



*Influence des mycorhizes à
arbuscules sur le
développement de quelques
espèces végétales de forêt
sèche cultivées en serre*

Octobre 2006

Rapport n° 7 /2006



MABioM
Mécanismes Adaptatifs et
BioMolécules des plantes
endémiques de Mélanésie

Influence des mycorhizes à arbuscules sur le développement de quelques espèces végétales de forêt sèche cultivées en serre

Rapport de Recherche

Professeur Hamid AMIR

Nouméa, octobre 2006

Convention PCFS-UNC n° 29 du 14 juin 2005

Origine du financement : Programme Forêt Sèche
(Province Nord et Province Sud de Nouvelle-Calédonie)

Les partenaires du Programme Forêt Sèche



PREFACE

Par sa diversité de formes et d'espèces, par son adaptation à des conditions topographiques, climatiques et pédologiques plutôt difficiles, la flore des forêts sèches étonne vraiment.

Sachant le niveau de dégradation dramatique qu'a subi cet écosystème depuis l'arrivée de l'homme en Nouvelle-Calédonie, la volonté de réparer une partie de ces dégâts est née.

C'est à cet objectif que le Programme Forêt Sèche s'emploie depuis sa création en 2001. Parmi les techniques qu'offre la restauration des forêts dégradées, figure la plantation d'espèces végétales appropriées. Avant de planter, il faut comprendre les mécanismes physiologiques de ces plantes (c'est le rôle de l'UNC), recenser la flore et connaître ses processus de régénération et de multiplication (à la charge de l'IRD), observer la phénologie et le comportement *in situ* de ces plantes, en récolter les graines, en maîtriser la culture en pépinière puis l'installation en forêt (c'est le travail de l'IAC).

On comprend bien que synergie, stratégie et collaboration sont les conditions nécessaires à ce que ces différents travaux débouchent sur des résultats tangibles.

La présente étude, 3^{ème} volet d'une opération sur les symbiotes de forêt sèche démarrée en 2003 pour s'achever entre 2008 et 2010, s'inscrit dans ce schéma d'ensemble. A partir d'un protocole scientifique aussi précis que rigoureux, il a été possible de sélectionner une souche mycorhizienne intéressante (la FSCtAc : il faudra peut-être lui trouver un nom plus sympathique !) puis d'en prouver la grande efficacité sur un lot de 6 espèces végétales.

Sa multiplication à plus grande échelle en laboratoire paraît aujourd'hui non seulement possible mais souhaitable. A l'heure où le transfert des connaissances sur la multiplication des espèces de la forêt sèche est programmé, nul doute que les pépiniéristes privés seront intéressés par cette souche mycorhizienne qui fait plus que tripler la croissance et le développement foliaire des jeunes plants. C'est un gain substantiel pour le pépiniériste bien sûr mais aussi pour le planteur et le gestionnaire du site d'introduction puisque ces plantes seront moins stressées, mieux armées pour s'adapter et plus propices à se développer.

On ne peut donc qu'encourager la poursuite de ces travaux :

- après la phase en serre, suivre ces plants mycorhizés sur le terrain,
- inoculer cette souche FSCtAc sur d'autres espèces que les six testées,
- rechercher des symbiotes sur d'autres plantes que les vingt cinq déjà étudiées (une soixantaine d'espèces sont déjà cultivables en pépinière).

Je remercie bien sincèrement le Professeur H. Amir et son équipe pour le travail déjà réalisé et pour les résultats très encourageants qui en ressortent. La restauration des forêts sèches néo-calédoniennes est possible : il suffit d'y croire et de s'en donner les moyens et les compétences.

Christian PAPINEAU

Directeur du Programme Forêt Sèche

Introduction

Les forêts sèches de Nouvelle-Calédonie, dont les surfaces se sont très fortement réduites sous la pression anthropique (Bouchet et al., 1995), font l'objet, depuis quelques années, d'une attention particulière. Cette attention s'est concrétisée notamment par la création du « Programme forêt sèche » qui mène des actions intégrées touchant différents domaines, en vue de préserver et de restaurer ces forêts. Parmi ces actions, un programme de recherche visant d'une part une meilleure connaissance de ses forêts, d'autre part l'amélioration des techniques de restauration est actuellement en cours.

Notre laboratoire a pris en charge des travaux de recherche concernant deux domaines :

- l'écophysiologie et la multiplication de certaines espèces végétales,
- le potentiel microbiologique, notamment mycorhizien des sols de forêt sèche et son utilisation pour améliorer la maîtrise de la croissance et l'adaptation des espèces végétales les plus importantes.

Les champignons mycorhiziens sont connus comme jouant un rôle considérable dans le développement de la grande majorité des plantes, notamment en milieu forestier et sur des sols carencés (Boulard, 1990 ; Sieverding, 1991). Leurs effets se manifestent non seulement au niveau de la nutrition minérale des plantes (notamment phosphore et azote), mais aussi dans leur adaptation au stress hydrique (les fluctuations d'humidité sont très fortes en forêt sèche) et leur résistance générale (Strullu, 1991, Varma, 1998).

Les recherches réalisées jusqu'à présent sur les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) dans les forêts sèches néo-calédoniennes ont permis notamment de confirmer l'importance de cette symbiose dans cet écosystème, d'apprécier l'affinité de ces champignons avec 25 espèces végétales de forêt sèche, puis d'isoler, de purifier et de cultiver en serre, quelques souches AMF pures.

Au cours de l'année 2005, trois de ces souches, apparemment les plus performantes, d'après leurs effets sur la culture de sorgho sur laquelle elle ont été purifiées, ont été testées pour estimer leur degré de sporulation et leur capacité à coloniser les racines de sorgho. Une souche a ainsi été sélectionnée.

Une expérimentation en serre pour évaluer l'impact de cette souche et de sols naturels plus ou moins riches en spores mycorhiziennes a été alors mise en place. Cette expérience, qui concerne 6 espèces végétales de forêt sèche habituellement bien endomycorhizées en milieu naturel, a duré une année et ne s'est terminée qu'en août 2006. L'objectif principal de cette expérience est de vérifier les effets comparés de différents types d'inoculum mycorhiziens, avec comme finalité la possibilité de préconiser plus d'une technique, selon les conditions matérielles disponibles.

Nous exposons donc ici les travaux réalisés de mars 2005 à août 2006.

Matériel et méthodes

Matériel

Souches étudiées

Parmi les 5 souches isolées à partir des sols de forêts sèches, 3 ont fait l'objet d'une étude de sporulation et de l'intensité de mycorhization afin de sélectionner la plus performante pour l'essai d'inoculation de plants de forêt sèche en serre. Il s'agit de : FSP5, FSCtAc et FST5 Les 3 souches appartiennent au genre *Glomus*, les espèces n'étant pas encore identifiées.

Ces 3 souches sont conservées en serre sur des plants de sorgho.

Sols utilisés pour l'inoculation

Vingt et un échantillons de sols provenant de la forêt de Ouen Toro ont été collectés, certains sous diverses plantes, d'autres au niveau de surfaces nues. L'étude de ces échantillons a permis de choisir 2 sols, l'un particulièrement riche en spores endomycorhiziennes, l'autre pauvre en spores. Ces 2 sols sont ensuite utilisés comme inoculum pour comparer leurs effets à ceux de la souche sélectionnée.

Espèces végétales utilisées pour l'essai en serre

Six espèces végétales de forêt sèche ont été choisies parmi les 25 espèces étudiées les années précédentes pour leur affinité avec les AMF. Le tableau 1 en donne la liste, leurs familles et leur intérêt.

Les plants sont fournis par le département Forêt de l'Institut Agronomique néo-Calédonien (IAC), à raison d'une soixantaine de plants pour *Gardenia urvillei* et de 20 à 24 plants pour les 5 autres espèces.

Tableau 1 : liste des espèces végétales de forêt sèche testées

Espèces	Familles	Intérêt de l'espèce
<i>Gardenia urvillei</i>	RUBIACEAE	Restauration
<i>Croton insularis</i> Baillon	EUPHORBIACEAE	Restauration
<i>Cupianopsis trigonocarpa</i> Radlkofer	SAPINDACEAE	Restauration
<i>Ochrosia inventorum</i> L. Allorge	APOCYNACEAE	Rareté
<i>Premna serratifolia</i> Linné	LAMIACEAE	Restauration
<i>Arytera</i> sp.	SAPINDACEAE	Restauration

Méthodes

Estimation de la sporulation des souches et de leur aptitude à mycorhizer la plante

Avant de préparer l'essai de mycorhization en serre et afin de choisir une souche pour cet essai, les 3 souches citées plus haut sont testées pour leur capacité à sporuler et pour leur aptitude à mycorhizer la plante. Pour ce dernier test, les souches sont inoculées sur des plants de sorgho cultivés en serre, sur sol désinfecté (autoclavage 1 h à 120 °C) en pot de 1 L. Des racines fines sont prélevées après 5 mois de culture et le taux de mycorhization est déterminé. La méthode précise est décrite au point « Evaluation du taux de mycorhization des espèces végétales ».

Les champignons endomycorhiziens sporulent à l'extérieur des racines et leurs spores se retrouvent ensuite dans le sol. On peut donc sur ce principe estimer le degré de sporulation d'une souche AMF, ce paramètre traduisant une certaine capacité à résister aux mauvaises conditions et à se propager par le sol, donc une certaine compétitivité directement liée à l'efficacité des souches.

Pour mesurer la sporulation, une petite quantité de sol est prélevée en plusieurs points au niveau des pots contenant les souches AMF à tester (voir la partie « matériel ») puis traité pour extraire les spores. La méthode est basée sur le principe que les spores AMF sont plus grosses que tous les autres microorganismes du sol. 50 g de sol sont tamisés sur une série de deux tamis de 250 µm et 50 µm mis l'un sur l'autre dans le but de récupérer l'ensemble des spores mycorhiziennes, ayant une taille comprise entre 50 et 250 µm (plus de 99 % des spores endomycorhiziennes de ces sols). Le contenu du tamis de 50 µm est recueilli dans un flacon avec un peu d'eau et centrifugé pendant 5 minutes à 800 tours/minute en présence d'un gradient de saccharose à 50%. Lors de la centrifugation, les spores viennent buter contre le saccharose, mais ne le traversent pas, contrairement aux particules minérales qui vont au fond du tube. L'interphase contenant les spores est ainsi prélevée à la pipette Eppendorf, mise dans un tamis de 25 µm et abondamment rincée.

Une aliquote de 1 mL de la suspension de spores obtenue est alors agitée et déposée dans un fond de boîte de pétri en plastique quadrillée (65 mm x 15 mm, quadrillage 10 mm), puis observée sous la loupe binoculaire (grossissement maximum de 45). Le nombre de spores AMF contenu dans

la boîte de pétri est déterminé. Les spores noires, celles qui flottent en surface ainsi que celles qui sont abîmées ne sont pas comptabilisées car elles sont peu viables. En cas de doute sur la nature de la particule, une faible pression sur la spore la fait éclater et un voile opaque en sort. Un simple calcul permet ensuite d'exprimer le résultat en nombre de spores par 100g de sol.

La même méthode est utilisée pour quantifier la densité des spores AMF dans les pots de culture des 6 espèces végétales de forêt sèche utilisée pour estimer les effets de différents inoculums mycorhiziens (voir plus loin). Quatre échantillons par traitement sont ainsi analysés.

Protocole général de mycorhization

Trois types d'inoculums mycorhiziens sont utilisés :

* La souche FSCtAc : elle est apportée sous forme de suspension de spores, à raison d'environ 100 spore par plant.

* Le sol de forêt sèche le plus riche en spores parmi les 21 analysés : il contient 2020 spores viables/100g de terre, ce qui est une densité relativement élevée (Gould et al., 1996). L'inoculation est réalisée directement par apport de 5 g de sol, soit environ 100 spores.

* Le sol de forêt sèche le plus pauvre en spores parmi les 21 analysés. Il contient 63 spores viables/100g de terre. L'inoculation étant réalisée comme précédemment, l'apport amène environ 3 spores par plant.

- Pour l'espèce *Gardenia urvillei*, 14 plants sont préparés pour chacun des 4 traitements (témoin non mycorhizé plus 3 inoculums mycorhiziens). Les plants sont répartis à raison de 2 plants par pot de 3 L, soit 7 pots par traitement.

- Pour chacune des 5 autres espèces végétales utilisées, 7 à 8 plants témoins non mycorhizés sont préparés, ainsi que 4 à 5 plants pour les 3 traitements de mycorhization, le nombre de plants disponibles n'étant pas suffisant pour réaliser 8 répétitions. Cette répartition est dictée par le fait que les plants mycorhizés peuvent par ailleurs être tous considérés comme un seul ensemble pour être comparés aux témoins non mycorhizés. Pour ces 5 espèces, les plants sont cultivés séparément dans des pots de 3 L.

Tous les pots sont placés en serre sous arrosage automatique (temps d'arrosage variant selon la saison : une à deux fois par jour pendant 3 à 5 mn).

Mise en place de l'essai en serre avec les six espèces végétales étudiées

L'espèce *Gardenia urvillei* a été traitée un peu différemment. En effet, pour cette espèce, nous avons pu obtenir des plantules très jeunes germées sur un substrat hors-sol. Les plantules ont donc été inoculées avec des spores mycorhiziennes trois semaines environ après mise en germination.

Pour les 5 autres espèces, les plants fournis avaient déjà une taille de 10 à 20 cm selon les cas. Ils étaient cultivés sur un substrat essentiellement composé de terreau.

** Préparation des inoculums mycorhiziens*

En ce qui concerne les sols, ils sont utilisés directement après séchage et tamisage sur tamis de 2 mm. La richesse d'un sol en spores AMF traduit sa capacité à mycorhizer les plantes (aussi appelée potentiel mycorhizogène). C'est donc dans ce but que nous avons vérifié la densité en spores AMF viables de 21 sols et que les 2 valeurs extrêmes ont été ensuite choisies pour tester leur effet sur les espèces végétales étudiées.

Pour la souche pure FSCtAc, une extraction des spores est d'abord réalisée. La méthode est décrite au point « estimation de la sporulation des souches et de leur aptitude à mycorhizer la plante ». La suspension obtenue est vérifiée à la loupe binoculaire. Elle est ensuite désinfectée grâce à l'ajout de Chloramine T à 2% avec quelques gouttes de Tween 20, pour réduire les risques d'avoir des pathogènes, avant d'être de nouveau rincée et récupérée dans un volume d'eau d'environ 100 mL.

** Inoculation des plants et mise en pot.*

Le substrat utilisé consiste en 60% d'un sol relativement pauvre que nous utilisons habituellement pour la culture des souches mycorhiziennes (la mycorhization nécessite notamment une teneur relativement basse en phosphore), additonné de 15% de sable et de 25% de terreau (en volume). L'ensemble, est légèrement humidifié puis désinfecté à l'autoclave pendant 1h à 120°C, afin de tuer les spores mycorhiziennes autochtones. Le fond des pots est tapissé de gravier afin d'éviter la perte du sol et de permettre une bonne percolation. Les pots sont d'abord remplis à moitié de sol et les plants sont déposés sur le sol à raison d'une plante par pot, sauf pour *Gardenia urvillei*, pour lequel 2 plantes sont utilisées par pot (plantules relativement petites).

Pour les inoculums naturels (sols), chaque plante à inoculer reçoit 5 grammes de sol contenant des spores, directement au contact des racines. Les plants sont alors recouverts de sol désinfecté et les pots sont placés en serre sous arrosage automatique (2 fois par jour pendant 3 à 8 mn, variant selon la température et l'hygrométrie).

L'inoculation avec la souche FSCtAc est effectuée en apportant 5 mL de suspension (voir précédemment) versées le long des racines des plants à inoculer, de façon à apporter 100 spores par plant. Les pots sont ensuite remplis et mis dans les mêmes conditions que précédemment.

Evaluation de l'effet des mycorhizes sur la croissance des plants et sur la nutrition minérale

Pour l'espèce *Gardenia urvillei*, la croissance des plants est évaluée après 9 mois puis après une année de développement. Pour les autres espèces, l'évaluation de la croissance n'est réalisée qu'après une année.

Les paramètres de croissance utilisés sont :

- * La hauteur des plants
- * Le nombre de feuilles. Lorsque la plante en question possède beaucoup de feuilles, ce paramètre est remplacé par le nombre de ramifications.

Tous les plants sont mesurés, le nombre de répétitions est donc de 14 pour *Gardenia urvillei* et de 5 à 8 pour les autres espèces (voir précédemment).

Pour la nutrition, les taux d'azote total et de phosphore total des feuilles sont mesurés après une année. Les analyses sont confiées au laboratoire des moyens analytiques de l'IRD-Nouméa.

Evaluation du taux de mycorhization des espèces végétales

** Echantillonnage*

Afin d'éviter de stresser excessivement les plantes, une seule mesure du taux de mycorhization est réalisée après une année. Pour chaque plant, des racines fines sont prélevées à 3 endroits différents du pot ; ces racines sont mélangées et constituent un échantillon. Chaque échantillon de racine est noté et numéroté. Quatre échantillons sont préparés par traitement et par espèce.

La phase la plus critique de quantification est la préparation des racines pour l'examen. Ses principales étapes sont le lavage, l'éclaircissement et la coloration des mycorhizes, le montage et l'observation.

** Lavage*

L'expérience montre que plus les échantillons sont propres plus l'évaluation est rapide et précise. Pour cela les racines sont débarrassées des particules de terre au moyen d'un rinçage abondant à l'eau courante dans une passoire. S'il reste des mottes de terre autour des racines, elles sont trempées dans une solution d'hexamétaphosphate de sodium (Calgon) qui entraînera la dispersion des particules terreuses (Brundrett et al., 1994). Ensuite, seules les petites racines relativement claires et peu sclérifiées seront sélectionnées.

** Eclaircissement et coloration des mycorhizes*

Les racines sont systématiquement éclaircies et colorées avant toute observation microscopique. La technique d'éclaircissement et de coloration de Phillips et Haymann (1970) est souvent utilisée lorsqu'on a affaire à des endomycorhizes à vésicules et arbuscules. Elle est rapide

et fonctionne pour un grand nombre de plantes-hôtes. Les racines sont placées dans des piluliers contenant une solution de KOH à 10%, dans une étuve à 90°C pendant 1 heure. Les racines sont ensuite abondamment rincées sous l'eau courante, égouttées et remises dans les piluliers où elles sont recouvertes avec une solution de bleu trypan à 0,05% dans le lactophénol. Les piluliers sont placés à l'étuve à 90°C pendant 15 minutes. Les racines sont ensuite rincées abondamment et conservées dans de l'eau distillée avant le montage.

* *Montage*

On prélève des segments de racines de quelques centimètres seulement choisis au hasard. Pour la quantification des endomycorhizes, Toth et al. (1990) jugent nécessaire l'examen par plant de 40 segments racinaires d'une longueur de 2 à 3 cm. Ces segments sont montés parallèlement par groupes de 10 à 15 dans la glycérine entre lame et lamelle (Kormanik et McGraw, 1982). Les racines restantes sont conservées dans de l'eau ou du glycérol acide.

* *Observation*

Les lames sont observées au microscope, chaque fragment étant soigneusement vérifié sur toute sa longueur, aux grossissements de 100 et 400.

* *Paramètres d'évaluation*

Plusieurs systèmes de notation sont utilisés pour évaluer l'importance de l'infection mycorhizienne. Le système proposé par Trouvelot et al. (1986) a été retenu pour cette étude. L'importance de la mycorhization est appréhendée à l'aide des paramètres suivants :

- *Le pourcentage de racines mycorhizées* : aussi appelé fréquence de la mycorhization. $F(\%) = (\text{nb fragments myco} / \text{nb total}) \times 100$ (Marx et al., 1977). C'est le paramètre le plus utilisé.
- *Intensité globale de la mycorhization* : $M(\%) = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / \text{nombre total de fragments}$. Dans cette formule, n_5 représente le nombre de fragments mycorhizés notés 5, n_4 le nombre de fragments notés 4. C'est ce paramètre qui traduit le mieux le degré de mycorhization.
- *Intensité de mycorhization des fragments mycorhizés* : $m(\%) = M \times (\text{nb total}) / (\text{nb myco}) = M \times 100 / F$
- *Intensité arbusculaire dans le système racinaire* : Ce paramètre a été apprécié de façon grossière en raison de la difficulté à identifier clairement les arbuscules, les racines étant souvent relativement foncées.

Maintien en collection de souches endomycorhiziennes

Les souches AMF sont maintenues en collection en serre sur des plants de sorgho.

** Préparation des plants de sorgho*

Une centaine de graines de sorgho sont désinfectées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3.5% pendant 15 minutes. Elles sont ensuite soigneusement rincées à l'eau stérile. Les graines sont mises à germer dans de la vermiculite stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Le substrat est ainsi vierge de tous parasites susceptibles de nuire à la germination des graines. Le semis est effectué dans un bac en plastique recouvert d'un couvercle transparent. Le bac est placé à la lumière artificielle (luminosité : 5000 lux) pendant 14h par jour.

** Inoculation des spores aux plants de sorgho*

Les spores sont extraites selon la méthode décrite précédemment. Des pots de 300 mL sont remplis avec un substrat stérile composé d'un mélange de terre peu fertile (1/2), de terreau (1/4) et de sables (fin, moyen et grossier, 1/4) sur lequel est déposée une plantule de sorgho au stade deux feuilles dont l'extrémité des racines est coupé, afin de favoriser le développement des racines secondaires. Cinq mL de suspension de spores sont directement déposées sur les racines de la plantule qui sont ensuite recouvertes de substrat. Les pots contenant le même inoculum sont placés côte à côte dans la serre et arrosés automatiquement à l'aide de sprinkler deux fois par jour. Après 6 mois de culture les pots sont mis à sécher, puis le sol et les racines sont récupérés et mis dans des sacs stériles bien fermés. L'inoculum AMF qui est alors sous forme de spores et de racines mycorhizées peut être conservé dans un lieu sec pendant un à deux ans.

Résultats et discussion

Comparaison de 3 souches AMF pour leur sporulation et leur capacité à mycorhizer la plante

L'étude réalisée en 2005-2006 fait suite à un travail d'évaluation du statut des mycorhizes à arbuscules en forêts sèches, de qualification de la mycorhization de 25 espèces végétales de ces forêts, puis d'isolement de souches. Cinq souches avaient été purifiées, parmi lesquelles 3 apparaissaient comme plus efficaces. Ce sont ces 3 souches qui sont analysées ici de façon plus précise afin d'en sélectionner une pour l'expérimentation en serre.

Tableau 2 : Comparaison de la sporulation et de la capacité à mycorhizer des plants de sorgho des 3 souches AMF étudiées

Souches	Sporulation (sp/100g de sol)	Intensité de mycorhization M (%)	Intensité arbusculaire (%)
FSCtAc	23 600	38,9	+++
FSP5	16 100	11,5	+
FST5	24 800	19,3	++

Les résultats (Tab. 2) montrent que la souche FSCtAc présente un taux de colonisation des racines (M) nettement supérieur aux 2 autres souches. Les arbuscules sont visibles en plus grand nombre dans les racines. Ces 2 critères indiquent d'une part la capacité des champignons à se propager dans le système racinaire de la plante et à établir des échanges aux travers des fines ramifications arbusculaires, notamment pour le phosphore et l'azote (Jakobsen et al., 2002). La production de spores de la souche FSCtAc est également élevée (23 600 pour 100 g de sol). La sporulation joue un rôle important dans l'adaptation de la souche, puisqu'il s'agit de spores de résistance, destinées à conserver le champignon et à le propager lorsque les racines meurent ou que les conditions sont défavorables. Cette capacité traduit donc l'aptitude de la souche à persister dans le milieu.

A la suite de ces résultats, la souche FSCtAc est choisie pour l'expérimentation en serre sur 6 espèces végétales.

Tableau 3 : Influence de différents moyens de mycorhization sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques et sur les paramètres de croissance de *Gardenia urvillei* (Rubiaceae).

Traitements de Mycorhization	Temps de croissance*	F (%)	M (%)	A approx.	Spores viables /100 g sol)	Hauteur des plants (cm)	Nombre de feuilles	P dans les feuilles (mg/kg)	N dans les feuilles (%)
Témoin non mycorhizé	9 mois 12 mois	0	0	/	0	4,6 ± 1,3 5,2 ± 1,5	13 ± 4 14 ± 3	1722	0,68
Sol pauvre en spores AMF	9 mois 12 mois	7,0	0,6	-	1250	4,6 ± 1,2 5,6 ± 1,2	15 ± 3 17 ± 4	2281	0,73
Sol riche en spores AMF	9 mois 12 mois	70,9	15,2	+	2640	8,0 ± 2,6 11,9 ± 3,4	26 ± 5 32 ± 6	3846	0,88
Souche pure (FSCtAc)	9 mois 12 mois	74,6	32,4	++	10330	16,2 ± 6,1 21,5 ± 8,2	45 ± 10 58 ± 12	4537	1,27

F (%) : Fréquence de mycorhization en % ; M (%) : intensité de mycorhization ; A approx. : développement des arbuscules, notation approximative globale

* : Temps de croissance depuis le repiquage à l'état de plantules au stade 2 feuilles.

Influence de différents inoculums AMF sur la croissance de 6 espèces végétales de forêt sèche et sur quelques paramètres de mycorhization

Trois inoculums AMF bien différents sont comparés quant à leurs effets sur la plante, dans cette expérience, sur une durée totale d'une année. Il ressort clairement que la mycorhization améliore fortement la croissance des 6 espèces testées. Les taux de mycorhization obtenus sont voisins de ceux rapportés par d'autres auteurs (Jasper et al., 1987 ; Shetty et al., 1994)

- Effets des inoculums sur *Gardenia urvillei*

Nous discuterons plus en détail les effets des inoculums sur l'espèce *Gardenia urvillei* (Rubiaceae) car le travail sur cette espèce a été réalisé avec un nombre suffisamment important de plants et en partant de plantules très jeunes, de sorte que les résultats sont plus nets (Tab. 3, Fig. 1).

Il apparaît que les plants témoins non mycorhizés de cette espèce se développent très mal, et les analyses confirment qu'ils ne sont pas mycorhizés. Cette faible croissance (5,2 cm en moyenne en une année) indique une forte dépendance de la plante vis-à-vis des AMF. Il est bien connu que les espèces végétales ont des niveaux de dépendance très divers vis-à-vis de la mycorhization (Strullu, 1991). Les concentrations en phosphore et en azote dans les parties aériennes confirment cette dépendance : elles sont nettement plus fortes dans les échantillons bien mycorhizés, ce qui indiquent un rôle important des AMF dans la nutrition minérale de cette espèce végétale.

L'inoculum constitué par un sol naturel pauvre en spores AMF (65 spores/100 g de sol) ne montre pas d'effet significatif sur la croissance des plants, bien que le nombre de feuilles par plant soit légèrement plus élevé. On peut noter que l'intensité de mycorhization (M %), qui traduit à peu près le pourcentage de surface racinaire colonisé par les symbiotes fongiques, est très faible (0,6 %) et les arbuscules semblent absents. Il est probable que cet inoculum soit non seulement trop peu dense pour permettre une véritable colonisation des racines par les symbiotes mycorhiziens, mais que les spores soient dans un état de stress trop élevé pour permettre une germination efficace. On constate toutefois une très faible amélioration des taux de phosphore et d'azote.

Les deux autres inoculums utilisés possèdent des densités en spores AMF à peu près équivalentes ayant permis d'apporter environ 100 spores/plant ; mais l'un est un sol naturel de forêt sèche, l'autre correspond à la souche pure FSCtAc. L'inoculum « sol riche » stimule nettement la croissance de la plante, avec une augmentation de la hauteur des plants et du nombre de feuilles de 128 %. La fréquence de mycorhization (F %) qui reflète à peu près le pourcentage de racines contenant des AMF, est de 70,9 %, tandis que l'intensité de mycorhization est de 15,2 %. Les arbuscules sont visibles et la densité des spores formées à partir des racines mycorhizées est de 2640 spores pour 100 g de sol. Ceci montre clairement que l'inoculum naturel contenait suffisamment de spores en bon état physiologique et qui ont permis de produire suffisamment de

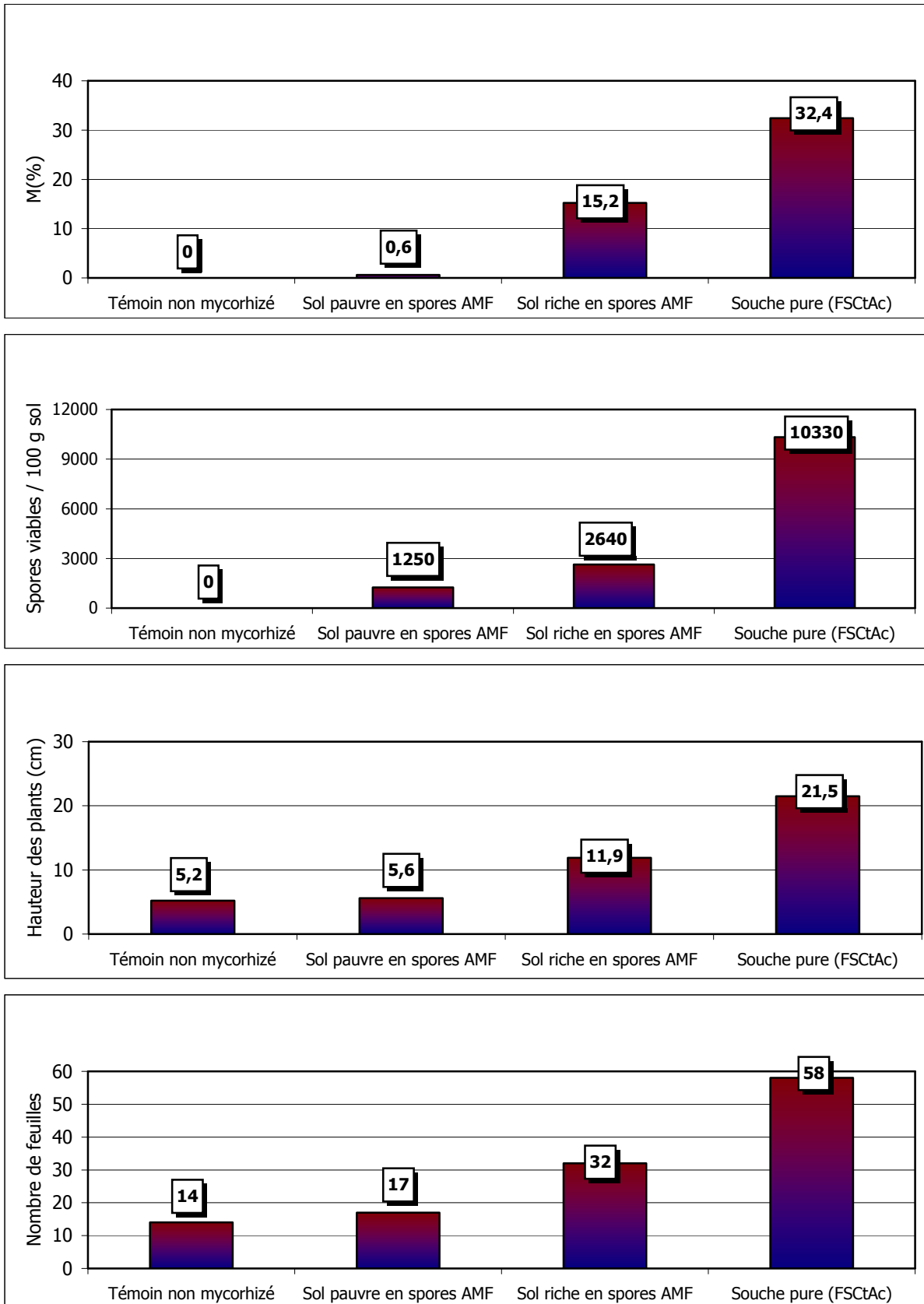
Tableau 4 : Influence de différents moyens de mycorhization sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques et sur les paramètres de croissance de *Croton insularis* (Euphorbiaceae) 12 mois après leur inoculation*.

Traitements de Mycorhization	F (%)	M (%)	A approx.	Spores viables /100 g sol)	Hauteur des plants (cm)	Nombre de ramifications***	P dans les feuilles (mg/kg)	N dans les feuilles (%)
Témoin non inoculé**	26,3	1,21	-	560	45,0 ± 20,2	12 ± 3	4143	1,09
Sol pauvre en spores AMF	67,1	1,29	-	1440	46,6 ± 15,4	16 ± 2	3896	1,22
Sol riche en spores AMF	81,5	16,9	+	3920	62,1 ± 22,5	18 ± 3	3987	1,13
Souche pure (FSCtAc)	94,2	28,4	++	8690	73,8 ± 24,1	19 ± 4	4183	1,30

F (%) : Fréquence de mycorhization en % ; M (%) : intensité de mycorhization ; A approx. : développement des arbuscules, notation approximative globale

* : les plants de départ avaient une taille de 12 à 18 cm ; ** : non inoculé par nous en champignon MA ; *** : le nombre de feuilles étant trop important, nous avons pris comme paramètre le nombre de rameaux partant de la tige principale.

Figure 1 : Influence de différents inoculums mycorhiziens sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques (intensité de mycorhization M) et sur les paramètres de croissance de *Gardenia urvillei* (Rubiaceae), après 12 mois de croissance.



mycélium pour permettre une bonne exploration du sol et une nette amélioration de la nutrition de la plante comme le montre également l'augmentation des taux de phosphore et d'azote.

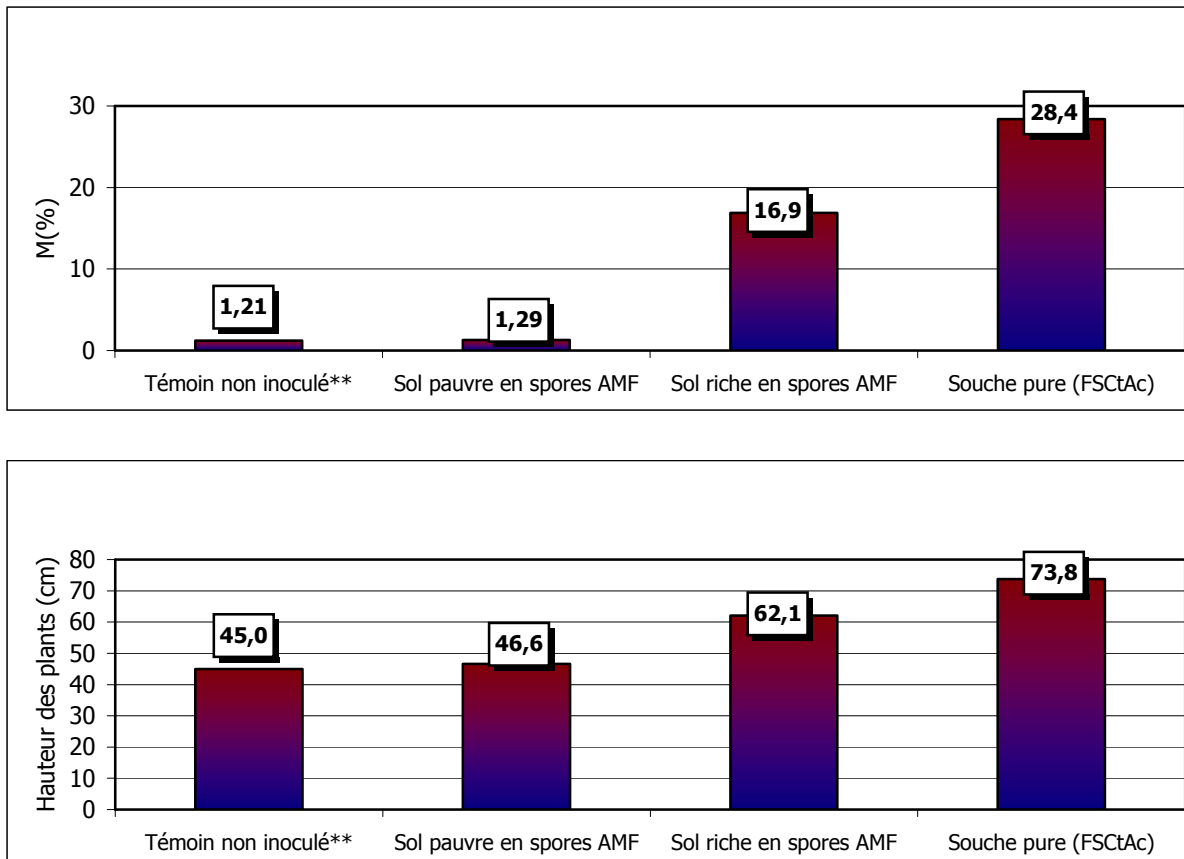
C'est toutefois l'inoculum FSCTAc qui stimule le plus fortement la croissance des plants de *G. urvillei*. En effet, la hauteur des plants et le nombre de feuilles sont augmentés de plus de 300 %. Comme on le voit bien sur la figure 1, il y a une bonne corrélation entre l'amélioration de la croissance et les paramètres de mycorhization. L'intensité de mycorhization est en effet 2 fois plus élevée que pour l'inoculum « sol riche », les arbuscules sont plus abondants et la sporulation nettement plus importante. La différence entre les 2 derniers inoculums s'expliquerait essentiellement par la qualité physiologique des spores qui sont plus jeunes. Effectivement, les spores contenues dans un sol naturel, même pris sous une plante mycorhizée, ont des âges très divers et une proportion plus ou moins importante, correspond à des spores en fin de vie, ce qui explique la différence d'intensité de mycorhization entre les 2 inoculums. Il n'est toutefois pas exclu que la qualité de la souche FSCTAc intervienne également dans les effets observés. L'amélioration de la croissance est liée à des effets à plusieurs niveaux, en particulier une amélioration de la nutrition en phosphore et en azote (augmentation très nette de la concentration de ces 2 éléments dans les feuilles) et en d'autres éléments, ainsi qu'une meilleure capacité à collecter l'eau et donc à résister au stress hydrique (Strullu, 1991).

Les photos 1 et 3 montrent un aspect des racines mycorhizées et les différences entre les effets des traitements testés sur la croissance des plants.

- Effets des inoculums AMF sur les autres espèces végétales testées

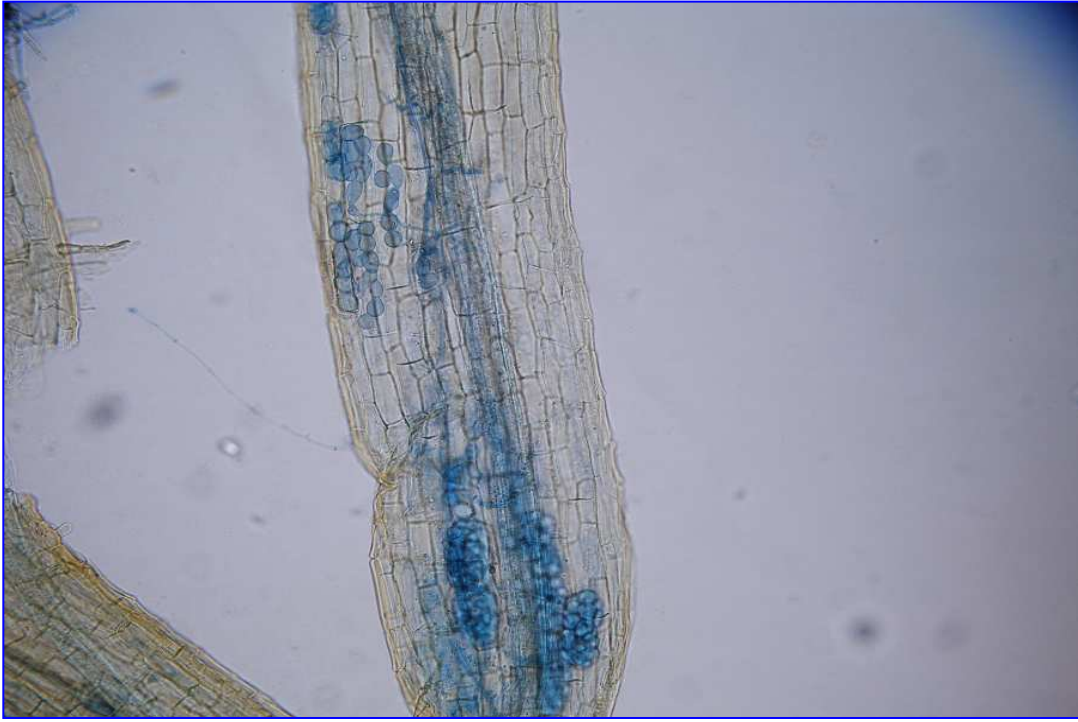
Les résultats obtenus avec les 5 autres espèces (Tab. 4 à 8 et Fig. 2 à 6) sont plus délicats à interpréter, tout au moins dans le détail. En effet, les plants utilisés étaient déjà âgés de quelques mois en début d'expérience et les taux de mycorhization non nuls obtenus pour les plants non inoculés montrent qu'ils ont déjà été au contact avec des spores mycorhiziennes en faible nombre. Les valeurs de l'intensité mycorhizienne (M) des témoins sont en effet très proches de celles obtenues avec l'inoculum « sol pauvre » dont l'influence sur la croissance des plants reste généralement peu significative.

Figure 2 : Influence de différents inoculum mycorhiziens sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques (intensité de mycorhization M) et sur les paramètres de croissance de *Croton insularis* (Euphorbiaceae) 12 mois après leur inoculation*.



* : les plants de départ avaient une taille de 12 à 18 cm

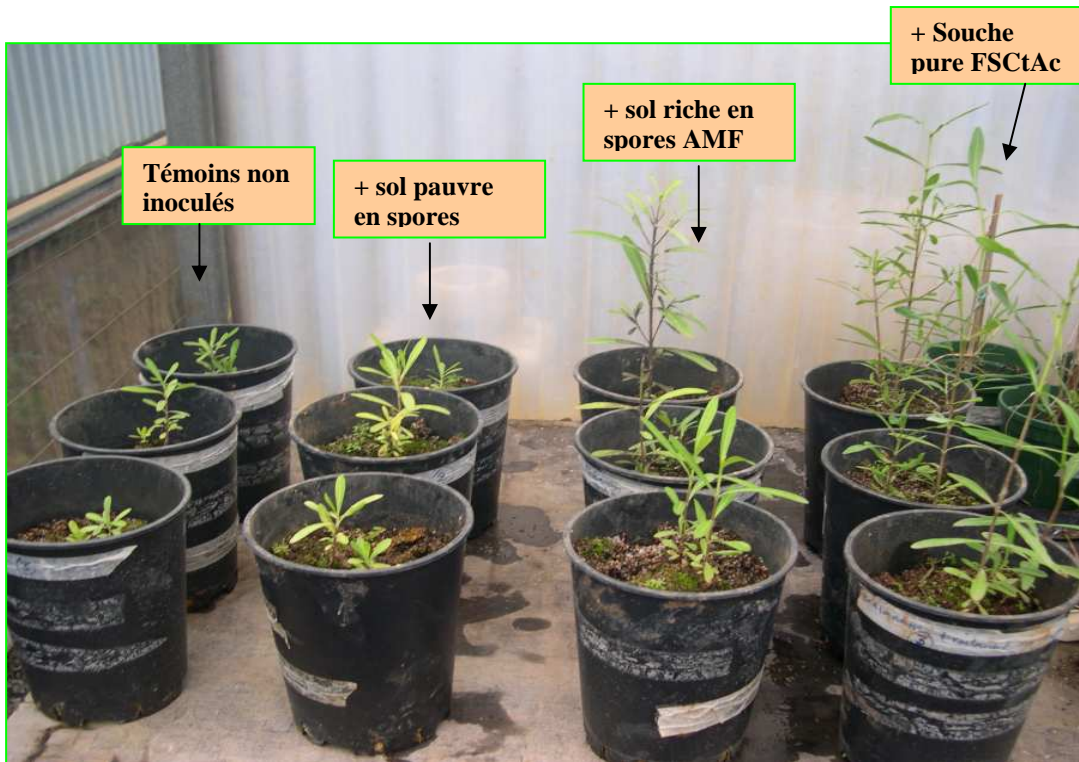
** : Non inoculé par nous en champignon MA



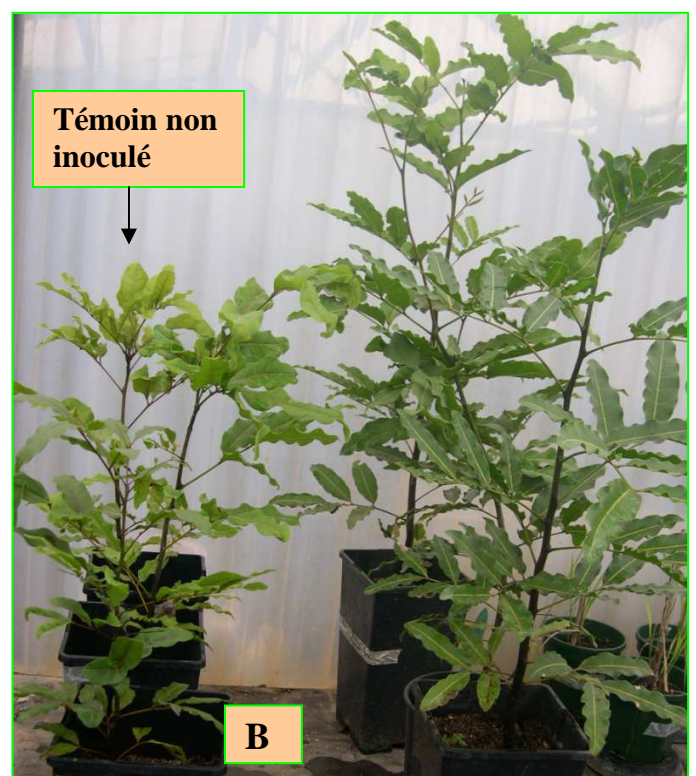
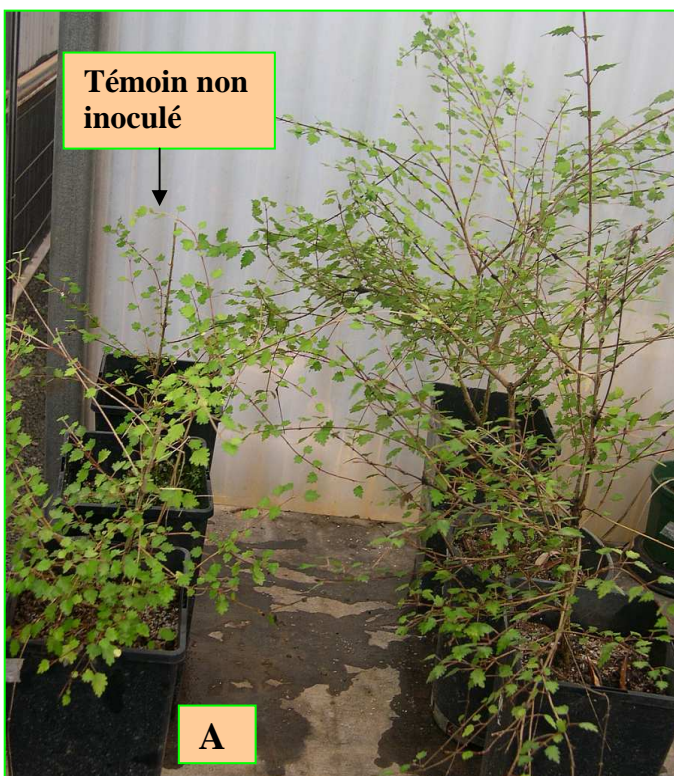
1- Aspect des formations mycorhiziennes (en bleu) dans une racine de *Gardenia urvillei*.



2- Aspect des arbuscules très abondant de la souche FSCtAc dans une racine de *Croton*



3- Influence des 3 inoculums AMF sur la croissance de *Gardenia urvillei*.



4- Influence de la souche FSCtAc sur la croissance de *Premna Serratifolia*. (A) et *Arytera* sp. (B).

Tableau 5 : Influence de différents moyens de mycorhization sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques et sur les paramètres de croissance de *Premna serratifolia* (Lamiaceae), 12 mois après leur inoculation*.

Traitements de Mycorhization	F (%)	M (%)	A approx.	Spores viables /100 g sol)	Hauteur des plants (cm)	Nombre de ramifications***	P dans les feuilles (mg/kg)	N dans les feuilles (%)
Témoin non inoculé**	34,4	3,3	-	1990	49,3 ± 10,1	37 ± 11	5419	0,96
Sol pauvre en spores AMF	38,5	2,03	-	1230	47,9 ± 12,8	33 ± 9	10156	/
Sol riche en spores AMF	89,2	35,8	+	4850	60,1 ± 12,2	45 ± 6	9371	/
Souche pure (FSCtAc)	88,8	19,2	+	3980	61,1 ± 13,5	51 ± 13	11662	1,15

F (%) : Fréquence de mycorhization en % ; M (%) : intensité de mycorhization ; A approx. : développement des arbuscules, notation approximative globale

* : les plants de départ avaient une taille de 15 à 19 cm ; ** : Non inoculé par nous en champignon MA ; *** : le nombre de feuilles étant trop important, nous avons pris comme paramètre le nombre de rameaux portant des feuilles.

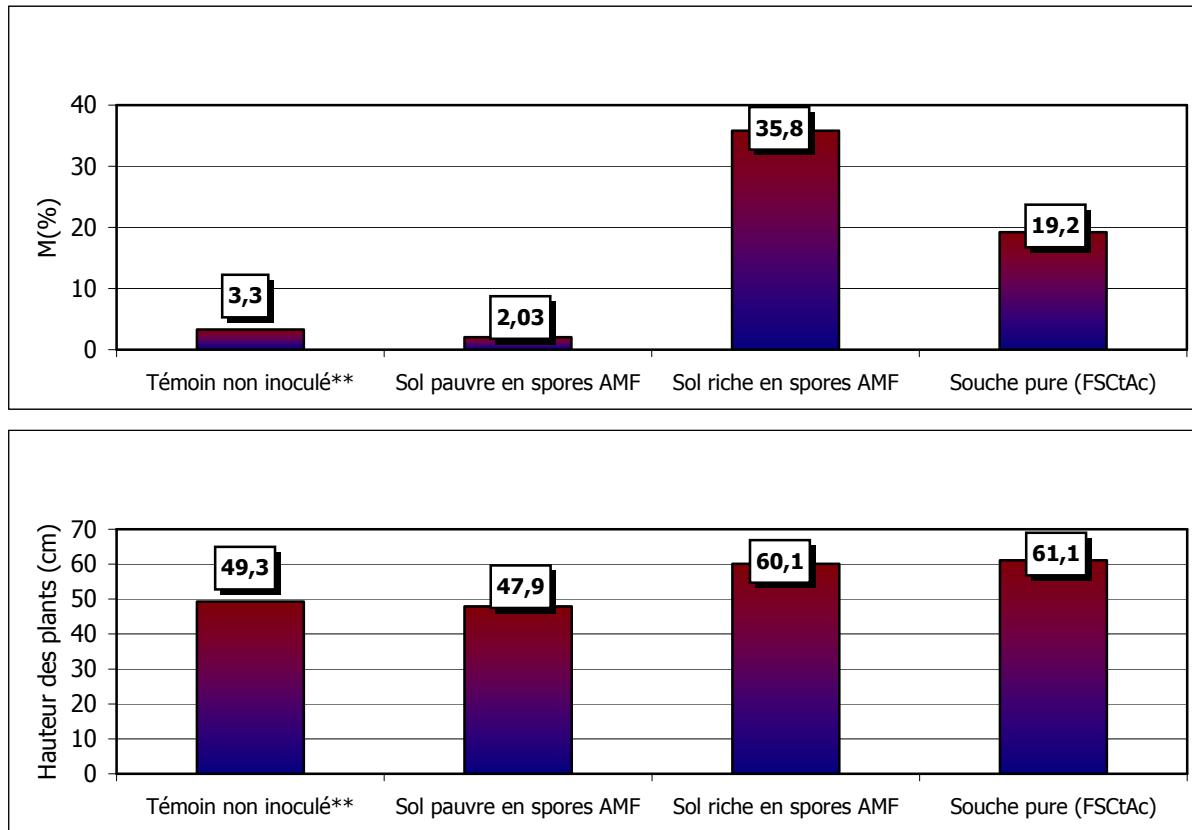
Les deux autres inoculum (« sol riche » et FSCtAc) augmentent sensiblement la croissance des plants, mais l'augmentation reste nettement plus faible que celle observée pour *G. urvillei*. Les pourcentages d'augmentation de la hauteur des plants sont les suivants (pour chaque espèce la première valeur correspond à l'inoculum « sol riche » et la deuxième à la souche FSCtAc) :

- *Croton insularis* (Tab. 4, Fig. 2) : 38 % et 64 %
- *Premna serratifolia* (Tab. 5, Fig. 3) : 22 % et 24 %
- *Cupaniopsis trigonocarpa* (Tab. 6, Fig. 4) : 24 % et 54 %
- *Arytera sp* (Tab. 7, Fig. 5) : 39 % et 69 %
- *Ochrosia inventorum* (Tab. 8, Fig. 6) : 41 % et 40 %.

La souche pure ne donne de meilleurs résultats par rapport au sol riche en spore que pour les espèces *C. insularis*, *C. trigonocarpa* et *Arytera sp*. Ces effets positifs sont très nets comme le montre la photo 4, mais il est possible qu'ils auraient été plus importants si la mycorhization avait été réalisée plus tôt et si les témoins étaient totalement indemnes de mycorhization. De même les différences entre l'inoculum « sol riche » et la souche pure ont dû être partiellement masquées par ces effets initiaux.

Comme on le voit bien sur les figures 2 à 6, il y a d'une manière générale pour les 5 espèces végétales, un lien net entre les paramètres de mycorhization et les effets d'amélioration de la croissance.

Figure 3 : Influence de différents inoculums mycorhiziens sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques (intensité de mycorhization M) et sur les paramètres de croissance de *Premna serratifolia* (Lamiaceae), 12 mois après leur inoculation*.



* : les plants de départ avaient une taille de 15 à 19 cm

** : Non inoculé par nous en champignon MA ;

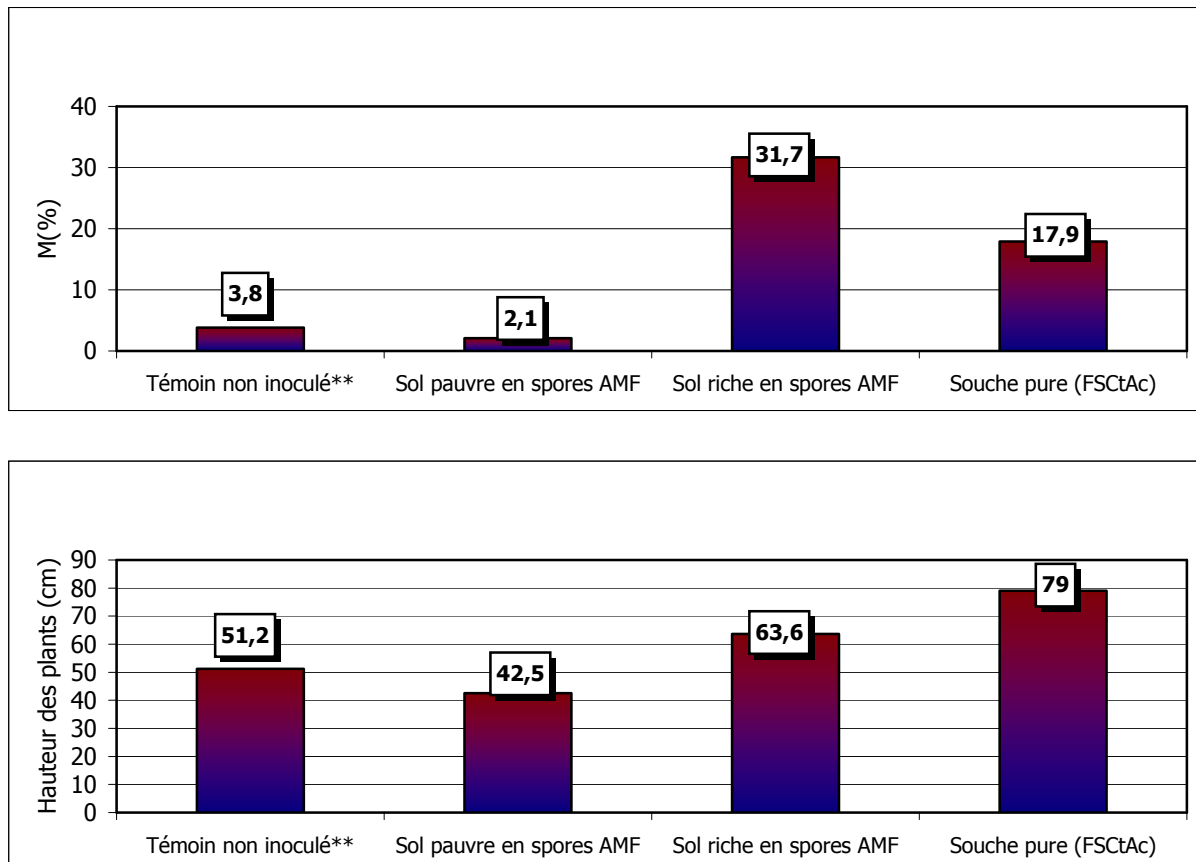
Tableau 6 : Influence de différents moyens de mycorhization sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques et sur les paramètres de croissance de *Cupaniopsis trigonocarpa* (Sapindaceae), 12 mois après leur inoculation*.

Traitements de Mycorhization	F (%)	M (%)	A approx.	Spores viables /100 g sol)	Hauteur des plants (cm)	Nombre de ramifications***	P dans les feuilles (mg/kg)	N dans les feuilles (%)
Témoin non inoculé**	54,4	3,8	±	960	51,2 ± 13,7	22 ± 6	3424	0,95
Sol pauvre en spores AMF	58,9	2,1	±	790	42,5 ± 14,1	19 ± 6	2840	1,17
Sol riche en spores AMF	97,5	31,7	+	5360	63,6 ± 11,1	25 ± 4	3387	1,10
Souche pure (FSCtAc)	84,1	17,9	+	5060	79,0 ± 10,6	27 ± 4	3728	1,17

F (%) : Fréquence de mycorhization en % ; M (%) : intensité de mycorhization ; A approx. : développement des arbuscules, notation approximative globale

* : les plants de départ avaient une taille de 10 à 17 cm ; ** : Non inoculé par nous en champignon MA ; *** : le nombre de feuilles étant trop important, nous avons pris comme paramètre le nombre de rameaux portant des feuilles.

Figure 4 : Influence de différents inoculums mycorhiziens sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques (intensité de mycorhization M) et sur les paramètres de croissance de *Cupaniopsis trigonocarpa* (Sapindaceae), 12 mois après leur inoculation*.



* : les plants de départ avaient une taille de 10 à 17 cm

** : Non inoculé par nous en champignon MA

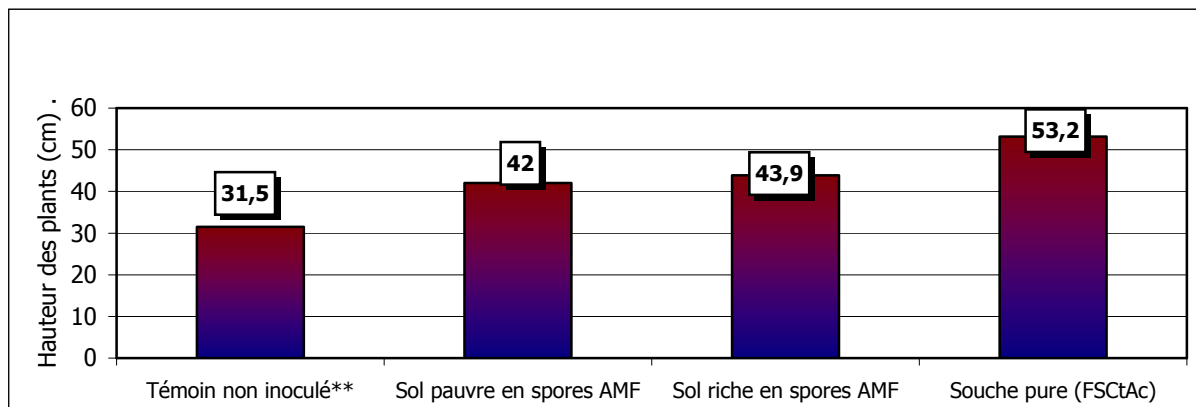
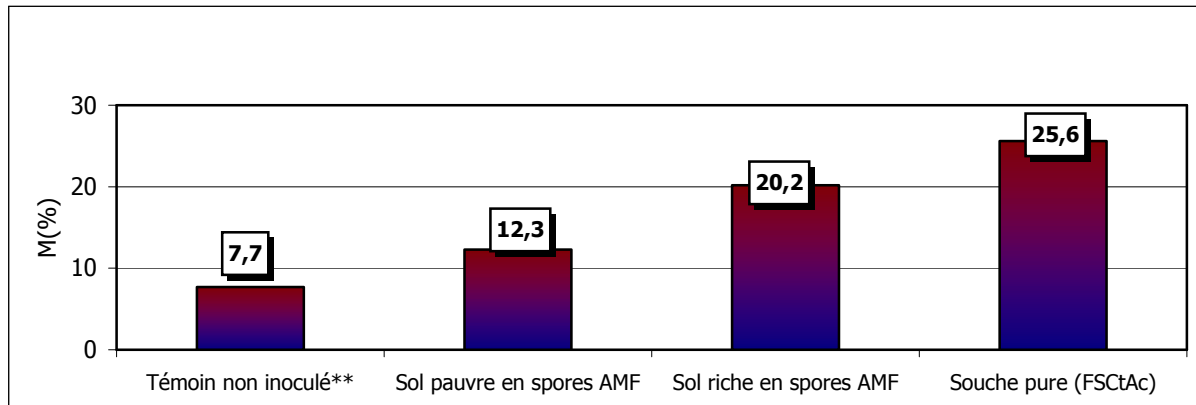
Tableau 7 : Influence de différents moyens de mycorhization sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques et sur les paramètres de croissance de *Arytera sp.* (Sapindaceae), 12 mois après leur inoculation* (moyennes de 4 à 16 valeurs selon les paramètres ; voir méthodes).

Traitements de Mycorhization	F (%)	M (%)	A approx.	Spores viables /100 g sol)	Hauteur des plants (cm)	Nombre de feuilles	P dans les feuilles (mg/kg)	N dans les feuilles (%)
Témoin non inoculé**	28,2	7,7	-	620	31,5 ± 8,4	15 ± 2	2637	0,72
Sol pauvre en spores AMF	92,9	12,3	-	1560	42,0 ± 4,9	20 ± 3	2332	0,87
Sol riche en spores AMF	97,9	20,2	±	3270	43,9 ± 5,7	19 ± 1	3073	1,00
Souche pure (FSCtAc)	93,1	25,6	±	3970	53,2 ± 8,0	22 ± 3	3133	0,93

F (%) : Fréquence de mycorhization en % ; M (%) : intensité de mycorhization ; A approx. : développement des arbuscules, notation approximative globale

* : les plants de départ avaient une taille de 5 à 9 cm ; ** : Non inoculé par nous en champignon MA .

Figure 5 : Influence de différents inoculum mycorhiziens sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques (intensité de mycorhization M) et sur les paramètres de croissance de *Arytera sp.* (Sapindaceae), 12 mois après leur inoculation*



* : les plants de départ avaient une taille de 5 à 9 cm

** : Non inoculé par nous en champignon MA

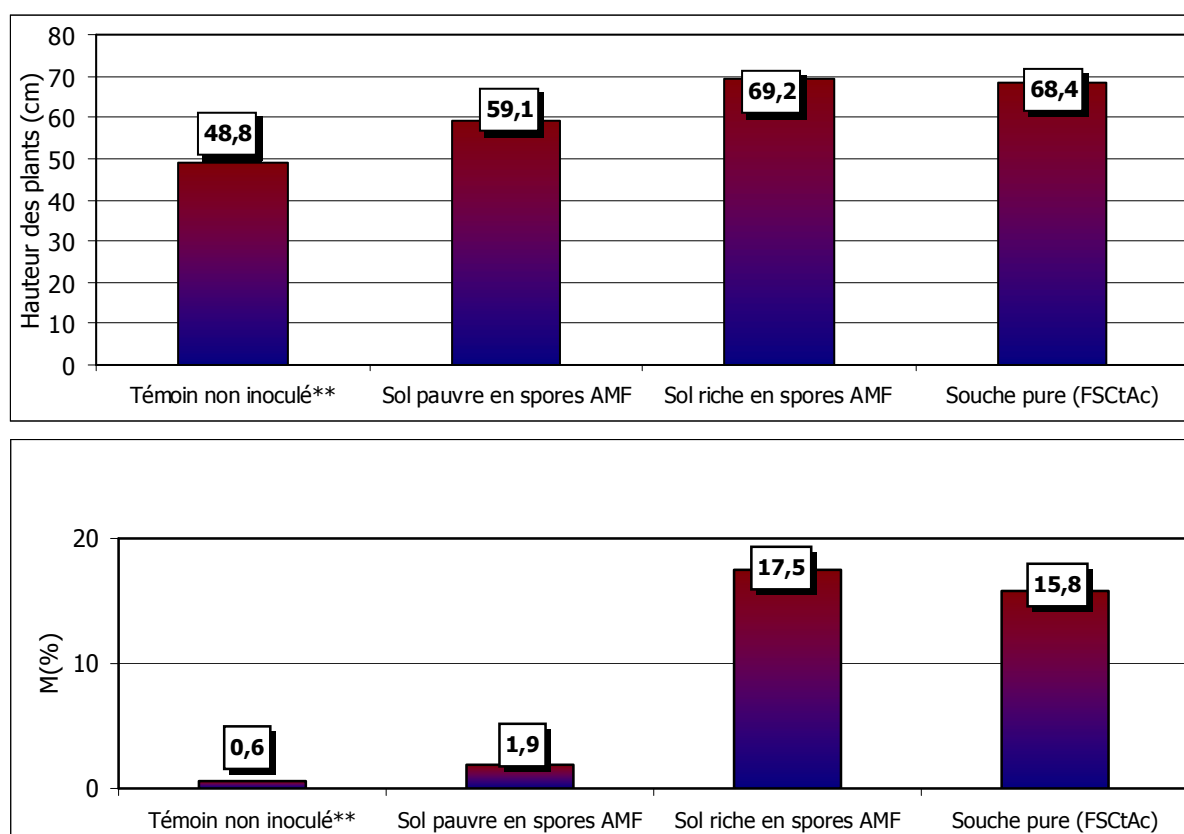
Tableau 8 : Influence de différents moyens de mycorhization sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques et sur les paramètres de croissance de *Ochrosia inventorum* (Apocynaceae), 12 mois après leur inoculation* (moyennes de 4 à 16 valeurs selon les paramètres ; voir méthodes).

Traitements de Mycorhization	F (%)	M (%)	A approx.	Spores viables /100 g sol)	Hauteur des plants (cm)	Nombre de feuilles	P dans les feuilles (mg/kg)	N dans les feuilles (%)
Témoin non inoculé**	10,1	0,6	-	130	48,8 ± 11,0	49 ± 9	7041	1,38
Sol pauvre en spores AMF	54,5	1,9	-	1200	59,1 ± 9,3	67 ± 5	5616	1,11
Sol riche en spores AMF	96,3	17,5	+	3010	69,2 ± 11,9	77 ± 14	6425	0,97
Souche pure (FSCtAc)	95,4	15,8	±	3240	68,4 ± 13,1	73 ± 16	7982	1,11

F (%) : Fréquence de mycorhization en % ; M (%) : intensité de mycorhization ; A approx. : développement des arbuscules, notation approximative globale

* : les plants de départ avaient une taille de 16 à 21 cm ; ** : Non inoculé par nous en champignon MA

Figure 6 : Influence de différents inoculums mycorhiziens sur la colonisation des racines par les symbiotes fongiques (intensité de mycorhization M) et sur les paramètres de croissance de *Ochrosia inventorum* (Apocynaceae), 12 mois après leur inoculation*



* : les plants de départ avaient une taille de 16 à 21 cm

** : Non inoculé par nous en champignon MA

Conclusion et perspectives

Malgré quelques difficultés, l'expérimentation en serre montre clairement l'intérêt d'une optimisation de la mycorhization dans la perspective de la restauration écologique des forêts sèches ou simplement pour un développement en pépinière des espèces végétales dont l'affinité avec les AMF est avérée (notamment les 25 espèces que nous avons caractérisées). Il serait bien sûr utile de compléter l'étude du statut mycorhiziens des autres espèces de forêt sèche non étudiées jusqu'ici.

Une expérimentation sur terrain est programmée pour 2007 afin de vérifier l'utilité de quelques techniques de mycorhization. Toutefois, on peut doré et déjà avancer un certain nombre de propositions pour une optimisation de la symbiose mycorhizienne en forêt sèche. On peut préconiser différentes démarches pour la mycorhization des plants, selon les possibilités dont disposent les entreprises :

- 1- La plus simple (mais pas la plus efficace), consiste à prélever dans la nature sous une plante connue pour son affinité forte avec les endomycorhizes, du sol contenant beaucoup de racines fines et d'en apporter quelques grammes au niveau des racines du plant, soit en pépinière même, si l'apport de sol est pratiqué et ne pose pas de problème, soit au moment de la plantation sur terrain.
- 2- La deuxième nécessite l'utilisation de 2 tamis à mailles fines (500 μm et 50 μm) et d'une loupe binoculaire et consiste en la même démarche que précédemment, mais après un choix judicieux du sol qui servira d'inoculum. Pour cela une dizaine ou une quinzaine d'échantillons de sols sont prélevés dans la nature, sous des plantes à forte affinité endomycorhizienne, puis leur richesse en spores mycorhiziennes est évaluée après tamisage et observation sous loupe. Le sol contenant le plus de spores viables (non flottantes, peu sombres, de contours bien nets) est alors choisi pour inoculer les plants. L'inoculum naturel peut d'ailleurs être concentré par tamisage.
- 3- Une autre amélioration peu coûteuse consiste à cultiver préalablement l'inoculum choisi sur une espèce végétale de culture facile et à forte affinité endomycorhizienne, en apportant l'inoculum au niveau des racines de plantules en pot de l'espèce végétale en question. Le sol ou le substrat utilisé devra être peu riche, notamment en phosphore, car une concentration optimale de phosphore inhibe le développement des mycorhizes. Après quelques mois de culture (variant selon la plante) le sol des pots est alors utilisé comme inoculum (une vérification de l'enrichissement en spores AMF, après tamisage et observation à la loupe binoculaire, est nécessaire). L'avantage de cette technique par rapport à la précédente est que les spores et le mycélium fongique sont alors plus concentrés, plus frais et leur capacité à mycorhizer nettement meilleure que celle d'un

sol naturel. Il y a toutefois un inconvénient possible à cette technique et auquel il est important de prendre garde : c'est le risque de multiplier un jour ou l'autre un pathogène en même temps que le champignon mycorhizien. Pour éviter ce risque, il faut bien surveiller l'état des plantes-pièges (sur lesquelles est multipliée l'inoculum) et renouveler l'opération à partir d'un sol naturel de temps en temps. Si l'on constate des symptômes de maladie, il est préférable d'éliminer les plantes, de désinfecter les lieux et de refaire un inoculum en repartant d'un autre sol naturel.

- 4- Une autre solution consiste à utiliser au départ une souche pure adaptée et d'efficacité prouvée fournie par le laboratoire et de la multiplier par la méthode précédente, en utilisant un substrat hors sol ou un sol peu riche en spores mycorhiziennes au départ. On pourrait désinfecter le substrat ou le sol pour améliorer l'implantation de la souche, mais on augmenterait ainsi les risques de développement de pathogènes. Il est évident que la souche, au départ majoritaire car concentrée, se diluera peu à peu dans les populations du sol et finira par être minoritaire. Mais rien n'empêche alors de récupérer de nouveau la souche pure et de refaire la démarche.
- 5- Enfin, on peut utiliser une souche pure sélectionnée pour ses effets positifs importants, souche que l'on multipliera par des moyens appropriés et que l'on maintiendra constamment en bon état. Cette dernière solution qui est la plus efficace nécessite toutefois des moyens particuliers, mais l'aide d'un laboratoire spécialisé peut permettre de la développer.

Références

- BOULLARD B., 1990. *Guerre et paix dans le règne végétal*, Edition Marketing, 181-291p.
- BOUCHET PH., JAFFRE T. et VEILLON J.M., 1995. Plant extinction in New-Caledonia : protection of sclerophyll forests urgently needed. *Biodiversity and Conservation*, **4**.
- BRUNDRETT M.C., MELVILLE L. et PETERSON A., 1994. Practical methods in mycorrhiza research, Mycologue Publications Editions, *Workshop organized in conjunction with the 9th North American Conference on Mycorrhizae and the University of Guelph*.
- GOULD A.B., HENDRIX J.W. et FERRISS R.S., 1996. Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky. I. Propagule and spore population densities. *Can. J. Bot.*, **74** : 247-261p.
- JAKOBSEN S.E., SMITH S.E. et SMITH FA, 2002. Function and diversity of arbuscular mycorrhizae in carbon and mineral nutrition. *In: Mycorrhizal Ecology*. M.G.A. Van Der Heijden and I.R. Sanders Eds.; Springer, Berlin. pp.: 75-92.
- JASPER D.A., ROBSON A.D. et ABBOTT L.K., 1987. The effect of Surface Mining on the Infectivity of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Aust. J. Bot.*, **35** : 641-652p.
- KORMANIK P.P. et MC GRAW A.C., 1982. Quantification of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae in plant roots. *In Methods and principles of Mycorrhizal Research*, Schenck N.C., editor, APS Press, 37p.
- MARX D.H., BRYAN W.C. et CORDELL C.E., 1977. Survival and growth of pine seedlings with *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae after two years on reforestation sites in North Carolina and Florida. *Forest Sci.* **23** : 363-373p.
- PHILLIPS J.M. et HAYMAN D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society*, **55** : 158-160p.
- SHETTY K.G., HETRICK B.A.D., FIGGE D.A.H. et SCHWAB A.P., 1994. Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. *Environmental pollution*, **86** : 181-188p.
- SIERVERDING E., 1991. Vesicular arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Schriftenreihe der GTZ, n°224. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit GmgH, Eschborn, FRG* : 371 p.
- STRULLU D.G., 1991. Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Lavoisier, Paris.
- TROUVELOT A., KOUGH J.L. et GIANINAZZI-PEARSON V., 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification

fonctionnelle. In *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S. (Eds.), INRA edition, Paris, 217-221p.

VARMA A., 1998. Mycorrhiza manual. Sringer, New Sringer, New York.