

Ectomycorhization de *Cedrus atlantica* en conditions contrôlées : efficacité de deux formes d'inoculum mycélien

Hassan Boukcim^{*}, Serge Conventi et Daniel Mousain

Laboratoire de Recherches sur les Symbiotes des Racines**, Institut National de la Recherche Agronomique,
2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

(Reçu le 25 mai 2001 ; accepté le 1^{er} août 2001)

Résumé – L'effet de la forme de l'inoculum (obtenu sur tourbe-vermiculite ou par inclusion dans l'alginate) de *Tricholoma tridentinum* var. *cedretorum* et *Hebeloma sinapizans* sur la mycorhization de semis du Cèdre de l'Atlas, cultivés sur un substrat minéral, a été expérimenté en conditions contrôlées. L'utilisation de mycélium de *T. tridentinum* développé sur tourbe-vermiculite permet d'obtenir des degrés de mycorhization supérieurs à ceux enregistrés en employant du mycélium du même champignon inclus dans l'alginate, un an après l'inoculation. Le résultat inverse a été obtenu avec *H. sinapizans*. Les pourcentages d'apex mycorhizés et les teneurs en mycélium viable des racines des plants inoculés par *T. tridentinum* ont été supérieurs à ceux des plants inoculés avec *H. sinapizans*. L'obtention de mycorhizes à l'aide d'inocula mycéliens, a été réalisée sur le Cèdre de l'Atlas dans des conditions contrôlées et reproductibles. L'inoculation des semis par du mycélium d'*H. sinapizans* cultivé sur substrat solide a stimulé la biomasse de leurs parties aériennes et racinaires alors que l'inoculum de *T. tridentinum*, produit sur le même substrat, n'a permis d'augmenter significativement que la biomasse des racines. L'inoculation des plants par du mycélium d'*H. sinapizans* inclus dans l'alginate n'a été bénéfique que pour la biomasse de leurs parties aériennes.

Cedrus atlantica / *Tricholoma tridentinum* var. *cedretorum* / mycorhization / inoculum mycélien / ergostérol

Abstract – Ectomycorrhization of *Cedrus atlantica* seedlings under controlled conditions: Efficiency of two forms of mycelial inocula. The effect of two mycelial inocula (mycelia grown in peat-vermiculite saturated by a nutritive medium, or entrapped into alginate) of two ectomycorrhizal species (*Tricholoma tridentinum* var. *cedretorum* and *Hebeloma sinapizans*) was tested, under controlled conditions, on the mycorrhization of Cedar seedlings grown on mineral substrate. One year after inoculation, the percentage of infected root tips and root ergosterol contents were higher with cedars inoculated using *T. tridentinum* peat-vermiculite inoculum than using alginate one. The opposite results were obtained with *H. sinapizans*. The degrees of mycorrhization of the seedlings inoculated with *T. tridentinum* were higher than those of the seedlings inoculated with *H. sinapizans*. The mycorrhization of *Cedrus atlantica* seedlings using mycelial inocula was thus performed under controlled conditions which may be reproducible. The consequences of the inoculation of seedlings on their shoot and/or root biomass vary with the inoculum form and fungal species.

Cedrus atlantica / *Tricholoma tridentinum* var. *cedretorum* / mycorrhization / mycelial inocula / ergosterol

1. INTRODUCTION

Les contraintes pédoclimatiques particulièrement sévères qui existent dans la Région Méditerranéenne nécessitent l'utilisation de plants forestiers d'excellente qualité, capables d'assurer la réussite des reboisements, par l'amélioration du taux de leur reprise et la stimulation de leur croissance. Le rôle des mycorhizes dans la survie et la croissance des semis a été mis en évidence dans les taches de régénération du Cèdre

[13]. La mycorhization étant aléatoire en conditions naturelles, l'introduction artificielle de champignons ectomycorhiziens en association avec les racines des plants forestiers au stade de la pépinière est susceptible de les aider à pallier le choc de transplantation [26]. L'intérêt de la mycorhization contrôlée a été mis en évidence dans de nombreuses régions du monde pour diverses espèces ligneuses (pins, épicéas, douglas, chênes, ...) [14, 15, 26], mais les rares applications de cette technique au Cèdre de l'Atlas [1, 29, 34] ont

* Correspondance et tirés-à-part

Tél. : (33) 04 99 61 28 22 ; fax : (33) 04 67 54 57 08 ; e-mail : boukcim@ensam.inra.fr

** Adresse actuelle : Unité Mixte de Recherche ENSAM-INRA Sol et Environnement, Équipe Rhizosphère et Symbioses.

souvent été confrontées à la difficulté d'obtenir une colonisation généralisée et reproductible des systèmes racinaires après leur inoculation par des mycelia de diverses espèces fongiques.

Parmi les facteurs qui interviennent dans la réussite de la mycorhization contrôlée, le choix de la formulation des inocula conditionne la procédure d'inoculation et peut affecter la survie des mycelia et leur capacité à infecter des racines réceptives. Les principales formes d'inocula ectomycorhiziens utilisées en pépinière forestière sont représentées (i) par des suspensions sporales dont les inconvénients principaux résident principalement dans la variabilité génétique de l'inoculum induite par la reproduction sexuée, et aussi dans le nombre généralement limité de fructifications en conditions naturelles, (ii) par des cultures mycéliennes sur substrat solide saturé par un milieu nutritif liquide approprié, et (iii) par des mycelia cultivés en milieu liquide et inclus dans un polymère tel que l'alginate. L'immobilisation de cellules ou d'enzymes dans l'alginate réticulé par des ions Ca^{++} a été pratiquée depuis une trentaine d'années [10–12]. L'inclusion du mycélium dans l'alginate a pour intérêt de protéger les hyphes des dessèchements éventuels tout en maintenant leur viabilité et leur capacité infective à un niveau élevé jusqu'à la formation de racines réceptives à l'infection sur la plante inoculée. L'intérêt pratique de cette technique est accru lorsque les inoculations sont pratiquées au semis [9, 21].

Dans le but d'obtenir une mycorhization généralisée et reproductible de semis de Cèdre de l'Atlas avec *Hebeloma sinapizans* (Paulet) Gillet et *Tricholoma tridentinum* Sing. var. *cedretorum* Bon, nous avons expérimenté l'efficacité des deux formes d'inoculum mycélien précitées dans la mycorhization et la croissance des semis, en conditions contrôlées. Ces deux espèces fongiques sont associées au Cèdre de l'Atlas dans les conditions naturelles, l'une d'elles (*T. tridentinum* var. *cedretorum*) étant spécifiquement associée à cette essence [3].

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal et fongique

Les graines de Cèdre (*Cedrus atlantica* Manetti) proviennent du massif du Ventoux. Elles ont été fournies par le Service des Graines et Plants de l'Office National des Forêts (Jura, France). Les partenaires fongiques sont représentés par : (i) un isolat de *Tricholoma tridentinum* Sing. var. *cedretorum* Bon obtenu sur milieu Melin-Norkrans modifié par Marx [20] (MNM), à partir d'un basidiome récolté dans la cédraie de Seheb (Moyen Atlas, Maroc) établie sur des limons argileux (pH 6,7) ; (ii) un isolat d'*Hebeloma sinapizans* (Paulet) Gillet obtenu sur le milieu PO utilisé par Rapior et al. [32], à partir d'un basidiome récolté dans la cédraie de Belvetz (garrigue gardoise, France) sur rendzine plus au moins décarbonatée, argileuse à argilo-limoneuse (pH 5,9).

2.2. Germination des graines

Des graines de Cèdre sont mises à imbiber dans de l'eau distillée pendant 48 heures à 4 °C. Elles sont ensuite désinfectées en surface dans une solution de Cryptonol (140 g L⁻¹ de sulfate double d'oxyquinoléine et de potasse) à 30 ml L⁻¹ pendant 30 minutes, rincées à l'eau distillée stérile puis mises à stratifier à 4 °C dans de la tourbe humidifiée et autoclavée deux fois à 120 °C pendant 30 minutes, à 48 heures d'intervalle. La levée de dormance dure entre trois et quatre semaines en fonction du lot de graines utilisés.

2.3. Production des inocula

2.3.1. Inoculum « solide »

En conditions aseptiques, un mélange tourbe-vermiculite (1:4, v/v) est ensemencé avec des implants mycéliens prélevés à partir d'une culture active sur gélose nutritive. La tourbe a été préalablement tamisée (diamètre des mailles : 4 mm) afin d'éliminer les éléments grossiers et ensuite désinfectée par un double autoclavage d'une durée de 30 minutes chacun à 120 °C, à 48 h d'intervalle. La vermiculite est tamisée à 1,8 mm pour éliminer les particules fines puis stérilisée à l'étuve pendant 4 h à 150 °C. Le mélange de substrat est ensuite réparti dans des sacs autoclavables à raison de 2 L/sac (SIGMA B7026, capacité : 3 L/sac) munies d'une fenêtre à filtre (diamètre des pores : 0,02 µm), puis saturé par un milieu nutritif liquide approprié (MNM pour *T. tridentinum* et PO pour *H. sinapizans*) avant d'être autoclavé 20 min à 120 °C.

Les substrats ensemencés sont mis à incuber pendant cinq semaines à l'obscurité et aux températures optimales de croissance des mycelia : 16 ± 1 °C pour *T. tridentinum*, 23 ± 1 °C pour *H. sinapizans*.

2.3.2. Inoculum « alginate »

Il est préparé selon le protocole de Maupérin et al. [21]. Quarante-cinq à cinquante grammes de mycélium frais produit en culture pure dans un milieu nutritif liquide (respectivement MNM pour *T. tridentinum* et PO pour *H. sinapizans*) sous agitation rotative sont inclus, après broyage modéré pendant 10 secondes au broyeur Waring Blendor (1 litre), dans 1 litre d'alginate de sodium à 10 g L⁻¹. L'inclusion se fait en conditions aseptiques en faisant couler goutte à goutte le mélange « mycélium broyé - alginate » dans une solution de $CaCl_2$ 20 mM à travers des tubulures de 2 mm de diamètre. Les billes ainsi formées sont laissées une nuit dans du $CaCl_2$. Elles sont ensuite rincées deux fois à l'eau distillée stérile puis stockées à 4 °C pendant 48 h avant utilisation.

2.4. Inoculation des plants

Des jeunes semis de *Cedrus atlantica* âgés d'un mois sont transférés sur des caissons à brumisation pour favoriser la croissance et la ramification du système racinaire [24]. Un mois plus tard, les plants sont transférés individuellement dans des conteneurs anti-chignons de 400 mL à deux faces amovibles (Thermoflan, Le Vigan, France) remplis par un substrat minéral riche en attapulgite expansée (« Oil Dri » pur de Géorgie, US-Special, GB 3-30), tamisée à 1,8 mm pour éliminer les particules fines puis désinfectée à sec 4 h à 150 °C. Simultanément à leur transplantation, les plants sont inoculés par apport de 100 mL d'inoculum « solide » ou « alginate » par plant, au contact des racines. L'inoculum est étalé le long du système racinaire pour favoriser le contact entre les propagules fongiques infectives et les racines réceptives.

Les plants témoins correspondant aux cèdres inoculés par de l'inoculum sous forme solide ont reçu le même inoculum autoclavé deux fois pendant 20 min à 120 °C, à 48 h d'intervalle. Des plants non inoculés représentent les témoins des plants inoculés par du mycélium inclus dans l'alginate. Des répétitions de 10 plants par traitement sont mises en place selon une disposition aléatoire.

2.5. Conditions de croissance des plants

Les conditions de photopériode et de température de la chambre de croissance où se déroule l'expérience sont contrôlées [photopériode : 16/8 h, lumière/obscurité ; cycle de T° 25/18 °C ; humidité relative (HR) : 65 % ; CO₂ : 350 µl L⁻¹ ; rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) : 250 µmol m⁻² s⁻¹ (400–700 nm)]. Les cèdres sont arrosés deux fois par semaine avec de l'eau déminéralisée. Ils sont aussi fertilisés par une solution nutritive faiblement concentrée [0,2 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM NH₄Cl, 0,1 mM KNO₃, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM KH₂PO₄, 0,1 mM MgSO₄, 1 mM KCl, 0,5 % FeCl₃, 0,2 mL L⁻¹ d'une solution d'oligo-éléments [22], pH ajusté à 5,5 avant utilisation], à raison de 100 mL par plant et par semaine.

2.6. Prélèvement des plants et évaluation du degré de mycorhization des racines

Un an après l'inoculation, les systèmes racinaires de tous les plants sont examinés pour vérifier la présence ou l'absence de mycorhizes, afin d'évaluer le pourcentage de plants présentant au moins une mycorhize dans un traitement donné. Cinq plants sur dix par traitement ont été par la suite prélevés au hasard et leurs systèmes racinaires nettoyés délicatement sous jet d'eau modéré. Des comptages d'apex mycorhizés ainsi que des dosages de l'ergostérol ont été réalisés sur des échantillons de racines des plants inoculés et des plants témoins. Les biomasses fraîches et sèches des parties aériennes et racinaires ont été mesurées respectivement avant et après lyophilisation.

2.6.1. Comptage des apex mycorhizés

Le comptage des apex mycorhizés est effectué sur des systèmes racinaires frais. Le système racinaire de chaque plant est nettoyé puis sectionné en segments de 5 cm de longueur. Les comptages des apex mycorhizés sont ensuite réalisés par observations stéréomicroscopiques sur ces segments prélevés au hasard jusqu'à un total de 500 apex, ce qui permet de déterminer le pourcentage d'apex mycorhizés par plant. Ces comptages ont été complétés par des dosages de l'ergostérol contenu dans les racines lyophilisées.

2.6.2. Dosages de l'ergostérol et de la glucosamine fongique

Après comptage des apex mycorhizés, les racines sont lyophilisées puis broyées. Le dosage de l'ergostérol est effectué sur ces broyats. L'ergostérol est dosé selon le protocole de Martin et al. [19] légèrement modifié par Boukcim et Mousain [4], par spectrophotométrie après extraction au méthanol suivie d'une séparation par HPLC sur colonne. Le rendement de l'extraction au méthanol, calculé avec des racines non mycorhizées additionnées de quantités connues d'ergostérol, est de 89 %.

Les dosages de la glucosamine fongique [38] et de l'ergostérol ont été effectués sur les inocula utilisés afin d'évaluer leurs teneurs en mycélium total et viable, respectivement. Nous avons aussi déterminé les teneurs en ergostérol du mycélium extraracinaire de plants mycorhizés d'âge identique. Ces plants ont été élevés dans les

mêmes conditions de culture que les précédents, mais dans des rhizotrons en présence d'une toile à blutter séparant les racines du substrat [5]. Ces teneurs sont de 3,9 et 1,8 µg d'ergostérol par mg de mycélium sec pour *H. sinapizans* et *T. tridentinum*, respectivement. Ces valeurs permettent de convertir les teneurs en ergostérol des racines mycorhizées en teneurs en mycélium viable présent dans ces racines.

2.7. Analyse des données

Les analyses statistiques des données obtenues ont été effectuées à l'aide du test de Duncan au seuil de probabilité 0,05 et en utilisant le logiciel Statistica (Kernel version 5.1 M, Stat Soft, Inc).

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. Ectomycorhization des semis de Cèdre

Le pourcentage de plants mycorhizés après inoculation par chacune des deux espèces fongiques étudiées a été de 100 %. L'aptitude mycorhizogène d'*Hebeloma sinapizans* et de *Tricholoma tridentinum* var. *cedretorum* est ainsi mise en évidence, pour la première fois, sur un substrat de culture minéral dans des conditions susceptibles d'être reproduites. Des ectomycorhizes avaient été précédemment obtenues sur des plants de *Cedrus atlantica* inoculés par *Tricholoma tridentinum* mais ces plants étaient cultivés sur la terre de l'horizon A1 d'un sol de cédraie [29].

L'examen des systèmes racinaires des plants témoins a montré qu'ils sont indemnes de toute contamination mycorhizienne.

3.1.1. Pourcentage d'apex mycorhizés

Le comptage des apex mycorhizés met en évidence des différences significatives dans les degrés d'infection des racines de Cèdre qui varient en fonction de l'espèce fongique et de la forme de l'inoculum utilisées. Ainsi, le pourcentage d'apex mycorhizés par *T. tridentinum* diminue de plus de 50 % lorsque l'inoculum est employé sous forme de mycélium inclus dans l'alginate que lorsqu'il est obtenu sur substrat solide (figure 1A). Au contraire, pour *H. sinapizans*, les différences observées avec les deux formes d'inoculum ne sont pas statistiquement significatives (figure 1B).

Deux tendances majeures se dégagent quant à l'efficacité des deux formes d'inoculum dans la mycorhization des semis de Cèdre : le mycélium de *T. tridentinum* est plus apte à mycorhizer les racines de Cèdre lorsqu'il est cultivé sur tourbe-vermiculite que lorsqu'il est apporté dans des billes d'alginate. Par contre, les mycelia d'*H. sinapizans* sont plus infectifs lorsqu'ils sont inclus dans l'alginate. En conditions de pépinière, les index de mycorhization du Douglas et l'*Epicéa* par *Hebeloma cylindrosporum* [15, 16] et du Douglas par *Laccaria laccata* [23] ont différé suivant la forme d'inoculum (« solide » ou « alginate ») utilisée.

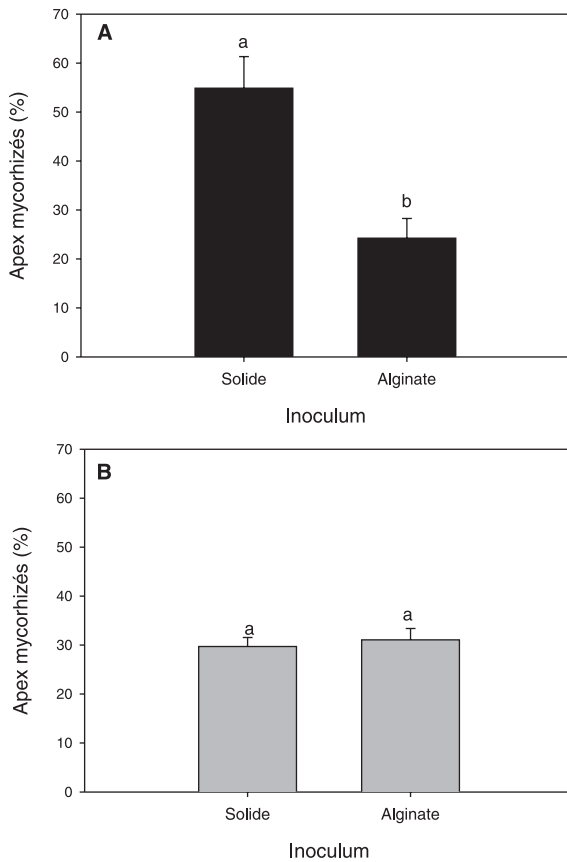


Figure 1. Pourcentages d'apex racinaires mycorhizés chez de jeunes cèdres inoculés par des mycelia de *Tricholoma tridentinum* var. *cedretorum* (A) ou *Hebeloma sinapizans* (B), développés sur substrat solide ou inclus dans l'alginate (moyenne \pm erreur standard, $n = 5$). Les teneurs suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes (test de Duncan, $P = 0,05$).

3.1.2. Teneurs des racines en mycélium viable

Les résultats des dosages d'ergostérol dans les racines des jeunes cèdres concordent avec ceux fournis par les comptages des apex mycorhizés. Ainsi, parmi les plants inoculés par *T. tridentinum*, ceux ayant reçu de l'inoculum sous forme « solide » présentent la teneur moyenne la plus élevée en biomasse mycélienne viable au niveau de leurs racines (figure 2A). À l'inverse, l'inoculation par du mycélium d'*H. sinapizans* inclus dans l'alginate conduit à une teneur moyenne des racines en mycélium viable plus élevée que celle obtenue avec l'inoculum « solide » (figure 2B). Dans des conditions voisines, en chambre de croissance, les capacités de mycorhization de semis de Pin pignon par deux espèces ectomycorhiziennes ont différé selon la forme de l'inoculum : le degré de mycorhization des pins par *Suillus collinitus* (évalué par dosages de la glucosamine et de l'ergostérol dans les racines) a été plus élevé lorsque le mycélium était inclus dans l'alginate que lorsqu'il était cultivé sur

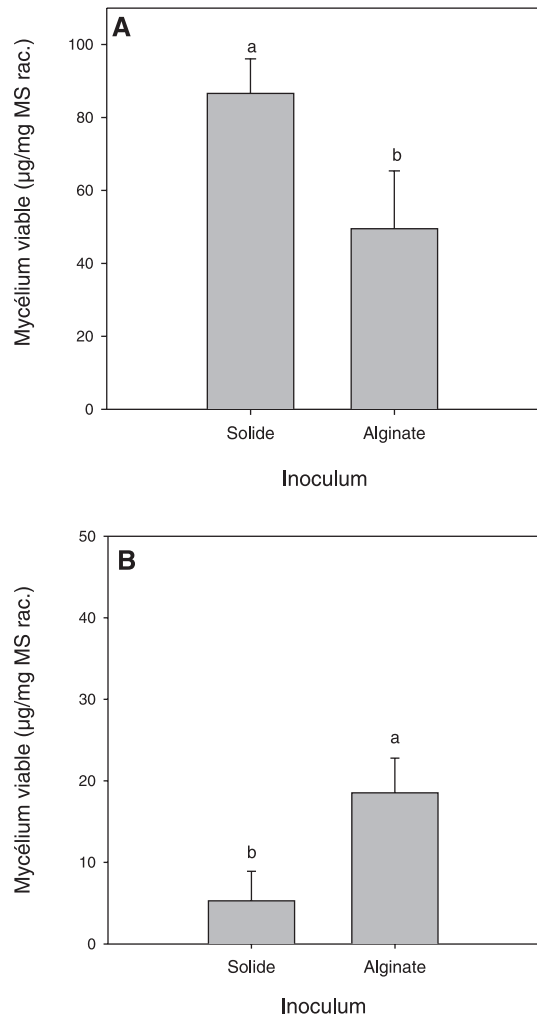


Figure 2. Teneurs en mycélium viable des racines de jeunes cèdres inoculés par des mycelia de *Tricholoma tridentinum* var. *cedretorum* (A) ou *Hebeloma sinapizans* (B), développés sur substrat solide ou inclus dans l'alginate (moyenne \pm erreur standard, $n = 5$). Les teneurs théoriques en mycélium des racines des plants témoins correspondants ont été déduites des teneurs brutes mesurées sur les plants inoculés. Les teneurs suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes (test de Duncan, $P = 0,05$).

substrat solide, alors que le mycélium de *Pisolithus tinctorius* cultivé sur tourbe-vermiculite a été particulièrement infectif [2].

Les différences d'infectivité entre les deux types d'inoculum utilisés dans le cadre de ce travail peuvent être expliquées en grande partie par le niveau de viabilité des hyphes dans les inocula qui autoriserait ou non une infection des racines plus intense pendant une période plus longue. Les dosages de glucosamine et d'ergostérol dans les inocula sont en faveur de cette hypothèse. En effet, la teneur en mycélium viable de l'inoculum de *T. tridentinum*, produit sur tourbe-vermiculite, est plus élevée que celle mesurée dans

l'inoculum « alginate » alors que la tendance inverse est observée chez *H. sinapizans* (tableau I). Ces différences vont globalement dans le même sens que celles mises en évidence par le comptage des apex mycorhizés et surtout par le dosage de l'ergostérol dans les racines. Ainsi, pour les deux espèces fongiques étudiées, c'est l'inoculum le plus concentré en mycélium viable qui a permis d'obtenir les degrés d'infection racinaire les plus élevés.

Les différences entre les biomasses fongiques totales et viables des inocula sont plus élevées pour les mycelia inclus dans l'alginate que pour ceux cultivés sur tourbe-vermiculite, notamment avec *H. sinapizans* (tableau I). Quel que soit le type d'inoculum, ces différences pourraient être attribuées en partie à une dégénérescence du contenu des hyphes [consécutivement à leur vieillissement, à l'appauvrissement du milieu de culture en éléments nutritifs essentiels ou à l'accumulation de métabolites toxiques dans le milieu de culture] ou à l'accroissement relatif des composés pariétaux (chitine ou autres). D'autre part, le dosage de l'ergostérol met en évidence une chute de viabilité consécutive à l'inclusion du mycélium des deux espèces ectomycorhiziennes dans l'alginate. La réduction des teneurs en mycélium viable des inocula « alginate » est d'environ 70 % avec *T. tridentinum* et de 50 % avec *H. sinapizans* (tableau I). La chute de la viabilité des mycelia inclus dans un polymère peut être attribuable au broyage du mycélium préalablement à son inclusion dans l'alginate. Nos observations ont, en effet, montré que les cultures de certaines espèces fongiques en routine au laboratoire ne tolèrent ni l'agitation des cultures ni la fragmentation des hyphes (cas de *Pisolithus tinctorius* et *Tricholoma cedrorum* en milieu agité). L'effet négatif de l'inclusion des mycelia dans l'alginate de calcium pourrait aussi être le résultat d'un choc osmotique induit par CaCl_2 .

La capacité du mycélium à tolérer différentes étapes de préparation de l'inoculum (broyage et inclusion) semble varier en fonction de l'espèce fongique. Ainsi, la viabilité du mycélium d'*Hebeloma crustuliniforme*, évaluée par la capacité d'émergence des hyphes à partir des billes étalées sur gélose nutritive, n'est pas affectée par une immersion des billes pendant au moins 22 h dans du chlorure de calcium 0,7 M [21] alors qu'une diminution très nette de l'activité réductrice

d'INT [chlorure de 2-(p-Iodophényl)-(p-Nitrophényl)-5-phényl Tétrazolium] d'un inoculum de *Pisolithus* sp. a été observée au cours de la polymérisation [31].

Des chutes de viabilité ont aussi été mises en évidence par dosages de la glucosamine et de l'ergostérol suite à l'inclusion des mycelia de *Pisolithus tinctorius* et de *Suillus collinitus* dans des billes d'alginate [2]. Sur gélose nutritive, les taux de reprise de la croissance de mycelia de *Pisolithus tinctorius* et de *Paxillus involutus* inclus dans l'alginate varient de 55 % à 90 % en fonction de l'espèce fongique et de l'âge de la culture [33].

Quelle que soit la méthode utilisée pour évaluer l'infection ectomycorhizienne des plants de Cèdre, des variations du degré de mycorhization des racines sont aussi observées en fonction de l'espèce fongique. Ainsi, le pourcentage moyen d'apex mycorhizés et la teneur en mycélium viable des racines sont plus élevés après leur inoculation par du mycélium de *T. tridentinum*, cultivé sur tourbe-vermiculite que par la même forme d'inoculum d'*H. sinapizans* (figures 1 et 2). Ces différences peuvent être dues à la teneur moyenne en mycélium viable dans l'inoculum « solide » de *T. tridentinum* qui est également supérieure à celle qui a été estimée dans l'inoculum « solide » de *H. sinapizans* (tableau I). Les différences observées entre les degrés de mycorhization des racines de Cèdre par les deux espèces fongiques seraient aussi attribuables à des différences dans les capacités infectieuses de ces espèces vis-à-vis des racines du Cèdre. Cette hypothèse a été illustrée dans diverses associations ectomycorhiziennes [6, 8, 36, 37].

3.2. Effet de la mycorhization sur la croissance des plants

La mycorhization des plants par *H. sinapizans* stimule la production de biomasse sèche dans leurs parties aériennes et racinaires 12 mois après l'inoculation (tableau II). Le gain de biomasse sèche des parties aériennes est d'environ 33 % lorsque *H. sinapizans* est apporté sous forme d'inoculum « solide » et de 43 % lorsqu'il est inoculé sous forme de billes d'alginate. La production de biomasse racinaire n'est

Tableau I. Teneurs en mycélium total, viable et non viable (en mg mg^{-1} de matière sèche d'inoculum) des deux formes d'inoculum utilisées (moyenne \pm erreur standard, $n = 4$). Les teneurs en mycélium total et viable sont mesurées respectivement par dosage de la chitine et de l'ergostérol dans les inocula utilisés. Les teneurs en mycélium non viable sont déduites de ces mesures.

Inoculum	Mycélium total (1)	Mycélium viable (2)	Mycélium non viable (1) - (2)
<i>T. tridentinum</i>			
Tourbe-vermiculite	0,28 \pm 0,04 a (a)	0,19 \pm 0,02 a (a)	0,09 \pm 0,02
Alginate	0,17 \pm 0,01 b (a)	0,05 \pm 0,01 c (b)	0,12 \pm 0,02
<i>H. sinapizans</i>			
Tourbe-vermiculite	0,12 \pm 0,03 b (a)	0,07 \pm 0,01 c (a)	0,05 \pm 0,03
Alginate	0,26 \pm 0,05 a (a)	0,13 \pm 0,02 b (b)	0,13 \pm 0,04

Les valeurs suivies de la même lettre dans chaque colonne ou chaque ligne (lettres entre parenthèses) ne sont pas significativement différentes (test de Duncan, $P = 0,05$).

Tableau II. Effet de l'inoculation par du mycélium de *Tricholoma tridentinum* ou d'*Hebeloma sinapizans*, cultivé sur substrat solide ou inclus dans l'alginate, sur la biomasse sèche des parties aériennes et racinaires de semis de Cèdre.

Traitement	Biomasse sèche (mg/plant)	
	Partie racinaire (PR)	Partie aérienne (PA)
A- <i>Tricholoma tridentinum</i>		
Inoculum « alginate »	4,34 ± 0,40 (a)	4,31 ± 0,37 (a)
Plants non inoculés	3,79 ± 0,11 (a)	3,53 ± 0,31 (a)
Inoculum « solide »	4,09 ± 0,20 (a)	4,25 ± 0,17 (a)
Inoculum autoclavé	3,53 ± 0,16 (b)	3,86 ± 0,20 (a)
B- <i>Hebeloma sinapizans</i>		
Inoculum « alginate »	4,03 ± 0,35 (a)	4,99 ± 0,37 (a)
Plants non inoculés	3,79 ± 0,11 (a)	3,53 ± 0,31 (b)
Inoculum « solide »	4,97 ± 0,26 (a)	5,90 ± 0,46 (a)
Inoculum autoclavé	3,36 ± 0,43 (b)	4,52 ± 0,35 (b)

Pour chacune des deux espèces fongiques et des deux formes d'inoculum, les biomasses aériennes et racinaires des plants inoculés et des plants témoins respectifs, suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (test de Duncan, $P = 0,05$).

améliorée que lorsque l'inoculum est utilisé sous forme « solide ».

D'autre part, quelle que soit la forme de l'inoculum, l'inoculation par *Tricholoma tridentinum* n'améliore pas significativement la production de biomasse sèche dans les compartiments aériens des cèdres inoculés (tableau II). Elle augmente seulement la biomasse des racines inoculées par l'inoculum « solide » (tableau II).

De nombreux travaux ont mis en évidence l'effet bénéfique de l'inoculation contrôlée par divers associés ectomycorhiziens sur la croissance des plantes hôtes. On ne dispose que de très peu de références traitant de la mycorhization du genre *Cedrus* ou des effets symbiotiques des deux espèces fongiques utilisées dans ce travail sur la croissance d'autres plantes hôtes. Les effets de plusieurs autres espèces fongiques appartenant au genre *Hebeloma* sur la croissance des ligneux associés (*Pinus*, *Tsuga*, *Picea*, *Quercus*, etc.) varient en fonction des espèces fongiques et ligneuses ainsi que des conditions de culture [6, 7, 18, 27, 30]. L'inoculation de jeunes cèdres en pépinière, par le mycélium d'un isolat de *Tricholoma tridentinum* (sur les deux étudiés) cultivé sur substrat solide, a stimulé leur croissance en hauteur après 7 mois sur sol de cédraie désinfecté [29]. D'autre part, une augmentation de la hauteur de jeunes cèdres a été observée 15 mois après leur inoculation par deux autres espèces fongiques, *Laccaria laccata* et *Hebeloma crustuliniforme*, isolées respectivement sous *Tsuga mertensiana* et *Picea abies* [28]. Une stimulation de la croissance en hauteur de l'ordre de 45 % a été observée en pépinière chez de jeunes cèdres inoculés par une suspension sporale de *Tuber albidum* [25]. Cet

effet de *T. albidum* en pépinière a été confirmé sur le terrain après quatre ans de plantation dans une rendzine [17].

Les résultats de notre étude ne montrent aucune corrélation entre la stimulation de la croissance des plants et le degré d'infection mycorhizienne de leurs systèmes racinaires, évalué par comptage des apex colonisés ou par dosage de l'ergostérol. D'autres travaux sur la mycorhization de semis de *Cedrus atlantica* en conditions contrôlées ont abouti à la même conclusion [3].

4. CONCLUSION

L'obtention de mycorhizes de façon généralisée et relativement intense chez le Cèdre de l'Atlas, par utilisation d'inocula mycéliens d'espèces ectomycorhiziennes observées en cédraies, constitue le résultat majeur de ce travail. Cette obtention a été réalisée dans des conditions contrôlées qui la rendent reproductible [3]. Les résultats de cette étude ont été appliqués avec succès à la mycorhization de plants de Cèdre de l'Atlas avec *T. tridentinum* var. *cedretorum* dans un dispositif expérimental de pépinière [4]. Ils ont aussi permis, à cette échelle, de préparer des séries d'au moins 300 plants mycorhizés par ce même champignon qui ont été mis en place dans un dispositif expérimental de terrain (Mousain et Bourdenet, comm. pers.).

La réussite de la mycorhization de semis de Cèdre dépend du potentiel infectieux des isolats mycorhiziens vis-à-vis des racines, de l'optimisation des conditions de culture in vitro de ces isolats, mais aussi du choix de formulations efficaces des inocula. En effet, les résultats de notre étude montrent que l'efficacité des deux formes (« solide » et « alginate ») d'inoculum dans la mycorhization du Cèdre varie en fonction de l'espèce fongique. Ces différences peuvent être expliquées en grande partie par les teneurs des inocula en mycélium viable, d'où l'intérêt d'évaluer le niveau de viabilité des inocula avant leur utilisation en pépinière. L'utilisation comparative des dosages de glucosamine et d'ergostérol permet cette évaluation en rendant compte du rapport entre les biomasses viable et totale dans les inocula. Ce rapport est généralement plus élevé dans des mycelia cultivés sur substrat solide que dans ceux inclus dans l'alginate.

Le comptage des apex mycorhizés et le dosage de l'ergostérol dans les racines sont des méthodes complémentaires qui permettent d'évaluer le degré de mycorhization des systèmes racinaires. À titre d'exemple, l'impact du champignon symbiotique dans la dynamique d'utilisation des glucides par les plants mycorhizés est mieux évalué par le dosage de l'ergostérol dans les racines que par les deux autres méthodes [35]. Toutefois, l'examen visuel, stéréomicroscopique ou microscopique, des racines offre une première estimation de l'état de mycorhization des plants. Il permet de rendre compte de la répartition des mycorhizes sur les systèmes racinaires ainsi que de l'état sanitaire des racines (taux de nécroses,...). Il a

aussi pour intérêt de permettre la caractérisation morphologique des mycorhizes et, parfois, leur identification.

La forme de l'inoculum a aussi une incidence sur la biomasse de la plante hôte, un an après l'inoculation contrôlée (la forme « solide » a souvent un effet favorable), mais cet effet est également fonction de l'espèce mycorrhizogène.

Outre la forme de l'inoculum utilisé, d'autres facteurs importants de la mycorrhization contrôlée du Cèdre de l'Atlas ont été expérimentés : architecture du système racinaire [5], régime de fertilisation phosphatée après inoculation mycorrhizienne [4], etc. Sur la base des résultats obtenus dans la présente étude, l'optimisation de la technologie d'inoculation ectomycorrhizienne des plants de Cèdre de l'Atlas devrait porter, entre autres facteurs, sur la réduction de la dose d'inoculum appliquée.

Remerciements : Ce travail a été réalisé dans le cadre du Programme de Recherche Agronomique pour le Développement (PRAD) Maroc-France 97-10 (1997-1998) et du Contrat ERBIC 18-CT 97-0197 (MYRISME) (INCO-DC, UE DG XII) (1998-2001). H. Boukcim a bénéficié d'une allocation de thèse délivrée par le Ministère français des Affaires Étrangères. Les auteurs remercient Jean Garbaye (UMR Interactions Arbre-Microorganismes, INRA-UHP Nancy) pour la lecture attentive et critique de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

- [1] Abourouh M., Essai de mycorrhization en pépinière par les spores de *Pisolithus tinctorius*, Ann. Rech. For. Maroc 26 (1993) 126-137.
- [2] Boukcim H., Étude cinétique de la mycorrhization contrôlée du Pin pignon (*Pinus pinea* L.) par des isolats ectomycorrhiziens de *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Desv. et *Suillus collinitus* (Fr.) O. Kuntze, Mémoire de diplôme d'Ingénieur Forestier, École Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts, Nancy, 1995, 70 p.
- [3] Boukcim H., Essai d'optimisation de la mycorrhization contrôlée du Cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Manetti), Thèse de Doctorat, École Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts, Paris, France, 1999, 224 p.
- [4] Boukcim H., Mousain D., Effets de la fertilisation phosphatée sur la mycorrhization, la croissance et la nutrition en phosphore et en azote de semis de Cèdre (*Cedrus atlantica* Manetti) inoculés en pépinière par *Tricholoma tridentinum* Sing. var. *cedretorum* Bon, Ann. For. Sci. (2001) 289-300.
- [5] Boukcim H., Pagès L., Plassard C., Mousain D., Effects of N-fertilization on root system architecture and receptivity to mycorrhizal infection of cedar seedlings, Tree Physiol. 21 (2001) 109-115.
- [6] Conjeaud C., Étude de l'influence de l'ectomycorrhization sur l'utilisation du carbone par le Pin maritime (*Pinus pinaster*). Interactions avec les nutriments phosphatée et azotée, Thèse de Doctorat, Univ. de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 1996, 141 p.
- [7] Dosskey M.G., Linderman R.G., Boersma L., Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas fir seedlings by some ectomycorrhizas, New Phytol. 115 (1990) 269-274.
- [8] Garbaye J., Compétitivité des champignons ectomycorrhiziens. Premiers résultats et application à la sélection de souches pour la mycorrhization contrôlée du Hêtre et du Chêne rouvre dans le Nord-Est de la France, Rev. For. Fr. XXXVI-1 (1984) 33-43.
- [9] Garbaye J., Wilhelm M.E., Facteurs limitants et aspects dynamiques de la mycorrhization contrôlée de *Fagus sylvatica* Lin, par *Hebeloma crustuliniforme* (Bull. ex. Saint-Amans), Qué. sur tourbe fertilisée, Ann. Sci. For. 42 (1) (1985) 53-68.
- [10] Glicksman A.H., Gum technology in the food industry, Academic Press, New York, 1969.
- [11] Hackel U., Klein J., Megnet R., Wagner F., Immobilization of microbial cells in polymeric matrices, Eur. J. Appl. Microbiol. 1 (1975) 291-293.
- [12] Kierstan M., Bucke C., Immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels, Biotechnol. Bioeng. 19 (1977) 387-397.
- [13] Lepoutre B., Premiers essais de synthèse sur le mécanisme de régénération du Cèdre dans le Moyen Atlas marocain, Ann. Rech. For. Maroc 7 (1963) 1-20.
- [14] Le Tacon F., Alvarez I.F., Bouchard B., Henrion B., Jackson R.M., Luff S., Parlade J.I., Pera J., Stenström E., Villeneuve N., Walker C., Variations in Field Response of Forest Trees to Nursery Ectomycorrhizal inoculation in Europe, in: Lewis D.H., Fitter A.H., Alexander I.J. (Eds.), Mycorrhizas in Ecosystems, Proceedings of the Third European Symposium on Mycorrhizas, University of Sheffield, August 19-23, 1991, pp. 119-134.
- [15] Le Tacon F., Jung G., Michelot P., Mugnier J., Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorrhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères, Ann. Sci. For. 40 (2) (1983) 165-176.
- [16] Le Tacon F., Jung G., Mugnier J., Michelot P., Mauperin C., Efficacy in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels, Can. J. Bot. 63 (1984) 1664-1668.
- [17] Le Tacon F., Mousain D., Garbaye J., Bouchard D., Churin J.L., Argillier C., Amirault J.M., Géré B., Mycorrhizes, pépinières et plantations forestières en France, Rev. For. Fr. XLIX (n. s.) (1997) 131-154.
- [18] MacFall J., Slack S.A., Effects of *Hebeloma arenosa* and phosphorus fertility on growth of red Pine (*Pinus resinosa*), Can. J. Bot. 69 (1991) 372-379.
- [19] Martin F., Delaruelle C., Hilbert J.L., An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas, Mycol. Res. 94 (8) (1990) 1059-1064.
- [20] Marx D.H., The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria, Phytopathology 59 (1969) 153-163.
- [21] Maupérin C., Mortier F., Garbaye J., Le Tacon F., Carr G., Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel, Can. J. Bot. 65 (1987) 2326-2329.
- [22] Morizet S., Mingeau M., Influence des facteurs du milieu sur l'absorption hydrique (étude effectuée sur tomate décapitée en exudation). Facteurs nutritionnels, Ann. Agron. 27 (1976) 183-205.
- [23] Mortier F., Le Tacon F., Garbaye J., Effect of dose and formulation of *Laccaria laccata* inoculum on mycorrhizal infection and growth of Douglas fir in a nursery, Agric. Ecosyst. Environ. 28 (1989) 301-309.
- [24] Mousain D., Étude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorrhiziens, Thèse de Doctorat d'État, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II, 1989, 279 p.
- [25] Mousain D., Falconnet G., Gruetz J., Chevalier G., Tillard P., Bousquet N., Plassard C., Cleyet-Marel J.C., Controlled ectomycorrhizal development of mediterranean forest seedlings in the nursery. First results and prospects, in: Sylvia D.M., Hung L.L., Graham J.H. (Eds.), Mycorrhizae in the next decade. Practical applications and research priorities, Proceedings of the 7th North American Conference On Mycorrhizae, May 3-8, Gainesville, Univ. Florida, Gainesville (USA), 1988, p. 129.
- [26] Mousain D., Plassard C., Argillier C., Sardin T., Leprince F., El Karkouri K., Arvieu J.C., Cleyet-Marel J.C., Stratégie d'amélioration de la qualité des plants forestiers et des reboisements méditerranéens par utilisation de la mycorrhization contrôlée en pépinière, Acta bot. Gallica 141 (4) (1994) 571-580.
- [27] Mousain D., Poitou N., Delmas J., La symbiose mycorrhizienne : résultats obtenus avec l'*Hebeloma cylindrosporum* et le *Pisolithus tinctorius*, et perspectives d'application agronomique, in: Delmas J. (Ed.), Mushroom Science X (Part 1), Proceedings of the 10th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Bordeaux, France, 1978, Bordeaux, 1979, pp. 949-956.

- [28] Nezzar-Hocine H., Associations mycorhiziennes naturelles de *Cedrus atlantica* dans le massif de Djurdjura (Algérie) et mycorhization contrôlée, Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 1998, 479 p.
- [29] Nezzar-Hocine H., Perrin R., Halli-Hargas R., Chevalier G., Ectomycorrhizal with *Cedrus atlantica* (Endl) Manetti ex Carrière. I. Mycorrhizal synthesis with *Tricholoma tridentinum* Singer var. *cedretorum* Bon (Short note), *Mycorrhiza* 8 (1998) 47–51.
- [30] Plassard C., Données sur la nutrition azotée de symbiotes ectomycorhiziens : *Pinus pinaster*, *Hebeloma cylindrosporum* et *Pisolithus tinctorius*, Thèse de Doctorat d'État, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II, France, 1989, 135 p.
- [31] Prin Y., Neyra M., Ducouso M., Dommergues Y.R., Viabilité d'un inoculum déterminée par l'activité réductrice de l'INT, *Agron. Trop.* 44 (1989) 13–19.
- [32] Rapior S., Andary C., Mousain D., *Cortinarius* setion *Orellani*: isolation and culture of *Cortinarius orellanus*, *Trans. br. Mycol. Soc.* 1 (1987) 41–44.
- [33] Rodrigues L.S., Megumi Kasuya M.C., Chaer Borges A., Viability of ectomycorrhizal fungus mycelium entrapped in calcium alginate gel, *Mycorrhiza* 8 (1999) 263–266.
- [34] Ruehle J.L., Marx D.H., Abourouh M., Development of *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris* ectomycorrhizae on seedlings of coniferous trees important to Morocco, *Ann. Rech. For. Maroc* 21 (1981) 283–296.
- [35] Sung S.J., White L.M., Marx D.H., Orosina W.J., Seasonal ectomycorrhizal fungal biomass development on loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seedlings, *Mycorrhiza* 5 (1995) 439–447.
- [36] Torres P., Honrubia M., Inoculation of containerized *Pinus halepensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arhizus* (Pers.) Rauschert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. M. Fr. and *Suillus collinitus* (Fr) O. Kuntze, *Ann. Sci. For.* 51 (1994) 521–528.
- [37] Tyminska A., Le Tacon F., Effect of three ectomycorrhizal fungi on growth and phosphorus uptake of *Pinus sylvestris* seedlings at increasing phosphorus levels, *Can. J. Bot.* 64 (1986) 2753–2757.
- [38] Vignon C., Plassard C., Mousain D., Salsac L., Assay of fungal chitin and estimation of mycorrhizal infection, *Physiol. Vég.* 24 (1986) 201–207.