

BIOTECHNOLOGIE ET MYCORHIZATION CONTROLEE EN MILIEU TROPICAL

Par Duponnois R.¹, Bâ A. M.², Galiana A.³, Baudoin E.¹, Sanguin H.³, Lebrun M.¹, Prin Y.³

¹ IRD. UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/SUP-AGRO/UM2. Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes (LSTM). Campus international de Baillarguet. Montpellier Cedex 5. France

² Laboratoire commun de microbiologie IRD/Isra/Ucad. Centre de recherche de Bel Air. Dakar. Sénégal

³ CIRAD. UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/SUP-AGRO/UM2.. Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes (LSTM). TA A-82/J, Campus international de Baillarguet. Montpellier Cedex 5. France

1. INTRODUCTION

La surexploitation des ressources forestières résultant d'activités industrielles (industrie papetière, etc.) ou de pratiques assurant les besoins des populations locales (ex : bois de chauffe, bois d'œuvre, etc.) a abouti à une déforestation significative au cours de ces dernières décennies dans les régions tropicales et méditerranéennes (Piéri, 1991). Une des conséquences de cette paupérisation du couvert forestier est l'accélération de la dégradation des sols et des processus de désertification qui en découlent et qui entraînent une perte ou une réduction des propriétés physico-chimiques et biologiques des sols (Requena *et al.*, 2001). Cette dégradation de la strate épigée contribue significativement au renforcement des processus d'érosion hydrique et éolienne aboutissant à une baisse de la fertilité tellurique et à des dysfonctionnements dans le fonctionnement biologique des sols (Garcia *et al.*, 1997). Parmi les composantes microbiennes particulièrement sensibles à ces dégradations environnementales figurent les champignons mycorhiziens dont la diversité et l'abondance dans le sol diminuent fortement dans de telles conditions (Duponnois *et al.*, 2001 ; Azcon-Aguilar *et al.*, 2003). Ce constat est d'autant plus pertinent que l'établissement de la symbiose mycorhizienne mobilise et facilite le transfert d'éléments nutritifs (N, P) vers la plante, améliore l'aggrégation des sols érodés et enfin entraîne une meilleure résistance des plantes aux déficits hydriques (Smith et Read, 1997).

Les champignons mycorhiziens sont présents dans pratiquement tous les écosystèmes terrestres et sont considérés comme des éléments clés dans les processus biologiques régissant le fonctionnement des principaux cycles biogéochimiques terrestres et l'évolution spatio-temporelle du couvert végétal (van der Heijden *et al.*, 1998 ; Requena *et al.*, 2001 ; Schreiner *et al.*, 2003). Deux types principaux d'associations mycorhiziennes sont distingués : les mycorhizes à arbuscules (MA) et les ectomycorhizes (ECM). La symbiose mycorhizienne à arbuscules est majoritairement présente dans le règne végétal et intéresse les ptéridophytes, les gymnospermes et les angiospermes (Read *et al.*, 2000). Ces symbiotes fongiques sont associés à environ 80-90 % des plantes terrestres dans les écosystèmes et agrosystèmes (Brundrett, 2002). Les ectomycorhizes sont observées au niveau des racines d'arbres, arbustes et parfois d'herbacées pérennes (ex : *Helianthemum* spp.) et résultent de l'association d'Homobasidiomycètes avec environ 20 familles de plantes (Smith et Read, 1997). Ces espèces végétales contractent des relations symbiotiques avec une grande diversité de champignons ectomycorhiziens évaluée entre 4 000 et 6 000 espèces, principalement des Basidiomycètes et Ascomycètes (Allen *et al.*, 1995 ; Valentine *et al.*, 2004). La distribution

des champignons ectomycorhiziens n'est pas uniforme au niveau spatial et temporel en termes d'abondance et de diversité. Cette répartition hétérogène au sein de l'écosystème est un facteur important à prendre en compte dans les opérations de reboisement, plus particulièrement lorsque la végétation présentant un statut ectotrophe s'est raréfiée (Marx, 1991) ou lorsque le potentiel ectomycorhizien des sols a subi de profondes dégradations à la suite d'événements d'origine naturelle (Terwilliger et Pastor, 1999) ou anthropique (Jones *et al.*, 2003).

La carence en structures ectomycorhiziennes au sein des racines des arbres est la cause principale des dysfonctionnements observés dans l'évolution spatio-temporelle des écosystèmes forestiers tant au niveau de la structure et de la productivité du couvert végétal que de sa capacité de résilience envers divers stress environnementaux. De nombreuses études ont montré que des champignons ectomycorhiziens spécifiques sont capables d'améliorer la croissance juvénile de certaines espèces forestières et d'atténuer les effets de la crise de transplantation (Castellano et Molina, 1989 ; Kropp et Langlois, 1990 ; Marx *et al.*, 1991 ; Castellano, 1996 ; Roldan *et al.*, 1996 ; Garbaye et Churin, 1997 ; Duponnois *et al.*, 2005, 2007). Comme il est estimé que la symbiose mycorhizienne est présente chez 95 % des espèces végétales au sein d'un couvert végétal non ou peu perturbé et que ce pourcentage sera uniquement de 1 % dans le cas d'écosystèmes perturbés, le potentiel mycorhizien des sols doit être rétabli afin de valoriser l'effet « symbiose » pour améliorer la croissance de la plante hôte et ainsi optimiser la performance d'opérations de reboisement. Une des voies d'action pour atteindre cet objectif est d'inoculer en masse au substrat de culture des propagules mycorhiziennes afin d'assurer le transfert en milieu naturel de plants « outillés » (en termes d'intensité de colonisation des racines par le symbiote fongique) pour supporter la crise de transplantation et présenter une croissance optimale dans des sols carencés en éléments nutritifs. Cependant, l'effet positif sur la croissance de la plante de l'association mycorhizienne est fonction du ou des symbiotes fongiques inoculés et de la plante hôte (Guelh *et al.*, 1990 ; Bâ *et al.*, 2002 ; Duponnois et Planchette, 2003). Cette variabilité dans la réponse de la plante à l'inoculation mycorhizienne dépend de plusieurs facteurs comme le degré de compatibilité entre les deux composantes de la symbiose (plante/symbiote fongique), la dépendance mycorhizienne de la plante hôte, l'efficacité du champignon en termes d'effet sur la croissance de la plante en rapport avec les caractéristiques biotiques et abiotiques du milieu (Garbaye, 1988). Afin d'augmenter la performance des programmes de reboisement, il est nécessaire que les pépinières forestières produisent des plants mycorhizés par des souches fongiques performantes et adaptées aux conditions écologiques rencontrées au niveau du site

de plantation. En fonction de ces paramètres pris en considération, différentes méthodes d'inoculation contrôlée sont susceptibles d'être identifiées afin d'optimiser l'effet fongique sur la croissance de la plante hôte.

Le principal objectif de cette contribution est de présenter différentes méthodes basées sur une production en masse d'inocula fongiques performants et de synthétiser les données disponibles montrant l'intérêt de recourir à la mycorhization contrôlée pour améliorer les performances d'opérations de reboisement en milieu tropical et méditerranéen.

2. CRITERES DETERMINANT LE CHOIX DU TYPE DE FORMULATION DE L'INOCULUM FONGIQUE

Les critères principaux permettant d'identifier le type d'inoculum fongique à utiliser peuvent être résumés de la façon suivante :

- le degré de l'impact de la souche fongique sélectionnée sur la croissance et l'état sanitaire des espèces forestières utilisées dans les projets de plantation ;
- la capacité des propagules fongiques à conserver leur viabilité après différents temps de conservation et maintenir ainsi leur efficacité sur la croissance de la plante au moment de l'inoculation du substrat ;
- le coût de la production et de la formulation de l'inoculum fongique qui doit être compatible avec les capacités socio-économiques des utilisateurs potentiels.

3. LES SPORES FONGIQUES COMME SOURCE D'INOCULUM MYCORHIZIEN

Les spores collectées à partir de fructifications peuvent être utilisées comme inoculum naturel mycorhizien. Cette pratique a été largement développée dans les pépinières forestières (Castellano, 1994). Cependant, l'inoculation basée sur l'introduction des spores dans le substrat de culture est particulièrement dépendante du symbiote fongique et est limitée à certains champignons tels que *Pisolithus* et *Scleroderma*.

3.1. INOCULUM DE TYPE « SPORES » ET EFFET SUR LA CROISSANCE DE LA PLANTE HOTE

Il existe différentes formulations d'inocula fongiques de type « spores ». Quelle que soit la formulation finale de l'inoculum, la première étape du processus repose sur la collecte de carpophores soigneusement identifiés et conservés dans des sacs en papier. Ces carpophores sont ensuite brossés afin d'éliminer les éléments indésirables (fragments de racines, traces de sol, etc.) puis mis à incuber dans l'obscurité à 35 °C environ. Le matériel ainsi séché est broyé dans des sacs en plastique puis tamisé à 200-500 µm. Ce produit séché est ensuite mélangé à différents types de substrat inerte pour aboutir aux formulations suivantes :

– La poudre de spores est mélangée à un sable fin préalablement stérilisé (140 °C, 20 min) au ratio de 1 pour 100 (m/m). Les supports culturels sont ensuite remplis par le substrat de culture amendé par l'inoculum fongique ou l'inoculum fongique est placé dans le trou de plantation du jeune semis.

– La poudre de spores est incluse dans un support inerte (ex : argile) pour obtenir des granules qui seront placés dans le trou de plantation de la jeune plantule (de la Cruz *et al.*, 1990). Turjaman *et al.* (2005) ont évalué l'effet de différents champignons ectomycorhiziens sur la croissance de plusieurs espèces de diptérocarpacées dans une expérience réalisée en conditions contrôlées. Des carpophores prélevés en milieu naturel ont été broyés manuellement dans des sacs en plastique afin de minimiser la perte de spores et d'éventuelles contaminations entre les souches fongiques testées (de la Cruz *et al.*, 1990). Les carpophores broyés ont ensuite été mélangés à une argile pour former des granules au ratio de 1 pour 100 (m/m). L'inoculation a été réalisée 10 jours après la germination des graines. Un trou a été matérialisé dans chaque pot pour y introduire l'inoculum fongique (0,4 g) à environ 1 cm en dessous de la surface du sol à proximité de la racine.

– Un autre processus d'inoculation, basé sur l'utilisation de spores ectomycorhiziennes, repose sur l'enrobage des graines par un mélange de spores et d'un agent collant comme l'argile (Marx *et al.*, 1984).

Les effets positifs sur la croissance de la plante résultant de l'inoculation ectomycorhizienne dans des conditions de pépinières forestières, ont été fréquemment publiés (tabl. 1). Toutefois, cette technique souffre de limites qui sont résumées de la façon suivante :

– difficultés de collecter de grandes quantités de carpophores pour certaines espèces fongiques,

Tableau 1. Impact de l'inoculation par des spores de champignons ectomycorhiziens sur la croissance de la plante hôte en pépinière.

Ref. ⁽¹⁾	Souche	Plante	Formulation Inoculum	Effets sur la croissance (%) et l'infection ectomycorhizienne			
				Hauteur	BA ⁽²⁾	BR ⁽³⁾	IE (%) ⁽⁴⁾
A	<i>Pisolithus arhizus</i>	<i>Shorea pinanga</i>	Granules	+ 46,1 ⁽⁵⁾	+ 66,7	nd ⁽⁶⁾	87
A	<i>Scleroderma</i> sp.	<i>S. pinanga</i>	Granules	+ 41,3	+ 60,5	nd	86
B	<i>P. tinctorius</i>	<i>Acacia mangium</i>	Granules	nd	+ 29,1	+ 40,7	52
C	<i>Rhizopogon roseolus</i>	<i>Pinus halepensis</i>	Suspension sporale	- 30,1	nd	nd	48
C	<i>Suillus collinitus</i>	<i>Pinus halepensis</i>	Suspension sporale	+ 27,8	nd	nd	75
D	<i>Scleroderma albidum</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Suspension sporale	+ 32,1	+ 19,7	+ 42,5	nd
D	<i>S. areolatum</i>	<i>E. globulus</i>	Suspension sporale	+ 17,5	+ 9,1	+ 33,5	nd
D	<i>S. cepa</i>	<i>E. globulus</i>	Suspension sporale	+ 30,8	+ 8,8	+ 2,0	nd
D	<i>S. albidum</i>	<i>E. urophylla</i>	Suspension sporale	- 3,6	+ 3,1	- 0,7	nd
D	<i>S. areolatum</i>	<i>E. urophylla</i>	Suspension sporale	+ 7,2	+ 4,9	+ 4,0	nd
D	<i>S. cepa</i>	<i>E. urophylla</i>	Suspension sporale	+ 6,3	+ 13,0	+ 1,4	nd
E	<i>P. tinctorius</i>	<i>P. halepensis</i>	Spore suspension	+ 37,1	+ 44,9	+ 41,7	55,4
E	<i>R. roseolus</i>	<i>P. halepensis</i>	Suspension sporale	+ 38,3	+ 44,6	+ 28,6	39,5
E	<i>Suillus collinitus</i>	<i>P. halepensis</i>	Suspension sporale	+ 35,1	+ 28,2	+ 30,6	28,9

⁽¹⁾ Ref. : Référence : A : Turjaman *et al.* (2005). B : Aggangan *et al.* (2010). C : Rincon *et al.* (2007). D : Chen *et al.* (2006). E : Torres et Honrubia (1994). ⁽²⁾ Biomasse aérienne. ⁽³⁾ Biomasse racinaire. ⁽⁴⁾ Infection ectomycorhizienne. ⁽⁵⁾ (valeur moyenne des plants mycorhizés – valeur moyenne des plants non mycorhizés) x 100 (valeur moyenne des plants mycorhizés). ⁽⁶⁾ nd : non déterminé.

– efficacité limitée de ce type d'inoculum fongique due à la germination lente des spores ou la faible viabilité des spores.

Malgré ces quelques critiques, ce processus d'inoculation est facile à mettre en œuvre et reste une technique efficace pour le transport et la conservation des spores pour certains champignons ectomycorhiziens tels que *Pisolithus* or *Scleroderma*.

4. INOCULUM FONGIQUE DE TYPE « VEGETATIF »

Cette formulation d'inoculum requiert des cultures pures de souches de champignons ectomycorhiziens généralement obtenues à partir de carpophores de champignons ectomycorhiziens collectés en milieu naturel, mais également en utilisant des racines ectomycorhizées, des sclérotés, des rhizomorphes et des spores (Molina et Palmer, 1982). Dans ce chapitre, les techniques visant à obtenir des cultures pures de champignons ectomycorhiziens seront décrites.

4.1. ISOLEMENT DE SOUCHES FONGIQUES A PARTIR DE CARPOPHORES

Cette procédure est généralement considérée comme la méthode la plus performante pour obtenir des cultures pures de champignons ectomycorhiziens. Les carpophores sont brossés à l'aide d'une brosse fine pour éliminer les éléments indésirables susceptibles d'introduire des contaminants microbiens (fragments de racines, particules de sol, etc.) puis divisés en deux parties en conditions axéniques dans une hotte à flux laminaire pour faire apparaître la chair pilérique du carpophore. Un petit fragment de chair pilérique (5 x 5 x 5 mm environ) est alors prélevé à l'aide d'un scalpel et placé dans une boîte de Petri remplie avec un milieu nutritif gélosé. Étant donné que les besoins nutritionnels varient en fonction de l'espèce fongique isolée, différents milieux nutritifs peuvent être utilisés (tabl. 2). Les cultures fongiques sont mises à incuber à 25 °C dans l'obscurité et différents repiquages successifs seront opérés jusqu'à l'élimination finale de tous contaminants microbiens indésirables. Les souches sont conservées en pratiquant des repiquages toutes les 6 à 12 semaines en fonction de la souche fongique cultivée.

Tableau 2. Composition de milieux nutritifs généralement utilisés dans les procédés d'isolement et de culture des champignons ectomycorhiziens (d'après Brundrett *et al.*, 1996).

Composition	Milieux nutritifs		
	MMN ⁽¹⁾	Pachlewski ⁽²⁾	FDA ⁽³⁾
Nutriments (mg.l⁻¹)			
(NH ₄) ₂ HPO ₄	250		
NH ₄ Cl			500
C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆ ⁽⁴⁾		500	
KH ₂ PO ₄	500	1000	500
MgSO ₄ 7H ₂ O	150	500	500
CaCl ₂ 2H ₂ O	50	50	
NaCl	25		
Fe EDTA	20	20	
H ₃ BO ₃		2,8	
MnCl ₂ 2H ₂ O		3,0	
ZnSO ₄ 7H ₂ O		2,3	
CuCl ₂ 2H ₂ O		0,63	
Na ₂ Mo ₄ 2H ₂ O		0,27	
Hydrates de C (g.l⁻¹)			
Maltose		5	
Glucose	10	20	20
Malt extract	3		
Vitamines (µg.l⁻¹)			
Thiamine HCl	0,1	0,1	
Agar (g.l⁻¹)	20	20	20
pH			
pH ajusté à	5,8	5,4	5,0

⁽¹⁾ MMN : Modified Menin Norkrans medium (Marx, 1969). ⁽²⁾ Pachlewski medium (Pachlewski et Pachlewski, 1974). ⁽³⁾ Ferry et Das (1968). ⁽⁴⁾ Ammonium tartrate.

4.2. FORMULATION D'INOCULA DE TYPE « VEGETATIF » ET EFFET SUR LA PLANTE HOTE

Ces formulations sont uniquement réalisables avec des souches fongiques capables de se multiplier rapidement et à grande échelle sur différents substrats de culture. Deux principaux supports inertes sont utilisés : la production de mycélium sur un mélange tourbe/vermiculite et la formulation d'inocula ectomycorhizien par inclusion des propagules fongiques dans une matrice formée par un hydrogel tel que l'alginate de calcium.

4.2.1. INOCULA TOURBE – VERMICULITE (Marx et Bryan, 1975)

Des bocaux en verre (1,6 l) remplis par 1,3 l d'un mélange tourbe/vermiculite (4:5-1:5, v:v, pH = 5,5) sont autoclavés (120 °C, 20 min). Un mélange basé sur un ratio tourbe/vermiculite peut également être retenu (2:3-1:3), mais des substances gazeuses émises à partir de la tourbe suite à la désinfection du substrat, peuvent être toxiques pour le champignon et ralentir son développement. En conséquence, le mélange (4:5-1:5, v:v) est généralement appliqué. Le substrat est ensuite humidifié à la capacité au champ avec 600 ml d'une solution nutritive (tabl. 2). Les bocaux sont obturés par un couvercle percé par un trou de 1 cm de diamètre, lui-même bouché par un morceau de coton cardé afin de permettre les échanges gazeux entre le milieu extérieur et l'intérieur du bocal, mais en évitant l'entrée de contaminants microbiens indésirables. Les bocaux ainsi conçus sont de nouveau autoclavés (120 °C, 20 min). Après le refroidissement du substrat de culture, environ 8 implants prélevés à la périphérie de colonies fongiques cultivées sur un milieu nutritif dans des boîtes de Petri, sont introduits dans le bocal à la surface du substrat en conditions axéniques. En fonction de la souche fongique utilisée, le mycélium colonise généralement la totalité du substrat après 6 à 10 semaines d'incubation à 25 °C à l'obscurité. Pour accélérer la multiplication du champignon, le substrat colonisé après 1 à 2 semaines de culture, peut être fragmenté en agitant le bocal et ainsi homogénéiser la distribution du mycélium au sein du substrat de culture dans chaque bocal. Ce type d'inoculum fongique ainsi conditionné peut être conservé pendant environ 6 mois à 4 °C sans que le symbiote perde sa viabilité et son infectivité.

4.2.2. ENCAPSULATION DES PROPAGULES MYCORHIZIENNES DANS DES BILLES D'ALGINATE (Mauperin *et al.*, 1987)

Ce processus permettant l'inclusion de fragments de mycélium dans un gel polymérisé (plus particulièrement l'alginate de calcium) a été décrit par Dommergues *et al.* (1979) et Le Tacon

et al. (1983, 1985). Ce type de formulation est plus efficace que celle basée sur l'utilisation de la tourbe/vermiculite (Mortier *et al.*, 1988), car le mycélium est protégé au sein des gels des différents stress d'origine abiotique (stress hydrique) et biotique (compétition avec d'autres microorganismes du sol). Avec cette technique, il est également possible de déterminer précisément la quantité de mycélium apportée au sol, ainsi que le nombre de propagules viables et efficaces. Différentes méthodes ont été testées pour mesurer la quantité de mycélium présente dans un substrat type tourbe/vermiculite [(Mesure des teneurs en ergostérol, Martin *et al.* (1990) ; Mesure des teneurs en chitine, Vignon *et al.* (1986)], mais aucune n'a donné de résultats fiables et reproductifs, car les substances émises par la tourbe en milieu aqueux interfèrent avec les mesures colorimétriques.

En utilisant une souche fongique capable de se multiplier en milieu liquide sous agitation, une suspension mycélienne est produite dans des flacons de type Erlenmeyer ou dans des fermenteurs remplis par un milieu nutritif liquide approprié. Après une durée de culture dépendante du symbiote fongique utilisé, le mycélium est lavé avec de l'eau distillée afin d'éliminer les résidus de composés nutritifs issus du milieu de culture et finement broyés pour obtenir une masse homogène de propagules fongiques (quelques articles d'hyphes par propagule) et enfin resuspendus dans de l'eau distillée. Le contenu en mycélium de l'inoculum est apprécié en mesurant la biomasse fongique sèche par millilitre ou en dénombrant le nombre de propagules viables (méthode de suspension/dilution et étalement dans des boîtes de Petri contenant un milieu nutritif). Puis la suspension de propagules fongiques est mélangée (1:1, v:v) à une solution contenant 20 g.l⁻¹ d'alginate de sodium et 50 g.l⁻¹ de poudre de tourbe préalablement stérilisée. La suspension finale est injectée dans un tube percé par des trous de 2 mm permettant de laisser goutter la suspension dans un bain de solution de chlorure de calcium (100 g.l⁻¹ CaCl₂). La présence de chlorure de calcium entraîne la polymérisation de l'alginate de Na sous forme d'alginate de calcium formant ainsi des billes solides (Mauperin *et al.*, 1987). Ces billes sont immergées pendant 24 h dans le bain de chlorure de calcium, puis récupérées et lavées à l'eau du secteur pour éliminer les traces de chlorure de calcium et enfin conservées dans des bidons à 4 °C. Ce type d'inoculum peut être conservé en l'état pendant 9 mois sans présenter une perte de qualité. Ces billes sont préparées en utilisant 1 à 2 g de mycélium (poids sec) par litre (Mortier *et al.*, 1988).

4.2.3. ECTOMYCORHIZATION CONTROLEE EN SERRE, PEPINIERE ET EN CONDITIONS DE PLANTATION

Ces procédures ont pour objectifs de tester différentes souches fongiques pour déterminer leur compatibilité avec la plante hôte retenue et de mesurer l'impact du symbiote fongique sur un paramètre donné (ex : effet sur la croissance de la plante) afin de sélectionner les souches les plus performantes susceptibles d'être utilisées dans les opérations de reboisement. Ces approches scientifiques et techniques seront illustrées par les résultats obtenus en milieu tropical avec différentes espèces d'*Acacia* australiens.

4.2.3.1. SELECTION DE SOUCHES FONGIQUES EFFICIENTES EN CONDITIONS CONTROLEES

De jeunes plantules sont cultivées dans un sol préalablement tamisé et désinfecté ou non à la chaleur (120 °C, 20 min) ou dans un substrat inerte de type tourbe/vermiculite (1:1, v:v). Différents types de supports cultureux peuvent être retenus en fonction de l'objectif de l'expérience. L'inoculation ectomycorhizienne est ensuite réalisée en mélangeant l'inoculum au substrat de culture. Le traitement témoin (sol non inoculé par le symbiote) est réalisé en mélangeant avec le sol un mélange tourbe/vermiculite humidifié par la solution nutritive (10/1 ; v:v). De nombreux résultats montrent l'intérêt d'inoculer des souches fongiques performantes quant à leur effet sur la croissance de la plante hôte et le potentiel de cette pratique culturale dans des opérations de reboisement à grande échelle en milieu tropical et méditerranéen (tabl. 3). Malheureusement force est de constater que cette innovation n'est réalisée qu'avec un nombre limité de champignons appartenant généralement aux genres *Laccaria*, *Hebeloma*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Suillus* ou *Rhizopogon* (Castellano, 1996).

4.2.3.2. INOCULATION CONTROLEE AU CHAMP

Il est maintenant parfaitement admis que l'inoculation mycorhizienne contrôlée améliore de façon significative la croissance d'essences forestières dans des milieux particulièrement dégradés. Cependant, la plupart de ces expériences a été réalisée en conditions de serre et peu de résultats attestent de l'effet durable de l'impact du champignon sur le développement de la plante hôte en conditions naturelles non contrôlées, plus particulièrement en milieu sahélien.

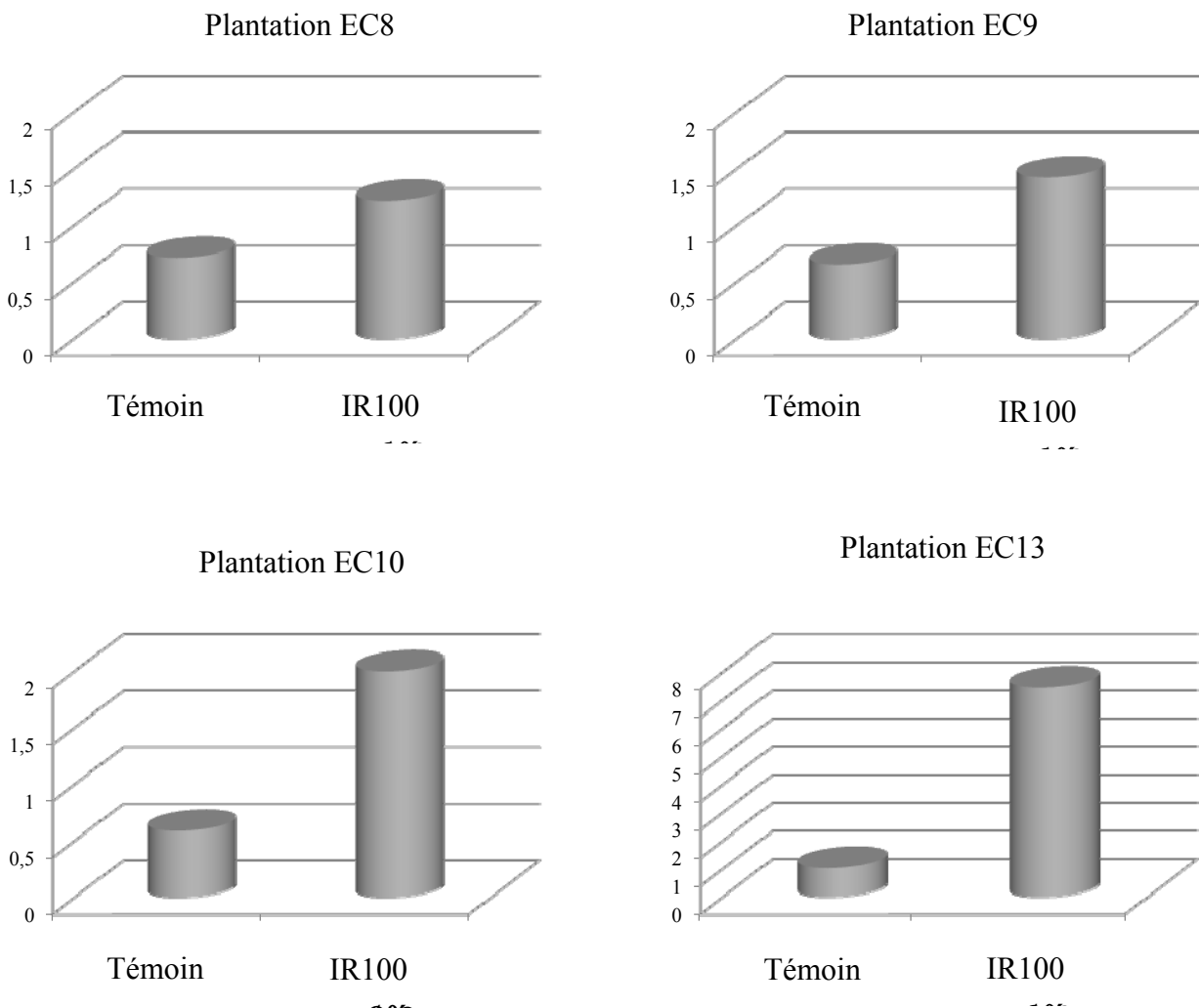
Tableau 3. Croissance de quelques espèces d'Acacia australiens inoculées par différentes souches de champignons ectomycorhiziens (Inoculum type tourbe/vermiculite) après 4 mois de culture en conditions contrôlées.

Souches fongiques	Espèces d' <i>Acacia</i>	Effets sur la croissance (%) et l'infection ectomycorhizienne			Références
		BA ⁽¹⁾	BR ⁽²⁾	IE ⁽³⁾ (%)	
<i>Pisolithus albus</i> IR100	<i>A. auriculiformis</i>	+ 42,1 ⁽⁴⁾	+ 38,6	45,2	A ⁽⁵⁾
<i>P. albus</i> IR100	<i>A. mangium</i>	+ 35,9	+ 44,1	20,1	A
<i>P. albus</i> IR100	<i>A. platycarpa</i>	+ 43,1	+ 9,8	31,6	A
<i>Pisolithus</i> sp. SL2	<i>A. holosericea</i>	+ 56,7	+ 10,6	48,3	A
<i>P. albus</i> COI007	<i>A. holosericea</i>	+ 55,6	+ 25,3	43,8	A
<i>P. albus</i> COI024	<i>A. holosericea</i>	+ 50,4	+ 17,1	10,8	A
<i>Pisolithus</i> sp. COI032	<i>A. holosericea</i>	+ 54,9	+ 12,6	15,0	A
<i>P. albus</i> IR100	<i>A. holosericea</i>	+ 57,1	+ 48,9	25,2	A
<i>P. tinctorius</i> GEMAS	<i>A. holosericea</i>	+ 57,8	+ 14,1	43,1	A
<i>Scleroderma dictyosporum</i> IR109	<i>A. holosericea</i>	+ 52,9	+ 21,0	53,4	A
<i>S. verrucosum</i> IR500	<i>A. holosericea</i>	+ 64,4	+ 14,1	13,8	A
<i>P. tinctorius</i> GEMAS	<i>A. crassicarpa</i>	+ 77,1	+ 52,3	49,4	B
<i>P. albus</i> COI024	<i>A. mangium</i>	+ 54,5	+ 52,1	41,7	C
<i>Scleroderma</i> sp. IR408	<i>A. holosericea</i>	+ 82,1	+ 89,6	13,8	D
<i>S. dictyosporum</i> IR412	<i>A. holosericea</i>	+ 72,9	+ 82,6	12,5	D

⁽¹⁾ Biomasse aérienne. ⁽²⁾ Biomasse racinaire. ⁽³⁾ Infection ectomycorhizienne. ⁽⁴⁾ (valeur moyenne des plants mycorhizés – valeur moyenne des plants non mycorhizés) x 100/(valeur moyenne des plants mycorhizés). ⁽⁵⁾ A : Duponnois et Planchette (2003). B : Lesueur et Duponnois (2005). C : Duponnois *et al.* (2002). D : Duponnois *et al.* (2006).

Des plantations de mycorhization contrôlée ont été réalisées au Sénégal en utilisant une espèce d'Acacia australien, *A. holosericea*, et un champignon ectomycorhizien *Pisolithus albus* isolat IR100 (Duponnois *et al.*, 2007). Le développement de cette essence forestière à croissance rapide a été amélioré dans toutes les plantations (fig. 1). Ces résultats suggèrent que dans des sols carencés en phosphore, la présence de symbiotes fongiques compatibles et efficaces constitue un facteur majeur pour assurer le succès de la plantation tant au niveau de sa productivité que de sa durabilité (Dommergues *et al.*, 1999). Toutefois et pour évaluer correctement la robustesse de cette technique de mycorhization contrôlée, ce type d'expérience doit être reproduit dans d'autres conditions environnementales en utilisant d'autres couples Essence forestière/symbiote fongique.

Figure1. Croissance de *A. holosericea* (exprimée en tonne de biomasse ligneuse par hectare avec une densité de plantation de 1 200 plants à l'hectare) inoculé ou non par *Pisolithus albus* isolat IR100 après 18 mois de plantations au Sénégal (d'après Duponnois *et al.*, 2007).



5. CONCLUSION

De nombreux travaux ont mis en évidence l'intérêt indéniable de valoriser les ressources fongiques symbiotiques pour améliorer la performance d'opérations de reboisement dans des milieux hostiles (sols carencés en éléments nutritifs, déficit en eau, etc.). Parallèlement, de nombreuses études ont été entreprises afin de minimiser le coût de production de l'inoculum fongique considéré comme le principal facteur limitant l'utilisation à grande échelle de la mycorhization contrôlée. Toutefois, la majeure partie de ces résultats ont été obtenus en conditions contrôlées et beaucoup reste à faire pour vulgariser cette technique culturale vis-à-vis des hommes du métier (pépiniéristes) qui, comme en attestent les résultats présentés dans ce chapitre, pourrait améliorer de manière significative les performances des opérations de reboisement et de réhabilitation des zones dégradées en milieu méditerranéen et tropical.

6. REFERENCES

- Aggangan, N.S., Moon, H.K. & Han, S.H. (2010). Growth response of *Acacia mangium* Willd. seedlings to arbuscular mycorrhizal fungi and four isolates of the ectomycorrhizal fungal *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch. *New Forests*, 39: 215-230
- Allen, E.B., Allen, M.F., Helm, D.J., Trappe, J.M., Molina, R. & Rincon, E. (1995). Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil*, 170: 47-62
- Azcon-Aguilar, C., Palenzuela, J., Roldan, A., Bautista, S., Vallejo, R. & Barea, J.M. (2003). Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology*, 14: 165-175
- Bâ, A.M., Sanon, K.B. & Duponnois, R. (2002). Influence of ectomycorrhizal inoculation on *Azelia quanzensis* Welw. Seedlings in a nutrient-deficient soil. *Forest Ecology and Management*, 161: 215-219
- Brundrett, M.C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154: 275-304
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. & Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph. 373 p
- Castellano, M.A. (1994). Current status of outplanting studies using ectomycorrhiza-inoculated forest trees. In: Pfleger F and Linderman B (ed). A reappraisal of

- Mycorrhizae in Plant Health. The American Phytopathological Society, St Paul, 261-281.
- Castellano, M.A. (1996). Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings. *In* Concepts in Mycorrhizal Research. Mukerji KG (ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 223-301
- Castellano, M.A. & Molina, R. (1989). Mycorrhizae. *In*: The Biological Component: Nursery Pest and Mycorrhizae Manual, Vol. 5. Landis TD (ed). Agric. Handbook 674. USDA Forest Service, Washington, DC, pp 101-167
- Chen, Y.L., Dell, B. & Malajczuk, N. (2006). Effect of *Scleroderma* spore density and age on mycorrhiza formation and growth of containerized *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla* seedlings. *New Forests*, 31: 453-467
- de la Cruz, R.E., Lorilla, E.B. & Aggrangan, N.S. (1990). Ectomycorrhizal tablets for *Eucalyptus* species. *In*: Werner D and Muller P (ed). Fast growing trees and nitrogen fixing trees. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 371
- Dommergues, R., Diem, H.G. & Divies, C. (1979). Microbiological process for controlling the productivity of cultivated plants. US Pat No 4.155.737, May 22, 1979
- Dommergues, Y.R., Duhoux, E. & Diem, H.G. (1999). Les arbres fixateurs d'azote, Editions Espaces 34. ORSTOM, FAO, Montpellier, 501 pp.
- Duponnois, R., Plenchette, C., Thioulouse, J. & Cadet, P. (2001). The mycorrhizal soil infectivity and arbuscular mycorrhizal fungal spore communities in soils of different aged fallows in Senegal. *Applied Soil Ecology*, 17: 239-251
- Duponnois, R., Founoune, H. & Lesueur, D. (2002). Influence of the controlled dual ectomycorrhizal and rhizobial symbiosis on the growth of *Acacia mangium* provenances, the indigenous symbiotic microflora and the structure of plant parasitic nematode communities. *Geoderma*, 109: 85-102
- Duponnois, R. & Plenchette, C. (2003). A mycorrhiza helper bacterium (MHB) enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza* 13: 85-91
- Duponnois, R., Founoune, H., Masse, D. & Pontanier, R. (2005). Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semi-arid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation. *Forest Ecology and Management*, 207: 351-362
- Duponnois, R., Assigbetse, K., Ramanankierana, H., Kisa, M., Thioulouse, J. & Lepage, M. (2006). Litter-forager termite mounds enhance the ectomycorrhizal symbiosis between

- Acacia holosericea* A. Cunn. Ex G. Don and *Scleroderma dictyosporum* isolates. *FEMS Microbiology Ecology*, 56: 292-303
- Duponnois, R., Plenchette, C., Prin, Y., Ducouso, M., Kisa, M., Bâ, A.M. & Galiana, A. (2007). Use of mycorrhizal inoculation to improve reforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. *Ecological engineering*, 29: 105-112
- Ferry, B.W. & Das, M. (1968). Carbon nutrition of some mycorrhizal *Boletus* species. *Transactions of the British Mycological Society*, 51: 795-798
- Garbaye, J. (1988). Les plantations forestières tropicales: un champ d'application privilégié pour la mycorrhization contrôlée. *Revue Bois et Forêts des Tropiques*, 216: 23-34
- Garbaye, J. & Churin, J.L. (1997). Growth stimulation of young oak plantations inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with special reference to summer drought. *Forest Ecology and Management*, 98: 221-228
- Garcia, C., Roldan, A. & Hernandez, T. (1997). Changes in microbial activity after abandonment of cultivation in a semi-arid Mediterranean environment. *Journal of Environmental Quality*, 26: 285-291
- Guehl, J.M., Mousain, D., Falconnet, G. & Gruez, J. (1990). Growth, carbon dioxide assimilation capacity and water-use efficiency of *Pinus pinea* L. seedlings inoculated with different ectomycorrhizal fungi. *Annales des Sciences Forestières*, 47:91-100
- Jones, M.D., Durall, D.M. & Cairney, J.W.G. (2003). Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. *New Phytologist*, 157: 399-422
- Kropp, B.R. & Langlois, C.G. (1990). Ectomycorrhizae in reforestation. *Canadian Journal of Forest Research*, 20: 438-451
- Le Tacon, F., Jung, G., Michelot, P. & Mugnier, J. (1983). Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. *Annales des Sciences Forestières*, 40: 165-176
- Le Tacon, F., Jung, G., Mugnier, J., Michelot, P. & Mauperin, C. (1985). Efficiency in a forest nursery of an ectomycorhizal fungus inoculums produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Canadian Journal of Botany*, 63: 1664-1668
- Lesueur, D. & Duponnois, R. (2005). Relations between rhizobial nodulation and root colonization of *Acacia crassicarpa* provenances by an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices* Schenk and Smith or an ectomycorrhizal fungus, *Pisolithus tinctorius* Coker & Couch. *Annals of Forest Sciences*, 62: 467-474
- Martin, F., Delaruelle, C. & Hilbert, J.L. (1990). An improved ergosterol assay to estimate the fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycological Research*, 94: 1069-1074

- Marx, D.H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59: 153-163
- Marx, D.H. (1991). The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. *Ecophysiology of Ectomycorrhizae of Forest Trees*, Marcus Wallenberg Foundation Symposia Proceedings 7: 54-90
- Marx, D.H. & Bryan, W.C. (1975). Growth and ectomycorrhizal development of Loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sciences*, 21: 242-254
- Marx, D.H., Jarl, K., Ruehle, J.L. & Bell, W. (1984). Development of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae on pine seedlings using basidio-encapsulated seed. *Forest Sciences*, 30: 897-907
- Marx, D.H., Ruehle, J.L. & Cordell, C.E. (1991). Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 23. Techniques for the study of mycorrhiza. Norris JR, Read DJ, Varma AK (ed). Academic Press, London, pp 383-411
- Mauperin, C., Mortier, F., Garbaye, J., Le Tacon, F & Carr, G. (1987). Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. *Canadian Journal of Botany*, 65: 2326-2329
- Molina, R. & Palmer, J.G. (1982). Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenck NC (ed). *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St Paul, 115-129
- Mortier, F., Le Tacon, F. & Garbaye, J. (1988). Effect of inoculum type and inoculation dose on ectomycorrhizal development, root necrosis and growth of Douglas fir seedlings inoculated with *Laccaria laccata* in a nursery. *Annales des Sciences Forestières*, 45: 301-310
- Pachlewski, R. & Pachlewski, J. (1974). Studies on Symbiotic Properties of Mycorrhizal Fungi of Pine (*Pinus silvestris* L.) with the Aid of the Method of Mycorrhizal Synthesis in Pure Culture on Agar. Forest Research Institute. Warsaw. Poland
- Piéri, C. (1991). Les bases agronomiques de l'amélioration et du maintien de la fertilité des terres de savanes au sud Sahara. In: *Savanes d'Afrique, terre fertile? Actes des Rencontres Internationales*, 10-14 December 1990, Montpellier, France, pp 43-74

- Read, D.J., Duckett, J.G., Francis, R., Ligrone, R. & Russell, A. (2000). Symbiotic fungal associations in “lower” land plants. *Philos Trans R Soc Lond Ser B-Biol Sci* 355: 815-830
- Requena, N., Perez-Solis, E., Azcon-Aguilar, C., Jeffries, P. & Barea, J.M. (2001). Management of indigenous plant–microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 495-498
- Rincon, A., de Felipe, M.R. & Fernandez-Pascual, M. (2007). Inoculation of *Pinus halepensis* Mill. with selected ectomycorrhizal fungi improves seedling establishment 2 years after planting in a degraded gypsum soil. *Mycorrhiza*, 18: 23-32
- Roldan, A., Querejeta, I., Albadalejo, J. & Castillo, V. (1996). Growth response of *Pinus halepensis* to inoculation with *Pisolithus arhizus* in a terraced rangeland with urban refuse. *Plant and Soil*, 179: 35-43
- Schreiner, R.P., Mihara, K.L., McDaniel, K.L. & Bethlenfalvay, G.J. (2003). Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant and Soil*, 188: 199-209
- Smith, S.E. & Read, D.J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd edn. UK: Academic Press.
- Terwilliger J, Pastor J (1999) Small mammals, ectomycorrhizae, and conifer succession in beaver meadows. *Oikos* 85, 83-94
- Torres, P. & Honrubia, M. (1994). Inoculation of containerized *Pinus halepensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arhizus* (Pers) Rauschert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) and *Suillus collinitus* (Fr) O Kuntze. *Annales des Sciences Forestières*, 51: 521-528
- Turjaman, M., Tamai, Y., Segah, H., Limin, S.H., Cha, J.Y., Osaki, M. & Tawaraya, K. (2005). Inoculation with the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus arhizus* and *Scleroderma* sp. improves early growth of *Shorea pinanga* nursery seedlings. *New Forests*, 30: 67-73
- Valentine, L.L., Fieldler, T.L., Hart, A.A., Petersen, C.A., Berninghausen, H.K. & Southworth, D. (2004). Diversity of ectomycorrhizas associated with *Quercus garryana* in southern Oregon. *Canadian Journal of Botany*, 82: 123-135
- van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. & Sanders, I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396: 69-72
- Vignon, C., Plassard, C., Moussain, D. & Salsac, L. (1986). Assay of fungal chitin and estimation of mycorrhizal infection. *Physiologie Végétale*, 24: 201-207

DES CHAMPIGNONS SYMBIOTIQUES CONTRE LA DESERTIFICATION

ECOSYSTEMES MEDITERRANEENS, TROPICAUX ET INSULAIRES

Editeurs scientifiques

ROBIN DUPONNOIS^{1,2,4}, MOHAMED HAFIDI², IBRAHIMA NDOYE^{3,4},
HERINIAIRANA RAMANANKIERANA⁵, AMADOU M. BÂ^{1,4}

¹ IRD. UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/AGRO-M/UM2. Laboratoire des symbioses tropicales et méditerranéennes (LSTM). Campus international de Baillarguet, Montpellier. France.

² Laboratoire Écologie & Environnement (Unité associée au CNRST, URAC 32). Faculté des sciences Semlalia. Université Cadi Ayyad. Marrakech. Maroc.

³ Université Cheikh Anta Diop. Département de Biologie végétale. Dakar. Sénégal.

⁴ IRD. Laboratoire commun de microbiologie IRD/ISRA/UCAD. Centre de recherche de Bel Air. BP 1386. Dakar. Sénégal.

⁵ Laboratoire de microbiologie de l'environnement. Centre national de recherches sur l'environnement. BP 1739. Antananarivo. Madagascar.

IRD Editions

INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT

Marseille, 2013