



HAL
open science

Multiplication des mycorhizes arbusculaires en milieu liquide et solide afin d'améliorer la formulation de biofertilisants

Laure Priou

► **To cite this version:**

Laure Priou. Multiplication des mycorhizes arbusculaires en milieu liquide et solide afin d'améliorer la formulation de biofertilisants. Sciences agricoles. 2013. <dumas-00975007>

HAL Id: dumas-00975007

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00975007v1>

Submitted on 7 Apr 2014

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

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



HAL Authorization



AGROCAMPUS OUEST

CFR Angers

2 rue le Nôtre
49100 ANGERS

PROINPA

Av. Meneces
Zone El paso
COCHABAMBA

Mémoire de Fin d'Études

**Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences
Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage**

Année universitaire : 2012-2013

Spécialité : Horticulture

Spécialisation ou option : Gestion Durable du Végétal en Horticulture et Aménagement Paysager

**MULTIPLICATION DES MYCORHIZES ARBUSCULAIRES EN MILIEU LIQUIDE ET SOLIDE
AFIN D'AMELIORER LA FORMULATION DE BIOFERTILISANTS**

Laure PRIOU

Volet à renseigner par l'enseignant responsable de l'option/spécialisation ou son représentant

Date :/.../... Signature

Bon pour dépôt(version définitive)

Autorisation de diffusion : Oui Non

Devant le jury :

Soutenu à Angers le : 19/04/13

Sous la présidence de : Jean-Charles Michel

Maître de stage : Noël Ortuño

Enseignant référent : Patrice Cannavo

Autres membres du jury : Nicolas Chen, Christian Hecker

*"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent
que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".*



FICHE DE DIFFUSION DU MEMOIRE

A remplir par l'auteur⁽¹⁾ avec le maître de stage.

Aucune confidentialité ne sera prise en compte si la durée n'en est pas précisée.

Préciser les limites de la confidentialité⁽²⁾ :

➤ Confidentialité absolue : oui non

(ni consultation, ni prêt)

↳ Si oui 1 an 5 ans 10 ans

➤ A l'issue de la période de confidentialité **ou** si le mémoire n'est pas confidentiel,

Merci de renseigner les éléments suivants :

Référence bibliographique diffusable(3) : oui non

Résumé diffusable : oui non

Mémoire consultable sur place : oui non

Reproduction autorisée du mémoire : oui non

Prêt autorisé du mémoire : oui non

Diffusion de la version numérique : oui non

↳ Si oui, l'auteur⁽¹⁾ complète l'autorisation suivante :

Je soussigné(e) _____, propriétaire des droits de reproduction dudit résumé, autorise toutes les sources bibliographiques à le signaler et le publier.

Date :

Signature :

Rennes/Angers, le

Le maître de stage⁽⁴⁾,

L'auteur⁽¹⁾,

L'enseignant référent,



(1) auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études¹

(2) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(3) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé.

(4) Signature et cachet de l'organisme.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements à l'ingénieur Noël Ortuño pour la proposition de ce stage au sein du laboratoire de microbiologie de la fondation Proinpa de Cochabamba (Bolivie). Merci pour ses conseils et sa culture scientifique.

Merci à Mayra, commandante en chef de l'équipage du laboratoire. Merci pour son aide précieuse tout au long du stage, et son dynamisme.

Mes remerciements vont ensuite à Marlene et son esprit analytique. Geek du SAS, logiciel statistique d'interprétation des données, nous aurons passé quelques heures devant le petit écran à faire frémir nos neurones. Merci pour sa bonne humeur et son rire facile de tous les jours.

Merci à Claudia pour sa connaissance des champignons et sa langue bien pendue. Je n'oublierai pas ce petit bout de femme à la volonté de fer.

Merci à mes compagnons de la faculté d'agronomie de San Simon, pour les bons moments passés ensemble et la solidarité face au calvaire nommé microscope et comptage de spores.

Je suis reconnaissante à toute la fondation pour son accueil et l'humanité de ses employés, leur humour un peu patachon.

Merci à Mario pour les nombreux trajets en bus.

Merci du fond du cœur à ma belle-mère Elena qui fut d'une aide précieuse pour garder ma fille chaque fois que j'en ai eu besoin.

Un très grand merci à ma mère et à mon beau-père pour leur soutien de toujours, leur amour et leur patience, pour avoir une fille si aventureuse.

Merci à mon mari Alvaro qui me rend heureuse.

Enfin, merci à ma fille Malena pour éclairer mes journées et donner un sens à ma vie : je lui dédie ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

FICHE DE DIFFUSION DU MEMOIRE	II
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIERES	IV-V
ABREGES ET SYMBOLES CHIMIQUES	VI
LISTE DES ANNEXES.....	VII
TABLE DES ILLUSTRATIONS	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
INTRODUCTION	1
I. ETAT DE L'ART.....	2
I.1. Caractéristiques générales des MA.....	2
I.2 Effets bénéfiques des MA sur les cultures.....	3
I.3. Caractéristiques morphologiques des MA.....	3
I.4. Facteurs déterminants la réussite de l'inoculation de MA sur les cultures.....	4
II. MATERIEL ET METHODES	5
II.1.Matériel biologique utilisé.....	5
<i>II.1.1. Matériel végétal : choix de la plante-hôte</i>	<i>5</i>
<i>II.1.2.Matériel fongique : choix d'une souche native et d'une souche commerciale</i>	<i>6</i>
II.2.Méthodologie suivie pour une production de MA en milieu solide.....	6
<i>II.2.1 : Mise en place de l'expérimentation</i>	<i>6</i>
<i>II.2.2. Suivi de l'expérimentation et variables évaluées</i>	<i>8</i>
<i>II.2.3. Protocole d'extraction des spores de mycorhizes et comptage au microscope optique</i>	<i>9</i>
II.3.Méthodologie suivie pour une production de MA en milieu liquide	9
<i>II.3.1. Mise en place de l'expérimentation</i>	<i>10</i>
<i>II.3.2. Suivi de l'expérimentation et variables évaluées</i>	<i>11</i>
<i>II.3.3. Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer la colonisation de mycorhizes</i>	<i>12</i>
<i>II.3.4. Protocole d'isolement des spores de mycorhizes en milieu liquide et comptage au microscope optique</i>	<i>13</i>

II.4. Traitement des données	13
III. RESULTATS	13
III.1. Résultats pour une production de mycorhizes en milieu solide	13
<i>III.1.1. Croissance d'hordeum vulgare</i>	13
<i>III.1.2. La sporulation des AMF</i>	16
III.2. Résultats pour une production de mycorhizes en milieu liquide	17
<i>III.2.1 Observations qualitatives de la croissance de la plante-hôte selon les différentes solutions</i>	17
<i>III.2.2 Fréquence de colonisation racinaire par les mycorhizes</i>	18
<i>III.2.3. Sporulation des AMF en milieu liquide</i>	20
IV. DISCUSSION	21
IV.1. Discussion en milieu solide	21
IV.2. Discussion en milieu liquide	23
CONCLUSION & RECOMMANDATIONS	24
BIBLIOGRAPHIE ET SITOGRAPHIE	25
ANNEXES	28

ABREGES ET SYMBOLES CHIMIQUES

AMF: Champignons formateurs de Mycorhizes Arbusculaires (Arbuscular Mycorrhizal Fungi)

MA: Mycorhizes Arbusculaires

Sn : Souche native

Sa : Souche allemande

T: Témoin

AH: Acide Humique

NaClO: Hypochlorite de sodium

Tg: Tétragrammes (1 Tg=1012g)

LISTE DES ANNEXES

<i>ANNEXE I</i> : La consommation de fertilisants chimiques en Amérique Latine durant la période 1996-2002. Le tableau provient du rapport Acta Nova, vol. 3, N°4, 2007	28
<i>ANNEXE II</i> : Présentation des différentes classes de mycorhizes (Mark Brundett, 1999)	29
<i>ANNEXE III</i> : Analyses de sol de l'argile et du sable, deux substrats provenant du département d'Oruro, Bolivie.....	30
<i>ANNEXE IV</i> : Design expérimental de l'expérience 2, méthode des blocs incomplets	31
<i>ANNEXE V</i> : Influence du substrat sur l'évolution au cours du temps de la hauteur de la plante-hôte	32
<i>ANNEXE VI</i> : Résultats de l'expérience 1bis, influence du substrat et de la souche sur le nombre de spores d'AMF recensés.	33

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Présentation de quelques genres de spores d'AMF	3
Figure 2 : Anatomie des MA.	4
Figure 3: Germination d' <i>hordeum vulgare</i>	5
Figure 4: Inoculation et semis des soucoupes	7
Figure 5: Schémas récapitulatifs des différentes modalités testées dans les expériences 1 et 1bis	7
Figure 6: Disposition en serre et aléatorisation des différents essais de l'expérience 1	8
Figure 7: Développement d' <i>hordeum vulgare</i> sur soucoupe d'argile et dessèchement après un mois	8
Figure 8: Technique de filtration de substrat en vue d'isoler les spores d'AMF.	9
Figure 9: Observation au stéréoscope grossissement 40 de spores viables.	9
Figure 10: Unité expérimentale de l'expérience 2.	10
Figure 11: Germination des graines d' <i>hordeum vulgare</i> dans les pots de 2L.....	10
Figure 12: Schéma récapitulatif des différentes modalités testées dans les expériences 2 et 2bis	11
Figure 13: Echantillonnage de racines en tube à essai et installation au bain-marie.	12
Figure 14: Disposition des fragments de racine sur plaque pour l'observation au microscope	12
Figure 15: Observation de mycélium externe de MA à la base de l'apex racinaire, X10.	12
Figure 11: Disposition des fragments de racine sur plaque pour l'observation au microscope.	12
Figure 15: Observation de mycélium externe de MA à la base de l'apex racinaire, X10.	12
Figure 16: Observation au stéréoscope de spores juvéniles grossissement?	13
Figure 17: Evolution du pourcentage de germination au cours du temps selon le substrat.	13
Figure 18: Evolution du pourcentage de germination au cours de temps selon les profondeurs.....	14
Figure 20: Influence du substrat sur la hauteur de plante en cm	14
Figure 19: Evolution de la hauteur de plante au cours du temps selon le substrat et sa profondeur.	14
Figure 21: Influence de la profondeur de substrat sur la hauteur la plante-hôte.	14
Figure 22: Influence du substrat sur la hauteur en cm d' <i>hordeum vulgare</i>	15
Figure 23: Influence de la souche d'AMF utilisée sur la hauteur de plante.	15
Figure 24: Influence du substrat sur le poids sec de racine, exprimé en mg.	15
Figure 25: Influence du substrat sur la quantité de spores/g	16
Figure 26: Influence de la souche d'AMF sur la quantité de spores/g recensée	16
Figure 27: Comparaison du système racinaire entre les traitements AH et Eau.	17
Figure 28: Etat racinaire des traitements dans l'expérience 2bis.	18
Figure 29: Influence de la solution sur la fréquence de colonisation	18
Figure 30: Influence de la solution et de la souche sur la fréquence de colonisation.....	19
Figure 31: Influence de la souche sur la fréquence de colonisation, expérience 2bis.	19
Figure 32: Influence de la solution sur la quantité de spores recensée.....	20
Figure 33: Influence de la souche sur la quantité de spores	20
Figure 34: Influence de la solution sur la quantité de spores pour l'expérience 2bis	20

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Aléatorisation des différentes répétitions pour chaque traitement.....	8
Tableau 2: Etat général et couleur d' <i>hordeum vulgare</i> selon chaque traitement.	17
Tableau 3: Etude de la corrélation entre fréquence de colonisation et nombre de spores recensées.....	21
Tableau 4: Calcul des taux de multiplication d'AMF dans les expériences 1 et 1bis	21
Tableau 5: Calcul des taux de multiplication dans les expériences 2 et 2bis	23
Tableau 6: Calcul des taux de multiplication d'AMF dans chaque solution pour l'expérience 2 bis.....	23

INTRODUCTION

Depuis leur introduction lors de la dénommée révolution verte, l'utilisation de fertilisants chimiques au niveau mondial a augmenté de façon alarmante. Il y a encore un demi-siècle, les agriculteurs appliquaient 17 Tg (1012g) de fertilisant chimique par hectare, mais aujourd'hui, ce volume a été multiplié par huit. Le tableau en annexe I montre cette augmentation de consommation dans les pays d'Amérique Latine : si la consommation de fertilisants est plus basse en Bolivie, elle a doublé en seulement cinq ans (**FAO, 2005**). En effet, dans la région du Valle Alto, zone de l'étude, la majorité des agriculteurs d'aujourd'hui ne pratiquent plus la rotation de cultures et l'apport en matière organique est minimal ce qui a provoqué une diminution du taux de nutriments dans le sol et augmenté le nombre de maladies et ravageurs de culture, causant une diminution de la productivité et des rendements (**Dalence, 1999**). En réponse à cette baisse de rendements, les agriculteurs utilisent de nombreux intrants chimiques, souvent de manière incorrecte et excessive, contaminant les sols et les eaux souterraines.

C'est dans ce contexte que la fondation PROINPA (PROmoción e INvestigación en Productos Andinos) a développé le projet «développement de biofertilisants pour une production alimentaire durable, en lien avec les petits agriculteurs, visant la souveraineté alimentaire des Andes». L'objectif principal de ce projet est de proposer des alternatives aux fertilisants chimiques, tout en garantissant des volumes de production acceptables. Les biofertilisants sont basés sur des interactions biologiques bénéfiques et des processus naturels: parmi ces interactions, les microorganismes symbiotes du sol, comme les mycorhizes (du grec *mikos*, champignon, et *rhiza*, racine), jouent un rôle important sur le développement de la plante (**Lopez, 2005**). Décrites pour la première fois par **Frank en 1885**, elles font référence, comme leur nom l'indique, à des associations existantes entre champignons du sol et racines de plantes. **Karagiannidis et Hadjisavva-Zinoviadi, 1998** ont montré que certaines espèces de mycorhizes peuvent augmenter la biomasse de plantes cultivées jusqu'à 11,6 fois et leur rendement 5,4 fois en comparaison avec des plantes non-inoculées. D'autre part, elles permettent de réduire la contamination environnementale par leur capacité à capter les nutriments du sol, provoquant une diminution de l'usage de fertilisants chimiques tout en garantissant de bons rendements (**Dodd & al., 1987; Joner y Johansen, 2000**). Les champignons formateurs de mycorhizes arbusculaires (AMF), type de mycorhize étudié ici, sont des symbiotes obligatoires, c'est-à-dire que leur propagation requiert la présence obligatoire d'un hôte, qui le fournit en composés carbonés principalement (**Sieverding, 1991**). Ce n'est que depuis un demi-siècle que l'importance, la signification et l'universalité de ces associations ont été mises en évidence : actuellement, on estime que 90% des plantes terrestres sont mycorhizées (**Smith & Read, 2008**). Les mycorhizes arbusculaires (MA) naturellement présentes dans les écosystèmes, tendent à disparaître dans les systèmes agricoles en raison de pratiques peu respectueuses de l'environnement (**Smith & Read, 2008**): c'est pourquoi tout l'enjeu de la mission est de récolter des souches natives dans les sols conservés de Bolivie, qui compte sur une grande biodiversité en ressources naturelles et microorganismes, pour les multiplier en conditions contrôlées au sein de la fondation dans le but d'augmenter la capacité infectieuse des AMF, traduite par le nombre de spores contenu, et d'obtenir un inoculum efficace applicable en grande culture.

Ces dernières années, diverses techniques de multiplication des MA ont été développées, parmi lesquelles les plus courantes sont celles qui utilisent une plante en milieu solide, constitué de substrat tel sol, tourbe, perlite, vermiculite, sable, argile, matériaux végétaux, forestiers ou le mélange de ceux-ci (**Morton & al., 1993, Fernández, 2003**). La culture d'inoculi de MA s'est également développée en milieu hydroponique, en mettant en contact les racines de plantes préalablement colonisées par une espèce fongique avec une solution nutritive qui flue de manière continue à vitesse constante. L'inconvénient de cette méthode est le contrôle rigoureux du pH qu'elle demande, dû aux variations causées par les exsudats de la plante cultivée (**Elmes et al, 1984**). En revanche, travailler en milieu liquide facilite l'extraction de spores en étant un substrat « propre ».

La production actuelle de spores au sein de la fondation Proinpa, que ce soit en milieu solide ou liquide, ne dépasse pas 35 spores/par gramme de terre, ce qui donne un produit commercial peu efficace sur des exploitations à grande échelle et ne garantit pas une réelle multiplication de mycorhizes une fois le produit épandu. La mission proposée est donc de réussir la multiplication massive de MA, en milieu liquide et en milieu solide, afin d'élaborer un produit final de qualité, facilement applicable et transportable.

Comment réussir la production massive de spores d'AMF, en milieu solide comme en milieu liquide pour augmenter la quantité de spores de mycorhizes tout en diminuant au maximum la quantité de substrat utilisé afin de diminuer les coûts de production, faciliter l'application à grande échelle sur les cultures?

Les enjeux de l'étude sont donc de parvenir à augmenter le taux de spores de mycorhizes dans les 2 milieux et d'améliorer le produit final destiné à la commercialisation. La première partie de ce mémoire sera un rapide état de l'art des connaissances actuelles sur les MA et leur cycle de vie, puis sera abordé le matériel et la méthodologie utilisée pour répondre à la problématique. La troisième partie présentera les différents résultats, qui seront discutés en dernière partie.

I. ETAT DE L'ART

I.1. Caractéristiques générales des MA

Les mycorhizes sont une symbiose mutualiste de caractère biotrophe dans laquelle l'hôte autotrophe fournit des composés carbonés, fruits de la photosynthèse, au symbiote hétérotrophe, le champignon, au sein d'un microhabitat protégé. En échange, le champignon apporte des nutriments minéraux, principalement le phosphore, et de l'eau grâce à un système ramifié d'hyphes extraracinaires capables d'explorer le sol au-delà de la zone d'influence de la racine (**Barea & al., 1980**). Dans le cas précis des AMF, l'interdépendance entre la plante et le champignon est à son maximum; en effet le champignon ne peut compléter son cycle de vie, qui culmine avec la formation de propagules viables, en absence de l'hôte (**Bago & Becard, 2002**). Ceci s'explique par le fait que ces deux organismes ont co-évolué durant 400 millions d'années, selon l'étude des fossiles et les données phylogéniques (**Redecker & al., 2000**). Les mycorhizes arbusculaires (MA) constituent le type de symbiose le plus répandu dans la nature. Elles sont présentes sur 80% des plantes, principalement les Angiospermes, les Gymnospermes, les Bryophytes et les Ptéridophytes. Les AMF sont microscopiques, au contraire d'autres champignons formateurs de mycorhizes. Leur principale caractéristique morphologique est l'arbuscule, à l'origine de leur nom. C'est une structure typique de la colonisation que le champignon forme à l'intérieur des cellules corticales par ramification répétée des hyphes (**Azcon-Aguilar & al., 1991 et 1998**). Les MA sont des endomycorhizes : leur caractéristique principale est que les hyphes intraracinaires pénètrent à l'intérieur des cellules corticales et/ou de l'épiderme racinaire. Elles ne forment pas de couverture d'hyphes qui couvrent les racines comme c'est le cas des ectomycorhizes (Annexe II). La classification actuelle indique que les MA font partie du *Phylum Glomerulomycota* qui inclue les genres *Paraglomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Diversispora*, *Geosiphon*, *Archaeospora* (**Schuessler & al., 2001**). La figure 1 ci-dessous illustre quelques genres de spores d'AMF.



Figure 1 : Présentation de quelques genres de spores d'AMF observés au microscope optique *160 (www.rincondelvago.com)

I.2 Effets bénéfiques des MA sur les cultures

Un des avantages les plus importants provoqués par les MA est l'augmentation de l'absorption de minéraux du sol en général, et du phosphore en particulier (Vestberg & Estaun, 1994). Hernandez et al., 2005, indiquent qu'elles absorbent le phosphore sous deux formes: par minéralisation du phosphore organique grâce à l'activité de phosphatases localisées dans les arbuscules matures et hyphes intercellulaires et par la solubilisation du phosphore insoluble (phosphate tricalcique, poudre de roche) grâce à la production d'acides.

L'amélioration de l'assimilation du phosphore est souvent considérée comme le meilleur bénéfice de l'association symbiotique : Gerdemann, 1969, a montré qu'un taux important de minéraux réduit le niveau d'infection par les MA, alors qu'une déficience ou un déséquilibre en minéraux l'augmente. En d'autres termes, plus les sols sont pauvres en phosphore, plus le champignon a des effets positifs (Harley y Smith, 1983). Gerdemann, 1968, conclut qu'une très faible quantité, ou une déficience modérée d'azote disponible ou de phosphore, augmente la quantité de composés carbonés dans les racines, alors plus susceptibles d'être infectées par les mycorhizes.

La plante-hôte reçoit d'autres bénéfices de l'association, en plus des effets nutritionnels des MA. En résumé, selon les dernières recherches de Jeffries & al., 2003 ; Ruiz-Lozano & al., 2003 ; Lum & Hirsh, 2003 ; Rillig, 2004 ; Van der Heijden, 2004 ; Govindarajulu et al., 2005 y 2008 ; Pozo & Azcon-Aguilar, 2007 ; Smith & Read, 2008 ; Gonzales-guerrero & al., 2009, les MA améliorent l'enracinement des plantes par la production de phytohormones. Le mycélium externe des MA est connu pour son effet bénéfique sur la structure du sol, à travers la production d'une glycoprotéine appelée Glomaline, qui favorise l'agrégation des particules du sol par ses caractéristiques chimiques. Les MA protègent la plante face à des stress biotiques (pathogènes) et abiotiques (salinité, sécheresse, déficience ou excès de nutriments, excès de métaux lourds, dégradation du sol). Elles favorisent la diversité des communautés de plantes et la succession végétale, puisque chaque plante montre un niveau de compatibilité majeur avec certains écotypes d'AMF, d'où l'importance de la conservation de la diversité de ces champignons pour bénéficier à la diversité et à la succession des plantes.

I.3. Caractéristiques morphologiques des MA

L'établissement de l'association mutualiste entre le champignon et les racines de la plante-hôte se caractérise par une colonisation de l'écorce de la racine, sans aucun préjudice pour la plante, jusqu'à être, physiologiquement et morphologiquement, partie intégrante de cet organe (Guerrero.E. 1986).

Les AMF infectent les plantes à partir de propagules, qui sont des spores d'origine asexuelle, des réseaux de mycélium, ou des fragments de racine présents dans le sol. Ces propagules sont capables d'initier la formation de nouvelles mycorhizes : le cycle de vie du champignon commence avec la germination des spores de résistance, lorsque les conditions de température et

d'humidité le permettent, ou par le contact entre un fragment de racine colonisée et la racine-hôte. Suite à l'émission d'un tube de germination, le mycélium de champignon croît jusqu'à rencontrer une racine hôte, sur laquelle il forme une structure de précolonisation dite appressorium. Grâce à cette structure, le champignon pénètre l'épiderme et commence la colonisation du tissu parenchymateux de la racine, mais ne pénètre pas l'endoderme ni les tissus vasculaires et méristématiques. A l'intérieur du tissu parenchymateux se forment des structures typiques dénommées bobines issues de circonvolutions d'hyphes intracellulaires. Par la suite, les hyphes pénètrent dans les cellules plus internes du cortex de la racine et se ramifient de manière répétée pour donner des arbuscules, qui présentent une vie brève, de 7 à 10 jours. L'échange de nutriments a majoritairement lieu dans les cellules du parenchyme cortical. Les vésicules sont des organes de réserve surtout lipidique, apparaissant après les arbuscules. Elles sont de forme variée selon les espèces d'AMF, et sont généralement produites aux extrémités des hyphes mais aussi tout le long du parenchyme cortical colonisé. Certaines espèces du genre *Gigaspora* ou *Scutellospora* ne forment pas de vésicules à l'intérieur de la racine, mais dans le mycélium externe où elles forment des cellules auxiliaires (Balestrini & Lanfranco, 2006 ; Giovannetti, 2008 ; Parniske, 2008). Le développement des AMF est présenté figure 2.

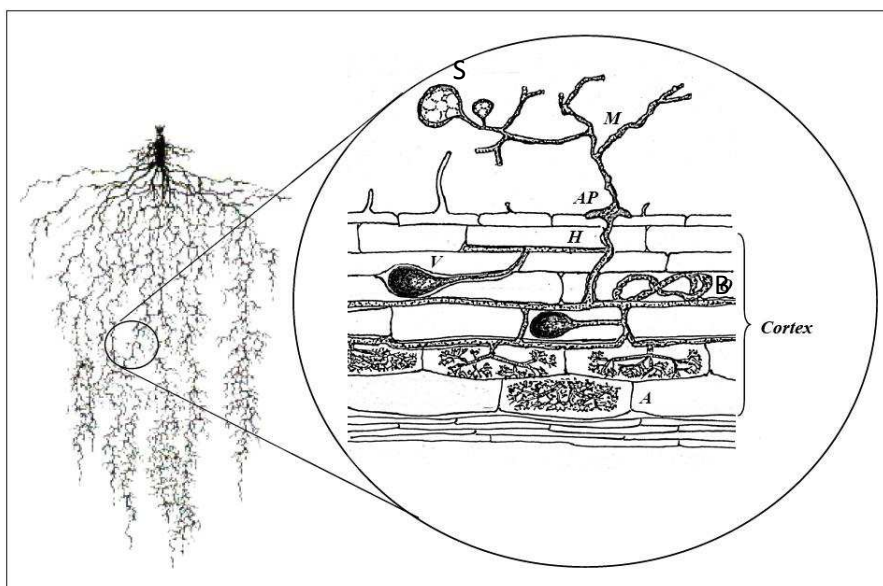


Figure 2 : Anatomie des MA. Abréviations: A : Arbuscule; AP: Appressorium; S: Spore; H : Hyphes intracellulaires ; M : Mycélium extra-racinaire ; B : Bobine ; V : Vésicule (Palenzuela & Barea, 2002)

Une fois la colonisation interne bien établie, les hyphes peuvent croître hors de la racine depuis la plante jusqu'au sol et explorer un volume de sol inaccessible aux racines : la plante-hôte augmente alors considérablement sa superficie d'absorption, de 100 à 1000 fois plus, et donc sa capacité de captation des nutriments et de l'eau. Les MA produisent ensuite des spores à partir du mycélium externe, ou parfois à l'intérieur de la racine, complétant ainsi le cycle de vie des AMF. Les spores de résistance peuvent rester viables dans le sol très longtemps, alors que les hyphes collapent après 2 à 4 semaines dans le sol si elles ne rencontrent pas de racines-hôte.

I.4. Facteurs déterminants la réussite de l'inoculation de MA sur les cultures

Les facteurs qui ont une influence sur la réponse des plantes à la colonisation par les MA sont la plante-hôte, le bilan minéral du sol, et l'inoculation potentielle des champignons producteurs de MA. Les pratiques agricoles, la rotation des cultures et la jachère peuvent affecter les populations d'AMF (Sylvia 2000).

Selon **Angulo (1997)**, **Contreras (1987)** et **Ruiz (1993)**, interviennent également des facteurs environnementaux tels la température ou la disponibilité en eau pour la plante-hôte. En effet, une trop grande sécheresse affecte la colonisation des AMF par altération des cellules corticales de la racine, inhibant la pénétration de l'hyphe ou par modification des stimuli de la racine. En revanche, une trop grande humidité provoque le collapse et la non-germination des spores d'AMF, ce qui réduit considérablement la colonisation. Enfin, le pH du sol affecte de manière significative la sporulation: en effet des variations de pH modifient la disponibilité de la majorité des éléments nutritifs du sol.

Bien que la symbiose de MA ne soit pas particulièrement spécifique, il est évident que toutes les espèces d'AMF ne sont pas équivalentes (**Smith & Read, 1997**): il existe une certaine compatibilité fonctionnelle entre la plante, le sol et le champignon, traduite par la présence ou non de biomolécules spécifiques, et certaines combinaisons sont plus favorables que d'autres (**Van der Heijden et al., 1998**).

Les techniques d'inoculation sont différentes selon l'espèce-hôte (par aspersion, enrobage de graines...) et ne se pratiquent pas nécessairement aux mêmes moments du stade de développement (**FAO, 2005**).

II. MATERIEL ET METHODES

Le stage sera réalisé dans les locaux et serres de la fondation PROINPA localisée à 14 km de la ville de Cochabamba dans la province de Quillacollo, de coordonnées 17° 21' 2.03'' latitude sud et 66° 15' 46.94'' longitude ouest. Les serres sèches de la fondation sont recouvertes de calamine, et les murs sont en simple grillage: la température moyenne est de 25°, l'humidité relative entre 50 et 60%, et le milieu est relativement venté.

II.1. Matériel biologique utilisé

II.1.1. Matériel végétal: choix de la plante-hôte

La plante-hôte utilisée est l'*hordeum vulgare* (orge), plante herbacée de la famille des poacées, micotrophique et compatible avec les AMF (figure 3). Son système racinaire est fibreux et étendu ce qui augmente le nombre de sites potentiellement colonisables. De plus, elle germe rapidement ce qui assure une photosynthèse rapide nécessaire au développement des AMF, elle résiste à la sécheresse, à la taille, et elle est adaptée aux conditions locales. D'autre part, les graminées et légumineuses s'avèrent les meilleures plantes-hôte pour une production massive de MA (**Chaurasia et Khare, 2006**).



Figure 3: germination d'*hordeum vulgare*, Laure Priou 2012

II.1.2. Matériel fongique : choix d'une souche native et d'une souche commerciale

La souche commerciale, d'origine allemande, provient du département Biologie SYMPLANTA de l'université LMU de Munich. Elle est composée de matériel inerte, à savoir des argiles minérales, et d'AMF produits in vitro dans des conditions stériles. Les espèces de mycorhizes présentes sont *Glomus intradices*, *Glomus proliferum*, *Scutellospora heterogama*, *Gigaspora decipiens*, *Gigaspora margarita*. La souche allemande contient initialement 2000 spores/g.

La souche native est produite sous serre dans les platebandes de la fondation : elle est composée de *Glomus fasciculatum*, *Glomus etunicatum* et quelques autres souches natives non identifiées, multipliées avec la plante-hôte *hordeum vulgare* dans un substrat composé d'argile et de matière organique. Cette souche native a montré de bons résultats sur culture d'*hordeum vulgare* dans de précédents travaux au sein de la fondation. Elle contient initialement 35 spores/g.

Les espèces de MA du genre *Glomus* se caractérisent par des clamidospores unicellulaires de grande taille (500-800 u de diamètre), de forme globuleuse à ovale, naissant d'un seul hyphe droit ou en forme d'entonnoir. Les spores varient entre couleur jaune, café, orange ou noir. La recherche sur les 10 dernières années a montré que la plupart des espèces de *Glomus* sont très utilisées pour l'inoculation en raison de leur grande disponibilité.

II.2. Méthodologie suivie pour une production de MA en milieu solide

La méthode la plus répandue pour la production de mycorhizes en milieu solide consiste à déposer les spores dans un substrat stérilisé pour semer ensuite les graines d'une plante capable de former des mycorhizes. Après trois ou quatre mois, le sol et les racines de la plante-hôte peuvent être utilisées comme un inoculant d'AMF (Brundrett et al., 1996).

Deux expériences ont été menées l'une après l'autre : la seconde, nommée expérience 1bis, a pour objectif d'améliorer et compléter les résultats obtenus précédemment.

Le principe de base de cette méthode s'appuie sur des données bibliographiques, qui précisent que la sporulation d'AMF est optimale lorsque la plante-hôte est stressée : le stress sera provoqué par la taille au collet de la plante-hôte, la faible profondeur de substrat et le peu de nutriments qu'il contient (Almanza & al., 2009).

II.2.1 : Mise en place de l'expérimentation

Unité expérimentale

L'unité expérimentale choisie pour les deux expériences est une soucoupe de 162,86 cm² superficie et de 7,2cm de rayon.

Préparation des substrats

La moitié des soucoupes est remplie de sable et l'autre d'argile pour la première expérience. La composition de ces deux substrats, provenant de l'Altiplano sud dans le département d'Oruro, se trouve en annexe III: ils sont considérés quasi inertes, pour le faible taux de matière organique (entre 0,60 et 0,80%), d'azote (entre 0,02 et 0,05%) et de phosphore (entre 6,9 et 8 ppm) qu'ils contiennent. Les deux substrats sont tamisés au préalable. Lors de l'expérience 1bis, un troisième substrat, composé du mélange des deux premiers, est testé.

La recherche au sein de la fondation PROINPA étant destinée directement aux agriculteurs, les substrats ne sont pas stérilisés, afin de travailler avec un milieu de culture qui s'adapte aux

conditions de croissance des AMF locaux et qui se rapproche des conditions écologiques que les AMF affronteront en plein champ (Abbott & al., 1992).

Un autre paramètre, la profondeur de substrat, est testé pour l'expérience 1 : la moitié des essais contient 1cm de substrat, l'autre moitié 2cm. En revanche, seule la profondeur 2cm est testée lors de l'expérience 1bis, au vu des résultats obtenus avec 1cm.

Inoculation et semis



Figure 4: Inoculation et semis des soucoupes, Laure Priou 2012

Ces dernières années, les mycorhizobiologistes ont utilisé aussi bien les hyphes, les spores ou les racines mycorhizées comme source d'inoculum. Dans cette étude, seules les spores ont été utilisées comme source d'inoculum. La quantité à utiliser dans chaque soucoupe est déterminée grâce à la dose d'inoculum recommandée par hectare. Les deux expériences contiennent des plants non inoculés servant de témoin, et notés T. La souche native, notée Sn, est dosée à 0,7 g

inoculum/soucoupe et la souche allemande, Sa, à 0,05g/soucoupe.

Les graines d'*hordeum vulgare* sont désinfectées à l'hypochlorite de sodium avant d'être semées en ligne directement dans les soucoupes pour l'expérience 1 (voir figure 4). La souche native étant recommandée pour 100gr de graines/m², chaque unité expérimentale contient 1,63 g de graines, ce qui correspond à 40 graines. L'expérience 1bis contient seulement 20 graines par soucoupe, issues de semis indirect : le pourcentage de germination n'étant pas de 100% lors du premier essai, le second essai est mené à l'aide d'une transplantation de plantules d'*hordeum vulgare* issues de culture hydroponique, plus résistantes au stress infligé.

Design expérimental

L'expérience 1 est composée de 12 traitements différents, répétés 4 fois tandis que l'expérience 1bis contient 9 traitements répétés 3 fois, comme résumé sur la figure 5 ci-dessous.

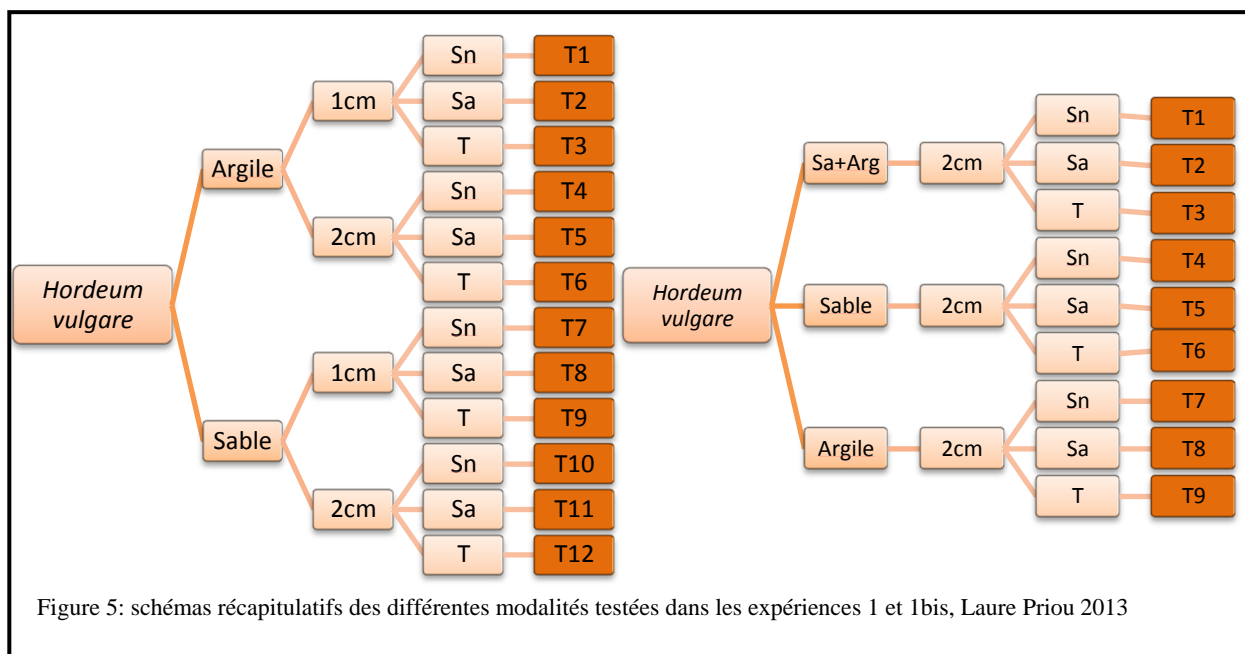


Figure 5: schémas récapitulatifs des différentes modalités testées dans les expériences 1 et 1bis, Laure Priou 2013

Les soucoupes de l'expérience 1 sont ensuite disposées sur un étal en serre ventilée, sans éclairage artificiel.



Figure 6: disposition en serre et aléatorisation des différents essais de l'expérience 1

Pour assurer une homogénéité des expériences et s'affranchir des variables du milieu telles la lumière et le vent principalement, les soucoupes ont été placées de manière aléatoire dans chaque bloc, constitué des 12 traitements (figure 6 et tableau 1). En revanche, les soucoupes de l'expérience 1bis sont placées en serre humide à aspersion automatique 30 secondes toutes les demi-heures. De même les essais sont aléatorisés pour chaque traitement.

Tableau 1: Aléatorisation des différentes répétitions pour chaque traitement. Laure Priou, 2012

T _{1d}	T _{12d}	T _{3d}	T _{4d}	T _{8d}	T _{6d}	T _{11d}	T _{5d}	T _{9d}	T _{10d}	T _{7d}	T _{2d}
T _{12c}	T _{1c}	T _{10c}	T _{6c}	T _{11c}	T _{4c}	T _{7c}	T _{3c}	T _{9c}	T _{2c}	T _{8c}	T _{5c}
T _{9b}	T _{11b}	T _{7b}	T _{1b}	T _{2b}	T _{12b}	T _{3b}	T _{6b}	T _{4b}	T _{10b}	T _{5b}	T _{8b}
T _{1a}	T _{2a}	T _{3a}	T _{4a}	T _{5a}	T _{6a}	T _{7a}	T _{8a}	T _{9a}	T _{10a}	T _{11a}	T _{12a}

→ Bloc 1 contenant toutes les répétitions

II.2.2. Suivi de l'expérimentation et variables évaluées

Lors de l'expérience 1, le pourcentage de germination et la hauteur de plante sont régulièrement évalués, une fois par semaine : les mesures de hauteur se font du collet de la plante jusqu'à la zone apicale, et une graine est considérée germée lorsqu'émerge la plantule. L'arrosage est assuré tous les jours excepté le week-end, avec un fin filet d'eau de manière à ne pas perdre de substrat : la même quantité d'eau est fournie à chaque plante, à l'aide de repères sur les soucoupes.

Les variables agronomiques évaluées durant l'expérience 1bis sont la hauteur de plante et le poids sec de racines, obtenu par récupération des racines desséchées en fin d'expérimentation. L'évaluation de ces différentes variables a pour objectif de déterminer les conditions permettant un développement optimal d'*hordeum vulgare*, et donc de son volume racinaire et des mycorhizes associées.

Enfin, le nombre de spores est quantifié à la fin de chaque expérience, c'est-à-dire 3 mois après démarrage des expérimentations.

Au total ont été réalisées 3 évaluations du pourcentage de germination et 3 évaluations de hauteur de plante, jusqu'à stabilisation des données. Après un mois, les plantes ont commencé à manquer d'espace et de nutriments et se sont desséchées progressivement

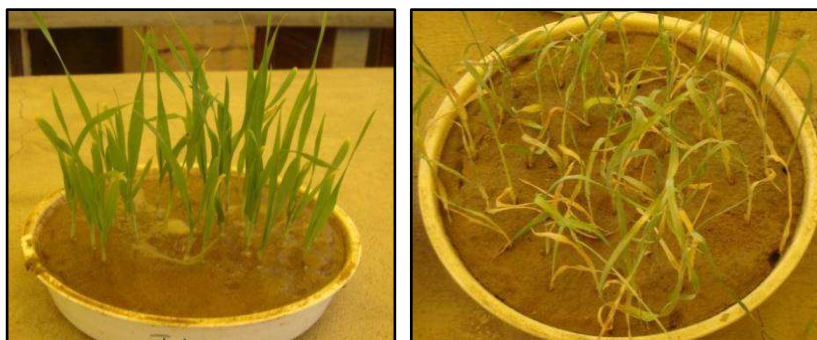


Figure 7: développement d'*hordeum vulgare* sur soucoupe d'argile et dessèchement après un mois. Laure Priou, 2012

(figure 7).

II.2.3. Protocole d'extraction des spores de mycorhizes et comptage au microscope optique

L'estimation de la population de MA requiert l'isolement des spores présentes dans le sol. Les principales étapes de cet isolement reconnues par la communauté scientifique sont la suspension d'un échantillon de sol dans de l'eau, l'agitation mécanique, le passage dans une série de tamis pour séparer la matière organique des autres particules, la création d'un gradient de densité par centrifugation afin de parvenir à une suspension de particules ayant une taille et une densité semblables à celles des spores de MA (450-40 µm), et enfin la filtration pour extraire ces particules. Le protocole suivi dans cette étude s'appuie plus précisément sur les travaux du **Dr Erwald Sieverding en 1984**.



Figure 8: technique de filtration de substrat en vue d'isoler les spores d'AMF. Laure Priou, 2013

La première étape consiste à prélever deux échantillons de 20 grammes dans chaque soucoupe, dont l'un servira à évaluer l'humidité du sol. L'autre échantillon est passé dans des tamis superposés, de diamètre de mailles 37, 60 et 177µ. L'échantillon est lavé abondamment grâce à un robinet à aspersion, pour éliminer les impuretés et particules de taille inférieure à celles des spores de MA (figure 8).

La deuxième étape consiste à verser délicatement ce qui reste dans le dernier tamis dans des tubes à centrifugation, complétés uniformément par de l'eau à 30 ml. Les tubes sont ensuite complétés à 45 ml par une solution d'eau sucrée à 70%. Après agitation des échantillons dans chaque tube (pour suspendre les spores de MA), ces derniers sont placés dans une centrifugeuse durant 5 minutes à 3200 rpm. Enfin, chaque solution est filtrée à l'aide d'une bombe à vide, rincée (pour éviter que les spores explosent) et placée sur du papier filtre dans des boîtes de petri.

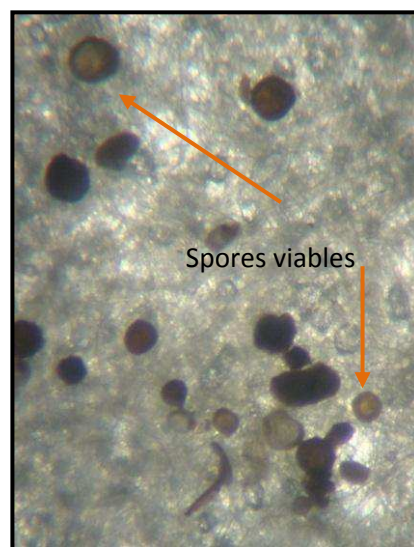


Figure 9: observation au stéréoscope grossissement 40 de spores viables. Laure Priou, 2013

L'étape suivante consiste à observer et compter les spores au stéréoscope. Pour cela chaque papier filtre au préalable humidifié est placé dans une boîte Petri repérée par une série de lignes espacées de 1 cm. Le comptage est alors réalisé ligne par ligne à l'aide d'un compteur et s'exprime en nombre de spores/g de sol sec. Seules sont recensées les spores viables, qui sont non opaques et à contenu cytoplasmique visible comme le montre la figure 9.

$$\text{Nb spores} = \frac{\text{spores comptées}}{\text{poids échantillon}} * (\text{Pi/Pf}) * 100$$

Pi : poids initial de l'échantillon utilisé pour déterminer l'humidité du sol

Pf : poids final de l'échantillon utilisé pour déterminer l'humidité du sol

II.3.Méthodologie suivie pour une production de MA en milieu liquide

Hypothèse de base : une solution appropriée au problème de la quantité de substrat nécessaire à la production massive de mycorhizes serait de les cultiver en milieu liquide, en

présence de micro et macro nutriments, selon la technique d'hydroponie, méthode encore très peu utilisée jusqu'à maintenant.

Le végétal utilisé sera l'*hordeum vulgare*, mis en condition de stress en faisant varier la quantité de solution nutritive dans le milieu.

De même, deux expériences ont été menées l'une après l'autre : l'expérience 2 et l'expérience 2bis, a pour objectif d'améliorer et compléter les résultats obtenus précédemment.

II.3.1. Mise en place de l'expérimentation

Unité expérimentale

L'unité expérimentale est un plateau de 915,04 cm² (34,4*26,6) pour l'expérience 2 (figure 10) et un pot de capacité 2L pour l'expérience 2bis.



Figure 10: unité expérimentale de l'expérience 2. Laure Priou, 2012

Préparation des solutions

La solution nutritive utilisée pour les deux expériences provient du Canada et est exportée par l'entreprise Agritecco. Elle est composée de macronutriments NPK, de ratio 10, 52, 10 respectivement et de micronutriments, à savoir du cuivre, du fer, du manganèse, du zinc, du bore, de l'oxyde de potassium et du phosphate.

Les solutions S₁₀₀ et S₅₀ sont préparées à 100% et 50% de la dose recommandée, à savoir 2g/L : l'hypothèse de base étant qu'en diminuant ainsi la quantité de phosphore, la sporulation des AMF est stimulée. Les deux expériences contiennent des essais témoins S₀, placés dans de l'eau.

Pour l'expérience 2, de l'acide humique (AH) est rajouté à S₁₀₀ et S₅₀, à 4L/36L_{H2O} et expérimenté également en tant que deuxième témoin. Extrait d'humus de ver de terre liquide, c'est un stabilisateur de pH, ce qui rend les nutriments plus disponibles pour la plante. D'après de précédentes études au sein de la fondation, la dose optimale d'acide humique est de 6L pour 36L de solution. Un ultime test est réalisé avec du Vigortop, dosé à 0,5L/10L_{H2O}, produit au sein de la fondation. C'est un biofertilisant foliaire liquide naturel contenant 94% d'acides humiques et fulviques, 2% de brasinoloides et 4% d'extraits de plantes. Il est testé en guise de troisième témoin, pour déterminer ou non son effet bénéfique sur la mycorhization. Chaque unité expérimentale contient 1L de solution.

Lors de l'expérience 2bis, l'acide humique et le vigortop sont supprimés.

Inoculation et semis



Figure 11: germination des graines d'*hordeum vulgare* dans les pots de 2L

La souche native, notée Sn, est dosée à 3,93g inoculum/plateau et la souche allemande, Sa, à 0,28g/plateau pour l'expérience 2 : l'inoculum natif est au préalable filtré et centrifugé selon la méthode ci-dessus pour ne récupérer que les spores avant d'être mélangé aux différentes solutions. L'inoculum commercial est déjà purifié et directement versé dans les plateaux. L'essai suivant contient seulement la souche native purifiée à 3,5g/pot. Il n'y aura pas de témoin neutre car l'on considère qu'il n'y a pas de mycorhizes dans la solution de départ, contrairement à la première expérience où l'on travaille avec du substrat qui peut en contenir un certain taux.

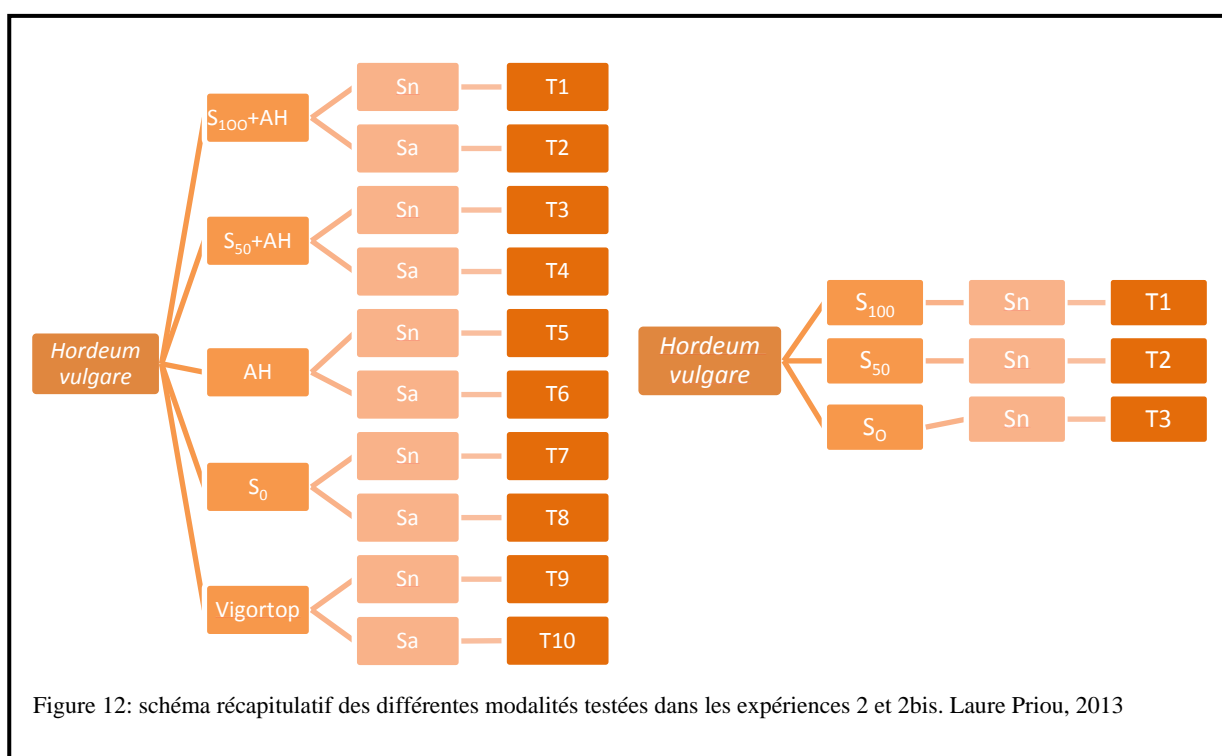
Les graines d'*hordeum vulgare* sont lavées au préalable avec du NaClO afin d'éviter tout risque d'infection pathogène par la suite, puis triées.

Elles sont ensuite mises à tremper durant 24h dans une solution d'H₂O, dans le but de les préparer à une germination rapide et homogène. Une fois les graines pré-germées, elles sont placées en serre humide de façon homogène sur des mailles recouvrant 3 plateaux pour l'expérience 2, et sur des passoires de laboratoires pour l'expérience 2bis (figure 11).

La maille comme la passoire ont des trous de diamètre suffisant pour la germination, et permettent le maintien des plantules. La quantité de graines est disposée de manière à recouvrir toute la superficie du plateau, ce qui correspond à 36g/plateau. L'étape suivante consiste à recouvrir les graines de papier journal pour conserver l'humidité jusqu'à leur germination. Le papier journal est alors retiré, et les plantules laissées quelques jours avant d'être transférées en serre sèche et installées sur les unités expérimentales contenant les différentes solutions. L'étal supportant les essais est entouré de plastique transparent afin de limiter l'évaporation.

Design expérimental

L'expérience 2 est composée de 10 traitements différents, répétés 4 fois tandis que l'expérience 2bis contient 3 traitements répétés 4 fois, comme illustré en figure 12.



De même, on cherche à s'affranchir des variables du milieu expérimental par une disposition aléatoire des plateaux et des pots. Lors de l'expérience, ne pouvant loger que 3 plateaux par largeur d'étal, les répétitions se font par blocs dits incomplets (annexe IV). En revanche l'expérience 2bis suit un modèle d'aléatorisation type celui de l'expérience 1.

II.3.2. Suivi de l'expérimentation et variables évaluées

Les deux expériences requièrent quelques pratiques culturales, à savoir le maintien d'un niveau suffisant de solution pour éviter le dessèchement des racines et le maintien du pH de la solution à 6. Le contrôle du pH se fait grâce à un pH-mètre et une solution d'acide citrique ou de soude permet respectivement de baisser ou monter le pH le cas échéant. L'oxygénation est assurée dans chaque plateau par des tuyaux alimentés par des bombes à air utilisées en aquarium.

Les MA se sont propagées durant un mois et demi en association à la plante-hôte *hordeum vulgare* pour l'expérimentation 2 et un mois pour l'expérimentation 2bis.

Les variables évaluées sont la fréquence de colonisation des racines et le nombre de spores présentes en solution à la fin des expériences.

II.3.3. Protocole d'extraction de racines puis teinte pour observer la colonisation de mycorhizes

Les différentes méthodologies utilisées pour observer les structures formées par les MA respectent les étapes suivantes : nettoyage, blanchiment, acidification, tinte et élimination des excès de colorant.

La première étape consiste à prélever un échantillon de 20 cm de racines représentatif du contenu de chaque plateau (figure 13). Les racines prélevées ne doivent être ni trop jeunes, ni trop vieilles, peu ramifiées pour faciliter l'observation au microscope. 5 échantillons de 4 cm sont récupérés à différents endroits de chaque plateau. Les racines sont ensuite placées dans des tubes à essai complétés par de l'eau. Les racines étant issues d'hydroponie, elles ne nécessitent pas de nettoyage ni de blanchiment supplémentaire.

La deuxième étape consiste à teindre les racines avec une teinte bleue contenant 5% de vinaigre à usage domestique qui permet de fixer le colorant sur les racines. Les tubes à essai sont placés au bain-marie à 90° durant 3 minutes (figure 13). Elles sont ensuite laissées à tremper dans de l'eau claire durant 20 minutes avant d'être rincées abondamment pour éliminer l'excès de colorant.

La troisième étape consiste à monter en plaque chaque échantillon : il s'agit de couper 20 fois 1 cm de racine pour chaque tube à essai, et de les placer alignées et parallèles sur une plaque couverte par un couvre-objet (**Phillips et Hayman, 1970**). Un échantillon représentatif comporte entre 30 à 100 cm de racines à évaluer par traitement selon Sanchez de P et al, 2007, ce qui fut le cas étant donné qu'on a évalué 4*20cm pour chaque traitement (figure 14).



Figure 13: échantillonnage de racines en tube à essai et installation au bain-marie. Laure Priou, 2013



Figure 14: disposition des fragments de racine sur plaque pour l'observation au microscope. Laure Priou, 2013

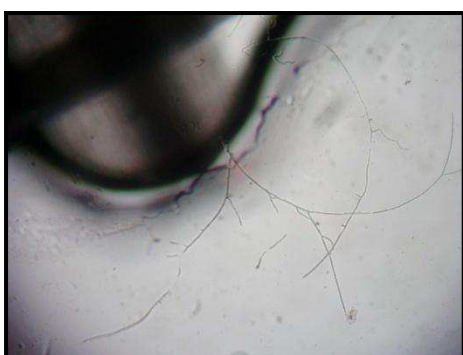


Figure 15: observation de mycélium externe de MA à la base de l'apex racinaire, X10. Laure Priou, 2013

L'observation des plaques se fait ensuite au microscope optique au grossissement 10. On parcourt la plaque dans le sens horizontal, en commençant par le premier tiers de la première racine, et on note pour chaque racine s'il y a ou non colonisation. On parcourt ensuite à nouveau la plaque en partant du deuxième tiers de la racine et ainsi de suite jusqu'au troisième tiers. Sur la figure 15, on peut observer le mycélium externe du champignon qui sort de la racine : c'est un exemple de colonisation réussie.

Estimation du pourcentage de colonisation racinaire par les MA : $C/T * 100$

C : Nombre de fois où l'on observe une colonisation par les MA (mycélium, vésicule, arbuscule)

T : Nombre de champs observés, ici 20*3 (la plaque a été divisée en 3 et il y a 20 racines)

II.3.4. Protocole d'isolement des spores de mycorhizes en milieu liquide et comptage au microscope optique

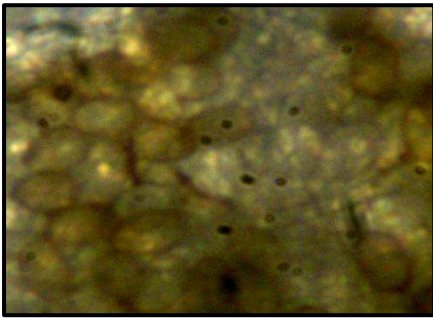


Figure 16: observation au stéréoscope de spores juvéniles grossissement? Laure Priou, 2013

Le protocole est identique à celui utilisé en milieu solide. En revanche, les spores sont différentes de celles observées précédemment : elles sont plus difficiles à repérer de par leur transparence, comme illustré en figure 16. En effet, le milieu de culture étant récupéré plus tôt, un mois et demi maximum après inoculation, les spores d'AMF sont encore juvéniles.

II.4. Traitement des données

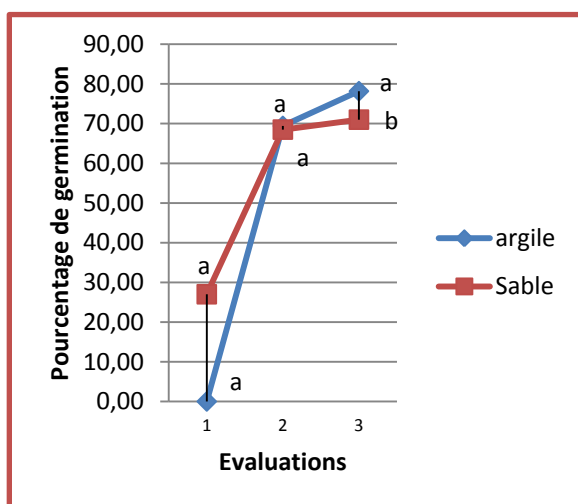
Les variables de réponse telles « hauteurs de plante », « poids sec de racine », ou « nombre de spores » ont été analysées via Microsoft Excel 2010 et le programme ANOVA du logiciel statistique SAS et respectent les conditions requises de la loi normale et de l'homogénéité de variance. Les variables de réponse « pourcentage de germination » et « fréquence de colonisation » des racines respectent les conditions requises de la loi binomiale et l'homogénéité de la variance.

III. RESULTATS

III.1. Résultats pour une production de mycorhizes en milieu solide

III.1.1. Croissance d'*hordeum vulgare*

Pourcentage de germination



Aux deux premières dates d'évaluation, le choix du substrat n'a pas d'influence significative sur le pourcentage de germination, bien qu'il soit supérieur dans le sable. Cependant, la 3^{ème} évaluation révèle que la moyenne statistique finale de germination est supérieure dans l'argile, atteignant 80% (figure 17).

D'autre part, le pourcentage de germination varie selon la profondeur de substrat dans les soucoupes. Si cette variation n'est pas significative la première semaine, elle le devient rapidement avec un taux de germination plus élevé dans 2cm de substrat (figure 18).

Figure 17: Evolution du pourcentage de germination au cours du temps selon le substrat. 1, 2 et 3 correspondent aux dates 07/11/12, 14/11/12 et 21/11/12

Une explication plausible est le plus grand espace et la plus grande disponibilité en eau que prodigue cette profondeur aux graines.

Le taux de germination n'atteint pas 100% de par l'origine des graines (non certifiées) et les conditions de stress auxquelles elles sont sujettes, à savoir le peu d'espace et le dessèchement rapide des soucoupes, dû aux conditions climatiques.

La souche inoculée n'a pas d'effet significatif sur le pourcentage de germination. En effet, les AMF sont probablement à l'état de spores dans le substrat, n'ayant pas encore rencontré de racines à coloniser : elles n'apportent donc pas de bénéfices particuliers à la plante à ce stade.

Hauteur de plante

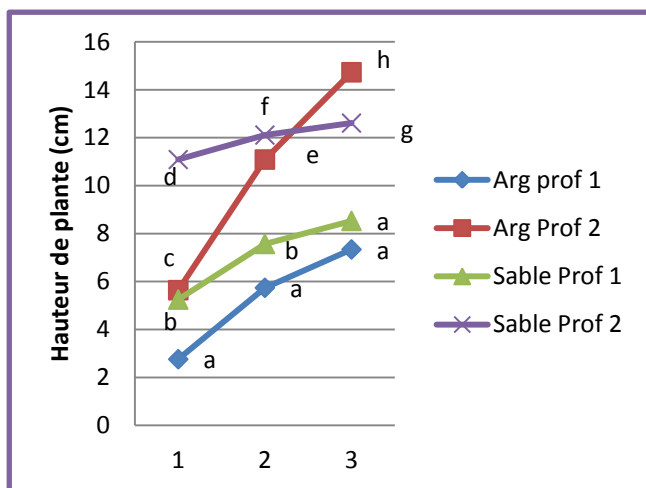


Figure 19: Evolution de la hauteur de plante au cours du temps selon le substrat et sa profondeur. Les numéros 1, 2 et 3 correspondent aux dates 14/11/12, 21/11/12 et 28/11/12

Si la hauteur moyenne de la plante-hôte est plus importante dans le sable (9,52 cm) que dans l'argile (figure 20), la figure 19 indique que les hauteurs de plante dans le substrat argile tendent à rattraper ou dépasser les valeurs atteintes dans le sable, jusqu'à une moyenne statistique de 15cm à 2cm de profondeur. L'influence du substrat sur la hauteur d'*hordeum vulgare* varie donc au cours du temps. L'hypothèse découlant de ces observations et testée dans l'expérience suivante consiste à penser que mélanger ces deux substrats permettrait d'augmenter la croissance d'*hordeum vulgare*.

Les différentes souches d'AMF n'ont pas d'influence significative sur la hauteur de plante. Une interprétation possible est que la symbiose tarde à s'établir en raison de la très faible quantité de nutriments du milieu de culture. En revanche, la profondeur de substrat est déterminante, puisque la hauteur de plante est presque doublée dans la profondeur 2 (figure 21).

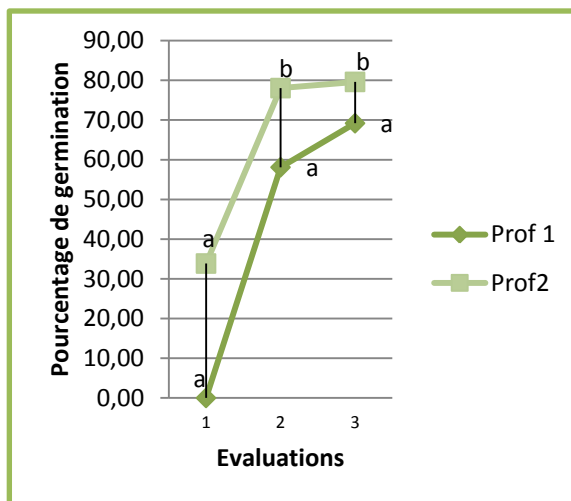


Figure 18: Evolution du pourcentage de germination au cours de temps selon les profondeurs Prof 1 (Profondeur de 1cm) et Prof 2 (Profondeur de 2 cm)

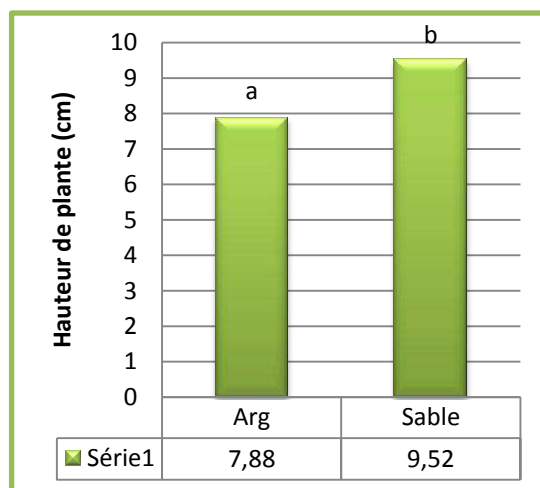


Figure 20: Influence du substrat sur la hauteur de plante en cm. Arg=Argile

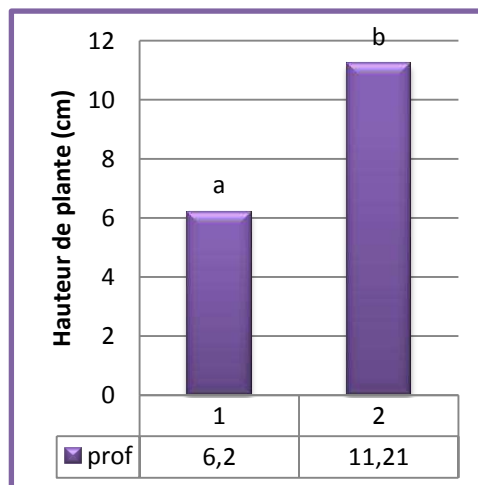


Figure 21: Influence de la profondeur de substrat sur la hauteur la plante-hôte. 1 et 2 correspondent respectivement aux profondeurs de substrat de 1et 2 cm

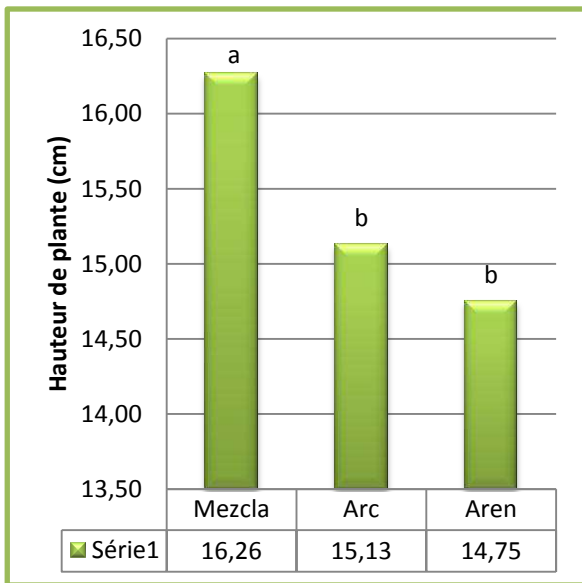


Figure 22: Influence du substrat sur la hauteur en cm d'*Hordeum vulgare*. Mel=Mélange argile+sable, Arg=Argile

L'expérience 1bis teste un mélange des deux substrats précédents, qui s'avère donner de meilleurs résultats quant à la hauteur de la plante-hôte (figure 22), ce qui confirme l'hypothèse ci-dessus. Il semble que les propriétés combinées des deux substrats, à savoir une grande porosité pour le sable et une meilleure capacité de rétention en eau pour l'argile, soient favorables au développement végétatif de la plante-hôte. Les hauteurs statistiques moyennes atteintes dans l'argile et le sable sont supérieures à celles de l'expérience 1 (respectivement 15,13 et 14,75 cm) : ceci s'explique par l'irrigation régulière (toutes les ½ heures) en serre humide. L'évolution de la hauteur de plante au cours du temps selon le substrat donne des résultats proches de ceux de l'expérience 1 (annexe V).

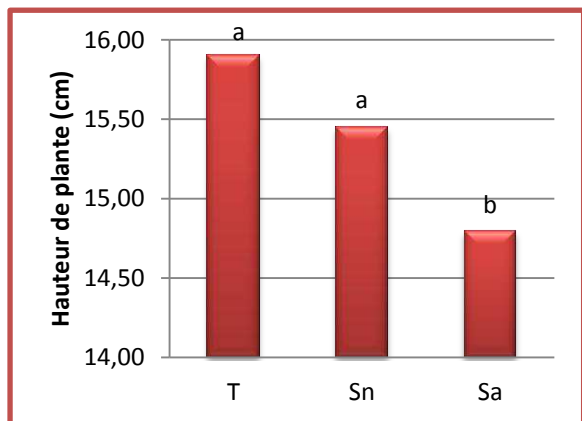
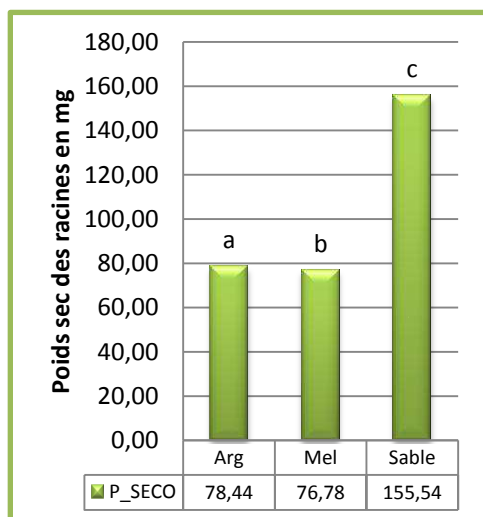


Figure 23: Influence de la souche d'AMF utilisée sur la hauteur de plante. T=Témoin, Sn=Souche native et Sa=Souche allemande

L'inoculation des AMF a cette fois un effet significatif sur la hauteur de plante : les soucoupes témoin et inoculées par la souche native montrent un meilleur développement végétatif après un mois que les soucoupes contenant la souche allemande (figure 23). Après la taille de l'expérience 1bis, la hauteur de plante atteint en moyenne 10 cm mais les paramètres tels la souche ou le substrat n'ont pas d'effets significatifs.

Le développement racinaire



La figure 24 montre que le poids sec de racines est plus de deux fois important dans le sable que dans les deux autres substrats. Cependant, ces résultats montrent que le développement racinaire reste limité puisque le poids sec de racines ne dépasse pas 155 mg de moyenne statistique. Le meilleur développement racinaire obtenu dans le sable peut s'expliquer par une prospection des racines facilitée par la porosité élevée de ce substrat.

Figure 24: Influence du substrat sur le poids sec de racine, exprimé en mg. Arg=Argile, Mel=Mélange argile+sable.

III.1.2. La sporulation des AMF

Effet du substrat sur la quantité de spores observées

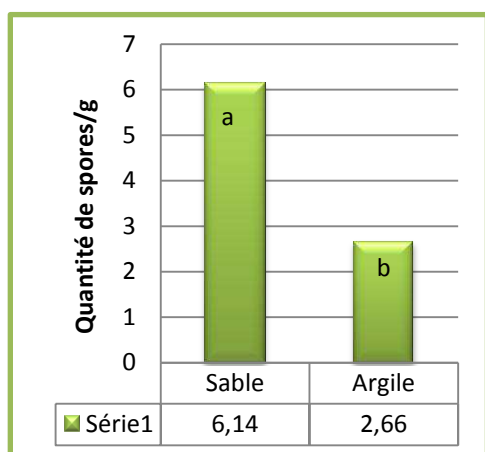


Figure 25: Influence du substrat sur la quantité de spores/g

Le nombre de spores comptées est significativement plus important dans le sable que dans l'argile (figure 25). Ceci s'explique probablement par le développement racinaire supérieur dans le sable, offrant une plus grande superficie de contact avec les AMF. Cependant, les quantités moyennes de spores recensées sont très faibles en comparaison des taux initiaux d'inoculum (6,14 spores/g \ll 35 spores/g). Les spores d'AMF sont donc mortes ou n'ont pas rencontré de racines-hôte après germination.

Effet de la souche inoculée sur la quantité de spores/g observée

Selon la figure 26, il n'y a pas de différence significative entre les souches native, allemande et le témoin, bien que la souche native soit corrélée aux meilleurs taux de spores comptés. De même, on remarque que les taux moyens de spores/g obtenus sont très faibles en comparaison des taux initiaux inoculés. On peut donc en déduire que les AMF ne se sont pas multipliés, et que la majorité d'entre elles n'a pas survécu. D'autre part, la quantité finale de spores n'est pas significativement différente de celle présente naturellement dans le substrat, comme le montrent les résultats de l'expérience témoin. Enfin, l'influence de la profondeur de substrat est nulle. Si elle a une influence sur le développement de la plante-hôte, le taux de spores final reste inchangé.

Les résultats de l'expérience 1 bis montrent également une variation selon le substrat du nombre de spores recensées, et le sable est de nouveau le meilleur traitement. Autant le mélange argile/sable favorise une bonne croissance végétative, autant il semble induire le développement de la symbiose entre les AMF et la plante-hôte. De même, il n'y a pas de différence significative entre les souches native, allemande et le témoin (annexe VI). Le nombre est à peine plus important que dans l'expérience 1, ce qui signifie que le stress causé par la taille et les autres modifications de conduite de l'expérience n'ont pas eu l'effet escompté.

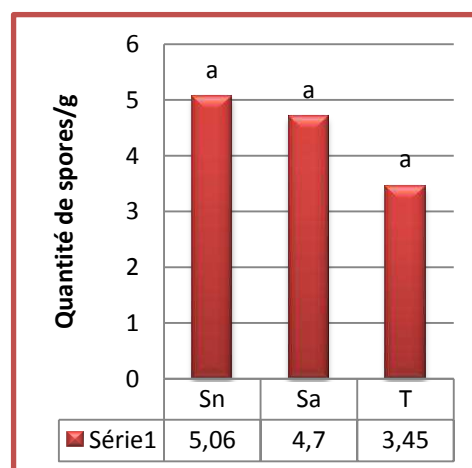


Figure 26: influence de la souche d'AMF sur la quantité de spores/g recensée

Calcul du taux de multiplication des AMF en milieu solide

$$\text{Taux de multiplication} : \frac{(T_f - T_i)}{T_i} * 100$$

T_f : Taux final/g

T_i : Taux initial/g

III.2. Résultats pour une production de mycorhizes en milieu liquide

III.2.1 Observations qualitatives de la croissance de la plante-hôte selon les différentes solutions

Tableau 2 : état général et couleur d'*hordeum vulgare* selon chaque traitement. Abréviations: BE=Bon Etat; TBE=Très Bon Etat; v=vert; vf=vert foncé; M=Mort; j=jaune; ME=Mauvais Etat

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
	S100+ AH +Sn	S100+ AH +Sa	S50+ AH +Sn	S50+ AH +Sa	AH+Sn	AH+Sa	Eau+ Sn	Eau+ Sa	Vigortop + Sn	Vigortop + Sa
a	ME, vf	ME, vf	M, j	M, j	M, j	M, j	BE, j	BE, j	BE, v	BE, vf
b	ME, vf	ME, vf	M, j	M, j	M, j	M, j	TBE, j	TBE, v	ME, v	ME, vf
c	ME, vf	ME, vf	M, j	ME, j	ME, v	M, j	TBE, v	TBE, v	BE, v	BE, vf
d	ME, vf	ME, vf	ME, j	M, j	M, j	ME, v	BE, v	BE, v	BE, vf	BE, vf

Il ressort de ce tableau que l'état sanitaire des différents essais n'est pas homogène. Certaines plantes ont très vite jaunies puis sont mortes, notamment dans les traitements S50 et AH, où les racines étaient couvertes d'algues et mortes pour la plupart.

Dans la solution S100, les plantes étaient en revanche vert foncé, grâce à la quantité appropriée de nutriments, mais les racines très sombres et couvertes d'algues et l'état général d'*hordeum vulgare* restait moyen. Dans le témoin eau, les tiges d'*hordeum vulgare* étaient fines et vert clair, en carence de nutriments, mais en très bon état tout comme les racines nombreuses, homogènes et blanches (figure 27). Les plantes en solution de vigortop étaient vert sombre et à tige épaisse, et contenaient peu de racines, rougeâtres, en moyen état. Le jaunissement des plantes dans les solutions S50+AH et AH, s'explique probablement par le pH qui n'était pas nivelé dans la solution d'acide humique utilisé. Dans certains plateaux, le pH est monté à 8/9, et malgré le rapide ajout d'acide citrique, les plantes n'ont pas récupéré. D'autre part, l'acide humique ne paraît pas approprié à l'utilisation en milieu liquide, puisqu'il a provoqué la rapide apparition d'algues et mouches et diminué la propreté du substrat dans les trois premiers traitements. Le vigortop est au contraire approprié à la culture hydroponique, puisqu'il favorise une bonne croissance de la plante tout en maintenant un bon état sanitaire des racines et du milieu de culture.



Figure 27: comparaison du système racinaire entre les traitements AH et Eau. Laure Priou ; 2013



S'appuyant sur les résultats précédents, l'expérience 2 bis a été menée sans ajout d'AH, en contrôlant plus rigoureusement le pH pour qu'il soit entre 5 et 6. Cependant, le pH n'a quasiment pas varié tout au long de l'expérience qui a duré un mois. La partie aérienne comme la partie racinaire des plantes étaient en bien meilleur état sanitaire (figure 28).

Figure 28: Etat racinaire des traitements dans l'expérience 2bis. Laure Priou, 2013

III.2.2 Fréquence de colonisation racinaire par les mycorhizes

L'étude de cette variable permet de déterminer si la symbiose a pu s'établir dans les racines de la plante-hôte ou non.

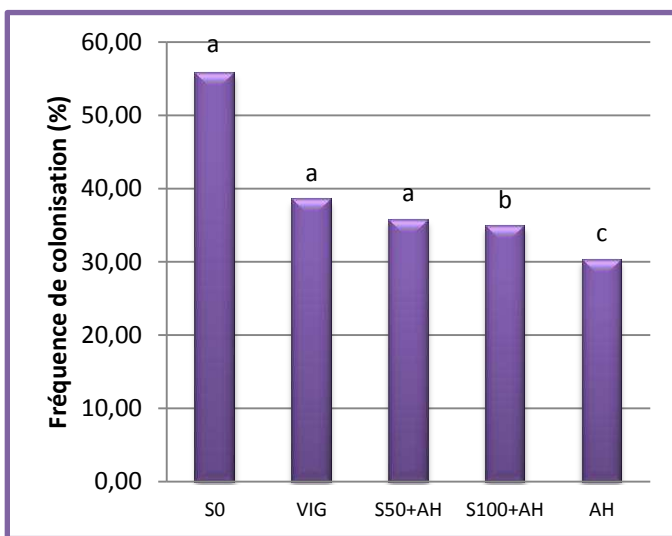


Figure 29: Influence de la solution sur la fréquence de colonisation. S0=témoin, Vig=vigortop, AH=Acide humique

par les propagules d'AMF et la réussite de la symbiose, résultat conforme aux références bibliographiques de la partie 1. De manière générale, la colonisation est plutôt faible, ne dépassant pas 40% pour la plupart des traitements, ce qui permet de nouveau de faire l'hypothèse que l'acide humique inhibe la colonisation pour le mauvais état racinaire qu'il engendre. Enfin, les solutions S0, vigortop ou S50 sont supposées créer un stress pour la plante, étant donné qu'elles contiennent peu de nutriments. Or, selon la bibliographie, le stress favorise la colonisation racinaire ce qui se vérifie ici : l'effet phosphore est vérifié, c'est-à-dire qu'une baisse de la quantité de phosphore dans le milieu favorise l'établissement de la symbiose.

Les variables « solution » et « souche » ont un effet significatif sur la fréquence de colonisation. La solution témoin S0, la solution de vigortop et la solution S50+AH présentent les fréquences les plus hautes, jusqu'à 56% de colonisation, suivies de la S100+AH et enfin le témoin AH (figure 29).

Ces résultats sont directement corrélés aux observations qualitatives ci-dessus, qui montraient un état général des plantes bien meilleur dans l'eau (S0) et dans le vigortop. D'autre part, il n'y a pas eu de variation de pH dans ces deux traitements, ce qui laisse penser que la variation de pH a un effet négatif sur la colonisation des racines

La figure 30 montre l'influence de la souche inoculée sur la fréquence de colonisation en fonction des différentes solutions. La solution S100 couplée à la souche allemande donne les meilleurs résultats, à savoir 76% de colonisation. De manière générale la souche allemande a mieux colonisé les racines d'*hordeum vulgare*, sauf dans la solution témoin S0. La souche native se comporte de la même manière dans chaque solution et colonise à 40% la plante-hôte. En revanche, le comportement de la souche allemande varie selon la solution utilisée : les AMF qu'elle contient semblent beaucoup plus sensibles au contenu du milieu de culture, et nécessitent probablement plus de nutriments dans le milieu pour germer et démarrer la symbiose avec la racine.

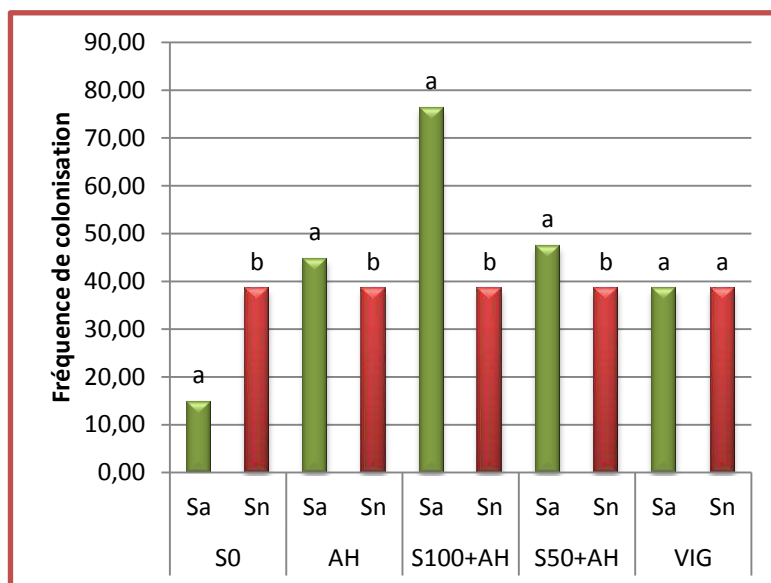


Figure 30: influence de la solution et de la souche sur la fréquence de colonisation.

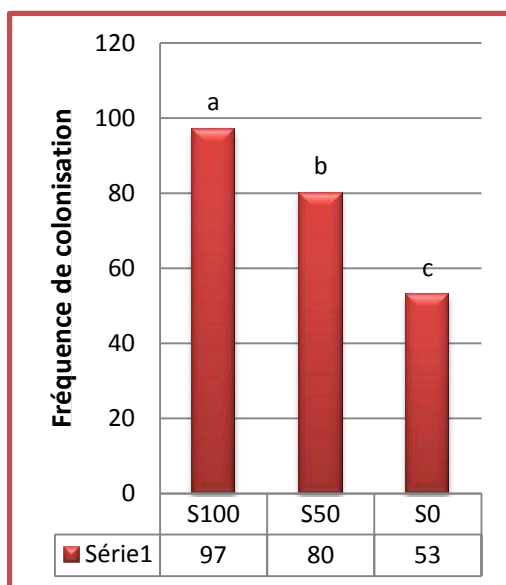


Figure 31: influence de la souche sur la fréquence de colonisation, expérience 2bis.

Lors de l'expérience 2bis, seule la souche native est testée avec S100, S50 et S0 puisque l'objectif de la fondation est de diminuer les coûts de production de MA et d'utiliser des intrants locaux. Les fréquences de colonisation atteintes lors du deuxième essai de culture en milieu liquide sont bien meilleures que précédemment, atteignant 97% pour la solution S100 (voir figure 31). On observe un gradient de colonisation selon la quantité de nutriments dont dispose la plante-hôte : la sporulation et le développement des AMF est donc directement dépendante du taux de nutriments présents dans le milieu de culture. L'hypothèse de l'effet négatif de l'acide humique sur la germination et le développement des AMF est donc confirmée : d'autre part, ce graphique démontre que de très bons résultats en termes de fréquence de colonisation peuvent être obtenus avec la souche native, si les conditions sanitaires de la plante-hôte sont optimales. Les fréquences de colonisation plus basses dans S50 que dans S100 indiquent que l'hypothèse d'une augmentation de colonisation en lien avec une baisse du phosphore dans le milieu est infirmée.

III.2.3. Sporulation des AMF en milieu liquide

Effet du milieu de culture sur la sporulation des AMF :

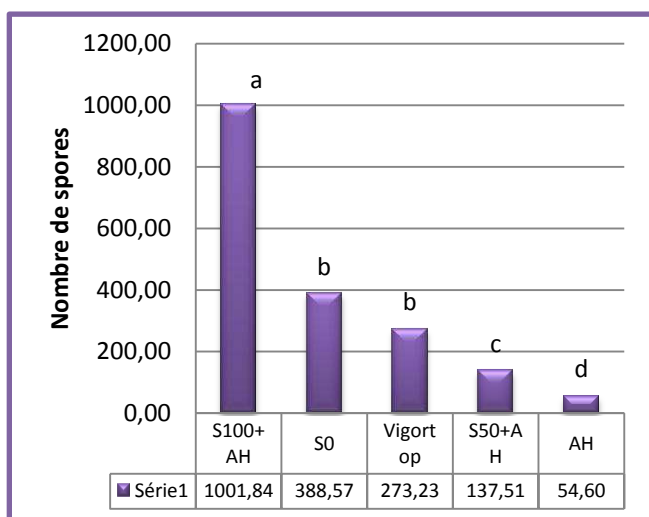


Figure 32: influence de la solution sur la quantité de spores recensée.

La figure 31, ci-contre, montre que le nombre de spores est à son maximum dans la solution S100+AH, atteignant plus de 1000 spores/L. La solution S0 et le vigortop contiennent entre 200 et 400 spores/L et les deux derniers traitements contiennent moins de 200 spores/L. La forte colonisation obtenue avec le milieu S100 notamment en présence de Sa a donc permis une forte sporulation : après germination et développement du mycélium à l'intérieur de cellules racinaires, les MA ont rencontré les conditions satisfaisantes pour terminer leur cycle de vie par sporulation dans le milieu de culture. D'autre part, la quantité de spores recensée est plus importante avec la souche allemande (341 spores/L) qu'avec la souche native (169 spores/L), ce qui est en

corrélation avec les résultats de colonisation obtenus ci-dessus (figure 32).

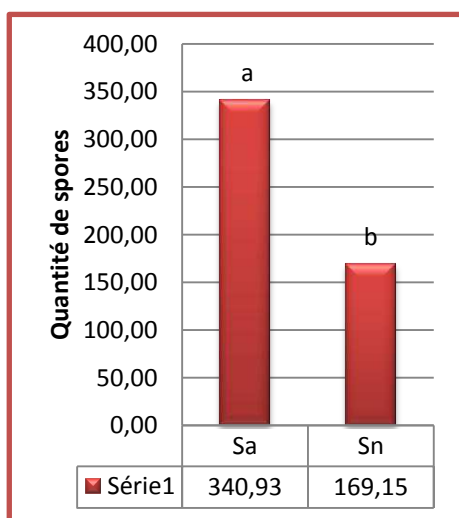


Figure 33: influence de la souche sur la quantité de spores

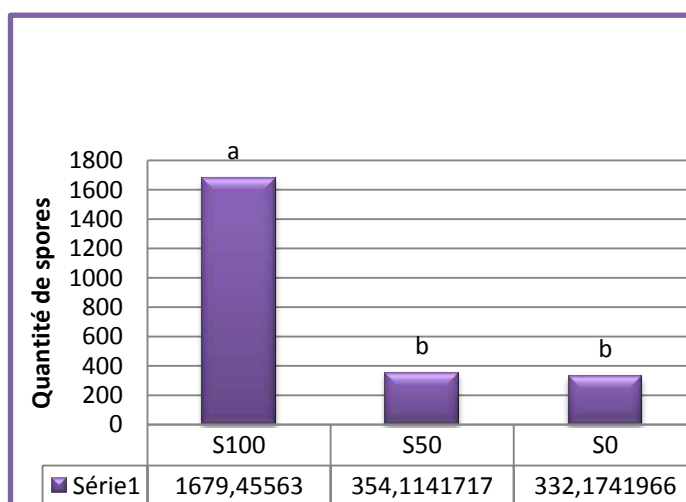


Figure 34: influence de la solution sur la quantité de spores pour l'expérience 2bis

Les résultats de l'expérience 2 bis suivent la même logique, avec un nombre de spores d'AMF dans la solution S100 atteignant 1679 spores/L (figure 33). Le nombre de spores atteint dans S50 est supérieur à celui de l'expérience précédente (354/L) et légèrement supérieur à celui du témoin (332 spores/L). Ces résultats montrent que le traitement S100 est définitivement le meilleur, donnant de très bons résultats même avec la souche native. De nouveau, l'effet phosphore n'est pas observé. Les conditions de stress imposées dans S50 et S0 ne sont pas appropriées à la sporulation d'AMF.

Etude de la corrélation entre la fréquence de colonisation et nombre de spores recensées dans le milieu de culture pour l'expérience 2 bis

Tableau 3: étude de la corrélation entre fréquence de colonisation et nombre de spores recensées

Corrélation entre fréquence de colonisation et sporulation	
S100	0,99
S50	0,74
T	-0,60

Le tableau 3 indique une corrélation positive entre la fréquence de colonisation pour les solutions S100 et S50 : ceci signifie que plus la colonisation est importante, plus la sporulation d'AMF aussi, surtout dans S100 où presque 100% des plantes AMF colonisateurs terminent leur cycle de vie sporulant. Au contraire on remarque une corrélation négative entre ces deux variables dans le témoin : la colonisation n'entraîne pas forcément une sporulation d'AMF. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les AMF ne reçoivent pas suffisamment de composés carbonés de la plante-hôte pour produire des spores en nombre.

Calcul du taux de multiplication des AMF en milieu liquide

$$\text{Taux de multiplication} : [(T_f - T_i) / T_i] * 100$$

T_f : Taux final/L
 T_i : Taux initial/L

IV. DISCUSSION

IV.1. Discussion en milieu solide

Tableau 4: calcul des taux de multiplication d'AMF dans les expériences 1 et 1bis

	Expérience 1			Expérience 1bis	
Taux de multiplication avec Sn	Q _{Sn} initial spores/g <u>24,5</u>	Q _{Sn} final spores/g <u>5,06</u>	Taux de multiplication avec Sn	Q _{Sn} initial spores/g <u>24,5</u>	Q _{Sn} final spores/g <u>4,05</u>
	-79,3%			-83,5%	
	Taux de multiplication avec Sa	Q _{Sa} initial spores/g <u>100</u>		Q _{Sa} final Spores/g <u>4,7</u>	Taux de multiplication avec Sa
-95,3%		-95,3%			

Selon le tableau 4, les taux de multiplication sont tous négatifs : le stress appliqué selon le principe de base a certainement été trop important. De plus il faudrait revoir à quel stade de développement affliger un stress à la plante-hôte : il serait intéressant dans de prochains travaux d'appliquer le stress une fois les parties aériennes et racinaires de la plante-hôte bien développées. Le taux de spores final est bien plus faible que le taux initial, ce qui est a priori illogique étant donné que les spores sont des organes de résistance conservant leur viabilité dans le substrat : on devrait donc recenser au moins le même nombre de spores que celui inoculé à la base de l'expérience. Cependant, ce résultat paradoxal trouve son explication par le fait que les spores sont certainement sorties de dormance, les conditions générales de l'expérience le permettant. Elles ont commencé à germer, et n'ont peut-être pas rencontré les conditions de culture optimales. En effet le stade de germination est un stade sensible, de par la fragilité des hyphes, et le manque ou le surplus d'irrigation selon l'expérience 1 ou l'expérience 1bis ont probablement affecté le bon déroulement de la symbiose. D'autre part, le poids racinaire évalué étant très faible, les racines n'occupaient pas tout l'espace de l'unité expérimentale et de nombreuses spores ont dû germer sans pouvoir rencontrer de racine-hôte.

L'irrigation lors de l'expérience 1 et 1bis n'a pas été optimale : trop faible pour l'expérience 1, notamment le week-end, il a provoqué le dessèchement des spores et trop important pour l'expérience 1bis, il a provoqué la perte de substrat et donc de spores par débordement hors des soucoupes.

Il aurait été intéressant d'évaluer le taux de spores à différents stades de la durée de l'expérience afin d'obtenir une courbe du taux de multiplication et déterminer le moment précis où le taux de spores est optimal.

La texture du substrat semble importante pour la réussite de la multiplication d'AMF mais ce n'est pas le seul facteur qui intervient : sont également déterminants la profondeur de substrat ou la quantité d'eau disponible. En effet, la multiplication n'a pas eu lieu, ni dans le sable ni dans l'argile, ce qui indique que d'autres paramètres de l'expérience sont à ajuster. La taille réalisée dans l'expérience 1bis, permise par la vigueur des plantules d'*hordeum vulgare* issues de culture hydroponique, ne semble pas un paramètre déterminant de la réussite de la multiplication de MA dans les conditions de l'expérience. Dans l'expérience 1bis, où la plante hôte est issue de semis indirect, la souche inoculée a un effet significatif sur la hauteur de plante (supérieure avec la souche native) et les plantules non inocuées sont corrélées aux plus grandes hauteurs : le fait de trouver des spores dans le témoin indique que les substrats utilisés contenaient un faible taux d'espèces d'AMF, présentes dans la matière organique. Ces souches présentes initialement sont peut-être plus adaptées aux conditions extrêmes ou plus compatibles avec la plante-hôte, et lorsqu'elles rentrent en compétition avec les souches inocuées, leur colonisation est moindre.

Les différents graphiques nous montrent une corrélation positive entre le nombre de racines et le nombre de spores, ce qui signifie qu'un bon développement racinaire est un critère majeur de la réussite de la colonisation d'AMF. En revanche, le bon développement végétatif ne semble pas nécessairement corrélé à un nombre de spores important.

De précédents travaux ont sélectionné les argiles épanchées comme le substrat le plus approprié à la multiplication des MA (**Giovanny Oirdobro, données non publiées**). Cependant, s'il a été vérifié que le taux de germination et le développement végétatif sont meilleurs dans l'argile, le substrat sable a obtenu un meilleur taux de spores final, dans les conditions de l'expérience. Il faudrait continuer à tester le substrat sable dans une plus grande profondeur pour savoir si des taux intéressants de spores d'AMF peuvent être atteints et si ce substrat peut être conseillé aux agriculteurs.

IV.2. Discussion en milieu liquide

Tableau 5: calcul des taux de multiplication dans les expériences 2 et 2bis

	Expérience 2		Expérience 2bis	
Taux de multiplication avec Sn	Q _{Sn} initial spores/L <u>137,55</u>	Q _{Sn} final spores/L <u>169,15</u>	Q _{Sn} initial spores/L <u>122,5</u>	Q _{Sn} final spores/L <u>788,6</u>
	23%		543,3%	
Taux de multiplication avec Sa	Q _{Sa} initial spores/L <u>560</u>	Q _{Sa} final Spores/L <u>340,93</u>		
	-39,1%			

Le taux de multiplication d'AMF en milieu liquide dans l'expérience 2 avec la souche allemande est négatif (-39,1%) et positif avec la souche native (23%), selon le tableau 5. La souche native est donc plus adaptée aux conditions de l'expérience. Ces résultats pouvaient être pressentis avec la figure 29. En effet, elle met en évidence que la souche native a le même comportement quelque soit la solution et les plus ou moins bonnes conditions sanitaires du milieu de culture, alors que la souche allemande présente de fortes variations : autant si les conditions le permettent, elles colonisent très bien les racines de la plante-hôte (comme c'est le cas pour S100), autant elles sont bien plus sensibles à des conditions de stress. Ceci met en lumière la « rusticité » et l'adaptabilité de la souche native, qui est donc réutilisée dans l'expérience 2bis. D'autre part, l'expérience 2 montre qu'une plante stressée (comme dans S0, ou S50) ne va pas nécessairement engendrer un taux de multiplication de MA positif, dû au développement d'algues et pathogènes associés qui entrent en compétition avec les AMF. Ainsi, comme en milieu solide, la gestion du stress causé à la plante-hôte est importante et ne doit pas porter préjudice à un bon état sanitaire de celle-ci. Le vigortop est bénéfique à la croissance de la plante-hôte et n'entraîne pas le développement de pathogènes. On pourra donc continuer à le tester dans de futurs travaux pour déterminer plus précisément comment le coupler à la solution nutritive.

Le taux de multiplication dans l'expérience 2 bis est très positif (543,3%). Le changement d'unité expérimentale et les modifications protocolaires en termes d'oxygénation et pH mieux contrôlés, de plus grand espace disponible pour les racines et de limitation de l'évaporation entre l'expérience 2 et 2bis sont donc très positifs.

Tableau 6: calcul des taux de multiplication d'AMF dans chaque solution pour l'expérience 2 bis

	Taux de multiplication
S100	1271%
S50	189%
S0	171%

Le tableau 6 montre plus précisément les taux de multiplication atteints pour chaque solution avec la souche native dans l'expérience 2bis : il est confirmé que la multiplication des spores d'AMF a lieu à des taux très intéressants (jusqu'à 1271%) lorsque la souche native rencontre les conditions optimales de son développement. Les résultats obtenus avec S50 sont meilleurs qu'auparavant, ce qui confirme le fait que les variations de pH et le bon état sanitaire de la plante-

hôte sont des facteurs déterminants pour le protocole de culture hydroponique de MA.

L'hypothèse d'une augmentation de la sporulation d'AMF en lien avec une baisse du phosphore dans le milieu est cependant infirmée dans les deux expériences. Or cela ne devrait pas être le cas selon les recherches bibliographiques liées au sujet. Le problème vient certainement de la solution nutritive utilisée : en effet le produit commercial contenait tous les macronutriments et micronutriment mélangés. Ainsi, en diminuant de moitié la quantité NPK recommandée, la quantité d'azote et de potassium a également diminué de moitié, causant préjudice à l'établissement de la symbiose. En effet, il a été reporté que qu'une baisse de d'azote dans le milieu a un effet négatif sur la multiplication de MA. (Baltruschat & Dehne, 1988; Gryndler & al.,1990; Liu & al., 2000).

CONCLUSION & RECOMMANDATIONS

Bien qu'il existe d'autres méthodologies de multiplication d'AMF donnant des taux de multiplication très élevés comme la multiplication aéronique (Hung y Sylvia, 1988) ou in vitro (Fernandez & al., 2006), cette étude se justifie par le besoin des agriculteurs des Andes de trouver rapidement un remède à l'appauvrissement de leurs sols et à la baisse de rendement. C'est pourquoi le département microbiologie de la fondation Proinpa cherche à mettre au point des techniques utilisant les microorganismes du sol, natifs de Bolivie, tout en privilégiant le facile accès aux agriculteurs sur le plan économique et complexité.

Malgré les résultats décevants de multiplication de MA obtenus en milieu solide, il est recommandé de continuer les recherches: en effet, c'est une technique peu coûteuse étant donnée que les substrats sont d'origine locale, et facile à appliquer par les agriculteurs. La conduite des expérimentations devra cependant être modifiée. Une bonne exposition à la lumière, une irrigation mieux contrôlée et une profondeur de substrat plus grande sont les principaux paramètres à ajuster. Si la multiplication des MA est un succès, le substrat ayant servi de support au développement des AMF et contenant les propagules pourra servir d'inoculum de manière à recommencer l'expérience avec un taux de spores plus élevé, et ainsi de suite jusqu'à obtenir une concentration en spores satisfaisante pour une bonne reprise dans les conditions réelles de l'agriculteur.

En revanche, la multiplication de MA en milieu liquide donne des résultats très intéressants et porteurs d'espoir sur la formulation prochaine d'un biofertilisant efficace. Si elle est plus difficile à mettre en place pour l'agriculteur, la technique de culture hydroponique reste très accessible en termes de prix. Il est recommandé à l'avenir de déterminer la quantité optimale de fertilisation à apporter dans le milieu de culture pour une sporulation encore plus importante. Les fertilisants devront être apportés séparément afin de ne diminuer que la quantité de phosphore dans le milieu. La technique de culture dans des pots de 2 litres surmontés de passoires paraît approprié, mais il faudra cependant attendre que les racines aient atteintes une taille suffisante en serre humide avant de les placer en solution et de les inoculer. En effet, de précédents travaux non publiés au sein de la fondation avaient mis en évidence le problème de l'inoculum qui tombe au fond au pot et n'entre pas en contact avec des racines trop petites. Les spores recensées étaient juvéniles au moment de l'évaluation : il faudra donc développer des techniques de formulation qui permettent de les conserver et d'éviter leur germination. Par exemple, la bentonite ou la vermiculite sont des substrats inertes qui absorbent l'humidité et empêchent donc les spores d'AMF de germer. Des essais pourront également être mis en place pour obtenir des spores matures, plus résistantes, en pratiquant la taille de la plante-hôte et en augmentant le temps dédié à la sporulation avant récolte du milieu de culture. Il serait intéressant de déterminer avec précision le moment optimal de récolte des spores, pour qu'elles soient viables, nombreuses et matures.

Selon Paulitz y Linderman, 1991, l'application d'inoculum de MA est recommandée en association avec d'autres biofertilisants comme les genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Burkholderia*, car elle permet d'obtenir des rendements supérieurs à ceux obtenus avec l'application seule d'AMF. C'est une conséquence positive des interactions

biológicas entre géneros de la rizosfera de las plantas micorrizadas. Las micorrizas tienen más efecto cuando se combinan con materia orgánica, debido al impacto de esta última sobre las características bio físicas del suelo que combinado con el efecto positivo de las micorrizas sobre la absorción de nutrientes, se manifiesta por un mayor desarrollo de las plantas (FAO, 2005). En efecto, se ha observado una mejor esporulación de AMF en los restos de insectos, semillas muertas y otros residuos orgánicos, interpretado como un mecanismo que favorece la supervivencia de esporas expuestas a condiciones adversas (Rabatin y Rhodes, 1982)

BIBLIOGRAFIA

- Abbott L.K., Robson A.D., Gazey C. (1992). Selection of inoculant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In Norris J.R., Read D.J., Varma A.K. (Eds.). *Methods in Microbiology*, 24.
- Almanza R.P. & al., (2000). Metodologías básicas para el trabajo con Micorriza Arbuscular y Hongos formadores de Micorriza Arbuscular. Cochabamba.
- Angulo V.W. (1997). Relación simbiótica entre hongos MA-Baccharis incarum y su papel en la recuperación de los suelos del altiplano boliviano, La Paz, pp.20-38
- Azcon-Aguilar C., Bago B., Barea J.M., Hock B & Varma A. (1998). Saprophytic growth of arbuscular-mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza: structure, Function, Molecular biology and Biotechnology*, pp.391-408.
- Azcon-Aguilar C., Garcia-Garcia F. & Barea J.M. (1991). Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorrizas vesículo-arbusculares. Fijación y movilización biológica de nutrientes. *Nuevas tendencias*, 2, pp. 129-147. Eds. J. Olivares & J.M. Barea, Madrid, CSIC.
- Bago B. & Becard G. (2002). Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhizal Technol Agr Genes Bioproducts*, pp. 33-48.
- Balestrini R. & Lanfranco L. (2006). Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 16, pp. 509-524.
- Baltruschat H. & Dehne, H.W. (1988). The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in agro-ecosystems. Influence of nitrogen fertilizer and green manure in continuous monoculture and in crop rotation on the inoculum potential of winter wheat. *Plant Soil*, 107, pp.279-284.
- Barea J.M., Escudero J.L. & Azcon-Aguilar C. (1980). Effects of introduced and indigenous VA mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate-fixing soils as affected by P fertilizers. *Plant and Soil*, 54 (2), pp.283-296.
- Brundrett M., Bougler N., Dell B., Grove T. & Malajczuk N. (1996). *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia, 344 pp.
- Chaurasia B. & Khare P.K. (2006). *Hordeum vulgare*: a suitable host for mass production of mycorrhizal fungi. *Applied ecology and environmental research*, 4(1), pp.45-53. <http://www.ecology.kee.hu>, Penkala Bt., Budapest, Hungary.
- Contreras D.J. (1987). Técnicas del cultivo de tembe para la producción de palmito. Ed. A. Castellón. Santa Cruz, Bolivia, pp.1-27.
- Dalence J.S. (1999). Fuentes de contaminación difusa y grado de contaminación por nitratos en los suelos agrícolas en el abanico de Punata. Tesis Maestría Profesional en « Información de Suelos para el Manejo de los Recursos Naturales », Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba.
- Dodd J.C., Burton C.C., Burns R.G. & Jeffries P. (1987). Phosphatase activity associated with the roots and the rhizosphere of plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*, 107, pp. 163-172.

- Elmes R.P., Hepper C.M., Hayman D.S. & al. (1984). The use of vesicular - arbuscular mycorrhiza roots by the nutrient film technique as inoculum for field sites. *Ann. Appl. Biol*, 104, pp. 437 - 441.
- FAO (2005). Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics. <http://faostat.fao.org/faostat/collections>.
- Frank A.B. (1885). Über die auf wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber. Deut. Bot. Ges.*, 3, 128.
- Gedermann J.W., Nicolson T.H. (1969). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Brit Mycol Soc*, 46, pp. 235-244.
- Gederman J.W. (1968). Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Phytopathology*, 6, pp.394-418.
- Gonzales-Guerrero M., Benabdellah K., Ferrol N. & Azcon-Aguilar C. (2009). Mechanisms underlying heavy metal tolerance in arbuscular mycorrhiza. In *Mycorrhizas: Functional Processes and Ecological Impact*, pp.107-121.
- Govindarajulu M., Pfeffer P.E., Jin H.R., Abubaker J., Douds D.D., Allen J.W., Bucking H., Lammers P.J. & Shachar-Hill Y. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 435 (7043), pp.819-823.
- Gryndler M., Lestina J., Moravec V., Prikyl Z. & Lipavsky J. (1990). Colonization of maize roots by VAM under conditions of long-term fertilization of varying intensities. *Agric. Ecos. Environ*, 29, pp.183-186.
- Guerrero E., Rivillas C. & Rivera E. (1996). Perspectivas de manejo de la micorriza arbuscular en ecosistemas tropicales. *Recurso Biológico del suelo*. Fondo FEN, Colombia, Bogotá, pp.181-201.
- Harley J.L., Smith S.E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*, 483 p.
- Hung L.L & Sylvia D.M. (1988). Production of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus Inoculum in Aeroponic Culture. *Applied and environmental Microbiology*, 54(2), pp.353-357.
- Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K. & Barea J.M. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility: *Biol fertile Soils*, 37 (1), pp. 1-16.
- Joner E.J. & Johansen A. (2000). Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 104, pp. 81-86.
- Karagiannidis N. & Hadjisavva-Zinoviadi S. (1998). The mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* enhances growth, yield and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils. *Nutrient cycling in Agroecosystems*, 52, pp.1-7.
- Liu A., Hamel C., Hamilton R.I. & Smith, D.L. (2000). Mycorrhizae formation and nutrient uptake of new corn hybrids with extreme canopy and leaf architecture as influenced by soil N and P levels. *Plant Soil*, 221, pp.157-166.
- Lopez C. (2005). Identificación de micorrizas arbusculares en cultivos de mora (*Rubus Glaucus*), en diez localidades de seis municipios del departamento de Boyacá. *Mémoire de licence en Biologie*, Université Pédagogique et Technologique, Colombie.
- Lum M.R. & Hirsh A.M. (2003). Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *J Plant Growth Regul*, 21, pp. 368-382.
- Morton J.B., Bentivenga S.P. & Wheeler W.W. (1993). Germplasm in the international collection of arbuscular and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and Storage. *Mycotaxon*, 48, pp. 491-528.
- Palenzuela J., Barea J. & al. (2002). Effects of mycorrhizal inoculation of shrubs from Mediterranean ecosystems and composted residue application on transplant performance and mycorrhizal developments in a desertified soil. *Biology and fertility of Soils*, 36, pp.170-175.
- Parniske M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6, pp.763-775.
- Phillips J.M. & Hayman D.S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), pp.158-161.

- Pozo M.J. & Azcon-Aguilar C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10 (4), pp. 859-861.
- Rabatin S.C. & Rhodes L.H. (1982). *Acaulospora bireticulata* inside oribatid mites. *Mycologia*, 74, pp. 859-861.
- Redecker D., Morton J.B. & Bruns T.D. (2000). Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol Phylogenet Evol*, 14 (2), pp. 276-284.
- Rillig M.C. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can. J. Soil Sci.*, 84, pp. 355-363.
- Rillig M.C. (2004). Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology letters*, 7 (8), pp.740-754.
- Ruiz-Lozano J.M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13 (6), pp. 309-317.
- Schussler A., Gehrig H., Schwarzott D. & Walker C. (2001). Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycol Res*, 105, pp.5-15.
- Sieverding E. (1984). VA mycorrhiza: management: a new, low cost, biological technology for crop and pasture production on infertile soils.
- Sieverding E. (1991). Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, Federal Republic of Germany, 371 p.
- Smith S.L. & Read D. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*, 2^a edición. Capítulo 1. Academic Press, San Diego, CA, EEUU. pp 1-21.
- Smith S.E. & Read D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd ed. New York: Elsevier, Academic Press.
- Van der Heijden M.G.A. (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi as support systems for seedling establishment in grassland. *Ecology letters*, 7 (4), pp.293-303.
- 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, 396, pp.69-72.
- Vestberg M., Estau V. (1994). Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. In: Gianinazzi S., Schuepp H., eds. *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Basel: Birkhauser Verlag, pp.217-226.

SITIOGRAPHIE

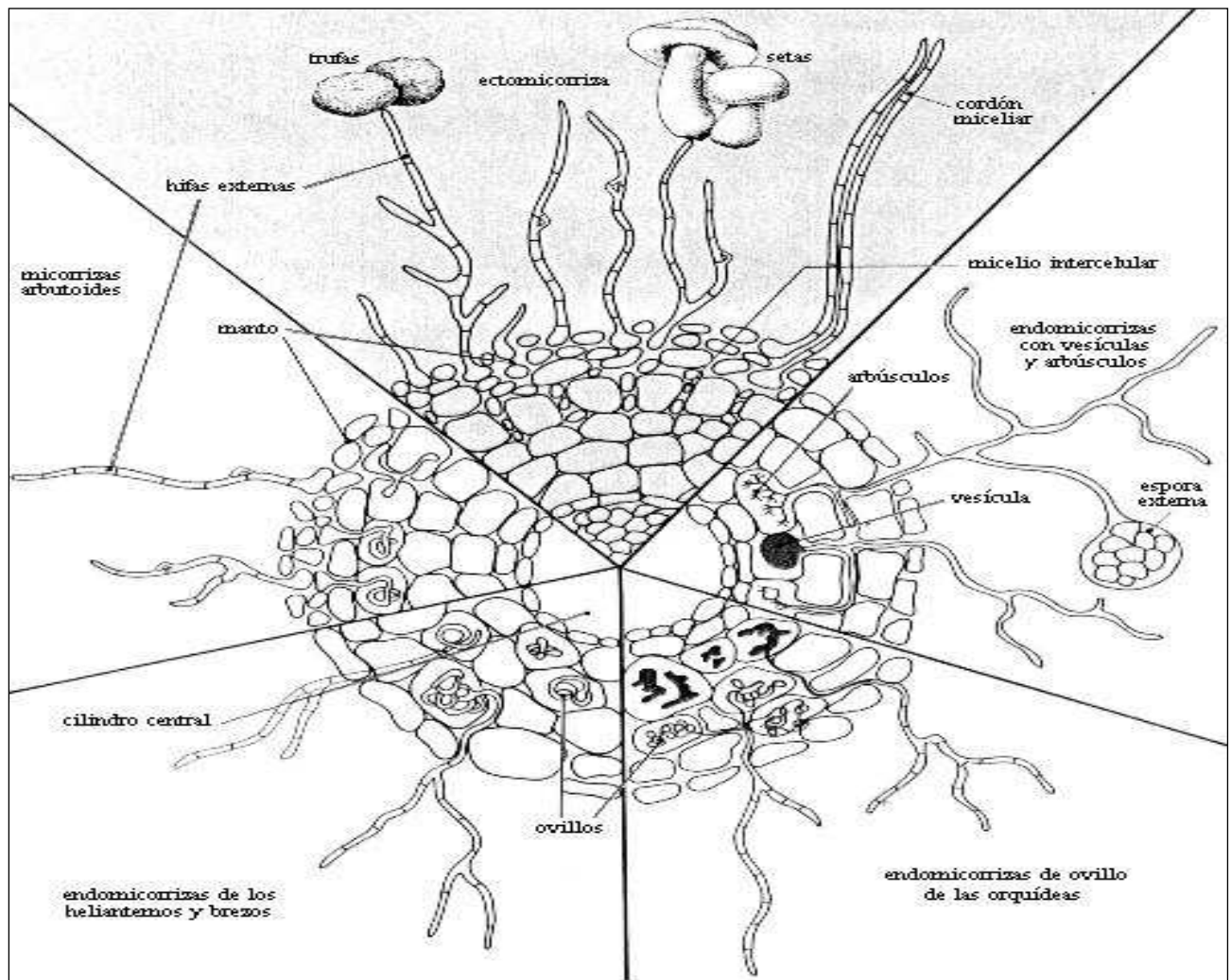
France Telecom España, S.A. Unipersonal (1998). www.rincondelvago.com. Consulté le 05/02/13.

ANNEXES

ANNEXE I : La consommation de fertilisants chimiques en Amérique Latine durant la période 1996-2002. Le tableau provient du rapport Acta Nova, vol. 3, N°4, 2007

País	1996	2002
	--- t ---	--- t ---
Argentina	855.200	739.526
Brasil	5.020.000	7.682.000
Bolivia	6.769	13.741
Chile	423.000	455.000
Colombia	485.000	691.500
México	1.636.400	1.711.900
Perú	185.300	274.007
Ecuador	118.000	229.522
Venezuela	305.000	300.000

ANNEXE II : Présentation des différentes classes de mycorhizes (Mark Brundett, 1999)




ANNEXE III : Analyses de sol de l'argile et du sable, deux substrats provenant du département d'Oruro, Bolivie.

Claudia Celeste

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMON
 FAC. de CS. AGRICOLAS y PECUARIAS
 "Martín Cárdenas"
 Dpto. de Ingeniería Agrícola

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUAS

ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS

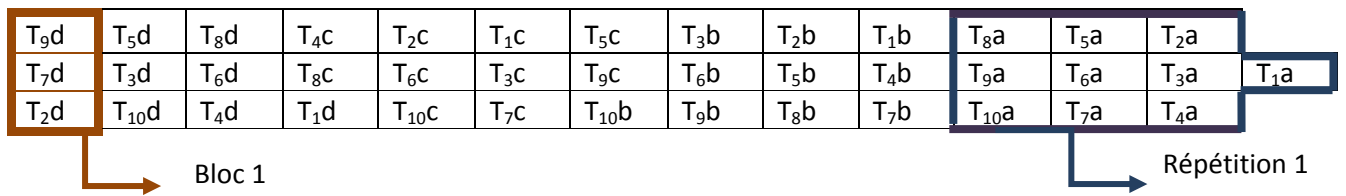


Interesado: FUNDACION PROINPA
 Proyecto: "Evaluación del efecto de Fertilizantes sintéticos y Biofertilizantes en la Microfauna y Microflora del suelo en cultivos de Lechuga y Rábano"
 Responsable Tesis: Claudia Yucra C.
 Procedencia: El Paso - Tiquipaya.

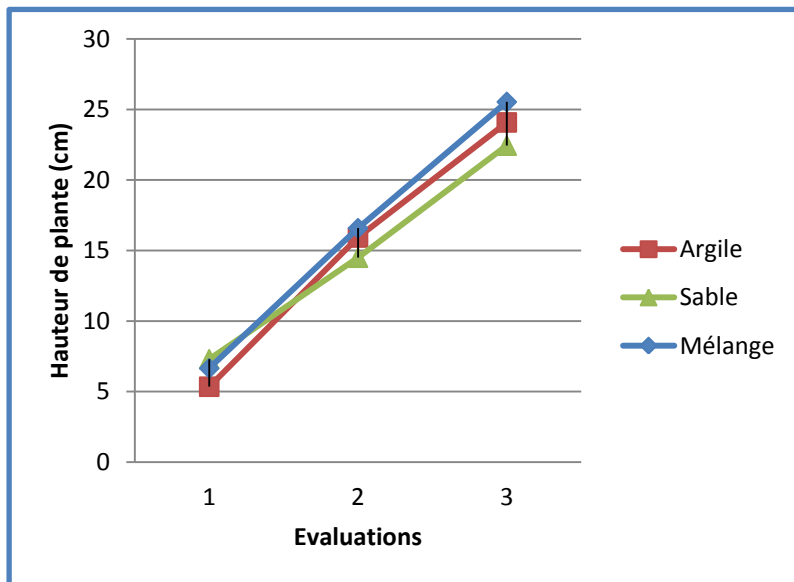
N° Lab.	Identific. No.	Prof. cm	pH (1)	Conduct. Eléctrica (1) <i>mmhos/cm</i>	Cationes Intercambiables me/100g				TBI <i>me/100g</i>	CIC <i>me/100g</i>	CO %	MO %	Nitrógeno total %	Fósforo (2) disponible ppm
					Ca++	Mg ++	Na +	Potasio						
289	suelo madre	maceta	7,5	0,706					8,9	0,47	0,89	0,053	6,9	
290	T0-L									0,66	1,25		12,0	

Traitement	pH	N	MO%	P	CIC	CE
Sable	7.1	0.023	0.65	8	5.5	0.65

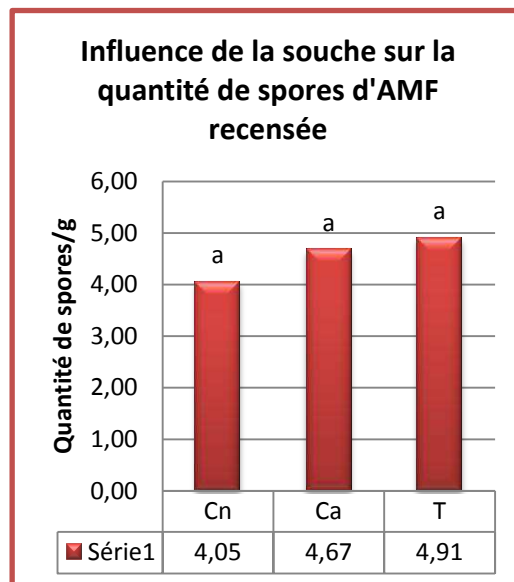
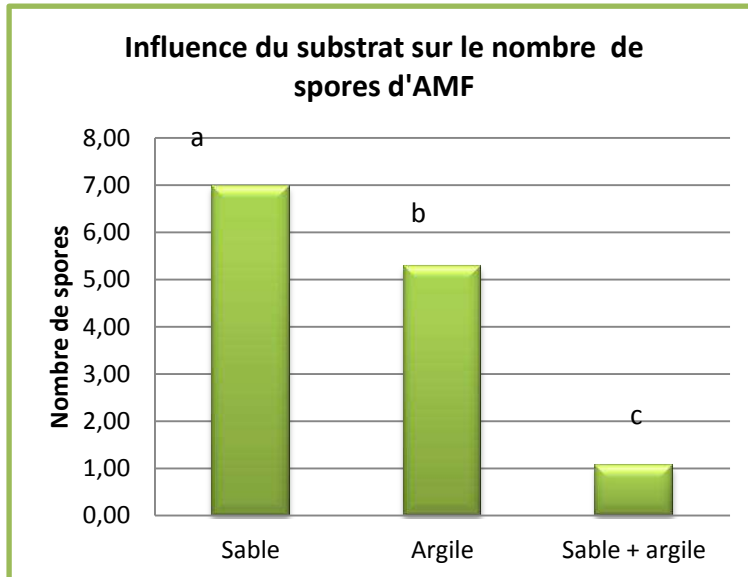
ANNEXE IV : Design expérimental de l'expérience 2, méthode des blocs incomplets



ANNEXE V : Influence du substrat sur l'évolution au cours du temps de la hauteur de la plante-hôte



ANNEXE VI : Résultats de l'expérience 1bis, influence du substrat et de la souche sur le nombre de spores d'AMF recensés.





Diplôme: Ingénieur AgrocampusOuest, Institut National d'Horticulture et du Paysage **spécialité** Gestion Durable du Végétal en Horticulture et Aménagement Paysager

Enseignant référent : Patrice Cannavo

Auteur : Laure PRIOU

Date de naissance: 06/07/1988

Nb pages: 28 Annexes: 6

Année de soutenance: 2013

Organisme d'accueil : Fondation PROINPA

Adresse: Centro El Paso Av.Meneces Km4 Zona El Paso
BOLIVIE

Maître de stage : Noël Ortuño

Titre français : Multiplication des mycorhizes arbusculaires en milieu liquide et solide afin d'améliorer la formulation de biofertilisants

Titre anglais : Increase of mycorhizes arbusculaires in liquid and solid middle to improve the formulation of organic fertilizers

Résumé: Avec l'augmentation de l'usage des fertilisants chimiques dans les pays d'Amérique latine et les effets secondaires entraînés, la recherche en microbiologie se développe. Ainsi, la fondation PROINPA, dont le siège est à Cochabamba (Bolivie), est productrice de biofertilisants, à base de mycorhizes arbusculaires (MA). L'objectif de ce travail est de multiplier les MA en minimisant la quantité de substrat utilisé. 2 techniques sont testées ici, la multiplication de MA en substrat à base d'argile et/ou de sable et en culture hydroponique. La plante-hôte, *hordeum vulgare*, est stressée par la faible profondeur de substrat ou par le manque de nutriments dans la solution afin de provoquer la sporulation: sont testées les solutions S100, S50 et T respectivement à 100%, 50% et 0% de solution nutritive. Les variables évaluées sont des données agronomiques telles pourcentage de germination, hauteur de plante et poids sec de racines, et des données sur l'établissement ou non de la symbiose, avec l'étude de la fréquence de colonisation et du nombre de spores recensé par échantillon. Les résultats en milieu solide ont donné des taux de multiplication négatifs, ce qui signifie que les spores inoculées ont germé mais les conditions de l'expérience n'ont pas été adéquates à l'établissement de la symbiose. Le sable pourrait donner de meilleurs résultats en terme de développement racinaire et donc de colonisation, mais en testant des profondeurs plus importantes. En revanche, les taux de multiplication en hydroponie sont très satisfaisants (jusqu'à 1271%) surtout dans S100. Il reste à améliorer le protocole de formulation des MA et étudier l'adaptation du produit en conditions réelles de culture.

Mots-clés: Biofertilisant, mycorhize, *hordeum vulgare*, multiplication, symbiose, hydroponie

Abstract: With the increased use of chemical fertilizers in Latin America and the side effects trained, microbiology research develops. Thus, PROINPA foundation headquartered in Cochabamba (Bolivia), is producing organic fertilizers, based on arbuscular mycorrhiza (AM). The objective of this work is to increase the AM minimizing the amount of substrate used. Two techniques are tested here, the multiplication of AM substrate base of clay and / or sand and hydroponics culture. The host, *hordeum vulgare*, is stressed by the shallow depth of the substrate or by the lack of nutrients in the solution to cause sporulation: S100, S50 and T, respectively 100%, 50% and 0% of nutrient solution are tested. Evaluated variables are agronomic data such germination, plant height and root dry weight, and data on the successful establishment of symbiosis or not, with the study of colonization frequency and spores number identified by sample. Results in solid medium gave negative rates of multiplication, which means that the inoculated spores germinated but the experimental conditions were not suitable for the establishment of symbiosis. The sand could give better results in terms of root development and thus colonization but by testing greater depths. In contrast, the rate of increase in hydroponics are very satisfactory (up to 1271%), especially in S100. It remains to improve the protocol formulation AM and study the adaptation of the product under actual conditions of culture.

Key words: organic fertilizers, mycorrhiza, *hordeum vulgare*, increase, symbiosis, hydroponic

