

Effet des mycorhizes à arbuscules (MA) sur la croissance et la composition minérale du trèfle

Abdallah Oihabi, Abdellah Meddich

Les cultures des régions oasiennes marocaines vivent continuellement sous stress hydrique et salin liés à la rareté des pluies et à la baisse de niveau des nappes phréatiques et des barrages. Cette situation est à l'origine de nombreux problèmes socio-économiques et écologiques graves. D'où la recherche de méthodes et de pratiques culturales visant à développer, chez les plantes cultivées dans ces régions, des mécanismes de résistance aux stress hydrique et salin et, par voie de conséquence, contribuant à développer une activité agricole qui aiderait à stabiliser les populations sahariennes.

Notre projet vise à améliorer la tolérance des plantes des régions désertiques aux contraintes abiotiques par l'utilisation de champignons mycorhiziens, dont certains résistent aux contraintes hydriques et rendent les plantes auxquelles ils sont associés tolérants vis-à-vis de la sécheresse [1].

Nous avons sélectionné des champignons mycorhizogènes à vésicules (V) et à arbuscules (A) provenant de sols de palmeraies marocaines et améliorant la croissance et la nutrition minérale du trèfle (*Trifolium alexandrinum*), plante fourragère à croissance rapide largement cultivée dans ces régions.

A. Oihabi, A. Meddich : Laboratoire de physiologie végétale, Faculté des Sciences-Semlalia, BP S15, 40000 Marrakech, Maroc.

Tirés à part : A. Oihabi

Matériel et méthodes

Les échantillons de sols à partir desquels les complexes mycorhiziens ont été obtenus, après piégeage et multiplication sur plante hôte, proviennent des palmeraies suivantes :

- Drâa, avec un site en amont (Agdz), un en aval (Tinfou, 250 km plus au sud) et un au centre (Zagora) ;
- Tafilalet (Aoufous, à 500 km au sud-est de Marrakech) ;
- Marrakech.

Pour chaque site, cinq échantillons de sols rhizosphériques sont prélevés avec des racines de palmiers dattiers, à une profondeur comprise entre 10 et 40 centimètres. Ils sont ensuite mélangés pour obtenir un substrat homogène représentatif de l'ensemble du site.

Les champignons mycorhizogènes à arbuscules sont piégés sur racines de plants de poireaux.

Des graines de poireaux sont désinfectées par immersion dans une solution d'eau oxygénée à 15 % pendant 30 minutes, suivie de trois lavages à l'eau distillée stérile. Elles sont ensuite mises à germer dans des bassines contenant de la vermiculite stérile, préalablement arrosée à l'eau distillée. Après une semaine, les jeunes plants sont repiqués dans les sols provenant des palmeraies. Pour chaque sol, trois plants sont prélevés toutes les deux semaines pour suivre l'état de la mycorhization. Les systèmes racinaires de ces plantes ont été traités [2] et colorés au bleu trypan à 0,01 % dans du lactoglycérol (photo 1). Lorsque le taux de mycorhization atteint son optimum, les racines du poireau myco-

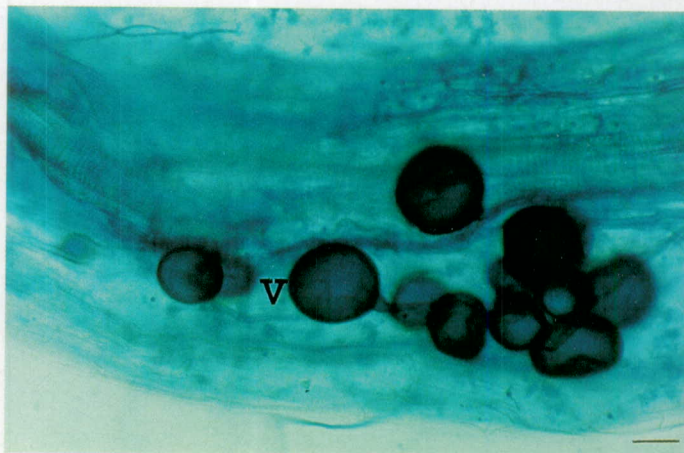


Photo 1. Racine de poireau mycorhizée (V = vésicule barre = 50 µm).

Photo 1. Mycorrhized leek root (V = vesicle, bar = 50 µm).

rhizées serviront d'inoculum endomycorhizien. Pour caractériser cet inoculum, nous avons utilisé la technique décrite par Trouvelot *et al.* [3], qui permet de juger l'état de la mycorhization et reflète les potentialités du système symbiotique. Cette technique est fondée sur l'étude de quatre critères :

- fréquence de mycorhization (F), reflétant l'importance de l'infection du système racinaire ;
- intensité de colonisation du cortex (M), exprimant la portion du cortex colonisée par rapport à l'ensemble du système racinaire ;
- teneur arbusculaire de la partie mycorhizée (a) ;
- teneur vésiculaire de la partie mycorhizée (v).

Les racines de poireau mycorhizées sont désinfectées pendant 10 minutes [4], rincées trois fois pendant 10 minutes à l'eau distillée stérile, puis découpées en fragments d'environ 1 à 2 millimètres de long. Les plants de trèfle sont préparés de la même façon que le poireau. Des plants âgés d'une semaine sont repiqués dans des pots en plastique (13 x 9 cm) contenant du sable préalablement désinfecté par une attaque à l'acide chlorhydrique N/3 pendant une nuit, suivie de plusieurs lavages à l'eau distillée pour éliminer les déchets organiques, puis

d'une stérilisation pendant 3 heures à l'étuve à 180 °C [5].

L'inoculation se fait par application de 0,5 gramme de racines de poireau mycorhizées contre le système racinaire de chaque trèfle. Les plantes sont ensuite incubées dans une salle de phytoculture à 24 °C, 70 % d'humidité, 16 heures de photopériode et 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ d'intensité lumineuse. Elles sont arrosées régulièrement à l'eau distillée avec un apport hebdomadaire de 30 millilitres de la solution nutritive de Long Ashton modifiée [6].

Le dispositif comprend six niveaux d'inoculation (témoin non inoculé, isolats Marrakech, Zagora, Agdz, Tinfou ou Aoufous) avec cinq répétitions de vingt-huit plantes par niveau. Toutes les deux semaines après l'inoculation, nous prélevons trois plantes par traitement pour examiner leur état de mycorhization [3]. Les plantes restantes (dix par traitement) ont servi à l'analyse minérale des parties aériennes.

La réponse des plantes de trèfle à la mycorhization a été estimée par la production de biomasse (matière sèche (MS) après séchage à l'étuve à 105 °C pendant 24 heures) des échantillons racinaires et foliaires pris séparément. L'effet de l'association symbiotique s'exprime par le paramètre « accroissement » selon la formule :

$$\text{Acc} = \frac{\text{MS plante M} - \text{MS plante NM}}{\text{MS plante NM}} \times 100$$

où M = mycorhizée,

NM = non mycorhizée.

L'effet de la mycorhization sur la teneur du trèfle en éléments minéraux a été estimé par le dosage de N, P, K, Na, Ca et Mg dans la partie aérienne de la plante [7].

Dans tous les cas (*figure 1*), les fréquences de mycorhization sont supérieures à 70 %, les plus élevées étant celles des isolats d'Aoufous, Agdz et Tinfou (avec des fréquences d'infection de 100 % pour les deux premiers et 94,4 % pour le troisième) qui présentent également les intensités de mycorhization les plus élevées. Les isolats de Marrakech et Zagora montrent des intensités plus basses de colonisation du cortex racinaire (30 et 10,4 %) ; contrairement aux autres isolats, ils ne se propagent que faiblement dans le système racinaire du poireau.

Après deux mois de culture, les racines de poireau ont montré des taux arbusculaires supérieurs à 60 % sur les parties mycorhizées du système racinaire. La production vésiculaire est généralement très faible, excepté pour l'isolat Tinfou où le taux dépasse les 60 %.

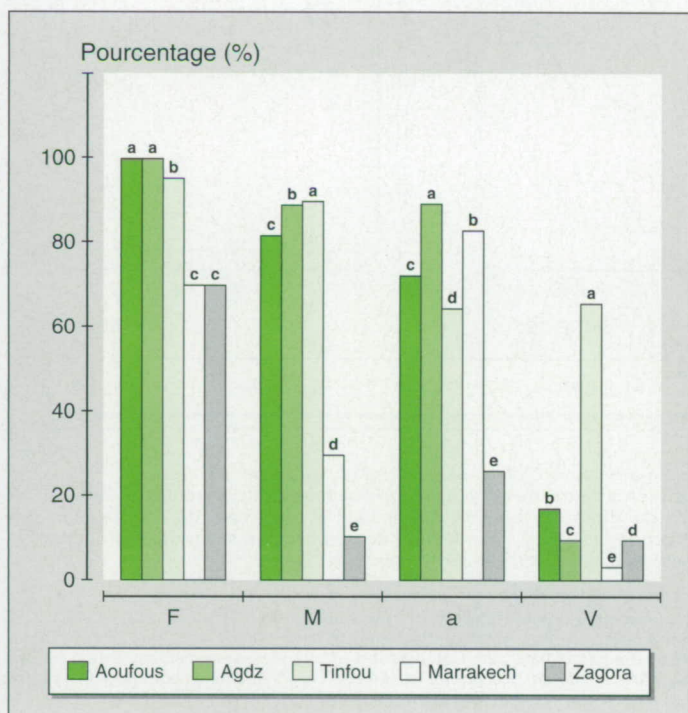


Figure 1. État de l'inoculum 8 semaines après inoculation des semis de poireau (les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, $p < 0,05$). Le pourcentage signalé au niveau de l'axe des ordonnées est celui des paramètres d'infectivité (F %, M %, a % et v %) qui sont présentés au niveau de l'axe des abscisses. Ces paramètres sont calculés en pourcentage, selon les formules définies par Trouvelot *et al.* [3] pour une lame enfermant 15 fragments d'environ 1 centimètre du système racinaire :

$$F \% = (N - n_0) / N \times 100,$$

où N = nombre de fragments observés,

n_0 = nombre de fragments sans trace de mycorhization ;

$$M \% = (95 \times n_5) + (70 \times n_4) + (30 \times n_3) + (5 \times n_2 + n_1) / N,$$

où n_5, n_4, \dots, n_1 sont les nombres de fragments notés 5,4... 1 respectivement ;

$$a \% = (100 \times m_{\Delta}) + (50 \times m_{\triangle}) + (10 \times m_A) / 100,$$

où mA, m Δ et m \triangle représentent le pourcentage de mycorhization de qualité arbusculaire donnée (A : faible ; Δ : moyen ; \triangle : forte) ;

$$v \% = (100 \times m_{\underline{v}}) + (50 \times m_{\underline{v}}) + (10 \times m_V) / 100,$$

où mV, m \underline{v} , et m \underline{v} représentent le pourcentage de mycorhization de qualité vésiculaire donnée (V : faible ; \underline{v} : moyen ; \underline{v} : forte).

Figure 1. State of the inoculum, 8 weeks after leek seedling inoculation (results followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$).

Les racines de poireau se sont montrées réceptives aux champignons VA des sols étudiés (ce qui rejoint les données de plusieurs auteurs [8, 9]) et ont servi d'inoculum pour le trèfle, dont l'infection a été estimée par l'analyse des paramètres : fréquence d'infection (F), intensité d'infection (M) et teneur AV [3]. Dans les dix premiers jours, après l'inoculation, F reste très faible (< 20 %) ou nul (phase de latence). Ensuite, le taux d'infection croît progressivement pour atteindre 90 % pour l'isolat d'Aoufous à la quatrième semaine, alors qu'il ne dépasse pas 40 % pour les autres isolats. À la sixième semaine, l'isolat d'Aoufous atteint 100 % tandis que ceux d'Agdz et Tinfou dépassent 90 % à la huitième semaine. Dans le cas des sols de Zagora et Marrakech, F n'a pas dépassé 70 et 50 % respectivement à la fin de l'expérience (figure 2A).

La colonisation des tissus racinaires du trèfle par les différents complexes fongiques VA étudiés ne s'est pas manifestée jusqu'à la deuxième semaine après l'inoculation. À la quatrième semaine, seul l'isolat d'Aoufous avait progressé nettement à l'intérieur des cellules du cortex, avec un M de 43 % pour atteindre 87 % à la huitième semaine. En revanche, pour les autres isolats, M est resté faible jusqu'à la huitième semaine, où seul l'isolat d'Agdz a atteint 70 %, les autres valeurs étant de 40 % pour Tinfou, 14 % pour Zagora et 3,4 % pour Marrakech (figure 2B).

L'observation au microscope optique des vésicules et arbuscules (figure 2C) montre que la production des vésicules est généralement faible (< 70 %) par rapport aux arbuscules (figure 2D). Seul l'isolat d'Aoufous présente une production précoce de vésicules, tandis que ceux d'Agdz, Tinfou et de Zagora ne produisent des vésicules qu'à partir de la sixième semaine ; l'isolat de Marrakech ne montre aucune production de vésicules.

Discussion et conclusion

Dans tous les cas, la cinétique de mycorhization se présente sous forme de courbes sigmoïdes, comme décrit par d'autres auteurs chez le trèfle [10], le palmier à huile [11] et le palmier dattier [8]. L'infection endomycorhizienne du trèfle est particulièrement élevée pour les iso-

Summary

Effect of arbuscular mycorrhiza on growth and mineral content of clover

A. Oihabi, A. Meddich

The present study was aimed at assessing the effects of arbuscular mycorrhizal fungi, isolated from Saharan soils at five sites in Morocco, on the development of clover (Trifolium alexandrinum). Isolates from Aoufous, Agdz and Tinfou were found to improve clover growth and phosphorus uptake. These parameters were positively correlated with root infection levels and mycorrhizal colonization rates.

Cahiers Agricultures 1996 ; 5 : 382-6.

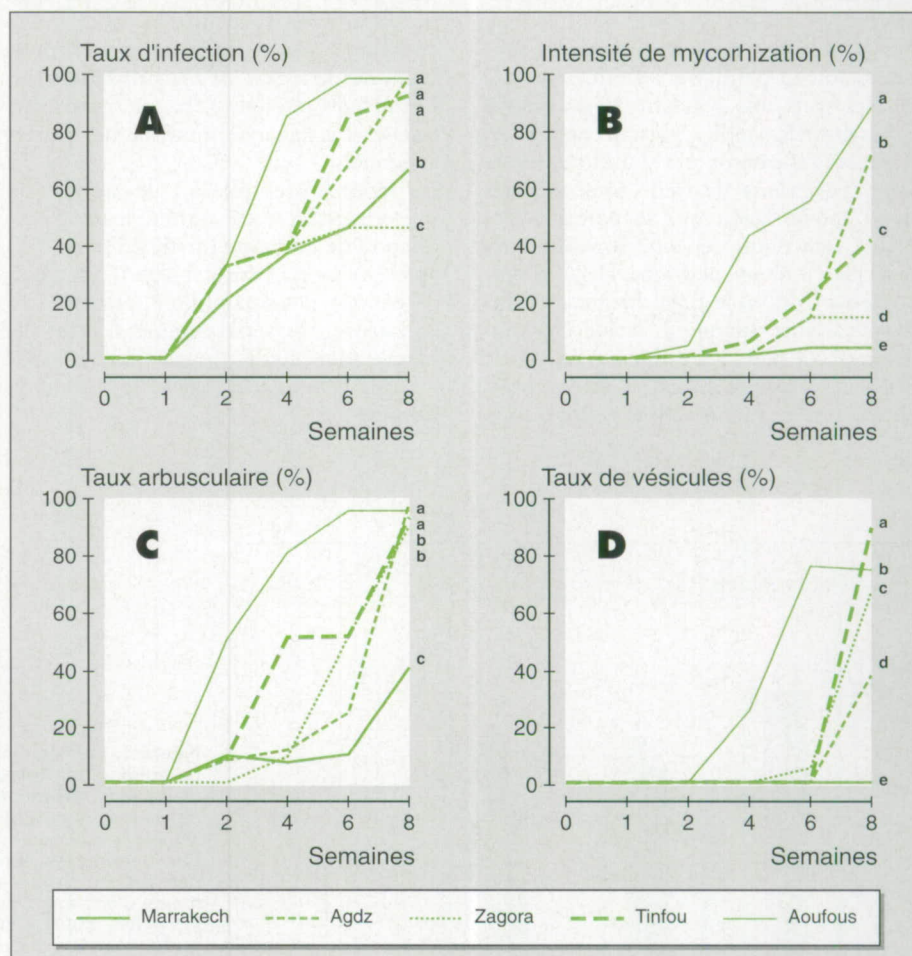


Figure 2. Réactions du trèfle après inoculation par différents isolats de VA (les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, $p < 0,05$). A : Taux d'infection racinaire du trèfle en fonction de l'isolat ; B : Intensité de colonisation des racines de trèfle en fonction de l'isolat ; C : Production des arbuscules sur trèfle en fonction de l'isolat ; D : Production des vésicules sur trèfle en fonction de l'isolat.

Figure 2. Clover reactions to inoculation with different fungus isolates VA (results followed by the same letter are not significantly different at $p < 0.05$). A : Level of root infection of inoculated clover according to isolate ; B : Colonization of clover root cortex according to isolate ; C : Arbuscular production on clover according to isolate ; D : Vesicles production on clover according to isolate.

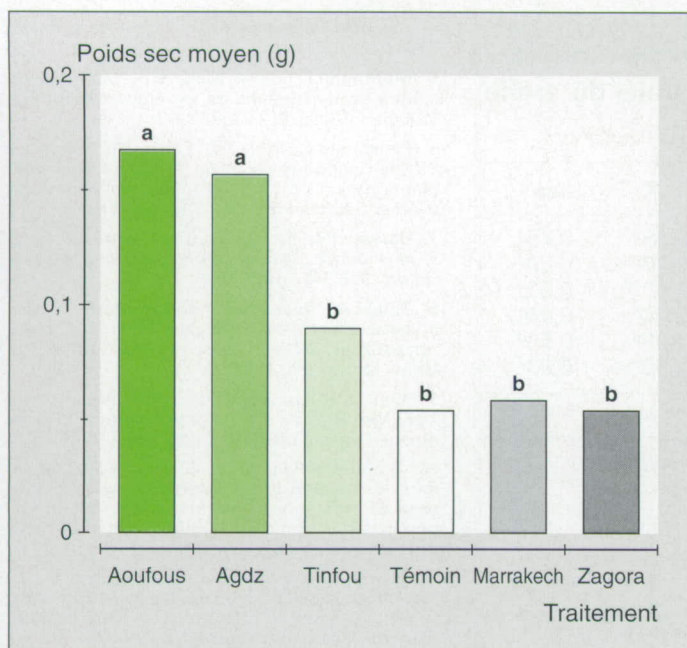


Figure 3. Effet de l'endomycorhization à arbuscules sur le poids sec du trèfle 8 semaines après transplantation (les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, $p < 0,05$).

Figure 3. Effect of VA mycorrhization on clover dry matter 8 weeks after transplantation (results followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$).



Photo 2. Effet de la mycorhization avec l'isolat fongique VA d'Aoufous sur la hauteur de la partie aérienne du trèfle 8 semaines après inoculation.

Photo 2. Effect of VA mycorrhizae of Aoufous on the height of aerial part of clover plants at eight weeks post inoculation.

lats fongiques d'Aoufous, Agdz et Tinfou, avec une infection et une colonisation plus importantes des racines de la

plante. La mycorhization par ces isolats est associée à un poids sec accru des trèfles par rapport au témoin (200 %

Tableau 1

Effet de la symbiose mycorhizienne sur le poids sec des différentes parties du trèfle (en % du témoin non traité)

Origine des mycorrhizes à arbuscules	Système aérien	Système racinaire
Aoufous	267	169
Agdz	251	143
Tinfou	63	57
Zagora	0	0
Marrakech	0	0

Effect of mycorrhizal symbiosis on the dry weights of different parts of clover plants (% of untreated control)

pour Aoufous et Agdz et 88 % pour Tinfou). En revanche, la mycorhization par les autres isolats n'a pas eu d'effet sur le poids sec de la plante-hôte (figure 3).

L'examen séparé des composantes aériennes et souterraines du trèfle montre que le poids sec de la partie aérienne croît plus rapidement que celui des racines (tableau 1). La hauteur des parties aériennes (exprimée en cm) est accrue de manière significative par l'infection des isolats VA d'Aoufous, Agdz et Tinfou, par rapport au témoin. Les plantes endomycorhizées par le complexe d'Aoufous sont trois fois plus hautes que les plantes non infectées (photo 2).

Les résultats de l'effet de la mycorhization sur la teneur du trèfle en éléments minéraux sont présentés dans le tableau 2. Les plantes endomycorhizées par les isolats d'Aoufous, Agdz et Tinfou présentent des teneurs en P, Ca, Mg et Na plus élevées que les plantes non inoculées.

Les champignons endomycorhizogènes ayant les meilleurs taux d'infection et la plus grande aptitude à coloniser les racines du trèfle sont corrélés avec la croissance la plus importante du trèfle et sa teneur la plus élevée en phosphore.

Les arbuscules sont le siège des échanges entre le champignon mycorhizogène et la plante-hôte [12], ce qui accroît la surface d'échange entre les deux partenaires, favorise le prélèvement de phosphore et stimule la croissance de la plante [8, 11]. Aucune stimulation de la teneur en phosphore et de croissance des plantes de trèfle n'est obtenue après inoculation par les complexes à faible intensité de mycorhization et de production d'arbuscules.

La liaison entre la stimulation de la croissance et le niveau d'infection par les VA a été observée dans le cas de la vigne [13]. Oihabi [8], relève une différence dans la production de biomasse chez le palmier dattier infecté par trois espèces de champignons VA *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae* et *Glomus intraradices*, ce dernier ayant le taux d'infection du système racinaire le plus élevé, corrélé à la plus forte production de matière sèche dans la partie aérienne.

L'inoculation par les isolats d'Aoufous, Agdz et Tinfou est corrélée à un accroissement significatif de la biomasse, de la taille et de la teneur en P, Ca et Mg. Les teneurs en N et en K ne sont cependant pas accrues par rapport à celles des plantes témoins non mycorhizées, ce qui pourrait être dû à la forte stimulation de la production de la matière sèche des trèfles mycorhizés. Contrairement aux isolats

Tableau 2

Effet des mycorhizes VA sur la composition minérale du trèfle (en % de la matière sèche)

	P	Ca ²⁺	Mg ²⁺	N	K	Na ⁺
Témoin	0,09 ^c	2,16 ^{bc}	1,17 ^b	2,11	2,48 ^a	0,45 ^e
Aoufous	0,32 ^a	2,57 ^a	2,82 ^a	2,03	2,20 ^{bc}	0,70 ^c
Agdz	0,19 ^b	2,40 ^{ab}	1,94 ^b	1,78	2,07 ^{cd}	0,80 ^b
Tinfou	0,18 ^b	2,40 ^{ab}	3,18 ^a	1,99	2,44 ^a	0,44 ^e
Marrakech	0,13 ^{bc}	2,16 ^{bc}	1,36 ^b	2,20	1,98 ^d	0,50 ^d
Zagora	0,14 ^{bc}	2,00 ^c	1,10 ^b	2,37	2,30 ^{ab}	0,93 ^a

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil $p < 0,05$.

Effect of VA mycorrhizae on clover mineral content (% of dry weight)

d'Aoufous, Agdz et Tinfou, ceux de Marrakech et Zagora n'ont pas eu d'effet sur la croissance et la nutrition du trèfle ■

Remerciements

Nos remerciements à la fondation internationale pour la science (FIS) à Stockholm (Suède) et à la « Third World Academy of Sciences » (TWAS) à Trieste (Italie) pour leurs soutiens matériels.

Références

1. Mikola P. Mycorrhizae under tropical stresses. *Angew Botanik* 1987 ; 61 : 15-23.
2. Phillips JM, Hayman DS. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Brit Mycol Soc* 1970 ; 55 : 158-61.
3. Trouvelot A, Kouch J, Gianinazzi-pearson V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire : recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Les mycorhizes : Physiologie et génétique. 1^{er} Séminaire Dijon*. Paris : Inra, 1986 : 217-21.
4. Strullu DG, Grellier B, Marciniak D, Letouzé R. Micropropagation of chesnut and conditions

of mycorrhizal synthesis *in vitro*. *New Phytol* 1986 ; 102 : 95-101.

5. Montagne D, Saint Macary H. Méthode de culture semi-aseptique de légumineuses en pot. *V. legu* 5, FAO/GRET, 1983 : 1-3.

6. Plenchette C, Furlan V, Fortin JA. Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. *J Amer Soc Hort Sci* 1982 ; 107 : 535-8.

7. Harvey RM, Fox JL. Nutrient removal using *Lemna minor*. *J. Water Pollution Control Federation* 1973 ; 45 : 1928-38.

8. Oihabi A. *Étude des endomycorhizes à vésicules et arbuscules sur le Bayoud et la nutrition du palmier dattier*. Thèse de doctorat d'État Univ., Marrakech, 1991 ; 117 p.

9. Plee J. *L'endomycorhization contrôlée du mérisier*. Mémoire de fin d'étude. Diplôme d'ingénieur en agriculture. Inra, Dijon, 1986 ; 79 p.

10. Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Trouvelot A. Evaluation of the infectivity and effectiveness of indigenous vesicular-arbuscular fungal population in some agricultural soils of Burgundy. *Can J Bot* 1985 ; 63 : 1521-4.

11. Blal B. *Les endomycorhizes VA chez le palmier à huile (Elaeis guineensis jacq.) : rôle dans la régulation de la croissance et dans la nutrition minérale des jeunes plants de clones micropropagés*. Thèse de doctorat, Univ. Dijon, 1989 ; 93 p.

12. Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Dexheimer J, Morandi D, Trouvelot A, Dumas E. Recherches sur les mécanismes intervenant dans les interactions symbiotiques plante-champignons endomycorhizogènes VA cryptogamie. *Mycol* 1988 ; 9 : 201-9.

13. Olivier B, Bertheau Y, Diem HG, Gianinazzi-pearson V. Influence de la variété de *Vigna unguiculata* dans l'expression de trois associations endomycorhiziennes à vésicules et arbuscules. *Can J Bot* 1983 ; 61 : 354-8.