

Travail d'équipe en sous-sol: les mycorhizes stimulent la croissance des plantes

Klaus Schläppi¹, Luise Köhl¹, Franz Bender¹, Alain Held¹, Fabio Mascher² et Marcel van der Heijden¹

¹Agroscope, 8046 Zurich, Suisse

²Agroscope, 1260 Nyon, Suisse

Renseignements: Klaus Schläppi, e-mail: klaus.schlaeppi@agroscope.admin.ch



Figure 1 | Inoculation avec des mycorhizes arbusculaires. Dans le sillon de semis ouvert, on reconnaît les grains de blé de couleur claire et le substrat de couleur noire avec lequel le champignon a été introduit. (Photo: Franz Bender, Agroscope)

Introduction

Pour conserver une productivité agricole élevée tout en réduisant l'emploi de produits agrochimiques, il est indispensable d'appliquer des stratégies alternatives. L'une d'entre elles consiste à inoculer le sol avec des micro-organismes utiles comme les mycorhizes (fig. 1).

Le terme de mycorhize signifie racine colonisée par des champignons (fig. 2A) et désigne la symbiose entre des champignons et la plante. Dans le sol, les mycorhizes forment un réseau de filaments qui sont reliés aux racines des plantes. Ce tissu permet aux plantes d'accéder à des

réserves d'eau et aux éléments nutritifs qui sinon sont inaccessibles aux racines. En contrepartie, les plantes fournissent aux mycorhizes les hydrates de carbone issus de la photosynthèse. Le groupe le plus fréquent de mycorhizes est celui des mycorhizes arbusculaires (MA), qui forment des structures ramifiées appelées arbuscules dans les cellules racinaires des plantes (fig. 2B). C'est dans les arbuscules qu'a lieu l'échange d'hydrates de carbone et de nutriments entre la plante et le champignon. La cohabitation avec des MA a un effet positif sur la croissance des plantes, notamment dans les sols pauvres en nutriments. Les MA améliorent la fertilité du sol, rendent leurs plantes-hôtes plus résistantes à la sécheresse et aux maladies et réduisent le lessivage des éléments nutritifs ou l'émission de protoxyde d'azote, le principal gaz à effet de serre (Köhl et van der Heijden 2016; Bender *et al.* 2014). Les MA font partie du microbiome du sol (encadré 1) et sont présents dans les sols de pratiquement tous les écosystèmes (Jansa *et al.* 2009; Davison *et al.* 2015). Ils jouent un rôle important dans l'agriculture, car la plupart des plantes cultivées comme le maïs, le blé et la pomme de terre interagissent avec les MA. Toutefois, l'exploitation intensive des sols et la fertilisation ou le labour fréquent réduisent la présence et la biodiversité des MA (Verbruggen *et al.* 2010; Säle *et al.* 2015).

Pour utiliser les MA de manière ciblée sur le plan agronomique, deux stratégies sont possibles: la première consiste à stimuler les champignons utiles des sols en adaptant les méthodes de travail du sol et d'entretien des cultures, p. ex. l'exploitation biologique, la réduction du travail du sol ou la mise en place de plantes de valeur (Köhl et van der Heijden 2016). La deuxième consiste à stimuler la fertilité du sol et la productivité des plantes en introduisant des MA (fig. 1). Cette dernière méthode a pour but de renforcer les effets des MA déjà présents dans le sol. Les MA pourraient être apportés via le traitement des semences ou pendant le semis via un substrat. De nombreux effets positifs des mycorhizes arbusculaires ont été observés dans des conditions de labora-

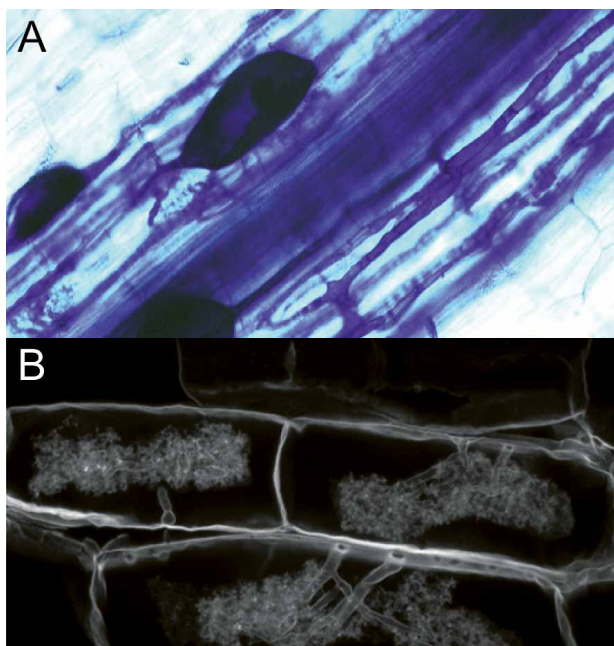


Figure 2 | Mycorhizes arbusculaires (MA) au microscope. A: les filaments fongiques et les vésicules (organes de réserve des MA) au centre des racines des plantes sont colorés en bleu marine. B: arbuscules, structure ramifiée au centre des cellules racinaires des plantes (Photos: van der Heijden *et al.* 2015).

toire idéales (p. ex. dans un sol stérile, dans des substrats artificiels ou des sols ayant une faible disponibilité en nutriments). Ils sont cependant souvent moins marqués dans les conditions de terrain. Il semble logique de penser que les communautés de MA locales présentes dans les sols naturels jouent un rôle décisif dans le succès de l'établissement des MA inoculés et dans le développement de leurs propriétés positives. C'est l'hypothèse que nous étudions actuellement afin d'améliorer le résultat des inoculations sur le terrain avec des mycorhizes arbusculaires. Une méthode moléculaire que nous avons développée (Schläppi *et al.* 2016) nous permet de quantifier les communautés de MA. Dans des essais pilotes en plein champ, nous avons testé si les inoculations avec des MA donnaient de meilleurs résultats lorsqu'elles étaient harmonisées par rapport à la communauté de MA naturellement présente. Ces études ont permis de déterminer si les inoculations avec des MA amélioreraient la croissance des plantes dans des conditions naturelles.

Matériel et méthodes

Expériences en serre

Huit types très différents de sol cultivé (abrégiés A–H) ont été collectés sur des sites de culture typiques répartis dans toute la Suisse. Les sols se distinguaient par

Résumé ■ Les mycorhizes arbusculaires (MA) jouent un rôle important dans l'agriculture, car ils soutiennent la santé et l'apport en nutriments de la plupart des plantes cultivées. Il serait donc intéressant d'augmenter la productivité des plantes cultivées en inoculant les cultures avec des mycorhizes. Nous montrons ici que les MA inoculés ont pu s'établir dans les sols cultivés et que cette technique a permis d'augmenter la biomasse du trèfle violet dans quatre des huit parcelles étudiées. Actuellement, il est toutefois difficile de prévoir le succès de l'inoculation des cultures avec des mycorhizes, car la productivité des plantes dépend fortement des caractéristiques des sols et des communautés de MA déjà présentes naturellement. Dans le but de prévoir l'effet d'un apport de mycorhizes aux cultures, nous avons développé une nouvelle méthode moléculaire permettant de mieux déterminer les communautés de MA. Afin d'augmenter les chances de réussite des inoculations, nous étudions actuellement s'il est possible d'opérer une inoculation ciblée en l'adaptant au site et aux communautés de mycorhizes déjà présentes naturellement dans le sol. L'emploi de micro-organismes utiles devrait permettre de réduire le recours aux produits agrochimiques et donc d'améliorer la durabilité de l'agriculture.

Encadré 1 | Qu'est-ce qu'un microbiome?

Le terme de microbiome désigne une communauté de micro-organismes vivant dans un habitat donné. Il existe différents microbiomes par exemple dans le sol, dans les racines des plantes ou dans l'intestin humain. Un microbiome se compose essentiellement de bactéries et de champignons, mais comprend également des microbes uni ou oligocellulaires, comme les micro-algues ou les protozoaires. Les micro-organismes du sol fonctionnent comme une communauté et exercent une grande influence sur la croissance des plantes. Ce sont les propriétés spécifiques des différents éléments du microbiome, comme les mycorhizes arbusculaires dont il est question ici, qui aident les plantes à s'approvisionner en nutriments, à éliminer les polluants ou à se défendre contre les ravageurs et les maladies.

leur type, leurs propriétés chimiques (p. ex. pH: 5,6–8,0; teneur en humus: 1,0–10,5%; phosphore déterminé à l'aide de la méthode AEE10: 7,8–210,1 mg/kg), leur assolement et leur mode d'exploitation. En guise de témoin, les chercheurs-euses ont utilisé un sol (H) qui présentait une très faible concentration en MA à la suite d'une longue durée de conservation.

Les différents sols ont été tamisés à 5 mm, bien mélangés et versés dans des pots. Ils ont été inoculés soit avec le champignon MA *Rhizoglyphus irregularis* (souche SAF#22, collection suisse de mycorhizes, www.agroscope.ch/saf), soit avec un substrat sans champignon (témoin). L'essai a testé les facteurs sol et inoculation de MA (avec et sans apport de *R. irregularis*) avec six répétitions pour chacun (96 pots au total). Un mélange de trèfles et de graminées usuel dans le commerce a été planté dans les pots et récolté au bout de 13 semaines. La biomasse végétale et la colonisation des racines par les MA ont ensuite été déterminées. L'essai en serre a été décrit en détail dans Köhl *et al.* (2016).

Essais d'inoculation en plein champ

Dans une parcelle d'essai d'Agroscope à Changins, des expériences ont été réalisées avec du blé de printemps (variété Rubli). Les champignons MA *R. irregularis* (souche SAF#22) et *Funneliformis mosseae* (souche SAF#11) ou le substrat sans MA qui servait de témoin ont été mis en place dans le sol de la parcelle. L'inoculation a été opérée lors du semis du blé dans le sillon de semis ouvert (fig. 1). Ce dernier a ensuite été mélangé localement à la pioche, puis refermé. Les trois procédés (témoin, SAF#22, SAF#11) ont été mis en place en quatre

Encadré 2 | Mesurer le microbiome

Un microbiome est aujourd'hui évalué sur la base du patrimoine génétique (en français: ADN, en anglais: DNA) de la communauté microbienne à l'aide du séquençage. C'est une technologie simple et peu coûteuse. Le séquençage permet de déterminer l'enchaînement (= séquence) des éléments de l'ADN, par lesquels les différents micro-organismes peuvent être identifiés. Les méthodes basées sur l'ADN ont le gros avantage de permettre de saisir également des microbes qui sont présents, mais que l'on ne peut pas cultiver. Le séquençage a connu dernièrement une avancée technologique – on parle de *next generation* ou de *high throughput sequencing* – et aujourd'hui il est possible de générer simultanément des millions de séquences de centaines d'échantillons dans une réaction de séquençage. Le grand nombre de séquences d'ADN permet d'appréhender un microbiome dans la totalité de son réseau complexe de micro-organismes en interaction. Les séquences d'ADN sont souvent réparties en OTU (*Operational Taxonomic Units*) à partir de leurs similitudes. Un OTU, se composant de séquences ayant 97% de ressemblance, correspond environ à une espèce d'un micro-organisme. Les séquences sont comparées avec les différentes bases de données et ainsi attribuées aux différents micro-organismes. Cette méthode permet de se faire une idée du *Who is Who?* dans le microbiome. Les fréquences des différents micro-organismes au sein d'un même microbiome peuvent également être déterminées de cette manière.

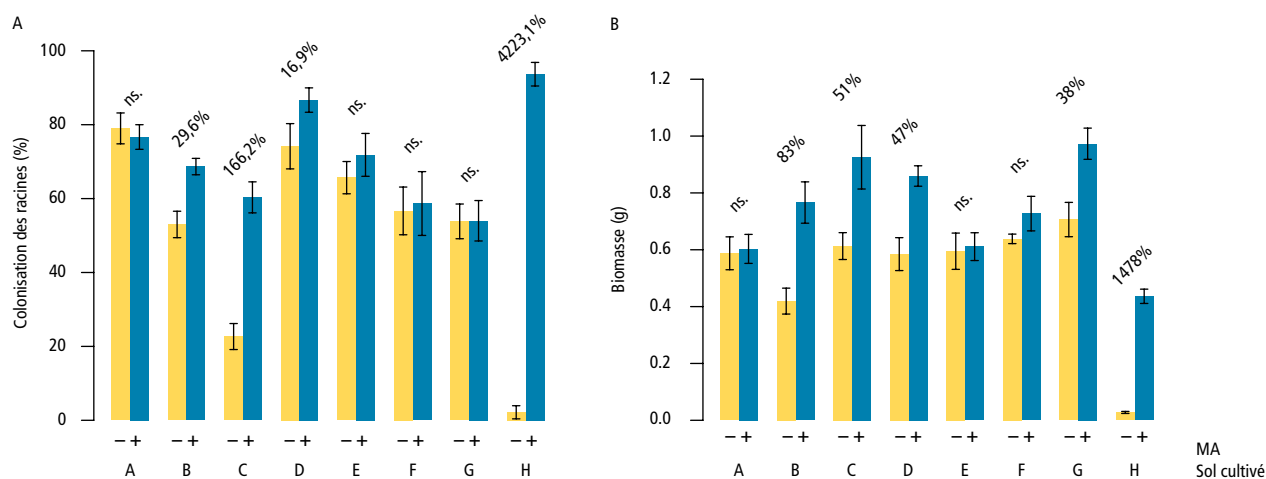


Figure 3 | Etablissement de MA et productivité des plantes dans huit sols cultivés en serre. Les barres indiquent (A) le taux de colonisation et (B) la biomasse (moyennes et écart-type) des racines de trèfles dans les témoins (-) et dans les sols cultivés (A–H) inoculés avec des MA (+). Les différences significatives sont signalées au-dessus des barres (test t, $p < 0,05$; ns. = non significatif).

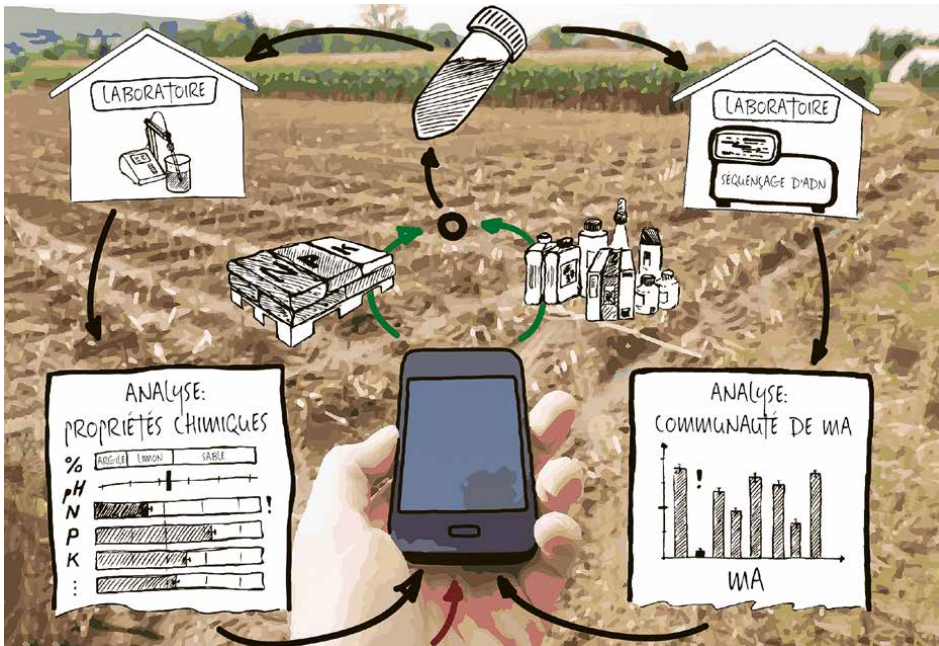


Figure 4 | Inoculation ciblée avec des MA: la composition du microbiome du sol et les propriétés pédologiques servent non seulement à déterminer la composition des engrais, mais aussi l'inoculum de MA spécifique au site. (Illustration: Schläppi et Bulgarelli 2015, adaptation).

répétitions chacun sur de petites parcelles (1,5m × 1m) comprenant cinq rangées de blé. L'infestation par les ravageurs a été évaluée pendant la période de végétation et le rendement a été déterminé après la récolte. Au moment de celle-ci, des échantillons de racines ont également été recueillis afin de mesurer les communautés de MA et de trouver des inoculats de MA (encadré 2).

Résultats et discussion

Le résultat de l'inoculation varie suivant les sols

Dans un premier temps, il s'agissait de vérifier en serre, à quel point (i) les MA introduits dans les différents sols cultivés parvenaient à s'établir et (ii) permettaient ainsi d'améliorer la productivité des plantes. La colonisation des racines de trèfles par les MA dépendait du sol et a augmenté à la suite de l'inoculation dans quatre des huit sols étudiés (fig. 3A). Dans les mêmes sols, plus un sol supplémentaire (G), l'inoculation de *R. irregulare* a également amélioré la biomasse du trèfle (fig. 3B). Là où le MA conduisait à un renforcement de la colonisation des racines, la productivité augmentait elle aussi. Les augmentations de biomasse de 38 à 83% constatées en serre sur le trèfle représenteraient un rendement supplémentaire de 1,2–2,2 t ha⁻¹ si on les extrapolait. Plusieurs espèces végétales réagissent différemment aux MA: avec le trèfle ou le maïs, les MA ont tendance à avoir des effets positifs sur la croissance, tandis que sur les gra-

minées ou le blé, les effets des MA ne se manifestent souvent pas sur la biomasse (Hoeksema et al. 2010). Les scientifiques cherchent également à savoir quelles plantes cultivées réagissent aux inoculations de MA et de quelle façon. Il a pu être confirmé que sur les graminées, les effets de croissance étaient quasiment inexistantes, voire plutôt négatifs, bien que leurs racines aient été bien colonisées par les MA après l'inoculation (Köhl et al. 2016). Les premières inoculations sur huit sites avec du maïs ont montré que des effets positifs pouvaient notamment être obtenus lorsque les apports en phosphore étaient bas (résultats non publiés, Franz Bender).

En résumé, on peut dire que l'établissement de l'inoculum de MA ainsi que ses effets sur la productivité de la plante hôte dépendent clairement des différents sols cultivés et de l'espèce végétale considérée. En ce qui concerne la dépendance au sol, on suppose qu'un MA introduit artificiellement doit s'établir dans la communauté locale existante.

Concept d'inoculation sur mesure

Tant qu'il n'est pas possible de prédire le succès de l'inoculation avec un minimum de fiabilité, cette technique est peu intéressante pour la pratique. Nous travaillons à améliorer la prédictibilité des inoculations avec des MA. Nous nous appuyons sur des méthodes de génétique moléculaire ultramodernes (cf. encadré 2) pour appréhender les communautés locales de MA dans leur ensemble. Notre approche part du principe qu'avec une

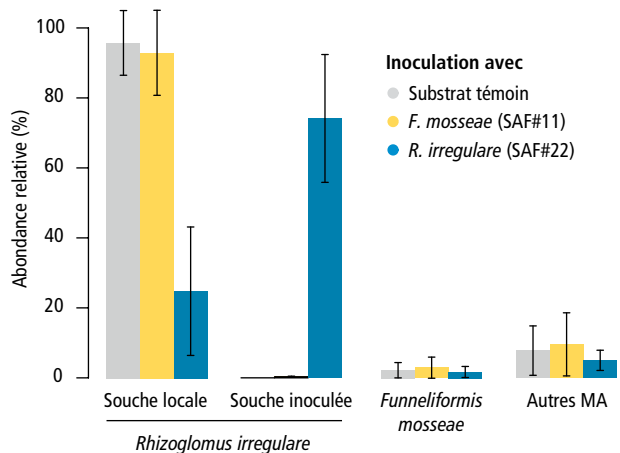


Figure 5 | Fréquence des espèces de MA dans les échantillons de racines de blé prélevés sur des parcelles ayant été inoculées avec *Rhizoglossomus irregulare* (souche SAF #22), *Funneliformis mosseae* (souche SAF#11) ou avec le substrat sans champignon (témoin). Les fréquences des espèces de champignons ont été indiquées les unes par rapport aux autres (total: 100%). SAF#22 a pu être différenciée de la souche locale de *Rhizoglossomus* grâce à sa signature génétique. Le schéma représente les moyennes et les écarts types de quatre répétitions par procédé.

bonne connaissance du microbiome local du sol, il est possible de pratiquer les inoculations avec des MA de manière ciblée et d'améliorer ainsi la fertilité du sol et la productivité des plantes. A l'instar de la gestion actuelle de l'approvisionnement en nutriments sur le terrain (échantillon de sol > analyse de laboratoire > évaluation > apport d'engrais ciblé), l'idée est d'analyser le microbiome pour une parcelle et d'identifier les MA les mieux adaptés au sol pour une inoculation ciblée (fig. 4).

Essai pilote: inoculation ciblée avec des MA

L'inoculation d'un champ de blé avec les MA *R. irregulare* et *Funneliformis mosseae* a amélioré la résistance des plants de blé par rapport aux dommages causés par les insectes, tandis que la biomasse des plantes n'a pas pu être augmentée (Imperiali *et al.* en préparation). Les échantillons de racines du témoin (substrat sans MA) reflétaient la communauté de MA présente naturellement sur le site. Elle était composée en grande partie de *R. irregulare* et contenait un petit nombre de MA de la famille *Funneliformis* (fig. 5).

Dans les parcelles inoculées avec le MA *F. mosseae*, celui-ci n'est pas parvenu à s'établir: nous n'avons trouvé aucune augmentation de la signature génétique de ce champignon dans les échantillons racinaires prélevés sur les parcelles dans lesquelles *F. mosseae* avait été introduit (fig. 5). En revanche, dans le cas de l'inoculation avec *R. irregulare*, la signature génétique de ce champignon était nettement plus élevée dans les échantillons pré-

levés sur les parcelles inoculées (fig. 5). Comme la souche de champignon utilisée se différencie de la souche locale, nous avons pu prouver que la souche de *R. irregulare* introduite pouvait s'établir dans la communauté locale de MA, alors que le *Funneliformis* n'y parvenait pas. Un MA inoculé doit pouvoir s'établir dans la communauté locale et l'essai d'inoculation décrit a montré que c'était possible même lorsque l'espèce de champignon introduite était déjà abondamment présente localement. D'autres validations sont encore nécessaires pour déterminer si cela est possible également dans d'autres types de sols avec d'autres espèces de MA.

Conclusions

Les inoculations de micro-organismes utiles comme les MA sont très prometteuses dans l'optique de réduire l'emploi de produits agrochimiques comme les engrais et les pesticides et donc d'améliorer la durabilité de l'agriculture. Nous avons présenté ici un concept pour maîtriser la problématique de l'établissement des inoculants de MA en fonction des sols. Les essais pilotes ont donné des résultats intéressants qui laissent espérer qu'à l'avenir, les inoculations de MA pourront être pratiquées de manière plus ciblée et plus fiable grâce à l'analyse moléculaire des communautés de MA.

En matière d'application, deux approches se dessinent. La première consisterait à développer un modèle prédictif, qui utiliserait les connaissances sur la biogéographie des communautés de MA, afin de pronostiquer indirectement l'inoculum de MA adéquat en fonction des propriétés chimiques du sol. La solution alternative consiste à mesurer directement la communauté de MA locale et à procéder à une intervention précise, spécifique au site avec l'inoculum déduit de ces mesures. Une telle méthode n'est pas sans rappeler les efforts de la médecine personnalisée, dans laquelle les médicaments et les thérapies sont adaptés aux caractéristiques du patient sur la base d'analyses génétiques. Dans le cas de l'agriculture, on parle de *Precision Farming* et à l'avenir, on peut s'imaginer que les produits agronomiques comme les engrais, les pesticides et les *biologicals* (p. ex. inoculants de MA) de même que les formes d'exploitation, seront taillés sur mesure en fonction des propriétés spécifiques du sol d'un site donné. ■

Remerciements

Les travaux ont reçu le soutien du Programme national de recherche «Utilisation durable de la ressource sol» (PNR 68) du Fonds National Suisse. Nous remercions nos partenaires pour leur collaboration dans le PNR 68, en particulier les groupes du Dr Monika Maurhofer (EPF de Zurich), du Dr Christoph Keel (Université de Lausanne) et du Prof. Ted Turlings (Université de Neuchâtel).

Riassunto

Lavoro di squadra nel sottosuolo: i funghi micorriza facilitano la crescita delle piante

I funghi micorriza arbuscolari (funghi MA) esercitano un ruolo importante nell'agricoltura. In quanto ausiliari della maggior parte delle piante coltivate, gli MA migliorano l'approvvigionamento di nutrienti e lo stato fitosanitario della pianta stessa. Vi è un grande interesse a inoculare i funghi MA nel terreno per aumentare la produttività delle piante coltivate. In questo articolo indichiamo il modo in cui i funghi MA inoculati si insediano nel terreno e la maniera in cui la loro presenza aumenta la biomassa di trifoglio pratense in quattro terreni su otto. Al momento però, la riuscita dell'inoculazione degli MA è poco prevedibile, considerando che gli effetti sulla produttività delle piante coltivate dipendono molto dal terreno e dalle comunità fungine MA naturalmente presenti. Per migliorare questa situazione abbiamo sviluppato un metodo molecolare atto a caratterizzare le comunità fungine preesistenti. Allo scopo di aumentare le probabilità di riuscita dell'inoculazione nel terreno, attualmente esaminiamo la possibilità di applicarli in modo mirato, adeguato all'ubicazione e in funzione della composizione delle comunità fungine MA naturalmente presenti. L'impiego di microrganismi utili dovrebbe consentire di ridurre l'uso di prodotti agrochimici in futuro e di aumentare la sostenibilità dell'agricoltura.

Summary

Underground teamwork: mycorrhizal fungi for promoting plant growth

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) play an important role in agriculture, supporting a wide range of crops with nutrients. There is currently a great interest in enhancing crop productivity through field inoculations with AMF. Here, we show how inoculated AMF are able to successfully establish in eight different field soils, increasing the biomass of red clover in four out of eight soils tested. The reliability of field inoculations with AM fungi is currently largely unpredictable and the effects on crop productivity are strongly dependent on the field soils in question and on the naturally occurring AMF communities. With the aim of improving this situation, we have developed a new molecular method for determining AMF communities. To increase the success of field inoculations, we are currently investigating whether an inoculation adapted to the field site and to the naturally occurring AMF communities can be undertaken in a targeted and successful manner. The use of beneficial soil microorganisms for improving soil quality should allow us to reduce the use of agrochemical products in future, thereby improving sustainability in agriculture.

Key words: Arbuscular mycorrhizal fungi, field inoculation, community analysis, microbiome, DNA sequencing.

Bibliographie

- Bender S. F., Plantenga F., Nefel A., Jocher M., Oberholzer H.-R., Köhl L., Giles M., Daniell T.J. & van der Heijden M.G.A., 2014. Symbiotic relationships between soil fungi and plants reduce N₂O emissions from soil. *ISME Journal* **8**, 1336–1345.
- Davison J., Moora M., Öpik M., Adhoseya A., Ainsaar L., Bâ A., Burla S., Diedhiou A.G., Hiiesalu I., Jairus T. *et al.*, 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* **349**, 970–973.
- Hoeksema J.D., Chaudhary V.B., Gehring C.A., Johnson N.C., Karst J., Koide R.T., Pringle A., Zabinski C., Bever J.D., Moore J.C., Wilson G.W.T., Klironomos J.N., & Umbanhowar J., 2010. A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters* **13**, 394–407.
- Imperiali N., Chiriboga X., Jaffuel G., Dennert D., Schläppi K., Fesselet M., Blanco-Pérez R., Villacrés D., van der Heijden M.G.A., Keel C., Mauerhofer M., Mascher F., Turlings T. & Campos-Herrera R., en préparation. Can the combined use of beneficial *Pseudomonas* bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi and entomopathogenic nematodes enhances the protection and performance of wheat?
- Jansa J., Oberholzer H.R. & Egli S., 2009. Environmental determinants of the arbuscular mycorrhizal fungal infectivity of Swiss agricultural soils. *European Journal of Soil Biology* **45**, 400–408.
- Köhl L. & van der Heijden M.G.A., 2016. Agriculteur cherche champignon – une relation fertile. *AGRIDEA Fiche technique*
- Köhl L., Lukaszewicz C.E. & van der Heijden M.G.A., 2016. Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant, Cell and Environment* **39**, 136–146.
- Säle V., Aguilera P., Laczko E., Mäder P., Berner A., Zihlmann U. & Oehl F., 2015. Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **84**, 38–52.
- Schläppi K. & Bulgarelli D., 2015. The plant microbiome at work. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **28**, 212–217.
- Schläppi K., Bender S.F., Mascher F., Russo G., Patrignani A., Camenzind T., Hempel S., Rillig M.C. & van der Heijden M.G.A., 2016. High-resolution community profiling of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **212**, 780–791.
- van der Heijden M.G.A., Martin F.M., Selosse M.A. & Sanders I.R., 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present and the future. *New Phytologist* **205**, 1406–1423.
- Verbruggen E., Rölling W.F.M., Gamper H., Kowalchuk G.A., Verhoef H.A. & van der Heijden M.G.A., 2010. Positive effects of organic farming on belowground mutualists – large scale comparison of mycorrhizal communities in agricultural soils. *New Phytologist* **186**, 968–979.