

## **SOMMAIRE**

1. <u>Introduction</u>	p1
2. <u>Contexte et bibliographie</u>	p2
2.1 La Martinique, contexte géographique du travail	p2
2.2 Culture de l'ananas en Martinique	p2
2.3 Effet des pratiques culturelles	p3
2.4 Règlementation future pour l'utilisation des pesticides/engrais et volonté d'une agriculture raisonnée.	p5
3. <u>Matériel et Méthodes</u>	p7
3.1 Matériel	p7
3.2 Méthodes	p11
4. <u>Résultats</u>	p16
4.1 Mise en place d'un protocole de coloration	p16
4.2 Mycorhization de l'ananas	p16
4.3 Comparaison du niveau de mycorhization de différentes plantes	p17
4.4 Résultats des analyses effectuées par L'université du Louvain	p19
5. <u>Discussion</u>	p20
Bibliographie	p23

## **1. Introduction**

La monoculture intensive pratiquée aux Antilles pour la plupart des cultures a fortement contribué à la baisse de la biodiversité (faune et flore) dans les agrosystèmes. Un déséquilibre dommageable pour l'environnement et les cultures a ainsi été favorisé entre organismes bénéfiques et organismes pathogènes, au profit de ces derniers. Dans un contexte de réglementations très restrictives vis-à-vis des pesticides et une demande sociétale forte et croissante pour une réduction des risques de pollution de l'environnement, la gestion écologique des pathogènes et ravageurs des agrosystèmes tropicaux est devenue un enjeu majeur dans les Antilles françaises.

L'étude que nous avons effectuée s'inscrit sur un projet FEADER (fonds européen pour le développement rural)/ CIOM (conseil interministériel d'outre-mer). Ce projet est porté par le CIRAD (centre international de recherche agronomique pour le développement) qui développe des systèmes de production n'utilisant pas de pesticides. L'objectif est l'intégration de plantes de service en rotation/association dans les systèmes de cultures en Martinique pour la gestion des bioagresseurs et de la fertilité des sols. Ces plantes de service favorisent la diversité de la microflore rhizo-bactérienne et fongique. Un des objectifs est de rendre reproductible au champ les performances qu'induisent des résistances systémiques induites par des bactéries et des champignons. La biodiversité de la microflore bactérienne sera évaluée ainsi que le potentiel de mycorhization des sols. Pour l'étude, cinq sols ont été sélectionnés, ils présentent des conditions agro-pédologiques différentes (de la culture biologique à la culture industrielle classique à différentes localisations et altitudes). On fait l'hypothèse que la diversité des caractéristiques des milieux observés permettra de mieux décrire la biodiversité bactérienne/mycorhizienne endophytique afin de pouvoir la valoriser via l'utilisation de résistances systémiques dans des systèmes de cultures innovants par la suite. Les plantes possèdent un mécanisme naturel de résistance qui s'active lors d'interactions plantes/ (micro)-organismes ce sont des résistances systémiques (SAR ou ISR) (Leboeuf, 2010). Les plantes mycorhizées peuvent exprimer des résistances systémiques induites (Shouteden et al, 2013). Mais également que la présence de mycorhizes peut faciliter l'installation de bactéries endophytes induisant elles aussi des résistances (Mika et al, 2008). Les mesures que nous allons effectuer permettront de vérifier s'il y a une relation entre la présence de ces bactéries et le potentiel de mycorhization des sols. L'objectif de ce stage sera de mesurer le potentiel de mycorhization de différents sols à l'aide d'un test biologique avec une plante piège connue pour être facilement mycorhizable.

La problématique du stage est la suivante: Une plante de service peut-elle augmenter de façon significative le potentiel de mycorhization d'un sol de façon durable. Cette problématique sera testée au sein de cultures d'ananas.

## **2. Contexte et bibliographie de l'étude**

### 2.1. La Martinique, contexte géographique du travail

La Martinique est une île volcanique de l'arc des petites Antilles, située à une altitude de 14° Nord, entre la Dominique et Sainte-Lucie. Elle bénéficie d'un climat tropical humide adouci par une exposition aux vents dominants venant de l'Est : les Alizées (SIDE, 2011). Le Nord montagneux reçoit de grandes quantités de pluie tandis que le Sud est plus sec et moins accidenté. Deux saisons s'y succèdent, une première caractérisée par un climat plus sec et frais : le « Carême » de décembre à mai. Et une seconde qui présente une pluviométrie plus forte et une température moyenne plus élevée: « L'hivernage », s'étendant de juin à novembre.

En fonction des années s'observent des intersaisons plus ou moins marquées. Cette île possède une richesse écologique exceptionnelle avec un taux d'endémicité élevé. Cependant, son territoire insulaire restreint couplé à une forte densité de population augmente la pression exercée par les activités humaines sur l'environnement (SIDE, 2011).

En Martinique, les plantations d'ananas sont concentrées dans le nord-atlantique de l'île, principalement sur des andosols sur pences (Albrecht et al, 1992) et sur andosols sur cendres. Ces sols sont relativement jeunes et riches en minéraux, quoique parfois légèrement déficients en éléments potassium et phosphore. Cependant les apports dans le cadre de l'agriculture classique pour ces derniers éléments sont apportés en quantité couvrant plus que largement les besoins réels de la culture (FRANCOIS, et al, 2005).

### 2.2. Culture de l'ananas en Martinique

#### • L'ananas

L'ananas est une plante qui appartient à la sous-classe des monocotylédones, à la famille des *Broméliacées* et au genre *Ananas*. Originaires d'Amérique du Sud, certaines espèces sont ornementales, d'autres produisent des fruits comestibles. L'espèce *comosus* est celle qui est cultivée pour ses fruits.

La croissance de l'ananas se divise en trois phases :

-Phase 1: La croissance végétative, qui dure de 12 à 18 mois. Elle s'arrête au moment de l'induction florale, provoquée par la diminution de la durée du jour, sur les plants ayant atteint un stade de développement suffisant (entre 12 et 18 mois). En agriculture l'induction est provoquée artificiellement grâce à un apport d'éthylène car cette technique limite le nombre de passages pour récolter les fruits à maturité facilite la gestion des parcelles pratiques (Lebeau et al, 2008).

La fraîcheur des températures participe également à cette induction. Les fleurs s'épanouissent du bas vers le haut de l'inflorescence.

- Phase 2: La maturation du fruit, qui a lieu également du bas vers le haut, mais aussi du cœur vers la périphérie. L'épiderme, vert lorsque le fruit est jeune, se colore de jaune orangé en mûrissant. *Ananas comosus* est autostérile, son fruit est donc parthénocarpique (se développe sans fécondation, donc ne contient pas de graines). De la floraison à maturité du fruit, il s'écoule environ 150 jours.

- Phase 3: La croissance des rejets, qui débute sur les réserves du plantet l'activité résiduelle du plant-mère. Les rejets peuvent conduire à la formation d'un second fruit ou produire des racines s'ils sont détachés.

La culture de l'ananas est favorisée dans les sols légers et poreux, car son système racinaire est très sensible à la compaction des sols même quand il s'agit d'une zone de compaction comme les semelles de labour, de zones argileuses ou d'horizons gravillonnaires peu profonds. De plus les racines de l'ananas sont également très sensibles à l'asphyxie dans les sols peu perméables ou sujets au phénomène d'hydromorphie. Le choix d'un sol pour la culture d'ananas doit s'orienter idéalement sur des sols sablo-argileux à argilo-sableux. Un autre facteur à prendre en compte est l'acidité du sol, dont le pH optimal serait compris entre 4,5 et 5,5 (Arbrofruit, 2007). L'ananas est peu exigeant en eau et tolère assez bien les climats secs. Il peut se cultiver sous des pluviométries allant de 600 à 4000 millimètres par an, mais une bonne pluviosité est indispensable pour de bons rendements (Py et al, 1984).

Sa culture, son histoire en Martinique:

L'ananas a vraisemblablement été introduit en Martinique par les Arawaks, peuple amérindien originaire d'Amazonie. Les colons, qui appréciaient l'ananas, le consommaient frais ou confis. En 1908, la première usine de transformation d'ananas fut ouverte au Gros-Morne ; mais c'est au début des années 1930 que cette production prit son essor avec la création de la société anonyme « Ancienne Compagnie antillaise » et l'apparition d'exploitations de taille moyenne. En 1935, l'ananas couvrait 135 hectares, 250 hectares en 1937, puis 300 hectares en 1940. Depuis les années 2000, la filière ananas connaît un certain déclin, tant sur le plan économique que structurel. En effet, le nombre de producteurs d'ananas a diminué de 80 % environ en l'espace de dix ans. De ce fait la superficie en ananas a également été fortement réduite, de même que la production. Aujourd'hui on considère que la surface cultivée en ananas est inférieure à 100 hectares, répartis dans le nord atlantique de la Martinique, principalement sur les communes de l'Ajoupa Bouillon, le Morne Rouge, Basse Pointe et Macouba. La production en 2012 serait de l'ordre de 800 tonnes (Letchimy, 2012).

### 2.3. Effet des pratiques culturales

- **Diminution de la fertilité des sols et détérioration de leurs structures**

Les sols sont affectés via diverse raisons par la culture d'ananas. Tout d'abord il y a une volonté de modification de la structure du sol. L'objectif pour la culture est d'obtenir un sol « *meuble, aéré, filtrant et peu sensible à la compaction au cours du temps* », les racines d'ananas étant sensibles à l'asphyxie. Selon le « *Manuel du planteur d'ananas Bouteille en Guadeloupe* » (2000), la préparation du terrain se divise en deux étapes (destruction du couvert existant et préparation du sol) qu'il est nécessaire de planifier au moins deux mois avant la date de plantation.

Ensuite au niveau de la flore (et donc indirectement de la faune du sol), il y a également de grande perturbations qui sont effectuées, par exemple dans le cas d'une jachère il est conseillé de « *détruire l'herbe par un désherbage avec des herbicides totaux à action non résiduelle comme par exemple le glyphosate (ROUND UP) puis passer un rom plow* ». Ou plus généralement, ce qui se faisait pour diminuer le stock de graines d'adventices présentes dans le sol, il était préconisé de les laisser germer et d'appliquer un herbicide total comme le glyphosate, au moins une semaine avant la préparation du sol.

Il existe également des modifications du sol résultant de la lutte contre les ravageurs de l'ananas. Les nématodes et les symphyles sont les ravageurs telluriques principaux de l'ananas. Les nématodes sont des vers de quelques millimètres de long, qui « *se nourrissent aux dépens des racines* ». Les symptômes provoqués sont les mêmes que ceux observés en cas de stress hydrique ou nutritif de la plante. Il semble que le labour du sol lors de sa préparation permet de créer un milieu qui n'est pas favorable aux nématodes (FREDON, fiche phytosanitaire). Pour maintenir les populations de nématodes à un seuil bas, évitant ainsi les pertes de rendement, les nematicides étant interdits de nos jours, on plantes des espèces défavorisant les nématodes tel que les crotalaires. Les symphyles (myriapodes attaquant l'extrémité des racines) provoquent en général un développement hétérogène des plants. La destruction des résidus de la plantation précédente permet de réduire le stock de symphyles présents dans le sol.

L'intensification de la culture d'ananas et la monoculture entraînent un déséquilibre entre les populations de micro-organismes bénéfique et pathogène au profit de ces derniers. L'utilisation massive de produits phytosanitaires participe à la diminution de la diversité des populations microbiennes. La diminution du taux de carbone organique du sol va diminuer sa fertilité, ce qui va jouer sur la culture de l'ananas, où l'homme va devoir de plus en plus intervenir avec des apports d'engrais chimiques. L'utilisation massive de produits phytosanitaires participe à la disparition de populations microbiennes. De plus, la culture d'ananas entraîne une détérioration de la structure du sol. Ses faibles systèmes radiculaires et aériens ne protègent pas les sols, qui subissent l'érosion. Ce phénomène est accentué par les plantations sur des pentes et la préparation du terrain non adaptée aux caractéristiques du sol. Les cultures sont réalisées de telle sorte que les récoltes sont régulières, ce qui a pour conséquence des rotations de parcelles laissées à nues en périodes de fortes pluies (FAO, 2001).

- **Pollutions sols et eau**

La monoculture d'ananas est également responsable de la pollution des sols et des nappes phréatiques par l'utilisation de pesticides que ce soit au niveau des sols ou hydrique(en 2005, 77000 tonnes en France pour 290 000 km<sup>2</sup> de surface cultivée). Il est considéré que sur une tonne de produits phytosanitaires appliqués à la culture, 60% se retrouve directement dans les eaux et sols, pour 40% de fixé par la plante (Bellec et al, 2002 ; Cabidoche et al, 2011). En effet, lors de la préparation du sol en vu d'une culture d'ananas, des traitements herbicides sont appliqués, ensuite au moment du semis on procède à un autre traitement, et enfin au cours des premiers mois de croissance les traitements herbicides suivent. Il n'y a pas que des herbicides, on trouve aussi des antifongiques et des insecticides. La flore, la faune se trouvent atteintes par la contamination de l'eau. Les composés organochlorés présents dans les pesticides sont toxiques pour les poissons et organismes aquatiques (Côte et al. 2011).

## 2.4 Réglementation future pour l'utilisation des pesticides/ engrais et volonté d'une agriculture raisonnée.

- **Ecophyto 2018:**

L'agriculture a eu plusieurs impacts néfastes sur l'homme et son environnement, que ce soit sur la biodiversité, sur la santé et la survie des êtres vivants ou encore sur la qualité et quantité des ressources disponibles. La prise de conscience s'est faite à plusieurs échelles. Il en est ressorti la mise en place de mesures vers une agriculture durable. Il est nécessaire de trouver de nouvelles pratiques capables de répondre à ces exigences.

Au niveau national, l'une des applications concrètes est proposée par le Grenelle de l'environnement à travers Ecophyto 2018. (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire, 2011). Ce projet possède plusieurs objectifs définis, comme par exemple l'utilisation des pesticides qui doit d'ici 2018, diminuer de 50% ou le retrait du marché des substances actives dangereuses. Les pratiques agricoles doivent être améliorées grâce à l'appui de la recherche et l'innovation de nouveaux systèmes de production viables et diffusables.

Dans la filière ananas les exploitations présentent un état s'étant fortement dégradé ces dernières années pour deux causes principales : tout d'abord plus faibles revenus des producteurs mais aussi parce que la réglementation en matière d'usage de produits phytosanitaires a fortement réduit le nombre de produits autorisés sur le marché. En particulier, il n'existe presque plus de produits autorisés pour le contrôle des cochenilles (provocant le Wilt qui est un flétrissement rapide de toute la plante) et des bioagresseurs telluriques (nématodes et symphyles) et le choix en matière de contrôle des adventices est très limité (Bellec et al, 2002).

L'intérêt de favoriser un système répondant à des normes plus respectueuses de l'environnement est une approche qui devient obligatoire dans le contexte actuel. L'objectif est de favoriser les effets positifs des organismes vivants constitutifs de ce système afin de limiter le recours aux intrants chimiques. L'utilisation de plantes de services s'inscrit dans cette démarche (Strassart et al, 2012).

- **Vers une agriculture raisonnée, importance de la mycorhization**

Les mycorhizes, littéralement «champignon de racines», est le nom donné aux relations mutualistes entre certaines plantes terrestres et des champignons qui colonisent leurs systèmes racinaires. Le type d'interaction le plus commun est l'association mycorhizienne arbusculaire (Harrier and Watson, 2003) impliquant les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA). Ils peuvent représenter de 5 à 50% de la biomasse microbienne du sol (Cardoso and Kuyper, 2006). Ces micro-organismes sont des symbiotes obligatoires (Harrier and Watson, 2003), ils fournissent à la plante des minéraux, principalement le phosphore, prélevés dans le sol par un réseau mycélien dense. Il a été démontré que les plantes mycorhizées bénéficient dans certaines conditions, d'une meilleure nutrition minérale. En particulier la concentration en phosphore, qui est le macronutritriment le moins mobile dans le sol (Declerck, 1996), est augmentée dans les plantes mycorhizées. Dans une moindre mesure, la mycorhization peut améliorer la nutrition en potassium, azote et en micronutriments tels que le zinc et le cuivre.

La mycorhizosphère (zone d'influence de la racine mycorhizée) s'étend au-delà de la zone d'exploration de la racine (la rhizosphère). La présence de CMA augmente les surfaces et les volumes d'absorption. On peut trouver 10 à 100 mètres de mycélium mycorhizien par centimètres de racines (Cardoso and Kuyper, 2006). De nombreuses recherches ont montré l'implication des CMA dans la protection des plantes (Azcón-Aguilar and Barea, 1997). La structure du sol affecte les potentiels d'érosion, les dynamiques hydriques et les cycles biogéochimiques des nutriments. Une des composantes majeures de la structure du sol est l'agrégation des particules qui le composent (Cardoso and Kuyper, 2006). Un des facteurs jouant sur cette agrégation est la présence de polysaccharides très stables Ces derniers sont exsudés par le mycélium des CMA, tels que la glomaline (Declerck, 1996). Ils assurent la cohésion physique des microparticules du sol. Le réseau mycélien agit donc comme un squelette assurant la cohésion des particules du sol (Cardoso and Kuyper, 2006).

Les champignons mycorhiziens sont affectés par des pratiques culturales qui ne prennent pas en compte l'importance de l'activité des organismes des sols (Declerck, comm pers.). Que ce soit:

- L'utilisation de fertilisants qui est néfaste à la mycorhize, en effet cette dernière dépend de la biodisponibilité des engrains. Si la plante n'a pas vraiment d'utilité à être colonisé par un champignon car les nutriments sont très disponibles dans le sol, cette dernière aura moins de sites réceptif. Tandis que si les éléments sont peu biodisponibles, la présence du champignon devient un besoin essentiel à la plante.

- Le labour qui détruit le réseau mycélien, de ce fait la capacité du transport des éléments par le champignon très limitée.

- Les fongicides toxiques pour ces champignons, et de plus la monoculture en elle même diminue la diversité des champignons.

De plus, les sols tropicaux sont susceptibles de limiter les rendements agricoles via des toxicités (Aluminium, Manganèse), ainsi que par un grand pouvoir fixateur de phosphore (lié à des pH trop acides ou trop basiques) (Sieverding, 1990).

L'augmentation du potentiel de mycorhization d'un sol est une des solutions qui peut contribuer à concevoir des systèmes de production plus « raisonnés » ou « agro-écologiques » répondant aux nécessités actuelles d'adapter les cultures soumises à de plus en plus de contraintes. Une utilisation d'une plante de service mycorhizante comme les crotalaires répondant à la nécessité à la fois, d'une augmentation de la résistance des cultures, une augmentation du potentiel de mycorhization du sol et une diminution des besoins en intrants. C'est dans ce contexte que la détermination du potentiel de mycorhization des sols dans la zone de production d'ananas s'impose naturellement dans une démarche d'amélioration des rendements. Cette amélioration vise également une limitation de l'utilisation de biocides dans l'optique d'une meilleure conservation de la biodiversité.

### **3. Matériel et méthodes :**

#### 3.1 Matériel :

- **Sols:**

Comme explicité dans l'introduction, les sols ont été choisis dans des conditions agropédoclimatiques contrastées dont les données pédoclimatiques ont été enregistrées. L'objectif est de pouvoir rendre compte d'éventuelles relations entre potentiel de mycorhization et facteurs du milieu.

**Tableau1: Récapitulatif des sols prélevés et observations relevées :**

Prélèvement	Lieu	Type de sol	Variété plantée	pH	Précipitations	Température moyenne	Description visuelle
Mer de Chine	Basse Pointe	Sols brun-rouille à halloysite	Cayenne Lisse	5, 59	3500-4000 mm	25,8°C	Cinq rangées d'ananas au milieu dans une parcelle de bananier, beaucoup d'adventices. Présence d'une plantation de crotalaire sur parcelle équivalente à 15m proche de la plantation. Pieds d'ananas peu développé, 1,5 an maximum. Traumatismes dus à un coupage de feuilles. Application d'engrais en pulvérisations uniquement.

Habitat ion Gradis	Basse pointe	Sol relativement peu évolué, à allophane sur cendre et ponce, sableux et humifère avec une cohésion allophanique faible mais très nette des mottes	MD2	6,02	4500- 5000 mm	23°C	Très intensif. Plantation d'ananas situé entre bananier et Crotalaire, présence également de plantation de cannes à sucre. On note la présence d'une seule espèce d'aventice, ce qui laisse supposer un traitement herbicide au minimum.
Nadin	Ajoupa bouillon	Sol relativement peu évolué, à allophane sur cendre et ponce, sableux et humifère avec une cohésion allophanique faible mais très nette des mottes.	MD2	4,92	4500- 5000 mm	23,33°C	(intensif) Présence d'une jachère accolée à une plantation d'ananas et une plantation de Crotalaire. Présence d'engrais visible en grande quantité entre les feuilles, beaucoup d'aventices (fougère).
Golvet	Morne Rouge	Sol relativement peu évolué, à allophane sur cendre et ponce, sableux à sablo- limoneux avec une cohésion allophanique faible mais très nette des mottes.	Cayenne Lisse	5, 87	5000- 5500 mm	22 ,62° C	Ananas très recouvrant, présence d'aventices en assez grande quantité.

Terne	Morne des Esses	Sol relativement peu évolué, à allophane sur cendre et ponce, sableux à sablo-limoneux avec une cohésion allophanique faible mais très nette des mottes.	Queen Victoria.	6	4500-5000 mm	23,3°C	(Agriculture biologique) Ananas bien espacés encore très jeunes. Jeune culture de bananes et de canne à sucre proche.
Honoré	Ajoupa bouillon	Sol relativement peu évolué, à allophane sur cendre et ponce, sableux et humifère avec une cohésion allophanique faible mais très nette des mottes.	MD2	4,92	4500-5000 mm.	23,33°C	Monoculture intensive d'ananas.
Bastel	Basse pointe	Sol relativement peu évolué, à allophane sur cendre et ponce, sableux et humifère avec une cohésion allophanique faible mais très nette des mottes.	MD2	6,02	4500-5000 mm	23°C	(Agriculture raisonnée) Diversifié, maraîchage, rotation piment patate douce, aubergines. Crotalaire également.

- **Matériel végétal :**

Afin de mesurer le potentiel de mycorhization des sols prélevés, il est nécessaire de mettre en culture des plantes piège dans ces sols. Le choix de la plante sera fait grâce à une étude préalable de sa capacité à « capter » les champignons mycorhiziens présents dans ce sol. De plus, il faut que cette espèce soit cultivable en conditions contrôlées sans trop de mortalité. Le choix s'est porté sur une crotalaire : *Crotalaria spectabilis*, qui se développe bien dans les conditions édapho-climatiques locales, et qui présente de bonnes aptitudes à la mycorhization (Germani and Plenquette, 2004). L'espèce *Crotalaria* est une plante résistante à la sécheresse, qui est capable de pousser sur quasiment tous les types de sols et participe à une réduction de l'érosion des sols. C'est une très bonne plante de couverture, sans être considérée comme une « mauvaise herbe », puisque permet d'éviter l'invasion d'adventices (Charles et al, 2012). Elle est généralement utilisée comme interculture (avec des cultures de riz, maïs, coton, canne à sucre, ananas), engrais vert et amendement et plante de couverture pendant la mise en culture. En effet, *Crotalaria* est une légumineuse permettant la fixation de l'azote et la plupart des variétés sont reconnues efficaces dans la lutte biologique contre les nématodes et symphyles (Cayrol et al, 2007).

Etant donné le manque d'étude comparative qui ont été faites sur la capacité de captation du potentiel de mycorhization d'un sol, nous mettrons en culture différentes plantes pour savoir si notre choix est pertinent. En effet, nous aurions pu choisir d'autres espèces, que ce soit au sein même du genre *Crotalaria* ou bien d'autres réputées pour capter le potentiel de mycorhization. Pour ce faire, un sol contenant des propagules de champignons endomycorhiziens est sélectionné (vérification grâce au prélèvement de racines présente dans ce même sol). Ensuite, sont plantés dedans : *Crotalaria spectabilis*, *retusa* et *juncea* qui sont trois espèces de *Crotalaria*, ainsi que des graines de Cives (oignon local), Tomate, Bracharia ruzizensis. Ces plantes seront laissées environ six semaines en terre avant d'être prélevées et analysées comme les autres (description ci-dessous).

- **Plantation de couronnes d'ananas dans un sol présentant un fort potentiel endomycorhizien.**

Dans le but d'une étude plus approfondie sur la mycorhization de l'ananas. Des essais préliminaires sont effectués. Nous avons plantés des couronnes d'ananas après que ces dernières aient passé environ 1 mois dans de l'eau afin que le système racinaire commence à se développer. Les couronnes d'ananas seront ensuite prélevés à intervalle régulier, par groupe de trois afin d'avoir des réplicats. Le système racinaire sera coloré et observé afin d'essayer de voir une potentielle évolution du processus de mycorhization sur le temps qui nous est imparti. En effet, il serait intéressant de tester les sols directement sur les ananas. Car dans une logique de coévolution, certains champignons endomycorhiziens possèdent des affinités plus ou moins importante selon de type de plante (Bonfante et al, 2008 ; Thompson, 2001).

Pour mieux rendre compte d'un potentiel de mycorhization qui favoriserait les cultures d'ananas il est donc préférable d'utiliser l'espèce concernée pour mesurer ce même potentiel d'un sol. Pour cela faut-il encore avoir une idée de la vitesse du processus de mycorhization chez l'ananas. C'est dans ce but que l'expérience a été mise en place.

### 3.2 Méthodes :

- **Préparation des sols pour la mise en culture:**

Le temps et les conditions de conservation et de séchage du sol, ainsi que le tamisage et l'homogénéisation doivent être standardisés car ceux-ci vont influencer le nombre ainsi que la variabilité des propagules (Utobo et al., 2011). La résistance d'une propagule à ces opérations dépend également de son type (spore, fraction de racine mycorhizée, mycélium externe) (Mc Graw and Hendrix, 1986), il est donc recommandé de réduire au maximum le temps écoulé entre le prélèvement de ce dernier et son utilisation pour analyse ou mise en culture.

Les analyses mycorhizes seront assurées par l'Université Catholique de Louvain (M Stephan Declerck – partenaire du projet). Pour cela nous avons utilisé les techniques qu'ils ont mis au point. C'est-à-dire effectué des dilutions des sols concernés afin de pouvoir utiliser la méthode du « most probable number » (MPN). La technique du MPN a été développée dans les années cinquante pour estimer les populations de micro-organismes (essentiellement bactéries et levures) dans l'eau et les laitages (Cochran, 1950). Porter (1979) fut le premier à adapter cette méthode à l'étude du potentiel mycorhizogène du sol. La méthode consiste à réaliser des dilutions successives du substrat à évaluer, avec un substrat (identique ou standard) stérile. Les dilutions sont ensuite placées dans des pots et une plante mycotrophe est mise en croissance sur celles-ci. Après un temps de croissance suffisant (généralement 6 semaines), chaque système racinaire est récolté et coloré. La présence (test positif) ou l'absence (test négatif) de mycorhize est ensuite évaluée sous microscope. Le résultat, aussi appelé MPN (Most Probable Number) est une estimation par maximum de vraisemblance du nombre de propagules infectieuses par poids de sol testé (Cochran, 1950). Le MPN repose sur deux postulats de base :

1) Une distribution aléatoire des propagules infectieuses, afin que deux fractions de même taille du même milieu contiennent la même quantité de propagules, et que celles-ci n'interagissent pas entre-elles par des phénomènes d'attraction ou de répulsion (Cochran, 1950).

2) L'expressivité d'une seule propagule, afin que tout échantillon contenant au moins une propagule puisse donner un résultat positif (Cochran, 1950). Cela implique aussi que le micro-organisme, dont la population est à déterminer, soit toujours identifiable après avoir subi une multiplication dans le milieu (Alexander, 1982). On obtient de meilleurs résultats en utilisant comme diluant l'échantillon original stérilisé (affirmation d'Adelman et Morton, 1986 ; Utobo et al., 2011). Cette théorie s'explique par une meilleure expression des propagules dans un milieu plus proche de la réalité (Adelman and Morton, 1986). On utilisera donc du sol stérilisé provenant du même lieu que celui du prélèvement pour nos dilutions.

Pour le détail du MNP se référer à la revue bibliographique rendue précédemment.

L'absence de contamination entre les différentes dilutions est évidemment essentielle. L'attention portée à ce point est d'autant plus grande que la réalisation des dilutions en série contraint l'expérimentateur à commencer par le sol le plus concentré en propagules, ce qui

l'empêche de respecter la règle de base qu'est d'utiliser les substances par ordre de potentiel infectieux croissant. La poussière créée par la manipulation des sols implique que les dilutions déjà préparées soient conservées dans une pièce différente de celle où sont réalisés les mélanges. Les ustensiles utilisés peuvent être un vecteur de propagules, c'est pourquoi ils doivent être constamment lavés et stérilisés à l'eau de javel entre chaque étape. Douze dilutions ont été effectuées avec une dilution d'un facteur 2 entre chacune.

- **Protocole de mise en culture des plantes:**

Afin de s'assurer que la colonisation racinaire par les champignons mycorhiziens à arbuscules ne provienne que du sol testé, il a été convenu de désinfecter les semences avant la germination. Le processus de stérilisation (Alderete-Chavez et al., 2010), implique 15min d'agitation des graines dans l'hypochlorite de sodium (10% de chlore actif), suivi de 3 rinçages à l'eau stérile (autoclave 20min à 121°C).

Prégermination: Le recours à la pré germination présente l'avantage de fournir aux expériences une population uniformisée de plantules ayant préalablement poussé dans les mêmes conditions, et de contourner les problèmes de graines non germées (Plenchette et al., 1989 ; Declerck et al. 1996). Les graines sont disposées dans une boîte de Petri, sur une couche de sable de Fontainebleau (de la société Sifrac), préalablement stérilisé (autoclave 2h à 110°C (Declerck et al. 1996)), et mouillé à l'eau stérile (autoclave 20min à 121°C).

Elles sont ensuite placées en chambre de culture, dans les conditions suivantes : une photopériode de 12 heures, température à 27°C, l'intensité lumineuse et l'humidité relatives sont inconnues. Les graines à germer ont séjourné pendant 4 à 6 jours pour les crotalaires.

- **Temps de croissance et fertilisation:**

Pour le MNP, le temps de croissance dans la littérature varie de 6 semaines (Porter, 1979 ; Declerck et al., 1999 ; Saint-etienne et al., 2006) à 9 semaines (An et al., 1990 ; Gaidashova et al. 2010). Des tests préliminaires montrent qu'avec une croissance de 8 semaines les résultats sont satisfaisants avec la crotalaire.

Certains auteurs préconisent la fertilisation pour une meilleure croissance végétale (Wilson and Trinick, 1983 ; An et al., 1990). Cependant, ces applications peuvent avoir des conséquences importantes sur le résultat de l'expérience (Penchete et al., 1989). Il n'y a donc pas d'ajout de fertilisant dans mes expériences.

- **Gestion des plantules mortes:**

Nous faisons le choix de remplacer les plantules mortes. Pour cela des plantules ayant du même âge sont conservées dans du sol stérile. Si la mort survient au-delà de 3 semaines de culture la plantule n'est alors pas remplacée car cela risque de fausser les résultats.

Pour limiter au maximum les contaminations entre les différentes dilutions, les plantes ont été mises dans des boîtes selon chaque dilution, les trois réplicats ensembles (Figure 1). Puis que les plantes étaient trop grande la boîte a été ouverte (Figure 2).



Figure 1: Mise en culture des plantes à T=0



Figure 2: Culture des plantes au bout d'un mois

### **-Ramassage fin de plantation**

Chaque particule du sol demeurant sur la racine altère la qualité de l'observation, d'où un lavage précautionneux de chaque système racinaire à l'eau claire. L'objectif du dépotage est de récupérer toute racine ou fragment de racine se trouvant dans le substrat. Après dépotage chaque système racinaire peut être conservé dans l'alcool à 70° (Utobo et al., 2011), ou bien être séché lentement (comm. Pers. Declerck). Pour les racines devant être envoyées au laboratoire de Belgique, ces dernières ont été séchées. Celles qui restent au laboratoire ont été conservées dans l'alcool. La conservation des systèmes racinaires ce fait dans des tubes à hémolyse, à température ambiante, dans un placard, à l'abri de la lumière.



Figure 3: Protocole de ramasse et conservation des racines

- **Protocole de coloration de racines:**

Le procédé de coloration de Phillips et Hayman (1970), permet d'observer des structures fongiques colorées, qui, même dans la phase intra-racinaire, sont distincts des cellules végétales. La première étape consiste en la décoloration des cellules végétales, en les vidant de leur contenu cytoplasmique et nucléaire (Phillips and Hayman, 1970), grâce à une solution d'hydroxyde de Potassium (KOH). Il faut ensuite colorer les structures fongiques. Vierheilig et al (1998) ont développé un processus de coloration simple, basé sur l'utilisation d'encre et de vinaigre, et permettant d'éviter le recours à des produits toxiques généralement utilisés (bleu de trypan, fuschine acide).

Bien entendu selon les racines à colorer ce protocole varie sur les durées de décoloration/coloration.

Des essais sont donc effectués au préalable pour déterminer le temps idéal pour les racines concernées. Pour nos analyses c'est le protocole suivant qui a été sélectionné :

- 1) Rincer l'eau des racines préalablement conservées dans de l'alcool à 70° (ou séchées)
- 2) Mettre dans une solution de KOH (hydroxyde de potassium).

Pour la préparation de la solution: 2L d'eau distillée pour +/- 225g d'hydroxyde de potassium, passer à l'agitateur jusqu'à dissolution complète.

Mettre au bain marie à 70°C pendant 1h15. Le KOH permet de vider les cellules de leur contenu cytoplasmique.

3) Vider les pots puis rincer, re-remplir avec une solution d'encre parker indélébile à 2% +acide acétique 2%, de nouveau bain marie durant 40 min. (Il est possible de faire les préparations à l'encre avant et mettre au bain plus tard). Mettre l'encre juste à niveau des racines, pas besoin de surplus.

4) Lames composées de 10 morceaux de racines, ajouté la glycérine avant de poser la lamelle pour éviter un séchage, et sceller avec du vernis.

Durant nos expériences nous avons eu des difficultés à obtenir du KOH.

Nous avons donc mis en place un protocole de remplacement en utilisant du NaOH (soude) qui possède les mêmes propriétés que l'hydroxyde de potassium.

- **Protocole de l'estimation du taux de mycorhization:**

Diverses méthodes sont employées. Certaines très précises et complexes comme la technique employée par Mc Gonigle (1990) nécessitent beaucoup de temps et d'expérience. Pour notre part le manque de temps a été un facteur décisif pour le choix de la technique. De plus le but de notre étude est plus une approche comparative que quantitative. Pour ces différentes raisons, la technique employée est celle développée par Trouvelot (1996). La méthode de notation sera mesurée sur la présence des vésicules qui sont des structures facilement identifiable et bien moins aux erreurs de lecture que les arbuscules par exemple.

-La fréquence de mycorhization F :  $F\% = 100 \times (n_0/N)$

Où N est le nombre de fragments observés et n0 le nombre de ces fragments sans trace de mycorhization. F reflète l'importance de la contamination.

-L'intensité de mycorhization, M, du système racinaire :

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

Où n5, n4, ..., n1 désignent respectivement les nombres de fragments notés 5, 4, ..., 1.

-L'intensité de mycorhization, dans les fragments mycorhizés

$$m\% = Mx (N/N_m)$$

Où Nm représente le nombre de fragments mycorhizés.

-La teneur en arbuscules ou vésicules, a, de la partie mycorhisée

$$a\% = (100A_3 + 50mA_2 + 10mA_1)/100$$

Où A3, A2 et A1 sont les pourcentages de fragments notés respectivement 3, 2 et 1 avec

$$mA_3 = ((95n_5A_3 + 70n_4A_4 + 30n_3A_3 + 5n_2A_2 + n_1A_1)/Nm) \times 100 / m$$

; il en est de même pour A2 et A1.

-Abondance des arbuscules ou vésicules dans le système racinaire

$$A\% = a \times (M/100)$$

Ces valeurs sont calculées automatiquement avec le logiciel « Mycocalc » (INRA de Dijon).

## **4. Résultats:**

### 4.1 Mise en place d'un protocole de coloration :

Comme expliqué dans le Matériel et Méthodes, la difficulté a ce procurer de l'hydroxyde de potassium nous a amené à chercher un autre réactif possédant les mêmes propriétés pour nos expériences. L'hydroxyde de Sodium en fait partis. Pour déterminer le temps nécessaire afin d'obtenir le résultat escompté, c'est-à-dire, un nettoyage de la cellule. Il faut sans pour autant détruire cette dernière ou retirer les mycorhizes.

Temps de passage dans le bain marie	Observations
10 min	Opacité très importante.
20 min	Racines encore très opaques mais quelques vésicules visibles.
30 min	Opacité encore présente mais moins importante, vésicules visibles.
40 min	Traitements équivalents à 1h dans le KOH, bonne visibilité des vésicules malgré la présence de quelques résidus.
50 min	Début de dégradation des cellules visibles. Mais plus de résidus.
60 min	Reste de filament, forte dégradation des cellules.
70 min	Très forte dégradation des cellules, tout semble avoir été trop fortement rincé lors du bain.

**Tableau 2: Récapitulatif des observations pour la mise au point d'une décoloration au NaOH.**

### 4.2 Mycorhization de l'ananas:

Trois dates avaient été prévues pour le prélèvement et l'analyse des systèmes racinaires de l'ananas. Le premier mois, aucun prélèvement n'a été effectué car la littérature laisse sous entendre qu'un minimum de 1 mois pour la mise en place d'une mycorhization est nécessaire. Donc au bout de 5 semaines, le premier prélèvement a été effectué. Puis le deuxième au bout de 8 semaines. Enfin le dernier prélèvement était prévu au bout de 11 semaines. Ce dernier n'a pas été effectué suite à un problème d'arrosage automatique qui s'est arrêté de fonctionner.

Les observations rendent tout de même compte de la vitesse de mycorhization de l'espèce. En effet sur le premier prélèvement aucune vésicule n'est observée. Seul quelques fragments racinaires présentent des filaments de champignons qui sont essentiellement extra-racinaire, donc par forcément des champignons endomycorhiziens.

Sur le deuxième prélèvement on observe énormément de spores et de filaments intra-racinaire sur tous les fragments, ce qui montre que la colonisation a commencé. On aurait certainement

eu des vésicules sur le dernier prélèvement. En effet, les vésicules ne sont pas les premières structures observables qui colonisent le milieu. Elles apparaissent un peu plus tard. Cela nous aurait permis de confirmer (ou non) le fait que le champignon observé est bien endomycorhizien et non un saprophyte par exemple.

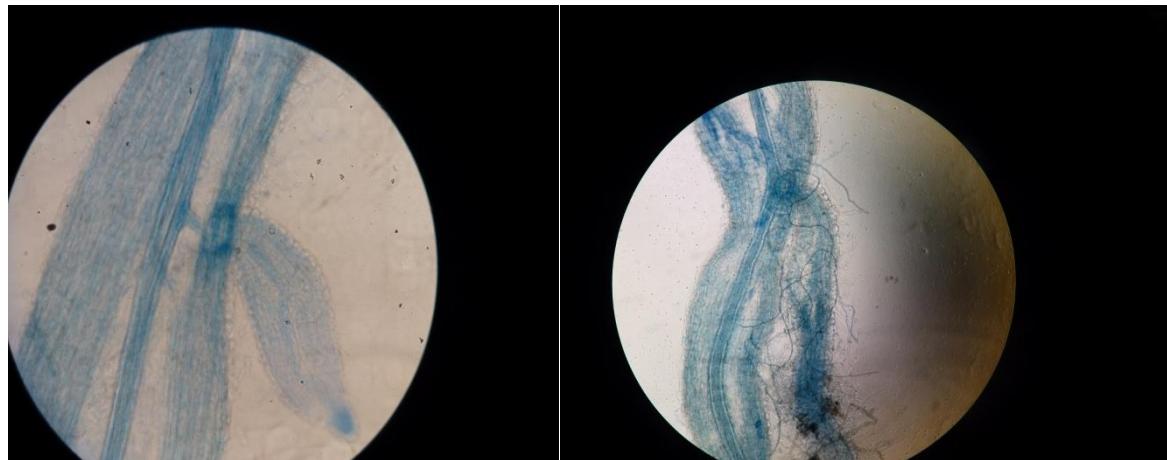


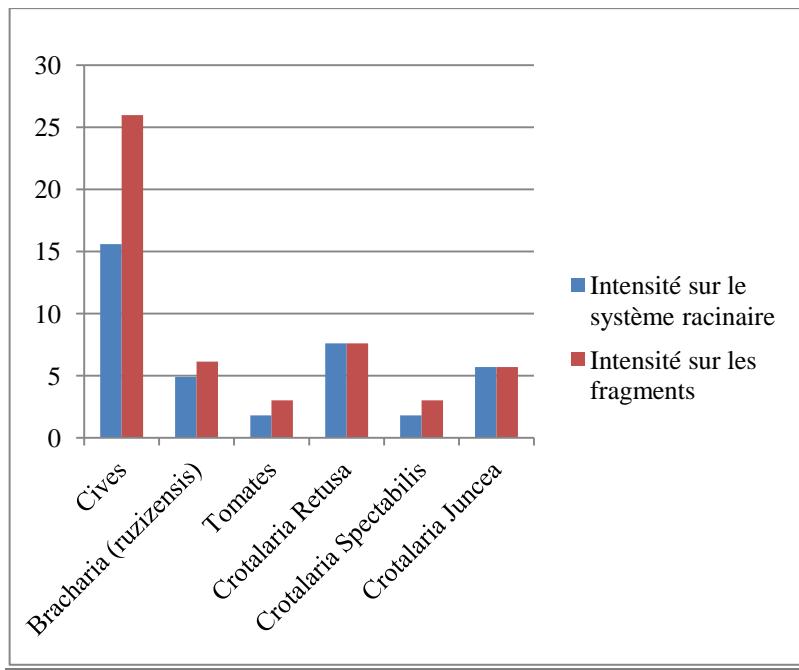
Figure 4: Photographie des observations de fragments de racines d'ananas avec à droite un fragment représentatif des observations faites sur le prélèvement 1 et à gauche un fragment représentatif des observations faites sur le prélèvement 2.

#### 4.3: Comparaison du niveau de mycorhization de différentes plantes:

mycorhization en %	Fréquence de mycorhization	Intensité sur le système racinaire	Intensité sur les fragments	Abondance des vésicules sur fragments	Abondance des vésicules sur système racinaire
Cives	60	15,6	26	45,83	7,15
Bracharia (ruzizensis)	80	4,9	6,13	77,35	3,79
Tomates	60	1,8	3	18,33	0,33
Crotalaria Retusa	50	7,6	7,6	7,37	0,28
Crotalaria Spectabilis	60	1,8	3	10	0,18
Crotalaria Juncea	80	5,7	5,7	15,26	0,87

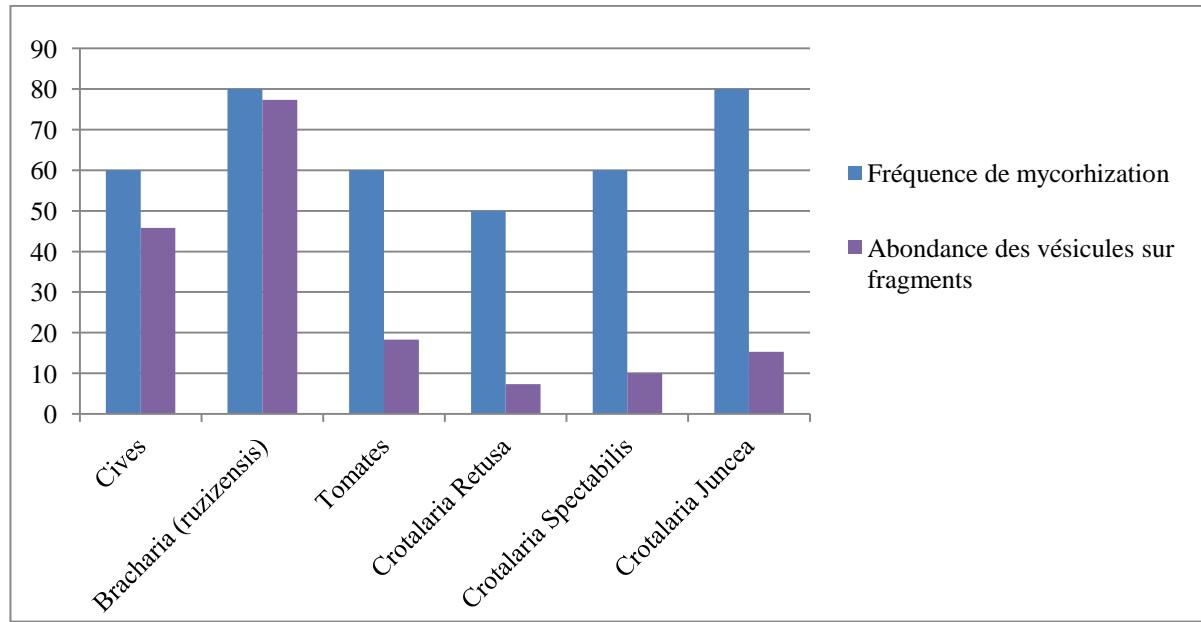
Tableau 3 Récapitulatif des données traités sous Mycocalc.

Le tableau 3 résume les données calculées grâce aux observations après coloration. Avec en vert les plus haut résultats et en rose les plus bas. *Bracharia ruzicensis* et *Cortalaria Juncea* présentent une fréquence de mycorhization plus élevées que les autres espèces.



**Graphique 1 : Intensités (en pourcentage) de mycorhization en fonction des espèces.**

Sur le graphique 1 on peut noter que les Cives semblent avoir une intensité de mycorhization nettement supérieure aux autres espèces. Et que les tomates et *Crotalaria spectabilis* présentent les intensités les plus faibles, n'atteignant pas les 5%.



**Graphique 2 : Fréquence et Abondance (en pourcentage) de mycorhization en fonction des espèces.**

On peut noter ici que les fréquences de mycorhization sont relativement élevées pour toutes les espèces. C'est surtout dans l'abondance relative des vésicules qu'on peut observer des variations avec *Bracharia ruizensis* et les Cives qui présentent les plus fortes abondances.

#### 4.4 Résultats des analyses effectuées par l'université du Louvain :

Les analyses n'ont toujours pas été faites à ce jour à Louvain. Ayant conservé la moitié des systèmes racinaires au sein de notre laboratoire nous allons tenter d'effectuer des analyses. Sachant que l'ensemble de ces analyses nécessitent un expert durant un mois complet. Les observations et analyses seront faites avec la méthode Trouvelot et non du most probable number, cette dernière nécessitant beaucoup trop de temps. Les observations sont en cours et les résultats non disponibles à ce jour.

## 5. Discussion:

L'obtention de nos résultats n'ayant pas été possible dans le temps impartis. La méthodologie proposée pour analyser ces résultats est la suivante. Nous aurions pu tout d'abord pour chacun des sols :

Effectuer un test de Dunett sous le logiciel R statistique, cela permet de comparer une moyenne à un témoin. Si le test était positif nous aurions pu conclure que nos sols possédaient effectivement un potentiel de mycorhization.

Le laboratoire aurait fourni les résultats en utilisant la méthode du « most probable number ». Nous rappelons que le MNP nous indique le nombre de propagules infectieuses (Porter, 1979) dans les conditions expérimentales données, pour un ensemble sol-hôte-conditions biotiques et abiotiques.

Nous aurions pu faire un test LSD (least square difference) de Fisher qui nous aurait permis de mettre en évidence des différences de potentiel de mycorhization entre les moyennes des sols. Le test de Fisher équivaut à un test de student mais avec un niveau de bruit qui n'est pas limité aux variations internes des deux groupes cibles (Buisson, 2012). Au contraire il intègre l'ensemble des bruits de tous les groupes ce qui, dans notre étude est non négligeable.

Nous aurions pu également (toujours sous R) faire une anova qui nous aurait permis de comparer toutes les moyennes de potentiel de mycorhization de nos sols. Avec un test de TukeyHSD nous aurions eu plus de précisions sur les différences. Nous aurions pu éventuellement expliquer les différences observées avec les paramètres observés (variété cultivées, type de sols...)

Limite du choix et de la fertilisation de la plante hôte :

Tout d'abord pour cette expérience nous avons choisi *Crotalaria spectabilis* en tant que plante hôte afin de mesurer le potentiel de mycorhization des sols prélevés. Or cette dernière fait partie des hôtes présentant les plus faibles taux de mycorhization au sein des espèces testées. Notre choix de départ s'était porté sur *Crotalaria retusa* qui d'après nos résultats semble avoir une position intermédiaire dans notre échelle de mycorhization mise en place. Ce qui signifie qu'elle reflète une moyenne réaliste du potentiel de mycorhization mesuré. Le problème auquel nous avons été confronté est la contamination des graines par des champignons malgré la stérilisation. En effet ces dernières possèdent une cicatrice qui renferme des champignons. Après divers tests de stérilisation des graines nous ne sommes pas parvenus à un résultat satisfaisant pour démarrer l'expérience avec *C. Retusa*. Cependant, les difficultés de germinations (dues à ce champignon) n'ont été observées qu'en laboratoire. En effet des graines des mêmes lots testés ont été utilisées lors d'un autre essai terrain, et nous n'avons noté aucun problème lors de la levée ou lors de la croissance de ces dernières. Il est donc important de noter que selon si l'expérience se passe sur le terrain ou en conditions contrôlées, une même plante ne réagit pas de la même façon. Cela peut certainement s'expliquer par une absence de concurrence extérieure en condition stérile qui limiterait les possibilités de développement des champignons parasites présents.

De plus, pour *C. spectabilis* nous avons dû adapter le protocole. En effet, ses racines nécessitent un temps supérieur aux autres pour le procédé de coloration. De surcroit elles répondent moins bien à la coloration. C'est donc un autre facteur qui est non négligeable et nous pousse à rechercher une espèce plus adaptée pour notre expérience.

D'autres éléments sont à prendre en compte, parmi eux : la facilité de culture en conditions contrôlées. En plus de présenter une facilitation à la mycorhization, l'espèce doit être cultivable sans trop de pertes car il est nécessaire d'avoir un maximum de réplicats pour avoir des résultats plus probants. Par exemple, dans les résultats on note que les cives répondent

très bien à l'essai en présentant des chiffres supérieurs que ce soit sur l'intensité de la mycorhization ou bien sur la fréquence. Cependant, cette espèce est difficile à cultiver en conditions contrôlées et ne présente pas beaucoup de racines, ce qui dans notre cas est un facteur très limitant car il nous faut pouvoir faire suffisamment de fragments pour toutes les analyses. *Crotalaria juncea* semble elle aussi faire un bon candidat. Le problème chez cette dernière étant la vitesse de croissance trop élevée qui nécessiterait un espace très important pour sa culture.

Pour conclure, l'espèce « idéale » pour la culture en condition contrôlées dans le but de mesurer un potentiel de mycorhization semble être la tomate. En effet elle représente un bon compromis entre la facilité de culture, de germination et stérilisation des graines, la capacité de la plante à « capter » un pouvoir mycorhizant. De plus cette dernière possède des racines qui se prêtent très bien aux observations sous microscope. Elles se prêtent très bien à la décoloration et coloration selon les protocoles utilisés dans cette expérience.

A propos de la fertilisation : Pour les MNP, l'absence de fertilisation tout au long des six semaines de croissance n'améliore peut-être pas la vitalité des plantes. Cependant la nécessité de ne pas fertiliser à déjà été discuté précédemment. Mais une utilisation d'engrais sans phosphore ou bien d'engrais peu biodisponible est à réfléchir. En effet cela permettrait que le champignon mycorhizien conserve son efficacité et utilité, tout en limitant d'éventuels déficits de la plante. Il serait intéressant d'effectuer une expérience avec un lot de plantes sans apport de fertilisant et un avec pour vérifier si effectivement : on observe moins de mortalité et une meilleure croissance, tout en conservant un même taux de mycorhization.

#### Limites du choix et stérilisation des sols.

Les applications de fongicides et de fertilisants épandus avec une proximité temporelle avant le prélèvement, autour de 5 mois (Plenquette et al, 2005), sont supposés affecter le potentiel mycorhizien d'un sol. Le moment de prélèvement a donc son importance. Ici nous n'avons pu obtenir ces informations précisément car les producteurs ne souhaitent pas communiquer leur itinéraire technique exact.

Le temps et les conditions (température, humidité) de conservation et de séchage du sol, ainsi que le processus d'homogénéisation jouent également sur les micro-organismes du sol. Dans cette étude les sols ont été prélevés en novembre puis utilisés en février. Entre temps ils ont été conservés dans des sachets clos au frais et à l'abri de la lumière. C'est un paramètre à ne pas oublier car la durée de vie des propagules et des micro-organismes est variable selon l'espèce. Il aurait donc été préférable de prélever le sol et de mettre nos plantes hôtes en culture immédiatement. Le tamisage a été standardisé et précautionneusement respecté pour limiter au maximum les bruits liés à cette partie de l'expérience. La finesse du sol due au tamisage à 2mm est indispensable à la réalisation des dilutions. Cependant cette finesse peut-être responsable d'une mauvaise structure ou d'un tassemement de sol, agissant en tant que barrière physique ou causant aux racines des problèmes de bilan hydrique. Ce dernier élément souligne encore une fois les limites d'une culture en conditions contrôlées.

Nous avons fait le choix d'utiliser comme diluant le substrat original stérilisé car il apparaît qu'on obtient de meilleurs résultats si on le compare à une utilisation de substrats minéraux stériles (Utobo et al, 2011). Cela est expliqué par une meilleure expression des propagules lorsque les conditions expérimentales et initiales correspondent (Adelman and Morton, 1998). Cependant, l'autoclavage nécessaire pour la stérilisation implique certaines modifications moléculaires du sol. Qu'elles soient positives comme la libération de nutriments, mais aussi négatives comme la libération de molécules organiques responsables d'une phytotoxicité du substrat (Rovira et Bewen, 1996).

Nous en venons ensuite au choix des sols. En effet ces derniers sont bien distincts les uns des autres ce qui permettra logiquement d'observer des variations de potentiel de mycorhization. Ici l'inconvénient est le suivant : les sols diffèrent selon de nombreuses variables biotiques (type de culture) ou abiotiques (traitement phytosanitaire, type de sols). Cela laisse apparaître un problème pour identifier l'importance des variables les unes par rapport aux autres. En effet il peut être moins évident d'interpréter des différences lorsque celles-ci sont explicables par plusieurs variables.

Pour la suite des expériences il existe plusieurs aspects qui nous semblent intéressant de développer :

Tout d'abord pour les essais en eux mêmes. En effet on obtiendrait certainement des résultats plus probants en prélevant des racines directement sur les ananas en culture. De plus, recueillir des données sur la mycorhization de l'ananas, tel que le temps nécessaire à sa mycorhization, l'influence du stade phénologique et de différents stress permettraient de compléter les connaissances nécessaires à l'élaboration d'un protocole technique visant à améliorer les cultures d'ananas.

Des essais sur le terrain sont en cours avec la mise en place d'un couvert végétal de crotalaire durant une rotation. Les prélèvements pour comparer les sols ayant eu ce couvert au préalable ou non ont été faits mais les analyses n'ont pas encore été réalisées. L'inconvénient de suggérer cette plante comme couverture durant les jachères est que la crotalaire n'est pas une plante fourragère. Le producteur ne trouve donc pas d'intérêt direct à la mise en place de ce procédé. La recherche d'une plante fourragère qui aurait des propriétés proches de la crotalaire pourrait rendre l'innovation culturale plus attractive.

Enfin, il y a un dernier point sur lequel il serait intéressant d'approfondir cette étude. En effet nous avons pu voir la présence de mycorhization sur les racines prélevées. Mais nous ne savons pas si ces mycorhization proviennent essentiellement d'une famille particulière de champignons endomycorhiziens ou bien si c'est un juste équilibre. L'analyse par PCR (polymérase chain reaction) des champignons présents permettrait de répondre de façon précise à cette question. Cela aiderait certainement dans le cas où l'objectif serait de fournir un apport de champignons endomycorhiziens ciblé pour un sol manquant de potentiel de mycorhization.

## **Bibliographie**

- Abo-Ghalia, H.H, Khalafallah, A.A (2008).** Responses of wheat plants associated with arbuscula mycorrhizal fungi ti short-term water stress followed by recovery at three growth stages. Journal of Applied sciences Research. 4: 570-580
- Alexander, M., 1982.** Most probable number method for microbial populations. In Methods of soil analysis part 2 (éd. Page A.L) American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, 815–820.
- An Z.Q., Hershman D.E., Henson G.T. (1990).** Evaluation of the “most propable number” (MNP) and wet-sieving method of determining soil borne populations of endogonaceous mycorrhizal fungi. Mycologia 82, 576-585.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M. (1997).** Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens—an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6, 457–464.
- Bégards F. (2004).** Agriculture et environnement, le choix de l’agriculture biologique.
- Bellec S., Godard E. (2002).** Contamination par les produits phytosanitaires organochlorés en Martinique. Caractérisation de l’exposition des population, Direction de la santé et du développement social en Martinique
- **Bouillard B.(1968).** Les mycorhizes. Paris, Masson et Cie.
- Bonfante P., and Gere A., (2008).** Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective.
- Brossard M., Albrecht A. & Feller C. (1985)** Algunas propuestas para el estudio de la materia organica de los suelos en las investigaciones en agrosistemas. In ORSTOM, INRA, Academia de Ciencias, Cuba (Eds) Sol et eau, Seminario científico de pedología para la region de Centro America y el Caribe, 8-20 avril 1985, La Havane, Cuba : 323-342.
- Cabidoche Y.M., Lesueur Jannoyer M., (2011).**Pollution durable des sols par la chlordécone aux Antilles. Innovations agronomiques 16, 117,-33.
- Cairney J.W.G. (2000).** Evolution of mycorrhiza systems. Naturwissenschaften.
- Cardoso, I.M., Kuypers, T.W. (2006).** Mycorrhizas and tropical soil fertility. Agriculture, ecosystems & environment 116, 72–84.
- Cayrol J.C, Dijian-caporalino C., anchaud-matti E., (2007).** La lute biologique contre les nematodes phytoparasites. Courrier de la cellule Envir. De l’INRA n°17.

-Charles R., Montfort F., Sarthe J-P, (2012). Effet biotiques des cultures intermédiaires sur les adventices, la microflore et la faune.

-Cochran, W.G., (1950). Estimation of bacterial densities by means of the “most probable number”. Biometrics 6, 105–116.

-Côte F.X., Chabrien C., Domergue R., Fouré E., Fournier P., Galan M.B., Laplace D., Marnotte P., Pavis C., Simon S. Vannière H., (2011). Pesticide DOM, inventaire de dispositifs expérimentaux. DAAF guyane, Ministère de l'agriculture et Onema EDR, Montpellier France, 283p.

-Courty, P.E, Buée, M., Diedhiou, Frey-Klett, A.G, Le Tacona, P., F. Rineau, Turpault, F. , Uroza, M.P., Garbaye, S. (2010) The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. Soil Biology and Biochemistry. 42: 679-698

-Declerck, S., Strullu, D., Plenchette, C., Guillemette, T. (1996). Entrapment of in vitro produced spores of Glomus versiforme in alginate beads: in vitro and in vivo inoculum potentials. Journal of Biotechnology 48, 51–57.

-Declerck, S., Plenchette, C., Risede, J.-M., Strullu, D.G., Delvaux, B. (1999). Estimation of the population density of arbuscular mycorrhizal fungi in soils used for intensive banana cultivation in Martinique. Fruits 54, 3–9.

- François, Moreau, & Sylvander, (2005). Agriculture biologique en Martinique, Quelles perspective de développement.

-FREDON. (s.d.). *Fiche Technique : Quelques ravageurs de la culture de l'ananas* . En collaboration avec le Service de la Protection des Végétaux de la Martinique. Fort de France: FREDON.

-Germani G., Plenchette C., (2004). Potential of Crotalaria species as green manure crops for the management of pathogenic nematodes and beneficial mycorrhizal fungi. Plant and Soil 266, 333-342.

-Harrier, L., Watson, C. (2003). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems, Advances in Agronomy, 79, 185–225.

-Kehe, M. (1988). Hansenella Ivorensis Juberthie-Jupeau et Kehe (1978), Symphyle, Myriapode (Scutigerillidae) Et Le Dépérissement Racinaire De L'Ananas En Côte D'Ivoire : Incidence agronomique et moyen de lutte. Abidjan: Université Nationale de Côte d'Ivoire. Thèse (Dr. Ingénieur en Sciences Agronomiques).

-Lebeau F., Imele J-P, Teisson C., Delhove G. (2008). Efficacité de la technique d'induction florale d'Ananas comosus L. Merr. Au moyen de charbon actif enrichi à l'éthylène ? Biotechno. Agron. Joc. Environ.(2009) 13(3), 395-400.

-Lemanceau, P., Heulin T. (1998). La rhizosphère. In : Sol : interface fragile, eds, INRA, Paris, France, 93-106

-Letchimy S. (2012). Quelles solutions pour l'ananas Martiniquais?

-McGonigle T.P., Miller M.H. (2000). Influence of soil fumigation and source of strawberry plants on population densities of spores and infective propagules of endogonaceous mycorrhizal fungi. Plant and soil 94, 425-434.

-Mika MT., Frey-Klett P. (2008). Mycorrhiza Helper bacteria. In mycorrhizal, ed. A. Varma: 113-32: Springer Berlin Heidelberg. Numer of 113-32pp.

-Phillips J.M., Ayman D.S. (1990). Improved procedures for clearing rots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55, 158-161.

-Plenchette C., Perrin R., Duvert P.(1989). The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to Endomycorrhizas. Canadian journal of Botany 67, 112-115.

-Plenchette, C., Clermont-Dauphin, C., Meynard, J.M., Fortin, J.A. (2005). Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. Canadian journal of plant science 85, 31–40.

-Porter, W. (1979). The “most probable number” method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Soil Research 17, 515–519.

- Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J.M, Azcon-aguilar, C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophtora* infection in tomato plants. Journal of experimental Botany. 53: 525-534

-Py C., Lacoeuilhe J.J, Teisson C. (1984). Technique agricole et production tropicale.

-Saint-Etienne L., Paul S., Imbert D., Dulorme M., Muller F., Toribio A., Plenchette C., Bâ A.M (2006). Arbuscular mycorrhizal soil infectivity in a stand of the weatland tree *Pterocarpus officinalis* along a salinity gradient. Forest ecology and management 232, 86-89.

-Saffache, P., Blanchart, É., Cabidoche, Y.-M., Josien, É., Michalon, T., Saudubray, F., & Scherer, C. (2005). Contexte de l'agriculture martiniquaise : atouts et contraintes pour l'agriculture biologique. Agriculture Biologique en Martinique (pp. 40-77). Montpellier: IRD éditions

-Shouteden N., Tuinen Dv., Chatagnier O., Elsen A. (2013). Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode “*Meloigyne incognita*” involves priming defense gene responses in tomato. Soil Biology and biochemistry 60:45-54

-Sieverding E. (1990). Ecology of VAM fungi in tropical agrosystèmes. Agriculture, Ecosystems and Environment 29, 369-390.

- **Smith, S.E, Read, D.J. (2008).** Mycorrhizal symbiosis. 3ème Edition, Academic Press, New-York, Etats-Unis, pp787
- **Stassart P.M., Baret Ph., Grégoire J-Cl., Hance Th., Mormont M., Reheul D., Stilmant D., Vanloqueren G., Visser M.(2012).** L'agroécologie : trajectoire et potentiel Pour une transition vers des systèmes alimentaires durables.
- **Soler, A., Gaude, J.-M., Marie-alphonsine, P.-A., Vinatier, F., Dole, B., Gauvindin, J.-C., Quennerve, P. (2011).** Development and evaluation of a new method for sampling and monitoring the symphilid population in pineapple. *Pest Management Society*, 67, 1169-1177.
- **Thomson J.N. (2001)** .Coevolution. Encyclopédia of life sciences.
- **Touron J., Fournier P., Collette E., Gabon S., Deroche J.(2000).** Manuel du planter d'ananas. Bouteille en Guadeloupe. Capesterre-Belle-Eau : CIRAD-FLHOR.
- **Trouvelot, A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V. (1986).** Mesure du taux de mycorhizations VA d'un système radiculaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In : Physiological and genetical aspects of mycorrhizae, eds Gianinazzi-PearsonV, Gianinazzi S, INRA Presse, Paris, France, 217-221
- **Tsai, B., cité dans Wang, K.-H., Sipes, B., & Hooks, C. (2010, Mai).** EnvironmentalFriendly Approaches for Managing Nematodes and Weeds on Pineapple. Newsletter of the Pineapple Working Group, International Society for Horticultural Science(N°17), pp. 27-32.
- **Utobo E.B., Ogbodo E.N, Nwogbaga A.C. (2011).** Techniques for extraction and quantification of arbuscular mycorrhizal fungi. Libyan agriculture research center journal international: 68-78.2011
- **Wang, K. H. (2001).** Suppression of Rotylenchulus reniformis by Crotalaria Juncea, Brassica napus and Tagetes erecta. *Nématropica* 32 , 237-251.
- **Wang (a), K.-H., Sipes, B. S., & Schmitt, D. P. (2002).** Crotalaria as a Cover Crop for Nematodes Management : a Review. *Nematropica*, vol. 32(1), 35-57.
- **Wilson JM. Trinick M.J. (1983).** Factors affecting the estimation of numbers of infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi by the most probable number method. *Soil research* 21, 73-81.

## **Sites internet :**

-Site internet pour la détermination des sols : Caribbean Satellite Environmental Information Systems.

-**Arbofruits (2007)**, Information technique sur la culture de l'ananas.

-**DAAF (2012)**. Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt de la Martinique - Publications statistiques.

-**FAO ,(2001)**: Les marchés mondiaux des fruits et végétaux.

-Filière agricole Ministère de l'agriculture.

-**Leboeuf J. (2010)**. Les résistances systémiques acquises-De quoi s'agit-il ? Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, Ontario

- **Ecophyto**. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du territoire. [en ligne le 22 avril 2012] : <http://agiculture.gouv.fr/Ecophyto-pour-tous>,1633

-**SIDE (2011)**. Portail Système Documentaire de l'Environnement - Région Martinique : Profil environnemental Martinique

Résumé :

La monoculture intensive pratiquée aux Antilles pour la plupart des cultures a fortement contribué à la baisse de la biodiversité dans les agrosystèmes. Via le projet d'Ecophyto 2018, la réglementation va obliger les agriculteurs à trouver des alternatives à l'utilisation de pesticides et d'herbicides qui sont aujourd'hui en vigueur. Il est donc nécessaire de trouver des solutions concrètes permettant de remplacer ces traitements tout en étant plus respectueux de l'environnement. L'objectif de notre étude est l'intégration de plantes de service en rotation/association dans les systèmes de cultures en Martinique pour la gestion des bioagresseurs et de la fertilité des sols. L'étude préliminaire consiste à mesurer le potentiel de mycorhization de différents sols à l'aide d'un test biologique avec une plante piège connue pour être facilement mycorhizable. Les sols ont été choisis dans des conditions agropédoclimatiques contrastées. La plante hôte choisie pour la mesure du potentiel de mycorhization est *Crotalaria spectabilis*. La technique d'analyse utilisée est celle élaborée par Trouvelot (1996). La problématique à laquelle nous avons essayé de répondre est la suivante : Une plante de service peut-elle augmenter de façon significative le potentiel de mycorhization d'un sol de façon durable. Cette problématique a été développée au sein de cultures d'ananas.

**Mots clefs : Mycorhization, Crotalaire, Culture d'ananas, Champignon endomycorhiziens, Systèmes de culture innovants.**

**Abstract :**

Intensive monoculture practiced in the Caribbean for most crops has greatly contributed to the reduction of biodiversity in agroecosystems. Via the project Ecophyto 2018, the regulation will require farmers to find alternatives to the use of pesticides and herbicides which are now in force. It is therefore necessary to find practical solutions to replace these treatments while being more environmentally friendly. The aim of our study is the integration of plants in rotation / association within cropping systems in Martinique for pest management and soil fertility. The preliminary study consists on measuring the potential of mycorrhizal from different soils using a bioassay with a trap plant known to be easily mycorhizable. Soils were selected in agropedoclimatic contrasted conditions. The host plant selected for the measurement of the potential mycorrhizal is *Crotalaria spectabilis*. The analytical technique used was developed by Trouvelot (1996). The problem that we tried to answer was: Can a service plant significantly increase the potential of a mycorrhizal soil sustainably? This problem has been developed in pineapple crops.

**Keywords:** Mycorrhiza, crotalaria, pineapple crop, endomycorrhizal fungus, innovative cropping systems.