

Méthode simple pour évaluer le potentiel endomycorhizogène d'un inoculum

Catherine Kuszala¹ et Silvio Gianinazzi

Résumé : *Les champignons mycorhizogènes à arbuscules (MA), forment une association mutualiste avec la plupart des plantes terrestres. Ils favorisent leur croissance et leur résistance à de nombreux stress biotiques et abiotiques. Leur utilisation en agriculture permet de limiter l'apport d'intrants chimiques. Pour gérer leur population il faut connaître leur abondance dans le sol, et donc évaluer le potentiel mycorhizogène du sol. Pour cela on utilise un test qui mesure le pouvoir de colonisation racinaire de ces symbiotes au niveau d'une plante piège. La méthode du « Most Probable Number » (MPN) est la plus utilisée. L'objectif de cette étude a été de comparer deux techniques d'évaluation du MPN : une technique volumétrique basée sur des dilutions successives et une technique par pesée. Dans ce dernier cas l'inoculum est directement ajouté sur la racine de la plante, ce qui réduit considérablement sa manipulation. Les résultats sont basés sur la détermination de la présence ou de l'absence de mycorhization dans les racines des plantes pièges, dans des séries de dilution. L'étude statistique est faite en utilisant le tableau MPN et le test Khideux. Nos résultats montrent que, pour les dilutions utilisées et à raison de cinq répétitions par dilution, les 2 méthodes donnent avec le tableau MPN des valeurs de concentration en propagules qui ne diffèrent pas significativement. En revanche, le test Khideux effectué avec les plantes met en évidence une différence significative entre les deux méthodes. Les valeurs obtenues par la méthode des pesées sont significativement supérieures. On privilégiera donc la méthode par pesée. En conclusion, lorsque la granulométrie de l'inoculum le permet, la méthode des pesées donne des valeurs de MPN supérieures avec la garantie qu'il n'a subi aucun traitement susceptible d'avoir modifié son potentiel mycorhizogène ce qui augmente la fiabilité des résultats.*

Mots clés : champignons endomycorhizogènes, MPN, test Khideux

Introduction

Les relations entre les micro-organismes du sol et le fonctionnement des écosystèmes sont depuis quelques années parmi les principaux objets de recherche en écologie. 80% des familles de plantes forment une symbiose au niveau de leurs racines avec des champignons du sol : les Gloméromycètes (**encadrés 1 et 2**). Cette symbiose appelée mycorhizienne à arbuscules (MA) exerce des fonctions écologiques essentielles pour le fonctionnement des écosystèmes terrestres des plantes. La formation des MA modifie les relations plante/sol. Elle est connue pour jouer un rôle (au niveau des plantes) de biofertilisant, bioprotecteur et biorégulateur (Gianinazzi S. et Wipf D. 2010). L'avantage principal est que ces champignons forment un lien critique entre des racines et le sol. En conséquence, les plantes mycorhizées sont souvent plus compétitives et plus capables de tolérer des stress environnementaux que les

¹ UMR1088 - Plante microbe environnement PME - INRA - F- 21065 Dijon

☎ 03 80 69 34 48 ✉ Catherine.Kuszala@dijon.inra.fr

plantes non mycorhizées. Les avantages des plantes pour ces symbioses mycorhiziennes peuvent être caractérisés sur le plan agronomique par une croissance accrue (**photos 1**) et un meilleur rendement. Les perturbations de sol comme le labour, le déplacement de couche de terre arable, certaines rotations des cultures, l'utilisation d'engrais et de pesticide peut abaisser le potentiel mycorhizogène dans un système agricole. Ce problème peut être renforcé par des conditions climatiques défavorables.

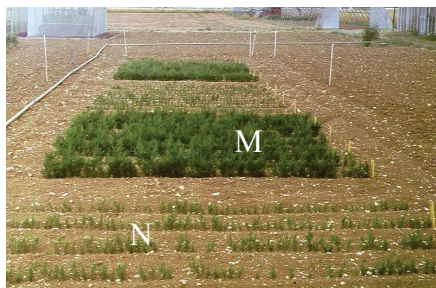


Photo 1-a : effet mycorhizien aux champs
Mycorhizé (M) et non mycorhizé (N)

Photo 1-b : poireau mycorhizé (A) et non mycorhizé (B)



Dans un contexte de réduction d'intrant chimique en agriculture (plan Ecophyto 2018) et de développement d'une agriculture écologiquement intensive (AEI), une utilisation raisonnée des symbiotes MA paraît incontournable. En effet pour maintenir une fertilité optimale d'un sol nous devons déterminer les niveaux souhaitables de propagules MA viables (des spores libres, des spores prises au piège dans des débris, des spores dans les tissus de racine, du mycelium, des fragments de racine) qui s'y trouvent. Et lorsque le potentiel est bas ou inefficace, il est utile de définir des stratégies d'inoculation à développer (Gianinazzi *et al.*, 1989). Dans des études écologiques il est donc important de déterminer le potentiel mycorhizogène d'un sol car il traduit la richesse de ce sol en propagules aptes à générer la mycorhization. Il peut être évalué quantitativement en déterminant le taux de colonisation d'un hôte sensible sous un jeu standard de conditions. Pour déterminer ce potentiel, la méthode doit être fiable.

Le potentiel de ces champignons peut être évalué par la méthode MPN du "nombre le plus probable" (most-probable-number) ou par la méthode de dilution (Alexander, 1965 ; Porter, 1979; Wilson and Trinick, 1982 ; Gianinazzi-Pearson V. *et al.*, 1985), bien que les évaluations obtenues pour le MPN soient très dépendantes des conditions expérimentales utilisées. La méthode consiste à diluer successivement le milieu et cerner ainsi la dilution limite dans laquelle il n'y aura plus de propagule fongique. La technique MPN est basée sur une détermination de la présence ou de l'absence de champignons MA dans les racines de plantes pièges poussant dans des aliquotes individuelles de dilutions successives de sol. C'est une méthode spécifique et fréquemment utilisée. Nous avons conduit cette étude pour

simplifier cette méthode en supprimant les dilutions successives dans le sol. Elle compare les valeurs expérimentales MPN entre les méthodes avec ou sans dilutions successives.

Encadré 1

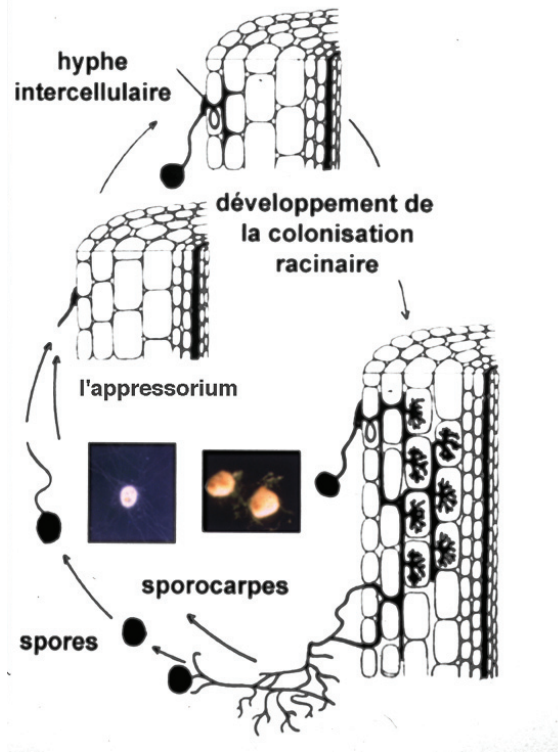
Les champignons mycorrhizogènes à arbuscules (MA) sont des biotrophes obligatoires et ne peuvent pas achever leur cycle de vie sans coloniser des racines.

Quand les conditions de sol sont favorables, les spores asexuées germent et forment des hyphes. Ces hyphes peuvent pénétrer les racines, par formation d'appressoria et créer l'association mycorrhizienne. Des arbuscules sont formés par ces champignons à l'intérieur des cellules dans les racines. Ils constituent les endroits où la plante et le champignon échangent des substances nutritives l'une avec l'autre. D'autres structures que des spores asexuées produites par certains champignons MA incluent des vésicules et des cellules auxiliaires. Les vésicules sont des structures qui se forment d'habitude dans des espaces intercellulaires et peuvent aussi servir de propagules reproductrices pour ces champignons. Des spores asexuées reproductrices peuvent être formées dans la racine ou plus généralement dans le sol par la différenciation d'hyphes végétatif.

Dans le sol, les champignons MA sont généralement trouvés près de la surfaces des racines, dans les racines en vie, dans des racines mortes, sur des particules de sol, ou parmi des agrégats de toute taille du sol. Ces champignons sont caractérisés par des hyphes très minces qui forment des réseaux (mycelium) entre particules de sol voisines, entre racines et particules de sol, entre racines sur la même plante, entre les racines de plantes différentes et dans les racines elles-mêmes. Les champignons colonisant les racines à l'aide de leurs hyphes extra radiculaires, étendent le volume de sol qui peut ainsi être exploré par la plante pour des substances nutritives et l'eau. Par ce mécanisme, ces champignons MA augmentent la superficie effective d'absorption de la plante. Cette association permet le mouvement du carbone produit par les plantes vers le champignon, et celui de l'eau et des substances nutritives fongiques acquises vers la plante. Donc les champignons MA sont particulièrement importants car ils améliorent la capacité des plantes à capter et à assimiler les éléments minéraux comme le phosphore et les oligo-éléments généralement présents en quantités limitées et peu mobiles car fortement liés ou séquestrés dans les particules de sol. D'autres bénéfiques à attribuer aux champignons MA sont l'augmentation de la tolérance à la sécheresse, aux sels, aux métaux lourds et aux agents pathogènes ainsi qu'une augmentation de la stabilité du sol. La capacité de jeunes plants pour s'associer avec des réseaux mycéliens intacts dans le sol peut donc être très avantageuse pour la récolte. Or la viabilité des hyphes peut baisser fortement en l'absence de plantes hôtes. La survie des champignons MA a été étudiée dans différentes conditions. À titre d'exemple, la survie de certains de ces champignons *ex-planta* dans des fractions de sol humide tamisé, donne, en conditions contrôlées, un aperçu de leur capacité à survivre dans des conditions environnementales hostiles (Kuszala *et al.*, 2001). À cela s'ajoute le fait que les spores de certains de ces champignons ont une période de dormance qui peut s'étendre de quelques semaines à plusieurs mois selon l'espèce ou l'isolat (Tommerup, 1983).

Encadré 2

Cycle biologique des champignons endomycorhizogènes à arbuscules



© Inra/Cordier C. 1997)

1. Matériels et méthodes

1.1 Matériels

Substrat de Culture : Sol Epoisses (gamma irradié) - pH (H₂O) 8, 24 ppm Olsen P ou mélange (V/V) Epoisses et sable B3 (l'origine LVM-Mme Agsorbr Clay). Le sable et du gravier sont stérilisés deux heures à 180°C avant leur utilisation.

Mélangeur : Turbula Numéro 880763 T2C (220 V, 50 Hz, 180 W), balance, éprouvettes, verrerie, multipots en plastique de 75 ml (contenant une couche de gravier stérile).

Plantes hôtes : jeunes plants pré-germés stériles de trèfle (*Trifolium repens*) ou poireau (*Allium porrum*).

Source des inocula : origine commerciale

1.2. Méthode MPN

1.2.a Méthodes volumétriques utilisant des dilutions successives de raison 10

La mesure du MPN de propagules infectieuses dans l'inoculum a été faite par dilutions successives de raison 10. Elle est réalisée par quatre dilutions successives au 1/10 (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000). Les dilutions dans du sol Epoisses ou du sol Epoisses/sable (V/V)

ont été réalisées avec le mélangeur Turbula. Chaque dilution a été divisée en cinq répétitions de 50 ml de sol par pot et un jeune plant de trèfle ou de poireau a été planté dans chaque pot.

1.2.b Méthode directe par pesée

Sol Epoisses ou mélange Epoisses/sable (V/V) et inoculum ont été pesés séparément avec une balance pour obtenir 50g final par pot pour des concentrations en inoculum 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000. Le sol ou le mélange pesé ont été mis dans le pot. Un cratère a été formé et un jeune plant de trèfle ou de poireau a été planté dans chaque pot. L'inoculum a été placé sur la racine de jeune plant pré germé au moment de la transplantation puis la racine a été couverte de sol stérile ou de mélange de sol. Pour chaque concentration en inoculum Nous avons fait cinq répétitions.

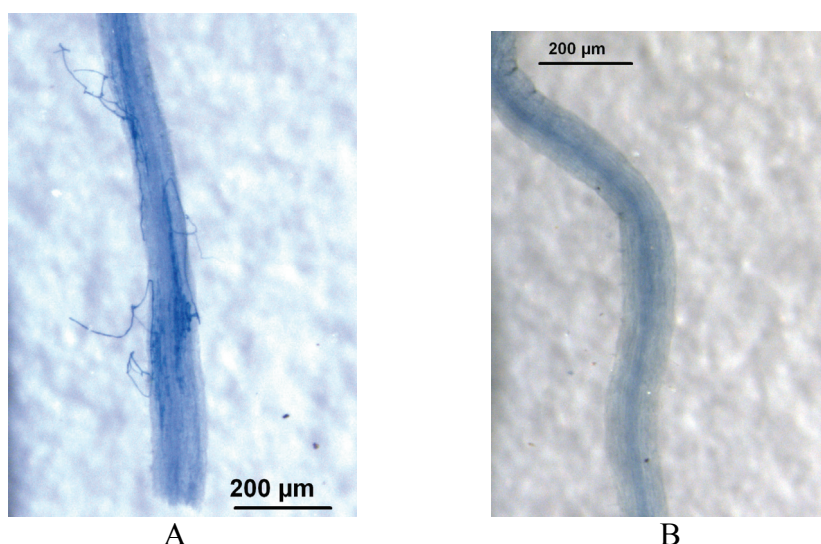
Nous avons mené en parallèle des expériences avec des plantes témoins non inoculées.

1.3 Conditions de culture

Les multi pots ont été arrosés et placés dans une chambre climatisée ou dans la serre. Pour toutes les expériences, les plantes ont été arrosées quotidiennement avec l'eau osmosée.

1.4 Evaluation des expériences

Après 5 semaines, le système racinaire entier de chaque plante a été récupéré, lavé puis coloré selon Phillips et Hayman (1970) pour révéler la présence des champignons mycorhizogènes. Les racines lavées ont été traitées dans une solution de KOH à 10 % à 90°C pendant 40 minutes, puis colorées au bleu de trypan à 0,05 % de trypan dans du lactoglycerol et eau pendant 15 minutes à 90°C. La notation, selon qu'il y a ou non infection mycorhizienne visible (**photos 2**) s'effectue par l'observation à la loupe des systèmes racinaires entiers. Le nombre de propagules par kg ou par litre est déduit de cette lecture par utilisation des tables d'Alexander (1965, table 100-1) et la fourchette statistique de cette estimation est déduite des tables d'Alexander (1965, table 100-2 ; Cochran, 1950). Pour comparer les deux méthodes nous avons utilisé le test du Khideux.



Photos 2 : *fragment de racine mycorhizée (A) et non mycorhizée (B)*

2. Résultats et discussion

Aucune mycorhization n'est constatée dans les pots témoins.

Le **tableau 1** montre les résultats de la colonisation des plantes pièges. Il donne la proportion de plantes mycorhizées par rapport aux plantes inoculées pour chaque dilution et les MPN qui en résultent. **La figure 1** présente les résultats des MPN de propagules infectieux selon la table d'Alexander avec des limites de confiance de 95 % (Cochran, 1950). Nous n'avons observé aucune différence entre les deux méthodes ; cependant, pour 5 inocula sur 7 les moyennes MPN de la méthode des pesées sont supérieures à celles de la méthode volumétrique. Pour vérifier si cette différence est significative nous avons utilisé le test du Khideux. Effectué sur les nombres de plantes mycorhizées ou non pour les dilutions 10^{-3} , nous obtenons une valeur de 3,75. Pour le seuil de tolérance de 5 % la valeur du tableau est de 3,841 et pour celui de 10 % il est de 2,706. Comme la valeur calculée 3,75 est supérieure à 2,706 et inférieure à 3,841 les deux méthodes diffèrent au risque 10 %. Le test du Khideux effectué sur les nombres de plantes mycorhizées ou non pour la somme des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} (hormis inoculum 1), nous donne une valeur de 3,916. Cette valeur étant supérieure au seuil critique 3,841 les deux méthodes diffèrent avec un risque de 5%. Donc l'hypothèse selon laquelle la méthode des pesées donne des valeurs supérieures est significative.

Contrairement à la méthode des pesées, l'application de la méthode par dilutions successives implique une parfaite réalisation des dilutions dans un milieu stérile comparable en pH, humidité, structure et granulométrie à l'inoculum. En outre les dilutions doivent être suffisamment mélangées pour que les propagules soient aléatoirement distribués, sans les léser ni les oxyder. D'autre part les propagules peuvent être adsorbés aléatoirement sur la verrerie et les particules du sol diluant. Ou encore les propagules agglomérés ou des spores groupées peuvent se désagréger au cours de dilutions successives. Avec cette méthode le contact de l'inoculum avec la racine n'est pas immédiat contrairement à la méthode des pesées. Cependant, cette dernière n'est pas applicable lorsque la granulométrie de l'inoculum est trop grosse ou trop hétérogène ; à l'inverse lorsqu'elle est fine elle peut devenir très précise.

En conclusion la méthode des pesées donne des valeurs de MPN supérieures, elle évite de perturber l'inoculum, elle est facile et elle est économe en temps et en matériel.

| Inocula | Méthodes | concentration des échantillons | | | | valeurs reportées | MPN X10 ² | MPN estimé |
|---------|----------|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|----------------------|------------|
| | | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | | | |
| 1 | V/V | 5/5 | 5/5 | 2/5 | 1/5 | 5-2-1 | 7.0 | 14 000 |
| | P | 5/5 | 5/5 | 5/5 | nd ^a | 5-5-5 | >23.0 | > 46 000 |
| 2 | V/V | 5/5 | 5/5 | 2/5 | 0/5 | 5-2-0 | 4.9 | 9 800 |
| | P | 5/5 | 5/5 | 3/5 | 1/5 | 5-3-1 | 11.0 | 22 000 |
| 3 | V/V | 5/5 | 5/5 | 1/5 | 0/5 | 5-1-0 | 3.5 | 6 600 |
| | P | 5/5 | 5/5 | 3/5 | 1/5 | 5-3-1 | 11.0 | 22 000 |
| 4 | V/V | 5/5 | 5/5 | 4/5 | 0/5 | 5-4-0 | 13.0 | 26 000 |
| | P | 5/5 | 5/5 | 4/5 | 0/5 | 5-4-0 | 13.0 | 26 000 |
| 5 | V/V | 5/5 | 5/5 | 1/5 | 0/5 | 5-1-0 | 3.5 | 6 600 |
| | P | 5/5 | 5/5 | 2/5 | 0/5 | 5-2-0 | 4.9 | 9 800 |
| 6 | V/V | 5/5 | 3/5 | 1/5 | 0/5 | 3-1-0 | 1.1 | 2 200 |
| | P | 5/5 | 4/5 | 1/5 | 0/5 | 4-1-0 | 1.7 | 3 400 |
| 7 | V/V | 5/5 | 5/5 | 0/5 | 0/5 | 5-0-0 | 2.4 | 4 800 |
| | P | 5/5 | 4/5 | 1/5 | 0/5 | 4-1-0 | 1.7 | 3 400 |

Tableau 1. Comparaison des résultats de la méthode volumétrique par dilutions successives (V/V) avec ceux de la méthode des pesées (P) pour 7 inocula. Les MPN (most probable numbers) des propagules viables sont basés sur la présence ou l'absence de la colonisation des plantes pièges.

Rapport : nombre de plantes mycorhizées / nombre de plantes inoculées.

MPN : nombre de propagules par kg ou par litre d'inoculum.

^a pas faisable avec cet inoculum

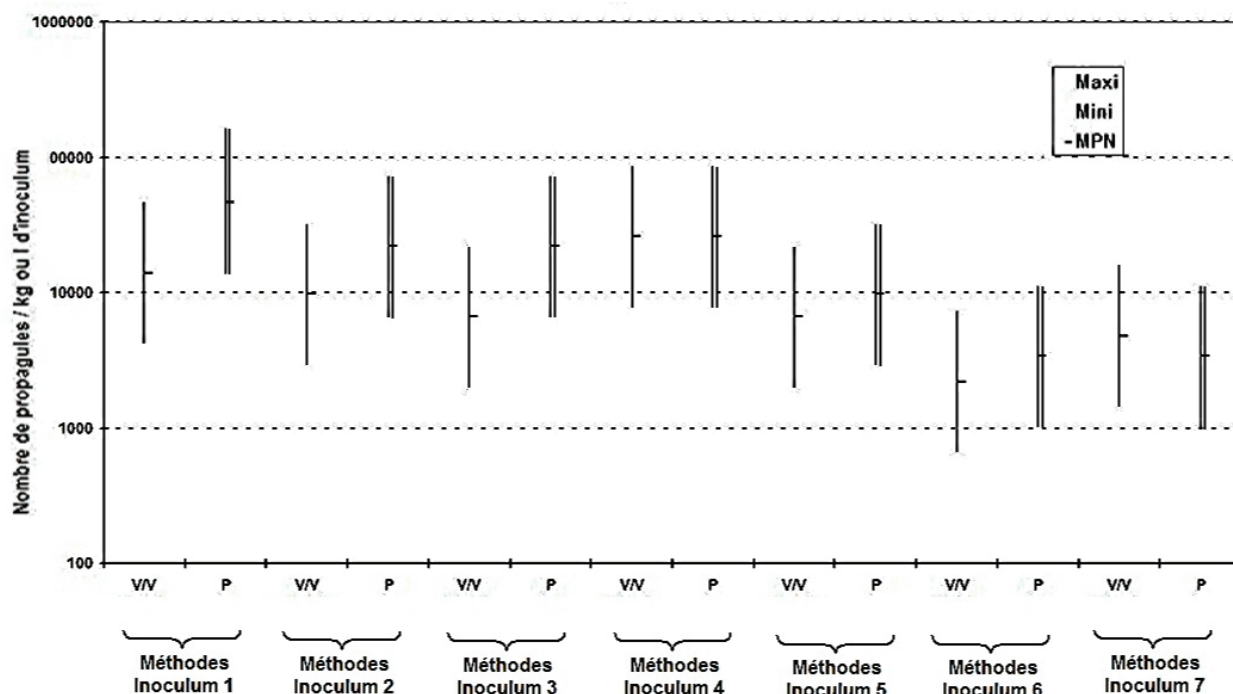


Figure 1 : comparaison du nombre de propagules selon la méthode utilisée : volumétrique (V/V) ou pesée (P) dans sept inocula. Résultat des MPN avec des limites de confiance de 95% (Cochran)

Bibliographie

- Alexander M. (1965) Most probable number method for microbial populations. *In* Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Edited by C. A. Black. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. pp. 1467-1472.
- Cochran, William G. (1950) Estimation of bacterial densities by means of the “most probable number”. *Biometrics* 6: 105-116.
- Cordier C. 1997 Bases cellulaires et moléculaires du contrôle biologique de *Phytophthora sp.* Au niveau des racines, par le champignon endomycorhizogène *Glomus mosseae*. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, Dijon, F.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. and Trouvelot A. (1985) Evaluation of the infectivity and effectiveness of indigenous vesicular-arbuscular fungal populations in some agriculturable soils in Burgundy. *Can. J. Bot.* Vol. 63.
- Gianinazzi S. et Wipf D. (2010) Des champignons au service des plantes. *PHM Revue horticole* Février n°521.
- Gianinazzi S., Trouvelot A. and Gianinazzi-Pearson V. (1989) Conceptual approaches for the rational use of VA endomycorrhizae in agriculture: possibilities and limitations. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 29, 153-161.
- Kuszala C., Gianinazzi S. and Gianinazzi-Pearson V. (2001) Storage conditions for the long-term survival of AM fungal propagules in wet sieved soil fractions. *Symbiosis*, 30, 287-299
- Phillips, J.M. and Hayman D.S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Porter, W.M. (1979) The ‘most probable number’ method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Aust. J. Soil Res.* 17: 515-519.
- Tommerup IC. (1983) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 81: 37-45.
- Wilson J.M. and Trinick M.J. (1982) Factors affecting the estimation of numbers of infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi by the most probable number method. *Aust. J. Soil Res.*, 21, 73-81.