

**Livrable 1. Rapport d'avancement du projet « PROTEGE » :
Programme de mycorhization sur l'exploitation de Mickael
Sansoni**

**Evaluation du potentiel mycorhizien du sol avant plantation et
avancement global du projet**

GENERALITES ADMINISTRATIVES	
Référence du rapport:	NC2021.3
Date:	31/05/2021
Réalisé par:	CROSSAY THOMAS
COORDONNEES DU PRESTAIRE	
Adresse e-mail:	thomasjc.crossay@gmail.com
Téléphone:	+687 53.19.11

PRESTATION A L'ATTENTION DU CLIENT	
Chambre d'Agriculture de Nouvelle-Calédonie	
Coordonnées:	
A l'Attention	• Mme Maryse Orrière
Adresse:	Chambre d'agriculture de la Nouvelle-Calédonie (CANC) La Flotille / 3 rue Alcide Desmazure, BP111, 98845 Nouméa, Nouvelle-Calédonie
Téléphone:	+(687)739326
Contexte:	
Références codes échantillons:	03-2021-Limon argile-1 ; 03-2021-Limon argile-2 ; 03-2021-Limon argile-3; 03-2021-Limon argile-4; 03-2021-Limon argile-5; 03-2021-Minier-1; 03-2021-Minier-2 ; 03-2021-Minier-3 ; 03-2021-Minier-4 ; 03-2021-Minier-5 ; 03-2021-Silice calcaire-1; 03-2021-Silice calcaire-2 ; 03-2021-Silice calcaire-3 ; 03-2021-Silice calcaire-4 ; 03-2021-Silice calcaire-5 ; 03-2021-Maraichage-1; 03-2021-Maraichage-2 ; 03-2021-Maraichage-3 ; 03-2021-Maraichage-4 ; 03-2021-Maraichage-5.
Date de prélèvement des échantillons :	15/03/2021

Culture:	<i>Desmanthus virgatus</i> ; <i>signale</i> (parcelle fruitiers) ; <i>banana</i> (parcelle maraîchage)
Variété:	NA
Stade de la culture:	NA
Echantillons:	20 échantillons de sols + racines
Symptômes:	NA

Introduction

Ce projet expérimental a pour but d'analyser l'effet de l'inoculation de plantes supports avec des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) commercialisés par la société Aura Pacifica sur le développement des plantes en agroforesterie sur une parcelle de fruitiers (avocat, agrume) et sur une parcelle de maraîchage déjà en place dans le cadre du projet « PROTEGE » sur une durée d'un an et huit mois. L'impact de cette inoculation des plantes supports avec des CMA sera mesuré grâce à l'analyse de plusieurs paramètres tels que la croissance, le rendement (uniquement pour la partie maraîchage), la concentration en métaux des parties foliaires (Ni, Cr, Co, Fe, Mn), la structuration et l'aération des sols (dosage de la glomaline) ainsi que la résistance au stress hydrique des plantes en comparant des lignes témoins (non inoculées) avec des lignes inoculées.

Les objectifs de ce premier rapport sont : i) d'évaluer le potentiel mycorhizien des trois types de sols (argile limon, minier, silice calcaire) présents sur la future parcelle de fruitiers, ii) d'évaluer le potentiel mycorhizien de la parcelle maraîchage déjà en place et iii) fournir un état d'avancement global du projet incluant les premiers résultats.

Evaluation du potentiel mycorhizien des trois types de sols (argile limon, minier, silice calcaire) de la future parcelle de fruitiers et de la parcelle de maraîchage déjà en place

Matériel et Méthodes

Récolteur des échantillons : Thomas Crossay

Observations labo & Analyses : Thomas Crossay

Dates d'analyse : les 22, 23, 24, 25, 26/03/2021 et 24, 25, 26, 28/05/2021

Vingt échantillons de sols contenant des racines (100 g pour chaque prélèvement) ont été prélevés, cinq sur chaque type de sol de la future parcelle de fruitiers (argile limon, minier, silice calcaire), ces prélèvements ont été effectués dans la rhizosphère des plantes présentes sur la parcelle (*Desmanthus virgatus* et signale) et cinq sur la parcelle de maraîchage déjà en place dans la rhizosphère de *Musa sp.* (bananiers).

Les 20 échantillons de 100 g de sols, ont été analysés.

Trois analyses ont été réalisées afin d'estimer le potentiel mycorhizien du sol :

-Analyse quantitative et qualitative : La coloration des racines présentes dans les échantillons a été réalisée afin d'estimer la fréquence et l'intensité de la mycorhization (Phillips et Hayman 1970 ; Trouvelot et al. 1986). Brièvement cette technique consiste à colorer des fragments de racine avec du bleu Trypan afin de colorer les structures fongiques et donc d'estimer l'intensité et l'abondance en arbuscules du système racinaire qui reflète l'activité de la symbiose (efficience).

-Analyse quantitative : Une extraction des spores du sol afin de dénombrer le nombre de spores de CMA par gramme de sol a été effectuée selon la technique décrite par Daniel et Skipper, 1982. Cette technique consiste à extraire les spores de champignon mycorhiziens à arbuscules (CMA) du sol, en effet cette technique permet d'avoir une estimation rapide du potentiel mycorhizien du sol. Des tamis de 300 μm , 200 μm , 150 μm , 100 μm et 50 μm ont été utilisés. Chaque échantillon de sol est tamisé, les tamis sont superposés et le sol est entraîné à travers les tamis par un jet d'eau et le substrat contenant les spores est récupéré dans le tamis qui a les plus petites mailles. Après avoir effectué l'extraction des spores, ces dernières sont observées avec une loupe binoculaire, un comptage du nombre de spores viables est alors réalisé ainsi qu'une analyse morphologique afin d'identifier les CMA.

-Analyse qualitative : Une identification morphologique des spores a été réalisée grâce à l'observation des structures pariétales, cette identification permet d'estimer la diversité en CMA.

Résultats

Intensité de mycorhization et abondance en arbuscules des systèmes racinaires analysés sur les différents types de sol de la future parcelle de fruitiers et sur la parcelle de maraîchage

Table 1. Intensité de mycorhization et abondance en arbuscules des systèmes racinaires des plantes présentes sur chaque sol étudié.

30 fragments de racines d'1 cm ont été analysés pour chaque sol (6 par échantillon)	Intensité de mycorhization (en %)	Abondance en arbuscules des système racinaires (en%)
Sol 1 : argile limon	7,43 (faible)	1,61 (faible)
Sol 2 : minier	30,13 (faible)	14,8 (faible)
Sol 3 : silice calcaire	21,4 (faible)	4,75 (faible)
Sol 4 : maraîchage	95 (fort)	77,9 (fort)

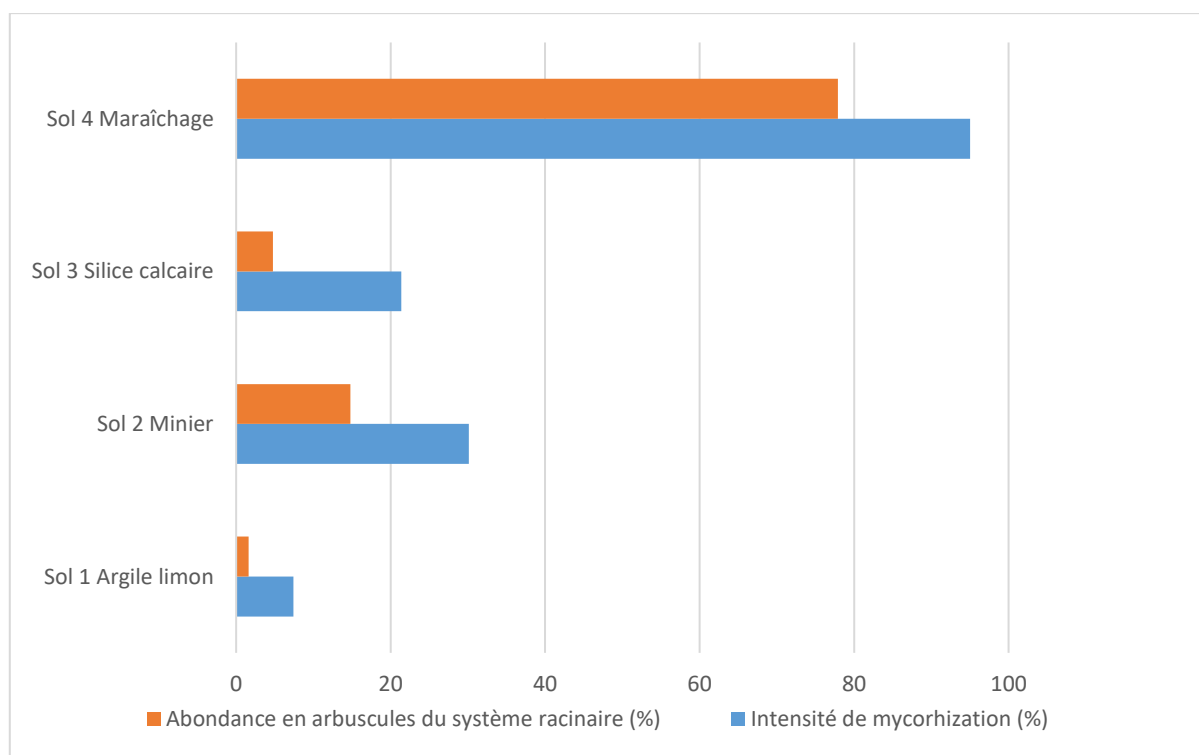


Figure 1. Représentation graphique de l'Intensité de mycorhization et de l'Abondance en arbuscules des systèmes racinaires pour chaque sol (cf. données brutes fichier Excel).

Structure intra-racinaires observées sur chaque type de sol de la future parcelle de fruitiers et sur la parcelle de maraîchage

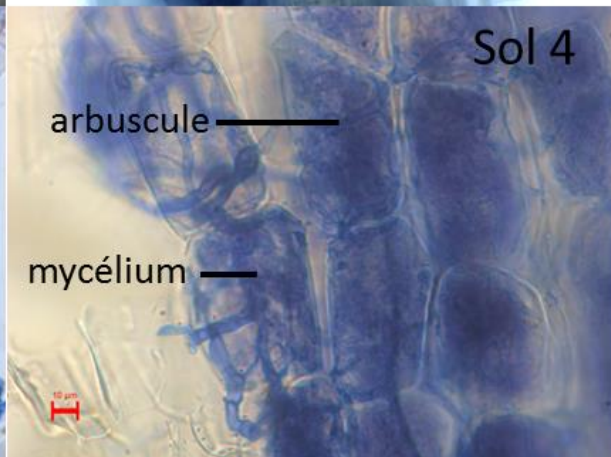
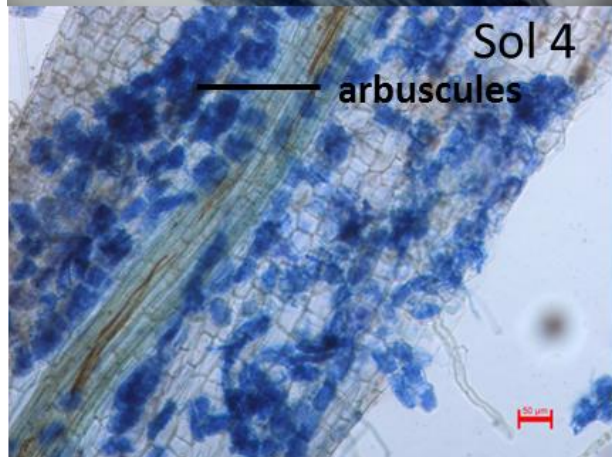
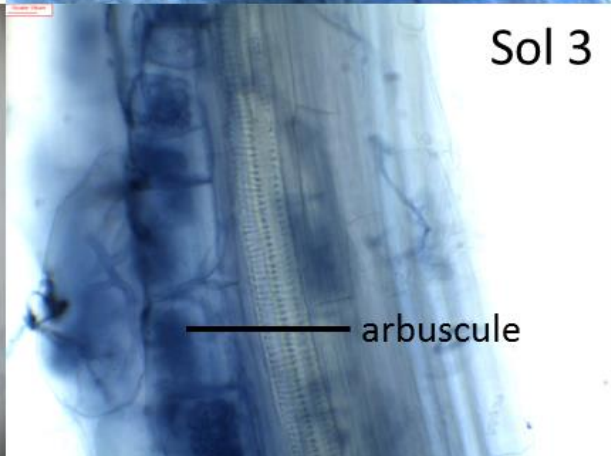
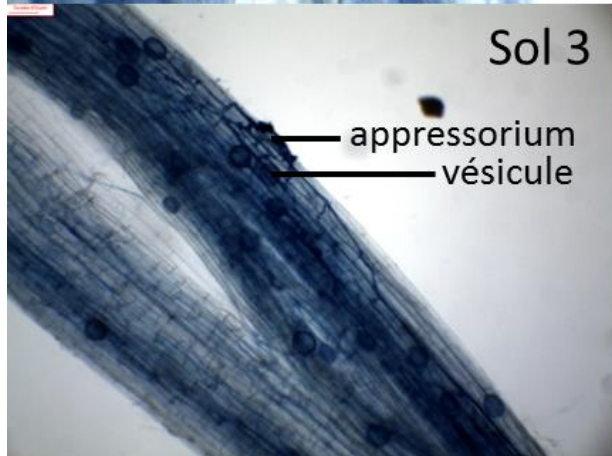
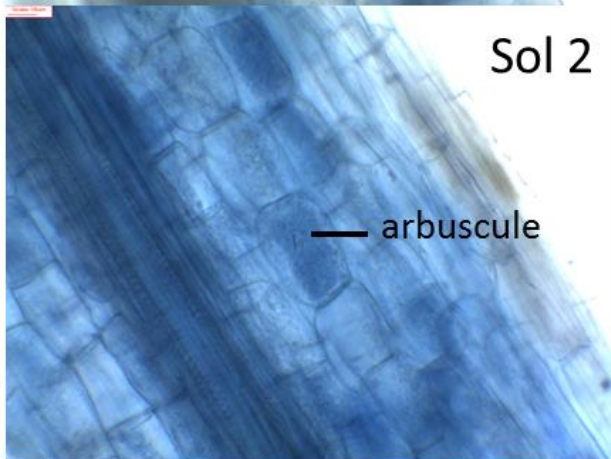
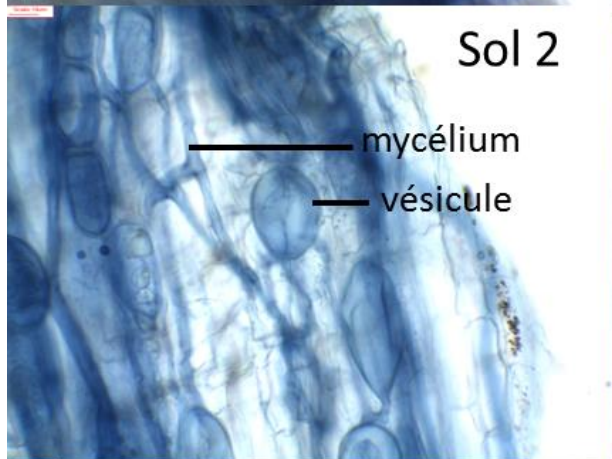
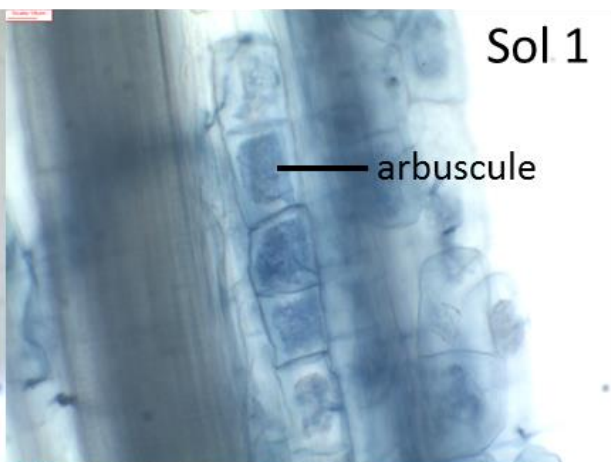
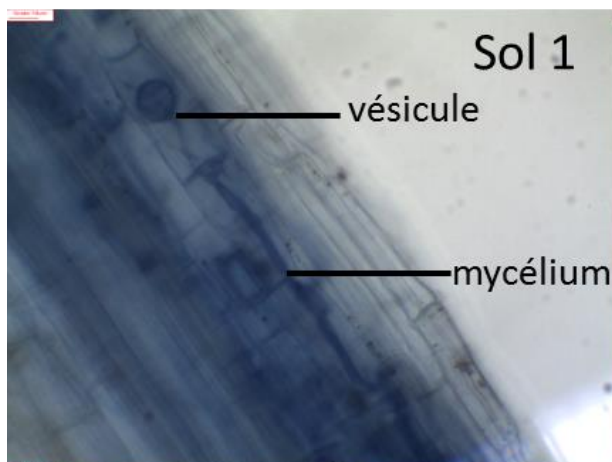


Figure 2. Structures intra racinaire des champignons mycorhiziens à arbuscules dans les racines des plantes présentes sur la future parcelle de fruitiers et sur la parcelle de maraîchage pour chaque type de sol. Les structures fongiques sont colorées avec du bleu Trypan. Sols de la future parcelle de fruitiers : Sol 1 : argile limon ; Sol 2 : minier ; Sol 3 : silice calcaire. Sol 4 : maraîchage.

Interprétation des résultats :

Rappel : l'abondance en arbuscules reflète l'efficacité de la symbiose en effet l'arbuscule est la structure d'échange (en nutriments et en eau) entre la plante et le champignon.

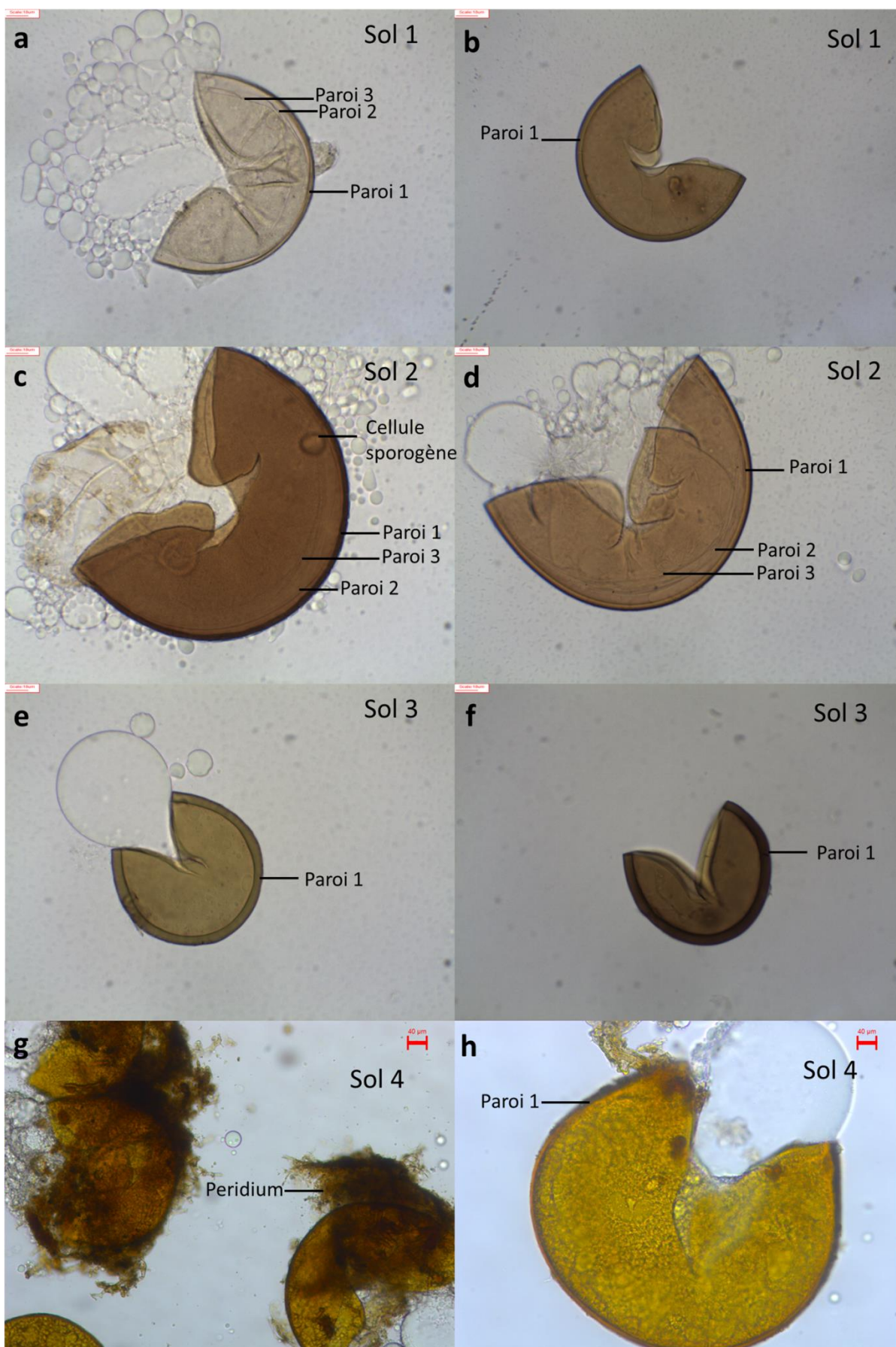
Les plantes sont endo-mycorhizées sur tous les sols. L'intensité de mycorhization varie de faible pour les sols de la parcelle de fruitiers à forte pour le sol de la parcelle de maraîchage déjà en place (Table. 1 ; Figs. 1, 2). L'abondance en arbuscules dans les racines des plantes est faible pour les trois sols de la parcelle de fruitiers et très forte dans les racines des bananiers présents sur la parcelle de maraichage ce qui signifie que les bananiers tirent une grande partie de leurs nutriments via la symbiose mycorhizienne (Table. 1 ; Figs. 1, 2). Il n'est pas étonnant de voir une forte intensité de mycorhization sur la parcelle de maraîchage, en effet M. Sansoni a amendé son sol avec un inoculum composé de différentes espèces de CMA (communication personnelle) et les pratiques d'agroforesterie favorisent le développement de ces champignons.

Dénombrement et identification des spores de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Table 2. Dénombrement des spores de CMA.

80 g de sol analysé pour chaque Sol (16 gr par échantillon)	Nb spores pour 80g de sol	Diversité nb d'espèces de CMA
Sol 1 : Argile limon	170 (faible)	2
Sol 2 : Minier	150 (faible)	1
Sol 3 : Silice calcaire	200 (faible)	1
Sol 4 : Maraîchage	600 (fort)	2

Identification des CMA



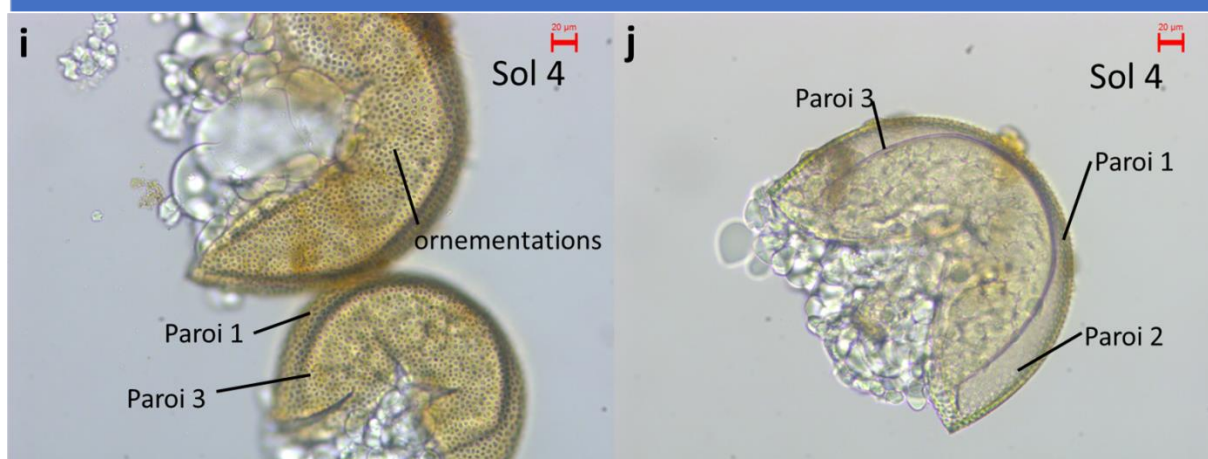


Figure 3. Spores de CMA retrouvées sur les différents sols analysés. Spores éclatées + PVLG. Sols de la future parcelle de fruitiers : Sol 1 : argile limon (a, b) ; Sol 2 : minier (c, d) ; Sol 3 : silice calcaire (e, f). Sol 4 : maraîchage (g, h, i, j).

Identification des spores de CMA isolées sur le sol 1 (argile limon) :

La première des deux espèces (Fig. 3a) possède des spores hyalines de taille moyenne (120 µm) avec trois parois séparées les unes des autres, ces caractéristiques morphologiques permettent d'affirmer que cette espèce appartient au genre *Acaulospora*. Pour déterminer l'espèce avec certitude un séquençage moléculaire serait nécessaire.

La deuxième espèce présente sur ce sol (Fig. 3b) possède également des spores de taille moyenne (100 µm), les spores sont de couleur brune et n'ont qu'une seule paroi. Ces caractéristiques morphologiques permettent d'affirmer que cette espèce appartient au genre *Glomus*. Pour déterminer l'espèce avec certitude un séquençage moléculaire serait également nécessaire.

Identification des spores de CMA isolées sur le sol 2 (minier) :

Une seule espèce a été retrouvée sur ce sol (Fig. 3c, d), cette espèce possède des spores de couleur brune de grande taille (200 µm) avec trois parois séparées les unes des autres, et une cellule sporogène ces caractéristiques morphologiques permettent d'affirmer que cette espèce appartient au genre *Dentiscutata*. D'après la morphologie de cette espèce on peut conclure qu'il s'agit très probablement de *Dentiscutata heterogama*.

Description complète accessible via ce lien : <http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/gigasporaceae/dentiscutata/heterogama.html>

Identification des spores de CMA isolées sur le sol 3 (silice calcaire) :

Une seule espèce a été retrouvée sur ce sol (Fig. 3e, f), elle possède des spores de taille moyenne (80 μm), les spores sont de couleur brune et n'ont qu'une seule paroi. Ces caractéristiques morphologiques permettent d'affirmer que cette espèce appartient au genre *Glomus*, il s'agit très probablement de la même espèce que celle présente sur le sol 1 (argile limon Fig. 3b). Pour déterminer l'espèce avec certitude un séquençage moléculaire serait également nécessaire.

Identification des spores de CMA isolées sur le sol 4 (maraîchage) :

La première des deux espèces (Fig 3g, h) possède des spores jaunes-marrons de grande taille (240 μm) avec une seule paroi, les spores sont recouvertes d'un peridium (manteau mycélien ; Fig. 3g) ces caractéristiques morphologiques permettent d'affirmer que cette espèce appartient au genre *Funneliformis* et à l'espèce *F. mosseae*.

Description complète accessible via ce lien :

<http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/funneliformis/mosseae.html>

La deuxième espèce présente sur ce sol (Fig. 3i, j) possède des spores de taille moyenne (150 μm), les spores sont hyalines et ont trois parois et possèdent des ornements (Fig. 3i). Ces caractéristiques morphologiques permettent d'affirmer que cette espèce appartient au genre *Acaulospora* et probablement à l'espèce *Acaulospora scrobiculata*.

Description complète accessible via ce lien :

<http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/classification/acaulosporaceae/acaulospora/scrobiculata.html>

Interprétation des résultats :

Rappel : Les CMA sporulent lorsqu'ils sont stressés pour se reproduire, ils sont capables de sporuler en trois à quatre mois. La détermination du nombre de spore par gramme de sol permet d'avoir une estimation du potentiel myco-rhizogène du sol mais ne reflète pas l'activité et l'efficacité de la symbiose sur les plantes.

La sporulation est faible sur les sols de la future parcelle de fruitiers (Table. 2) et forte sur la parcelle de maraîchage déjà en place. La diversité est relativement faible sur tous les sols

analysés (Table. 2). L'espèce *F. mosseae* est une espèce connue en termes d'amélioration de la croissance des plantes, cette espèce a été inoculée par M. Sansoni. En effet après discussion avec M. Sansoni un inoculum composé de quatre espèces a été utilisé lors de la mise en place de la parcelle de maraîchage sur ces quatre espèces, seule l'espèce *F. mosseae* a été retrouvée ce qui signifie que c'est la seule à avoir réussi à s'adapter au sol de la parcelle. Les espèces de CMA identifiées sont différentes des espèces commercialisées par Aura Pacifica.

Commentaires et Conclusion

Concrètement ces résultats nous permettent de positionner clairement les objectifs de notre projet : sur la parcelle de fruitiers la faible présence des CMA (Table 1 et 2 ; Fig. 1, 3a, b, c, d, e, f) nous permettra de comparer un système (en terme de croissance, de concentration en métaux des parties foliaires, de la structuration et l'aération des sols ainsi que la résistance au stress hydrique) ou l'on apporte des CMA (lignes mycorhizées avec l'inoculum Aura Pacifica) avec un système sans apport et naturellement pauvre en CMA (lignes non mycorhizées avec l'inoculum Aura Pacifica).

Pour la parcelle maraîchage l'objectif sera d'analyser si l'apport de différentes espèces de CMA (inoculum Aura Pacifica) sur un sol déjà très mycorhizés (Table 1 et 2 ; Fig. 1, 3g, h, i, j) permet d'apporter un gain en termes de croissance, de rendement, de diminution de la concentration en métaux des parties foliaires (Ni, Cr, Co, Fe, Mn), de structuration d'aération du sol et de résistance au stress hydrique des plantes. Dans la littérature il est connu qu'il existe une complémentarité fonctionnelle des différentes espèces de CMA (Crossay et al. 2019), mais ces résultats reposent principalement sur des expériences en serre en conditions contrôlées, ce projet permettra d'analyser si ces résultats se confirment sur le terrain.

Avancement globale du projet et résultats préliminaires

Description des parcelles et avancement du projet

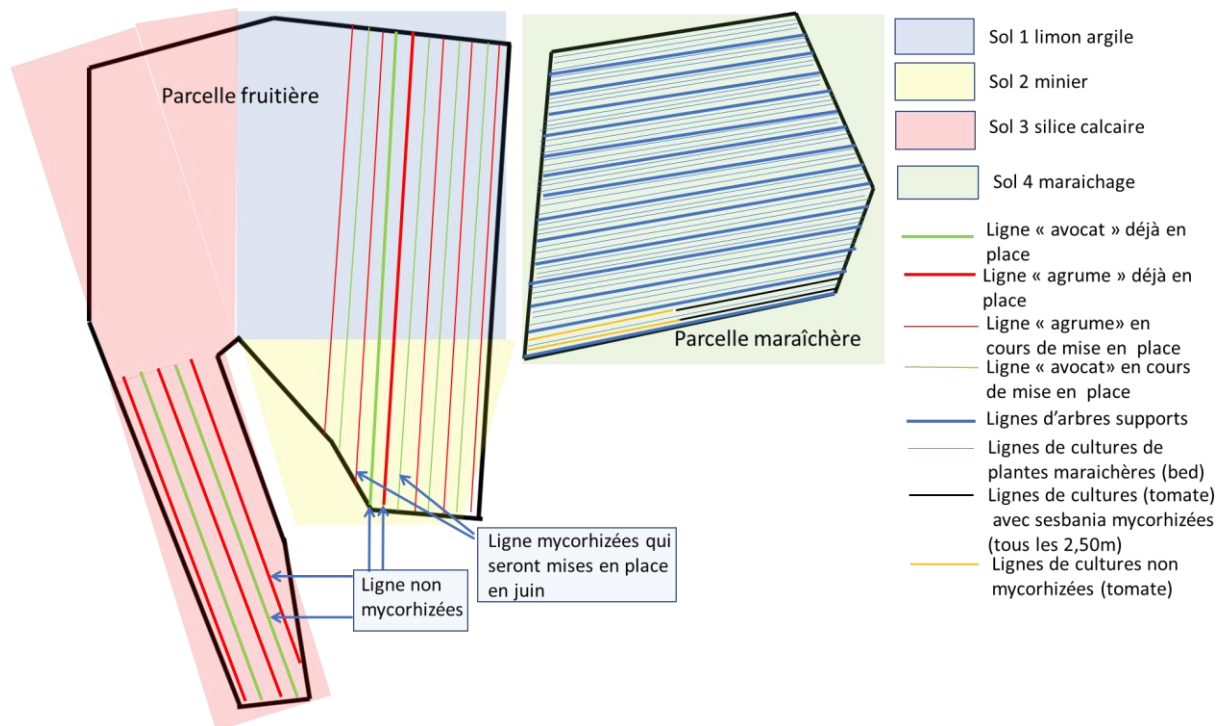


Figure 4. Schéma des parcelles et avancé du projet.

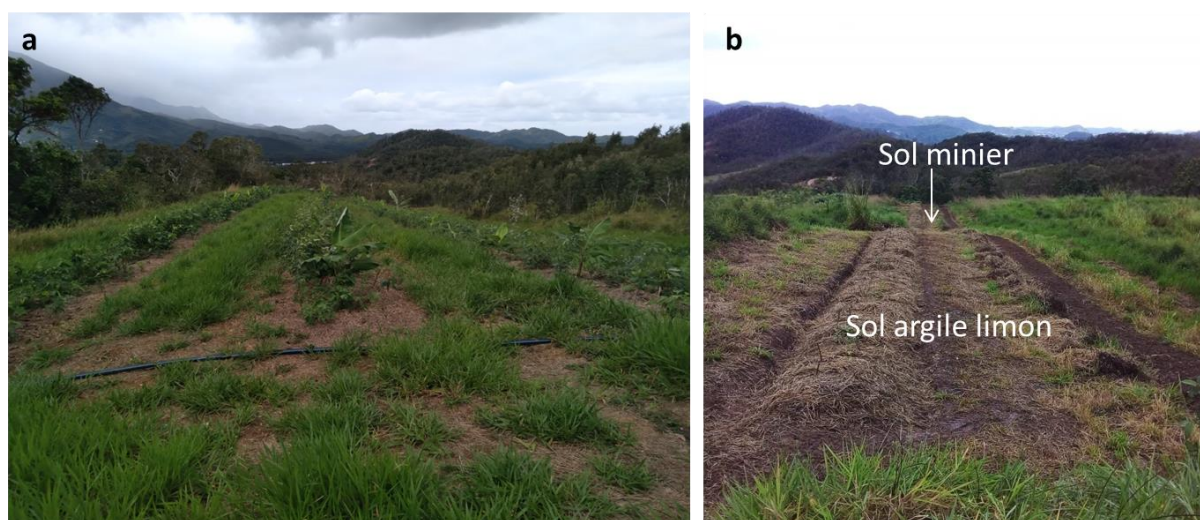


Figure 5. Photo des lignes déjà en place : a) Sol silice calcaire (5 lignes). b) photo des lignes non mycorhizées sur sol argile limon et sur sol minier (2 lignes sur chaque type de sol).



Figure 6. Photo des lignes de tomate sur la parcelle de maraîchage a) ligne non mycorhizée sans sesbania b) ligne mycorhizée avec sesbania.

Au niveau de l'avancement du projet les lignes sur le sol silice calcaire sont déjà plantées (depuis le 28 avril 2021) et les deux lignes non mycorhizées sur sol minier et argile calcaire viennent d'être plantées (Figs. 4, 5 ; le 28 mai 2021). Les lignes sur tomate sont également en place sur la parcelle maraîchage (depuis le 5 mai 2021). Il reste donc 4 lignes mycorhizées (2 sur sol minier et 2 sur sol argile calcaire) à réaliser pour pouvoir faire l'étude comparative.

Remarque : les changements par rapport au protocole de départ sont en gras.

La parcelle expérimentale de fruitiers comporte 3 types de sols (sol 1 : argile limon ; sol 2 : minier ; sol 3 : silice calcaire ; Fig. 4). Les plantations ont été réalisées comme prévu dans le protocole de départ, des lignes de 100 m de long sur 1 m de large en alternant une ligne « avocat » puis une ligne « agrume » ont été réalisées. Ces lignes sont composées d'une séquence répétée, ces séquences sont composées d'un cortège de plante (Fig. 7) **des ambrevades ont été semées sur le côté Est des séquences « agrume » et « avocats » (Fig. 7)**. Pour les lignes « avocat » la séquence mesure 6,125 m de long et est répétée sur les 100 m (Fig. 7) donc une ligne contient 16 séquences. Pour les lignes « agrume » la séquence mesure 3.375 m de long et est répétée sur les 100 m (Fig. 7) soit 30 séquences par ligne.

FRUITIER : AGRUME

← 3,375 m

○	1,125	1,5	2,25	2,5	3,375
ricin	ricin	ricin	ricin	ricin	ricin
	manioc				manioc
curcuma	curcuma	curcuma	curcuma	curcuma	curcuma
	moringa		eucalyptus		sesbania
AGRUME	gliricida		bananier		faux lila ou jamelon ou bois noir
sesbania		faux poivrier	sesbania	faux poivrier	
	manioc	taro		taro	manioc
titonia	titonia	titonia	titonia	titonia	titonia
ambrevades					

FRUITIER : AVOCAT

← 6,125 m

○	0,875	1,75	2,625	3,5	4,375	5,25	6,125
ricin	ricin	ricin	ricin	ricin	ricin	ricin	ricin
	manioc		manioc		manioc		manioc
curcuma	curcuma	curcuma	curcuma	curcuma	curcuma	curcuma	curcuma
		sesbania		sesbania		sesbania	
AVOCAT	moringa	bananier ou café ou noni	acacia mangium	bananier ou café ou noni	acacia mangium	bananier ou café ou noni	moringa
sesbania		faux poivrier	faux lila	faux poivrier	jamelon ou bois noir	faux poivrier	gliricida
	gliricida						
	manioc	taro	manioc	taro	manioc	taro	manioc
titonia	titonia	titonia	titonia	titonia	titonia	titonia	titonia
ambrevades							

Figure 7. Séquences « agrume » et « avocats ».

Pour les séquences « avocats » la plante hôte choisie pour disséminer les mycorhizes est le **sesbania** (légumineuse) car cette plante possède une croissance rapide, est pérenne et est extrêmement mycotrophe (réceptive aux mycorhizes). **Les pieds d'avocats (1 par séquence ; Fig. 7) devaient être inoculés en pépinière mais cela n'a pas été fait pour des raisons techniques la stratégie a donc été d'implanter un sesbania mycorhizé en pépinière au pied des avocateurs (Fig. 7). Sur le sol silice calcaire seulement une ligne mycorhizée au lieu de trois a été réalisée pour des raisons topographiques (Fig. 4). Sur cette ligne « mycorhizée » avocat, les sesbanias ont été inoculés en pépinière (3 plants par séquence ; Fig. 7) avant d'être implantés sur le terrain.**

Pour les séquences « agrume » la plante hôte choisie devait être le **faux poivrier finalement pour des raisons pratique le sesbania a également été choisie**. Les sesbanias (2 par séquence ; Fig. 7) ont été inoculés avec l'inoculum de CMA au stade plantule en pépinière. Les pieds d'agrumes (1 par séquence ; Fig. 7) ont également été inoculés au stade plantule en pépinière. **Finalement quatre porte-greffes (mycorhizés) ont été plantés côte à côte afin de sélectionner celui qui se développe le mieux sur le terrain (Citrumelo, C35, Sacaton, Poncirus). Sur le sol silice calcaire seulement deux lignes mycorhizées au lieu de trois ont été réalisées pour des raisons topographiques (Fig. 4).**

Les 3 lignes témoins « avocat » (une par type de sol) sont déjà mises en place ainsi que les 3 lignes témoins « agrume » (une par type de sol) (Figs. 4, 5).

Commentaire : Pour le projet l'important est d'avoir deux lignes mycorhizées (agrume et avocat) par type de sol et deux lignes non mycorhizées (agrume et avocat) par type de sol afin de pouvoir réaliser une étude comparative. Il faut donc rapidement mettre en

place sur le sol minier et argile limon une ligne mycorhizée d'agrumes et d'avocat
 L'implantation de ces lignes devrait être réalisée courant juin 2021.

Description de la parcelle de maraichage de M. Mickael Sansoni

Le système développé par M. Mickael Sansoni est composé de lignes de 70 m de long en moyenne sur 1 m de large. Ces lignes sont composées d'une séquence répétée, ces séquences sont composées d'un cortège de plantes (Fig. 8). La séquence mesure 3 m de long et est répétée sur les 70 m (Fig. 8) donc une ligne contient une 20 aine de séquences. Entre chacune de ces lignes un espace de cinq mètres permet la culture des légumes. Sur ces 5 m il y'a trois lignes de légumes de 60 cm séparées par des chemins d'accès (Figs.4, 8).

Sur deux moitiés de deux interlignes de tomate (Fig. 4, 6 et 8) des *Sesbania grandiflora* inoculés avec les CMA en pépinière ont été placés tous les 2,50 m (au lieu de 1,5m dans le protocole initial) et sur les deux autres moitiés de ces mêmes interlignes les tomates sont cultivées sans sesbania. Seulement deux interlignes ont été réalisées (au lieu de 9 interlignes dans le protocole initial). En effet la saison étant particulièrement pluvieuse les tentatives de plantation de semis maraîcher (courgette, concombre, radis...) ont échoué à cause des attaques d'escargots (de nouveaux essais seront envisagés dans les prochains mois).

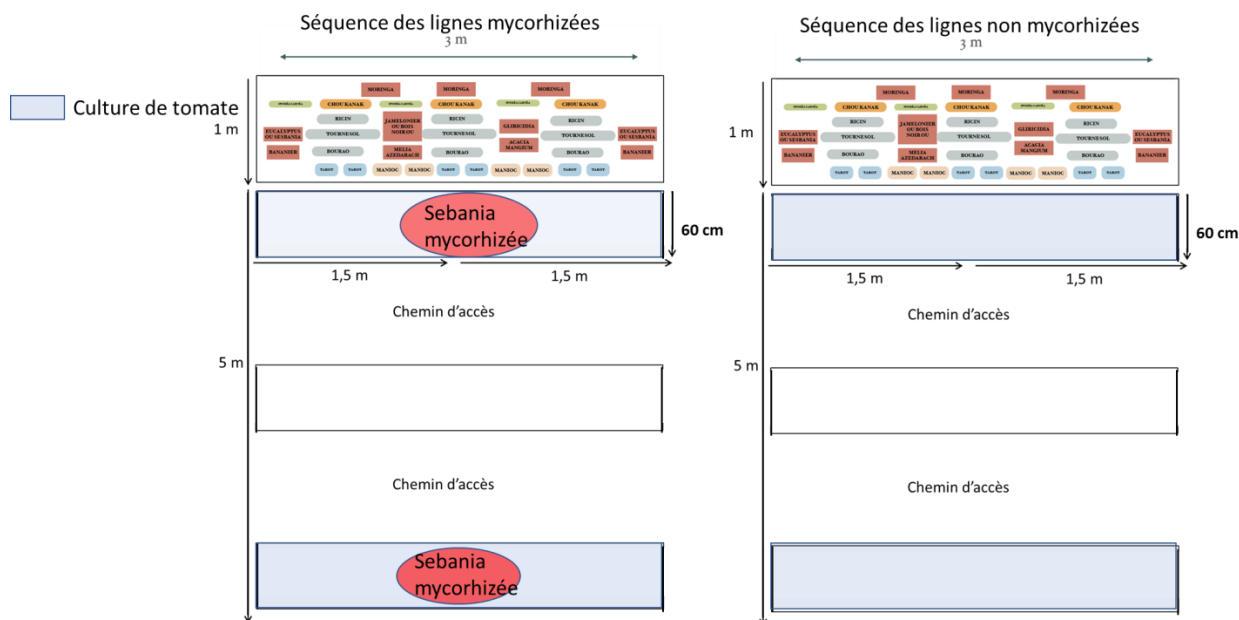


Figure 8 : Séquence « maraîchage ».

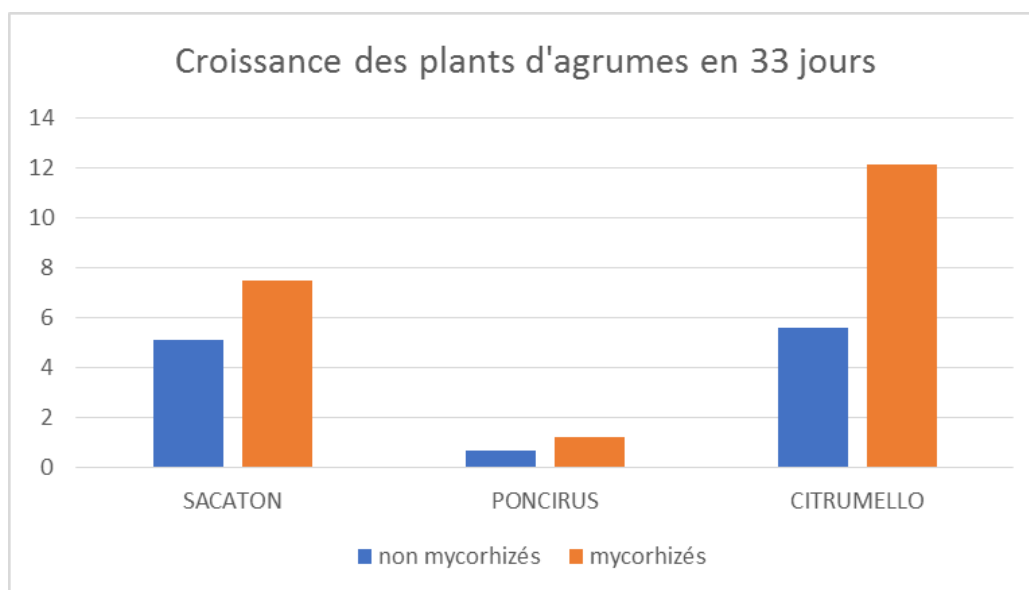
Résultats préliminaires : Relevés de croissance

Figure 9. Croissance des plants d'agrumes en centimètre 33 jours après implantations sur le terrain.



Figure 10. Photo d'un porte greffe d'agrumes (Citumelo) 3 semaines après plantation sur sol silice calcaire : a) porte greffe mycorhizé b) porte greffe non mycorhizé. Le choque de transplantation n'est pas visible sur les plants mycorhizés.

Commentaires : En moyenne, la croissance des plants d'agrumes sur 33 jours est deux fois supérieures sur les portes greffe Citrumelo (54%) et Poncirus (42%) et 32% supérieur sur le porte greffe Sacaton (Fig. 9). Des mesures spectrophotométriques ont également permis de montrer que les plan mycorhizés sont beaucoup plus riches en chlorophylle que les plants non mycorhizés, ce qui est d'ailleurs visible à l'œil nu (Fig. 10). Les effets des mycorhizes ont également été constatés en pépinière sur les portes greffe. Ces résultats montrent déjà l'effet

positif des mycorhizes et confirment l'intérêt d'inoculer les plants d'agrumes en pépinière avant plantation avec les solutions mycorhiziennes développées par Aura Pacifica.

Rapport Financier.

	Sommes en CFP
<u>Petit matériel, produits, utilisation d'équipements</u>	100 000
<u>Estimation du potentiel mycorhizien du sol</u>	300 000
<u>Fourniture de l'inoculum et inoculation en pépinière</u>	180 000
<u>Rédaction du rapport</u>	3 jours
<u>Temps de travail global (déplacement, analyse, réunion, rédaction)</u>	11 jours
Estimation des coûts	Environ 700 000 CFP

Bibliographie

Crossay T, Majorel C, Redecker D, et al (2019) Is a mixture of arbuscular mycorrhizal fungi better for plant growth than single-species inoculants? *Mycorrhiza* 29:325–339. doi: 10.1007/s00572-019-00898-y

Daniels BA and Skipper HD (1982). Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: Schneck NC. (eds.) *Methods and principles of mycorrhizal Research*. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota; p.244.

Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158–161

Trouvelot A, Kough JL Gamp; Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In : *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (eds.). INRA Press, Paris, pp. 217-221.