

D. Mousain, C. Bonnin, L. Mauré, P. Scheromm, K. El Karkouri, J. C. Cleyet-Marel, C. Argillier & T. Sardin

Stratégie d'amélioration de la qualité des plants forestiers et des reboisements méditerranéens par utilisation de la mycorrhization contrôlée en pépinière

Abstract

Mousain, D., Bonnin, C., Mauré, L., Scheromm, P., El Karkouri, K., Cleyet-Marel, J. C., Argillier, C. & Sardin, T.: A strategy for quality improvement of forest seedlings and mediterranean reforestation by means of controlled mycorrhizal infection in nurseries. – *Bioconea* 5: 375-387. 1996. – ISSN 1120-4060.

General aspects of the structure of forest tree mycorrhizae and of the physiological and ecological consequences of the establishment of symbiosis are reviewed. A long-term research programme on the use of controlled mycorrhizal infection to improve the quality of the forest seedlings and mediterranean reforestation is described, and preliminary results are presented: obtention of mycorrhizal isolates suitable for mediterranean forest species; screening of these isolates using physiological criteria; production of mycorrhizal seedlings and characterization of the mycorrhizae; measurement of the physiological effects of mycorrhizal infection in the nursery; definition of the ecological ability of selected isolates; set-up and follow-up of the ecology and ecophysiology of the experimental wood lots.

Les mycorrhizes des arbres forestiers

Dans les conditions naturelles, la plupart des arbres forestiers vivent en symbiose avec des champignons. Cette association engendre des organes mixtes mycélium-racines, appelés mycorrhizes, dans le système racinaire des plantes hôtes. On rencontre plusieurs types de mycorrhizes se différenciant suivant leur morphologie et anatomie, et les champignons qui les génèrent.

Les endomycorhizes. – Dans ces organes, non distinguables à l'œil nu, les hyphes externes ne forment pas de manchon autour des racines mais un réseau dont le développement peut être considérable. Le mycélium pénètre dans les racines en franchissant les parois mais pas le plasmalemme des cellules-hôtes du cortex, ou en colonisant les méats intraracinaires. Le sous-type d'endomycorhizes où le mycélium forme des suçoirs (arbuscules) et des organes de réserve (vésicules) à l'intérieur des racines concerne plu-

sieurs espèces d'arbres qui ne constituent généralement pas des massifs forestiers (genres *Platanus*, *Acer*, *Populus*, *Alnus*, *Fraxinus*, *Cupressus*, *Sequoia*, *Podocarpus*, etc.) Les champignons qui forment ces endomycorhizes à vésicules et arbuscules appartiennent à la famille des *Endogonaceae*.

Les ectomycorhizes. – Ces organes, visibles à l'œil nu, se distinguent par leurs formes courtes et épaisses. Chez les pins, ils se présentent sous forme de racines courtes, simples ou ramifiées dichotomiquement. Dans les *Abietaceae* autres que les pins et chez la plupart des angiospermes, les ectomycorhizes peuvent avoir un port pyramidal caractéristique. Le mycélium progresse entre les cellules du cortex racinaire de ces organes au niveau de la lamelle moyenne pour constituer un réseau mycélien intercellulaire qui ne traverse jamais la paroi des cellules vivantes. Simultanément, un manteau mycélien formé d'hyphes agglomérées se constitue autour de la racine. A partir de ce manteau, se développe un réseau mycélien extramatriciel composé d'hyphes individuelles ou de cordons mycéliens qui pénètrent plus profondément dans le sol que les premiers. Ce réseau mycélien externe assure une très grande surface de contact entre le sol et la racine.

Les ectomycorhizes ne se rencontrent que sur des espèces ligneuses ne représentant pas plus de 3 % des taxons végétaux mais dont l'intérêt économique et sylvicole est considérable. La majorité des champignons ectomycorhizogènes sont des hyménomycètes (genres *Boletus*, *Suillus*, *Amanita*, *Lactarius*, *Cortinarius*, etc.) ou des gastéromycètes (genres *Rhizopogon*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, etc.), mais de nombreux ascomycètes (p. ex. les genres *Tuber*, *Terfezia*, et deux espèces d'*Endogone*, *E. lactiflua* Berk. & Broome: Fassi 1965, et *E. eucalypti*, nom. inval.: Warcup 1975) peuvent aussi former des ectomycorhizes. Des ecto- et des endomycorhizes sont souvent présentes simultanément sur des espèces ligneuses appartenant aux *Salicaceae*, *Juglandaceae*, *Myrtaceae*, *Cesalpiniaceae*, *Mimosaceae*, etc.

Les ectendomycorhizes. – Elles possèdent à la fois des caractères d'ectomycorhizes (présence d'un réseau mycélien intercellulaire et d'un manteau souvent peu épais) et d'endomycorhizes (franchissement des parois des cellules hôtes par les hyphes mycéliennes). Ce type de mycorhizes, notamment présent chez les *Pinaceae* en pépinière, est souvent produit par des ascomycètes.

Les champignons mycorhizogènes ne pénètrent jamais dans les tissus du méristème apical, ni dans le cylindre central des racines.

Schématiquement, la plante hôte approvisionne le champignon symbiotique en glucides. En retour, celui-ci absorbe les éléments minéraux et les transfère à la plante hôte. Ces échanges ont lieu à l'interface constituée par la juxtaposition de la paroi des hyphes mycéliennes et de la paroi des cellules racinaires, au niveau du réseau mycélien intercellulaire des ectomycorhizes dont il sera traité exclusivement dans ce qui suit.

L'effet bénéfique de l'ectomycorhization sur la croissance des plantes est surtout observé dans des sols où la disponibilité en éléments minéraux est faible. Cette stimulation de croissance de la plante hôte est attribuable à l'amélioration de plusieurs processus physiologiques et écologiques: nutrition phosphatée et azotée, absorption de l'eau par la plante hôte et tolérance à la sécheresse, au calcaire et aux métaux lourds, utilisation du fer ferrique.

La mycorhization contrôlée en pépinière pour améliorer la qualité des plants forestiers et des reboisements méditerranéens

La forêt méditerranéenne joue un rôle essentiel dans la protection des sols, la conservation des nappes, la restauration des paysages, la production de bois et autres produits forestiers, et la reconversion des terres délaissées par l'agriculture. L'application des nouvelles orientations de la Politique Agricole Commune requiert l'amélioration de la qualité des reboisements dans la région méditerranéenne. La crise de transplantation, difficulté majeure du reboisement, est aggravée dans cette région aux fortes contraintes édaphiques (sols à faible teneur en éléments minéraux assimilables, souvent très calcaires, déficitaires en eau, et au potentiel mycorhizogène faible ou nul), climatiques (limitant la période de plantation) et économiques. Il en résulte que les taux de reprise des jeunes arbres à la plantation sont médiocres et que les coûts des reboisements sont trop élevés. L'utilisation de la mycorhization contrôlée – ensemble de techniques visant à associer artificiellement une plante hôte et un champignon sélectionné pour son efficacité et sa compétitivité, dès le stade de la pépinière – représente un des moyens susceptibles d'améliorer la qualité des plants forestiers produits et celle des reboisements dans la région méditerranéenne. Pour réaliser cet objectif, le programme suivant est mis en œuvre: obtention d'isolats mycorhizogènes d'espèces forestières méditerranéennes; criblage de ces isolats suivant des critères physiologiques; production de plants mycorhizés de façon contrôlée en pépinière et caractérisation des mycorhizes obtenues; mesure des effets physiologiques de la mycorhization en pépinière; définition de la compétence écologique des isolats sélectionnés et mise en place et suivi écologique et écophysologique de boisements expérimentaux.

Matériaux et méthodes

Obtention d'isolats mycorhizogènes d'espèces forestières méditerranéennes

De nombreux isolats ont été obtenus *in vitro* à partir de sporophores de basidiomycètes ectomycorhiziens relevés dans des peuplements de *Pinus pinea* L., *P. halepensis* Mill., *P. sylvestris* L., *P. nigra* Arnold subsp. *nigra*, *Cedrus atlantica* (Endl.) Carrière et *Abies cephalonica* Loudon. Les principaux isolats obtenus sous les pins appartiennent aux genres *Suillus* (*S. collinitus* (Fr.) Kuntze, *S. bellini* (Inzenga) Watling, *S. granulatus* (L. : Fr.) Kuntze var. *mediterraneensis*, *S. bovinus* (L. : Fr.) Kuntze, *S. granulatus* (L. : Fr.) Kuntze, etc.), *Rhizopogon*, *Lactarius* et *Hebeloma* et aux espèces *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Desv., *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. et *Laccaria laccata* (Scop. : Fr.) Berk. & Broome. Un isolat de *Rhizopogon rubescens* var. *ochraceus* A. H. Sm. a été obtenu à partir de mycorhizes apparues fortuitement sur les racines de pins cultivés en pépinière, en liaison avec des sporophores de cette espèce. Dans un peuplement forestier équienne, la composition spécifique des communautés de champignons ectomycorhiziens varie avec le temps (Mason & al. 1983; Garbaye & al. 1986). Aux espèces mycorhiziennes intervenant à un stade précoce ("early-stage" des auteurs anglo-saxons) s'ajoutent les champignons dits "tardifs" qui constituent l'essentiel de la macroflore fongique des peuplements forestiers (russules, lactaires, bolets, cortinaires, tricholomes, chanterelles

etc.) (Garbaye 1991). La plupart des isolats de notre collection appartiennent à la première catégorie. D'autre part, certaines espèces de basidiomycètes sont connues pour être associées exclusivement à un genre (voire à une espèce) d'arbre hôte. C'est le cas de *Suillus grevillei* (Klotzsch) Singer avec le genre *Larix*; d'autres *Suillus* (*S. bovinus*, *S. luteus*, *S. granulatus*) et beaucoup de *Rhizopogon* ne s'associent qu'aux pins. Il existe même des cas où des champignons d'espèces très voisines diffèrent par leur spécificité: par exemple, *Lactarius deliciosus* Fr., *L. salmonicolor* Heim & Leclair et *L. deterrimus* Gröger sont respectivement inféodés aux pins, sapins et épicéas (Garbaye 1991). De plus, pour un même partenariat spécifique, la compatibilité varie avec l'origine génétique ou géographique des partenaires (Malajczuk & al. 1990).

L'aptitude mycorhizogène des isolats obtenus est vérifiée au laboratoire, en conditions axéniques ou non (sachets de croissance, conteneurs), vis-à-vis de diverses plantes hôtes cultivées sur substrat artificiel. Il est nécessaire de rétablir périodiquement cette aptitude par synthèse de mycorhizes in vitro, consécutivement à la vérification initiale. Des connaissances plus approfondies sur les bases cellulaires et moléculaires de l'interaction plante-champignon seraient très utiles, notamment en ce qui concerne les phénomènes de reconnaissance entre les partenaires symbiotiques (émission de molécules signal) (Bonfante & Scannerini 1992).

Criblage d'isolats suivant des critères physiologiques

Plusieurs critères sont retenus au stade du laboratoire pour cribler les souches mycorhiziennes bien que la sélection définitive de ces souches ne puisse intervenir qu'à la suite des essais en pépinière et en boisements expérimentaux. Le choix de ces critères tient compte des conditions écologiques des milieux de transplantation.

Aptitude à l'utilisation des phosphates organiques et minéraux du sol. – Le phosphore organique représente une part importante du phosphore total des litières et des horizons superficiels des sols. La libération d'orthophosphate à partir des phosphates organiques est due à l'activité des phosphatases. La mesure de cette activité sur des mycelia dans des conditions standard permet d'estimer l'aptitude potentielle de ces mycelia à hydrolyser les phosphates organiques. Avec le substrat le plus souvent utilisé au laboratoire, le para-nitrophényl phosphate (PNPP), on obtient un mélange équimolaire d'orthophosphate (Pi) et de para-nitrophénol (PNP) dans le milieu réactionnel.

Parmi 8 isolats mycorhizogènes des pins, les activités phosphatases les plus élevées sont observées dans 3 isolats de *Suillus collinitus*, et les plus faibles dans les mycelia de *Pisolithus tinctorius* (n° 9) et *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. (n° 1) (Fig. 1). Il reste à vérifier que l'aptitude du mycélium de *S. collinitus* à hydrolyser le PNPP s'exerce aussi vis-à-vis d'un phosphate naturel tel que le phytate (hexaphosphate d'inositol).

La plupart des réserves phosphatées du sol sont immobilisées dans des minéraux, ce qui les rend peu accessibles pour la plante. L'aptitude des champignons mycorhiziens à solubiliser ces minéraux, qui résulte à la fois de leur pouvoir d'acidification du milieu et de leur capacité à excréter des anions organiques très réactifs, est variable en fonction des conditions écologiques, notamment la présence et la concentration en ions Ca^{2+} et HCO_3^- en sol calcaire. Il s'agira de déterminer la part des différents mécanismes mis en

œuvre par le champignon (excrétion de protons et d'acides organiques, respiration) pour acidifier le milieu de culture saturé en CaCO_3 . Le criblage portera en particulier sur la capacité des isolats à excréter de l'acide oxalique en milieu carbonaté.

Capacité d'assimilation du nitrate. – L'utilisation rationnelle de la symbiose implique aussi de cribler les souches mycorhiziennes suivant leur capacité à assimiler le nitrate, forme d'azote minéral prédominante en sol calcaire. La mesure d'activité nitrate réductase (ANR), réalisée in vitro dans des conditions optimales de pH, température et disponibilité en substrat, est la seule méthode qui permette d'évaluer correctement la capacité de réduction du nitrate par une espèce fongique donnée. La fiabilité de cette méthode, mise au point à l'origine sur *Hebeloma cylindrosporium* Romagn., a été vérifiée sur d'autres espèces fongiques (Plassard & al. inéd.). La mesure d'ANR in vitro est donc utilisable pour comparer les capacités d'assimilation du nitrate dans divers isolats mycorrhiziens employés dans des essais de mycorhization contrôlée.

Tolérance à la contrainte osmotique. – Le criblage d'une dizaine d'isolats de champignons ectomycorhiziens suivant leur capacité à tolérer une contrainte osmotique a été réalisé en utilisant le glucose comme osmoticum. Les concentrations en glucose du milieu de culture (55, 110, 275 et 550 mM) correspondent à des pressions osmotiques externes de -0.14, -0.27, -0.68 et -1.36 MPa, respectivement (1 MPa = 10 bars). En présence de glucose 550 mM, les mycelia d'isolats de quatre espèces (*Rhizopogon roseolus*, *Suillus bellinii*, *Pisolithus tinctorius* et *S. collinitus*) ont une croissance significative et ajustent convenablement leur pression osmotique interne à celle du milieu ($Y_p = -1.2$ à -1.4 MPa), contrairement aux mycelia d'*Hebeloma edurum* Métrod et *Laccaria*

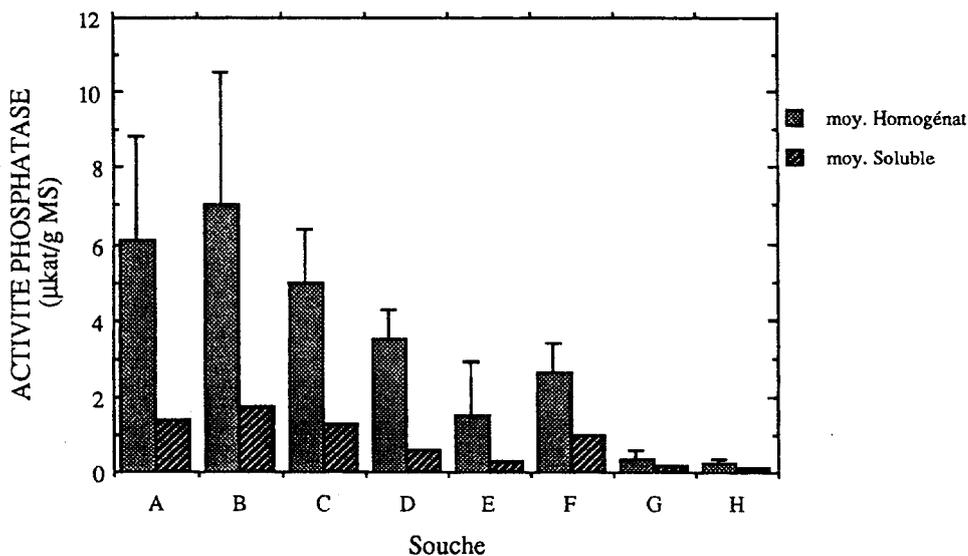


Fig. 1. Activités phosphatases des thalles d'isolats de basidiomycètes ectomycorhiziens. – A-D: *Suillus collinitus* n° 2, 6, 8 et 9; E: *Suillus bovinus* n° 10; F: *Suillus granulatus* n° 5; G: *Pisolithus tinctorius* n° 9; H: *Rhizopogon roseolus* n° 1.

laccata qui ont une croissance nulle dans ces conditions (Fig. 2). Ce type de criblage permettra d'orienter le choix des souches utilisables en association avec les pins méditerranéens dans des conditions de forte contrainte hydrique, en pépinière ou en boisement.

Essais de mycorhization contrôlée de plants forestiers en pépinière

Ces essais comportent la production d'un inoculum fongique de qualité, l'inoculation mycorhizienne d'arbres juvéniles cultivés sur substrat artificiel et le contrôle de la mycorhization qui implique la caractérisation des mycorhizes obtenues.

Production d'inoculum fongique. – L'inoculum mycorhizien est produit classiquement en laboratoire par culture de mycélium sur mélange de vermiculite (ou de perlite) et de tourbe (4 : 1, v/v) saturé par des solutions nutritives adaptées aux besoins des champignons ectomycorhiziens. Cette production en unités de 0.5 litres est réalisée en 10 semaines. Un essai de préparation d'inoculum de *Pisolithus tinctorius* sur milieu liquide selon une méthode dérivée de celle de Gagnon & al. (1987) a conduit à un pourcentage de pins laricios de Calabre mycorhizés inférieur à celui obtenu avec la technique précédente, bien que le degré d'infection des pins soit équivalent dans les deux traitements (Tableau 1). La production d'un inoculum de qualité peut être optimisée sur milieu solide, en agissant sur quelques paramètres respirométriques de la croissance, et sur milieu liquide, en incluant le mycélium dans un gel d'alginate de calcium. Ce procédé, éprouvé pour quelques espèces ectomycorhiziennes (Le Tacon & al. 1985; Maupérin & al. 1987; Kuek & al. 1992), nécessite d'être adapté à d'autres espèces, en particulier *Suillus collinitus*. Les améliorations recherchées devraient permettre d'allonger la

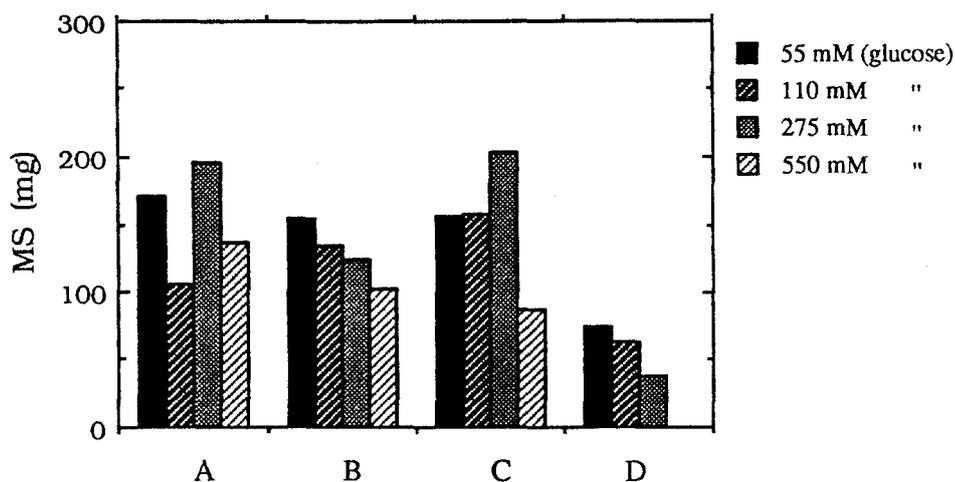


Fig. 2. Evolution de la matière sèche produite par quatre isolats de basidiomycètes en fonction de la concentration en glucose du milieu. – A: *Suillus bellinii* n° 10; B: *Rhizopogon roseolus* n° 1; C: *Suillus collinitus* n° 9; D: *Laccaria laccata* n° 5. Pour les souches A-C, les variations de la matière sèche ne sont pas significativement différentes à $p = 0.05$.

Tableau 1. Résultats de l'inoculation mycorhizienne de pins laricios de Calabre par du mycélium de *Pisolithus tinctorius* (isolat n° 19) cultivé selon deux méthodes différentes. – Inoculum: 1 = préparé sur vermiculite-tourbe selon la technique classique; 2 = préparé sur milieu liquide selon une méthode dérivée de celle de Gagnon & al. (1987). Le degré d'infection des racines est exprimé en μg de glucosamine (issue de l'hydrolyse acide de la chitine fongique) par mg de matière sèche de racine. Les intervalles de confiance des moyennes sont indiqués pour $p = 0.05$.

Inoculum	Effectif inoculé	Mycorhization (% des plants inoculés)	Degré d'infection ($\mu\text{g mg}^{-1}$)
1	96	88.5 \pm 6.5	5.26 \pm 1.24
2	94	40.4 \pm 10.1	5.27 \pm 2.46

période de survie de l'inoculum dans le substrat de culture des arbres, de manière qu'elle coïncide avec le stade de réceptivité des racines à l'infection par le champignon.

Inoculations mycorhiziennes. – Ces inoculations sont réalisées à la Pépinière Administrative des Milles-Aix-en-Provence (Direction Départementale de l'Agriculture des Bouches-du-Rhône), en collaboration avec le Cemagref (Division Forêt Méditerranéenne). L'inoculum est appliqué au contact de plants âgés de 2 à 3 mois qui sont cultivés en conteneurs de type WM sur un mélange comprenant, à volumes égaux, de la tourbe et soit du compost d'écorce de pins, soit de la vermiculite ou de la perlite. Outre les conditions climatiques, le stade de développement des plants ou la conservation de l'aptitude mycorhizogène de l'inoculum, la fertilisation minérale des plants peut représenter un facteur majeur de l'établissement des mycorhizes, ainsi que l'indiquent les résultats de l'inoculation mycorhizienne de pins pignons par un isolat de *Suillus collinitus* (Tableau 2).

Contrôle de la mycorhization. – Cette opération pose le problème de la caractérisation des ectomycorhizes dont plusieurs sont identifiables d'après leur morphologie et la couleur du manchon fongique (mycorhizes de *Pisolithus tinctorius*, *Paxillus involutus* et *Cenococcum geophilum* Fr., etc.). Des ornements particuliers du manchon ou des hyphes extramatricielles permettent de distinguer les mycorhizes de différentes espèces de *Tuber* (Chevalier 1974). Cependant, la convergence morphologique et anatomique des mycorhizes est la règle pour de très nombreuses espèces, ce qui nécessite la mise au point de méthodes fiables, objectives et pratiques de caractérisation. Dans cette perspective, des marqueurs chimiques des mycelia de *Suillus* sont recherchés à la Faculté de

Tableau 2. Effet de la fertilisation sur la mycorhization de plants de pin pignon par *Suillus collinitus* (isolat n° 9) en pépinière. – La fertilisation est représentée par l'apport d'une solution "Dynaflor" (8,6,5,13) à 0.5 % (D) ou 0.1 % (D/5). Les données sont exprimées en pourcentage de plants mycorhizés par rapport aux plants inoculés. Les limites des intervalles de confiance des pourcentages sont indiquées entre parenthèses ($p = 0.05$). NF = plants non fertilisés.

NF	D/5	D
43 (31; 55)	31 (26; 35)	9 (3; 21)

Tableau 3. Effet de la mycorhization par divers basidiomycètes sur la croissance du pin pignon en pépinière (d'après Mousain & al. 1988). Les mesures sont effectuées 5 mois après l'inoculation mycorhizienne. – Les variations des moyennes des hauteurs des plants mycorhizés par rapport à la hauteur moyenne des témoins sont exprimées en pourcentage de celle-ci. *S.c.* = *Suillus collinitus*; *P.t.* = *Pisolithus tinctorius* (n° 15); *R.r.* = *Rhizopogon roseolus* (n° 1).

	<i>S.c.</i> (n° 1)	<i>S.c.</i> (n° 2)	<i>R.r.</i>	<i>P.t.</i>	Témoin
Hauteur (cm plante ⁻¹)	21.4	21.5	20.0	17.8	18.5
Variation (% du témoin)	+ 15.7	+ 16.2	+ 8.1	- 3.8	-

Pharmacie (Université de Montpellier I). Ainsi, un marqueur chimique, spécifique du genre *Suillus* et de deux genres affines de la famille des *Gomphidiaceae* (proche de la famille des *Boletaceae*) a été isolé et analysé: il s'agit de la farnésylacétone. A l'inverse d'autres marqueurs (suilline, polyols), cette molécule lipophile est présente à la fois dans les carpophores et dans le mycélium de dix espèces de *Suillus*, en culture in vitro, quelle que soit la composition du milieu de culture (Berchil & al. 1991). La même molécule a été détectée aussi dans les mycorhizes des associations *Pinus pinaster* - *Suillus bovinus*, *P. pinaster* - *S. collinitus* et *P. pinea* - *S. collinitus*. A l'INRA (Montpellier), on recherche des isoenzymes caractéristiques des isolats d'intérêt. L'étude électrophorétique de ces isoenzymes a indiqué que plusieurs systèmes enzymatiques sont discriminants pour les genres et espèces de champignons mycorhiziens étudiés. Ce polymorphisme enzymatique, qui exprime la variabilité génétique des champignons, sera couplé à l'immunochimie pour permettre la mise au point d'une méthode pratique de détection des mycorhizes étudiées. L'approche moléculaire (sondes oligonucléotidiques, polymorphisme des longueurs de fragments d'ADN, etc.) permet aussi d'identifier les microorganismes. L'utilisation de ces techniques s'est considérablement simplifiée et a gagné en sensibilité avec la mise au point de l'amplification génique (PCR).

Quelles que soient les techniques employées, la caractérisation objective des mycorhizes doit faciliter l'étude de la dynamique des populations mycorhiziennes et valoriser les procédés de mycorhization contrôlée des arbres.

Effets des ectomycorhizes sur la physiologie du pin pignon en pépinière

Effets des ectomycorhizes sur la croissance et la nutrition minérale du pin. – Dans les conditions des essais exécutés sur des pins pignons cultivés sur tourbe-perlite, trois des quatre isolats utilisés pour l'inoculation ont stimulé la croissance de ces pins (Tableau 3) (Mousain & al. 1988).

Dans une autre expérience, les effets de la fertilisation minérale, de la mycorhization par un isolat de *Pisolithus tinctorius* et de l'interaction fertilisation et mycorhization, sont significatifs sur la biomasse des pins pignons qui est la plus grande dans les pins fertilisés par une solution nutritive employée à 0.5 % et dans les pins mycorhizés et fertilisés par la même solution à 0.1 % (Tableau 4). La mycorhization par *Pisolithus tinctorius* associée à une fertilisation très modérée a donc le même effet que l'apport aux témoins non mycorhizés d'une solution cinq fois plus concentrée. Ce type de mycorhi-

zation ne modifie pas significativement l'accumulation d'azote total dans la plante contrairement à la fertilisation par la solution la plus concentrée, mais il favorise seul l'accumulation de phosphore (Mousain & al. inéd.).

Tableau 4. Effets de la mycorhization par *Pisolithus tinctorius* (n° 19) et de la fertilisation sur la biomasse totale du pin pignon en pépinière (d'après Mousain & al. inéd.). – Absence de fertilisation (NF) ou fertilisation par la solution "Dynaflor" (8.6,5.13) à 0.5 % (D) ou 0.1 % (D/5). Les moyennes des biomasses totales des plants sont exprimées en g de matière sèche par plante. Les moyennes présentant des lettres communes entre parenthèses ne sont pas significativement différentes ($p < 0.05$).

	NF	D/5	D
Pins non mycorhizés	0.85 (b)	0.88 (b)	1.49 (a)
Pins mycorhizés	1.22 (ab)	1.44 (a)	1.46 (a)

Effet des ectomycorhizes sur les échanges gazeux du pin. – Les effets des ectomycorhizes sur les échanges gazeux de CO₂ et H₂O ont été mesurés sur des pins pignons cultivés sur tourbe-perlite, avant le début de la deuxième saison de végétation (février). L'association *Pinus pinea* - *Rhizopogon roseolus* stimule à la fois la capacité d'assimilation de CO₂ et l'efficacité de l'eau (WUE = water-use efficiency, en anglais) des plantes hôtes qui est exprimée par le rapport du taux d'assimilation de CO₂ au taux de transpiration (Tableau 5). De plus, l'assimilation de CO₂ et la transpiration sont couplées au niveau individuel dans les pins pignons mycorhizés par trois isolats de basidiomycètes. Ce couplage exprime la constance de WUE et reflète une étroite régulation de l'efficacité de l'eau à l'échelle instantanée qui n'est pas observée dans les pins non mycorhizés (Guehl & al. 1990). L'assimilation du CO₂ dans les plants mycorhizés peut être stimulée par un mécanisme autre que l'amélioration de la nutrition phosphatée, comme l'indiquent les résultats obtenus avec des *Pinus pinea* - *Rhizopogon rubescens* var. *ochraceus* alimentés en pépinière par des solutions plus ou moins concentrées en phosphore. Ces données sont, par contre, en accord avec le rôle de puits de carbohydrates joué par les mycorhizes.

Tableau 5. Mesures d'échanges gazeux de CO₂ et H₂O dans des pins pignons de 1 an mycorhizés par diverses espèces fongiques (d'après Guehl & al. 1990). – Les moyennes d'une même colonne qui ne présentent pas de lettre commune sont significativement différentes ($p < 0.05$).

Traitement (Nombre de répétitions)	Assimilation totale de CO ₂ (nmol s ⁻¹ plante ⁻¹)	Efficacité de l'eau utilisée (WUE) (mol kmol ⁻¹)
Témoins (9)	27.9 b	5.06 b
<i>R. roseolus</i> (13)	50.5 a	7.21 a
<i>S. collinitus</i> 1 (6)	44.0 ab	7.63 a
<i>S. collinitus</i> 2 (6)	36.5 b	7.04 a

Installation et suivi écologique et écophysiological de boisements expérimentaux

Lors de la transplantation en boisements, les mycorhizes installées sur les racines des plants de pépinière entrent en compétition avec les espèces mycorhiziennes natives et sont soumises aux conditions physiques et chimiques du sol. La dynamique des espèces mycorhiziennes introduites doit donc être étudiée dans le but de s'assurer de leur survie dans le milieu de transplantation. La réceptivité d'un sol forestier à un couple champignon- plante peut être estimée par un test biologique de laboratoire impliquant la confrontation d'une population de jeunes plantes sensibles à des quantités croissantes d'inoculum (Perrin & al. 1988). Le suivi des espèces introduites in situ est rendu possible par l'application de techniques immuno-chimiques ou moléculaires à la caractérisation des mycorhizes. Toutefois, le sol étant un milieu hétérogène, la répartition des mycorhizes de différentes espèces dépend des conditions physiques et chimiques locales, ce qui impose l'étude détaillée des variations locales des propriétés du sol afin de réaliser un échantillonnage raisonné des mycorhizes.

Des boisements expérimentaux comprenant des pins pignons ou des cèdres de l'Atlas mycorhizés ou non en pépinière ont été installés dans divers sites du Languedoc et de Petite-Camargue.

Boisements du Languedoc. – Dans la garrigue gardoise (Poulx), sur sol brun méditerranéen, les pins pignons mycorhizés en pépinière par *Suillus collinitus* (n° 2) étaient tous vivants après une année de plantation, alors qu'une mortalité de 20 % était observée dans les témoins non mycorhizés en pépinière.

A St-Laurent-la-Vernède (Gard) en sol sableux acide établi sur calcaire gréseux décarbonaté en surface, le taux de survie des pins pignons mycorhizés par *Pisolithus tinctorius* (n° 19) était supérieur à celui des pins non mycorhizés en pépinière, après 18 mois de plantation: 81 ± 6 % contre 67 ± 6 % ($p < 0.05$). A Villeveyrac (Hérault), sur le sol d'un ancien terroir de bauxite constitué par un matériau ferrallitique riche en argile, fer et aluminium mélangé au calcaire de la roche, la hauteur des pins pignons mycorhizés par *Suillus collinitus* (n° 2) était significativement supérieure à celle des témoins de pépinière, après 3 ans de plantation: 40 cm contre 23 cm plante⁻¹ avec des accroissements moyens respectifs de 18.5 cm et 4.5 cm plante⁻¹ par rapport à la taille en sortie de pépinière. De plus, près de 50 % des plants mycorhizés, contre seulement 25 % des témoins, possédaient des aiguilles adultes. Dans le dispositif de Montaren-Saint-Médiers (Gard), installé sur rendzine, le taux de reprise à la plantation de cèdres de l'Atlas mycorhizés en pépinière par des spores de *Tuber albidum* Pico est de 70 % après 2 ans, contre 62 % pour les témoins. Les hauteurs moyennes sont respectivement de 28.5 cm plante⁻¹ pour les premiers contre 24.6 cm plante⁻¹ pour les témoins (différence significative à $p = 0.05$).

Boisements de Petite-Camargue. – En Petite-Camargue (Brasinvers), la hauteur des pins pignons mycorhizés par *S. collinitus* (n° 2) était significativement supérieure à celle des témoins de pépinière après 3 ans de plantation sur arénosol calcaire: 74 cm contre 53 cm plante⁻¹ avec des accroissements respectifs de 52.5 cm et 34.5 cm plante⁻¹, en moyenne.

Tableau 6. Effets de la mycorhization et de la fertilisation en pépinière sur la croissance du pin pignon en plantation sur arénosol calcaire de Petite-Camargue. – Traitements de pépinière: Mycorhization par *Suillus collinitus* (S.c.) n° 2 ou n°9 ou absence de mycorhization (NM); fertilisation par la solution Dynaflor (8,6,5,13) à 0.5 % (D) ou 0.1 % (D/5), ou absence de fertilisation (NF). Les moyennes d'une même colonne affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0.05$), d'après le test de comparaison multiple de Scheffe. Les intervalles de confiance des accroissements de hauteur sont indiqués à $p = 0.05$.

Traitement	Hauteur(cm plante ⁻¹)			Accroissement total (cm plante ⁻¹)	
	Après 1 an	Après 2 ans	Après 3 ans		
NM	D	26.5 cd	37.8 b	47.8 b	25.7 ± 1.6
	D/5	20.8 b	29.7 a	40.0 a	26.2 ± 2.0
	NF	16.2 a	27.8 a	36.1 a	26.5 ± 1.9
S.c. n° 2	D/5	24.5 c	39.8 b	50.5 b	32.4 ± 1.6
S.c. n° 9	D/5	27.4 d	40.7 b	50.5 b	29.5 ± 2.3

Un autre boisement du même site comprend des pins pignons, mycorhizés par *S. collinitus* (n° 2 et 9) ou non mycorhizés, et fertilisés ou non en pépinière par une solution "Dynaflor" (8, 6, 5, 13) à 0.5 % ou 0.1 %: après 3 ans de plantation, les pins mycorhizés en pépinière et fertilisés par la solution Dynaflor à 0.1 % ainsi que les témoins fertilisés par Dynaflor à 0.5 % ont une hauteur significativement supérieure à celle des pins témoins non fertilisés ou fertilisés par Dynaflor à 0.1 %. L'accroissement de taille des pins mycorhizés par *S. collinitus* (environ 30 cm plante⁻¹) est significativement supérieur à celui des témoins de pépinière (environ 25 cm plante⁻¹) (Tableau 6). Cet essai suggère que la mycorhization contrôlée du pin pignon par des souches fongiques efficaces, associée à une fertilisation très modérée, peut être au moins aussi bénéfique qu'une fertilisation cinq fois plus élevée en pépinière pour la reprise à la plantation et la croissance initiale des arbres dans des sols sableux déficitaires en eau et en éléments nutritifs. Après 3 ans dans ce dernier dispositif, le contrôle de la mycorhization des arbres, effectué par observation microscopique, indique que les mycorhizes de *S. collinitus* se sont maintenues in situ sur les plants initialement mycorhizés par cette espèce. Les témoins sont mycorhizés par d'autres espèces. Ces observations devront être corroborées par la caractérisation moléculaire des mycorhizes.

Conclusion

La plupart des arbres forestiers sont mycorhizés dans les conditions naturelles. L'ectomycorhization améliore généralement la croissance des arbres et plusieurs processus physiologiques et écologiques déterminants pour la vie de la plante, en particulier la nutrition minérale, l'absorption et l'utilisation de l'eau par la plante, la tolérance de cette plante au calcaire et aux métaux lourds. Toutefois, ces effets dépendent des conditions de milieu et de l'identité des partenaires, au niveau spécifique ou infraspécifique. Ces éléments ont conduit les chercheurs à tenter de tirer bénéfice de certaines propriétés

des ectomycorhizes dans les opérations de reboisement, notamment dans les zones dégradées du bassin méditerranéen. La mycorhization contrôlée des arbres en pépinière nécessite de sélectionner des isolats mycorhizogènes efficaces, compétitifs et adaptés aux sites de reboisement, de produire massivement de l'inoculum mycorhizogène de qualité, de déterminer les conditions optimales de la mycorhization (stade de développement de la plante, fertilisation etc.) et de mettre au point des méthodes fiables et objectives de caractérisation des mycorhizes obtenues en pépinière. Jusqu'à présent, seule la variabilité naturelle des isolats sauvages a été envisagée comme base de sélection. Dans l'avenir, cette base pourra être élargie par l'utilisation de la reproduction sexuée et des manipulations génétiques. Les premiers résultats obtenus en boisements expérimentaux soulignent d'ores et déjà l'intérêt d'utiliser la mycorhization contrôlée des arbres pour assurer le succès des reboisements en améliorant l'adaptation de ces arbres aux milieux à fortes contraintes.

Remerciements

Le programme de recherche développé dans le texte précédent a bénéficié de l'aide de l'ANVAR Languedoc-Roussillon (Contrat n° A 8803 023 J 011-0) pour la période 1988-91 et de la CEE et des Chambres Régionales d'Agriculture de Languedoc-Roussillon et de Provence-Alpes-Côte d'Azur dans le cadre des Programmes Intégrés Méditerranéens (1988-92). Il se poursuit depuis 1990 avec le soutien du Ministère chargé de l'Agriculture dans le cadre des Conventions INRA/DERF relatives au Conservatoire de la Forêt Méditerranéenne.

Références bibliographiques

- Berchil, H., Wylde, R., Heitz, A., Mousain, D. & Andary, C. 1991: A selective marker in the *Boletales*. – Pp. 14-15 in: Anonyme (ed.), Abstracts of short lectures and poster presentations. Poster at the 39th Annual Congress on Medicinal Plant Research, Saarbrücken, 3-7 September 1991. – Stuttgart.
- Bonfante, P. & Scannerini, S. 1992: The cellular basis of plant-fungus interchanges in mycorrhizal associations – Pp. 65-101 in: Allen, M. (ed.), Functioning mycorrhizae. – New York & London.
- Chevalier, G. 1974: Convergence des caractères du péridium des ascocarpes et du manteau des mycorhizes chez quelques espèces de *Tuber*. – Ann. Phytopathol. **6**: 492.
- Fassi, B. 1965: Micorrize ectotrofiche di *Pinus strobus* L. prodotta da un'endogone (*Endogone lactiflua* Berk.). – Allionia **11**: 7-15.
- Gagnon, J., Langlois, C. G. & Fortin, J. A. 1987: Growth of containerized jack pine seedlings inoculated with different ectomycorrhizal fungi under a controlled fertilization schedule. – Canad. J. Forest Res. **17**: 840-845.
- Garbaye, J. 1991: Utilisation des mycorhizes en sylviculture. – Pp. 197-248 in: Strullu, D. G. (ed.), Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. – Paris.
- , Menez, J. & Wilhelm, M. E. 1986: Les mycorhizes des jeunes chênes dans les pépinières et les régénérations naturelles du nord-est de la France. – Acta Oecol., Oecol. Pl. **7**: 87-96.
- Guehl, J. M., Mousain, D., Falconnet, G. & Gruez, J. 1990: Growth, carbon dioxide assimilation capacity and water-use efficiency of *Pinus pinea* L. seedlings inoculated with different ectomycorrhizal fungi. – Ann. Sci. Forest. **47**: 91-100.

- Kuek, C., Tommerup, I. C. & Malajczuk, N. 1992: Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. – *Mycol. Res.* **96**: 273-277.
- Le Tacon, F., Jung, G., Mugnier, J. & Michelot, P. 1985: Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. – *Canad. J. Bot.* **63**: 1664-1668.
- Malajczuk, N., Lapeyrie, F. & Garbaye, J. 1990: Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. I. Mycorrhizal formation in model systems. – *New Phytol.* **114**: 627-631.
- Mason, P. A., Wilson, J., Last, F. T. & Walker, C. 1983: The concept of succession in relation with the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soil. – *Pl. & Soil* **71**: 247-256.
- Maupérin, C., Mortier, F., Garbaye, J., Le Tacon, F. & Carr, G. 1987: Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. – *Canad. J. Bot.* **65**: 2326-2329.
- Mousain, D., Falconnet, G., Gruez, J., Chevalier, G., Tillard, P., Bousquet, N., Plassard, C. & Cleyet-Marel, J. C. 1988: Controlled ectomycorrhizal development of mediterranean forest seedlings in the nursery. First results and prospects. – P. 129 in: Sylvia, D. M., Hung, L. L. & Graham, J. H. (ed.), *Mycorrhizae in the next decade. Practical applications and research priorities. Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae, Gainesville (Florida, U.S.A.), 3-8 May 1987.* – Gainesville, FL.
- Perrin, R., Planchette, C. & Duvert, P. 1988: Substrate receptiveness to mycorrhizal association: concepts, methods and applications. – *Acta Hort.* **221**: 223-228.
- Warcup, J. H. 1975: A culturable *Endogone* associated with eucalypts. – Pp. 53-63 in: Sanders F.E., Mosse B. & Tinker P. B. (ed.), *Endomycorrhizas. Proceedings of a Symposium held at the University of Leeds, 22-25 July 1974.* – London, New York & San Francisco.

Adresse des auteurs:

Dr D. Mousain, C. Bonnin, L. Mauré, Dr. P. Scheromm, K. El Karkouri & Dr J. C. Cleyet-Marel, Laboratoire de Recherches sur les Symbiotes des Racines, INRA-ENSA, 2, Place Viala, F-34060 Montpellier Cedex 1, France.

Dr C. Argillier, Division Agriculture et Forêt Méditerranéennes, Cemagref, Le Tholonet, BP 31, F-13612 Aix-en-Provence Cedex, France.

T. Sardin, STIR-ONF, 1175, chemin du Lavarin, F-84000 Avignon, France.