square and triangle as barycentres) on the individual (black circle) factorial map. (B) Circle of correlations with active (bold) and supplementary (italic) variables. (C) Contribution (%) of active variables in axis 1. (D) Eigenvalue diagram. 'nem: final number of nematodes; N: total N amount in plant; P: total P amount in plant; Sh : final shoot biomass; SR: final shoot:root ratio.....

Figure 1.3: Effect of *Acrobelloides* sp. on rice root parameters after 28 days of growth in a Ferralsol. “-Nem” and “+Nem” indicates the absence or presence of bacterivorous nematodes, respectively. Letters (a and b) refers to significant differences according to student t test at $p < 0.05$

Figure 1.4: Effect of <i>Acrobeloides</i> sp. on rice root length after 28 days of growth in a Ferralsol. “-Nem” and “+Nem” indicates the absence or presence of bacterivorous nematodes, respectively. Letters (a and b) refers to significant differences according to Student t test at $P < 0.05$	50
Figure 1.5: Distribution of the number of tips (log-transformed) according to root length size classes in the control treatment (‘-Nem’; black triangle, $F = 255$; $P < 0.001$; $y = -4.64x + 2.72$; $R^2 = 0.88$) and the treatment with nematodes (‘+Nem’; black square, $F = 424$; $P < 0.001$; $y = -3.92x + 2.72$; $R^2 = 0.92$).....	50
Photography 1.1: Active filtering of nematodes through fine cellulose wadding paper	36
Photography 1.2: Microcosm set up in the greenhouse (left) and a microcosm (right).....	40
Photography 1.3: The rhizobox device	42
Photography 1.4: Image of the root system (left) and scan for the root system analysis with WhinRhizo® (right).....	44
 Chapitre 2: Mesure in situ de l'effet de <i>Acrobeloides</i> sp. sur les fonctions du riz pluvial à l'aide d'une nouvelle méthode : effet des pratiques agricoles à Madagascar	
Table 2.1: Agronomical characteristics of the agricultural fields.....	66
Table 2.2: Statistics (F- and p-values) of a two-way ANOVA performed on plant final dry biomass after 40 days of co-inoculation with "field" and "trophic level" as factors.....	77
Table 2.3: Statistics (F- and p-values) of a two-way ANOVA performed on total nitrogen and total phosphorus in plant tissue after 40 days of co-inoculation “field” and “trophic level (-nem; +nem)” as factors	79
 Figure 2.1: I-Banema assay schedule	69
Figure 2.2: Principal Component Analysis performed (PCA1) on agronomic parameters. (A) Agronomic factor ordination with black square, black star, empty cross, black triangle and empty circle as barycentres for "Agroforestry", "Rotation", "Monoculture", "Fallow" and "Bozaka", respectively, the first two axes (axes 1 and 2). Black circle are individuals on the factorial map. (B) Circle of correlations with active (full vectors) and supplementary (dotted vectors) variables on the first axes. (C) Agronomic factor ordination on the axes 1 and 3 of the factorial plan. (D) Circle of correlations on the axis 1 and 3 of the factorial plan. ‘A’ refers to parameters of the actual crop (year of sampling) while ‘P’ refers to parameters of the	

previous crop (year before). inp: input of organo-mineral materials; till: tillage; rice: presence of rice; comp: input of compost; num: number of plant; ass: association; tree: presence of trees; leg: presence of legumes; manure: input of manure; bz: bozaka as agricultural precedent. "ES_B", "ES_N" and "ES_P" refers to Cohen's d effect size for rice biomass, N and P amount, respectively..... 73

Figure 2.3: Principal Component Analysis (PCA2) performed on soil parameters. (A) Agronomic factor ordination with black square, black star, empty cross, black triangle and empty circle as barycentres for "Agroforestry", "Rotation", "Monoculture", "Fallow" and "Bozaka", respectively. Black circle are individuals on the factorial map. (B) Circle of correlations with active (full vectors) and supplementary (dotted vectors) variables. Ca: Soil Calcium, CEC: Soil cation exchange capacity, Mg: Soil Magnesium, Pi: Inorganic phosphorus, K: Soil Potassium, P: Soil total Phosphorus, Clay: Soil Clay fraction, K/Mg: soil K:Mg ratio, N: Soil total Nitrogen, FSi: Soil Fine silt fraction, C: soil total Carbon, Ca/Mg: soil Ca:Mg ratio, WHC: Soil water – holding capacity, F_Sa: Soil Fine sand fraction, C/N: Soil C:N ratio, C/P: Soil C:P ratio, BD: Bulk density, C_Sa: Soil coarse sand fraction. "ES_B", "ES_N" and "ES_P" refers to Cohen's d effect size for rice biomass, N and P amount, respectively..... 74

Figure 2.4: Mean effect size of *Acrobelloides* sp. on rice shoot biomass (A) and root biomass (B) after 40 days of growth in soil cores originating from different agricultural fields (table 1). White and black circles indicate significant (different from zero) and non-significant mean effect size (Esm) respectively: *p-value<0.05; **p-value <0.01; ***p-value <0.001. Horizontal bars correspond to 95% confidence intervals.....76

Figure 2.5: Mean effect size of *Acrobelloides* sp. on rice total P (A) and total N (B) amount after 40 days of growth in soil cores originating from different agricultural fields (table 1). White and black circles indicate significant (different from zero) and non-significant mean effect size (Esm) respectively: *: p value<0.05; **: p value <0.01; ***: p value <0.001. Horizontal bars correspond to 95% confidence intervals. 78

Figure 2.6: Final number of nematode per gram of soil. Hatched bars are the means (n=5) with standard deviation. Different letters indicate significant differences at P<0.05 (one-way ANOVA followed by post hoc Tukey HSD test). 79

Figure 2.7: Prediction of the effect of *Acrobelloides* sp. on total biomass of rice from the PLS-regression model using both agronomic and soil abiotic variables. R² corresponds to the

coefficient of correlation between the measured and predicted values. Signs “+” and “-” mean that the input variables influence positively or negatively the target variables.	80
Figure 2.8: Prediction of the effect of <i>Acrobelloides sp.</i> on rice total nitrogen from the PLS-regression model using both agronomic and soil abiotic variables. R^2 corresponds to the coefficient of correlation between the measured and predicted values. Signs “+” and “-” mean that the input variables influence positively or negatively the target variables	81
Figure 2.9: Prediction of the effect of <i>Acrobelloides sp.</i> on rice total phosphorus from the PLS-regression model using both agronomic and soil abiotic variables. R^2 corresponds to the coefficient of correlation between the measured and predicted values. Signs “+” and “-” mean that the input variables influence positively or negatively the target variables	82
Figure 2.10: Regression between the final density of <i>Acrobelloides sp.</i> (response variable) and the percentage of coarse-sands in the soil (explicative variable).....	88
Figure 2.11: Regressions between the effect of <i>Acrobelloides sp.</i> on (A) rice total biomass, (B) rice P amount, and (C) rice N amount (response variables) and the final density of <i>Acrobelloides sp.</i> (explicative variable)	89
Photography 2.1: Intact soil core sampling	67
Photography 2.2: I-Banema assay design.....	70
 Chapitre 3: Attractivité des nématodes bactérivores par la rhizosphère du riz en fonction des génotypes de riz pluvial	
Table 3.1: Agronomic criteria used in the selection of the eight upland rice cultivars.....	104
Table 3.2: The effect of rice cultivar on root (RB), shoot and root-adhering soil (RAS) dry mass, RAS:RB ratio, RAS respiration and pH_{water} after 32 days of growth in a poor-nutrient Malagasy ferrasol.	109
Figure 3.1: Experimental setup made by three-compartment petri dish used to assess nematode attractancy to root-adhering soils (ras) from eight rice cultivars. Compartment A (white area), filled with sterile agarose, was connected to the two others by open gates. Compartments B (light grey area) and C (dark grey area) were filled with RAS or bulk soil. The black dashed line represents an imaginary line splitting the compartment a in two zones (r and l). Nematodes were inoculated in the top of the imaginary black dashed line (black arrow).	106

Figure 3.2: Attractancy of nematodes to root-adhering soils (RAS) from eight upland rice cultivars (CD, F154, W880, F182, F152, N4, F172 and B22). The horizontal bars correspond to standard deviation. NS: not significant, *P < 0.05; ** P< 0.01; ***P< 0.001 according to a binomial test (5 replicates).	108
Photography 3.1: Pot experiment (october, 2015)	105
Photography 3.2: Root -adhering soil (RAS) sampling (November, 2015).....	105

INTRODUCTION GENERALE



Parcelle de riz pluvial – Itasy, Madagascar (Avril 2017)

I. Contexte et problématique

Le sommet mondial sur le développement durable à New-York en 2015 a défini un programme de développement durable à l'horizon 2030. Ce programme comporte 17 objectifs de développement durable (ODD) et 169 cibles qui guideront les actions à mener dans des domaines d'une importance cruciale : l'humanité, la planète, la prospérité, la paix et les partenariats, et en particulier, la sécurité alimentaire.

"Eliminer la pauvreté et la faim, sous toutes leurs formes et dans toutes leurs dimensions, et faire en sorte que tous les êtres humains puissent réaliser leur potentiel dans des conditions de dignité et d'égalité et dans un environnement sain."

Fondement 2 des objectifs de développement durable, Sommet sur le développement durable, New-York, Septembre 2015

"Eliminer la faim, assurer la sécurité alimentaire, améliorer la nutrition et promouvoir l'agriculture durable."

Objectif 2, Sommet sur le développement durable, New-York, Septembre 2015

De nombreuses menaces pèsent sur la sécurité alimentaire. Il s'agit, entre autres, d'une croissance démographique exponentielle, de la diminution de la superficie des terres arables, de la pauvreté des sols en nutriments, de l'érosion de la biodiversité et du changement climatique. Pour nourrir les 9,4 milliards d'individus attendus d'ici 2050 (Lal, 2000), le secteur de l'agriculture doit être au centre des politiques visant à éradiquer la faim dans le monde, et plus particulièrement dans les milieux ruraux.

Madagascar, l'un des pays les plus pauvres au monde, doit faire face à de nombreux problèmes: un taux de croissance économique faible (3% en 2015), un taux de pauvreté élevé, une forte insécurité alimentaire et une vulnérabilité aux perturbations, notamment les catastrophes naturelles. Sa situation économique est caractérisée par une pauvreté massive car 91% des ménages vivent avec moins de deux dollars PPA (Parité de Pouvoir d'Achat) par jour (PND, 2015) et plus d'un tiers de la population, notamment dans les milieux ruraux, vit dans une situation d'insécurité alimentaire et/ou nutritionnelle (PND, 2015). Dans le cadre de son Plan National de développement (PND) élaboré en 2015, Madagascar a ainsi

défini des axes stratégiques à l'horizon 2019 visant à améliorer la productivité agricole et le système de production alimentaire.

Le riz est l'aliment de base à Madagascar, avec une consommation annuelle moyenne par habitant de 138 kg en milieu rural et 118 kg en milieu urbain (UPDR/FAO, 2001). Les bas-fonds des vallées et les plaines sont traditionnellement consacrés à la riziculture irriguée. Cependant la production rizicole reste faible. Les 1,2 millions d'hectares consacrés à la riziculture irriguée ne produisent en moyenne que 4 tonnes de paddy par hectare par an (PND, 2015). Depuis 1970, Madagascar est devenu un pays importateur du riz afin de subvenir aux besoins de la population, notamment dans les milieux urbains (Morris et al., 2011). De plus, face à une croissance démographique relativement rapide (taux de renouvellement) de 2,5% par an (PND, 2015), la demande en riz ne cesse d'augmenter et la superficie de terres cultivables disponibles par exploitation agricole ne suffit plus. Les parcelles cultivables, qui sont héritées et partagées de génération en génération, deviennent en effet de plus en plus exiguës (Andrianantoandro and Bélières, 2015). En 2007, le ministère de l'agriculture, de l'élevage et de la pêche estimait la moyenne nationale de la surface totale cultivée par exploitation à 0,86 ha. C'est pourquoi depuis 15 ans, la riziculture pluviale sur les versants des collines ou "tanety" s'est développée (Raboin et al., 2013) sur les hautes terres malgaches. Ceci a notamment été possible grâce au développement et la diffusion de variétés de riz tolérantes à l'altitude, à la pyriculariose (maladie fongique du riz) et à l'humidité.

Sur les Hautes Terres de Madagascar, les sols des tanety sont généralement des sols ferrallitiques (Rabeharisoa, 2004). Ce sont des sols profonds caractérisés par une altération très poussée des minéraux primaires. Ils sont caractérisés par une forte teneur en fer et en aluminium échangeables (Randriamanantsoa et al., 2013; Sanchez et al., 1997). Cette forte teneur en sesquioxydes de fer et d'aluminium leur confère un statut acide voire très acide (Andriamananjara, 2011) et un pouvoir fixateur du phosphore (P) très élevé, limitant ainsi la croissance et la productivité des plantes (Rabeharisoa et al., 2012). En effet, les plantes prélèvent le P uniquement sous sa forme inorganique d'ions orthophosphates (HPO_4^{2-} ou $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$). Malgré une forte quantité de P total (300 à 1200 mg-P.kg⁻¹), la teneur en P disponible n'excède pas 10 mg.kg⁻¹ avec l'extraction Olsen (Rabeharisoa, 2004). Cette faible disponibilité du P va limiter l'activité des microorganismes capables de minéraliser la matière

organique du sol (contenant de l'azote), dont la teneur est par ailleurs particulièrement faible (entre 10 et 20 g.kg⁻¹) (Randriamanantsoa et al., 2013; Rabeharisoa, 2004). La maîtrise de la fertilité minérale des sols est alors l'un des principaux enjeux de la réussite de la riziculture pluviale, puisque le P mais aussi l'azote (N) sont des macronutriments essentiels à la productivité de la plante (Holford, 1997; Vitousek et al., 2010). Toutefois, les exploitations agricoles, souvent de petite taille, n'ont pas les moyens financiers d'investir dans des intrants chimiques, voire organiques.

Le fonctionnement du sol et des écosystèmes est assuré par différents organismes du sol qui à travers leurs activités vont agir sur quatre principales fonctions écologiques (Kibblewhite et al., 2008): (i) la transformation du carbone (C) à travers la décomposition des matières organiques, (ii) le recyclage des nutriments, (iii) le renouvellement de la structure du sol, et (iv) le contrôle des bioagresseurs et des maladies. Ainsi, l'intensification des fonctions écologiques réalisées par les organismes du sol représente un moyen d'améliorer le fonctionnement et la durabilité de l'agrosystème ; elle représente une solution potentielle aux problèmes rencontrés par les agriculteurs dans la mise en œuvre de la riziculture pluviale.

Plusieurs fonctions basées sur les interactions biologiques dans la rhizosphère des plantes ont été identifiées comme potentiellement bénéfiques pour la disponibilité des nutriments dans les sols, participant ainsi considérablement à la nutrition et à la croissance des plantes. L'une de ces fonctions repose sur les relations trophiques entre les plantes, les bactéries et les microbivores dans la rhizosphère: la "boucle microbienne des sols" sensu Clarholm (1985a). La boucle microbienne repose sur la forte limitation énergétique des bactéries présentes dans le sol non rhizosphérique. Le carbone organique libéré par les racines via l'exsudation ou la rhizodéposition, constitue une source d'énergie importante pour les bactéries qui, temporairement libérées de cette carence énergétique, minéralisent la matière organique du sol et immobilisent les nutriments (N et P) dans leur biomasse. Les microbivores (protozoaires et nématodes) consomment les bactéries et libèrent par excrétion les nutriments stockés dans la biomasse microbienne (Clarholm, 2005; Kuikman et al., 1991). Aussi, la présence des microbivores augmente l'activité des décomposeurs, et par voie de conséquence, la minéralisation brute de la matière organique du sol. L'augmentation de la croissance des plantes, et notamment des racines, qui succède à la libération des

nutriments va induire un apport accru de C rhizosphérique, alimentant ainsi la boucle microbienne (Bonkowski, 2004; Bonkowski and Brandt, 2002). Les interactions biologiques dans les sols (entre la plante, les bactéries et les microbivores) régulent ainsi la quantité de nutriments issus de la minéralisation des composés organiques du sol et potentiellement disponibles pour la plante.

Mon travail de thèse consistera à (i) étudier les mécanismes par lesquels les nématodes bactérovores régulent les flux de nutriments (N et P) dans la rhizosphère du riz pluvial dans un sol ferrallitique de Madagascar, (ii) étudier les effets des interactions bactéries – nématodes bactérovores sur les fonctions de la plante (croissance et nutrition) et (iii) évaluer les principaux facteurs contrôlant la boucle microbienne des sols dans une optique d'intensification agricole.

II. Etat de l'art

1. Les nématodes des sols

1.1 Ecologie des nématodes

Les nématodes sont des eucaryotes multicellulaires (métazoaires triploblastiques pseudo coelomates) de petite taille, généralement de 0,25 à 3 mm (Siddiqi, 1986) qui vivent dans les films d'eau entourant les particules du sol (Arpin et al., 1980; Nicholas, 1975). Les nématodes sont des petits vers ronds, à symétrie bilatérale (Nicholas, 1975), incolores et généralement transparents (Peters, 1955), et dont le corps est recouvert par une cuticule (Goodey, 1951). Les nématodes ont toujours une reproduction sexuée (amphimictique, parthénogénétique ou par hermaphrodisme) et un cycle de vie constitué d'un stade œuf suivi par quatre stades juvéniles séparés par des mues et un stade adulte (Byerly et al., 1976). Ils peuvent être ovipares, ovovivipares ou vivipares. Ils ne présentent pas de systèmes respiratoire ni circulatoire.

Ils représentent un groupe monophylétique très diversifié comptant environ 28 000 espèces décrites et une richesse spécifique estimée entre 100 000 et 500 000 espèces, ce qui en fait l'un des groupes les plus diversifiés du règne animal sur terre (Lambshhead, 1993). Les nématodes ont colonisé tous les milieux aquatiques, marins et limniques, les milieux terrestres, les sols très humides aux plus secs, les mousses et les lichens, les plantes supérieures et les animaux. Ils sont ubiquistes et très bien adaptés aux conditions du milieu.

Ils sont également présents dans des milieux extrêmes tels que l'Antarctique et les déserts. En effet, les nématodes sont capables, via la diapause (forme de vie ralentie), de survivre aux périodes défavorables de l'environnement (variations saisonnières de l'habitat, gel, déshydratation) (Nicholas, 1975; Bongers, 1990). Arpin et al. (1980) ont considéré que 85% des nématodes étaient eurytopes (sans exigence spécifique). Toutefois certaines espèces ont une localisation préférentielle (Arpin et al., 1980). Par exemple, un bon nombre de Rhabditidae et Cephalobidae abondent dans les milieux riches où la matière organique se décompose rapidement alors que les Monhysteridae sont caractéristiques des sols humides marécageux (Arpin et al., 1980). D'autres nématodes ont une préférence pour certains facteurs environnementaux (Bongers, 1990). Les nématodes de la classe Secernentea sont généralement moins sensibles aux polluants que ceux de la classe Adenophorea (Zullini 1976; Jacobs 1987). Les nématodes appartenant aux familles des Rhabditidae, Panagrolaimidae, Diplogastridae et Monhysteridae ont un taux de reproduction et une capacité de colonisation élevés, sont faciles à mettre en culture et sont peu sensibles voire insensibles aux polluants (Bongers, 1990). Ces familles sont également capables de survivre à la raréfaction de nourriture (Bongers, 1990).

La densité de nématodes libres dans les sols est de l'ordre de 1.000.000 à 5.000.000 individus.m⁻² avec une concentration de la population dans les 10 premiers centimètres du sol (Arpin et al., 1980). Dans le cadre d'une étude menée sur les hautes terres de Madagascar, Villenave et al. (2009a) ont montré que la densité de nématodes variait en fonction du mode d'usage du sol (semis direct avec restitution des résidus de récolte, ou labour avec exportation des résidus de récolte dans une rotation de soja/riz) (Figure 1).

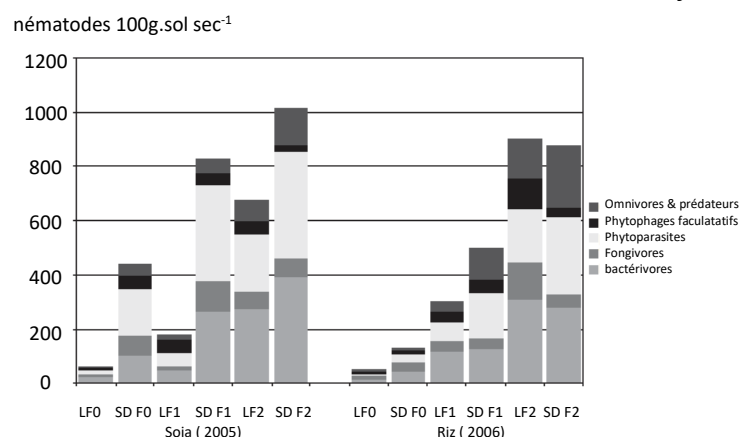


Figure 1: Densité de nématodes (individus pour 100g.sol sec⁻¹) en soja (2005) et riz (2006) en fonction du travail du sol (L: labour conventionnel, SD: sans travail du sol) et de la

fertilisation (F0: sans fertilisation, F1: fumier 5t.ha⁻¹, F2: 70N-30P-40K + fumier 5t.ha⁻¹) (Villenave et al., 2009a)

1.2 Les groupes trophiques et stratégies de vie

Les nématodes présentent une grande diversité de régime alimentaire. D'une manière synthétique, ils sont répartis en différents groupes ou guildes trophiques en fonction de leur comportement alimentaire (Yeates et al., 1993). La différenciation des groupes trophiques se fait au niveau de la morphologie de la cavité buccale (ou stoma) et du pharynx (Bongers and Bongers, 1998) et d'observation en conditions contrôlées (Figure 2).

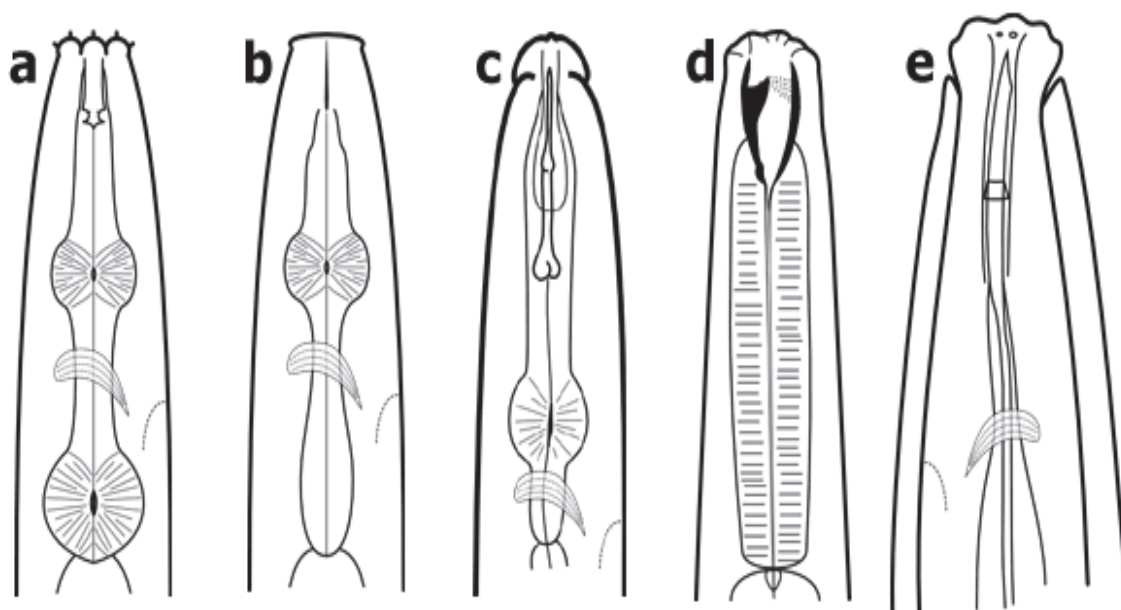


Figure 2: Classification des nématodes en fonction de leurs pièces buccales. a: bactérovores, b: fongivores, c: phytophages, d: carnivores et e: omnivores. (Ed Zaborski, University of Illinois).

Les phytophages se nourrissent de plantes et sont dotés d'un stomatostylet creux pourvu de trois protubérances à sa base (les boutons basaux) ou d'un odontostylet également creux (Yeates et al., 1993). Les fongivores perforent les tissus mycéliens, pour en aspirer le contenu, à l'aide d'un stomatostylet ou d'un odontostylet selon les espèces (Arpin et al., 1980; Yeates et al., 1993). Les bactérovores se nourrissent de cellules procaryotes qu'ils ingèrent grâce à leur cavité buccale en forme de tube ou d'entonnoir qui peut être large ou étroite selon les espèces (Yeates et al., 1993). Les prédateurs (ou carnivores) sont dotés soit d'un stylet, le plus souvent d'un odontostylet ou d'une large cavité buccale fortement sclérotisée avec des dents perforatrices. Ils se nourrissent d'invertébrés (protozoaires,

nématodes, rotifères) (Arpin et al., 1980; Yeates et al., 1993). Les omnivores ont une alimentation diversifiée et se nourrissent à tous les niveaux trophiques de la chaîne alimentaire (Yeates et al., 1993). Il s'agit essentiellement de nématodes portant un odontostylet.

En fonction de leur stratégie de développement (stratégie r à K^1), les nématodes terrestres ont également été classés selon un gradient démographique allant des taxons "colonisateurs" aux taxons "persistants" (Bongers, 1990). Les nématodes colonisateurs, très abondants dans le sol, sont caractérisés par un cycle de vie court, un taux de reproduction élevé, une capacité de colonisation élevée et une grande tolérance aux perturbations tels que l'eutrophisation et l'anoxie (Bongers, 1990). Ils ont des gonades volumineuses et libèrent un grand nombre de petits œufs. Les nématodes persistants sont quant à eux caractérisés par un taux de reproduction faible, un cycle de vie long, une faible capacité de colonisation et une grande vulnérabilité aux perturbations (Bongers, 1990). Ils ont de petites gonades mais produisent de grands œufs. Une valeur de "cp" (gradient colonisateur-persistant) allant de 1 à 5 a été assigné à chaque genre et famille de nématodes (Bongers et al., 1995; Bongers et al., 1998):

 **cp-1:** Les nématodes cp-1 sont des nématodes opportunistes caractérisés par un cycle de vie court, une activité métabolique élevée et une tolérance au stress et à la pollution. Ces nématodes produisent des petits œufs en grande quantité. Lorsque l'activité microbienne diminue, ces nématodes passent à l'état d'adulte, stade de développement alternatif plus résistant aux conditions dégradées de l'environnement.

¹ La notion de stratégie r et K a été élaborée par Mac Arthur et Wilson en 1967.

La stratégie r est une stratégie de développement des populations d'êtres vivants adoptée par des animaux ou des végétaux dont l'habitat est variable ou perturbé, l'approvisionnement en ressources vitales imprévisible et les risques élevés. Ce sont des espèces colonisatrices, en expansion ou opportunistes.

La stratégie K est une stratégie de développement des populations d'êtres vivants adoptée par des animaux ou des végétaux dont les conditions de vie sont prévisibles, avec un approvisionnement constant en ressources et des risques faibles. Il s'agit d'espèces en équilibre stationnaire.

Ce groupe est composé, entre autres, par les Rhabditidae, Diplogastridae et Panagrolaimidae.

 **cp-2:** Les nématodes cp-2 sont caractérisés par un cycle de vie court, un taux de reproduction élevée et une tolérance à la pollution et aux perturbations. Ils sont peu sensibles à la disponibilité de nourriture. Contrairement aux cp-1, les nématodes cp-2 n'ont pas la capacité de passer à l'état dauer. Ce groupe est composé, entre autres, par les Aphelencoidea, Cephalobidae et Plectidae.

 **cp-3:** Les nématodes cp-3 ont des caractéristiques intermédiaires entre les cp-2 et cp-4. Ils sont caractérisés par un cycle de vie plus long et sont relativement sensibles aux perturbations. Ce groupe est composé, entre autres, par les Chromadoridae, Desmodoridae et Teratocephalidae.

 **cp-4:** Les nématodes cp-4 sont caractérisés par un cycle de vie long, une cuticule perméable et une sensibilité aux polluants. Ce groupe est composé, entre autres, par les Alaimidae, Dorylaimidae et Trichodoridae.

 **cp-5:** Les nématodes cp-5 sont caractérisés par un cycle de vie long, un taux de reproduction faible, une faible activité métabolique et une faible mobilité. Ils produisent des grands œufs mais en faible quantité. Leur cuticule est perméable, ce qui les rend très sensibles aux polluants et aux perturbations. Ce groupe est composé, entre autres, par les Thornelemtidae, Discolaimidae et Nygolaimidae.

1.3 Les nématodes bactériophages

D'un point de vue taxonomique, les nématodes bactériophages sont les plus diversifiés à l'échelle de la famille. Parmi toutes les familles listées par le nématologiste Howard Ferris sur le site internet Nemaplex (<http://nemaplex.ucdavis.edu/Ecology/bioindicators.htm>), 54% sont classées parmi les bactériophages.

Au sein de ce groupe, il existe une grande diversité morphologique de la cavité buccale (Figure 3), leur permettant d'exploiter différentes ressources bactériennes. Des travaux de Paul De Ley montrent comment la diversité des pièces buccales de 12 espèces de Cephalobidae, en particulier les probolae labiaux et céphaliques, autorise la coexistence de ces espèces au sein d'un même sol sableux au Sénégal en limitant la compétition interspécifique (De Ley, 1992).

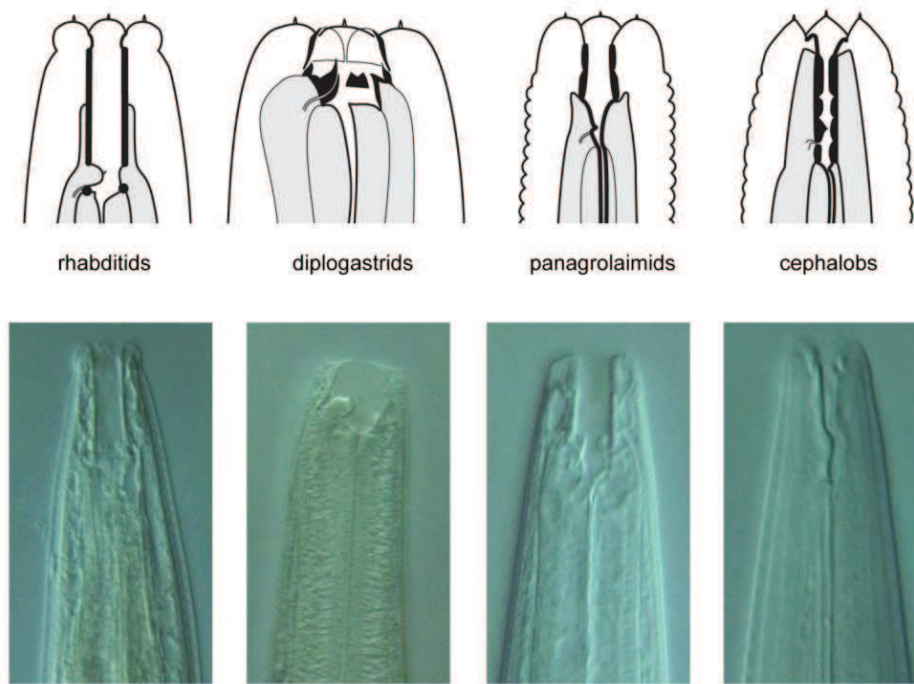


Figure 3: Morphologie de la cavité buccale (ou stoma) de nématodes Rhabditida illustrée par les 4 infra-ordres les plus communs (de gauche à droite) : Rhabditomorpha, Diplogasteromorpha, Panagrolaimomorpha et Cephalobomorpha.

Les nématodes bactérivores sont classés du cp-1 au cp-5 selon l'échelle de Bongers (Bongers et al., 1998). Parmi toutes les espèces listées sur le site Nemaplex (<http://nemaplex.ucdavis.edu/Ecology/bioindicators.htm>), 44% sont des cp-1. En ce qui concerne les familles:

- ✿ quatorze sont des cp-1 (Alloionematidae, Brevibuccidae, Bunonematidae, Diplogasteridae, Diplogasteroididae, Diploscapteridae, Hoplolaimidae, Monhysteridae, Neodiplogasteridae, Panagrolaimidae, Peloderidae, Pterygorhabditidae, Rhabditidae, et Tylopharyngidae)
- ✿ sept sont des cp-2 (Cephalobidae, Elaphonematidae, Myolaimidae, Osstellidae, Panagrolaimidae, Plectidae, et Xyalidae)
- ✿ seize sont des cp-3 (Aphanolaimidae, Aulolaimidae, Bastianiidae, Chromadoridae, Chronogasteridae, Cylindrolaimidae, Desmodoridae, Desmoscolecidae, Diplopeltidae, Ethmolaimidae, Leptolaimidae, Linhomoeidae, Microlaimidae, Prismatolaimidae, Rhabdolaimidae, et Teratocephalidae)
- ✿ trois sont des cp-4 (Alaimidae, Amphidelidae, et Bathyodontidae)
- ✿ une famille est un cp-5 (Isolaimidae).

La distribution des nématodes bactérivores dans les systèmes cultivés va dépendre de la disponibilité de la nourriture, de l'humidité du sol et des pratiques agricoles (Villenave et al., 2009a, Djigal et al., 2004a). Les nématodes bactérivores sont très présents dans la rhizosphère où ils trouvent des bactéries en abondance (Djigal et al., 2004a).

Plus de 50% des nématodes libres du sol sous savane (Bozaka) des hautes terres malgaches sont des bactérivores (Villenave et al., 2009b). Sous les systèmes agricoles, cette densité va varier en fonction des pratiques culturales (labour, amendement, culture en place). La densité de nématodes bactérivores est plus élevée en semis direct, par rapport au labour conventionnel, et cette densité augmente avec l'augmentation de l'apport de fertilisants (Villenave et al., 2009a).

Acrobeloides sp., objet de notre étude, est un nématode bactérivore appartenant à la famille des Cephalobidae. Les Cephalobidae sont souvent les nématodes bactérivores les plus abondants dans le sol (Yeates, 2003). Ils sont classés dans le groupe cp-2 de l'échelle de Bongers (Bongers and Bongers, 1998) et appartiennent à la faune basale (Ferris et al., 2001). Ce sont des nématodes relativement petits avec une stratégie de vie intermédiaire entre les types r et K, un cycle de vie moyen et des capacités de colonisation et une fécondité moyennes. Ils sont tolérants au stress, en particulier hydrique (Bongers and Bongers, 1998; Villenave et al., 2010). Ils sont également peu sensibles à la faible disponibilité de nourriture et sont très tolérants aux polluants et à d'autres perturbations (Bongers and Bongers, 1998). *Acrobeloides* sp. a un temps de régénération (cycle de vie) de 11 jours (variable selon la température et le type de bactérie présent dans la culture) et prolifère mieux en présence de faibles densités bactériennes (Anderson and Coleman, 1981).

2. Fonctions portées par les nématodes bactérivores

Les nématodes bactérivores jouent un rôle clé dans le fonctionnement écologique des écosystèmes aquatiques et terrestres (Bonkowski et al., 2000; Ingham et al., 1985). La prédation des bactéries par les nématodes bactérivores stimule l'activité microbienne du sol ce qui va améliorer la fertilité minérale du sol et favoriser la productivité primaire des plantes (Djigal et al., 2004b; Ferris et al., 1998; Irshad et al., 2011). En libérant par excrétion les nutriments immobilisés dans la biomasse microbienne, les nématodes bactérivores vont

améliorer la disponibilité des nutriments (Anderson et al., 1983; Ferris et al., 1998) et les fonctions de la plante (Irshad et al., 2012; Trap et al., 2016).

Ils jouent également un rôle dans les chaînes trophiques car ils sont la proie d'autres organismes (nématodes carnivores, nématodes omnivores, arthropodes, protozoaires, tardigrades).

2.1 Effets sur les communautés microbiennes

Les effets de la prédation des nématodes bactérovores sur la croissance et l'abondance des bactéries varient en fonction de l'espèce de nématodes (Fu et al., 2005; Ingham et al., 1985), de la durée d'incubation (Djigal et al., 2004a), de la texture du sol (Anderson et al., 1978; Elliott et al., 1980; Jiang et al., 2017) et de la disponibilité de ressources telles que le carbone labile (Anderson et al., 1978) ou l'azote (Baath et al., 1981). Les nématodes bactérovores influencent également la structure de la population bactérienne en sélectionnant les cellules bactériennes en fonction de leurs préférences alimentaires (Griffiths et al., 1999; Jiang et al., 2017; Venette and Ferris, 1998; Xiao et al., 2010).

Dans des expériences en microcosmes, la prédation par les nématodes bactérovores stimule la croissance bactérienne (Fu et al., 2005) et l'abondance bactérienne (Jiang et al., 2017). Ingham et al., (2005) ont montré que le nombre de cellules de bactéries par gramme de sol augmentait significativement de $1.25 \cdot 10^5$ le jour de l'inoculation à $3.7 \cdot 10^8$ et $7.8 \cdot 10^8$ dans les traitements "plante + bactéries" (*Bouteloua gracilis* + *Pseudomonas paucimobilis*) et "plante + bactéries + nématodes" (*B. gracilis* + *P. paucimobilis* + *Acrobeloides* sp.), respectivement, après 40 jours d'incubation à 30°C jour/22°C nuit dans un sol sablo-limoneux non amendé. Les nématodes bactérovores vont en effet participer à la dissémination des bactéries vers d'autres niches dans le sol en les transportant dans leur cuticule ou dans leur tube digestif (Tugel et al., 2000). D'autres études ont en revanche montré que la prédation par les nématodes bactérovores réduisait l'abondance des bactéries (Anderson et al., 1978; Baath et al., 1981; Coleman et al., 1977; Djigal et al., 2004a; Gould et al., 1981; Woods et al., 1982). Bardgett and Chan (1999) n'ont trouvé aucun effet significatif de la prédation des nématodes bactérovores (Rhabditidae, Plectidae et Cephalobidae) sur la biomasse et l'abondance bactériennes après 60 jours d'incubation à 15°C dans un sol (stagnopodzol humique) défauné et amendé avec des excréments de moutons.

Plusieurs études ont montré que la présence de nématodes bactérovores stimule l'activité et le taux de renouvellement des bactéries. Par exemple, Djigal et al. (2004a) ont montré que la présence de nématodes bactérovores (*Zeldia punctata*, *Cephalobus pseudoparvus*, *Acrobelloides nanus*) augmentait de 18%, par rapport au contrôle sans nématodes, l'activité de la phosphatase alcaline dans la rhizosphère du maïs après 47 jours de croissance à 28-33°C dans du sol défauné. Il a également été montré que la respiration basale du sol augmente à travers un taux de renouvellement bactérien plus rapide en présence de *Mesodiplogaster* sp. (Coleman et al., 1977). Trofymow et al. (1983) ont montré que la prédation par *Pelodera* sp. augmente la minéralisation du carbone après 43 jours d'incubation à 20°C dans du sol sablo-limoneux autoclavé et amendé avec de la cellulose. En travaillant avec 2 espèces de nématodes bactérovores (*Acrobelloides* sp. et *Mesodiplogaster lheritieri*), Anderson and Coleman (1981) ont montré que la quantité de CO₂ libéré par la communauté microbienne semblait dépendre de la taille du nématode : *Acrobelloides* sp. de plus petite taille peut consommer plus de bactéries en ayant facilement accès à des pores plus fins dans le sol.

2.2 Effets des nématodes bactérovores sur la disponibilité des nutriments

De nombreux auteurs ont montré que la prédation exercée par les nématodes bactérovores sur les bactéries décomposeurs stimule la minéralisation nette de N et P (Anderson and Coleman, 1981; Griffiths, 1986; Postma-Blaauw et al., 2005; Trofymow et al., 1983; Xiao et al., 2010). Hassink et al. (1993) ont observé une corrélation positive entre le taux de minéralisation de N (kgN.ha.jour⁻¹) par unité de biomasse bactérienne (kgC.ha⁻¹) et la pression de prédation exercée par les nématodes bactérovores sur les bactéries (biomasse de nématodes bactérovores par unité de biomasse bactérienne). Des expériences menées en microcosmes sans plantes ont montré que la minéralisation nette de N et P augmente progressivement durant les premiers jours d'incubation puis se stabilise avant de diminuer (Anderson et al., 1981; Coleman et al., 1977). Anderson et al. (1981) montrent, par une expérience menée avec du sol sablo-limoneux amendé avec du glucose, du N et P minéral, que la présence de *Acrobelloides* sp. et *M. lheritieri* augmente la minéralisation nette de N (production de NH₄⁺) et d'ions phosphates durant les 10 premiers jours de l'incubation. Après 65 jours d'incubation, les teneurs de NH₄⁺ et P inorganique (extraction Olsen) en présence des nématodes bactérovores ne diffèrent plus du contrôle (sans nématodes).

Coleman et al. (1977) ont montré, par une expérience menée avec du sol sablo-limoneux non amendé, que la minéralisation nette de N (en NH_4^+) et P (en PO_4^{3-}), en présence de *Mesodiplogaster* sp., augmente à partir du 3^{ème} jour d'incubation puis diminue à partir du 17^{ème} jour d'incubation. Toutefois, Griffiths (1986) a montré, par une expérience menée avec du sol sablo-limoneux non amendé, que la présence de *Rhabditis* sp. augmente la minéralisation de l'azote (en NH_4^+) de manière continue au cours des 28 jours d'incubation. La minéralisation de N varie donc en fonction des espèces de nématodes bactérivores, et de l'amendement apporté au sol (Trofymow et al., 1983). Après 100 jours d'incubation dans un sol sablo-limoneux dont la teneur native de NH_4^+ est de $22 \mu\text{gN.g}^{-1}$ sol sec, la quantité de N minéralisée dans le contrôle (sans nématodes) est relativement faible alors qu'en présence de *Pelodera* sp., $21 \mu\text{gN.g}^{-1}$ sol sec sont minéralisés dans les systèmes amendés avec de la cellulose ($314 \mu\text{gC.g}^{-1}$ sol sec) et $43 \mu\text{gN.g}^{-1}$ sol sec dans les systèmes amendés avec de la cellulose ($314 \mu\text{gC.g}^{-1}$ sol sec) et de la chitine ($686 \mu\text{gC.g}^{-1}$ sol sec) (Trofymow et al., 1983). La présence de nématodes bactérivores améliore également la nitrification nette (Bouwman et al., 1994; Xiao et al., 2010). Bouwman et al. (1994) ont montré que les quantités de NO_3^- produites dans des microcosmes de sol sablo-limoneux amendés avec de la paille de luzerne et de blé, sont égales à -0.07, 0.03 et 0.30 mgN par 100 g de sol après 32, 60 et 180 jours d'incubation, respectivement dans le contrôle (sans nématodes). La présence de *Rhabditis* sp. et *Acrobelloides bütschlii* va stimuler la nitrification: 0,16, 1,94 et 3,93 mg N par 100 g de sol de NO_3^- ont été produites après 32, 60 et 180 jours d'incubation, respectivement. Xiao et al. (2010) ont trouvé que la concentration en NO_3^- , dans des microcosmes de sol sableux amendés avec du lisier de porc, augmentait de manière constante et significative en présence d'une communauté de nématodes bactérivores à partir du 7^{ème} jour d'incubation jusqu'à la fin de l'expérience (28^{ème} jour) grâce à la stimulation de l'activité des bactéries nitrifiantes. Le même patron est observé dans le contrôle (sans nématodes) mais les concentrations sont significativement plus basses qu'en présence des nématodes bactérivores.

D'autres études ont montré l'absence d'effets des nématodes bactérivores sur la minéralisation de N et P (Cole et al., 1978; Griffiths, 1986; Woods et al., 1982). Cole et al. (1978) ont montré que la présence de *M. lheritieri* ne stimulait pas la minéralisation du P. Après 24 jours d'incubation, les teneurs en phosphates dans les microcosmes de sol non

amendé sont de 4,67 et 5,26 ppm pour le contrôle (sans nématodes) et le traitement "+nématodes", respectivement. Lorsque le sol est amendé avec du glucose, les teneurs en phosphate à la fin de l'expérience sont de 3,87 et 3,55 ppm pour le contrôle (sans nématodes) et le traitement "+nématodes", respectivement. Woods et al. (1982) ont montré que la minéralisation de N n'augmentait pas en présence de *M. lheritieri*. Après 24 jours d'incubation, l'activité bactérienne seule (traitement contrôle sans nématodes) dans des microcosmes de sol non amendé ou amendé avec du glucose ($600 \mu\text{C.g}^{-1}$ sol sec) ne produit aucune minéralisation nette de N. L'ajout de *M. lheritieri* dans ces microcosmes réduit l'abondance de bactéries mais ne stimule pas la minéralisation nette de N.

2.3 Mécanismes potentiels impliqués dans l'amélioration de la disponibilité des nutriments en présence des nématodes bactérovores

Deux voies principales ont été proposées pour expliquer les effets positifs des nématodes bactérovores sur la disponibilité des nutriments (Bouwman et al., 1994; Coleman et al., 1978): (i) une voie indirecte basée sur la stimulation de l'activité et du taux de renouvellement (turnover) du compartiment bactérien, et (ii) une voie directe correspondant à l'excrétion des nutriments par les bactérovores.

La voie indirecte se base sur différents mécanismes dont la capacité des nématodes à disséminer les bactéries dans le sol (Chantanao and Jensen, 1969) leur permettant ainsi de coloniser plus d'espace et de décomposer plus de substrat. Ce mécanisme permet également de coloniser de nouvelles niches riches en matière organique. Ce transport peut être phorétique ou interne. En effet, beaucoup de cellules bactériennes sont évacuées vivantes après ingestion par les nématodes (Arpin et al., 1980; Sohlenius, 1980; Griffiths, 1994). Les nématodes éliminent également les cellules bactériennes sénescents permettant ainsi de conserver la communauté microbienne dans un état actif. L'excrétion des ions ammonium et phosphates par les nématodes permet de stimuler l'activité microbienne. Enfin, la libération accrue de carbone par les racines via la présence des nématodes stimule fortement l'activité microbienne.

La voie directe repose sur l'homéostasie stœchiométrique stricte des nématodes bactérovores et leur faible capacité d'assimilation du carbone (Clarholm, 1985a; Kuikman et al., 1991). Ainsi, afin de réguler leurs concentrations internes en éléments nutritifs, les

nématodes bactérivores vont excréter, sous forme inorganique, l'excès de nutriments qu'ils ont assimilés en ingérant les bactéries (Anderson et al., 1983; Ferris et al., 1998). Ferris et al. (1998) ont calculé qu'un nématode bactérivore excrète quotidiennement entre 0,0012 et 0,0058 μgN (principalement sous forme de NH_4^+) selon l'espèce. A partir des valeurs des ratios stœchiométriques et de l'efficacité de production (EP) des nématodes bactérivores définis dans la littérature (C:N = 5.6; C:P = 9.4; N:P = 1.9; EP = 69.4%) (Ferris et al., 1998; Borkott, 1988; Crotty et al., 2013), Trap et al. (2016) ont calculé les pourcentages théoriques de nutriments excrétés par les bactérivores. Ils ont trouvé que les nématodes bactérivores devraient excréter 9-20% de l'azote qu'ils ont assimilé et 66-76% du P qu'ils ont assimilé.

2.4 Effets des nématodes bactérivores sur les fonctions de la plante

De nombreux auteurs ont montré que les nématodes bactérivores stimulent la croissance des plantes herbacées (Alphei et al., 1996; Bonkowski et al., 2000; Ingham et al., 1985) et ligneuses (Irshad et al., 2012; Irshad et al., 2011; Setälä et al., 1999). Ingham et al. (1985) ont montré que la présence de *Acroboloides* sp. augmente de 153% la biomasse aérienne et de 133% la biomasse racinaire de *Bouteloua gracilis* (Graminée) par rapport au contrôle, après 40 jours de croissance sur sol non amendé. Après 60 jours de croissance sur de l'agarose amendé avec du phytate, Irshad et al. (2012) ont observé une augmentation par rapport au contrôle de 50% de la biomasse aérienne et de 44% de la biomasse racinaire des plants de *Pinus pinaster* en présence de *Rhabditis* sp. Bardgett and Chan (1999) ont toutefois montré que la présence de nématodes (majoritairement des *Rhabditidae*, *Plectidae* et *Cephalobidae*) n'a pas d'effet sur la croissance de *Nardus stricta* (Graminée).

Outre l'augmentation de la biomasse des plantes, les nématodes bactérivores peuvent également modifier l'architecture racinaire (Cheng et al., 2011; Irshad et al., 2012; Mao et al., 2006). Cheng et al. (2011) ont observé que les plants de riz (*Oryza sativa*) développaient des racines plus ramifiées et plus longues en présence de *Cephalobus* sp. et *Caenorhabditis elegans*. Après 20 jours de croissance dans un sol sablo-limoneux d'origine alluviale, la présence de *Cephalobus* sp. augmente, respectivement, de 15% et de 13% la longueur totale des racines et le nombre d'apex par rapport au contrôle. Irshad et al. (2012) ont montré que la présence de *Acroboloides* sp. augmentait, respectivement, le nombre d'apex et de

fourches de 46% et 36% par rapport au contrôle, après 60 jours de croissance sur de l'agarose amendé avec du phytate.

Les effets positifs de la présence de bactérivores sur la teneur en N et P dans les tissus des plantes résultent soit d'une augmentation de la teneur de ces éléments dans les tissus, soit d'une augmentation de la quantité totale via un gain de croissance de la plante sans augmentation de la teneur ; il est très rare d'observer à la fois une augmentation de la teneur et une augmentation de la quantité de N total ou de P total (Trap et al., 2016). Bonkowski et al. (2000) ont montré que la présence de deux nématodes *Coactadera cystilarva* et *Panagrolaimus* spp. a augmenté la quantité en N total dans les tissus de *Lolium perenne* (ray grass, Graminée) ($\times 1,1$ par rapport au contrôle). Aussi, Djigal et al. (2004b) ont montré que la présence de *Zeldia punctata* augmentait de 7%, par rapport au contrôle, la teneur en azote dans les parties aériennes de *Zea mays* ce qui a augmenté de 7% la quantité d'azote total dans la plante après 51 jours d'incubation. Toutefois, Alpehi et al. (1996) ont observé que malgré une augmentation de 22% par rapport au contrôle de la biomasse racinaire de *Hordelymus europaeus* (graminée) en présence de *Pellioditis pellio*, la quantité d'azote total dans les tissus de *H. europaeus* est identique au contrôle. Djigal et al. (2004b) ont montré que la présence de *Z. punctata* augmentait la teneur en P et la quantité en P total dans les parties aériennes de *Z. mays* après 51 jours d'incubation, de 33% et 38% par rapport au contrôle respectivement. Irshad et al. (2011) ont montré que la présence de *Rhabditis* sp. augmentait la teneur en P dans les parties aériennes de *Pinus pinaster* ($\times 1,65$ par rapport au contrôle) après 35 jours d'incubation grâce à une augmentation de la biomasse aérienne des plantes.

2.5 Mécanismes potentiels impliqués dans l'amélioration des fonctions de la plante en présence de bactérivores (nématodes et protozoaires)

Deux théories ont été proposées pour expliquer l'amélioration des fonctions de la plante en présence de bactérivores (protistes et nématodes): (i) la boucle microbienne sensu Clarholm et (ii) la théorie hormonale sensu Bonkowski.

La boucle microbienne du sol décrit des mécanismes nutritionnels par lesquels les bactérivores peuvent améliorer la croissance et la nutrition des plantes (Clarholm, 1985a). Elle repose sur la capacité des bactérivores à augmenter la disponibilité des nutriments pour

la plante (Clarholm, 2005; Kuikman et al., 1991) en (i) augmentant le taux de renouvellement et l'activité bactériens et (ii) excréant le surplus d'éléments nutritifs.

La théorie hormonale repose sur la capacité des bactérivores (surtout les protistes) à stimuler le développement de l'architecture racinaire via à une modification de la composition de la communauté microbienne (Alphei et al., 1996; Bonkowski and Brandt, 2002; Jentschke et al., 1995; Kreuzer et al., 2006; Krome et al., 2009a). Le carbone labile fourni par les racines va stimuler la croissance des bactéries. La prolifération des bactéries va par la suite stimuler le développement des bactérivores qui vont modifier la structure de la communauté bactérienne. La modification de la structure de la communauté microbienne, en particulier l'augmentation de l'abondance relative des bactéries nitrifiantes et des bactéries productrices d'auxine, est détectée par la plante, certainement via la présence de molécules signalétiques tels les ions nitrates. Ce signal perçu par la plante entraîne une modification du métabolisme hormonal interne de la plante. La plante augmente alors la production d'auxine active ce qui va induire une croissance accrue des racines latérales. Le développement des racines latérales va augmenter le volume de sol prospecté par les racines, ce qui va permettre une augmentation du prélèvement des nutriments disponibles dans le sol par la plante.

2.6 Déterminants des effets des interactions bactéries – nématodes bactérivores sur la disponibilité des nutriments et les fonctions de la plante

L'espèce de nématode bactérivore, la variété de riz, les caractéristiques physico-chimiques du sol et les pratiques agricoles sont des facteurs de contrôle des effets de la présence de nématodes bactérivores sur les fonctions de la plante.

Les exsudats racinaires constituent les principales sources d'énergie pour les bactéries présentes dans la rhizosphère. La composition et la quantité d'exsudats racinaires varient cependant en fonction de l'espèce et du stade de développement de la plante (plantule, initiation paniculaire, floraison et maturité) (Aulakh et al., 2001; Bhattacharyya et al., 2013; Somasundaram et al., 2008). Les effets positifs de la présence des nématodes bactérivores seront maximisés par la culture d'une variété de riz capable de fournir aux bactéries assez de carbone labile, via ses exsudats racinaires, tout au long de sa croissance.

Aussi, tout le P et N rendus disponibles par les nématodes bactériovores ne sera pas prélevé par la plante, une partie sera ré-immobilisée par les bactéries, une autre peut être perdue par lixiviation ou adsorption. Les quantités de P et N immobilisées par les bactéries, après excrétion par les nématodes bactériovores, dépendent de la disponibilité de C dans le sol (Ferris et al., 1998). Des sols ayant des ratios C:P et C:N élevés vont favoriser la prolifération des bactéries et la ré-immobilisation des nutriments disponibles au détriment de la plante, à condition que le C soit peu récalcitrant. Des sols ayant des ratios C:N et C:P faibles vont limiter la croissance des bactéries, qui seront vite limitées en énergie, ce qui va réduire la ré-immobilisation des nutriments dans la biomasse bactérienne. Les effets de la présence des nématodes bactériovores sur la minéralisation de N et P vont ainsi dépendre de la quantité de carbone labile produite par les racines ou dérivée de la décomposition de la matière organique (Bonkowski and Clarholm, 2012).

La gestion de la capacité d'adsorption du P dans les sols est également un facteur de contrôle de la boucle microbienne, notamment dans les sols ferrallitiques très fixateurs des hautes terres malgaches. En effet, dans un sol riche en cations (Fe, Al, Ca), une faible proportion du P_i sera adsorbée sous forme de complexes métalliques insolubles ce qui va limiter l'accès de la plante aux ions orthophosphates, déjà très peu mobiles (faible diffusion) (Gérard, 2016; Hinsinger, 2001). La quantité d'ions orthophosphates adsorbés aux argiles et complexes métalliques augmente avec des valeurs décroissantes de pH (Plassard et al., 2015). Les effets de la présence des nématodes bactériovores sur les fonctions de la plante sont alors positivement corrélés avec les valeurs de pH.

La pression de prédation des nématodes bactériovores sur les bactéries est plus élevée dans les sols sableux que dans les sols limoneux et argileux (Hassink et al., 1993). La texture du sol joue un rôle important dans la dispersion des nématodes dans le sol. La présence de macropores dans le sol va en effet favoriser le déplacement des nématodes vers de nouvelles niches riches en bactéries ce qui va augmenter la minéralisation de l'azote (Hassink et al., 2013).

Les dynamiques de population de nématodes bactériovores dans le sol dépendent (i) de l'espèce de nématode bactériovore utilisée, (ii) des espèces de bactéries présentes dans le sol et (iii) des pratiques agricoles (Anderson and Coleman, 1981; Villenave et al., 2009a). Chaque

espèce de nématode bactérivore a en effet une stratégie de développement différente. Un nématode cp-1 sera plus opportuniste et plus performant qu'un nématode cp-5 (Bongers, 1990). La composition de la communauté bactérienne du sol va influencer la croissance des nématodes bactériveres puisque chaque espèce de nématode a une préférence en termes de nourriture. L'abondance de nématodes bactériveres dans le sol augmente avec la quantité de fertilisants organiques et minérales apportée au sol (Villenave et al, 2004a). Le non labour favorise également la croissance des nématodes bactériveres. Cependant, ces pratiques agricoles favorisent aussi la croissance des nématodes phytoparasites, déterminants de la productivité végétale (Villenave et al., 2009a).

3. Approches méthodologiques pour appréhender les effets des bactériveres (protistes et nématodes) sur la disponibilité des nutriments et les fonctions de la plante

Différents dispositifs méthodologiques ont été utilisés pour étudier les effets des interactions bactéries-bactériveres sur la disponibilité des nutriments (Coleman et al., 1977; Darbyshire et al., 1994; Irshad et al., 2012). Nous avons classé ces différents dispositifs suivant un gradient de complexité depuis les dispositifs les plus simples, adaptés pour comprendre les mécanismes les plus fins, vers des dispositifs plus complexes cherchant à reproduire les conditions au champ.

Le dispositif expérimental le plus simple est le milieu de culture liquide et les suspensions de sol (Darbyshire et al., 1994; Griffiths, 1986, 1989; Taylor, 1986). Par exemple, Griffiths (1986) a utilisé une suspension de sol stérile pour comprendre les effets des interactions entre *Pseudomas fluorescens* et ses prédateurs (*Rhabditis* sp. et *Colpoda stenii*) sur la minéralisation de N et P. Darbyshire et al. (1994) ont utilisé une solution de sels minéraux (solution de Prescott et James) avec une approche de type "batch" pour étudier les effets de *C. stenii* sur la disponibilité de N et P à différentes température (5°C, 10°C et 15°C). Les bactéries (*Arthrobacter* sp.) utilisées dans cette étude ont été obtenues à partir d'une culture pure dans une solution de sels minéraux (solution de Owens et Keddie) ayant un ratio C:N soit égal à 3 (bactéries limitées en C) soit égal à 18.9 (bactéries limitées en N). Ces approches permettent d'obtenir des résultats assez rapidement, facilitent la manipulation et le comptage des bactériveres et permettent surtout de connaître avec exactitude les

quantités de C, N et P dans le milieu. Un désavantage important est la faible prise en compte de la complexité, de la diversité et de l'hétérogénéité des milieux naturels.

Suivant le gradient de complexité des dispositifs expérimentaux, nous pouvons ensuite citer les nombreuses études menées avec du sol tamisé en l'absence de plante (Griffiths, 1989; Ronn et al., 2001; Woods et al., 1982). Par exemple, Cole et al. (1978) ont réalisé une expérience en microcosmes pour étudier les interactions entre les bactéries (*Pseudomonas*), amibes (*Acanthamoeba*), et nématodes (*Mesodiplogaster*) sur la disponibilité du P dans un sol amendé ou non avec du glucose, après 24 jours d'incubation. Dans cette étude, le sol est séché à l'air libre, puis ré-humidifié à la capacité au champ (15%) avant d'être fumigé avec de l'oxyde de propylène. Ces approches permettent également d'obtenir des résultats assez rapidement et facilitent la manipulation et le comptage des bactérivores. Ils ont permis de quantifier les effets de la présence de bactérivores sur la minéralisation nette de l'azote (NH_4^+ et NO_3^-) et du phosphore (PO_4^-) dans le milieu. Toutefois, les teneurs de N et P obtenues avec des extractants chimiques ne correspondent pas aux quantités de nutriments réellement phytodisponibles. De plus, comme ces dispositifs utilisent un sol fortement remanié, la complexité et l'hétérogénéité des milieux naturels ne sont pas assez pris en compte.

D'autres études ont introduit une plante dans leur dispositif expérimental. Ces auteurs ont étudié les effets des bactérivores sur la croissance et la nutrition des plantes sur (i) du sable autoclavé ou un mélange sol/sable (Jentschke et al., 1995), (ii) un mélange humus/sable (Baath et al., 1981) ou (iii) de l'agarose (Irshad et al., 2012; Irshad et al., 2011). Par exemple, Irshad et al. (2012) ont conduit une expérience en boîte de Pétri pour étudier les effets de la présence de *Rhabditis* sp. et *Acrobeloides* sp. sur la croissance et la nutrition de *Pinus pinaster* via la minéralisation du phytate par *Bacillus subtilis*, après 60 jours d'incubation en conditions climatiques contrôlées. L'utilisation de l'agarose présente un avantage indéniable, à savoir la maîtrise des formes et des quantités de nutriments présents dans les microcosmes. Pour faire suite à l'expérience sur agarose de Irshad et al. (2012), Plassard et al., (2014) ont conduit une expérience en boîte de Pétri pour étudier les effets de la présence de *Rhabditis* sp. sur la croissance et la nutrition de *Pinus pinaster* sur un mélange sol tamisé et autoclavé/microbilles de verre stériles via la minéralisation du phytate par *Bacillus subtilis*, après 100 jours d'incubation en conditions climatiques contrôlées.

D'autres auteurs ont conduit des expériences encore plus proches des conditions du terrain en étudiant les effets des bactérivores sur la croissance et la nutrition des plantes sur du sol tamisé (Alphei et al., 1996; Clarholm, 1985a; Djigal et al., 2004a; Ingham et al., 1985). Par exemple, Clarholm (1985a) a décrit la boucle microbienne en réalisant une expérience sur du sol, avec un apport continu de carbone et de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) tout au long de 6 semaines d'incubation. Pour cette expérience, le sol avait été tamisé à 4 mm, puis ré-humidifié à la capacité au champ avant d'être autoclavé deux fois. Djigal et al. (2004a) ont quant à eux réalisé une expérience sur du sol ré-humidifié à la capacité au champ pour étudier les effets de *Zeldia punctata*, *Cephalobus pseudoparvus*, *Acrobeloides nanus* sur la croissance et la nutrition de *Z. mays* après 47 jours d'incubation en conditions climatiques contrôlées. Dans cette étude, les nématodes natifs du sol ont été éliminés par 5 cycles de congélation-décongélation (7 jours à -18°C et 7 jours à température ambiante) afin de minimiser l'impact de la défaunation sur le sol.

Toutes ces études ont été menées sur des milieux (plus ou moins) contrôlés et perturbés. Le tamisage du sol, l'amendement, et l'utilisation d'un groupe trophique spécifique (bactérivores), bien que nécessaires pour comprendre les mécanismes, ne reflètent pas ce qui se passe réellement sur le terrain. Plus récemment, Gebremikael et al. (2014) ont mis en place une nouvelle méthode pour étudier les effets d'une communauté de nématodes libres du sol sur la disponibilité de l'azote. Ils ont conduit une expérience dans des tubes en PVC rempli avec du sol tamisé à 5mm, tassé à la densité apparente au champ. Le sol a été défauné par irradiation gamma. La communauté de nématodes dans les carottes de sol "+nématodes" est dominée par les bactérivores au début de l'expérience (50%) et par les phytophages à la fin de l'expérience (70%). Après 86 jours d'incubation, la présence de nématodes n'a pas d'effet significatif sur la croissance et la nutrition azotée de *Lolium perenne* (ray grass, Graminées). Cette approche est appropriée pour étudier les effets des nématodes bactérivores sur la disponibilité des nutriments. Toutefois, elle est moins efficace pour le suivi de l'activité mutualiste des nématodes bactérivores dans plusieurs parcelles agricoles. En effet, l'approche développée par Gebremikael et al. (2014) requiert du temps et de l'argent ce qui le rend peu applicable pour une étude à grande échelle dans des pays en développement comme Madagascar.

L'analyse de la littérature met en exergue le souhait de plus en plus présent de la communauté scientifique de s'approcher des conditions du terrain afin de quantifier avec exactitude la contribution des nématodes sur les fonctions des écosystèmes et d'éviter les biais expérimentaux. Il s'agit également d'un de nos objectifs. Néanmoins, l'identification des mécanismes par lesquels les nématodes agissent sur le fonctionnement des écosystèmes est toujours bien présente dans la littérature et reste une priorité. Pour cela, l'utilisation des isotopes de C, N et P semble constituer une approche méthodologique prometteuse.

La technique de marquage isotopique ^{13}C permet de suivre l'activité des microorganismes (bactéries et bactérivores) via l'évolution de la production de $^{13}\text{CO}_2$ résultant de l'utilisation de glucose (Anderson et al., 1981) ou de la minéralisation de la matière organique apportée dans le sol (Bonkowski et al., 2000). Le marquage isotopique ^{13}C permet également de suivre les flux du carbone issu de la partie aérienne des plantes vers les tissus racinaires, les exsudats racinaires, la biomasse microbienne et la respiration du sol (Leake et al., 2006). Pour cela le carbone assimilé par la plante par photosynthèse sera fourni par du $^{13}\text{CO}_2$ qui remplace le CO_2 de l'atmosphère.

La dynamique des flux de N dans le sol en présence de microbivores (nématodes et protozoaires) peut être suivie en marquant à l'aide du traceur isotopique ^{15}N l'azote immobilisé dans la biomasse microbienne (Irshad et al., 2011; Kuikman et al., 1989; Kuikman et al., 1991) ou la matière organique apportée dans le sol (Bonkowski et al., 2000). Le ^{15}N est également utilisé pour répartir la faune du sol dans des guildes trophiques en fonction de leur comportement alimentaire (Setälä and Aarnio, 2002; Pollierer et al., 2009; Gan et al., 2014).

La technique de marquage isotopique ^{32}P est une méthode robuste qui repose sur le principe de la conservation de la masse: l'activité spécifique des différents de pool de P se conserve durant la durée de l'échange. L'activité spécifique du phosphore labile dans le compartiment considéré correspond au ratio de l'isotope ajouté (^{32}P) avec l'isotope stable (^{31}P). La technique de marquage isotopique ^{32}P permet d'étudier la phytodisponibilité du phosphore inorganique (Pi) dans le système sol-plante grâce à la détermination de la valeur L (Fardeau et al., 1995). La valeur L correspond au Pi potentiellement assimilable par la plante pendant la durée de sa croissance et est déterminée à partir de l'activité spécifique du Pi de la partie aérienne de la plante et de l'activité spécifique du Pi isotopiquement échangeable du sol

(Larsen, 1952). Lorsque la valeur L est élevée cela signifie que la plante prélève plus de ^{31}P . La valeur L est calculée en utilisant la formule:

$$L = (P_{\text{pa}} - P_{\text{graines}}) / (r/R)$$

avec P_{pa} : quantité de P total dans les parties aériennes (mg P)

P_{graines} : quantité de P total dans les parties aériennes issue de la graine (mg P)

R : radioactivité dans les parties aériennes à la fin de l'expérience (kBq)

R : radioactivité introduite (kBq).

En pratique, une quantité connue (R) d'ions phosphates radioactifs en solution est soigneusement mélangée dans le sol de façon bien homogène. La radioactivité (r) et le P prélevé par la plante sont déterminés à la fin de l'expérience. L'utilisation de la méthode de dilution isotopique représente toutefois un grand défi dans les sols tropicaux fortement fixateurs, comme les sols ferrallitiques des hautes terres malgaches (Frossard et al., 2011). Malgré une richesse en P total, ces sols ne contiennent en effet qu'une faible fraction de P phytodisponible car les ions phosphates issus de la minéralisation du P organique sont rapidement adsorbés aux argiles et oxydes métalliques (Rakotoson et al., 2016). De nombreuses études évaluant la phytodisponibilité du P inorganique dans un système sol-plante ont été conduites en calculant la valeur L (Rakotoson et al., 2016; Rakotoson et al., 2014; Pypers et al., 2006). Mais comme les dispositifs expérimentaux diffèrent d'une étude à une autre, les valeurs L ne peuvent pas être comparées entre elles.

Nicholas and Viswanathan (1975) ont calculé, en marquant avec du ^{32}P le P immobilisé dans la biomasse bactérienne, les proportions de P immobilisé par le nématode bactérivore *Caenorhabditis briggsae* pour maintenir une homéostasie stœchiométrique stricte. Ils ont montré que *Caenorhabditis briggsae* immobilisait 19 à 36% du P qu'il assimile en ingérant les bactéries (*Escherichia coli*). Dropkin and King (1956) ont utilisé le traceur isotopique ^{32}P pour étudier la compétition entre les nématodes phytoparasites (*Heterodera schachtii*) et les plants de tomates sur l'accès au P à partir d'une solution nutritive. Ils ont montré que les tissus des plants infectés par les nématodes à galles contenaient moins de ^{32}P que les tissus des plantes saines. Toutefois, cette baisse n'est pas due à une compétition avec le nématode puisque la quantité de P total immobilisée par les nématodes n'excède pas 10% de la quantité de P total dans la plante.

III. Objectifs et hypothèses

L'objectif général de ce travail de thèse est de contribuer à la compréhension et au déterminisme des effets des nématodes bactérovores sur la disponibilité du N et du P dans la rhizosphère du riz en culture pluvial dans un sol ferrallitique tropical pauvre en nutriments. Cette étude comprend trois sous-objectifs distincts dont découlent des questions déclinées en hypothèses.

1. Premier sous-objectif

Le premier sous-objectif est d'identifier les flux de P impliqués dans la biodisponibilité de P dans du sol remanié (tamisé puis autoclavé) non restauré, en présence de nématodes bactérovores. Ce travail se base sur (i) une expérience en pots avec le radio-isotope ^{32}P comme traceur pour identifier les flux de P à l'interface sol-plante et (ii) une expérience en rhizoboxes pour suivre l'évolution de l'architecture racinaire en présence de *Acrobeloides* sp.

Question 1.1 : Quels sont les mécanismes impliqués dans les effets des interactions bactéries-bactérovores sur la disponibilité en P dans la rhizosphère du riz pluvial ?

Hypothèse H1.1 : Les nématodes bactérovores vont augmenter le prélèvement de P par le riz via une amélioration de la minéralisation du P organique.

Hypothèse H1.2 : L'amélioration de la disponibilité de P induite par la présence des nématodes bactérovores est négativement corrélée avec la capacité d'adsorption des phosphates par le sol.

Hypothèse H1.3 : La présence de nématodes bactérovores ne stimule pas le développement des racines latérales à cause de leur faible capacité à sélectionner les cellules bactériennes (Jousset et al., 2009).

2. Second sous-objectif

Le second sous-objectif est d'observer les effets de la présence de nématodes bactérovores (*Acrobeloides* sp.) sur la biodisponibilité des nutriments (N et P) dans du sol non perturbé échantillonné dans plusieurs parcelles agricoles sous différentes pratiques. Ce travail s'intéressera aux impacts des pratiques agricoles sur les effets des interactions bactéries-bactérovores sur la croissance et la nutrition du riz pluvial. Afin de rendre compte de l'effet

des pratiques sur l'activité mutualiste des nématodes, une méthode de mesure de cette activité mutualiste sur un sol non perturbé a été développée.

Question 2.1 : Quels sont les effets des nématodes bactériovores sur les fonctions de la plante dans un sol non perturbé ?

Question 2.2 : Quels sont les effets des pratiques agricoles sur l'activité mutualiste des nématodes bactériovores ?

Hypothèse H2.1 : La présence de nématodes bactériovores au sein de la rhizosphère de riz augmente la libération des éléments nutritifs (N et P) dans la solution du sol, et par voie de conséquence améliore la croissance et la nutrition de la plante.

Hypothèse H2.2 : L'activité mutualiste est maximale dans les systèmes agricoles où les pratiques limitent l'acidification du sol, la compaction du sol et l'appauvrissement en matière organique.

3. Troisième sous-objectif

Le troisième sous-objectif est de déterminer les effets de la variété sur les interactions plante-bactériovores. Les effets de la présence de nématodes bactériovores sur les fonctions (croissance et nutrition) du riz diffèrent d'une variété à une autre (Somasundaram et al., 2008). La capacité de la rhizosphère à attirer les nématodes bactériovores est alors un facteur de contrôle des interactions plante-bactériovores. Ce travail se base sur une expérience en microcosmes visant à étudier le pouvoir attractif de la rhizosphère de 8 variétés de riz pluvial sélectionnées par le CIRAD et le FOFIFA sur un nématode bactériovore (*Acrobeloides* sp.).

Question 3.1 : Les différentes variétés de riz pluvial sélectionnées par les agronomes attirent-elles les nématodes bactériovores avec la même intensité ?

Question 3.2 : Existe-t-il une relation entre la capacité des différentes variétés de riz pluvial à attirer les nématodes et les critères agronomiques qui ont fait l'objet de la sélection ?

Hypothèse H3.1 : L'attractivité des nématodes bactériovores varie selon la variété de riz.

Hypothèse H3.2 : L'attractivité des nématodes bactériovores est liée à la performance agronomique (tolérance ou résistance au striga et à la pyriculariose, altitude optimale de culture) des variétés de riz pluvial.

IV. Organisation du manuscrit

Après cette introduction générale, le manuscrit comprendra trois chapitres de résultats puis une conclusion générale. Les chapitres de résultats ont été rédigés en anglais sous la forme d'articles scientifiques. Chaque article est encadré par une courte présentation et une synthèse rédigées en français.

Chaque chapitre de résultats correspond à un sous-objectif (présentés ci-dessus). Le premier chapitre traite des mécanismes impliqués dans l'augmentation de la biodisponibilité des nutriments en présence d'*Acrobelloides* sp. Le second chapitre porte sur le développement d'une nouvelle méthode d'expérimentation basée sur des carottes de sol intact afin d'évaluer les effets d'*Acrobelloides* sp. sur les fonctions du riz sur sol ferrallitique et de son utilisation dans la région d'Itasy afin de rendre compte des effets des pratiques agricoles de riz pluvial. Le troisième chapitre étudie l'attractivité d'*Acrobelloides* sp. par la rhizosphère de différentes variétés de riz pluvial. L'ensemble des résultats est synthétisé et discuté au sein de la section "Conclusion générale et perspectives".

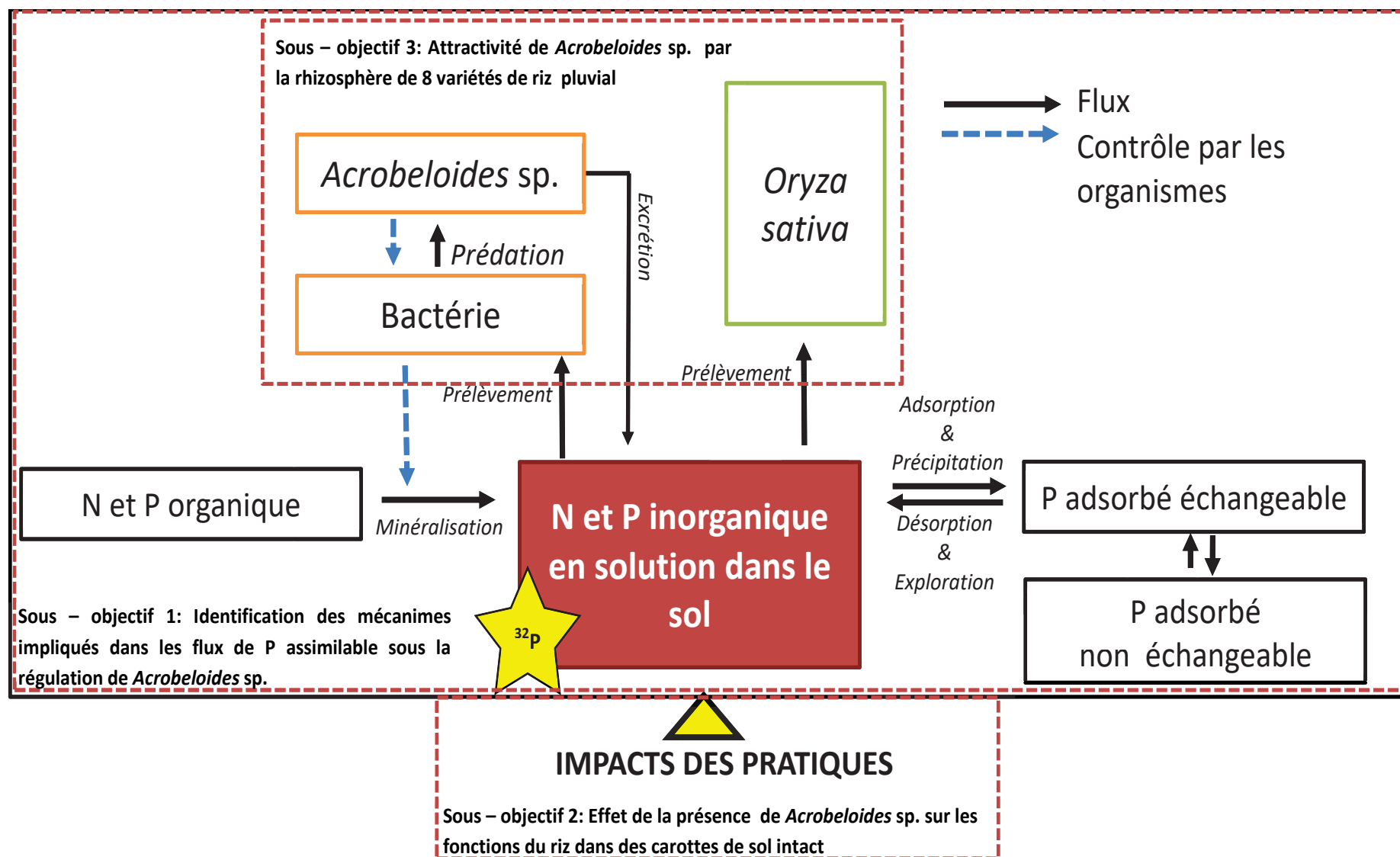


Figure 4: Schéma conceptuel de la thèse

CHAPITRE 1

Effets de *Acrobeloides* sp. sur les flux de phosphore et son acquisition
par le riz dans un sol ferrallitique à forte capacité de sorption



Dispositif: Expérience en pot avec le ^{32}P comme traceur isotopique (2016)

CHAPITRE 1. Effets de *Acrobeloides* sp. sur les flux de phosphore et son acquisition par le riz dans un sol ferrallitique à forte capacité de sorption

I. Présentation du chapitre 1

Les sols ferrallitiques des hautes terres malgaches, objet de notre étude, sont riches en phosphore (P) total mais relativement pauvres en P inorganique disponible pour la plante. L'utilisation d'engrais phosphatés à Madagascar est très limitée car peu disponibles et très chers pour les paysans. Dans ce contexte, il apparaît primordial d'intensifier les processus écologiques impliqués dans l'augmentation de la minéralisation du P organique du sol et la disponibilité du P pour la plante cultivée.

De nombreuses études ont montré que les organismes bactériovores (nématodes et protozoaires) jouent un rôle clé dans l'amélioration des fonctions de la plante (croissance et nutrition). Deux théories ont été émises pour expliquer les effets positifs des interactions bactéries-bactériovores sur la disponibilité des nutriments (N et P), la croissance de la plante et la nutrition de la plante. La première théorie repose sur la capacité des bactériovores à augmenter la disponibilité des nutriments pour la plante en augmentant le taux de renouvellement et l'activité de la communauté bactérienne et en excréant le surplus d'éléments nutritifs assimilés par les organismes bactériovores. Les mécanismes impliqués ont été conceptualisés au sein de la boucle microbienne du sol par Marianne Clarholm en 1985 (voie nutritionnelle via la minéralisation de la matière organique). La deuxième théorie repose sur la capacité des bactériovores à stimuler le développement de l'architecture racinaire via une modification de la composition de la communauté microbienne. Le développement de l'architecture racinaire, en particulier des racines latérales, permet une augmentation du volume de sol prospecté par les racines, en par voie de conséquence, la quantité de P inorganique adsorbée à la phase solide du sol. Il s'agit de la boucle microbienne auxiliaire formulée par l'équipe de Michael Bonkowski (voie hormonale via l'exploration racinaire). L'implication relative des différents mécanismes dans les flux de P à l'interface sol-plante est cependant encore mal connue, notamment dans les sols tropicaux. L'objectif de cette étude est d'identifier les mécanismes qui sont impliqués dans l'amélioration de la disponibilité de P pour le riz pluvial (*Oryza sativa*) dans du sol remanié

non restauré en présence du nématode bactérivore *Acrobeloides* sp. Pour ce faire nous avons mené deux expériences complémentaires:

-  une expérience en pots avec le radio-isotope ^{32}P comme traceur pour identifier les flux de P
-  une expérience en rhizobox pour suivre l'évolution de l'architecture racinaire en présence du nématode.

Pour l'expérience en pots avec le ^{32}P , nous avons utilisé du sol échantillonné sous bozaka (*Aristida* sp.) à Lazaina (Hautes terres, Madagascar) tamisé à 2 mm puis défauné par autoclavage. Pour tester si l'effet des nématodes bactérivores variait en fonction de la capacité de sorption du P du sol, nous avons comparé deux traitements testant l'apport ou non de "dolomie". Des tests préliminaires ont en effet montré que l'ajout de dolomie dans le sol permettait d'augmenter le pH du sol et de diminuer son taux de sorption du P. Deux traitements biologiques ont été comparés selon l'apport d'une population d'abondance connue de nématodes bactérivores: "+nématodes" et "-nématodes". Chaque pot contenait 500 g de sol marqué avec du ^{32}P , 100 g de sable stérile à sa surface, et 8 graines de riz pluvial (variété B22). Les pots ont été incubés en conditions contrôlées dans une serre pendant 28 jours. A la fin de l'expérience, le N total et le P total dans les tissus de la plante, ainsi que les teneurs en magnésium (Mg), potassium (K) et calcium (Ca) dans les parties aériennes ont été mesurés. La L-value de la partie aérienne, un indicateur du P disponible pour la plante, a également été déterminée.

Pour l'expérience en rhizobox nous avons utilisé le même sol que pour l'expérience en pot. 1‰ de dolomie a été mélangé de façon homogène au sol. Pour cette expérience nous avons rajouté de la dolomie dans tous les traitements puisque l'expérience en pots a montré des effets significatifs de la présence de *Acrobeloides* sp. uniquement dans les traitements "+dolomie". Deux traitements biologiques ont été comparés: "+nématodes" et "-nématodes". Chaque rhizobox contenait 300 g de sol et une graine de riz pluvial (variété B22). Les rhizobox ont ensuite été placés verticalement (avec une inclinaison de 30°) dans des bacs contenant de l'eau ultrapure de façon à ce que l'excès de papier filtre soit toujours immergé. Les rhizobox ont été incubés dans une serre pendant 28 jours. A la fin de l'expérience, les paramètres racinaires (biomasse, longueur, surface, diamètre, volume,

nombre d'apex, longueur pour chaque classe de diamètre) ainsi que le N total et le P total dans les tissus de la plante ont été mesurés.

II. Article 1: Analysing the effects of a bacterivore nematode on rice P uptake and root architecture in a high P-sorbing Ferrallitic soil using ³²P-labelling: testing the microbial loop and the auxiliary mechanisms

Mahafaka Patricia RANOARISOA^{2, 3}

Christian MOREL⁴

Andry ANDRIAMANANJARA¹

Christophe JOURDAN⁵

Laetitia BERNARD²

Thierry BECQUER²

Lilia RABEHARISOA¹

Koloina RAHAJAHARILAZA¹

Claude PLASSARD⁶

Eric BLANCHART²

Jean TRAP^{1,2}

Submitted for publication in "*Soil Biology & Biochemistry*"

Corresponding author: Jean Trap

IRD, UMR Eco&Sols, Laboratoire des Radio-Isotopes, BP 3383, 101 Antananarivo, Madagascar

Tél : +261 (0)32.47.126.74

Email : jean.trap@ird.fr

² Laboratoire des Radio-Isotopes, BP 3383, Route d'Andraisoro, 101 Antananarivo, Madagascar

³ Eco&Sols, IRD, INRA, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

⁴ INRA, UMR ISPA, Villenave d'Ornon, France

⁵ Eco&Sols, CIRAD, IRD, INRA, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

⁶ Eco&Sols, INRA, IRD, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

Abstract

Soil bacterivorous nematodes are key plant mutualists increasing nutrient availability for plants either through enhancing mineralization of organic compounds, i.e. the "*mineralization pathway*" either via increasing plant root branching and subsequently the volume of soil prospected by roots, i.e. the "*exploration pathway*". The effects of these organisms on plant nutrition growing in Ferralsols strongly depleted in nutrients, especially available inorganic phosphorus (P), are however poorly known as well as the pathways involved. Here, using *Oryza sativa* (Poaceae) and *Acrobeloides* sp. (Cephalobidae), we aimed at testing the "*mineralization*" and "*exploration*" hypotheses in an acid P-depleted Ferralsol from the highlands of Madagascar. For that purpose, we assessed the effect of nematode inoculation on (i) inorganic P flows from soil to plant using the ^{32}P labelling technique and (ii) plant root architecture using the rhizobox device. We showed that the ability of *Acrobeloides* sp. to enhance plant P uptake is strongly limited in Ferralsols due to the high precipitation and chemisorption of phosphates. However, when the soil pH was corrected with dolomite, *Acrobeloides* sp. increased plant P uptake through the "*mineralization*" pathway, rather than through an enhanced soil exploration by roots. Indeed, the L-value, an index of the amount of plant-available P, increased by 49% in the presence of nematodes suggesting a higher net P mineralization. In contrary, specific root length, tip number and root branching density did not increase in the presence of nematodes. From an ecological intensification perspective, and in order to promote agro-ecological intensification in tropical regions, our results suggest that amending the soil with rich-P organic matter and correcting soil pH with appropriate dolomite amount may constitute a suitable agronomic actionable lever to drive the mutualistic activity of the bacterivorous nematodes.

Keywords: ^{32}P -labelling, dolomite lime, *Acrobeloides* sp., upland rice, rhizobox technique, Madagascar

1. Introduction

Due to their high ability to sorb inorganic phosphorus (Pi) as insoluble Fe/Al-complexes, the Ferrallitic soils (Ferralsols) of tropical regions are strongly depleted in available Pi (Gérard, 2016; Ramaroson et al., 2017) with a content in the soil water solution around 0.01 mg.kg⁻¹ and below 5 mg.kg⁻¹ using anion exchange resin membranes (Gérard, 2016; Randriamanantsoa et al., 2015; Randriamanantsoa et al., 2013). Since plants are only able to take up P as free orthophosphate ions (HPO₄²⁻ or H₂PO₄⁻) from the soil solution (Bucher, 2007), P is therefore the main limiting factor in most tropical agroecosystems (Saidou et al., 2003).

Two main soil compartments can act as potential sources of available Pi for plants: organic P compounds and Pi sorbed on variable charge surfaces and on the soil solid phase, providing Pi by mineralization and desorption, respectively (Becquer et al., 2014; Gyaneshwar et al., 2002; Hinsinger, 2001). Despite a poorly-available Pi content, the Ferralsols contain both P sources in relatively high amounts (Randriamanantsoa et al., 2015). For instance, Randriamanantsoa et al. (2013) measured a total of 45 mg.kg⁻¹ organic P (27% of total P) and 125 mg.kg⁻¹ mineral P (73% of total P) in a Ferralsols under *Aristida* sp. savanna from Madagascar. Furthermore, both soil P pools increased in agricultural soils following practices such as manure, compost or ash supply (Buehler et al., 2002; Margenot et al., 2017; Rodrigues et al., 2016). In the attempt to improve agronomic yields in these tropical regions, it appears crucial to identify and intensify the ecological processes enhancing the supply of available P from these two P sources.

Soil bacterivores (mainly protozoa and nematodes) are key plant mutualists involved in soil nutrient cycling (Bonkowski et al., 2000; Ingham et al., 1985). Through their grazing activity, they can significantly enhance plant P uptake up to 30% (Trap et al., 2016). However, the mutualistic activity of nematodes remains variable and difficult to predict; it has been reported to be high (Cole et al. 1978), small (Anderson et al., 1978; Darbyshire et al., 1994; Djigal et al., 2004b), or sometimes null (Griffiths, 1986).

In the positive cases, different mechanisms have been proposed (Bonkowski and Clarholm, 2012; Clarholm, 1985b). The mineralization of organic P by microbial exoenzymes (Hayes et al., 2000; Mullaney and Ullah, 2003; Richardson et al., 2000) can be reinforced in the

presence of microbial grazers (Irshad et al., 2012), increasing P availability for plants through the “*soil microbial loop*” (SML) hypothesis (Clarholm, 1985a), *i.e.* the “*mineralization pathway*”. Also, bacterivorous nematodes are able to release high amounts of inorganic P incorporated from bacteria in the medium as shown by Nicholas and Viswanathan (1975).

In parallel, protozoa have been shown to enhance plant nutrient uptake and growth by increasing root branching (Alphei et al., 1996; Jentschke et al., 1995). Bonkowski and co-workers formulated the “*auxiliary microbial loop*” (AML) hypothesis (Bonkowski and Clarholm, 2012) based on the ability of these microorganisms to stimulate lateral root growth through active selection of rhizospheric bacterial cells, inducing shifts in the soil microbial community composition under grazing (Bonkowski, 2004; Bonkowski and Brandt, 2002; Kreuzer et al., 2006; Krome et al., 2009b). By increasing the volume of soil prospected by roots following the stimulation of lateral root growth, protozoa may thus increase plant P uptake from the adsorbed-Pi pool, *i.e.* the “*exploration pathway*”.

The “*mineralization*” and “*exploration*” pathways are not exclusive and both provide complementary mechanisms by which bacterivores may increase plant P (and other nutrients) uptake (Trap et al., 2016). Bacterivorous nematodes have been shown to induce the “*mineralization*” pathway (Irshad et al., 2012; Irshad et al., 2011) and analogous root patterns from those induced by protozoa have been observed in their presence (Cheng et al., 2011; Jiang et al., 2012), supposing that these animals may also induce the same “*exploration*” effects that protists do. However, it is still unknown whether bacterivorous nematodes impact plant P nutrition in strong P-depleted soils from the tropics, and if so, what pathways are involved.

To assess P flows from soil to plant and test the “*mineralization*” pathway, the L-value technique based on $^{32}/^{33}\text{P}$ isotopes exchange is very relevant. This technique measures the amount of plant-available P from soil according to the specific activity (SA) of a plant grown on a soil labelled with $^{32}/^{33}\text{PO}_4$ ions (Frossard et al., 1994; Larsen, 1952). In contrary to chemical extraction methods such as Olsen P (Olsen and Watanabe 1957), the L-value is directly related to the amount of P taken up by the plant. To our knowledge, although the L-value technique is widely used in soil-plant studies (Bolan et al., 1984; Brookes, 1982; Frossard et al., 2011; Pypers et al., 2006; Rakotoson et al., 2014), no investigation has been

conducted to assess the flow of P driven by bacterial grazers using this isotopic tool. Concerning the “*exploration*” pathway, the rhizobox technique appears appropriate to monitor and analyse the root architecture and root dynamics under laboratory conditions without disturbing plant growth (Neumann et al., 2009).

Here, using *Oryza sativa* (Poaceae) and *Acrobeloides* sp. (Cephalobidae) as plant and bacterivorous nematode models, we aimed at testing the “*mineralization*” and “*exploration*” hypotheses in a P-depleted Ferralsol from the highlands of Madagascar using both the L-value and rhizobox techniques. On the basis of the current literature, we hypothesize that bacterivorous nematodes increase rice P uptake in Ferralsol by increasing gross organic P mineralization (the “*mineralization*” pathway). In other words, the L-value may thus increase in the presence of nematodes indicating the mineralization pathway. This constituted our first hypothesis (H1). We also expected that the enhanced plant P availability induced by nematodes decreases with increasing soil Pi sorption capacity due to rapid phosphate sorption by soil. This was our second hypothesis (H2). Lastly, we supposed that bacterivorous nematodes do not alter lateral root branching (the “*exploration*” pathway) because of a low bacterial cell selection ability (Jousset et al., 2009). This was our third and last hypothesis (H3). For testing these hypotheses, we conducted two greenhouse microcosm experiments; a pot experiment with ^{32}P -labelled soil to determine the L-value of rice and a rhizobox experiment where we characterized rice root architecture. In both experiments, we manipulated the presence of *Acrobeloides* individuals in a Ferralsol from the highlands of Madagascar.

2. Materials and methods

2.1 Soil sampling

We sampled the first 10 cm of a Ferralsol soil under natural savanna from the experimental station of the "Laboratoire des Radio-Isotopes" in Lazaina (18°46'55 59° S, 47°32'46 3°N, 1274 m altitude, Madagascar) in October 2016. The site had been under weedy fallow vegetation dominated by *Aristida* sp. grasses for at least 10 years. The soil had a sandy-clay texture, a pH of 5.5, total organic C content 20.8 g.kg⁻¹ total N content of 1.3 g.kg⁻¹, a C:N of 16, a total P content of 380 mg.kg⁻¹, Olsen P content of 7.12 mg.kg⁻¹, exchangeable K, Ca and

Mg contents of 30.7, 120.7 and 28.3 mg.kg⁻¹ , respectively. The CEC (cationic exchange capacity) was 1.34 cmol⁺.kg⁻¹ and the water-holding capacity (WHC) was 0.49 g.g⁻¹ dry soil.

2.2 Soil preparation

2.2.1 Soil defaunation

The soil was air-dried until constant weight (7 days) and sieved at 2 mm. The air-dried soil was then re-humified at 50% of its water-holding capacity and autoclaved during 10 minutes at 100°C in order to kill all nematodes. Autoclaved soil was air-dried until constant weight (7 days) and sieved again at 2 mm. The absence of nematodes was checked after extraction using the Seinhorst Erlenmeyer method (Seinhorst 1962) followed by active filtering through fine cellulose wadding paper during 48 h following the Baermann funnel method (Southey 1986) (Photography 1.1). The autoclaving killed all nematodes. The autoclaved soil was stored in a closed bucket at room temperature before use.



Photography 1.1: Active filtering of nematodes through fine cellulose wadding paper

2.2.2 Mineral fertilizations and dolomite liming

A mineral solution (solution A) was made containing, per litre, 65.04 g NH₄Cl, 62.32 g KCl, 37.46 g MgSO₄ 7H₂O, 55.86 g CaCl₂, 10.34 g KH₂PO₄ and 4 ml of a micro-nutrient solution in

sterile deionized water (Morizet and Mingeau, 1976). This solution A was autoclaved at 120°C during 20 minutes before use. The micro-nutrient solution contains per litre 125 g H_3BO_3 , 67.5 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 25 mg KI, 500 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 650 mg $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 100 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 25 mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Irshad et al., 2011; Morizet and Mingeau, 1976). An appropriate volume of solution A was poured in the soil in order to provide 28.2 mg-N and 3.4 mg-P per kg dry soil. We added the solution A through mixing by hand during 15 minutes in large plastic containers for homogeneous fertilization.

In order to test the second hypothesis (H2), we attempted to limit phosphate sorption on soil by adding dolomite lime. We first split the soil into two portions. The first portion was stored at room temperature while the second portion received dolomite powder $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ (Louis Dreyfus Commodities Madagascar, Antananarivo). The composition of the dolomite lime was 29% of CaO, 20% of MgO with a particle size ranging from 0.01 to 2 mm. Preliminary tests showed that providing 1 mg.kg^{-1} of dolomite increased the soil pH by 0.77 unit (from 5.59 to 6.36) and increased the “remaining Pi” from 25 to 29.8 mg-P.kg^{-1} (Supporting Information 1.1). The “remaining Pi” was measured by adding 50 ml of a Pi solution (60 mg-P.L^{-1}) into 5 g of a soil without shaking in the dark. After 16 h of contact, the excess of Pi in the solution was quantified. This method can be used as a proxy of Pi sorption rate. According to these preliminary tests, we thus provided 1 mg.kg^{-1} of dolomite lime in the second portion by gently mixing the soil and the dolomite powder by hand during 15 minutes until homogeneous spreading. The first aliquot (without dolomite) was also mixed in the same condition.

2.2.3 Bacterial fertilization

Because fumigation is also known to alter the microbial biomass, a bacterial inoculation was made from fresh soil using a two steps protocol. In the first step, intact fresh soil and sterile water (1:4 mass ratio) were placed in a 1L glass beaker and shaken for 5 min using a large spatula to get a soil suspension. Then, the suspension was filtered at 2 μm to avoid nematode contamination and to limit fungi development. 200 μl of the filtered soil suspension was poured into 50 ml sterile TSB (Tryptic Soy Broth, 5 g.L^{-1}) in a sterile 250 ml glass flask and incubated one night at 28°C with constant shaking (150 rpm). The suspension was centrifuged at 2268 rcf during 10 minutes and the bacterial pellet was washed twice

with sterile deionized water. The bacterial pellet was then re-suspended in 5 ml sterile deionized water (bacterial suspension #1).

In a second step, a bacterial medium was made with 658 μl of the solution A, 50 μl of the solution B (vitamin solution), 200 μl of the micro-nutrient solution, 350 mg of glucose and 50 μl of cycloheximide (10 mg ml^{-1}) in 50 ml sterile deionized water. The solution B contained 5 g L^{-1} panthotenate, 20 g.L^{-1} inositol, 2 g.L^{-1} nicotinic acid, 250 mg.L^{-1} pyridoxal hydrochloride, 250 mg.L^{-1} thiamine hydrochloride, 10 mg.L^{-1} of biotine. This solution B was sterilized by filtration at 0.2 μm before use. The pH of the bacterial medium was adjusted at 5.8 by adding drops of NaOH 1N. 50 μL of the bacterial suspension #1 was added in 50 ml of the bacteria medium in a 250 ml sterile glass flask. The glass flasks were then incubated in the dark at room temperature for 4 days with constant shaking (150 rpm). A preliminary test (data not shown) revealed that 4 days were enough to observe 91% and 96% exhaustion of ammonium and phosphates, respectively, from the bacterial medium. Microorganisms were then centrifuged at 2268 rcf during 10 minutes and the bacterial pellet was washed twice in sterile deionized water to eliminate any remaining mineral N and P. Bacteria were then re-suspended in sterile deionized water (microbial suspension #2). The absence of fungal hyphae was checked under the microscope. All solutions, including the deionized water used to wash the bacterial pellet, were analysed for total N and P in order to calculate the actual amount of N and P at the beginning of bacterial growth and immobilized by the bacterial community. An appropriate volume of the bacteria suspension was then poured into the soil in order to provide 28.2 mgN and 3.4 mgP per kg dry soil as bacterial biomass N and P. This amount is equivalent to the microbial biomass N and P found in the native soil. The soil was gently mixed by hand during 15 minutes for homogeneous inoculation.

2.3 Bacterial-feeding nematodes

Monoxenic populations of *Acrobeloides* sp. on *Escherichia coli* were obtained from Lazaina and maintained at 25°C in the laboratory following the procedure described in Irshad et al. (2011). Before use in the pot experiment, nematodes were removed from the Petri dishes by washing the surface with sterile water and transferred on a fine cellulose wadding paper placed in a Petri dish with water during 48 h (Southey, 1986). Living nematodes moved from the filter paper into the water without agar pollution. The number of living nematodes was

counted and the nematode concentration in the suspension was adjusted in order to inoculate 10 individuals per dry soil g.

2.4 Shoot L-value determination using the ^{32}P -labelled technique

2.4.1 Experimental design

Two dolomite treatments with 5 replicates were considered: (1) the control with a native pH at 5.5 (-Dom) and (2) the dolomite treatment with pH of 6.3 (+Dom). Two biological treatments were considered: (1) the control without nematode (-Nem) and (2) the treatment with nematodes (+Nem). We also set up five supplementary pots as the +Nem treatment condition but without ^{32}P (see below) in order to assess the nematode survival rate.

2.4.2 Microcosms set up and ^{32}P labelling

The entire amount of the autoclaved soil required for the experiment was labelled with a ^{32}P radionuclide source delivered in HCl 1M (P102616H/1, PerkinElmer®, Belgium) and diluted in water with an activity rate of 0.1 mCi.kg^{-1} dry soil. The volume of ^{32}P , corresponding to 86 ml.kg^{-1} , was high enough to achieve a uniform labelling. During labelling, the soil was gently mixed by hand during 15 minutes in a large plastic container. The ^{32}P -labeled soil was then brought to 80% of the WHC by adding nanopure water. The soil was mixed again during 15 minutes. The equivalent of 500 g of ^{32}P -labelled dry soil was introduced in 1L plastic pots previously pierced at the bottom to avoid water accumulation. 100 g of sterile and acid-wash sand was provided at the top on the soil to reduce radioactive dust suspension. Eight seeds of rice (cultivar B22) were planted in each pot.

The pots were placed in the confined greenhouse for radioactive P handling in the "Laboratoire des Radio-Isotopes" (Antananarivo, Madagascar) (Photography 1.2). The soil moisture content was maintained at 80% WHC twice a day during all the experiment by weighing the pots. The climatic condition within the greenhouse was monitored with a climatic station (WatchDog Series Weather Stations, software SpecWare 9 Pro Spectrum Technologies).



Photography 1.2: Microcosm set up in the greenhouse (left) and a microcosm (right)

2.4.3 Measurements at the end of the experiment

After 28 days of growth, plants were gently removed from the pots. The roots, the remaining seeds and the aerial parts of plants were separated, washed and dried at 65°C during 48 h and finally weighted. Total P content in shoots, roots and seeds was determined after crushing, overheated at 550°C for 5 h and digestion of plant tissues (subsamples of 1 g) with nitric acid 65%. P concentration was determined in the digest solutions using Molybdenum blue method developed by Murphy and Riley (Murphy and Riley, 1962). The absorbance was measured at 740 nm. Total C and N contents in plant were determined by CHNS/O elemental microanalyser (Flash 2000 Series, CHNS/O 122 Analysers Thermo Scientific, IRCOF, France). Standard controls (wheat tissues) with known amount of total C, N and P were used to check assay quality. We analysed total Mg, K and Ca concentrations in the digest solutions of the shoot tissues using Atomic Absorption Spectroscopy (Thermo Scientific iCE 3000 SERIES, China).

We also determined nematodes survival rates in supplementary unlabelled pots (n=5) incubated in the same conditions. For that, nematodes were extracted from a subsample of soil (100 g) using the method described above.

2.4.4 Measurements of the shoot L-value

The shoot digests were analysed for ^{32}P radioactivity with a liquid scintillation analyzer (Tri-Carb 2800 TR, PerkinElmer) after addition of 2.5 mL of liquid scintillation cocktail (Ultima Gold XR). Internal plant material standard was used in the digestion as quality control. The analyses have been done in accordance with the safety rules regarding the use of radioactive P in the "Laboratoire des Radio-Isotopes" (Becquer et al., 2017). The ^{32}P activities in the aqueous labelling solutions were measured at the same time as plant digests and all radioactivity concentrations were radioactive decay corrected. Specific activity (SA) of shoot P was calculated from the ratio between r/R (remaining radioactivity in harvested shoots/ introduced radioactivity) and shoot P uptake. Shoot P uptake from soil was calculated by subtracting total final shoot P amount to shoot P originated from seed. The total amount of P used by plants from seeds was calculated by subtracting final to initial seed P. The L-value, which is a proxy of the amount of plant-available P, was estimated using:

$$(1) L = (P_{\text{shoot}} - P_{\text{seed}}) / (r/R)$$

with P_{shoot} : the total amount of P in the shoot (mg P); P_{seed} : the amount of P in shoot derived from the seed (mg P); r : the total radioactivity ^{32}P in harvested shoot (kBq), R : the introduced radioactivity (kBq).

2.5 Root architecture characterization using the rhizobox technique

2.5.1 The rhizobox device and experimental design

The rhizobox device consisted in a PVC box ($40 \times 20 \times 1$ cm) equipped with transparent root observation windows and filled with 300 g of soil (equivalent to 10 mm thickness) (Figure 1.1). We used the same fertilized soil that from the ^{32}P -labelled experiment. The autoclaved soil received an appropriate volume of the solution A to provide 28.2 mg-N and 3.4 mg-P per kg dry soil and 1‰ of dolomite which induced an increase of soil pH by 1 unit (see section 2.2.2). Because the first ^{32}P labelling experiment showed significant effects of nematodes only in the soil with dolomite, we did not use the soil without dolomite for this second experiment. A filter paper (20×45 cm) was placed below the soil layer, on the underside of the rhizobox and protrudes by 5 cm downwards. One seed of rice (cultivar B22) was placed in the soil on the top of the rhizobox. The thick transparent plastic plate (observation

window) was pressed on the soil layer and fixed with clamps (Photography 1.3). The rhizoboxes were randomly placed in large plastic containers with an angle of approximately 30 degrees from vertical position to allow the roots to grow on the transparent plate. The plastic containers were filled with a low volume of nanopure water so that only the excess of paper filter was immersed. The filter paper allowed soil humidification by capillarity. The containers with the rhizoboxes were incubated in the greenhouse for 28 days. Plants were exposed to light but the roots and soil of the rhizoboxes were kept in dark conditions with aluminium foils.

Two treatments were considered: (1) the control without nematodes (-Nem) and (2) the treatment with nematodes (+Nem). With 6 replicates, the total number of rhizoboxes was thus twelve.



Photography 1.3: The rhizobox device

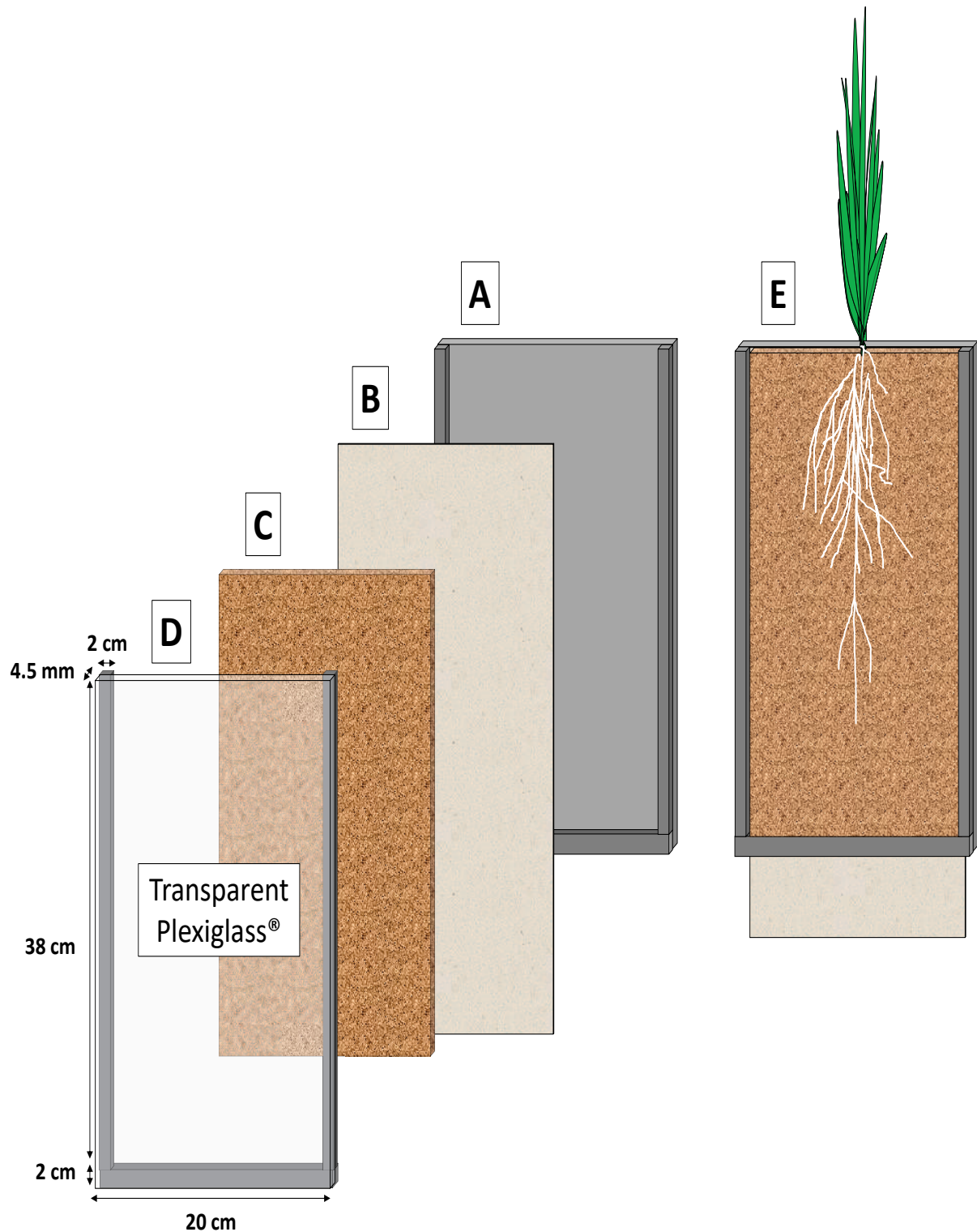
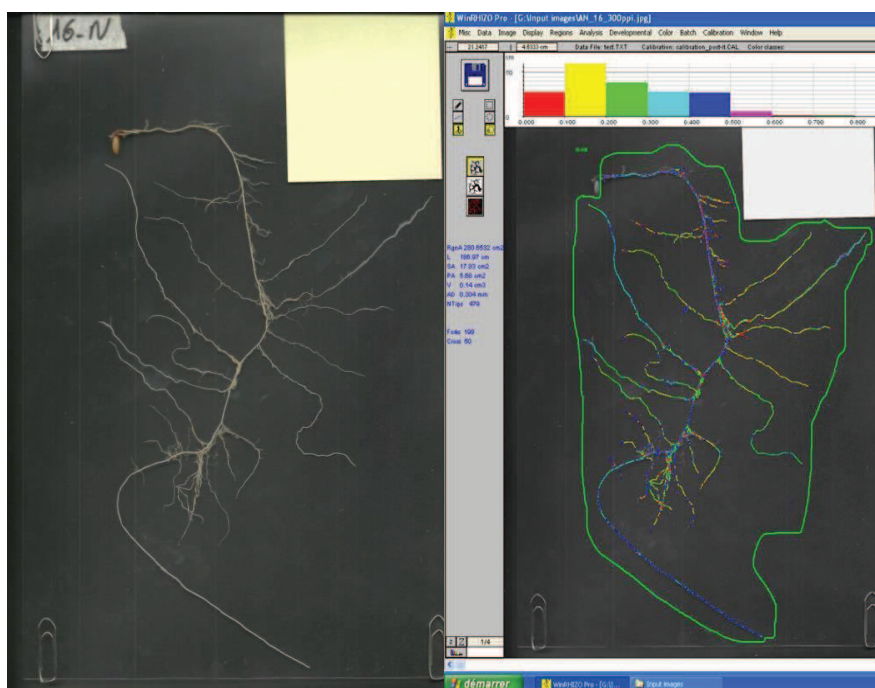


Figure 1.1: The rhizobox design included (A) the back transparent PVC plate where (B) the filter paper is deposited and then filed with (C) the 1 cm-thick soil layer. The box is then closed with (D) PVC tabs thanks to a transparent PVC plate identical to the back one. (E) The final box dimensions are 40 cm high, 20 cm wide and 3 cm deep.

2.5.2 Root measurements

After 28 days of growth, a grid with a mesh of 1 cm² was placed on the transparent plate of the rhizobox. We counted the total number of 1 cm² cases below which roots were present (filled cases) or absent (empty cases). The total number of filled cases was used as a proxy of the area of the soil explored by roots ("area exploration"). We then carefully removed the roots from the soil and the root system was gently washed and scanned (300 ppi). The root images were processed and analysed using WinRHIZO Root Imaging software (Regent Inc., Canada) (Photography 1.4). We obtained the following root parameters: biomass, length, area, mean diameter, volume, number of tips and the length for each root diameter category (from 0 to 1.5 mm). We then calculated the specific root length (SRL, root length divided by root biomass), the root branching density (number of lateral root tips divided by total root length), and the specific area exploration (root area exploration divided by root biomass).



Photography 1.4: Image of the root system (left) and scan for the root system analysis with WinRHizo® (right)

2.5.3 Plant nutrient content measurements

The shoot and root were dried at 65°C during 48 h, weighted and total N and total P in plant tissues were analysed as described previously. We also determined nematode survival rates.

2.6 Statistical analyses

All tests were done with the R software (Team 2016). Statistical significance was set at $P < 0.05$. Means and standard deviation (SD) was computed per treatments for all variables.

2.6.1 The ^{32}P -labelled soil experiment

We performed two-way ANOVA models with ‘dolomite’ (presence/absence) and “nematode” (presence/absence) treatments as factors for plant variables using the “aov” functions from “ade4” package (by default, it implement a sequential sum of squares). The normality of the data and the homogeneity of variance were checked using Shapiro and Levene’s tests, respectively. When there was no significant interaction effect, because more powerful in this case, type II sum of squares (SS) was chosen with the function “Anova” from the package “car” in order to improve the initial model. If interaction was present, type III SS was used with the same function. The significance of the interactions and main effects were provided by these full-improved models. The type of SS used in the improved models was indicated in the results section. We lastly detected the significant differences among levels within factors using the Tukey HSD post hoc test (function and package “TukeyC”).

2.6.2 The rhizobox experiment

A Principal Component Analysis (PCA) was performed on the root parameter data set (12 rows, 10 columns) with the function “dudi.pca” from the “ade4” package. We tested the number of axes in the PCA with the procedure “testdim.pca” from the same package. This function is based on the computation of the RV coefficient. We then performed a between-class analysis with the ‘nematode’ treatment (presence/absence) as factor. The significance of the clustering was tested with a permutation test from the “randtest” function. Shoot biomass, shoot:root ratio, total N and P in plant were projected as supplementary columns without prior modification onto the PCA in order to identify correlation between root architecture and plant nutrient uptake and growth. The effect of bacterivore nematodes was then tested for each variable using Student t tests. The normality of the data was checked using Shapiro test.

3. Results

3.1 ³²P labelled soil experiment

After 28 days of growth, we did not observe any nematodes in the control (-Nem) suggesting that no contamination occurs during the incubation. In the "+Nem" treatment, an average of 20 individuals per g dry soil was found, irrespective of the presence of dolomite.

We observed the highest rice shoot, root and total biomass values when both dolomite and nematodes were present (Table 1.1). The two-way ANOVA showed significant interaction between these two factors for these plant traits (*P*-value ranged from 0.011 to 0.040). Unexpectedly, the presence of dolomite tended to reduce total rice biomass in the absence of the nematodes, from 978 mg to 836 mg per pot. The inoculation of nematodes exhibited similar negative effects in absence of dolomite (but not significant). The shoot:root ratio was not affected by the factors (mean 1.2).

The plant P traits were poorly affected by the treatments (Table 1.1). However, we still observed higher P amount in shoot in the control or when both dolomite and nematodes were added. According to the ANOVA and Student t tests, the inoculation of nematodes on shoot P amount was (positive) significant only in the presence of dolomite. Again, the presence of nematodes in the absence of dolomite tended to reduce shoot P amount, but also root P amount (but not significant). The shoot L-value was significantly affected by the interaction of the factors. The highest values (mean 15.8 mg-P.kg⁻¹) were observed in the presence of dolomite and nematodes (corresponding to 49% more than the control). Both dolomite and nematodes alone tended to decrease the shoot L-value.

Concerning the other nutrients, we observed higher shoot N and Mg amounts and shoot N:P ratio when dolomite and nematodes were added together (Table 1.1). But for N, the variance of this macronutrient in shoot was mainly explained by the presence of dolomite (*p*-value 0.002). K, Ca and Mg exhibited similar behaviour: they increased when both dolomite and nematodes were added (*i.e.*, significant interaction according to the two-way ANOVA). Lastly, the shoot Ca:Mg and K:(Ca+Mg) ratios were mostly affected by the addition of dolomite.

Table 1.1: Mean (SD) and two-way ANOVA statistics for plant variables measured after 28 days of growth in presence/absence of dolomite (-Dol; +Dol) and *Acrobeloides* sp. (-Nem; +Nem) in a Ferralsol from Madagascar

Variables	Unit	Treatments												Two-way ANOVA		
		-Dol						+Dol						Factors		
		-Nem			+Nem			-Nem			+Nem			Dol	Nem	Interaction
Shoot biomass	mg.pot ⁻¹	537	(65)	a	481	(54)	a	466	(41)	b	555	(27)	a	0.148	0.059	0.011*
Root biomass	mg.pot ⁻¹	441	(71)	a	396	(51)	a	370	(67)	b	464	(45)	a	0.115	0.335	0.040*
Shoot : root ratio	ratio	1.2	(0.2)	a	1.2	(0.1)	a	1.3	(0.2)	a	1.2	(0.1)	a	0.880	0.532	0.751
Total biomass	mg.pot ⁻¹	978	(118)	a	877	(100)	a	836	(103)	b	1020	(47)	a	0.055	0.182	0.011*
Shoot P amount	mg.pot ⁻¹	0.37	(0.05)	a	0.24	(0.08)	a	0.30	(0.03)	b	0.37	(0.03)	a	0.379	0.463	0.043*
Root P amount	mg.pot ⁻¹	0.24	(0.05)	a	0.19	(0.05)	a	0.23	(0.04)	a	0.22	(0.03)	a	0.607	0.124	0.231
Total P amount	mg.pot ⁻¹	0.61	(0.09)	a	0.57	(0.13)	a	0.55	(0.06)	a	0.60	(0.03)	a	0.935	0.468	0.061
Shoot L-value	mg-P.kg ⁻¹	13.6	(1.9)	a	12.4	(1.6)	a	10.6	(1.3)	b	15.8	(0.7)	a	0.846	0.009**	0.001***
Shoot N amount	mg.pot ⁻¹	15.1	(2.36)	a	13.8	(1.24)	a	15.0	(0.88)	a	17.5	(1.36)	a	0.002**	0.868	0.359
Shoot K amount	mg.pot ⁻¹	19.1	(2.64)	a	17.6	(3.15)	a	14.6	(2.89)	b	18.1	(1.15)	a	0.104	0.340	0.048*
Shoot Ca amount	mg.pot ⁻¹	1.8	(0.55)	a	1.4	(0.22)	a	1.5	(0.12)	b	1.8	(0.14)	a	0.922	0.753	0.046*
Shoot Mg amount	mg.pot ⁻¹	1.2	(0.25)	a	1.1	(0.22)	a	1.4	(0.19)	b	1.6	(0.07)	a	0.001**	0.491	0.049*
Shoot N:P ratio	ratio	38.8	(6.7)	a	41.5	(9.5)	a	54.6	(9.5)	a	43.1	(4.3)	b	0.047*	0.320	0.042*
Shoot Ca:Mg ratio	ratio	1.43	(0.17)	a	1.30	(0.11)	a	1.10	(0.11)	a	1.08	(0.09)	a	0.000***	0.309	0.423
Shoot K:(Ca+Mg) ratio	ratio	6.49	(1.16)	a	6.89	(0.60)	a	4.98	(0.43)	a	5.33	(0.37)	a	0.000***	0.284	0.852

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Letters (a and b) indicates significant differences between "-Nem" and "+Nem" treatments within dolomites treatments according to the Student t test at $p < 0.05$.

3.2 Rhizobox experiment

The final number of nematodes was 9.9 individuals per dry soil in the nematode treatment. We did not any find nematodes in the control.

The first two axes of the Principal Component Analysis (PCA) performed on the root parameters data set explained more than 77 % of the total inertia, but only the first axis was significant at 5% (Figure 1.2.A). The first axis of the PCA (relative inertia = 51.4%) opposed the plants that grew in the presence of nematodes (negative coordinates) against plants growing without nematodes (positive coordinates) (Figure 1.2.A). The Monte-Carlo test performed on the between-class analysis revealed a highly significant clustering ($P < 0.005$). The correlations circle showed opposition between root diameter, volume, area and biomass (negative scores) against root branching (positive scores) on the first axis (Figure 1.2.B).

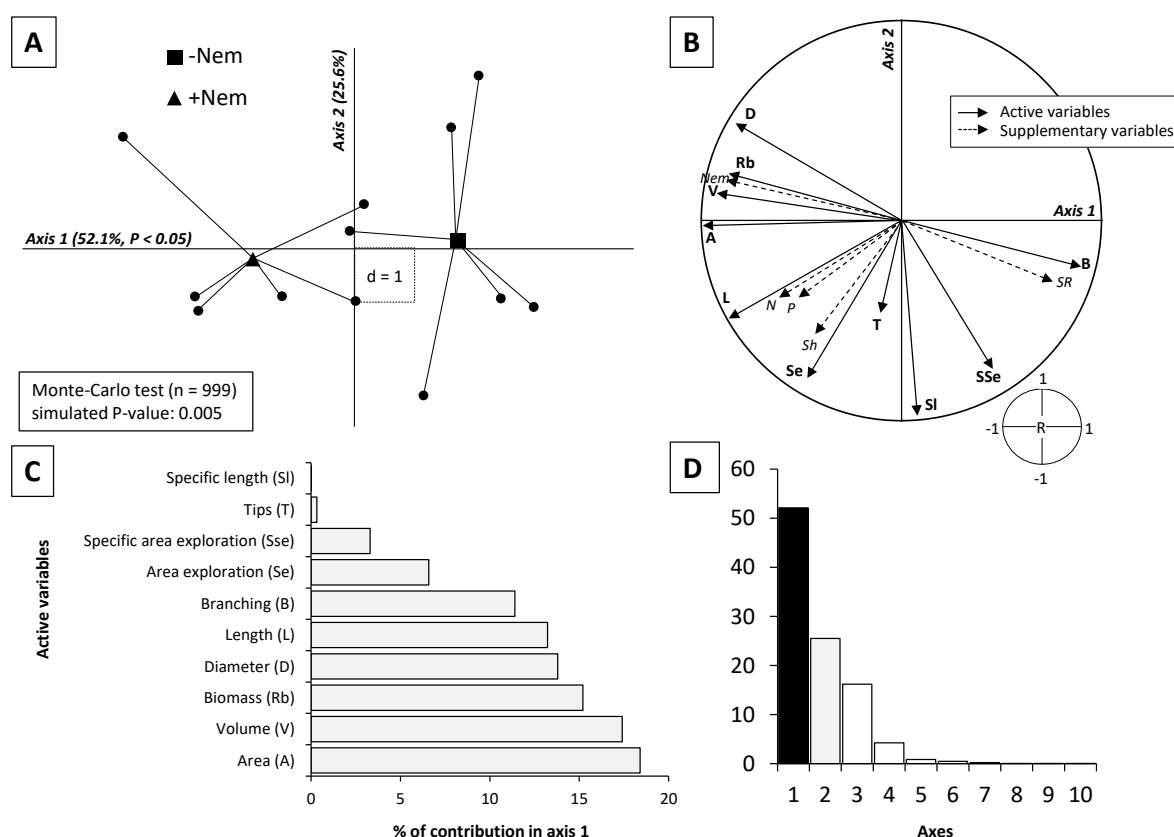


Figure 1.2: Principal Component Analysis performed on root parameters. (A) Nematode treatment ordination (black square and triangle as barycentres) on the individual (black circle) factorial map. **(B)** Circle of correlations with active (bold) and supplementary (italic) variables. **(C)** Contribution (%) of active variables in axis 1. **(D)** Eigenvalue diagram. 'nem: final number of nematodes; N: total N amount in plant; P: total P amount in plant; Sh : final shoot biomass; SR: final shoot:root ratio.

Root volume and root area were the two main root parameters exhibiting the highest contributions in the construction of the first axis. Indeed, the presence of nematodes significantly increased root length and root area from 150 to 250 cm and from 13.4 to 30 cm², respectively (Figure 1.3). However, the ratio of root tips to root biomass, the density of root branching, decreased in the presence of nematodes from 3.3 to 2.5 tips.cm⁻¹. We did not observe significant effect of nematodes on specific length, the total number of tips and on the total surface of soil explored by roots expressed per root biomass unit (i.e. specific exploration) (Figure 1.3). The smallest (diameter inferior to 0.2 mm) and biggest (diameter superior to 0.8 mm) roots were not significantly impacted by the presence of nematodes (Figure 1.4). However, *Acrobeloides* sp. significantly increased the length of roots with a diameter ranging between 0.2 and 0.8 mm. The distribution of the number of tips (log-transformed) according to root length size classes in the "-Nem" treatment was not significantly different from the "+Nem" treatment (Figure 1.5). The slopes were almost the same, i.e. -4.64 for "-Nem" and -3.92 for "+Nem".

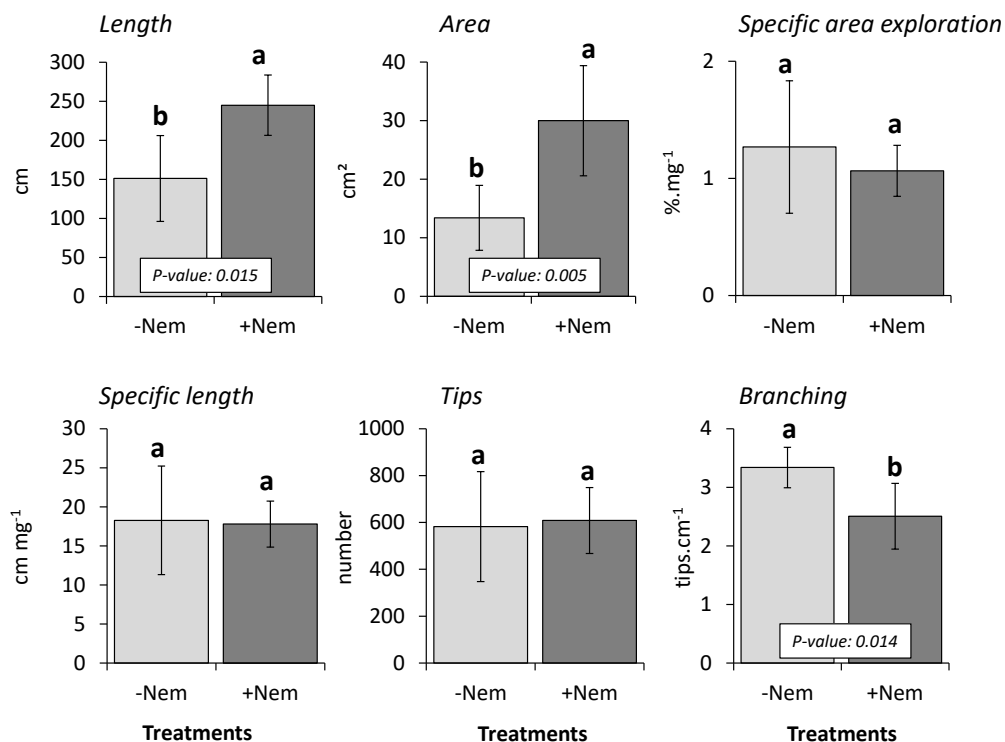


Figure 1.3: Effect of *Acrobeloides* sp. on rice root parameters after 28 days of growth in a Ferralsol. "-Nem" and "+Nem" indicates the absence or presence of bacterivorous nematodes, respectively. Letters (a and b) refers to significant differences according to student t test at $p < 0.05$.

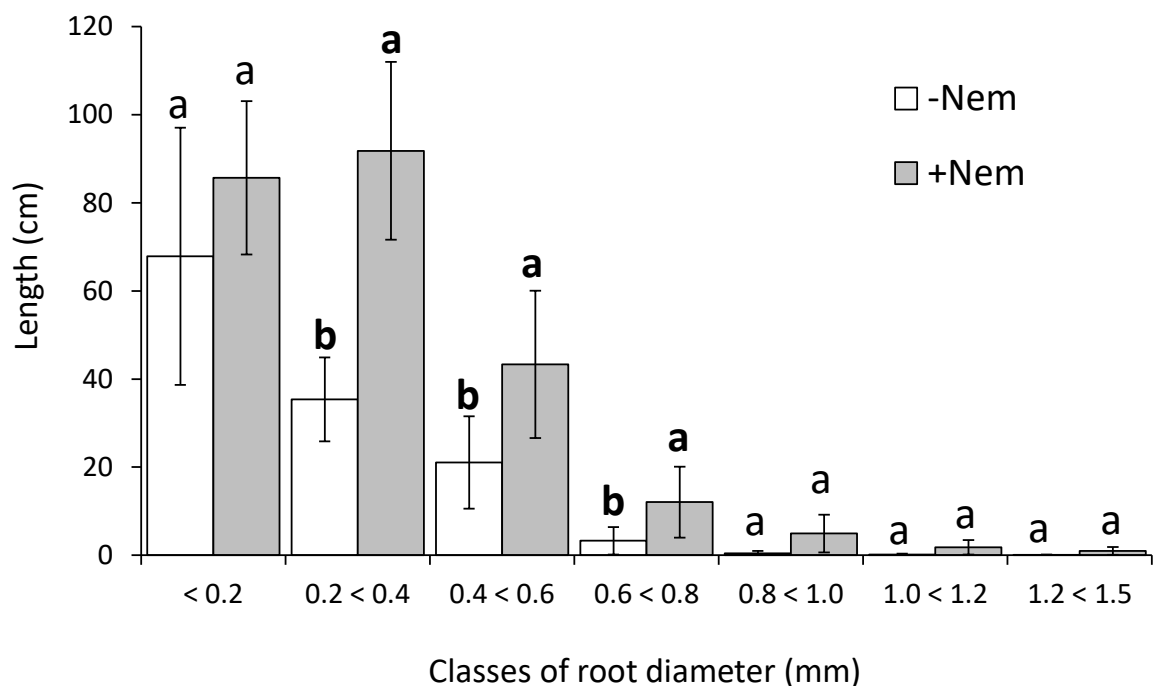


Figure 1.4: Effect of *Acrobeloides* sp. on rice root length after 28 days of growth in a Ferralsol. "-Nem" and "+Nem" indicates the absence or presence of bacterivorous nematodes, respectively. Letters (a and b) refers to significant differences according to Student t test at $p < 0.05$.

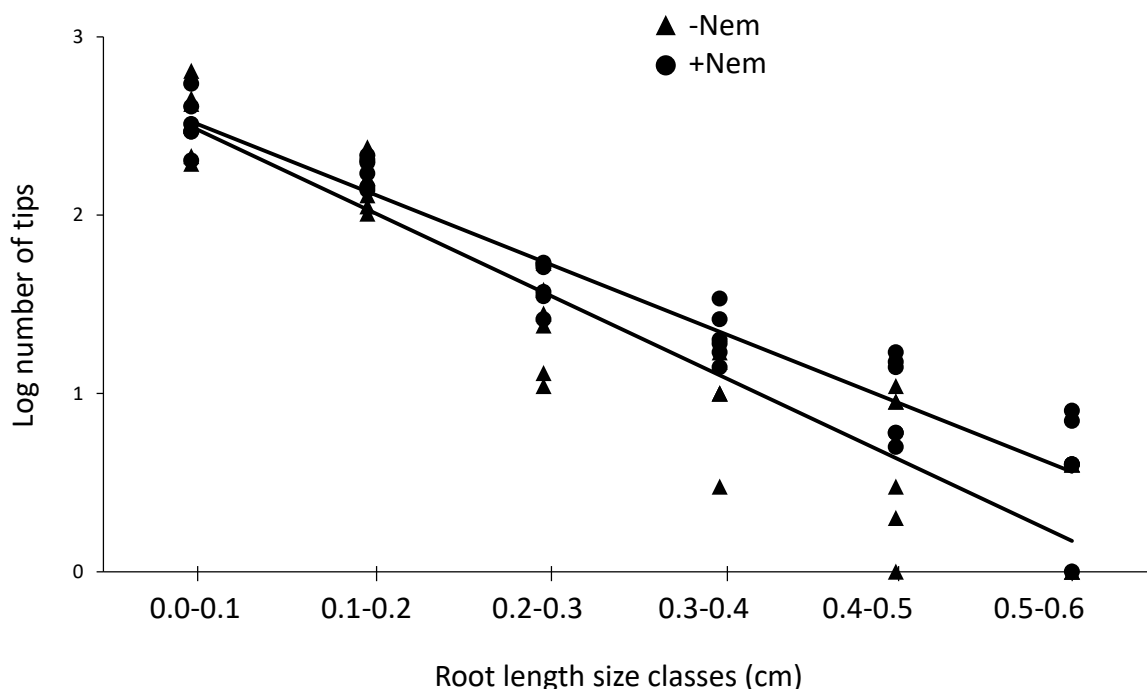


Figure 1.5: Distribution of the number of tips (log-transformed) according to root length size classes in the control treatment ("-Nem"; black triangle, $F = 255$; $P < 0.001$; $y = -4.64x + 2.72$; $R^2 = 0.88$) and the treatment with nematodes ("Nem"; black square, $F = 424$; $P < 0.001$; $y = -3.92x + 2.72$; $R^2 = 0.92$).

4. Discussion

4.1 Effect of *Acrobeloides* sp. on soil-plant ^{32}P flow

The mutualistic activity of bacterial grazers on plant P availability has been reported many times (Anderson et al., 1982; Anderson et al., 1981; Barsdate et al., 1974; Irshad et al., 2012). In a recent quantitative review, Trap et al. (2016) showed that the presence of bacterial grazers (protists and nematodes) can increase soil P mineralization by 22%, shoot P content by 30% and root P content by 23%. In this review, authors however noted that no studies including highly weather tropical soils were available. In the present study, we observed significant positive effects of the nematode *Acrobeloides* sp. on rice P uptake only when dolomite lime was added. In the absence of dolomite, the nematodes did not significantly change plant variables. Indeed, 60% of the plant variables showed significant interaction response according to the two-way ANOVA. The mutualistic activity of the nematodes was thus highly dependent of the abiotic component of the soil.

When the soil was limed, the L-value significantly increased in the presence of nematodes, suggesting that nematodes favoured plant P uptake from the soil organic P pool (the "*mineralization*" pathway). These results support the findings of Irshad et al. (2012) who showed an enhanced *Pinus pinaster* P uptake when *Rhabditis* sp. (Nematoda, Rhabditidae) and *Acrobeloides* sp. were inoculated in a medium supplemented with phytate and a phytate-mineralizing bacteria (*Bacillus subtilis*). Their results suggested that the nematodes and *B. subtilis* together increased the production of free P_i from phytate. Similarly, Jiang et al. (2017) conducted a manure fertilization experiment and found, using structural equation model and interaction networks, a significant positive correlation between the abundance of bacterivore nematodes (especially *Protorhabditis*) and alkaline phosphatase (ALP) - producing bacteria coexisting in large macroaggregates of a Ferralsols in China. They confirmed the causal link between nematodes and ALP-producing bacteria by conducting an 14-day microcosm experiment where they found higher ALP-producing bacteria abundance and activity in the presence of *Protorhabditis* in comparison to control (without nematodes) but only when the soil was supplied with high amount of manure (with or without lime).

Many mechanisms have been proposed to explain these patterns (Trap et al., 2016) such as the removal of senescent cells by nematodes or shifts in the soil microbial community

composition (Blanc et al., 2006; Djigal et al., 2010; Djigal et al., 2004a), with succeeding effects on specific P functions (Jiang et al., 2017). Besides the mineralization effect, the role of *Acrobelloides* sp. on the functional profiling of the soil bacteria community should thus be studied. It is however possible that the actual contribution to organic P mineralization induced by nematodes in plant P nutrition was underestimated since bacteria can uptake Pi from the soil solution for their own requirement (Richardson and Simpson, 2011), leading to similar isotopic signature after Pi excretion by nematodes. Also, nematodes can retained high amount of ^{32}P from labelled bacteria in their tissues (Nicholas and Viswanathan, 1975). According to these results, we thus only partially accept our first hypothesis H1 but we validate the second one (H2) suggesting that the mutualistic activity the *Acrobelloides* sp. was dependent to the P-sorbing ability of the soil.

It is likely that different P flows could have been obtained with other bacterivorous nematode species since nematode effects on nutrient cycling are known to be species-specific (Zhu et al., 2017). *Acrobelloides* sp. is a cephalobid nematode distributed worldwide, frequent in dry and sandy soils and, usually, exhibit high water-stress resistance capacities (Andrássy, 2007). Using this genus as a model is thus relevant since soil fauna from the Malagasy hills ("tanety") experiences long period of dryness during May to November. Also, this genus exhibits low labial and cephalic prolobae and a narrow mouth cavity. It is thus well adapted to soil habitats where bacterial density is low that is the case in Malagasy Highland Ferralsols. This is one of the reasons why Bongers (Bongers, 1990; Bongers, 1999) classed this genus in the second class along the colonizer-persistent gradient (cp) into the Maturity index. Usually, cp-1 nematodes have higher metabolic activity than cp-2 (Ferris and Bongers, 2006; Ferris et al., 2001). They also have wider abilities to colonize concentrated organic matter patches such as the rhizosphere and to grow on dense bacterial populations (Bongers, 1990). We can thus expect a more pronounced effects of cp-1 bacterivores on plant functions than cp-2. For instance, Cheng et al. (2011) found that *Caenorhabditis elegans* (a cp-1 nematode) induced more pronounced positive effect than *Cephalobus* sp. (a cp-2 nematode) on rice N amount after 20 days of growth in an alluvial sandy loam soil in China. Djigal et al. (2004a) investigated the effects of four bacterivorous nematodes within the Cephalobidae family (*Zeldia punctata*, *Acrobelloides nanus* morphotype 1 and 2 and *Cephalobus pseudoparvus*) on N uptake by maize growing in a Sahelian soil in Senegal. Even

if the nematodes species induced similar trends, the effect size on plant nutrition was slightly higher for *C. pseudoparvus* and *A. nanus* type 1 in comparison to *Z. punctata* and *A. nanus* morphotype 2. Inoculating another bacterivore nematodes species, especially cp-1, would be especially relevant in agricultural soils in Madagascar where the content of soil organic matter rapidly increases in November after the application of manure, compost or vermicompost.

4.2 Distinct effects of dolomite and *Acrobeloides* sp. on plant functions

In this study, we found two distinct effects. The first one was the decreasing effect of dolomite on rice growth and P and K uptake in the "-Nem" treatment. In agriculture, the supply of dolomite is usually done to increase crop productivity. Here, we provided dolomite to increase soil pH and reduce Pi chemisorption on the soil solid phase (see Supporting Information 1.1) in order to test H2. In contrast to soil improvement, dolomite liming reduced rice growth and nutrition. This statement is not surprising since similar results have been found for upland rice in Madagascar with field assays (Raboin et al., 2016) or in Cerrado soils in Brazil (Fageria, 2000; Fageria, 2001). To go further, we compared the soil available Pi in soil not limed or limed with dolomite (1, 1.5 or 2 mg.kg⁻¹) using the Olsen Pi method. In the native soil (without dolomite), we obtained 7.12 mg-P.kg⁻¹ while with dolomite (1 mg.kg⁻¹) we found 7.00 mg-P.kg⁻¹. Even no significant, the addition of dolomite tended thus to reduce soil Olsen Pi content. With 1.5 (pH 6.55) and 2 (pH 6.75) mg dolomite per kg soil, the Olsen P content persisted to 7.00 and decreased to 6.00 mg-P.kg⁻¹ respectively. At pH superior to 6.5, the reduction of Olsen P content was probably due to the precipitation of P with Ca as Ca phosphate (Naidu et al., 1990). Also, plants mostly uptake Pi as H₂PO₄⁻ rather than HPO₄²⁻, while the former decreases with increasing pH values and the minimal P-sorption on the soil solid phase is closed to pH 5. (Barrow, 2017). Increasing soil pH above 6 appears thus detrimental for rice productivity. Indeed, the optimal soil pH for upland rice grown on Oxisols vary between 5.4 and 5.9 (Fageria and Baligar, 2008). We can suppose that the pH of the native soil was probably high enough (5.5) for rice growth. Determining soil Al concentration, and possibly the amount of Pi associated with Al, would be an interesting outlook to explain the response of rice to dolomite addition.

We observed a slight decrease in plant growth and nutrition in the presence of *Acrobeloides*

sp. without dolomite. The works of Sundin et al. (1990) showed that the inoculation of *Panagrellus redivivus* (Panagrolaimidae) in the rhizosphere of *Brassica napus* induced after two weeks 2.6 times more organic C in the plant exudates (mainly as carbohydrates). They calculated that 65% of the net production was exuded in the soil (available for use by bacteria) when nematodes were present while 40% was exuded in the absence of the bacterial grazers. These results suggest that nematodes can rapidly increase carbon loss through higher exudation after their inoculation in the rhizosphere. In strong weathered tropical soils, where plant-availability of nutrients (N, P, K, S, Mg, Ca, Mn, Si) is very low, it is possible that nematodes did not compensate this carbon loss by higher plant-available nutrients despite high nematode activity. Consequently, the presence of the nematodes may induce lower growth in comparison to treatments without nematodes where root exudation may be lower. This hypothesis is supported by the significant increase in shoot K, Ca and Mg amount in the presence of nematodes in limed soil in comparison to the control, but not in the native soil.

We can also highlight that the interactions between rice and bacterivorous nematodes are likely to differ according to plant cultivar. For instance, nematode attraction by roots is influenced by a wide variety of compounds as well as pH gradients (Anderson and Coleman, 1981; Grewal and Wright, 1992; Rasmann et al., 2012; Young et al., 1996) and vary according to rice cultivar (Ranoarisoa et al., 2017). Likewise, the gain in plant growth and nutrition in response to protist inoculation has been shown to fluctuate according to rice cultivar (Somasundaram et al., 2008). In the present study, the rice cultivar B22 was used and hence, according to the literature, our results are not generic. Ranoarisoa et al. (2017) showed that the rhizospheric soil of the cultivar B22 did not significantly attract *Acrobelloides* sp. individuals in contrast to the rhizospheric soil of cultivars F172, F182 or F152. We thus propose to conduct similar pot experiments with these last cultivars.

4.3 Effect of *Acrobelloides* sp. on root architecture

The lateral root growth induced by grazing lies on the ability of the grazers (mostly protists) to strongly modify the rhizospheric microbial community structure and the subsequent microbe-root communication (Bonkowski, 2004; Bonkowski et al., 2009). Selective grazing by bacterivore nematodes has been suggested to explain shifts in the bacterial community

composition after nematode inoculation (Blanc et al., 2006; Djigal et al., 2004a). However, using mixed populations of mildly toxic wild-type and nontoxic *gacS*-deficient mutants of *Pseudomonas fluorescens* in batch and rhizosphere systems, Jousset et al. (2009) showed that the diet composition of *Caenorhabditis elegans* did not vary with changes in the frequency of the two bacterial strains, confirming its lack of strong selective ability compared to the protist *Acanthamoeba castellanii* that clearly preferred the non-toxic bacterial mutants. It thus appears unlikely that bacterivorous nematodes actively select for specific prey taxa and alter microbe-root communication as protists do. Here, the presence of *Acrobelloides* sp. had significant positive effect on root biomass and total length. We also observed higher root length with a diameter ranging between 0.2 and 0.8 mm in the presence of nematodes, probably due to local increase in nutrient (ammonium, nitrates and phosphates) content. However, *Acrobelloides* sp. did not improve specific root length, tips number and root branching density. Using *A. castellanii*, Kreuzer et al. (2006) showed great effects of grazing on rice root system architecture caused by differences in both number and growth of lateral roots. When the authors expressed the distribution of lateral roots according to root length size classes, they found a sharp slope in the control compared to the protist treatment, supposing a more homogeneous root system with long first-order lateral roots when the protists were inoculated. In our study, we did not find such difference when we expressed the number of tips per root length size class (Figure 1.5). Hence, the nematodes increased the length of lateral roots, especially roots with a diameter ranging from 0.2 to 0.8 mm, but not their number. Our conclusions differed from those of Jiang et al. (2012) who showed stimulating effects of *Cephalobus* sp. inoculated with *Pseudomonas* sp. or *Burkholderia* sp. on *Arabidopsis thaliana* root length and tip number, growing on a sandy-loam alluvial soil from China during 20 days. However, from the Jiang et al. (2012) data set, we calculated root branching using the same index (ratio of tip number to total root length); we found similar values among treatments with a mean around 2.4 tips.cm⁻¹. We thus believe that nematodes can increase plant and root growth through higher nutrient mineralization but did not alter root branching as protists do.

5. Conclusion

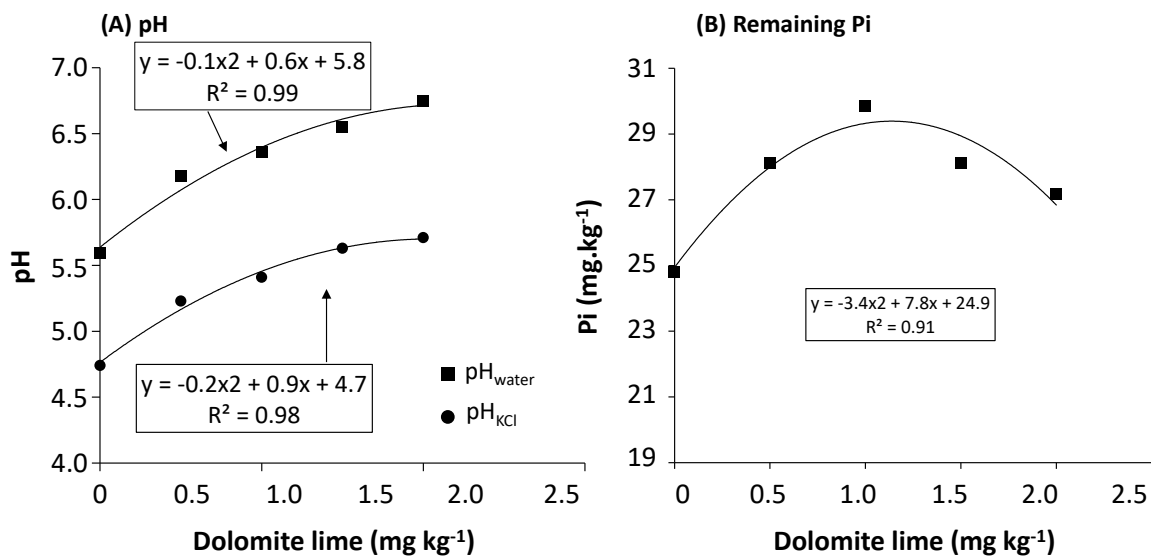
Both experiments converged towards the same conclusions: *Acrobelloides* sp. increased plant

P uptake mainly through the “*mineralization*” pathway, rather than through an enhanced soil exploration by roots, but only when the soil was limed with dolomite. Without dolomite, the effects of *Acrobeloides* sp. on plant growth and nutrition is null, even slightly (but not significantly) negative. The ability of this nematode species to enhanced plant P uptake is thus strongly limited by the high ability of Ferralsols to precipitate and chemisorb phosphates. In uncultivated soil (savanna) the role of bacterivorous nematodes appears limited, in agreement with findings of Jiang et al. (2017). From an ecological intensification perspective, and in order to promote agro-ecological agriculture development in such tropical regions, our results suggested that amending the soil with rich-P organic matter and correcting soil pH with dolomite may constitute appropriate agronomic actionable levers to drive the mutualistic activity of the *Acrobeloides* populations.

Acknowledgements

We acknowledge the Laboratoire des Radio-Isotopes of the University of Antananarivo, Madagascar, for access to the experimental station of Lazaina and the greenhouse. We thank Modeste Rakotondramanana, Marie-Paule Razafimanantsoa, Andrianantenaina Hilaire Damase Razafimahafaly and Eric .N. Randrianasolo for their laboratory assistance.

Supporting information 1.1: Effect of increasing addition of dolomite lime on (A) soil pH (pH_{water} and pH_{KCl}) and (B) soil remaining Pi. The dolomite was provided in water to reach 80% of water-holding capacity. The pH values and the remaining Pi were measured at 7 and 10 days, respectively, after the addition of dolomite and the soil was incubated at room temperature in the dark. Black lines refer to polynomial models.



III.Synthèse du chapitre 1

Après 28 jours de croissance, l'expérience de marquage nous a permis d'observer que:

- (i) Pour le traitement "-Dol", la présence de *Acrobelloides* sp. a un effet négatif (mais non significatif) sur la croissance de la plante (biomasse racinaire, biomasse aérienne et biomasse totale), sur la quantité de P total dans les tissus de la plante (parties aérienne et racinaire) et sur la valeur L dans la partie aérienne.
- (ii) La présence de dolomie seule (traitement "+Dol -Nem") tend également à diminuer la biomasse totale de la plante (de 978 à 836mg) et la valeur L dans la partie aérienne.
- (iii) Pour le traitement "+Dol", la présence de *Acrobelloides* sp. a un effet significativement positif sur la croissance de la plante (biomasse racinaire, biomasse aérienne et biomasse totale), sur la quantité de P total, K, Ca et Mg dans les tissus de la partie aérienne de la plante et sur la valeur L dans la partie aérienne. La présence de *Acrobelloides* sp. augmente de 49% la valeur L dans la partie aérienne de la plante, par rapport au contrôle.

Pour l'expérience en rhizobox, après 28 jours de croissance, nous avons observé que:

- (i) La présence de *Acrobelloides* sp. augmente significativement la longueur et la surface racinaires (de 150 à 250 cm et de 13.4 à 30 cm², respectivement). Plus précisément, la présence de *Acrobelloides* sp. augmente significativement la longueur des racines dont le diamètre est compris entre 0.2 et 0.8 mm.
- (ii) La présence de *Acrobelloides* sp. diminue significativement les ramifications racinaires (nombre d'apex par unité de surface racinaire) (de 3.3 à 2.5 apex.cm⁻¹).
- (iii) La présence de *Acrobelloides* sp. n'a pas d'effet sur le nombre d'apex et la longueur spécifique des racines ainsi que sur la surface explorée par les racines.

Nos résultats montrent que l'inoculation d'*Acrobelloides* sp. augmente le prélèvement de P par la plante, en présence de dolomie, via la voie nutritionnelle ("voie de minéralisation") plutôt que par la voie hormonale (ramification des racines). En absence de dolomie, les effets de la présence de *Acrobelloides* sp. sur les fonctions de la plante sont nuls voire négatifs. L'activité mutualiste des nématodes bactériophages est fortement liée à la capacité de sorption du P du sol et la correction du pH du sol via un amendement calcique pourrait constituer une voie agro-écologique à explorer.

CHAPITRE 2

Mesure in situ de l'effet de *Acrobeloïdes* sp. sur les fonctions du riz pluvial à l'aide d'une nouvelle méthode: effet des pratiques agricoles à Madagascar



Dispositif: Carotte de sol non perturbé (2017)

CHAPITRE 2. Mesure in situ de l'effet de *Acrobelloides* sp. sur les fonctions du riz pluvial à l'aide d'une nouvelle méthode : effet des pratiques agricoles à Madagascar

I.Présentation du chapitre 2

D'après la littérature, la présence de bactérivores (nématodes et protozoaires) dans le sol améliore les fonctions de la plante (croissance et nutrition) via la boucle microbienne du sol. L'intensification de cette fonction écologique, via des pratiques agricoles appropriées, représente une solution pour l'amélioration de la croissance et de la nutrition du riz pluvial. Identifier les pratiques agricoles favorables à la boucle microbienne du sol reste toutefois difficile. De nombreux designs expérimentaux ont été utilisés pour étudier les effets des interactions entre les bactéries et leurs prédateurs bactérivores (nématodes et protozoaires) sur la disponibilité des nutriments (N et P) et les fonctions de la plante (croissance et nutrition). Toutefois, il s'agit surtout d'expériences en microcosmes en laboratoire, réalisées avec du sol perturbé, qui ne reflètent pas les réalités sur le terrain (pratiques agricoles et caractéristiques abiotiques du sol). L'objectif de cette étude était de tester une nouvelle méthode d'expérimentation, basée sur des carottes de sol intact, non perturbé, afin d'évaluer les effets de *Acrobelloides* sp. sur les fonctions du riz pluvial sur Ferralsol dans des conditions les plus proches du terrain. Pour ce faire, nous avons échantillonné des carottes de sol dans seize parcelles paysannes de riz pluvial et une parcelle de bozaka (Itasy, Madagascar). Les parcelles ont été sélectionnées de façon à avoir une diversité de pratiques agricoles qui reflètent ce que font les paysans dans notre zone d'étude. Le riz pluvial était en monoculture, en association, ou en rotation (ici le riz est soit le précédent cultural soit la culture en place). Dix carottes de sol (4.5 cm de diamètre et 12 cm de hauteur) ont été prélevées dans chaque parcelle. Les carottes ont été fumigées avec du chloroforme, afin de tuer les nématodes natifs du sol, puis ré-humidifiées avec une suspension bactérienne fraîche. Une graine de riz (variété B22) a été plantée dans chaque carotte. Les carottes ont ensuite été incubées à température ambiante pendant 40 jours. Deux traitements biologiques ont été comparés: "-nématodes" et "+nématodes". A la fin de l'expérience, les quantités de N et P dans les tissus de la plante ont été mesurées. Nous avons également déterminé, grâce à des régressions PLS, les variables agronomiques et abiotiques du sol qui

permettent de prédire le mieux les effets de *Acrobeloïdes* sp. sur les fonctions de la plante. Les résultats des régressions PLS nous ont également permis de développer des indicateurs de la taille de l'effet (Cohen's d) de *Acrobeloïdes* sp. sur les fonctions de la plante.

II. Article 2: Effect of *Acrobeloïdes* sp. on plant functions using undisturbed soil cores from upland rice (*Oryza sativa*) fields in Madagascar

Mahafaka Patricia RANOARISOA^{1, 2}

Eric BLANCHART²

Lilia RABEHARISOA¹

Laetitia BERNARD²

Claude PLASSARD³

Jean TRAP^{1,2}

Planned to be submitted in "*Ecological Indicator*"

Corresponding author: Jean Trap

IRD, UMR Eco&Sols, Laboratoire des Radio Isotopes, BP 3383, 101 Antananarivo, Madagascar

Tél : +261 (0)32.47.126.74

Email : jean.trap@ird.fr

¹ Laboratoire des Radio Isotopes, BP 3383, Route d'Andraisoro, 101 Antananarivo, Madagascar

² Eco&Sols, IRD, INRA, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

³ Eco&Sols, INRA, IRD, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

Abstract

Soil bacterivores, such as nematodes, have substantial effects on soil nutrient availability and plant nutrition. Clarholm in 1985 has described their positive impact on plant growth, as the "soil microbial loop". Evaluating the impacts of agricultural practices on the soil microbial loop, beyond simple measures of field bacterivore abundance, is still challenging. In this study, we aimed at testing, using a new field undisturbed soil cores method, the impacts of agricultural practices on bacterial-feeding nematode effects on soil nutrient (N and P) phyto-availability in upland rice (*Oryza sativa*) fields in Madagascar. For that purpose, we sampled intact soil cores using PVC cylinders in sixteen upland rice fields (Itasy, highlands of Madagascar) exhibiting contrasting agricultural practices. The soil cores, still in the cylinders, are fumigated and moistened with a fresh soil suspension containing only bacteria. One rice seed is inserted in the soil core, which is then incubated under natural conditions for 40 days. Soil cores are inoculated or not with bacterivorous nematodes (*Acrobelloides* sp.). At the end of the experiment, total N and total P content in plant tissues were analyzed. We also calculated the effect size of *Acrobelloides* sp. on rice function with the Cohens' d in order to obtain a metric of the mutualistic activity of *Acrobelloides* sp.

We found that the effect to *Acrobelloides* sp. on rice function were variable (positive, neutral or negative) and highly dependent on both agricultural practices and soil abiotic variables. The *Acrobelloides* mutualistic activity – favoring systems were those including crop association (especially field under agroforestry), and high value of soil pH and Mg content. The method developed tries to mimic field conditions, making it adequate for experiments involving interactions between soil bacterivores, nutrient flows and plant nutrition in natural soils.

Keywords: *Acrobelloides* sp., upland rice, undisturbed soil cores method, agricultural practices, soil abiotic variables, Madagascar

1. Introduction

Phosphorus (P) and Nitrogen (N) are the main macronutrients limiting plant productivity in many terrestrial ecosystems (Holford, 1997; Vitousek et al., 2010). P and N are mainly present in soil in organic forms not directly available by plants, which can assimilate P only in the form of free orthophosphate (HPO_4^{2-} or $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$) and N mostly in the form of nitrate (NO_3^-) and to a lesser extent in the form of ammonium (NH_4^+) (Bucher, 2007). The mineralization of both organic P and N is thus a key step in P and N cycling to supply available N and P for plants (Marschner, 1995; Schimel and Bennett, 2004).

In the highlands of Madagascar, soils of hills cropped with upland rice are predominantly Ferralsols characterized by low pH values (Andriamananjara, 2011), a very low mineral fertility with high iron and aluminium oxyhydroxides content (Randriamanantsoa et al., 2013; Sanchez et al., 1997). The content of soil organic matter, the main pool of N and P, is particularly low and estimated to be approximately 2 g.kg^{-1} (Randriamanantsoa et al., 2013). In these soils, the most limiting nutrient is available P, whose concentration in the soil solution does not exceed 10 mg kg^{-1} (Rabeharisoa, 2004).

Moreover, poor smallholder farmers do not have access to expensive mineral fertilizers. Using them to increase the total amount of inorganic N and P in the soil solution is thus not an option. It appears then obvious that increasing the upland rice crops' primary productivity requires an effective intensification of the basic ecological functions involved in nutrient availability. By increasing soil nutrient availability, ecological functions based on biological interactions represent potential keys solutions to such agricultural problems (Altieri, 1999; Clarholm, 1985a; Plassard and Dell, 2010; Smith and Read, 2008).

The soil microbial loop described by Clarholm (1985a) is an important ecological function occurring in the rhizosphere of plants relying on the interactions between soil bacteria and bacterial-feeders (protists and nematodes). More precisely, the presence of bacterivores can increase the plant-availability of limiting nutrients through higher microbial biomass turnover and enhanced microbial activity (Clarholm, 2005; Kuikman et al., 1991). By allowing a more efficient availability of resources in space and time, this function occurring in the rhizosphere of plant is thus a key ecological function in unfertile soils. Intensifying it in

upland rice crop systems through appropriate soil practices may constitute a smart agroecological way to increase plant nutrition and growth.

Identifying agricultural practices that can act as drivers of the soil microbial loop, beyond simple measurements of field bacterivore density in fields, is however still challenging. Up to date, various methodological designs were used to study the effects of interactions bacteria-bacterivores on nutrient availability (Coleman et al., 1977; Darbyshire et al., 1994; Gebremikael et al., 2014; Irshad et al., 2012). We can classify the different designs from the simplest ones appropriate to disentangling the mechanisms towards more complex designs trying to mimic field conditions.

The simplest experimental models referred to liquid cultures that can be a soil suspension or a mineral saline solution (Darbyshire et al., 1994; Griffiths, 1986, 1989; Taylor, 1986). For instance, Griffiths (1986) showed, using liquid culture, that N mineralization was greater when nematodes (*Rhabditis* sp) and protozoan ciliates (*Colpoda steinii*) were combined than with *C. steinii* alone. Using batch cultures, Darbyshire (1994) observed that the rate of N excretion by the protozoan ciliates (*C. steinii*) was dependent to the N content of the bacterial prey and the temperature.

Along this complexity gradient in the design models, we can cite the studies conducted with sieved soil but without plants (Griffiths, 1989; Ronn et al., 2001; Woods et al., 1982). These works revealed that the presence of bacterivores increased net N and P mineralization in soil (Cole et al., 1978; Coleman et al., 1977). Other studies introduced a plant in their assays, either with autoclaved sand or soil/sand mixture (Jentschke et al., 1995), or humus/sand mixture (Baath et al., 1981), or sometimes with agarose (Irshad et al., 2012; Irshad et al., 2011). These last designs allowed a good control of the experimental system in which the form and amounts of each nutrient were well known. For instance, Irshad et al. (2012) showed that the presence of nematodes (*Rhabditis* sp. and *Acrobeloides* sp.) feeding on phytate-mineralizing bacteria (*Bacillus subtilis*) significantly increased P accumulation in *Pinus pinaster* plants from the mineralization of a recalcitrant organic P source, i.e. the phytate. Finally, more realistic studies have been conducted with (sieved) soil and a plant (Alphei et al., 1996; Clarholm, 1985a; Djigal et al., 2004b; Ingham et al., 1985). For instance, Clarholm (1985a) showed that the presence of protists (from a soil suspension) increased, by

78%, wheat biomass and N content in plant tissues after six weeks of incubation. Similar patterns have been observed for plant P content (Djigal et al., 2004b; Ingham et al., 1985).

Whatever the experimental design, quantifying the mutualistic activity of bacterivores remains technically difficult and time-consuming. Also, we noted that most of these studies inoculated the organisms in disturbed soils, usually 2 mm-sieved soils. Sieving the soil is indeed required to homogenize the substrate and avoid confusing effects in controlled experiments but it is still questionable whether these protocols did reflect the actual field conditions and altered the actual size effect of bacterivores on plant functions. More recently, Gebremikael et al. (2014) proposed a new method with soil cores in PVC tubes with sieved soil compacted to the bulk density found in the field, to assess the effects of nematodes on plant functions in conditions closed to the field. Fauna were killed by applying gamma irradiation with a dose proven to kill completely nematodes and other fauna without significantly altering the native microbial community. This approach is technically relevant but remains less effective in the attempt to monitor and screening the mutualistic activity of bacterivores in numerous fields. Also, this method is hardly applicable in Southern poor countries where applying gamma irradiation is not feasible.

Here, we aimed at testing a new method based on intact soil cores and nematode re-inoculation in order to assess the potential mutualistic activity of the bacterial-feeding nematode *Acrobelloides* sp. on rice functions growing on a nutrient-poor soil in Madagascar. We called this method the "I-Banema assay " referring to the "Index of BActerial-feeding NEmatode Mutualistic Activity". The I-Banema assay was developed to limit disruption and to mimic field conditions as much as possible. We also aimed at calculating a metric easy to use from the assay that can be used as a potential soil biological indicator (or proxy) of bacterial-feeding nematode mutualistic activity on rice function. This metric would be useful to monitor the ecological intensification of upland rice fields and identify the agronomic and soil drivers through statistical analyses. We hypothesized that the presence of *Acrobelloides* sp. in the rhizosphere of rice has a positive effect on plant growth and nutrition, by increasing the release of N and P in the soil solution. However, numerous edaphic factors are involved in the regulation of the interaction between bacteria and their grazers. Thus, the mutualistic activity of nematodes is maximal when specific soil conditions are met, i.e., good

soil porosity to favor nematode move, high organic matter content to favor bacterial proliferation, pH not too acid to limit P diffusion.

2. Materials and methods

2.1 Selection of upland rice fields

A total of 16 farm fields cropped with upland rice were selected in Madagascar in the region of Itasy, District of Arivonimamo (Table 2.1). Eight fields were sampled in February 2016 and the others eight in April 2017. We also selected a “bozaka” field (natural vegetation of savanna grassland) as a reference of non-cultivated area in February 2016.

Table 2.1: Agronomical characteristics of the agricultural fields

	Actual Crop	Actual soil amendment	Previous Crop	Previous soil amendment	Actual tillage practices	Year of sampling	GPS coordinates
F1	Rice (<i>Oryza sativa</i>) + <i>Eucalyptus</i> + Maize (<i>Zea mays</i>)	Compost + green manure	Bozaka + <i>Eucalyptus</i>	None	No tillage	2016	S 18°58'18.1" E 47°21'17.9"
F2	Rice (<i>Oryza sativa</i>) + <i>Stylosanthes</i> + <i>Tephrosia</i>	None	<i>Stylosanthes</i> + <i>Tephrosia</i>	None	Crop under direct cover	2016	S 18°58'40.2" E 47°20'39.2"
F3	Rice (<i>Oryza sativa</i>) + Groundnut (<i>Arachis hypogaea</i>)	Compost + Manure + crop residues	Soybean (<i>Glycine max</i>)	Compost + Manure	Tillage	2017	S 19°00.196' E 047.16.895'
F4	Rice (<i>Oryza sativa</i>) + Coffee trees (<i>Coffea</i>)	French beans residues	French beans (<i>Phaseolus vulgaris</i>) + Coffee tree (<i>Coffea</i>)	Compost + Manure	Tillage	2017	S 18°58.156' E 047°17.851'
F5	Rice (<i>Oryza sativa</i>) + Groundnut (<i>Arachis hypogaea</i>) + Coffee tree (<i>Coffea</i>)	Compost	Coffee tree (<i>Coffea</i>) + Taro (<i>Colocasia esculenta</i>)	Compost	Tillage	2017	S 18° 56.582' E 047° 20.252'
F6	Rice (<i>Oryza sativa</i>) + Banana trees (<i>Musa</i>)	Compost	Banana trees (<i>Musa</i>) + Taro (<i>Colocasia esculenta</i>)	Compost	Tillage	2017	S 18° 56.582' E 047° 20.252'
F7	Rice (<i>Oryza sativa</i>) + <i>Eucalyptus</i>	Compost + Manure	<i>Eucalyptus</i>	None	Tillage	2017	S 18° 58.268' E 047° 21.241'
F8	Maize (<i>Zea mays</i>) + Jugo bean (<i>Vigna subterranea</i>)	Compost	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	Manure	Tillage	2016	S 18°58'17.7" E 47°21'17.8"
F9	Fallow + <i>Eucalyptus</i>	None	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	Manure	No tillage	2016	S 18°58'17.8" E 47°21'18.4"
F10	Sweet potato (<i>Ipomoea batatas</i>)	Rice straw	French beans (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Manure + chemical fertilizers	Tillage	2016	S 18°58'15.4" E 47°21'11.4"
F11	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	Compost + ashes	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	Compost + ashes	Tillage	2017	S 18° 58.253' E 047° 21.131'
F12	Rice (with maize in edge)	Compost + ashes	Jugo bean (<i>Vigna subterranea</i>)	None	Tillage	2017	S 18° 58.253' E 047° 21.131'
F13	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	Ashes + crop residues	Sweet potato (<i>Ipomoea batatas</i>)	Manure	Tillage	2017	S 18° 56.548' E 047° 20.746'
F14	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	Manure	Bozaka	None	Tillage	2016	S 18°58'14.2" E 47°21'07.9"
F15	Rice (with Jugo bean in edge)	Compost	Bozaka	None	Tillage	2016	S 18°58'27.5" E 47°20'54.8"
F16	Rice (with maize in edge)	Manure + ashes + rice chaff	Bozaka	None	Tillage	2016	S 18°58'27.9" E 47°20'54.5"
Bz	Bozaka	None	Bozaka	None	None	2016	S 18°58'17.3" E 47°21'17.2"

According to fields, rice was either in monoculture, in association or in rotation (rice is the current or the previous crop) (Table 2.1). These selected fields are representative of the agronomics practices developed by farmers in the highlands of Madagascar, i.e. association with legumes or trees, organic matter amendments, fertilization, soil tillage (Table 2.1). All fields are ferrallitic clay or clayey-silt soils (Ferralsols).

2.2 Soil cores sampling

For each campaign, seven days before the beginning of the assay (T_{-7} , “T” refers to ‘time’ and “ T_0 ” is the date of start of the I-Banema assay), we sampled three intact soil cores in the middle of each field, near to the cultivated plants, with PVC cylinders (4.5 cm diameter and 12 cm height) (Photography 2.1). The soil cores were carefully transported to the laboratory. In the field, we also sampled a composite sample (0-12 cm depth) for the analyses of soil abiotic characteristics. One week after this first sampling (T_0), ten soil cores were sampled per field using the same PVC cylinders. They were used to conduct the I-Banema assay.



Photography 2.1: Intact soil core sampling

2.3 Soil analysis

The three soil cores sampled at T_{-7} were saturated with water in a basin for two hours. They were then placed on a sand tray for one hour. Then, the remaining soil moisture was determined after oven drying at 105°C for 24 hours. The amount of water determined by weight loss corresponds to the water holding capacity (WHC). Various soil parameters were

measured on the composite soil samples. Five grams of soil were mixed with 12.5 ml of distilled water. The mixture was then shaken on a back and forth agitator for 30 minutes. The pH_{water} was measured using a glass electrode. A second measurement was carried out after addition of 0.93 g of KCl per 12.5 ml in order to measure the soil total acidity (pH_{KCl}). We also determined the particles size distribution using the Atterberg grade scale reduced to five fractions: clay (0-2 μm), fine silt (2-20 μm), coarse silt (20-50 μm), fine sand (50-200 μm) and coarse sand (200-2000 μm). We used the cylinder method to determine the soil bulk density. In the field, at T_0 , the core sampler was pushed into the soil to 10 cm depth and then removed. Soil mass was determined after oven drying at 105°C for 24 hours, and the volume was that of the cylinder. We measured the exchangeable ions after saturation with cobaltihexamine chloride solution ($Co(NH_3)_6O^{3+}6Cl^-$). CEC was estimated by measuring the Cobalt remaining in solution by flame atomic absorption spectrometric method. We also measured three exchangeable cations: Ca^{2+} , Mg^{2+} and K^+ . The Walkley and Black (1934) method was used to measure the percentage of soil organic carbon. The Kjeldahl (1883) method was used to measure soil total nitrogen. It consists in an oxidation using concentrated sulphuric acid. The Berthelot reaction (1859) was then used for the determination of ammonium-N in the soil extract. The perchloric acid digestion method (Jackson, 1958) was used to determine the soil total phosphorus content. Inorganic phosphorus was extracted with an ion-exchange resin filled with bicarbonate (0.5M) (Amer et al., 1955). P concentration was analysed in HCl/NaCl (0.1 M) solution by colorimetry with malachite green (Rao et al., 1997). We used a modified Seinhorst (1962) elutriation method for nematode extraction from 250 g of a soil composite sample. The number of free-living nematodes was estimated on the basis of the number of nematodes counted in 5 ml of the final volume of water collected.

2.4 Bacterial-feeding nematodes

Monoxenic populations of nematodes (*Acrobelloides* sp.), obtained from Lazaina (18°46'55 59° S, 47°32'46 3°N, 1274 m altitude, Madagascar) were cultured on *Escheria coli* (*Enterobacteriaceae*) following the procedure described by Irshad et al. (2011). *Acrobelloides* sp. is a common ubiquitous genus that dominates bacterivorous nematode communities in upland rice systems in the Malagasy highlands (Villenave et al., 2009).

2.5 The “I-Banema assay” set up

Soil cores from the second sampling (T_0) were moistened (with distilled water) at 50% of their specific WHC and fumigated with chloroform vapour, twice during 2 h separated by 24h in order to eliminate the free-living nematodes (Figure 2.1). Because fumigation with chloroform vapour induces a lysis of microbial cell membranes (Vance et al., 1987), a microbial suspension was prepared for each field by mixing vigorously 100 g of fresh (not fumigated) soil in 400 ml of distilled sterile water during 3 minutes. The soil suspension was then filtered at 1.2 μm in order to eliminate the free-living nematodes. Two days after the sampling (T_2), the soils cores were moistened at 100% of their WHC with a fresh microbial suspension, i.e. each soil core was re-inoculated with its own microbial bacterial community. The soil cores were incubated for seven days in the dark for the establishment of the microbial cells. Seven days after the addition of the microbial suspension (T_9), one rice seed was planted in each soil core. We used the Brazilian upland rice cultivar B22 which was introduced in Madagascar in the early 1980's. This cultivar is widely used by farmers in Itasy region. B22 is sensitive to root parasites (*Striga asiatica*, *Orobanchaceae*) and susceptible to rice blast disease (Raboin et al., 2013; Raboin et al., 2014). Its optimal altitude of cropping is between 700 to 1200 m.

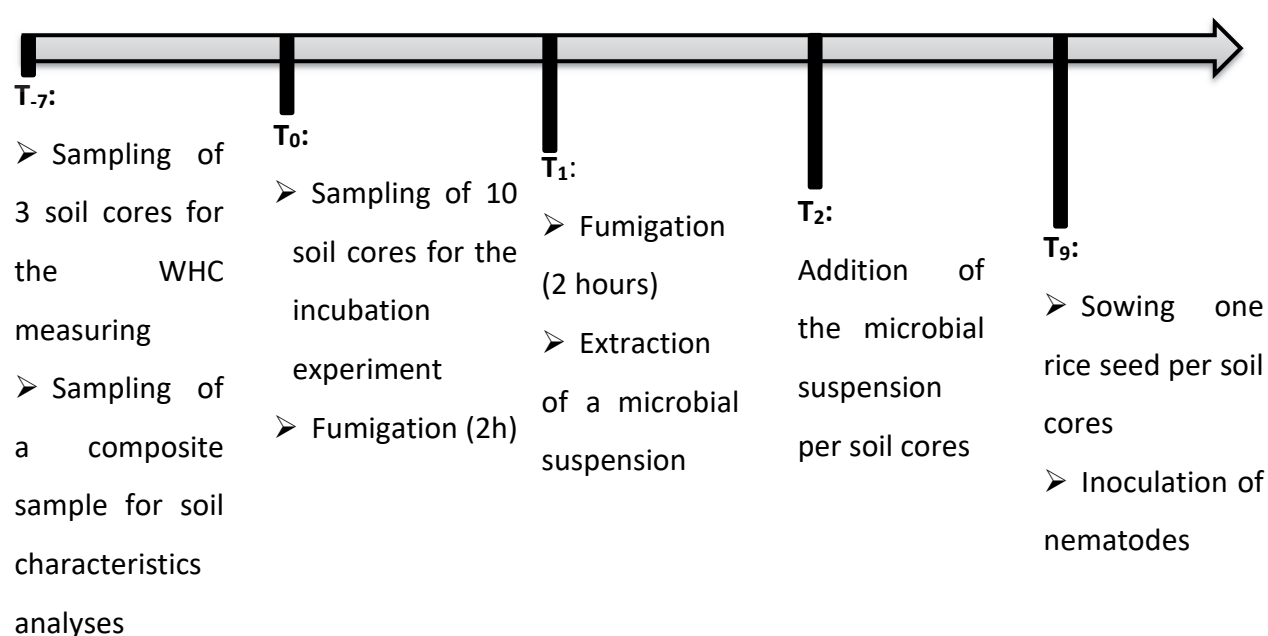


Figure 2.1: I-Banema assay schedule

2.6 I-Banema assay design

Two trophic level treatments were conducted. The soil cores were inoculated either (i) without bacterivorous nematodes (-nem), corresponding to the control, (ii) or with bacterivorous nematodes *Acrobelloides* sp. (+nem). For the "+nem" treatment, we added the equivalent of 10 nematodes per gram of dry soil. For each field, five replicates were set up for each trophic level treatment. A total of 170 soil cores were thus set up. The soil cores were incubated under natural conditions, outside the greenhouse, in order to mimic field conditions (Photography 2.2). Soil cores were daily irrigated with distilled water in order to compensate for the water loss during the experiment. Daily climatic parameters were recorded (WatchDog 2000 Series Mini Stations).



Photography 2.2: I-Banema assay design

2.7 Analyses at the end of the assay

After 40 days of growth, the shoot and the root of each plant were separately collected. The dry root and shoot biomass were determined after oven-drying at 60°C for 48 hours. Total P content of plants (shoot + root) was determined after crushing and mineralization of plant tissues with nitric acid 65% (US EPA Method 3051). P concentration was analysed in mineralized solution by colorimetry with the vanado-molybdate method. The absorbance was measured at 450 nm. Total N content in plant was determined by CHNS/O elemental analyser. We also determined nematode survival rates by extracting them from 150 g of soil using the Seinhorst's Erlenmeyer method (Seinhorst, 1962) followed by active filtering through fine cellulose wadding paper during 48 h and counted using a stereoscope (Southey 1886).

2.8 Statistical analyses

For each agricultural fields, mean and standard deviation ($n=5$) of each variable were calculated for each trophic level treatment ("-nem", "+nem"). We performed a two-way analysis of variances (ANOVA) on all variables with "trophic level (-nem, +nem)" and "field" as factors in order to determine the effects of interactions among factors on the variables. Data normality was checked using the Wilk-Shapiro test. ANOVA was performed with the R software at the 5% level of statistical significance (R, 2016).

We also performed two principal component analyses (PCA1 and PCA2) in order to analyze the dispersal of the fields according to agronomic and soil abiotic variables which describe the 17 fields sampled. PCA1 was performed on the agronomic variables whereas PCA2 was performed on the soil abiotic variables. PCA1 and PCA2 were also performed with the R software (R, 2016).

The aim of the I-Banema assay is to obtain a metric, easy to interpret, that can be used as a proxy of the mutualistic activity of *Acrobelloides* sp. This proxy could be used to find environmental drivers using multiple regressions and a potential biological indicator with a scale of interpretation. We thus calculated the effect size of the nematodes on the production of biomass and the nutrition of rice with the Cohen's d (Cohen, 1988) :

$$d = (M_1 - M_2) / (SD_{\text{pooled}})$$

where M_1 is the mean of each variable for the "+nem" treatment, M_2 is the mean of each variable for "-nem" treatment and SD_{pooled} was the pooled standard deviation of each variable.

The Cohen's d effect size can be described as being "very small, small, medium, large, very large or huge" according to the magnitudes of " d " as initially suggested by Cohen in 1988 and expanded by Sawilowsky in 2009. To determine if the effect size was significantly different from zero, we performed a Student test with R at the 5% level of statistical significance.

We also performed a Linear Regression with the function "*lm*" with R at the 5% level of statistical significance in order to determine which soil abiotic variables explained the effect of *Acrobelloides* sp. on plant functions (growth and nutrition).

Lastly, to evaluate the importance of the agronomic and soil abiotic variables as predictors of the mutualistic activity of *Acrobelloides* sp. on rice functions, Partial Least Squares regression (PLS-R) models were used with Cohen's d as the response variable (Tenenhaus, 1998; Wold et al., 2001). PLS-R models were performed using TANAGRA 1.4.5 (Rakotomalala, 2005). Model strength was assessed by the proportion of variance in the dependent variable that can be predicted by the model (Q^2). At the 5% level, the test is considered significant when Q^2 exceeds a critical value $Q^2_{\text{limit}} = 0.097$ (Tenenhaus, 1998). The Variable Importance of Projection (VIP) reflects the relative influence of each independent variable in the construction of the model, and the capacity of the model to predict the dependent variable. The VIP corresponds to the sum of the variable's influence over all model dimensions divided by the total explained variation by the model. Independent variables with $VIP > 1$ are the most relevant and significant for explaining the dependent variable. We performed three PLS-R models to evaluate the importance of the agronomic and soil abiotic variables as predictors of the effect of *Acrobelloides* sp. on plant total biomass (first model), plant total nitrogen (second model) and plant total phosphorus (third model). For each model, we performed first a full PLS-R including all the variables. Then we performed a second PLS-R including the independent variables with $VIP > 1$ in order to improve the quality of the models.

3. Results

3.1 Agronomic characteristic of the selected fields

The Principal Component Analysis performed on the agronomic parameters (Figure 2.2) revealed a good dispersion of the individuals (fields) on three axes.

The first two axes of the PCA explained 48.3% of the total inertia (Figure 2.2A). The first axis opposed "bozaka" and monoculture fields (positive scores) to the others (negative scores) (Figure 2.2A). Bozaka as agricultural precedent, crop association (mostly the presence of trees) and the amendments on the previous crops (manure, compost, ashes) were the main agronomic parameters explaining the first axis. The second axis opposed fields with rice as the crop during the sampling (agroforestry fields), also characterized by the input of compost (negative scores), to crop rotations and fallow characterised by organic matter input in the previous crop (positive scores). The third axis explained 19.8% of the total inertia and

opposed crop rotations (negative scores) to agroforestry and fallow fields (positive scores) (Figure 2.2C).

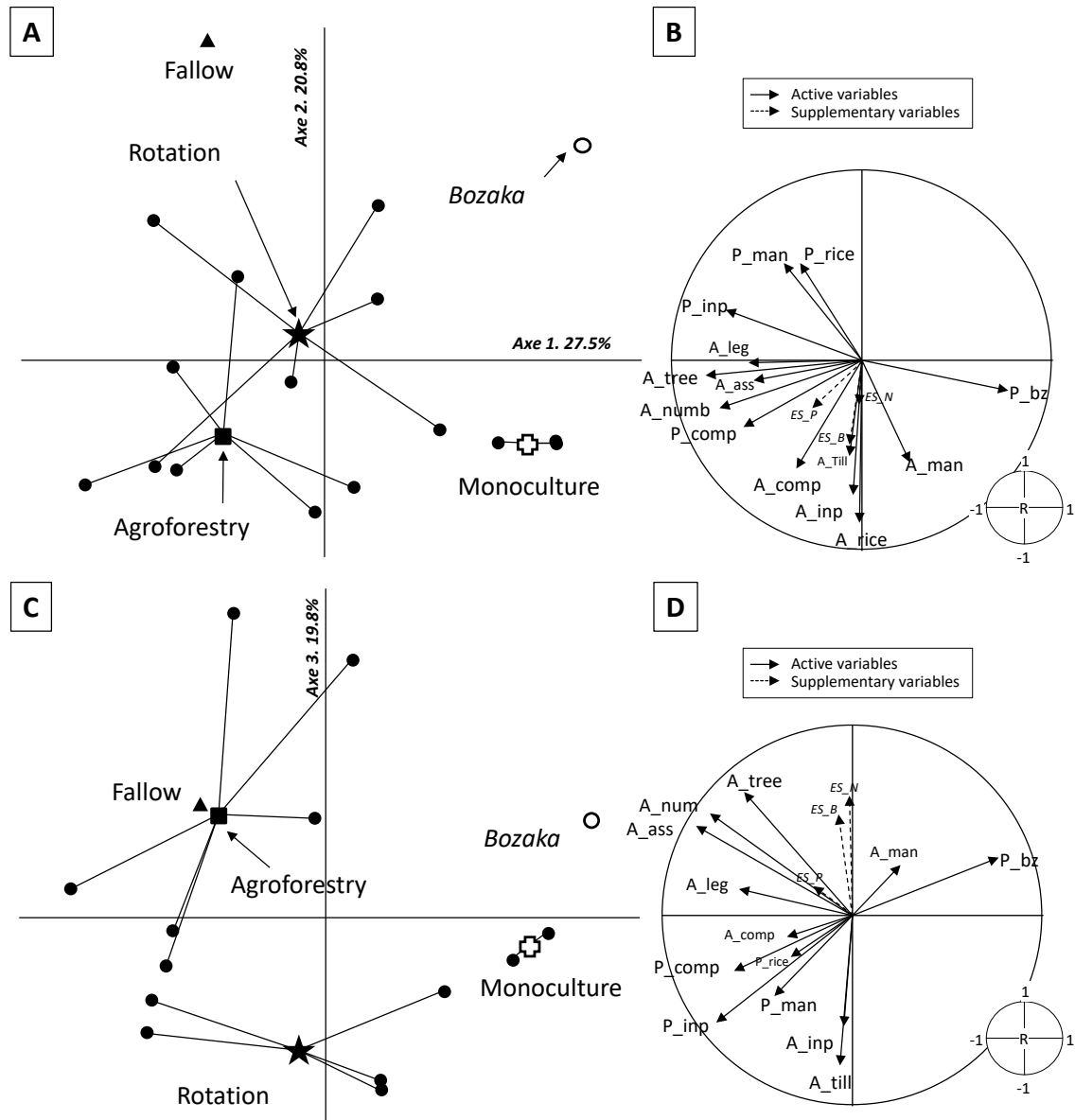


Figure 2.2: Principal Component Analysis performed (PCA1) on agronomic parameters. (A) Agronomic factor ordination with black square, black star, empty cross, black triangle and empty circle as barycentres for "Agroforestry", "Rotation", "Monoculture", "Fallow" and "Bozaka", respectively, the first two axes (axes 1 and 2). Black circle are individuals on the factorial map. **(B)** Circle of correlations with active (full vectors) and supplementary (dotted vectors) variables on the first axes. **(C)** Agronomic factor ordination on the axes 1 and 3 of the factorial plan. **(D)** Circle of correlations on the axis 1 and 3 of the factorial plan. 'A' refers to parameters of the actual crop (year of sampling) while 'P' refers to parameters of the previous crop (year before). inp: input of organo-mineral materials; till: tillage; rice: presence of rice; comp: input of compost; num: number of plant; ass: association; tree: presence of trees; leg: presence of legumes; man: input of manure; bz: bozaka as agricultural precedent. "ES_B", "ES_N" and "ES_P" refers to Cohen's d effect size for rice biomass, N and P amount, respectively.

3.2 Soil abiotic characteristics in the seventeen fields

The values of the soil abiotic variables are characteristic of Ferralsols with low organic matter content and acidic pH (Supporting information 2.1). The soils sampled in the 17 fields contained in average 26 g.kg⁻¹ total C, 2.1 g.kg⁻¹ total N, 0.72 cmol+.kg⁻¹ Ca content, 0.26 cmol+.kg⁻¹ Mg content. The mean pH_{water} was 5.04. Our fields were also characterized by a low C:N ratio (12) and high C:P ratio (31). However, the values of the soil abiotic variables, except pH and bulk density, were very variable with a coefficient of variation (CV) higher than 15%. The values of Pi (CV=83%) and K contents (CV=71%) were the most variable.

The Principal Component Analysis (PCA2) performed on soil parameters (Figure 2.3) shows a good dispersion on the first two axes explaining 44.6% of the total inertia. The first axis (relative inertia = 22.7%) opposed fields with high (coarse and fine) sand content, bulk density and C:P ratio (negative scores) *versus* fields with high P, N, K and clay contents (positive scores) (Figure 2.3B). We did not observe relationships between soil parameters and agronomic classification on this first axis (Figure 2.3A). The second axis (relative inertia = 21.9%) opposed fields with high Ca, Mg, Pi and CEC contents (positive scores) *versus* fields with high total C and N, fine silt contents, Ca/Mg ratio and pH_{KCl}.

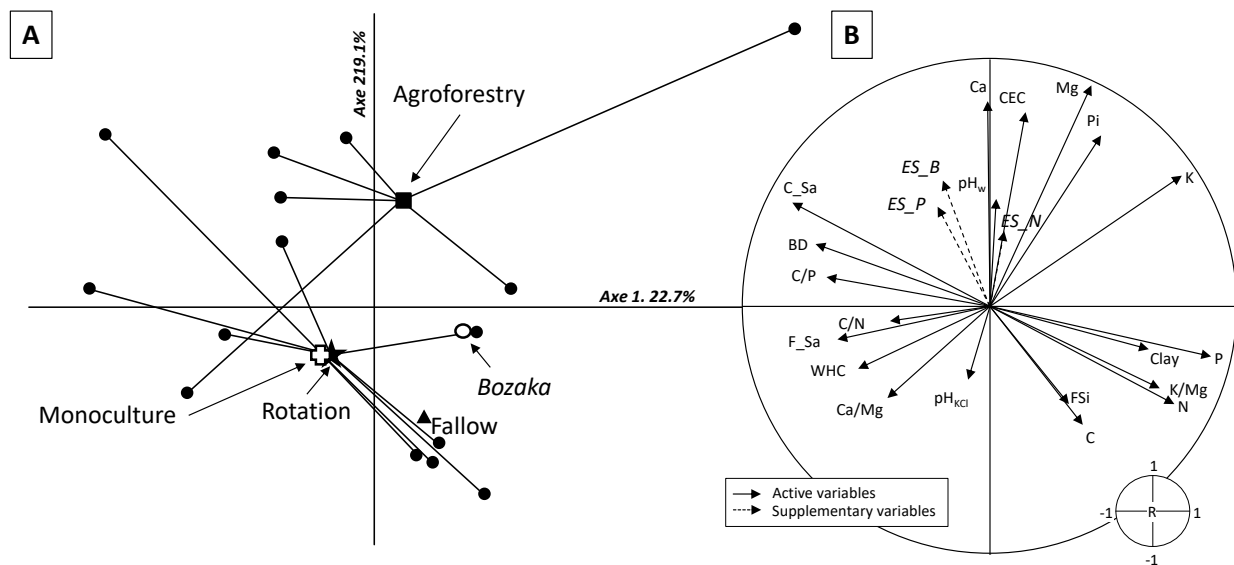


Figure 2.3: Principal Component Analysis (PCA2) performed on soil parameters. (A) Agronomic factor ordination with black square, black star, empty cross, black triangle and empty circle as barycentres for "Agroforestry", "Rotation", "Monoculture", "Fallow" and "Bozaka", respectively. Black circle are individuals on the factorial map. **(B)** Circle of correlations with active (full vectors) and supplementary (dotted vectors) variables. Ca: Soil Calcium, CEC: Soil cation exchange capacity, Mg: Soil Magnesium, Pi: Inorganic phosphorus, K: Soil Potassium, P: Soil total Phosphorus, Clay: Soil Clay fraction, K/Mg: soil

K:Mg ratio, N: Soil total Nitrogen, FSi: Soil Fine silt fraction, C: soil total Carbon, Ca/Mg: soil Ca:Mg ratio, WHC: Soil water – holding capacity, F_Sa: Soil Fine sand fraction, C/N: Soil C:N ratio, C/P: Soil C:P ratio, BD: Bulk density, C_Sa: Soil coarse sand fraction. "ES_B", "ES_N" and "ES_P" refers to Cohen's d effect size for rice biomass, N and P amount, respectively.

3.3 Effects of *Acrobeloides* sp. on plant growth

As shown in figure 2.4, the effects of the bacterivorous nematodes on shoot and root biomasses measured with Cohen's d effect size, were variable (positive, neutral or negative) according to fields.

Acrobeloides sp. significantly increased shoot biomass in ten of the seventeen fields with an average positive effect of 35% more than the control. More precisely, *Acrobeloides* sp. had a significant positive effect on shoot biomass in soil cores sampled from fields fertilized with ashes or crop residues, and characterized by the presence of trees (Figure 2.4A). The nematodes significantly increased shoot biomass for F1, F3, F4, F5, F6, F7, F9, F11, F12 and F13, but the magnitude of their Cohen's d differed. For instance, the effect size for F1 was very large ($d= 1.86$), whereas the effect size for F5 was small ($d= 0.38$). On the other hand, the effect of bacterivorous nematodes on shoot biomass was significantly negative for three of the seventeen fields, with a mean negative effect around 19% less than control. Those fields were characterized by the presence of legumes and mostly corresponded to crop rotation. The bacterivorous nematodes significantly decreased shoot biomass for F8 ($p\text{-value}= 5.36E^{-04}$), F10 ($p\text{-value}= 4.86E^{-03}$) and F15 ($p\text{-value}= 2.89E^{-04}$) with a large effect size. The effect was positive, but non-significant, for bozaka.

Concerning the root biomass, *Acrobeloides* sp. had a significant positive effect for seven of the seventeen fields resulting in average of +33% more root biomass than the control (Figure 2.4B). We noted that the nematodes significantly increased root biomass for F1 ($p\text{-value}= 2.17E^{-04}$) with a huge effect size ($d= 2.21$), and also for F2 ($d= 0.82$), F3 ($d= 0.71$), F4 ($d= 1.05$), F6 ($d= 1.15$), F7 ($d= 0.84$) and F11 ($d= 0.83$). The effect of *Acrobeloides* sp. was significantly negative for five of the seventeen fields resulting in 25% less than the control. The bacterivorous nematodes *Acrobeloides* sp. significantly decreased root biomass, with small to huge effect size, for F8 ($p\text{-value}= 3.33E^{-04}$), F10 ($p\text{-value}= 2.66E^{-03}$), F14 ($p\text{-value}= 2.23E^{-02}$), F16 ($p\text{-value}= 2.87E^{-02}$), and bozaka ($p\text{-value}= 2.70E^{-03}$). The effect size was small for F16 ($d=-$

0.38), medium for F14 ($d=-0.62$) and bozaka ($d=-0.65$), very large for F8 ($d=-1.35$) and huge for F10 ($d=-2.67$).

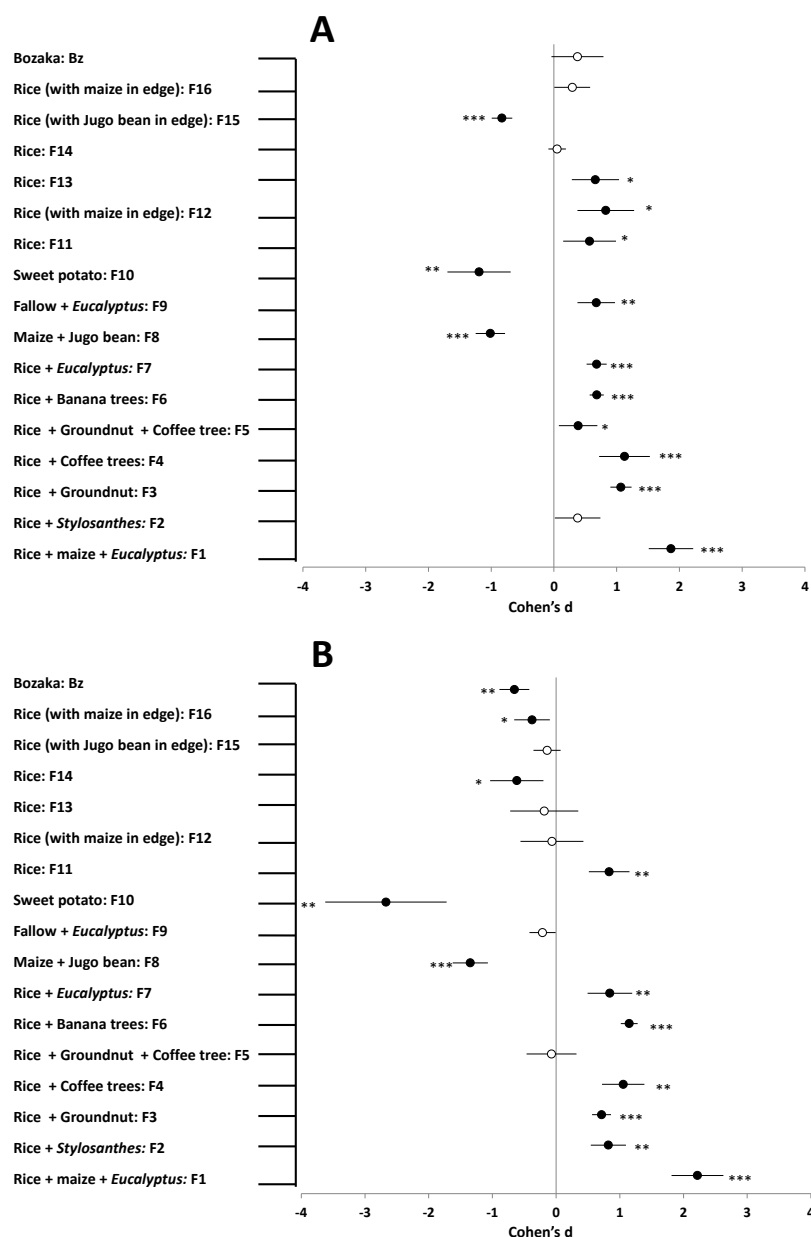


Figure 2.4: Mean effect size of *Acrobeloides* sp. on rice shoot biomass (A) and root biomass (B) after 40 days of growth in soil cores originating from different agricultural fields (table 2.1). White and black circles indicate significant (different from zero) and non-significant mean effect size (Esm) respectively: *p-value<0.05; **p-value <0.01; ***p-value <0.001. Horizontal bars correspond to 95% confidence intervals.

The two-way ANOVA showed that the root biomass was affected by the "field" effect and by the interaction between the factors "field" and "trophic level (-nem, +nem)" and not by the "trophic level" alone (Table 2.2). The shoot and plant total biomass were affected by "field" effect.

Table 2.2: Statistics (F- and p-values) of a two-way ANOVA performed on plant final dry biomass after 40 days of co-inoculation with "field" and "trophic level" as factors.

Factors	Plant dry biomass		
	Shoot biomass	Root biomass	Plant total biomass
Field (F)	20.670***	4.322***	10.163***
Trophic level (T)	6.651*	0.028	1.694
F × T	1.401	2.129*	1.938

*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001

3.4 Effects of *Acrobelloides* sp. on plant N and P nutrition

The effects of *Acrobelloides* sp. on plant nutrition (total N and P amount) were also variable (positive, neutral or negative) according to fields (Figures 2.5).

Acrobelloides sp. significantly increased rice total P amount in nine of the seventeen fields with an average positive effect of 62% more than the control. More precisely, the effect of the bacterivorous nematodes was significantly positive for fields F1, F2, F3, F4, F5, F6, F9, F11 and F13 (Figure 2.5A). The effect size was very large for F3 (d= 1.53) and medium for F2 (d= 0.62). *Acrobelloides* sp. had a significant negative effect for six of the seventeen fields resulting in average of 30% less total P amount than the control. The bacterivorous nematodes significantly decreased rice total P amount for the microcosms from fields under rice monoculture system (F14, F15 and F16), or where rice is not the actual crop (F8 and F10).

Acrobelloides sp. significantly increased rice total N amount in seven of the seventeen fields with an average positive effect of 39% more than the control. More precisely, the effect of the bacterivorous nematodes was significantly positive for F1, F2, F3, F4, F6, F7 and F12 (Figure 2.5B). The effect size was very large for F2 (d= 1.94) and medium for F12 (d= 0.52). The effect of the bacterivorous nematodes was significantly negative for five of the seventeen fields with a mean negative effect around 19% less than the control. More precisely, *Acrobelloides* sp. significantly decreased rice total N amount, with medium to large effect size, for the microcosms from fields under rice monoculture system (F14, F15 and F16) or characterized by the fact that rice is not the actual crop (F8 and F10).

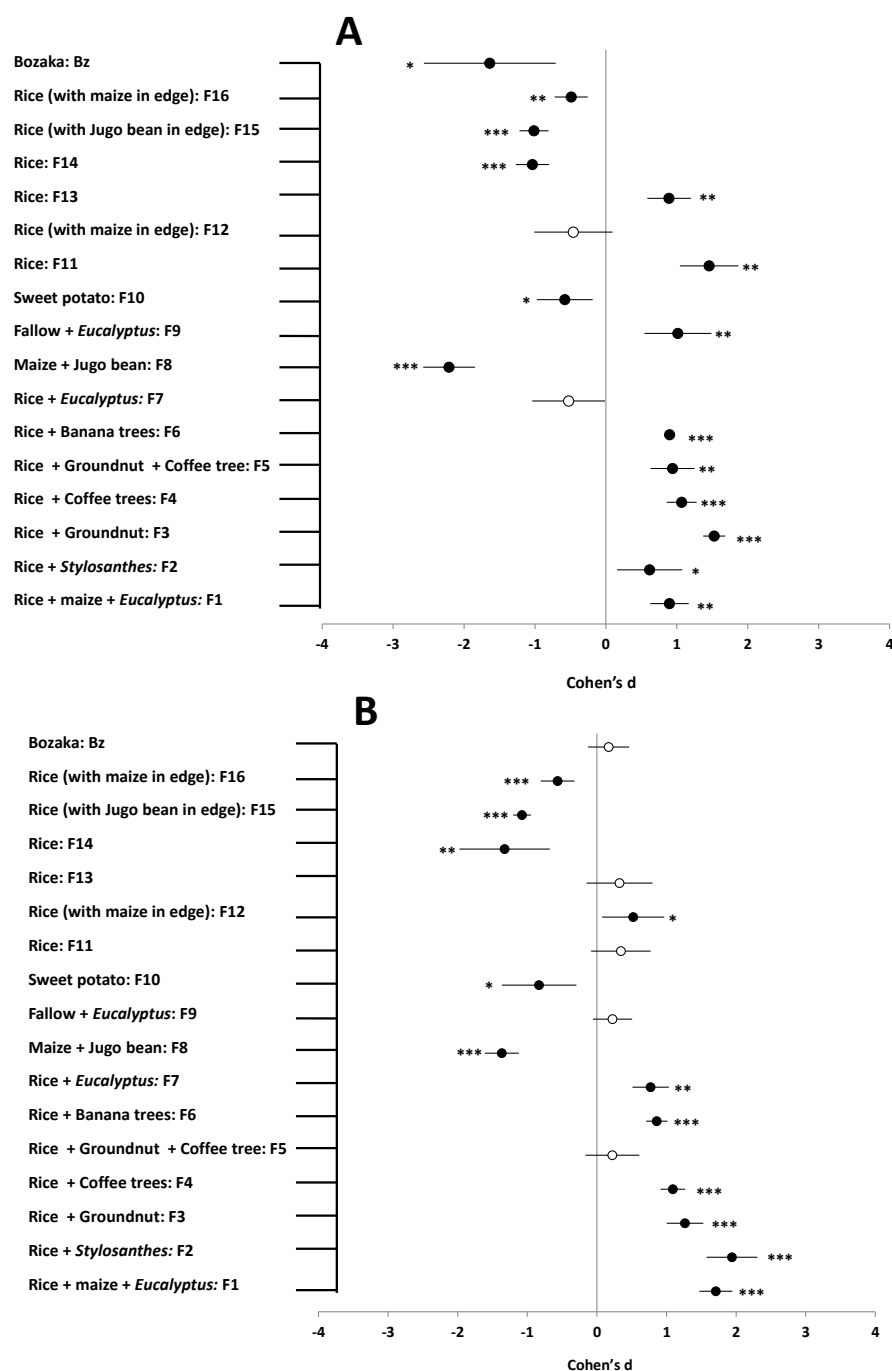


Figure 2.5: Mean effect size of *Acrobeloides* sp. on rice total P (A) and total N (B) amount after 40 days of growth in soil cores originating from different agricultural fields (table 2.1). White and black circles indicate significant (different from zero) and non-significant mean effect size (Esm) respectively: *: p value<0.05; **: p value <0.01; *: p value <0.001. Horizontal bars correspond to 95% confidence intervals.**

The two-way ANOVA showed that the total N and P amount in plant tissues at the end of the experiment were affected by the "field" effect and by the interaction between the factors "field" and "trophic level (-nem, +nem)" and not by the "trophic level" effect alone (Table 2.3).

Table 2.3: Statistics (F- and p-values) of a two-way ANOVA performed on total nitrogen and total phosphorus in plant tissue after 40 days of co-inoculation “field” and “trophic level (-nem; +nem)” as factors

Factors	Plant N	Plant P
Field (F)	11.826***	13.651***
Trophic level (T)	3.292.	0.743
F × T	2.390**	2.643**

*p < 0.05; **p< 0.01; ***p< 0.001

3.5 Final density of *Acrobelloides* sp.

After 40 days of growth, we did not observe nematodes in the controls ("-nem") suggesting that no contamination occur during the incubation. As shown in figure 2.6, the final density of *Acrobelloides* sp. was significantly affected by fields (p-value <2e⁻¹⁶). The densities were higher in the fields sampled in March 2017 (around 63 individuals per g dry soil) in comparison to 2016 (around 4 individuals per g dry soil). The density of nematodes was highest in F5 (around 110 individuals per g dry soil) and lowest in bozaka (3 individuals per g dry soil).

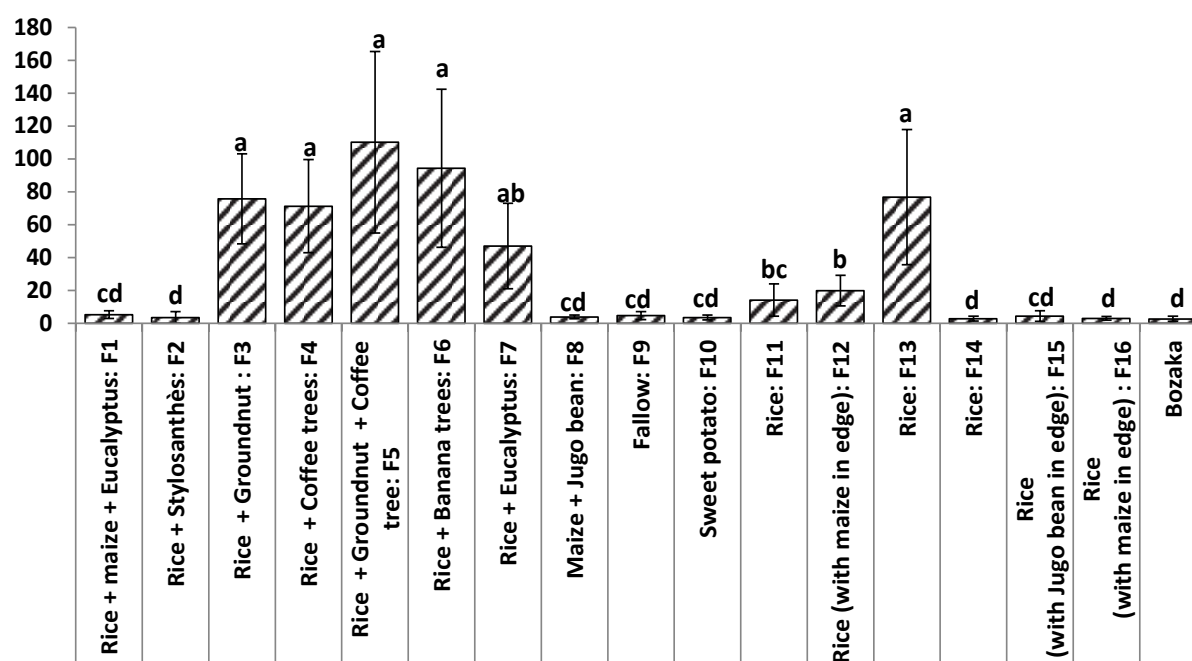


Figure 2.6: Final number of nematode per gram of soil. Hatched bars are the means (n=5) with standard deviation. Different letters indicate significant differences at P<0.05 (one-way ANOVA followed by post hoc Tukey HSD test).

3.6 Agronomical and soil abiotic parameters as potential predictors of the mutualistic activity of *Acrobeloides* sp. on plant functions

Three PLS-R models were performed with the effect size of the nematodes on the plant functions (Cohen's d) as the response variable (Figure 2.7, Figure 2.8, and Figure 2.9). The three PLS-R models included the eight agronomic variables and the twenty-two pedological variables.

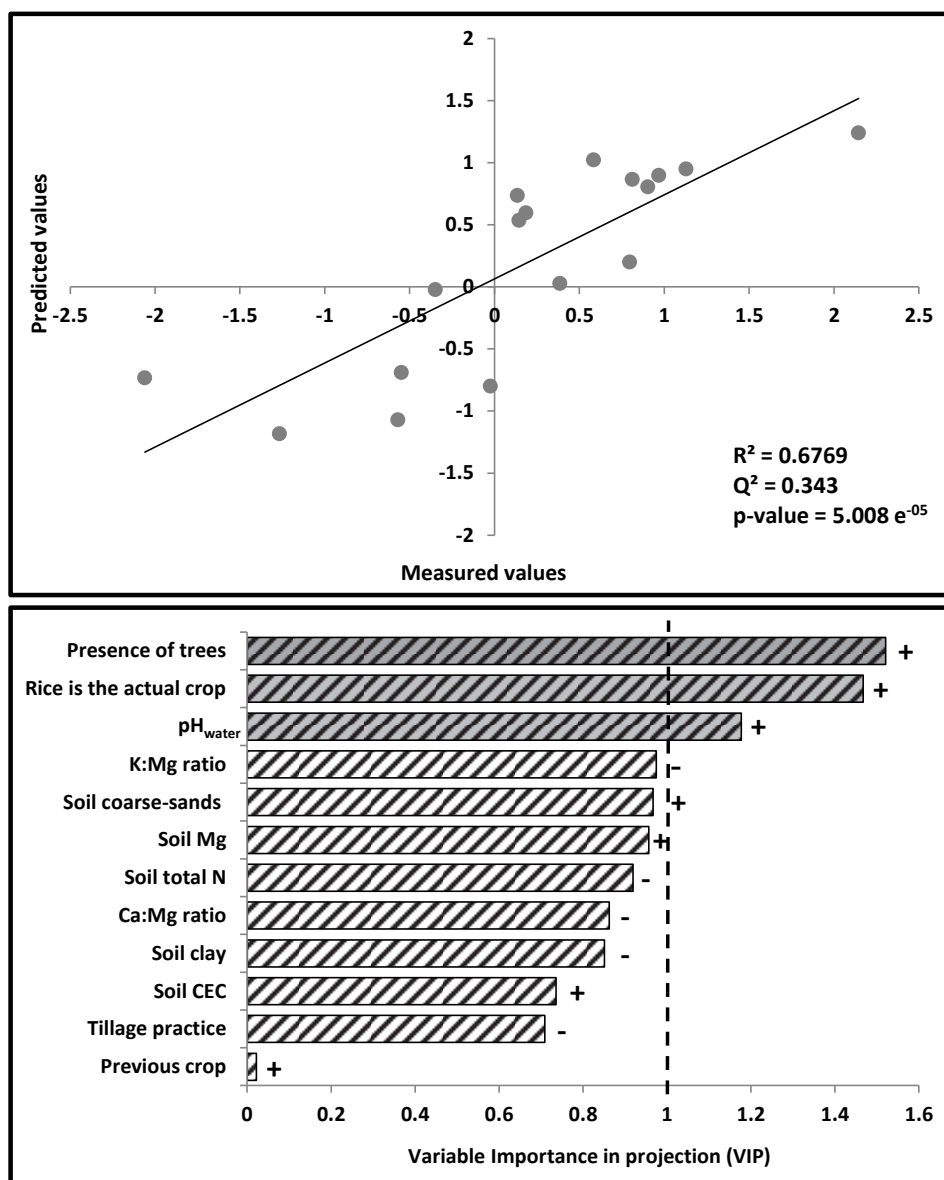


Figure 2.7: Prediction of the effect of *Acrobeloides* sp. on total biomass of rice from the PLS-regression model using both agronomic and soil abiotic variables. R^2 corresponds to the coefficient of correlation between the measured and predicted values. Signs "+" and "-" mean that the input variables influence positively or negatively the target variables.

The first model explained 67.7% of the effect of *Acrobeloides* sp. on plant total biomass and showed intermediate goodness of prediction ($Q^2 = 0.343$) (Figure 2.7). "Presence of trees", "Rice is the crop at the sampling date" and "pH_{water}" were the best predictors for plant total biomass (Figure 2.7). The variables that had the highest Variable Importance in Projection (VIP) values were "presence of trees" for the agronomic variables (1.5206) and "pH H₂O" for the soil abiotic ones (1.117). The effect on plant total biomass increased with increasing values of pH_{H₂O}. The presence of trees in the fields also increased the effect of *Acrobeloides* sp. on plant total biomass.

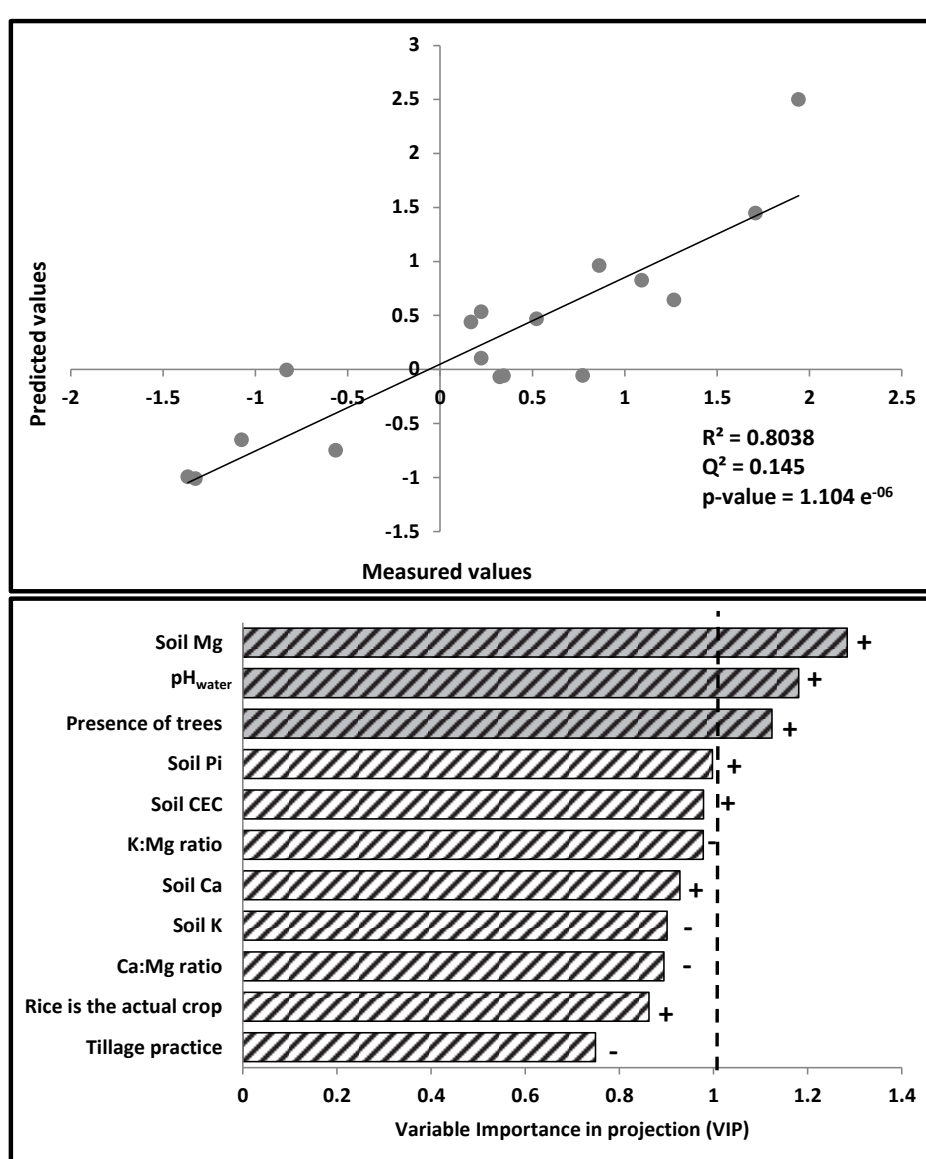


Figure 2.8: Prediction of the effect of *Acrobeloides* sp. on rice total nitrogen from the PLS-regression model using both agronomic and soil abiotic variables. R^2 corresponds to the coefficient of correlation between the measured and predicted values. Signs "+" and "-" mean that the input variables influence positively or negatively the target variables

The second model explained 80.4% of the effect of *Acrobeloides* sp. on plant total N amount and showed lower goodness of prediction ($Q^2 = 0.145$) (Figure 2.8). "Soil Mg", "pH_{water}" and "Presence of trees" were the best predictors for plant total nitrogen (Figure 2.8). The variables that had the highest Variable Importance in Projection (VIP) values were "presence of trees" for the agronomic variables (1.124) and "Soil Mg" for the soil abiotic ones (1.284). The effect on plant total N amount increased with increasing values of soil Mg content and pH_{H2O}. The presence of trees in the fields also increased the effect of *Acrobeloides* sp. on plant total N amount.

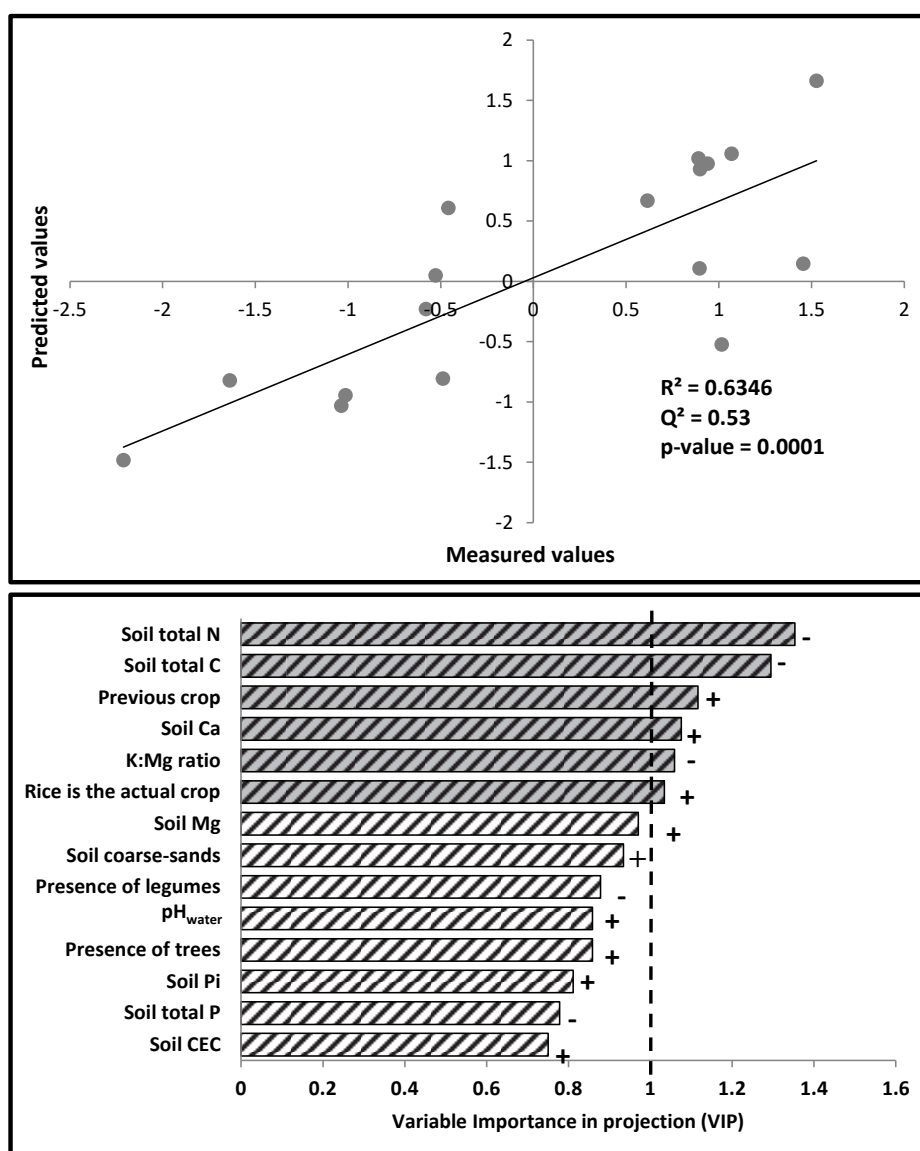


Figure 2.9: Prediction of the effect of *Acrobeloides* sp. on rice total phosphorus from the PLS-regression model using both agronomic and soil abiotic variables. R^2 corresponds to the coefficient of correlation between the measured and predicted values. Signs "+" and "-" mean that the input variables influence positively or negatively the target variables

The third model explained 63.4% of the effect of *Acrobelloides* sp. on plant total P amount and showed high goodness of prediction ($Q^2 = 0.53$) (Figure 2.9). "Soil total N", "Soil total C", "Previous crop", "Soil Ca", "K:Mg ratio", and "Rice is the actual crop" were the best predictors for total plant phosphorus (Figure 2.9). The variables that had the highest VIP values were "previous crop" for the agronomic variables (1.117) and "Soil total nitrogen" for the soil abiotic ones (1.3534). The effect on plant total P amount increased with decreasing values of soil total N, soil total C and K:Mg ratio. On the other hand, the effect increased with increasing values of Calcium.

3.7 Development of indicators

We constructed three indicators, one for each function, namely "I-Banema-B", "I-Banema-N" and "I-Banema-P" for the mutualistic activity of *Acrobelloides* sp. on rice biomass, N and P uptake, respectively. For that purpose, we firstly selected the best models based on their coefficient of determination (R^2) and goodness of prediction (Q^2) values. Then, we selected the variables easy-to-measure in order to have an efficient and effective indicator. For the effect size on rice N and P nutrition, we found three soil parameters (pH, CEC, total N) which allowed having good prediction. For the effect size on plant biomass, we found two agronomic variables (trees and rice as the actual crop) and one soil abiotic parameter (pH). Using the unstandardized parameters from the PLS models, with constructed the following indicators:

- (i) I-Banema-B= $-10.3 + (\text{Tree} \times 0.91) + (\text{Rice} \times 1.06) + (\text{pH} \times 1.86)$
- (ii) I-Banema-N= $-11.5 + (\text{pH} \times 2.34) + (\text{CEC} \times 0.65) + (\text{N} \times -0.84)$
- (iii) I-Banema-P= $-10.9 + (\text{pH} \times 2.19) + (\text{CEC} \times 0.61) + (\text{N} \times -0.78)$

The R^2 values of the models were 0.74, 0.70, and 0.46 for I-Banema-B, I-Banema-N and I-Banema-P, respectively. The Q^2 values were 0.65, 0.42 and 0.42 following the same order. The cross-validation standard error was 11%, 16% and 21% of Cohen's d range (max-min values) while the RPD ratio which was 2.0, 1.0 and 1.1 for I-Banema-B, I-Banema-N and I-Banema-P, respectively. The RPD ratio is the ratio of standard deviation to standard error and is hoped to be high (low error with respect to variability). In soil science, the accuracy of the models is considered good when $\text{RPD} > 2$ and acceptable when $\text{RPD} > 1.6$ (Chang et al.,

2001; Dunn et al., 2002). Here, only the model predicting *Acrobelloides* sp. effects on plant biomass is considered as good and we thus propose to use only this indicator (I-Banema-B).

4. Discussion

4.1 Diversity of the upland rice systems

We sampled fields with diverse agronomic characteristics. The seventeen fields can be gathered in five representative groups of farm management practices in our study area: agroforestry (F1, F2, F4, F5, F6 and F7), rotation (F3, F8, F10, F12 and F13), monoculture (F11, F14, F15 and F16), fallow (F9) and bozaka (F17). The second Principal Component Analysis (PCA2) performed on soil parameters showed a large dispersion in soil abiotic characteristics between the 17 fields, even if all the fields sampled were on Ferralsols. We can thus conclude that our final field sampling fits well the criteria we set initially, namely to select various upland rice agrosystems on Ferralsols.

4.2 I-Banema assay: *Acrobelloides* sp. – effects on *Oryza sativa* plant growth and nutrition

In our study, we showed that the effects of *Acrobelloides* sp. on rice plant functions were variable (positive, neutral or negative) according to the fields. *Acrobelloides* sp. had significant positive and negative effects on rice growth for 50% and 23% of the fields, respectively. The mean overall effects of *Acrobelloides* sp. on rice shoot and root biomass were around 19% and 5%, respectively, more than control. In a meta-analysis, Trap et al. (2016) reported larger effects of bacterivores (nematodes and protists) on plant growth. They showed that bacterivores significantly increased shoot and root biomass with an average positive effect of 27% and 21%, respectively, in comparison to control. They mostly reported positive or neutral effect of bacterivores on plant growth while negative effects on plant shoot and root biomass were only 3% and 4%, respectively, of their observations. However, it is important to precise that the data used in this meta-analysis came from studies that were conducted under controlled experimental conditions, with sieved soil, liquid culture or agar.

Acrobelloides sp. had significant positive and negative effect on rice plant nutrition (N and P)

for 47% and 32% of the fields, respectively. The mean overall effect of *Acrobeloides* sp. on rice total N amount and P amount were around 13% and 21%, respectively, more than control. Again, Trap et al. (2016) reported greater bacterivore effects on the total N and P amounts in shoots and roots. They found that bacterivores increased the shoot total N amount, root total N amount, shoot total P amount and root total P amount by 59, 28, 38 and 55% compared to control, respectively. Indeed, they reported overall positive effect of bacterivores on plant total P amount while negative effects on plant total N amount have been reported only 3% of their observations.

Finally, based on the mean effect size, we noticed that the use of intact soil cores did not result in completely different findings in comparison to the meta-analysis quoted earlier. However, the variance of the effects is larger in our study, with more negative and null effect sizes. The intact soil core method tried to mimic the field conditions as near as possible, including the heterogeneity in the distribution of soil nutrients (García-Palacios et al., 2012). The use of sieved soil, agar or liquid culture results in more homogeneous experimental conditions, likely to promote less variable patterns. Indeed, these simplified designs facilitate the survival and the dispersal rate of the nematodes. Thus, our method revealed that the effect of bacterial-feeding nematodes on plant growth and nutrition (N and P) may be more variable as expected from the literature according to environmental conditions.

4.3 Predictors of the I-Banema assay

The first PLS model showed that pH_{water} was the best predictor of the effect of *Acrobeloides* sp. on plant total biomass. More precisely, the effects of *Acrobeloides* sp. on plant total biomass increased with increasing value of pH. Indeed, pH is a regulatory factor of soil nutrient availability (Schachtman et al., 1998; Zou et al., 2016). Nutrients released by bacterivores were either absorbed by plants or re-immobilized within the microbial biomass or adsorbed to soil constituents according to pH (Ferris et al., 1997). For instance, the amount of orthophosphate (Pi) retained in the exchange sites by adsorption increases with decreasing values of pH (Plassard et al., 2015). Thus, when pH is (relatively) high, soil nutrients are more available for plants and microbes. We thus expected high effect of bacterial-feeding nematodes on nutrient availability when the soil pH is high (above 6).

We also showed that *Acrobelloides* sp. mostly increased plant biomass and total N amount in the microcosms from fields under agroforestry. Trees are known to improve soil porosity (Angers and Caron, 1998; Jones et al., 1997) by creating macropores with possible increasing effects on the nematodes dispersal rate, especially in clay soils. It is thus possible that bacterivorous nematodes prospected more areas that would be inaccessible in the absence of tree roots. Indeed, the final density of *Acrobelloides* sp. was significantly explained by the percentage of coarse sand in the soil (p-value: 2.136×10^{-6}) (Figure 2.10). The particle size distribution of the agroforestry fields were : clay : 42% (-4% compared to the other fields) ; fine silt : 22% (+7%) ; coarse silt : 6% (+11%) ; fine sand : 8% (-18%) ; coarse sand : 22% (+7%). However, soil particle size has been classed as an “inherent soil quality parameter”, which is intimately linked to pedogenetic processes (Salome et al., 2014), in contrast to “dynamic parameters” which are likely to vary according to agricultural practices. It is unlikely that the presence of trees changed the fraction of sand in the soil. Furthermore, the bulk density was not affected by the presence of trees, suggesting that other factors were involved.

On the other hand, Pardon et al. (2017) showed that the presence of tree increase soil carbon and nutrient (N, P, K and Mg) concentration (mg (kg dm)^{-1}), resulting from the input of leaf litter. Indeed, trees are known to contribute to soil organic matter dynamics through their capacity to modify soil properties (soil organic matter stock, CEC, exchangeable cations) (Gruba and Mulder, 2015). But these modifications are dependent on trees species (Augusto et al., 2002; Finzi et al., 1998). It is thus possible that the microbial biomass and activity near the tree roots will improve with the high levels of carbon and nutrient availability in soil. Therefore, the presence of tree will maximize *Acrobelloides* sp. positive effects on plant functions by releasing the nutrient stored in the microbial biomass near plant roots.

The second PLS model showed that the effect of *Acrobelloides* sp. on plant total N amount increased with increasing values of pH_{water} and Mg content. Plant N nutrition is a strong factor of pH changes (Plassard et al., 2015). Indeed, plant ammonium (NH_4) nutrition causes soil acidification (absorption of an excess of cations) whereas plant nitrate (NO_3) nutrition causes soil alkalization (absorption of an excess of anion) (Plassard et al., 2015). The effect of *Acrobelloides* sp. on rice N uptake was maximized by (relatively) high values of pH. It is thus possible that *Acrobelloides* sp. improved plant N acquisition through high nitrate availability

especially in soil with high pH values. Concerning Mg, it is crucial element for the uptake of N, especially nitrates (Grzebisz et al., 2010). Indeed, the hydrogen pump efficiency requires high H⁺-ATP-ase activity, which depends in turn on Mg²⁺ as an enzyme cofactor. Therefore, application of fertilizers containing Mg in the fields should improve the efficient use of the soil available N and, consequently, increase root system size (Grzebisz, 2013). The root growth will promote the microbial growth and activity, and by releasing the nutrients stored in the microbial biomass, the bacterial-feeding nematodes activity will be maximized with high Mg content values.

In contrast to the two previous models, the soil pH, the cations content or the presence of trees were not good predictors of plant P uptake induced by nematodes in the last model. Rather, the third PLS model showed that the effects of *Acrobeloides* sp. on plant total P amount increased with decreasing values of soil total N and C amounts. Soil total C amount is a limiting factor of microbial growth and activity (Ferris et al., 1998). Thus, with high soil total carbon amount, the largest part of nutrients released by bacterivores may be rapidly re-immobilized within the microbial biomass (Ferris et al., 1997), reducing the amount of nutrients available for plants. We also found that “the previous crop” was a good predictor for the effect of *Acrobeloides* sp. on plant total P amount. The quantity and type of fertilizers used by the farmers depend on the type of crop. The addition of crop residues stimulated bacterial growth by increasing the availability of labile carbon derived during initial phases of litter decomposition (Bonkowski and Clarholm, 2012). Thus, more amounts of nutrients will be stored in the microbial biomass, potentially unlocked by the activity of the bacterivores (Clarholm, 2005; Kuikman et al., 1991).

4.4 *Acrobeloides* sp. survival rates

In savanna (bozaka) of the highlands of Madagascar, Villenave et al. (2009) reported ~7 individuals of nematodes per gram of dry soil, including ~3 bacterivores. In our assay, we inoculated 10 nematodes per gram of dry soil in each soil core (“+nem” treatments), thus about three times the natural density. At the end of the experiment, the density in the soil cores was highly variable according to fields. We found between 4 and 110 individuals per gram of dry soil. The lowest values of final density of *Acrobeloides* sp. were counted in the soil cores from the fields sampled in 2016. It is thus possible that the difference of

nematodes densities between the two campaigns was due to changes in microclimatic conditions because the soil cores were not incubated in a greenhouse. For the first campaign (February to April 2016), the temperature was 17-25°C, the mean humidity was 91% and the cloud coverage was 51%. For the second campaign (April and May 2017), the temperature was 19-23°C, the humidity was 74% and the cloud coverage was 25%. In both campaigns, the temperature reached the temperature niche breadth for *Acrobelloides* sp. ranging from 15 to 30°C (Anderson and Coleman, 1982). Moreover, *Acrobelloides* nematodes, in axenic culture, were able to reproduce from 20 to 32°C (Nicholas, 1962). But, the range of temperature adapted to the reproduction of *Acrobelloides* may depend on the geographic regions from where the species were isolated (Venette and Ferris, 1997).

Despite climate, an important soil parameter may explain the survival rate of the nematode: the soil texture (Ettema, 1998). The soil particle size distribution of the fields sampled during the second campaign were: clay: 38% (-21% compared to the first campaign); fine silt: 19% (-17%) ; coarse silt: 6% (+6%) ; fine sand: 9% (+14%) ; coarse sand: 28% (+83%). Thus, globally, the soil texture was coarser in the second campaign in comparison to the first one. And as shown by Jiang et al. (2017), the average number of total nematodes increases with increasing aggregate size. A low soil porosity prevents the nematodes' dispersion in the soil, and this inability to explore other niches rich in bacteria can result in a decrease of the population of nematodes (Trap et al., 2015). In fact, the abundance of bacterivorous nematodes is positively correlated with the bacterial abundance (Jiang et al., 2017), this is because the predation increases the total grazer biomass (Griffiths, 1986). It is thus possible that the survival rate of *Acrobelloides* sp. was mostly related to change in soil texture than climate change during the two campaigns. In our study, we noted that the final density of *Acrobelloides* sp. was significantly explained by the percentage of coarse sand in the soil ($R^2=0.78$) (Figure 2.10), supporting this hypothesis.

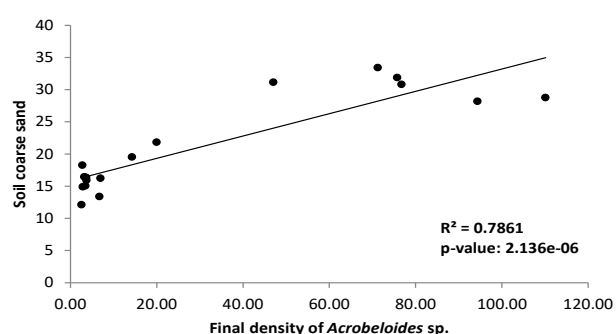


Figure 2.10: Regression between the final density of *Acrobelloides* sp. (response variable) and the percentage of coarse-sands in the soil (explicative variable)

It is questionable if the seasonable variations altered the efficiency of the method to reveal the mutualistic activity of the nematodes, especially in the attempt to compare fields. In others words, have we made the mistake of not incubating the soil cores in standardized climatic conditions? First, we believe that miming both field soil and climatic conditions is crucial within our philosophy to approach the realistic conditions and depart from the methods already achieved in the past. Miming daily climatic (temperature, humidity, photosynthetic active radiation, etc.) in a greenhouse is hardly possible. Second, despite changing in final nematode density, we did not find significant relationships between the effect size of *Acrobelloides* sp. on plant functions and the final density of *Acrobelloides* sp. (Figure 2.11), except for rice P amount but with a poor fit ($R^2 = 0.30$) (Figure 2.11B). It is therefore central to monitor the climatic conditions during the incubation and to measure the survival rate of the nematodes in order to interpret the results as accurately as possible. But it is also important to keep the incubation method outside the greenhouse and not under controlled conditions in order to take into account the low or strong daily climatic variations.

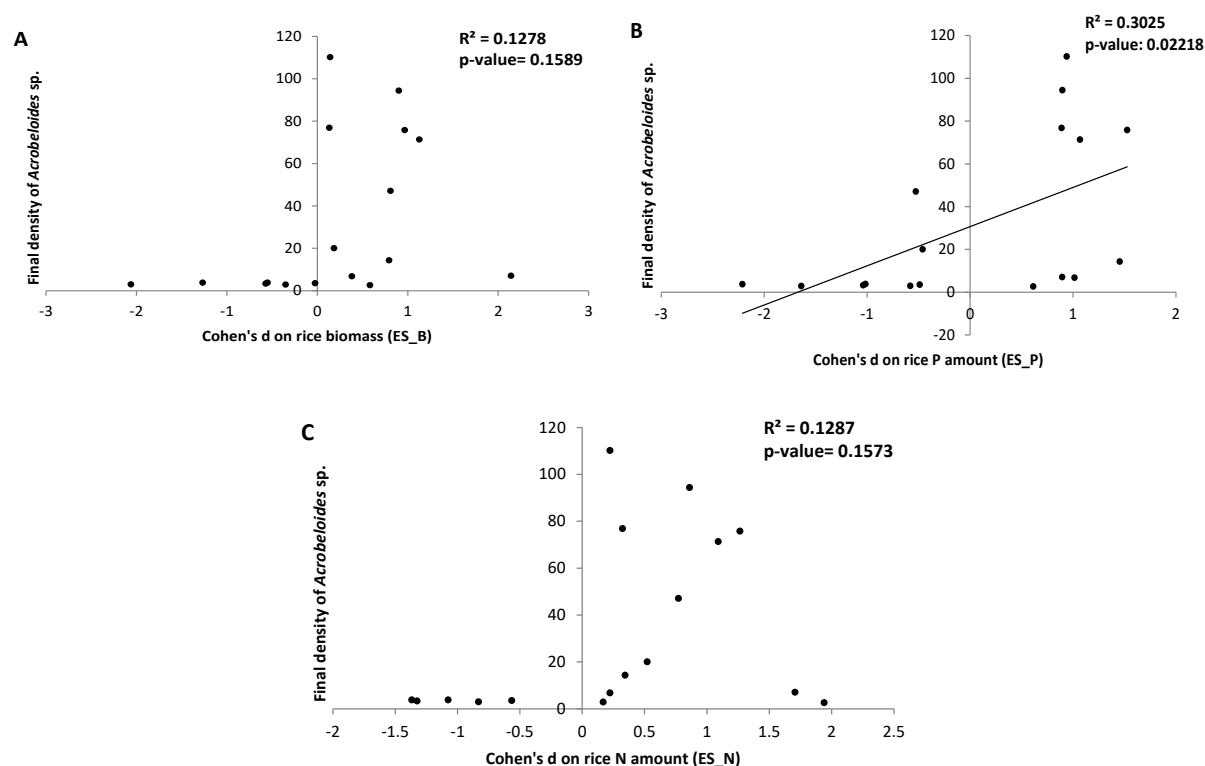


Figure 2.11: Regressions between the effect of *Acrobelloides* sp. on (A) rice total biomass, (B) rice P amount, and (C) rice N amount (response variables) and the final density of *Acrobelloides* sp. (explicative variable)

4.5 Development of indicators

We have to keep in mind that the I-Banema assay (Indicator of BActerivorous NEmatode Mutualistic Activity) requires time, specific materials and skills in experimentation and soil biology. This is the reason why we limited the total samples to 170 soil cores, reaching the limit of our seasonal analytical capacity. The identification of indicators based on rapid and cheap soil parameters appears as a smart way to increase our ability to characterize or monitor the mutualistic activity of nematodes. Several authors developed indicators to monitor soil quality based on total availability of nutrients (Bastida et al., 2008; Gil-Sotres et al., 2005). However, these indicators do not allow quantifying how far agricultural practices intensify ecological processes such as the soil microbial loop. For instance, high mineral N and P availability in soil measured by chemical extraction can result from high fertilization (anthropogenic source) rather than from high organic matter net mineralization (ecological source). This is why, using the PLS-R models, we tried to develop indicators of the effect size (Cohen's d) obtained from the I-Banema assay. These innovative indicators of the mutualistic activity of *Acrobelloides* sp. on rice functions would be promising tools to characterize the functional trajectory of the upland rice towards ecological or conventional intensification.

In order to limit error of interpretation according to the cross-validation standard error, we propose the following reading:

-  When the predicted Cohens' d value is lower than -0.3, the effect of *Acrobelloides* sp. is negative and the soil can be restored by organic amendments and pH must be corrected. Fallowing can also be recommended.
-  When the predicted Cohens' d value is comprise -0.3 and 0.3, the effect of *Acrobelloides* sp. is neutral. In this case, the organic (and possibly mineral) status of the soil should be corrected via input of high quality organic matter.
-  When the Cohens' d value is higher than 0.3, the effect of *Acrobelloides* sp. is positive and the soil organic fertility had to be maintained through timely input of organic amendment.

Of course, these indicators have to be used in the same pedoclimatic context (Ferralsols in 1300-1500 m asl with 17-21°C annual temperature).

5. Conclusion

To conclude, we found that the effects of *Acrobelloides* sp. on plant growth and nutrition were variable (positive, neutral or negative) according to field conditions. Driving the mutualistic activity of bacterivorous nematodes through specific soil practices in poor tropical soils is thus possible. Indeed, the effects of *Acrobelloides* sp. on plant growth and nutrition were highly dependent on both agronomic practices and soil abiotic variables. The practices intensifying the mutualistic activity of *Acrobelloides* sp. were those including crop associations, especially fields in agroforestry. Furthermore, high values of soil pH and Mg content increased the effects of *Acrobelloides* sp. on plant growth and nutrition. However, it would be interesting to conduct similar co-inoculation experiments with different levels of soil pH and Mg content in order to confirm if these parameters are key drivers of the mutualistic activity of the *Acrobelloides* sp. We have to keep in mind that the I-Banema assay requires time, specific materials and skills in experimentation and soil biology. This is the reason why we limited the total samples to 170 soil cores, reaching the limit of our seasonal analytical capacity. The identification of indicators of the mutualistic activity of nematodes based on rapid and cheap soil parameters appears as a smart way to increase our ability to characterize or monitor the functional trajectory of the upland rice towards ecological or conventional intensification. These innovative indicators proposed earlier seem promising tools but other campaigns should be conducted to increase the robustness of these indicators.

Acknowledgements

This work received support from the French state (Labex Agro: ANR-10-LabX-001-01), generated by the National Research Agency under the program "Future Investments". We are grateful to the "Institut de Recherche pour le Développement" (IRD) for having provided a PhD grant to P. Ranoarisoa through the "Allocation de Recherche pour une Thèse au Sud" (ARTS) program. We want to thank Sariaka Raharijaona and Hasina M. Ralalason for their laboratory assistance.

Supporting information 2.1: Soil abiotic characteristics of the seventeen fields

Variables	Units	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	Bz	Mean	CV
Clay fraction	%	38.4	58.6	25.4	34.3	47.1	46.0	34.1	38.0	39.5	50.3	45.4	40.4	27.9	58.9	52.8	56.8	37.7	43.0	23.6
Fine silt fraction	%	29.7	19.1	22.3	19.6	11.8	13.8	19.3	30.2	29.5	19.3	21.1	24.0	18.5	13.0	17.8	15.2	31.0	20.9	29.4
Coarse silt fraction	%	7.5	3.9	9.0	4.9	5.5	5.6	6.7	7.3	8.9	5.6	4.9	4.6	7.2	3.4	4.5	4.3	5.8	5.9	28.4
Fine sand fraction	%	8.2	6.2	11.4	7.7	6.9	6.4	8.7	8.2	8.6	9.9	9.1	9.2	15.6	8.2	9.0	8.6	7.3	8.8	24.7
Coarse sand fraction	%	16.2	12.1	31.8	33.4	28.8	28.2	31.1	16.3	13.4	14.9	19.5	21.8	30.8	16.4	15.9	15.0	18.2	21.4	34.8
Bulk density	g.cm ⁻³	1.01	0.95	1.21	1.12	1.15	1.15	1.09	0.98	0.99	0.96	1.17	1.04	1.19	1.04	1.06	1.07	1.22	1.08	8.17
Soil water - holding capacity	%	25.9	16.6	31.0	29.3	27.7	27.7	31.6	18.7	26.6	33.8	31.7	24.0	27.3	34.8	32.3	26.0	17.8	27.2	20.0
pH _{water}		5.3	5.2	5.3	5.1	4.9	4.9	5.0	4.6	5.1	5.0	5.0	5.0	5.2	4.7	5.0	5.0	5.4	5.0	4.0
pH _{KCl}		4.4	4.1	4.4	4.1	4.0	3.9	4.3	4.3	4.3	4.1	4.2	4.1	4.3	4.1	4.2	4.2	4.3	4.2	3.3
Potassium (K)	cmol+.kg ⁻¹	0.08	0.25	0.05	0.07	0.06	0.11	0.04	0.06	0.05	0.08	0.04	0.03	0.02	0.06	0.07	0.07	0.08	0.07	70.8
Calcium (Ca)	cmol+.kg ⁻¹	0.62	1.07	1.31	1.03	0.91	0.93	0.41	0.55	0.52	0.75	0.56	0.61	0.61	0.55	0.51	0.48	0.76	0.72	35.0
Magnesium (Mg)	cmol+.kg ⁻¹	0.36	0.58	0.32	0.33	0.37	0.35	0.16	0.17	0.19	0.25	0.19	0.26	0.22	0.15	0.15	0.15	0.28	0.26	43.0
K:Mg ratio		0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1	0.4	0.4	0.5	0.3	0.3	41.5
Ca:Mg ratio		1.7	1.8	4.2	3.1	2.4	2.7	2.5	3.2	2.7	3.0	2.9	2.3	2.7	3.7	3.3	3.3	2.7	2.8	21.4
Cation exchange capacity (CEC)	cmol+.kg ⁻¹	2.8	3.5	3.2	2.3	3.1	3.6	2.3	2.4	2.0	2.6	3.0	3.3	1.7	1.8	2.0	1.8	2.7	2.6	23.9
Total carbon (C)	g.kg ⁻¹	27.5	23.3	16.4	26.7	19.1	26.5	30.2	29.8	26.2	26.7	29.6	29.8	14.0	30.9	25.5	26.7	33.9	26.0	20.1
Total nitrogen (N)	g.kg ⁻¹	2.6	2.3	1.3	1.9	2.0	1.9	1.6	2.9	2.5	2.3	1.6	1.7	1.5	2.5	2.2	2.2	3.1	2.1	23.1
Total phosphorus (P)	g.kg ⁻¹	1.4	1.6	0.5	0.7	0.4	0.6	0.8	1.3	1.3	1.2	0.6	0.6	0.5	0.9	1.0	0.9	1.1	0.9	38.2
C:N ratio		10.8	10.2	12.3	14.0	9.5	13.9	19.1	10.4	10.7	11.7	18.2	17.4	9.5	12.5	11.7	12.3	11.0	12.7	23.4
C:P ratio		19.8	15.0	29.9	36.1	44.0	40.9	40.0	23.4	20.4	22.6	47.2	50.1	31.0	34.0	25.3	29.8	29.8	31.7	32.0
Inorganic phosphorus (Pi)	mg.kg ⁻¹	4.1	8.6	2.8	5.4	1.5	3.9	0.4	0.6	1.6	5.6	2.0	4.6	1.5	0.6	2.0	1.3	0.3	2.7	83.2
Number of nematodes the day of sampling	Ind.g ⁻¹	3.6	7.6	6.6	6.0	3.4	4.6	3.7	6.3	6.6	5.0	2.8	1.7	9.0	10.7	3.9	2.7	3.3	5.1	47.4

Supporting information 2.2: Selection of seventeen fields in the region of Itasy in Madagascar



F1: Rice (*Oryza sativa*) + *Eucalyptus* + Maize (*Zea mays*) (2016)



F2: Rice (*Oryza sativa*) + *Stylosanthes* + *Tephrosia* (2016)



F3: Rice (*Oryza sativa*) + Groundnut (*Arachis hypogaea*) (2017)



F4: Rice (*Oryza sativa*) + Coffee trees (*Coffea*) (2017)



F5: Rice (*Oryza sativa*) + Groundnut (*Arachis hypogaea*) + Coffee tree (*Coffea*) (2017)



F6: Rice (*Oryza sativa*) + Banana trees (*Musa*) (2017)



F7: Rice (*Oryza sativa*) + *Eucalyptus* (2017)



F8: Maize (*Zea mays*) + Jugo bean (*Vigna subterranea*) (2016)



F9: Fallow + *Eucalyptus* (2016)



F10: Sweet potato (*Ipomoea batatas*) (2016)



F11: Rice (*Oryza sativa*) (2017)



F12: Rice (with maize in edge) (2017)



F13: Rice (*Oryza sativa*) (2017)



F14: Rice (*Oryza sativa*) (2016)



F15: Rice (with Jugo bean in edge) (2016)



F16: Rice (with maize in edge) (2016)



Bz: Bozaka (2016)

III.Synthèse du chapitre 2

Les effets de la présence de *Acrobelloides* sp. sur la croissance et la nutrition du riz pluvial sont variables (positifs, neutres ou négatifs) en fonction des parcelles d'origine des carottes de sol.

- (i) Les effets de la présence de *Acrobelloides* sp. sur la croissance et la nutrition (N et P) du riz sont significativement positifs dans les carottes échantillonnées dans les parcelles en association, notamment avec des arbres.
- (ii) Les effets de la présence de *Acrobelloides* sp. sur la croissance du riz sont significativement négatifs dans les carottes échantillonnées dans les parcelles en rotation et caractérisées par la présence de légumineuses.
- (iii) Les effets de la présence de *Acrobelloides* sp. sur la nutrition (N et P) du riz sont significativement négatifs dans les carottes échantillonnées dans les parcelles en monoculture.

A l'aide de régressions PLS, nous avons identifié des leviers agronomiques et pédologiques qui stimulent l'activité mutualiste de *Acrobelloides* sp. L'association culturale, notamment les parcelles sous agroforesterie, stimule l'activité mutualiste de *Acrobelloides* sp. Les valeurs élevées de pH et de teneur en Mg augmentent les effets de *Acrobelloides* sp. sur les fonctions de la plante.

En utilisant les variables agronomiques et abiotiques du sol, nous avons développé trois indicateurs de la taille de l'effet (Cohen's d) de *Acrobelloides* sp sur les fonctions de la plante:

$$\text{Biomasse} = -10.3 + (\text{Présence d'arbre} \times 0.91) + (\text{Riz est la culture en place} \times 1.06) + (\text{pH} \times 1.86)$$

$$\text{N total} = -11.5 + (\text{pH} \times 2.34) + (\text{CEC} \times 0.65) + (\text{N total} \times -0.84)$$

$$\text{P total} = -10.9 + (\text{pH} \times 2.19) + (\text{CEC} \times 0.61) + (\text{N total} \times -0.78)$$

Afin de valider les leviers pédologiques il serait intéressant de mener la même expérience avec des niveaux de pH et de Mg différents. Il serait également intéressant de faire une troisième campagne d'échantillonnage pour valider les résultats que nous avons déjà obtenus et développer des indicateurs plus robustes.

CHAPITRE 3

Attractivité des nématodes bactériophages par la rhizosphère du riz en fonction des génotypes de riz pluvial



Variétés de riz pluvial sélectionnées par le CIRAD et le FOFIFA

CHAPITRE 3. Attractivité des nématodes bactérivores par la rhizosphère du riz en fonction des génotypes de riz pluvial

I.Présentation du chapitre 3

Lors des chapitres précédents nous avons vu que *Acrobelloides* sp. pouvait améliorer les fonctions de la plante via la boucle microbienne du sol. La boucle microbienne du sol repose sur la limitation en C des bactéries du sol. Ce carbone leur sera fourni par la coiffe de la racine qui se développe et va la rencontre des patchs de matière organique abritant les bactéries. Grâce au carbone fourni par la coiffe racinaire, les bactéries vont proliférer et libérer du CO₂ par respiration ce qui va attirer les nématodes bactérivores. C'est la présence conjointe des bactéries et des nématodes près des racines qui confère aux nématodes une activité mutualiste élevée. La localisation spatiale des nématodes dans le sol est donc un facteur important dans l'optique d'intensifier la boucle microbienne. Or, il a été montré que la composition et la quantité d'exsudats racinaires différaient d'une variété de riz à l'autre, avec des conséquences possibles sur la capacité des variétés à interagir avec les organismes rhizosphériques. La variété de riz utilisée par l'agriculteur est alors un levier agronomique important de la boucle microbienne. L'objectif de cette étude est de tester la capacité de la rhizosphère de huit variétés de riz pluvial à attirer *Acrobelloides* sp. Pour cela une expérimentation dans des boîtes de Pétri 90 mm à trois compartiments a été menée. Le premier compartiment (compartiment A) a été rempli avec 7 ml d'agarose (10 mg.L⁻¹), le second (compartiment B) avec 10 g de sol non adhérent aux racines et le troisième (compartiment C) avec 10 g de sol adhérent aux racines. Les compartiments B et C communiquent avec le compartiment A grâce à des portes. Cent nématodes (*Acrobelloides* sp.) ont été inoculés à l'extrémité supérieure du compartiment A, à égale distance des deux portes de communication. Nous avons mesuré la capacité du sol adhérent aux racines des huit variétés de riz pluvial à attirer *Acrobelloides* sp. en comptant le nombre de nématodes se dirigeant vers le compartiment rempli avec le sol adhérent aux racines après 16 h à 25°C.

II. Article 3: Attractancy of bacterivorous nematodes to root-adhering soils differs according to rice cultivars

Mahafaka Patricia RANOARISOA^{1, 2}

Eric BLANCHART²

Kirsten Vom BROCKE³

Alain RAMANANTSOANIRINA⁴

Mathilde SESTER⁵,

Claude PLASSARD⁶

Laurent CURNAC⁷

Jean TRAP^{1,2}

Published in "*Rhizosphere*"

Corresponding author: Jean Trap

IRD, UMR Eco&Sols, Laboratoire des Radio Isotopes, BP 3383, 101 Antananarivo, Madagascar

Tél : +261 (0)32.47.126.74

Email : jean.trap@ird.fr

¹ Laboratoire des Radio Isotopes, BP 3383, Route d'Andraisoro, 101 Antananarivo, Madagascar

² Eco&Sols, IRD, INRA, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

³ CIRAD, UR AGAP, SRR FOFIFA, BP 230, 110 Antsirabe, Madagascar

⁴ SRR FOFIFA, BP 230, 110 Antsirabe, Madagascar

⁵ CIRAD, UR AIDA, TA-B-115/02, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier, France

⁶ Eco&Sols, INRA, IRD, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

⁷ IRD, UMR Eco & Sols, LMI IESOL, Centre IRD/ISRA de Bel Air, BP 1386, Dakar, Senegal

Abstract

We tested the ability of root-adhering soils (RAS) from eight rice cultivars to attract a bacterivorous nematode (*Acrobeloides* sp.) living in a poor-nutrient soil in Madagascar. We showed that the ability of rice to attract bacterivorous nematodes in its rhizosphere is variable among cultivars. FOFIFA 172 was the cultivar with the highest attraction value, the lowest root biomass (RB) and the highest RAS:RB ratio and RAS respiration. In contrast, nematodes exhibited strong repellent response to W880 RAS. Also, nematode attractancy was not related to rice resistance against pests (blast rice disease and *Striga asiatica*) neither to cultivar ability to grow at specific altitude. Our results suggest a trade-off in carbon allocation between plant biomass and root exudation driving nematode attractancy and raise questions about the impact of plant breeding on cultivar ability to interact with soil mutualists such as bacterivorous nematodes. Further investigations are required into (i) variation in root exudate quantity and composition among the eight cultivars and (ii) the response of rice cultivars to bacterivorous nematode inoculation.

Keywords: Upland rice cultivar, *Acrobeloides* sp., Nematode attractancy, Ferrallitic soil, Madagascar

1. Introduction

Bacterivorous nematodes are key plant mutualists (Irshad et al., 2011; Mao et al., 2006; Trap et al., 2016). Their grazing activity stimulates bacterial growth, especially in the rhizosphere of plants where bacteria proliferate, which enhances the availability of nutrients for plant roots (Anderson et al., 1978; Bonkowski and Clarholm, 2012; Irshad et al., 2012). In nutrient-poor soils, the presence of bacterivorous nematodes in the vicinity of roots can significantly increase the competitive advantage of plants over bacteria regarding nutrients (Bjornlund et al., 2012; Trap et al., 2016).

Nematode behaviour is influenced by a wide variety of compounds (ions, amino acids, volatile organic compounds, vitamins, CO₂), as well as pH gradients and bacterial food (Anderson and Coleman, 1981; Grewal and Wright, 1992; Rasmann et al., 2012; Young et al., 1996). Bacterivorous nematodes move along a signal gradient towards the bacteria (Hallem et al., 2011; Rengarajan and Hallem, 2016). Such signals are found in the rhizosphere where root facilitates nematode movement (Trap et al., 2015) and root exudates promote bacterial proliferation (el Zahar Haichar et al., 2014) and subsequently attract nematodes (Bais et al., 2006; Horiuchi et al., 2005). In view of the fact that the amount and composition of root exudates varies according to the rice cultivar (Aulakh et al., 2001; Bhattacharyya et al., 2013), we hypothesized that the ability of rice to attract bacterivorous nematodes in its rhizosphere also varies according to the cultivar. We tested this hypothesis using an original three-compartment Petri dish experiment with eight upland rice cultivars growing in a poor-nutrient tropical soil in Madagascar and *Acrobeloides* sp. as a bacterivorous nematode model species.

2. Pot experiment

We sampled the first 10 cm of a Ferrallitic soil under natural savanna from Lazaina (18 °46'55 59 °S, 47 °32'46 3 °N, 1274 m altitude, Madagascar) in October 2016. The soil (sandy-clay texture, pH 5.5, C:N 16, Olsen P 4.7 mg.kg⁻¹) was air-dried until constant weight (7 days) and sieved at 2 mm. Eight upland rice cultivars (*Oryza sativa* L.) were selected in order to be representative of the large panel of rice cultivars used by farmers (Table 3.1): B22, FOFIFA 182, FOFIFA 172, FOFIFA 152, FOFIFA 154, NERICA 4, Chhromrong Dhan and WAB 880-1-32-1

-1-P2-HB-1.

Table 3.1: Agronomic criteria used in the selection of the eight upland rice cultivars

Rice cultivars	Selection criteria	Optimal altitude for cropping	Adoption by farmers ^a
B22	Cultivar susceptible to root parasites, Striga (<i>Striga asiatica</i>) and susceptible to rice blast disease	700–1200 m	Highly in some districts
FOFIFA 182 (F182)	Cultivar tolerant to blast rice disease	700–1200 m	Not yet distributed
FOFIFA 172 (F172)	Cultivar resistant to blast rice disease	1200–1650 m	Poorly
FOFIFA 152 (F152)	Cultivar susceptible to blast rice disease	1200 –1650 m	Abandoned
FOFIFA 154 (F154)	Cultivar susceptible to blast rice disease	1200–1650 m	Abandoned
NERICA 4 (N4)	Cultivar tolerant to root parasites, Striga (<i>Striga asiatica</i>)	700–1200 m	Highly in some districts
Chhromrong Dhan (CD)	Cultivar tolerant to rice blast disease, optimal culture at an altitude of 1650–1900 m.	1200–1900 m	Very highly
WAB 880-1-32-1-1-P2-HB-1 (W880)	Cultivar tolerant to blast rice disease	700–1200 m	Not yet distributed

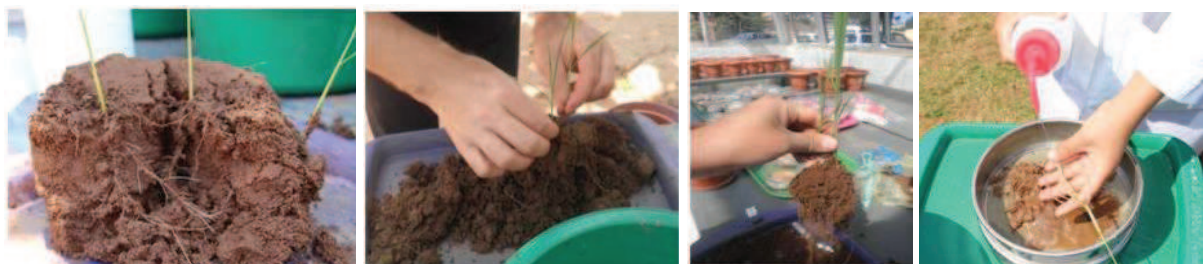
^asee Raboin et al. 2013; Raboin et al. 2014.

Forty-five pots containing 1 kg of dry soil were prepared (Photography 3.1). For each cultivar, three seeds were planted in each pot and five replicates were used. Pots without seeds were used as control. The soil moisture content was maintained at 80% of water-holding capacity. After 32 days of growth in a greenhouse (mean temperature 28.1 °C; mean and max PAR light 522 and 2378 $\mu\text{M m}^2 \text{s}^{-1}$ between 6:00 am and 6:00 pm), the plants were gently removed from the pot together with their soil (Photography 3.2). The plants were then held by hand at the shoot collar and dropped 30 cm high on a plastic tray before being lifted from the tray and placed on a 200 μm sieve. The soil remaining on the tray was removed.

The root-adhering soil (RAS) was carefully separated from the roots by washing over the sieve with sterile deionized water (constant volume). RAS was air-dried over 7 days before the Petri dish experiment. RAS sampling was carried out by the same person to ensure protocol reproducibility. The plant shoot and root were separated, dried at 60 °C for 48 hours and weighted. RAS respiration was measured by weighting 20 g of dry RAS, moistened at 80% of holding capacity and incubating over 7 days at 28 °C in the dark within 150 ml hermetic glass flasks (three replicates). At the end of the incubation, the total atmospheric CO₂ concentration was measured in all flasks using a micro-CPG (CP-4900, Varian, Middelburg, The Netherlands). Flasks without soil were used as control. RAS pH_{water} was measured after 30 mn of stirring in distilled water (1:2.5 soil:water ratio).



Photography 3.1: Pot experiment (October, 2015)



Photography 3.2: Root -adhering soil (RAS) sampling (November, 2015)

3. Petri dish experiment

Monoxenic populations in sterile Petri dishes of *Acrobelloides* sp. on *Escherichia coli* were obtained from Lazaina and maintained at 25 °C in the laboratory following the procedure described in Irshad et al. (2011). *Acrobelloides* is a common ubiquitous genus that dominates bacterivorous nematodes in upland rice systems in the Malagasy highlands (Djigal et al. 2012; Villenave et al. 2009). Before use in the Petri dish experiment, nematodes were removed from the breeding TSA plates (by washing the surface with sterile water) and transferred to a fine cellulose wadding paper placed in a Petri plate (90 mm diameter) with water during 48 h. Living nematodes will move from the filter paper into the water without agar pollution. Tri-compartment Petri dishes (90 mm diameter) were used to test the nematode attractancy of RAS (Figure 3.1).

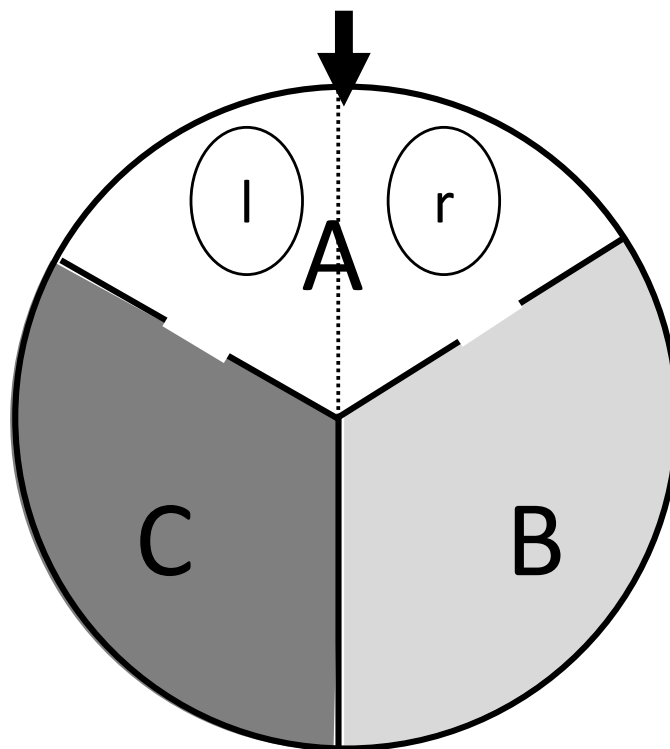


Figure 3.1: Experimental setup made by three-compartment petri dish used to assess nematode attractancy to root-adhering soils (ras) from eight rice cultivars. Compartment A (white area), filled with sterile agarose, was connected to the two others by open gates. Compartments B (light grey area) and C (dark grey area) were filled with RAS or bulk soil. The black dashed line represents an imaginary line splitting the compartment a in two zones (r and l). Nematodes were inoculated in the top of the imaginary black dashed line (black arrow).

Compartment A of the Petri dishes was filled with 7 ml of sterile agarose (10 g L^{-1}) and communicated with the two other compartments by open gates. Compartments B and C were not connected and were filled with either 10 g of dry RAS or bulk soil from the five control pots, then moistened with 4.8 or 4.4 ml of distilled water for RAS and bulk soil, respectively. Compartment A was moistened with 200 μl of sterile distilled water to favour nematode migration. Around 100 food-deprived nematodes were inoculated on the top of the middle line (dark dashed line in Figure 3.1). Petri dishes were incubated in the dark at 25°C . After 16 h, the nematodes were counted in the right (r) and left (l) zones of each side of the middle line of the compartment A. For each cultivar, we replicated the experiment five times so as to match the five replicates from the pot experiment. The attractancy was expressed in percentage.

Statistical analyses were performed with R (Team 2016). One-way ANOVA and Tukey HSD post-hoc tests were performed on shoot and root biomass (RB), RAS mass, RAS:RB ratio and RAS respiration. Data normality was checked using the Wilk-Shapiro test. Significance in RAS nematode attractancy was assessed with a binomial test. Pearson correlations were used to test for linear relationships between nematode attractancy and RAS mass.

4. Results and discussion

Bacterivorous nematodes graze on dense bacterial populations that mineralize root exudates, increasing bacterial turnover and nutrient cycling in the rhizosphere of plants (Griffiths, 1986; Trap et al., 2016). We formulated the hypothesis that the translocation of plant carbon to the soil may be a mechanism by which rice attracts mutualistic nematodes, resulting in a higher respiration. In agreement with this assumption, F172 was the cultivar that exhibited the highest attraction value (61%) (Figure 3.2) and RAS respiration, *i.e.* 1.5 times more than the bulk soil (Table 3.2). This hypothesis is also supported by the significant correlation between RAS:RB ratio and nematode attractancy when W880 was excluded from the data set ($R^2 = 0.79$, P -value 0.006). F152 and F182 attracted fewer nematodes (56% average) and had lower RAS respiration than F172. Finally, the abilities of rice roots to aggregate the soil and to attract *Acrobeloides* sp. are thus most likely mediated by high amounts of root exudation (el Zahar Haichar et al., 2014). F172 had also the lowest root

biomass (RB) and the highest RAS:RB ratio among cultivars (Table 3.2), supposing a trade-off between carbon allocation in root biomass and exudates.

Interestingly, we observed that *Acrobeloides* sp. individuals were significantly more attracted to the bulk soil than the RAS produced by W880 (Figure 3.2). W880 did not show lower respiration values than the bulk soil, suggesting that nematode repulsion by W880 RAS was not related to a low rhizodeposition. Likewise, W880 did not alter soil pH as N4 did (Table 3.2), rejecting the hypothesis that W880 repulsed nematodes by changing soil pH (Jairajpuri and Azmi, 1978). Knowing that nematode movement is also influenced by ions or volatile compounds (Le Saux and Queneherve, 2002; Rasmann et al., 2012), it is possible that W880 (i) altered its rhizospheric nutrient concentrations or (ii) produced volatile compounds or favored production of bacterial metabolites acting as repellents (Dusenbery, 1983).

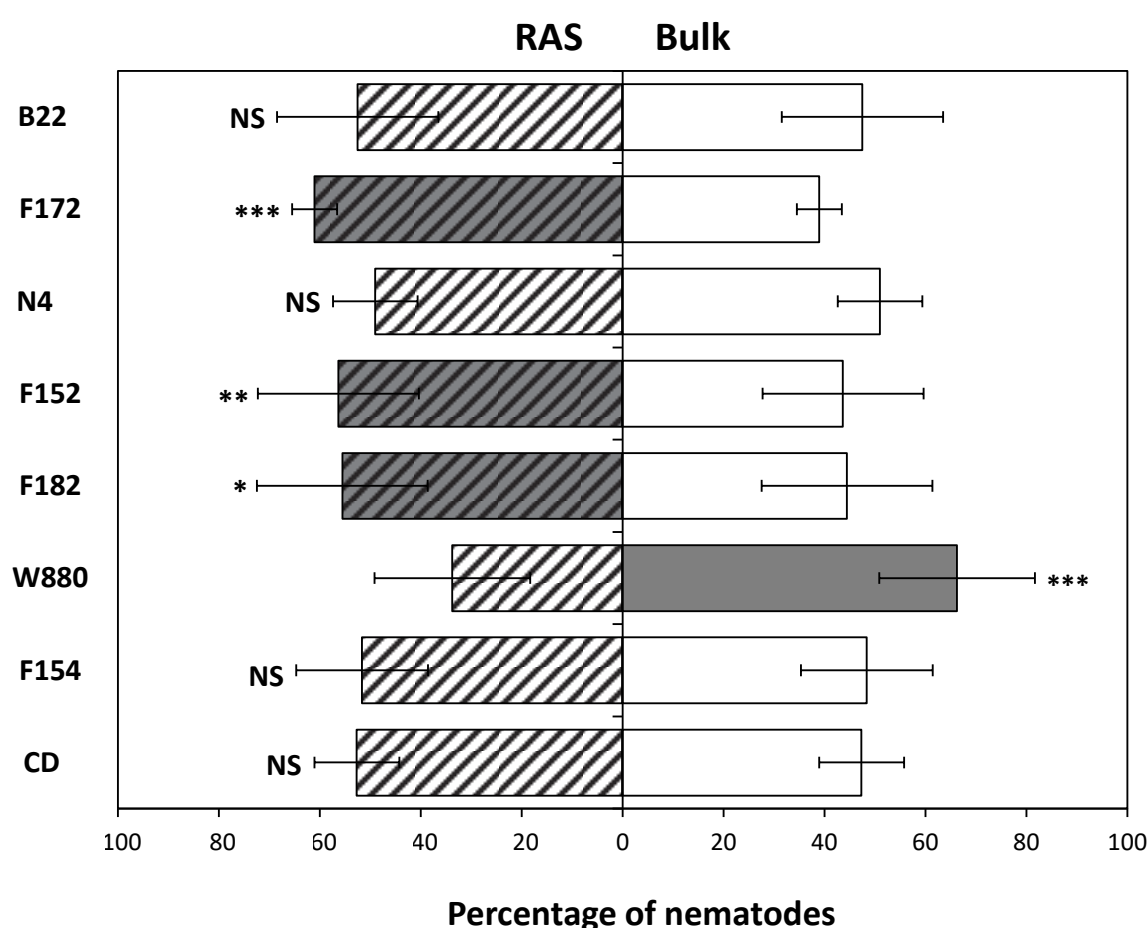


Figure 3.2: Attractancy of nematodes to root-adhering soils (RAS) from eight upland rice cultivars (CD, F154, W880, F182, F152, N4, F172 and B22). The horizontal bars correspond to standard deviation. NS: not significant, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ according to a binomial test (5 replicates).

Table 3.2: The effect of rice cultivar on root (RB), shoot and root-adhering soil (RAS) dry mass, RAS:RB ratio, RAS respiration and pH_{water} after 32 days of growth in a poor-nutrient Malagasy ferrasol.

Rice cultivars	Root biomass (mg)			Shoot biomass (mg)			RAS (g)			RAS:RB ratio (kg g ⁻¹)			RAS respiration (µg C-CO ₂ . dry g ⁻¹ d ⁻¹)			RAS pH _{water}		
B22	62.7	(11.6)	ab	63.7	(9.1)	abc	194.6	(50.6)	abc	3.3	(1.1)	bc	62.4	(0.9)	b	5.38	(0.05)	ab
F182	60.9	(8.3)	ab	64.5	(4.3)	abc	226.6	(18.1)	abc	3.8	(0.4)	bc	56.5	(1.0)	c	5.27	(0.09)	b
F172	41.9	(13.8)	b	53.2	(3.8)	c	252.4	(32.7)	ab	6.5	(2.0)	a	68.4	(1.1)	a	5.39	(0.11)	ab
F152	73.0	(9.7)	ab	77.0	(7.7)	a	194	(40.2)	abc	2.7	(0.8)	bc	62.7	(1.8)	b	5.38	(0.03)	ab
F154	80.4	(20.4)	a	71.7	(6.4)	ab	180.2	(48.2)	bcd	2.4	(1.0)	c	44.2	(1.3)	d	5.18	(0.17)	b
N4	69.4	(18.2)	ab	48.2	(5.9)	c	117	(17.4)	d	1.7	(0.3)	c	59.7	(1.5)	bc	5.65	(0.20)	a
CD	69.9	(33.7)	ab	56.2	(14.9)	bc	158.6	(44.9)	cd	3.0	(2.2)	bc	44.2	(3.3)	d	5.39	(0.09)	ab
W880	53.6	(15.2)	ab	56.8	(8.9)	bc	260.4	(27.2)	a	5.2	(1.3)	ab	59.8	(2.6)	bc	5.43	(0.05)	ab

Means (standard deviation) with n=5. Different letters (a, b, c and d) indicate significant changes according to one-way ANOVA and Tukey HSD post hoc tests at p < 0.05.

5. Conclusion

To conclude, we showed that plant breeding, already known to affect interactions between rice and plant-parasitic nematodes (Dimkpa et al. 2015), impact the ability of rice to interact with mutualistic bacterivorous nematodes. Increasing production of root exudates by rice cultivars may thus favour nematode recruitment, with possible positive feedbacks for bacterial colonization of rhizosphere and nutrient release (Knox et al. 2003). However, the role and involvement of selection criteria in the ability of rice to attract nematodes remains unclear. For instance, nematode attraction did not seem related to the resistance or tolerance against pests (blast rice disease and *Striga asiatica*), nor to the cultivar ability to grow at specific altitude (Table 3.1). Screening a larger panel of rice cultivars would be necessary to better link agronomic performance with nematode attractancy. Also, characterizing root exudation of the eight rice cultivars, as well as their nutrient response to bacterivorous nematode inoculation, would constitute useful further investigations to better understand interactions between upland rice genotype diversity, mutualist nematodes and the agronomic outputs.

Acknowledgements

This work received support from the French state (Labex Agro: ANR-10-LabX-001-01), generated by the National Research Agency under the program “Future Investments”. We are grateful to the “Institut de Recherche pour le Développement” (IRD) for having provided a PhD grant to P. Ranoarisoa through the "Allocation de Recherche pour une Thèse au Sud" (ARTS) program. We want to thank K. Rahajaharilaza and H.M. Ralalason for their assistance during root-adhering soil collection and Dr. C. Villenave (ELISOL Environnement, Nîmes, France) for nematode identification.

III. Synthèse du chapitre 3

Après 32 jours de croissance dans un sol natif échantillonné sous bozaka à Lazaina (Hautes terres, Madagascar) :

- (i) Les variétés F152 et F154 présentent les biomasses racinaires (RB) (73 mg et 80.4 mg, respectivement) et aériennes (77 mg et 71.7 mg, respectivement) les plus élevées. La variété F172 a quant à elle les biomasses racinaire et aériennes les plus faibles (41.9 mg et 53.2 mg, respectivement).
- (ii) Les variétés W880 et F172 ont le plus de sol adhérent aux racines (RAS) (260.4 g et 252.4 g, respectivement) alors que la variété N4 en a le moins (117 g).
- (iii) Les variétés F172 et W880 ont les ratios RAS:RB les plus élevés (6.5 kg.g^{-1} et 5.2 kg.g^{-1} , respectivement) tandis que la variété N4 a le ratio RAS:RB le plus faible (1.7 kg.g^{-1}).
- (iv) La respiration journalière du RAS est le plus élevé pour la variété F172 ($68.4 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{dry g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) et le plus faible pour les variétés CD et F154 ($44.2 \mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{dry g}^{-1} \text{ d}^{-1}$).
- (v) La variété N4 a la valeur de pH du SAR le plus élevé (5.65) tandis que les variétés F154 et F182 ont les valeurs de pH du RAS les plus faibles (5.18 et 5.27, respectivement).

L'attractivité de *Acrobelloides* sp. par le sol rhizosphérique du riz varie en fonction de la variété de riz pluvial. Elle peut être positive, neutre ou négative.

- (i) La rhizosphère des variétés B22, N4, F154 et CD ont une attractivité de *Acrobelloides* sp. neutre. La rhizosphère des variétés B22, N4, F154 et CD attire, respectivement, 52%, 49%, 52% et 53% des nématodes (*Acrobelloides* sp.) que nous avons inoculé.
- (ii) Les variétés F152, F182 et F172 ont une attractivité de *Acrobelloides* sp. significativement positive. La rhizosphère des variétés F152, F182 et F172 attirent, respectivement, 56%, 55% et 61% des nématodes (*Acrobelloides* sp.) que nous avons inoculé à l'extrémité supérieure du compartiment A de la boîte de Pétri.
- (iii) La variété W880 a une attractivité de *Acrobelloides* sp. significativement négative. Sa rhizosphère n'a attiré que 34% des nématodes (*Acrobelloides* sp.) que nous avons inoculé à l'extrémité supérieure du compartiment A de la boîte de Pétri.

Pour mieux comprendre les qualités attractives ou répulsives à *Acrobelloides* sp. des rhizosphères des huit variétés riz pluvial, il faudrait caractériser chimiquement leurs exsudats racinaires. Il serait également intéressant de voir si les variétés attractives

répondent positivement à la présence de nématodes bactérivores pour leur croissance et leur nutrition. Afin de tester la réponse des huit variétés de riz pluvial à la présence des nématodes, nous avons lancé une expérimentation en pot avec du sol natif de Lazaina. Chaque pot contenait 1 kg de sol tamisé, autoclavé, puis amendé avec de la dolomie et un niveau basal de N, P et K. Pour chacune des huit variétés, nous avons mis trois graines de riz par pot. Deux traitements ont été comparés : (i) "-nématodes" et (ii) "+nématodes" (10 individus par gramme de sol). L'expérience a été arrêtée après huit semaines de croissance et les résultats sont actuellement en cours d'analyse.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES



Aménagement des parcelles cultivées – Itasy, Madagascar (Mars 2016)

1. Objectifs de la thèse

Les objectifs de cette thèse étaient:

-  d'étudier les mécanismes par lesquels les nématodes bactérovores régulent les flux de nutriments (N et P) dans la rhizosphère du riz pluvial dans un sol ferrallitique de Madagascar,
-  d'étudier les effets des interactions bactéries – nématodes bactérovores sur les fonctions de la plante (croissance et nutrition),
-  d'évaluer les principaux facteurs contrôlant la boucle microbienne des sols dans une optique d'intensification agricole.

L'objectif de ce chapitre est de statuer sur les hypothèses formulées dans l'introduction et de synthétiser l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude.

2. Chapitre 1: Effets de *Acrobeloides* sp. sur les flux de phosphore et son acquisition par le riz dans un sol ferrallitique à forte capacité de sorption

L'objectif était d'identifier les flux de P impliqués dans la biodisponibilité de P dans du sol remanié (tamisé puis autoclavé) non restauré, en présence de nématodes bactérovores. Deux expériences complémentaires ont été menées pour identifier les mécanismes impliqués dans les effets des interactions bactéries – nématodes bactérovores sur la disponibilité en P dans la rhizosphère du riz pluvial: (i) une expérience en pots avec le radio-isotope ^{32}P comme traceur et (ii) une expérience en rhizoboxes.

Hypothèse H1.1 : Les nématodes bactérovores vont augmenter le prélèvement de P par le riz via une amélioration de la minéralisation du P organique.

Hypothèse H1.2 : L'amélioration de la disponibilité de P induite par la présence des nématodes bactérovores est négativement corrélée avec la capacité d'adsorption des phosphates par le sol.

Les effets de la présence de nématodes bactérovores (*Acrobeloides* sp.) sur les biomasses des parties aériennes et racinaires ainsi que sur les quantités de P total dans les tissus de la plante sont significativement positifs lorsque le sol est restauré avec de la dolomie. En absence de dolomie, les effets de la présence des nématodes bactérovores sur les fonctions

de la plante sont nuls voire négatifs. La valeur L dans les parties aériennes est également affectée par l'interaction entre les facteurs "dolomie" et "nématodes". Elle augmente de 49% en présence des nématodes, par rapport au contrôle, lorsque le sol a été chaulé. L'activité mutualiste des nématodes bactériovores est ainsi fortement reliée au pouvoir fixateur du sol. Les résultats de l'expérience en pot avec le ^{32}P comme traceur isotopique nous permettent de partiellement accepter l'hypothèse H1.1 et de valider l'hypothèse H1.2.

Hypothèse H1.3 : La présence de nématodes bactériovores ne stimule pas le développement des racines latérales à cause de leur faible capacité à sélectionner les cellules bactériennes (Jousset et al., 2009).

La présence des nématodes bactériovores augmente significativement la longueur et la surface racinaires mais diminue significativement les ramifications racinaires (nombre d'apex par unité de surface de racine). Contrairement à ce qui a été observé avec les protistes (Bonkowski, 2004), les nématodes bactériovores augmentent la croissance racinaire via la voie nutritionnelle et non par la voie hormonale. L'hypothèse H1.3 est donc acceptée.

3. Chapitre 2: Mesure in situ de l'effet de *Acrobelloides* sp. sur les fonctions du riz pluvial à l'aide d'une nouvelle méthode : effet des pratiques agricoles à Madagascar

L'objectif était d'observer les effets de la présence de nématodes bactériovores (*Acrobelloides* sp.) sur la biodisponibilité des nutriments (N et P) dans du sol non perturbé échantillonné dans plusieurs parcelles agricoles sous différentes pratiques. Une nouvelle approche basée sur des carottes de sol intact (non perturbé) a été utilisée pour étudier les effets des interactions bactéries – nématodes bactériovores sur la croissance et la nutrition du riz pluvial, en fonction des pratiques agricoles et des caractéristiques abiotiques du sol.

Hypothèse H2.1: La présence de nématodes bactériovores au sein de la rhizosphère de riz augmente la libération des éléments nutritifs (N et P) dans la solution du sol, et par voie de conséquence améliore la croissance et la nutrition de la plante.

Hypothèse H2.2: L'activité mutualiste est maximale dans les systèmes agricoles où les pratiques limitent l'acidification du sol, la compaction du sol et l'appauvrissement en matière organique.

Nous avons observé que les effets de la présence de nématodes bactérivores sur la croissance et la nutrition de la plante étaient variables (positifs, neutres ou négatifs), contrairement aux résultats présentés dans la littérature où les effets sont majoritairement positifs. Les variances importantes dans les tailles de l'effet de la présence de nématodes bactérivores sur les fonctions de la plante résident dans la nouvelle approche méthodologique que nous avons testée. Cette méthode vise à mimer les conditions du terrain. Ainsi, l'activité mutualiste des nématodes bactérivores dépend des caractéristiques agronomiques et pédologiques des parcelles échantillonnées. Nos résultats montrent que les effets des nématodes bactérivores sont maximaux pour les parcelles en association culturale (agro-écologie) caractérisées par des valeurs de pH et de teneur en Mg élevés et des agrégats grossiers. Les résultats de cette expérience nous permettent de partiellement accepter l'hypothèse H2.1 et de valider l'hypothèse H2.2.

4. Chapitre 3: Attractivité des nématodes bactérivores par la rhizosphère du riz en fonction des géotypes de riz pluvial

L'objectif était de déterminer les effets de la variété sur les interactions plante-bactérivores. Une expérimentation dans des boîtes de Pétri 90 mm à trois compartiments a permis d'étudier l'attractivité des nématodes par la rhizosphère de huit variétés de riz pluvial.

Hypothèse H3.1: L'attractivité des nématodes bactérivores varie selon la variété de riz.

Hypothèse H3.2: L'attractivité des nématodes bactérivores est liée à la performance agronomique (tolérance ou résistance au striga et à la pyriculariose, altitude optimale de culture) des variétés de riz pluvial.

L'attractivité d'*Acrobelloides* sp. par la rhizosphère des huit variétés de riz pluvial est positive, neutre ou négative. L'attractivité de *Acrobelloides* sp. par la rhizosphère des variétés F152, F182 et F172 est significativement positive alors que celle par la rhizosphère de la variété W880 est significativement négative. Nous pouvons donc valider l'hypothèse H3.1.

Les variétés F182 et W880 sont tolérantes à la pyriculariose, la variété F172 y est résistante et la variété F152 y est sensible. L'altitude optimale de culture des variétés F182 et W880 est de 700-1200 m et celle de variétés F152 et F172 est de 1200-1650 m. Les quatre autres variétés étudiées présentent des performances agronomiques similaires à au moins une des

variétés dont l'attractivité est significativement positive ou négative. Nous pouvons donc rejeter l'hypothèse H3.2.

5. Bilan des effets des interactions bactéries – nématodes bactérovores sur la phytodisponibilité des nutriments dans la rhizosphère du riz

5.1 Mécanismes impliqués dans les interactions bactéries - nématodes bactérovores

Deux théories ont été proposées pour expliquer les effets positifs de la présence de bactérovores sur la disponibilité des nutriments et les fonctions de la plante cités dans la littérature. La première théorie repose sur la capacité des bactérovores à excréter le surplus de nutriments qu'ils ont ingérés (voie nutritionnelle) (Clarholm 1985a) alors que la seconde théorie repose sur la capacité des bactérovores à modifier l'architecture racinaire (voie hormonale) (Bonkowski and Clarholm, 2012). Les résultats du chapitre 1 montrent que, en présence de dolomie, les nématodes augmentent la disponibilité des nutriments sans modifier l'architecture racinaire. Le prélèvement de P par la plante se fait via la voie nutritionnelle ou voie de minéralisation.

5.2 Effets de la présence de nématodes bactérovores sur les fonctions de la plante (croissance et nutrition)

Les effets de *Acrobeloides* sp. sur les fonctions de la plante sont variables (positifs, neutres ou négatifs) contrairement à ce qui est présenté dans la littérature, où la majorité des observations sont positives (Trap et al., 2016).

Sur du sol remanié (chapitre 1), lorsque le pouvoir fixateur du sol n'est pas corrigé avec de la dolomie, la présence de nématodes bactérovores diminue la biomasse et les quantités de N total et P total dans les tissus de la plante: en présence de *Acrobeloides* sp., nous observons une diminution, par rapport au contrôle (sans nématodes), de 10% de la biomasse totale du riz, de 7% de la quantité de P total dans les tissus de la plante, de 9% de la quantité de N total dans les tissus des parties aériennes de la plante et de 9% de la valeur L dans les parties aériennes de la plante. Par contre, lorsque le pouvoir fixateur du sol est corrigé avec de la dolomie, la présence de nématodes bactérovores augmente la biomasse et les quantités de N total et P total dans les tissus de la plante: en présence de *Acrobeloides* sp., nous observons une hausse, par rapport au contrôle (sans nématodes), de 22% de la biomasse totale du riz,

de 9% de la quantité de P total dans les tissus de la plante, de 17% de la quantité de N total dans les tissus des parties aériennes de la plante et de 49% de la valeur L dans les parties aériennes de la plante. Le sol des hautes terres de Madagascar étant très fixateur, les effets des nématodes bactérovores sur la phytodisponibilité de P dépendent de la capacité de sorption de P du sol. Néanmoins, il est possible qu'une faible proportion du phosphore sous forme de phosphates adsorbés aux constituants du sol soit potentiellement facilement échangeable et donc biodisponible. En effet, la désorption du P adsorbé échangeable est une réaction à l'équilibre. Ainsi, plus la durée de l'expérience est longue, plus du phosphore qui a été fixé par le sol deviendra disponible. Toutefois, la durée des expériences avec le radio-isotope ^{32}P est limitée par la demi-vie de ce dernier.

Sur du sol intact (chapitre 2), les effets des nématodes bactérovores dépendent des caractéristiques pédologiques et agronomiques des parcelles qui ont été échantillonnées. L'activité mutualiste des nématodes est favorisée par des valeurs de pH et de teneur en Mg dans le sol élevés alors que la présence de légumineuses ainsi que le labour limitent les effets des nématodes bactérovores sur les fonctions de la plante. La nature des intrants influence également l'activité biologique dans le sol. Par exemple, l'amendement des parcelles avec des résidus de culture stimule l'activité et la croissance bactérienne. Dans les carottes échantillonnées dans les parcelles en agroforesterie la présence de nématodes augmente, par rapport au contrôle (sans nématodes), de 26% la biomasse totale des plantes, de 44% la quantité de P total dans les tissus de la plante et de 38% la quantité de N total dans les tissus de la plante. Dans les carottes échantillonnées dans les parcelles en rotation, la présence de nématode diminue de 5% la biomasse totale des plantes alors qu'elle augmente de 16% la quantité de P total dans les tissus de la plante et de 5% la quantité de N total dans les tissus de la plante, par rapport au contrôle (sans nématodes). Dans les carottes échantillonnées dans les parcelles en monoculture la présence de nématode diminue, par rapport au contrôle (sans nématodes), de 2% la biomasse totale des plantes, de 18% la quantité de P total dans les tissus de la plante et de 11% la quantité de N total dans les tissus de la plante. Ainsi, l'agroforesterie est une solution à la disposition des agriculteurs pour intensifier l'activité mutualiste des nématodes bactérovores sur les fonctions du riz pluvial (croissance et nutrition). En effet, les arbres ont accès à des horizons de sol profonds inaccessibles pour les plants de riz (Mulia and Dupraz, 2006). Ils ont ainsi accès à un pool de

nutriments plus important. Une partie des nutriments qu'ils vont prélever en profondeur sera redistribuée à la surface via la litière (feuilles mortes). Grâce à l'accès à des ressources profondes et à la valorisation des pertes (feuilles et racines mortes), les systèmes agroforestiers pourraient nécessiter moins d'apports en fertilisants exogènes pour les cultures.

5.3 Relation entre le sol et les nématodes bactérovores

Les résultats du chapitre 1 montrent l'importance de la capacité de sorption du P par le sol. Lors de nos expérimentations avec du sol remanié (tamisé et autoclavé) nous avons observé que la présence de nématodes bactérovores avait des effets nuls voire négatifs sur les fonctions de la plante, en absence de dolomie ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$). Il en ressort que la correction du pH du sol est très importante pour l'activité mutualiste des nématodes bactérovores. Les résultats du chapitre 2 montrent d'ailleurs que le pH et la teneur en Mg sont des variables qui permettent de prédire la taille de l'effet des nématodes bactérovores sur les fonctions de la plante. L'effet de la présence de nématodes bactérovores sur la croissance et la nutrition de la plante est positivement corrélé avec le pH et la teneur en Mg du sol. L'utilisation d'un sol avec une capacité plus faible de fixation des phosphates pourrait permettre d'obtenir des résultats plus prononcés sur les fonctions de la plante (croissance et nutrition) sous le contrôle des interactions rhizosphériques.

5.4 Relation entre la plante et les nématodes bactérovores

Les nématodes bactérovores se nourrissent de bactéries et le dynamisme de leur population va dépendre du dynamisme de leurs proies. Or l'activité et la croissance de la communauté bactérienne sont dépendantes de l'énergie que lui fournit la plante à travers ses exsudats racinaires. Les résultats du chapitre 3 montrent que les relations entre la plante, via sa rhizosphère, et les nématodes bactérovores varient d'une variété à une autre. Cette variation est due au fait que les quantités d'exsudats racinaires libérées varient en fonction des variétés (Somasundaram et al., 2008) ce qui va impacter la communauté bactérienne dans la rhizosphère et donc l'attractivité des nématodes. L'importance des exsudats racinaires peut également expliquer les résultats que nous avons observés dans le chapitre 2. En effet, les effets de la présence des nématodes bactérovores sur la croissance et la nutrition de la plante sont maximaux pour les parcelles en association culturale (notamment en

agroforesterie). La présence d'une culture associée semble augmenter la libération de carbone labile, indispensable pour la prolifération des bactéries, dans la rhizosphère. La quantification et l'analyse chimique des exsudats racinaires des huit variétés de riz pluvial permettraient de mieux comprendre les variations dans l'attractivité des nématodes par la rhizosphère.

6. Valorisation des résultats

Les résultats des chapitres 2 et 3 ont été valorisés dans le cadre de congrès internationaux. Les résultats du chapitre 2 ont été présentés au congrès "*International Congress of Soil Zoology 2016*" au Japon ainsi qu'à "*Ecosummit 2016*" à Montpellier. Les résultats du chapitre 3 ont également été présentés à "*Ecosummit 2016*" à Montpellier.

Les résultats du chapitre 3 ont été publiés dans "*Rhizosphere*" sous le format d'une short communication. Les résultats du chapitre 1 ont été soumis dans la revue "*Soil Biology & Biochemistry*" et les résultats du chapitre 2 seront soumis dans la revue "*Ecological Indicator*" au cours du premier semestre 2018.

7. Perspectives

Nos travaux soulèvent beaucoup de questions auxquelles des études futures devraient répondre. Ci-après sont proposées quelques études qui pourraient compléter les résultats déjà acquis sur les effets des interactions bactéries – nématodes bactérivores sur la phytodisponibilité des nutriments dans la rhizosphère du riz pluvial dans un sol ferrallitique tropical.

7.1 Utilisation d'autres organismes dans le dispositif expérimental

Nous avons utilisé la variété de riz pluvial B22 dans nos expériences car c'est la variété la plus cultivée par les paysans dans notre zone d'échantillonnage. Les résultats du chapitre 3 ont cependant montré que la variété B22 a une attractivité des nématodes neutre. Il serait alors intéressant de refaire les expériences du chapitre 1 et 2 avec une variété de riz pluvial ayant une attractivité positive comme la variété F172. L'utilisation de la variété W880, qui a une attractivité négative, serait également intéressante pour étudier les effets de la présence de nématodes bactérivores sur les fonctions d'une plante dont la rhizosphère semble repousser

les nématodes bactérivores.

Nous avons utilisé *Acrobeloides* sp. dans toutes les expériences menées dans le cadre de ce travail. Il s'agit d'un nématode cp-2. Il serait intéressant de refaire nos expériences avec des nématodes ayant un gradient colonisateur-persistant différent. L'utilisation d'un nématode cp-1, plus opportuniste, comme les Rhabditidae, et d'un nématode cp-5, persistant, comme les Isolaimidae, permettrait de voir si les effets des nématodes bactérivores sur les fonctions de la plante augmentent avec le gradient colonisateur-persistant.

7.2 Rôle de la stœchiométrie sur les effets des interactions bactéries-bactérivores sur la nutrition du P

La boucle microbienne repose sur la capacité des bactérivores à libérer les nutriments présents dans la biomasse microbienne (Clarholm, 2005 ; Kuikman *et al.*, 1991). Une première partie de ces nutriments libérés sera prélevée par la plante, une seconde partie sera immobilisée par les oxydes métalliques et l'argile du sol, et une troisième partie sera de nouveau immobilisée par les bactéries. Les quantités de phosphore et d'azote immobilisées par les bactéries, après excrétion par les bactérivores, dépendent respectivement des ratios C:P et C:N du sol. En effet, plus il y aura du carbone labile dans le sol, plus les bactéries vont proliférer et plus elles immobiliseront des nutriments au détriment de la plante. C'est pourquoi la compréhension et la maîtrise du facteur stœchiométrique comme facteur de contrôle de la boucle microbienne sont importants. Une expérience type « batch » consistant en une co-inoculation d'organismes (bactéries, prédateurs et plante) en conditions stériles et climatiques contrôlées permettrait d'étudier l'effet des nématodes bactérivores sur la croissance et la nutrition en N et P du riz en fonction de la stœchiométrie du sol. L'expérience se ferait dans un premier temps sur agarose, afin de maîtriser rigoureusement les quantités de nutriments (C, N et P) apportés dans le milieu et de s'affranchir des phénomènes physiques et chimiques de fixation du phosphore, puis dans un second temps sur un sol ferrallitique malgache.

7.3 Rôle de la structure de la communauté sur l'activité mutualiste

Trap et al. (2016) ont calculé la taille de l'effet des bactérivores sur la minéralisation de N et les fonctions de la plante. Sur les 42 études qu'ils ont analysées dans leur méta-analyse, 45%

ont été réalisées avec des nématodes, 38% avec des protistes et 16% avec des protistes et des nématodes. Sur ces 16%, seules deux études ont une plante dans leur dispositif expérimental. Leurs résultats ont montré que les protistes sont plus performants que les nématodes sur la minéralisation de N et la production de biomasse racinaire alors que les nématodes sont plus performants que les protistes sur la production de biomasse aérienne et la nutrition azotée des parties aériennes de la plante. Lorsque les deux groupes sont présents dans le microcosme, la minéralisation en N et la production de biomasse racinaire augmentent significativement par rapport aux microcosmes où les groupes sont présents séparément. Les études comprenant les protistes et les nématodes dans leur dispositif expérimental ont été réalisées sur du sol sablo-limoneux amendé ou sur du sol riche en matière organique. Il serait alors intéressant d'étudier les effets de la diversité du micro-réseau trophique sur la minéralisation du P et les fonctions de la plante dans un sol pauvre et fixateur. L'utilisation de trois groupes de bactérivores (amibes, ciliés et nématodes) permettrait d'étudier les différences selon les groupes et de voir si la présence des trois groupes induit un effet additif.

7.4 Rôle des champignons endomycorhizien dans l'acquisition par le riz du P libéré par la boucle microbienne.

84% des études sur les effets des bactérivores sur les fonctions de la plante ont été réalisées dans la rhizosphère de plantes non mycorhizées (Trap et al., 2016). Cependant, les racines des plantes sont systématiquement associées à des champignons à travers la formation de la symbiose mycorhizienne (Ehrenfeld et al., 2005). Dans le cas du riz, il s'agit d'une symbiose endomycorhizienne. Ces champignons mycorhiziens sont considérés comme un élément clé pour améliorer la nutrition minérale de la plante hôte, en particulier la nutrition du phosphore (Louche et al., 2010; Plassard and Dell, 2010). En effet, ces champignons sont capables de prélever le phosphore fixé aux constituants du sol, d'augmenter le volume de sol prospecté par les racines, ainsi que de produire des enzymes extra-cellulaires minéralisant le phosphore organique du sol. Il apparaît donc crucial d'améliorer nos connaissances fondamentales des interactions biologiques entre les organismes libres du sol (bactéries et bactérivores) impliqués dans la boucle microbienne et les champignons mycorhiziens associés aux plantes dans des sols pauvres en phosphore. Une expérience réalisée sur sol ferrallitique avec *Glomus intraradices* (champignon endomycorhizien du riz)

permettra de prendre en compte la capacité du partenaire symbiotique à prélever le phosphore fortement fixé.

References

1. Alpei, J., Bonkowski, M., Scheu, S., 1996. Protozoa, Nematoda and Lumbricidae in the rhizosphere of *Hordelymus europaeus* (Poaceae): faunal interactions, response of microorganisms and effects on plant growth. *Oecologia* 106, 111-126.
2. Altieri, M.A., 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74, 19-31.
3. Amer, F., Bouldin, D.R., Black, C.A., Duke, F.R., 1955. Characterization of soil phosphorus by anion exchange resin adsorption and P32-equilibration. *Plant and Soil* 6, 391-408.
4. Anderson, R., Trofymow, J., Coleman, D., Reid, C., 1982. Phosphorus mineralization by a soil pseudomonad in spent oil shale as affected by a rhabditid nematode. *Soil Biology and Biochemistry* 14:365-371
5. Anderson, R.V., Coleman, D.C., 1981. Population development and interactions between 2 species of bacteriophagic nematodes. *Nematologica* 27:6-19
6. Anderson, R.V., Coleman, D.C., 1981. Population Development And Interactions Between 2 Species Of Bacteriophagic Nematodes. *Nematologica* 27, 6-19.
7. Anderson, R.V., Coleman, D.C., 1982. Nematode Temperature Responses: a Niche Dimension In Populations of Bacterial-Feeding Nematodes. *Journal of Nematology* 14, 69-76.
8. Anderson, R.V., Coleman, D.C., Cole, C.V., Elliott, E.T., 1981. Effect of the nematodes *Acrobeloides* sp and *Mesodiplogaster-Lheritieri* on substrate utilization and nitrogen and phosphorus mineralization in soil. *Ecology* 62:549-555
9. Anderson, R.V., Elliott, E.T., McClellan, J.F., Coleman, D.C., Cole, C.V., Hunt, H.W., 1978. Trophic interactions in soils as they affect energy and nutrient dynamics. 3. Biotic interactions of bacteria, amebas, and nematodes. *Microb Ecol* 4:361-371
10. Anderson, R.V., Gould, W.D., Woods, L.E., Cambardella, C., Ingham, R.E., Coleman, D.C., 1983. Organic and Inorganic Nitrogenous Losses by Microbivorous Nematodes in Soil. *Oikos* 40, 75-80.
11. Andrassy, I., 2007. *Pedozoologica Hungarica* No. 4 Free-living nematodes of Hungary
12. Andriamananjara A., 2011. Système de culture a rotation voandzou – riz pluvial (*Oryza sativa*) sur les Hautes Terres de Madagascar : Rôle du voandzou (*Vigna subterranea*) sur la

biodisponibilité du phosphore dans les ferralsols. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. 162 p.

13. Andrianantoandro, V.T., Bélières, J.-F., 2015. L'agriculture familiale malgache entre survie et développement : organisation des activités, diversification et différenciation des ménages agricoles de la région des Hautes Terres. *Revue Tiers Monde* 221, 69-88.
14. Angers, D.A., Caron, J., 1998. Plant-induced Changes in Soil Structure: Processes and Feedbacks. *Biogeochemistry* 42, 55-72.
15. Arpin, P., Kilbertus, J.F., Ponge, G., Vannier, G., 1980. Importance de la microflore et de la microfaune en milieu forestier, in: Pesson (Ed.), *Actualités d'écologie forestière: Sol, flore et faune*. Gauthier-Villars, Paris, pp. 87-150.
16. Augusto, L., Ranger, J., Binkley, D., Rothe, A., 2002. Impact of several common tree species of European temperate forests on soil fertility. *Ann. For. Sci.* 59, 233-253.
17. Aulakh, M., Wassmann, R., Bueno, C., Kreuzwieser, J., Rennenberg, H., 2001. Characterization of root exudates at different growth stages of ten rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Plant Biology* 3:139-148
18. Baath, E., Lohm, U., Lundgren, B., Rosswall, T., Soderstrom, B., Sohlenius, B., 1981. Impact of Microbial-Feeding Animals on Total Soil Activity and Nitrogen Dynamics: A Soil Microcosm Experiment. *Oikos* 37, 257-264.
19. Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, pp. 233-266
20. Bardgett, R.D., Chan, K.F., 1999. Experimental evidence that soil fauna enhance nutrient mineralization and plant nutrient uptake in montane grassland ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 1007-1014.
21. Barrow, N., 2017. The effects of pH on phosphate uptake from the soil. *Plant and Soil* 410:401-410
22. Barsdate, R., Prentki, R., Fenchel, T., 1974. Phosphorus cycle of model ecosystems: significance for decomposer food chains and effect of bacterial grazers. *Oikos*:239-251
23. Bastida, F., Zsolnay, A., Hernandez, T., Garcia, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147, 159-171.

24. Becquer, A., Torres-Aquino, M., Le Guernevé, C., Amenc, L. K., Trives-Segura, C., Staunton, S., Quiquampoix, H., Plassard, C., 2017. A Method for Radioactive Labelling of *Hebeloma cylindrosporum* to Study Plant-fungus Interactions. *Bio-protocol* 7(20): e2576.
25. Becquer, A., Trap, J., Irshad, U., Ali, M.A., Plassard, C., 2014. From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association. *Frontiers in plant science* 5:1-7
26. Bhattacharyya, P., Das, S., Adhya, T., 2013. Root exudates of rice cultivars affect rhizospheric phosphorus dynamics in soils with different phosphorus statuses. *Communications in soil science and plant analysis* 44:1643-1658
27. Bjornlund, L., Liu, M.Q., Rønn, R., Christensen, S., Ekelund, F., 2012. Nematodes and protozoa affect plants differently, depending on soil nutrient status. *European Journal of Soil Biology* 50:28-31
28. Blanc, C., Sy, M., Djigal, D., Brauman, A., Normand, P., Villenave, C., 2006. Nutrition on bacteria by bacterial-feeding nematodes and consequences on the structure of soil bacterial community. *European Journal of Soil Biology* 42:S70-S78
29. Bolan, N., Robson, A., Barrow, N., Aylmore, L., 1984. Specific activity of phosphorus in mycorrhizal and non-mycorrhizal plants in relation to the availability of phosphorus to plants. *Soil Biology and Biochemistry* 16:299-304
30. Bongers, T., 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* 83:14-19
31. Bongers, T., 1999. The maturity index, the evolution of nematode life history traits, adaptive radiation and cp-scaling. *Plant and soil* 212:13-22
32. Bongers, T., Bongers, M., 1998. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology* 10, 239-251.
33. Bongers, T., Goede, R.G.M.d., Korthals, G.W., Yeates, G.W., 1995. Proposed changes of c-p classification for nematodes. *Russian Journal of Nematology* 3, 61-62.
34. Bonkowski, M., 2004. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* 162:617-631
35. Bonkowski, M., Brandt, F., 2002. Do soil protozoa enhance plant growth by hormonal effects? *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1709-1715.

36. Bonkowski, M., Cheng, W., Griffiths, B.S., Alphei, J., Scheu, S., 2000. Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *European Journal of Soil Biology* 36:135-147
37. Bonkowski, M., Clarholm, M., 2012. Stimulation of plant growth through interactions of bacteria and protozoa: Testing the auxiliary microbial loop hypothesis. *Acta Protozoologica* 51:237-247
38. Bonkowski, M., Griffiths, B., Scrimgeour, C., 2000. Substrate heterogeneity and microfauna in soil organic 'hotspots' as determinants of nitrogen capture and growth of ryegrass. *Applied Soil Ecology* 14, 37-53.
39. Bonkowski, M., Villenave, C., Griffiths, B., 2009. Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant and Soil* 321:213-233
40. Bouwman, L.A., Bloem, J., van den Boogert, P.H.J.F., Bremer, F., Hoenderboom, G.H.J., de Ruiter, P.C., 1994. Short-term and long-term effects of bacterivorous nematodes and nematophagous fungi on carbon and nitrogen mineralization in microcosms. *Biology and Fertility of Soils* 17, 249-256.
41. Brookes, P.C., 1982. Correction for seed-phosphorus effects in L-value determinations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 33:329-335
42. Bucher, M., 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* 173, 11-26.
43. Buehler, S., Oberson, A., Rao, I.M., Friesen, D.K., Frossard, E., 2002. Sequential phosphorus extraction of a P-labeled Oxisol under contrasting agricultural systems. *Soil Sci Soc Am J* 66:868-877
44. Byerly, L., Cassada, R.C., Russell, R.L., 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental biology* 51, 23-33.
45. Cakmak, I., Kirkby, E.A., 2008. Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. *Physiologia plantarum* 133, 692-704.
46. Chang C.W., Laird D.A., Mausbach M.J., Hurburgh C.R.J., 2001. Near-infrared reflectance spectroscopy–principal components regression analyses of soil properties. *Soil Science Society of America Journal* 65 : 480-490.

47. Chantanao, A., Jensen, H.J., 1969. Saprozoic Nematodes as Carriers and Disseminators of Plant Pathogenic Bacteria. *J. Nematol.* 1, 216-218.
48. Cheng, Y.H., Jiang, Y., Griffiths, B.S., Li, D.M., Hu, F., Li, H.X., 2011. Stimulatory effects of bacterial-feeding nematodes on plant growth vary with nematode species. *Nematology* 13:369-372
49. Clarholm, M., 1985a. Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry* 17:181-187
50. Clarholm, M., 1985b. Possible roles for roots, bacteria, protozoa, and fungi in supplying nitrogen to plants. In: Fitter AH (ed) *Ecological interactions in soil*. Blackwell Scient. Publ., pp 355-365
51. Clarholm, M., 2005. Soil protozoa: an under-researched microbial group gaining momentum. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 811-817.
52. Clarholm, M., 2005. Soil protozoa: an under-researched microbial group gaining momentum. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 811-817.
53. Cole, C.V., Elliott, E.T., Hunt, H.W., Coleman, D.C., 1978. Trophic Interactions in Soils as They Affect Energy and Nutrient Dynamics .5. Phosphorus Transformations. *Microbial Ecology* 4, 381-387.
54. Coleman, D.C., Anderson, R.V., Cole, C.V., Elliott, E.T., Woods, L., Campion, M.K., 1978. Trophic Interactions in Soils as They Affect Energy and Nutrient Dynamics .4. Flows of Metabolic and Biomass Carbon. *Microbial Ecology* 4, 373-380.
55. Coleman, D.C., Cole, C.V., Anderson, R.V., Blaha, M., Campion, M.K., M., C., Elliott, E.T., Hunt, H.W., Shaefer, B., Sinclair, J., 1977. An analysis of rhizosphere-saprophage interactions in terrestrial ecosystems. *Ecological Bulletins* 25, 299-309.
56. Darbyshire, J.F., Davidson, M.S., Chapman, S.J., Ritchie, S., 1994. Excretion of nitrogen and phosphorus by the soil Ciliate *Colpoda steinii* when fed the soil bacterium *Arthrobacter* sp. *Soil Biology & Biochemistry* 26, 1193-1199.
57. De Ley, P., 1992. The nematode community of a marginal soil at Camberene, Senegal, with 858 special attention to functional morphology and niche partitioning in the family 859 Cephalobidae. *Mededelingen van de Koninklijke Academie voor Wetenschappen, 860 Letteren en Schone Kunsten van België, Klasse der Wetenschappen* 53: 109-153.

58. Dimkpa, S.O., Lahari, Z., Shrestha, R., Douglas, A., Gheysen, G., Price, A.H., 2015. A genome-wide association study of a global rice panel reveals resistance in *Oryza sativa* to root-knot nematodes. *J. Exp. Botany* 470
59. Djigal, D., Baudoin, E., Philippot, L., Brauman, A., Villenave, C., 2010. Shifts in size, genetic structure and activity of the soil denitrifier community by nematode grazing. *European Journal of Soil Biology* 46:112-118
60. Djigal, D., Brauman, A., Diop, T.A., Chotte, J.L., Villenave, C., 2004a. Influence of bacterial-feeding nematodes (Cephalobidae) on soil microbial communities during maize growth. *Soil Biology & Biochemistry* 36:323-331
61. Djigal, D., Saj, S., Rabary, B., Blanchart, E., Villenave, C., 2012. Mulch type affects soil biological functioning and crop yield of conservation agriculture systems in a long-term experiment in Madagascar *Soil and tillage research*, 118, pp. 11–21.
62. Djigal, D., Sy, M., Brauman, A., Diop, T.A., Mountport, D., Chotte, J.L., Villenave, C., 2004b. Interactions between *Zeldia Punctata* (Cephalobidae) and bacteria in the presence or absence of maize plants. *Plant And Soil* 262, 33-44.
63. Dropkin, V.H., King, R.C., 1956. Studies on plant parasitic nematodes homogeneously labeled with radiophosphorus. *Experimental Parasitology* 5, 469-480.
64. Dunn B.W., Beecher H.G., Batten G.D., Ciavarella S., 2002. The potential of near-infrared reflectance spectroscopy for soil analysis—a case study from the Riverine Plain of south-eastern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 42 : 607-614.
65. Dusenbery, D.B. 1983. Chemotactic behavior of nematodes. *J Nematol* 15:168
66. Ehrenfeld, J.G., Ravit, B. and Elgersma, K., 2005. Feedback in the plant-soil system. *Annual Review of Environment and Resources*, 30: 75-115.
67. el Zahar Haichar, F., Santaella, C., Heulin, T., Achouak, W., 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol. Biochem.*, 77,. 69-80
68. Elliott, E.T., Anderson, R.V., Coleman, D.C., Cole, C.V., 1980. Habitable Pore-Space And Microbial Trophic Interactions. *Oikos* 35, 327-335.
69. Ettema, C.H., 1998. Soil Nematode Diversity: Species Coexistence and Ecosystem Function. *Journal of Nematology* 30, 159-169.
70. Fageria, N., 2000. Upland rice response to soil acidity in cerrado soil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 35:2303-2307

71. Fageria, N., Baligar, V., 2008. Ameliorating soil acidity of tropical Oxisols by liming for sustainable crop production. *Advances in agronomy* 99:345-399
72. Fageria, N.K., 2001. Effect of liming on upland rice, common bean, corn, and soybean production in cerrado soil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 36:1419-1424
73. Fardeau, J.C., Guiraud, G., Marol, C., 1995. The role of isotopic techniques on the evaluation of the agronomic effectiveness of P fertilizers. *Fertilizer research* 45, 101-109.
74. Ferris, H., Bongers, T., 2006. Nematode indicators of organic enrichment. *J Nematol* 38:3
75. Ferris, H., Bongers, T., De Goede, R., 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied soil ecology* 18:13-29
76. Ferris, H., Venette, R.C., Lau, S.S., 1997. Population energetics of bacterial-feeding nematodes: Carbon and nitrogen budgets. *Soil Biology & Biochemistry* 29, 1183-1194.
77. Ferris, H., Venette, R.C., van der Meulen, H.R., Lau, S.S., 1998. Nitrogen mineralization by bacterial-feeding nematodes: verification and measurement. *Plant and Soil* 203, 159-171.
78. Finzi, A.C., Canham, C.D., Van Breemen, N., 1998. canopy tree–soil interactions within temperate forests: species effects on ph and cations. *Ecol. Appl.* 8, 447-454.
79. Frossard E et al., 2011. The Use of Tracers to Investigate Phosphate Cycling in Soil-Plant Systems. In: Bunemann EK, Oberson A, Frossard E (eds) *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*, vol 26. *Soil Biology*. pp 59-91.
80. Frossard, E., Morel, J., Fardeau, J., Brossard, M., 1994. Soil isotopically exchangeable phosphorus: a comparison between E and L values. *Soil Sci Soc Am J* 58:846-851
81. Fu, S., Ferris, H., Brown, D., Plant, R., 2005. Does the positive feedback effect of nematodes on the biomass and activity of their bacteria prey vary with nematode species and population size? *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1979-1987.
82. Gan, H., Zak, D.R., Hunter, M.D., 2014. Trophic stability of soil oribatid mites in the face of environmental change. *Soil Biology and Biochemistry* 68, 71-77
83. García-Palacios, P., Maestre, F.T., Bardgett, R.D., de Kroon, H., 2012. Plant responses to soil heterogeneity and global environmental change. *The Journal of ecology* 100, 1303-1314

84. Gebremikael, M.T., Buchan, D., De Neve, S., 2014. Quantifying the influences of free-living nematodes on soil nitrogen and microbial biomass dynamics in bare and planted microcosms. *Soil Biology and Biochemistry* 70, 131-141.
85. Gérard, F., 2016. Clay minerals, iron/aluminum oxides, and their contribution to phosphate sorption in soils—A myth revisited. *Geoderma* 262:213-226
86. Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leiros, M.C., Seoane, S., 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 877-887.
87. Goodey, T., 1951. Soil and Freshwater Nematodes. *Soil Science* 72, 85.
88. Gould, W.D., Bryant, R.J., Trofymow, J.A., Anderson, R.V., Elliott, E.T., Coleman, D.C., 1981. Chitin decomposition in a model soil system. *Soil Biology and Biochemistry* 13, 487-492.
89. Grewal, P., Wright, D., 1992. Migration of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae) larvae towards bacteria and the nature of the bacterial stimulus. *Fundamental and applied nematology* 15:159-166
90. Griffiths, B.S., 1986. Mineralization of nitrogen and phosphorus by mixed cultures of the Ciliate protozoan *Colpoda steinii*, the nematode *Rhabditis* sp and the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem.*, 18 637-641
91. Griffiths, B.S., 1989. Enhanced nitrification in the presence of bacteriophagous protozoa. *Soil Biology & Biochemistry* 21, 1045-1051.
92. Griffiths, B.S., 1994. Microbial-feeding nematodes and protozoa in soil: Their effect on microbial activity and nitrogen mineralization in decomposition hotspots and the rhizosphere. *Plant and Soil* 164, 25-33.
93. Griffiths, B.S., Bonkowski, M., Dobson, G., Caul, S., 1999. Changes in soil microbial community structure in the presence of microbial-feeding nematodes and protozoa. *Pedobiologia* 43, 297-304.
94. Gruba, P., Mulder, J., 2015. Tree species affect cation exchange capacity (CEC) and cation binding properties of organic matter in acid forest soils. *Science of The Total Environment* 511, 655-662.
95. Grzebisz, W., 2013. Crop response to magnesium fertilization as affected by nitrogen supply. *Plant and Soil* 368, 23-39.

96. Grzebisz, W., Przygocka-Cyna, K., Szczepaniak, W., Diatta, J.B., Potarzycki, J. 2010. Magnesium as a nutritional tool of nitrogen efficient management - plant production and environment. *J. Elem.* 15(4): 771-788.
97. Gyaneshwar, P., Kumar, G.N., Parekh, L.J., Poole, P.S., 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245:83-93
98. Hallem, E.A., Dillman, A.R., Hong, A.V., Zhang, Y., Yano, J.M., DeMarco, S.F., Sternberg, P.W., 2011. A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. *Current Biology* 21:377-383
99. Hassink, J., Bouwman, L.A., Zwart, K.B., Bloem, J., Brussaard, L., 1993. Relationships between soil texture, physical protection of organic matter, soil biota, and c and n mineralization in grassland soils. *Geoderma* 57, 105-128.
100. Hayes, J., Simpson, R., Richardson, A., 2000. The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant and Soil* 220:165-174
101. Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant And Soil* 237:173-195
102. Holford, I.C.R., 1997. Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants. *Aust. J. Soil Res.* 35, 227-239.
103. Horiuchi, J-i., Prithiviraj, B., Bais, H.P., Kimball, B.A., Vivanco, J.M., 2005. Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and rhizobium bacteria. *Planta* 222:848-857
104. Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R., Coleman, D.C., 1985. Interactions of Bacteria, Fungi, and their Nematode Grazers: Effects on Nutrient Cycling and Plant Growth. *Ecological Monographs* 55, 119-140.
105. Irshad, U., Brauman, A., Villenave, C., Plassard, C., 2012. Phosphorus acquisition from phytate depends on efficient bacterial grazing, irrespective of the mycorrhizal status of *Pinus pinaster*. *Plant and Soil* 358, 148-161.
106. Irshad, U., Villenave, C., Brauman, A., Plassard, C., 2011. Grazing by nematodes on rhizosphere bacteria enhances nitrate and phosphorus availability to *Pinus pinaster* seedlings. *Soil Biology & Biochemistry* 43, 2121-2126.
107. Jackson, M.L., 1958. Soil chemical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.

108. Jairajpuri, M., Azmi, M., 1978. Aggregation and repulsion of nematodes at pH gradients *Nematologia mediterranea*. 6. pp. 107-112
109. Jentschke, G., Bonkowski, M., Godbold, D.L., Scheu, S., 1995. Soil Protozoa and Forest Tree Growth - Non-Nutritional Effects and Interaction with Mycorrhizae. *Biology and Fertility of Soils* 20, 263-269.
110. Jiang, Y., Liu, M., Zhang, J., Chen, Y., Chen, X., Chen, L., Li, H., Zhang, X.-X., Sun, B., 2017. Nematode grazing promotes bacterial community dynamics in soil at the aggregate level. *ISME J.*
111. Jiang, Y., Wu, Y., Xu, W., Cheng, Y., Chen, J., Xu, L., Hu, F., Li, H., 2012. IAA-producing bacteria and bacterial-feeding nematodes promote *Arabidopsis thaliana* root growth in natural soil. *European Journal of Soil Biology* 52, 20-26.
112. Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78, 1946-1957.
113. Jousset, A., Rochat, L., Péchy-Tarr, M., Keel, C., Scheu, S., Bonkowski, M., 2009. Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. *The ISME journal* 3:666-674
114. Kibblewhite, M.G., Ritz, K., Swift, M.J., 2008. Soil health in agricultural systems. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B-Biological Sciences* 363, 685-701.
115. Kjeldahl, J., 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für analytische Chemie* 22, 366-382.
116. Knox, O.G.G., Killham, K., Mullins, C.E., Wilson, M.J., 2003. Nematode-enhanced microbial colonization of the wheat rhizosphere. *Fems Microbiology Letters* 225:227-233
117. Kreuzer, K., Adamczyk, J., Iijima, M., Wagner, M., Scheu, S., Bonkowski, M., 2006. Grazing of a common species of soil protozoa (*Acanthamoeba castellanii*) affects rhizosphere bacterial community composition and root architecture of rice (*Oryza sativa* L.). *Soil Biology & Biochemistry* 38:1665-1672
118. Krome, K., Rosenberg, K., Bonkowski, M., Scheu, S., 2009a. Grazing of protozoa on rhizosphere bacteria alters growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana*. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1866-1873.
119. Krome, K., Rosenberg, K., Dickler, C., Kreuzer, K., Ludwig-Müller, J., Ullrich-Eberius, C., Scheu, S., Bonkowski, M., 2009b. Soil bacteria and protozoa affect root branching via effects on the auxin and cytokinin balance in plants. *Plant and Soil* 328:191-201

120. Kuikman, P.J., Jansen, A.G., Vanveen, J.A., 1991. N-15-Nitrogen Mineralization From Bacteria By Protozoan Grazing At Different Soil-Moisture Regimes. *Soil Biology & Biochemistry* 23, 193-200.
121. Kuikman, P.J., Vanvuuren, M.M.I., Vanveen, J.A., 1989. Effect Of Soil-Moisture Regime On Predation By Protozoa Of Bacterial Biomass And The Release Of Bacterial Nitrogen. *Agriculture Ecosystems & Environment* 27, 271-279.
122. Lal, R., 2000. Soil management in the developing countries. *Soil Science* 165, 57-72.
123. Lamshead, P.J.D., 1993. Recent developments in marine benthic biodiversity research.
124. Larsen, S., 1952. The use of P 32 in studies on the uptake of phosphorus by plants. *Plant and soil* 4:1-10
125. Le Saux, R., Queneherve, P., 2002. Differential chemotactic responses of two plant-parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*, to some inorganic ions. *Nematology*, 4, 99-105,
126. Leake, J.R., Ostle, N.J., Rangel-Castro, J.I., Johnson, D., 2006. Carbon fluxes from plants through soil organisms determined by field ¹³CO₂ pulse-labelling in an upland grassland. *Applied Soil Ecology* 33, 152-175.
127. Louche, J. et al., 2010. Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *Fems Microbiology Ecology*, 73(2): 323- 335.
128. Mao, X., Hu, F., Griffiths, B., Li, H., 2006. Bacterial-feeding nematodes enhance root growth of tomato seedlings. *Soil Biology & Biochemistry* 38:1615-1622
129. Margenot, A.J., Paul, B.K., Sommer, R.R., Pulleman, M.M., Parikh, S.J., Jackson, L.E., Fonte, S.J., 2017. Can conservation agriculture improve phosphorus (P) availability in weathered soils? Effects of tillage and residue management on soil P status after 9 years in a Kenyan Oxisol. *Soil and Tillage Research* 166:157-166
130. Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition., New York.
131. Morizet J, Mingeau M Influence des facteurs de milieu sur l'absorption hydrique. Etude effectuee sur tomate decapitee en exsudation. i. facteurs nutritionnels. In: *Annales agronomiques*, 1976.
132. Morris, M.L., ed., David-Benz, H., ed., Carimentrand, A., Ravoarison, N., Razafimandivy, S., Vidal-Mbarga, H., Randrianarison, L., Graftieux, P., Losch, B.,

- Raveloarison, J., Razafintsalama, Z., 2011. Madagascar Étude économique et sectorielle (ESW) : Marchés agricoles à Madagascar : contraintes et opportunités. Rapport de synthèse, No. 66028. Banque mondiale, Washington, France, p. 112.
133. Mulia, R., Dupraz, C., 2006. Unusual fine root distributions of two deciduous tree species in southern France: what consequences for modelling of tree root dynamics? *Plant and Soil* 281, 71-85.
134. Mullaney, E.J., Ullah, A.H.J., 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 312:179-184
135. Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta* 27:31-36
136. Naidu, R., Syers, J., Tillman, R., Kirkman, J., 1990. Effect of liming and added phosphate on charge characteristics of acid soils. *European Journal of Soil Science* 41:157-164
137. Neumann, G., George, T.S., Plassard, C., 2009. Strategies and methods for studying the rhizosphere—the plant science toolbox. *Plant and Soil* 321:431-456
138. Nicholas, W., Viswanathan, S., 1975. A study of the nutrition of *Caenorhabditis briggsae* (Rhabditidae) fed on ¹⁴C and ³²P-labelled bacteria. *Nematologica* 21:385-400
139. Nicholas, W.L., 1962. A Study of a Species of Acrobelloides (Cephalobidae) in Laboratory Culture. *Nematologica* 8, 99-109.
140. Nicholas, W.L., 1975. The biology of free-living nematodes. Clarendon Press., Oxford.
141. Olsen, S.R., Watanabe, F.S., 1957. A method to determine a phosphorus adsorption maximum of soils as measured by the Langmuir isotherm. *Soil Sci Soc Am J* 21:144-149
142. Pardon, P., Reubens, B., Reheul, D., Mertens, J., De Frenne, P., Coussement, T., Janssens, P., Verheyen, K., 2017. Trees increase soil organic carbon and nutrient availability in temperate agroforestry systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 247, 98-111.
143. Peters, B.G., 1955. Soil-inhabiting nematodes. London: Butterworths Scientific Publications, pp. 44-53 pp.
144. Plassard, C. and Dell, B., 2010. Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology*, 30(9): 1129-1139.
145. Plassard, C., Robin, A., Le Cadre, E., Marsden, C., Trap, J., Herrmann, L., Waithaisong, K., Lesueur, D., Blanchard, E., Chapuis-Lardy, L., Hinsinger, P., 2015. Améliorer la

biodisponibilité du phosphore : comment valoriser les compétences des plantes et les mécanismes biologiques du sol ? *Innovations Agronomiques* 43, 115-138.

146. Plassard, C., Trap, J., Irshad, U., Ranoarisoa, P., Perrin, A., 2014. Do trophic relationships in soil enhance plant P nutrition: Phytate mineralization as a case study. *Phosphorus in Soil and Plant (PSP) 5th International Symposium (Montpellier, France)*. Communication orale.

147. Pollierer, M.M., Langel, R., Scheu, S., Maraun, M., 2009. Compartmentalization of the soil animal food web as indicated by dual analysis of stable isotope ratios ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1221-1226.

148. Postma-Blaauw, M.B., de Vries, F.T., de Goede, R.G.M., Bloem, J., Faber, J.H., Brussaard, L., 2005. Within-trophic group interactions of bacterivorous nematode species and their effects on the bacterial community and nitrogen mineralization. *Oecologia* 142, 428-439.

149. Pypers, P., Van Loon, L., Diels, J., Abaidoo, R., Smolders, E., Merckx, R., 2006. Plant-available P for maize and cowpea in P-deficient soils from the Nigerian Northern Guinea Savanna—comparison of E-and L-values. *Plant and soil* 283:251-264

150. Rabeharisoa L., 2004. Gestion de la fertilité et de la fertilisation phosphatée des sols ferrallitiques des hautes terres de Madagascar, Thèse de Doctorat d'Etat ES Sciences Naturelles. Université d'Antananarivo

151. Rabeharisoa, L., Razanakoto, O.R., Razafimanantsoa, M.P., Rakotoson, T., Amery, F., Smolders, E., 2012. Larger bioavailability of soil phosphorus for irrigated rice compared with rainfed rice in Madagascar: results from a soil and plant survey. *Soil Use and Management* 28, 448-456.

152. Raboin, L.-M., Ramanantsoanirina, A., Dzido, J.-L., Frouin, J., Radanielina, T., Tharreau, D., Dusserre, J., Ahmadi, N., 2013. Création variétale pour la riziculture pluviale d'altitude à Madagascar : bilan de 25 années de sélection. 2013 22.

153. Raboin, L.-M., Randriambololona, T., Radanielina, T., Ramanantsoanirina, A., Ahmadi, N., Dusserre, J., 2014. Upland rice varieties for smallholder farming in the cold conditions in Madagascar's tropical highlands. *Field Crops Research* 169, 11-20.

154. Raboin, L.-M., Razafimahafaly, A.H.D., Rabenjarisoa, M.B., Rabary, B., Dusserre, J., Becquer, T., 2016. Improving the fertility of tropical acid soils: Liming versus biochar

application? A long term comparison in the highlands of Madagascar. *Field Crops Research* 199:99-108

155. Rakotoson, T., Amery, F., Rabeharisoa, L., Smolders, E., 2014. Soil flooding and rice straw addition can increase isotopic exchangeable phosphorus in P-deficient tropical soils. *Soil use and management* 30:189-197

156. Rakotoson, T., Rabeharisoa, L., Smolders, E., 2016. Effects of soil flooding and organic matter addition on plant accessible phosphorus in a tropical paddy soil: an isotope dilution study. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 179, 765-774.

157. Ramaroson, V.H., Becquer, T., Sá, S.O., Razafimahatratra, H., Delarivière, J.L., Blavet, D., Vendrame, P.R.S., Rabeharisoa, L., Rakotondrazafy, A.F.M., 2017. Mineralogical analysis of ferralitic soils in Madagascar using NIR spectroscopy. *CATENA*.

158. Randriamanantsoa, L., Frossard, E., Oberson, A., Bunemann, E.K., 2015. Gross organic phosphorus mineralization rates can be assessed in a Ferralsol using an isotopic dilution method. *Geoderma* 257:86-93

159. Randriamanantsoa, L., Morel, C., Rabeharisoa, L., Douzet, J.-M., Jansa, J., Frossard, E., 2013. Can the isotopic exchange kinetic method be used in soils with a very low water extractable phosphate content and a high sorbing capacity for phosphate ions? *Geoderma* 200-201, 120.

160. Ranoarisoa M.P., Blanchart, E., vom Brocke, K., Ramanantsoanirina, A., Sester, M., Plassard, C., Cournac, L., Trap, J., 2017. Attractancy of bacterivorous nematodes to root-adhering soils differs according to rice cultivars *Rhizosphere* 3:128-131

161. Rao, A.S., Reddy, K.S., Takkar, P.N., 1997. Malachite green method compared to ascorbic acid for estimating small amounts of phosphorus in water, 0.01 M calcium chloride, and olsen soil extracts. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 28, 589-601.

162. Rasmann, S., Ali, J.G., Helder, J., van der Putten, W.H., 2012. Ecology and evolution of soil nematode chemotaxis. *J Chem Ecol* 38:615-628

163. Rengarajan, S., Hallem, E.A., 2016. Olfactory circuits and behaviors of nematodes. *Current Opinion in Neurobiology* 41:136-148

164. République démocratique de Madagascar, 2015. Plan National de développement 2015-2019. 105p

165. Richardson, A.E., Hadobas, P.A., Hayes, J.E., 2000. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant, Cell & Environment* 23:397-405
166. Richardson, A.E., Simpson, R.J., 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol* 156:989-996
167. Rodrigues, M., Pavinato, P.S., Withers, P.J.A., Teles, A.P.B., Herrera, W.F.B., 2016. Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. *Sci Total Environ* 542:1050-1061
168. Ronn, R.M., Griffiths, B.S., Young, I.M., 2001. Protozoa, nematodes and N-mineralization across a prescribed soil textural gradient. *Pedobiologia* 45, 481-495.
169. Ronn, R.M., Griffiths, B.S., Young, I.M., 2001. Protozoa, nematodes and N-mineralization across a prescribed soil textural gradient. *Pedobiologia* 45, 481-495.
170. Saidou, A., Janssen, B., Temminghoff, E., 2003. Effects of soil properties, mulch and NPK fertilizer on maize yields and nutrient budgets on ferralitic soils in southern Benin. *Agriculture, ecosystems & environment* 100:265-273
171. Salome, C., Coll, P., Lardo, E., Villenave, C., Blanchart, E., Hinsinger, P., Marsden, C., Le Cadre, E., 2014. Relevance of use-invariant soil properties to assess soil quality of vulnerable ecosystems: The case of Mediterranean vineyards. *Ecological Indicators* 43, 83-93.
172. Sanchez, P.A., Shepherd, K.D., Soule, M.J., Place, F.M., Buresh, R.J., Izac, A.-M.N., Mokwunye, A.U., Kwesiga, F.R., Ndiritu, C.G., Woomer, P.L., 1997. Soil Fertility Replenishment in Africa: An Investment in Natural Resource Capital, in: Buresh, R.J., Sanchez, P.A., Calhoun, F. (Eds.), *Replenishing Soil Fertility in Africa*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 1-46.
173. Schachtman, D.P., Reid, R.J., Ayling, S.M., 1998. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology* 116, 447-453.
174. Schimel, J.P., Bennett, J., 2004. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology* 85, 591-602.
175. Seinhorst, J., 1962. Extraction methods for nematodes inhabiting soil, in: Murphy, P.W. (Ed.), *Progress in Soil Zoology*. Butterworths, London, pp. 243-256.

176. Setälä, H., Aarnio, T., 2002. Vertical stratification and trophic interactions among organisms of a soil decomposer food web – a field experiment using ^{15}N as a tool. *European Journal of Soil Biology* 38, 29-34.
177. Setälä, H., Kulmala, P., Mikola, J., Markkola, A.M., 1999. Influence of ectomycorrhiza on the structure of detrital food webs in pine rhizosphere. *Oikos* 87, 113-122.
178. Shaul, O., 2002. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 15, 309-323.
179. Siddiqi, M.R., 1986. Tylenchida: parasites of plants and insects. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough SL2 3BN.
180. Smith, S.E., Read, D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis - Third Edition. Academic Press, London.
181. Sohlenius, B., 1980. Abundance, Biomass and Contribution to Energy Flow by Soil Nematodes in Terrestrial Ecosystems. *Oikos* 34, 186-194.
182. Somasundaram, S., Bonkowski, M., Iijima, M., 2008. Functional role of mucilage-border cells: a complex facilitating protozoan effects on plant growth. *Plant production science* 11:344-351
183. Southey, J.F., 1986. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Reference Book 402, London,
184. Sundin, P., Valeur, A., Olsson, S., Odham, G., 1990. Interactions between bacteria-feeding nematodes and bacteria in the rape rhizosphere - Effects on root exudation and distribution of bacteria. *Fems Microbiology Ecology* 73:13-22
185. Taylor, W.D., 1986. The Effect of Grazing by a Ciliated Protozoan on Phosphorus Limitation of Heterotrophic Bacteria in Batch Culture1. *The Journal of Protozoology* 33, 47-52.
186. Taylor, W.D., 1986. The Effect of Grazing by a Ciliated Protozoan on Phosphorus Limitation of Heterotrophic Bacteria in Batch Culture1. *The Journal of Protozoology* 33, 47-52.
187. Team R, 2016. RStudio: Integrated Development for R
188. Tenenhaus, M., 1998. La régression PLS, Paris.

189. Trap, J., Bernard, L., Brauman, A., Pablo, A.L., Plassard, C., Ranoarisoa, M.P., Blanchart, E., 2015. Plant Roots Increase Bacterivorous Nematode Dispersion through Nonuniform Glass-bead Media. *J. Nematol.* 47, 296-301.
190. Trap, J., Bonkowski, M., Plassard, C., Villenave, C., Blanchart, E., 2016. Ecological importance of soil bacterivores for ecosystem functions. *Plant and Soil* 398, 1-24.
191. Trofymow, J.A., Morley, C.R., Coleman, D.C., Anderson, R.V., 1983. Mineralization of cellulose in the presence of chitin and assemblages of microflora and fauna in soil. *Oecologia* 60, 103-110.
192. Tugel, A.J., A.M. Lewandowski, and D. Happe-vonArb, eds. 2000. *Soil Biology Primer*. Ankeny, IA: Soil and Water Conservation Society.
193. UPDR/FAO, 2001. Diagnostic et perspectives de développement de la filière riz à Madagascar. FAO/RAFP Antananarivo
194. Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703-707.
195. Venette, R.C., Ferris, H., 1997. Thermal constraints to population growth of bacterial-feeding nematodes. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 63-74.
196. Venette, R.C., Ferris, H., 1998. Influence of bacterial type and density on population growth of bacterial-feeding nematodes. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 949-960.
197. Villenave, C., Oumar Ba, A., Rabary, B., 2009a. Analyse du fonctionnement biologique du sol par l'étude de la nématofaune : semis direct versus labour sur les hautes terres près d'Antsirabé (Madagascar). *Etude et Gestion des Sols, Association française pour l'étude des sols*, 16 (3/4), pp.369-378.
198. Villenave, C., Rabary, B., Chotte, J.-L., Blanchart, E., Djigal, D., 2009b. Impact of direct seeding mulch-based cropping systems on soil nematodes in a long-term experiment in Madagascar. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 44, 949-953.
199. Villenave, C., Rabary, B., Kichenin, E., Djigal, D., Blanchart, E., 2010. Earthworms and plant residues modify nematodes in tropical cropping soils (Madagascar): a mesocosm experiment. *Applied and Environmental Soil Science* 2010, Article ID 323640.
200. Vitousek, P.M., Porder, S., Houlton, B.Z., Chadwick, O.A., 2010. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. *Ecol. Appl.* 20, 5-15.

201. Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37, 29-38.
202. Wold, S., Sjostrom, M., Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58, 109-130.
203. Woods, L.E., Cole, C.V., Elliott, E.T., Anderson, R.V., Coleman, D.C., 1982. Nitrogen transformations in soil as affected by bacterial-microfaunal interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 93-98.
204. Xiao, H., Griffiths, B., Chen, X., Liu, M., Jiao, J., Hu, F., Li, H., 2010. Influence of bacterial-feeding nematodes on nitrification and the ammonia-oxidizing bacteria (AOB) community composition. *Applied Soil Ecology* 45, 131-137.
205. Yeates, G.W., 2003. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects. *Biology and Fertility of Soils* 37, 199-210.
206. Yeates, G.W., Bongers, T., De Goede, R.G.M., Freckman, D.W., Georgieva, S.S., 1993. Feeding Habits in Soil Nematode Families and Genera—An Outline for Soil Ecologists. *J. Nematol.* 25, 315-331.
207. Young, I., Griffiths, B., Robertson, W., 1996. Continuous foraging by bacterial-feeding nematodes. *Nematologica* 42:378-382
208. Zhu, T., Yang, C., Wang, J., Zeng, S., Liu, M., Yang, J., Bai, B., Cao, J., Chen, X., Müller, C., 2017. Bacterivore nematodes stimulate soil gross N transformation rates depending on their species. *Biology and Fertility of Soils*.
209. Zou, Y., Hu, Z., Zhang, J., Xie, H., Guimbaud, C., Fang, Y., 2016. Effects of pH on nitrogen transformations in media-based aquaponics. *Bioresource Technology* 210, 81-87