



HAL
open science

Contribution des endomycorhizes à la production de plants micropropagés d'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr)

Jean-Philippe Guillemin

► **To cite this version:**

Jean-Philippe Guillemin. Contribution des endomycorhizes à la production de plants micropropagés d'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr). Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Bourgogne, 1994. Français. NNT: . tel-02847373

HAL Id: tel-02847373

<https://hal.inrae.fr/tel-02847373>

Submitted on 27 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

UFR : Sciences de la Vie

Spécialité : Biologie des relations plantes/micro-organismes

**CONTRIBUTION DES ENDOMYCORHIZES À LA
PRODUCTION DE PLANTS MICROPROPAGÉS D'ANANAS**

(Ananas comosus (L.) Merr)

THÈSE

présentée par

Jean-Philippe Guillemin

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université

Soutenue le 27 mai 1994 devant la Commission d'Examen :

Dr. S. Gianinazzi	Directeur de thèse
Dr. Y.R. Dommergues	Rapporteur
Mr J. Marchal	Rapporteur
Dr. V. Gianinazzi-Pearson	Examineur
Pr. J. Monin	Examineur
Mr Y. Mathieu	Examineur

à mon père,

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Phytoparasitologie (INRA-CNRS, INRA de Dijon), le CIRAD/FLHOR de Montpellier et la société Vitropic S.A. (St Mathieu de Trévières).

Ce sujet de thèse a été retenu par le Ministère de la Recherche et de la Technologie dans le cadre d'un appel d'offre spécifique à l'Agronomie Tropicale et il a été financé par une allocation de Recherche.

Je remercie

Monsieur S. Gianinazzi, Directeur du Laboratoire de Phytoparasitologie, de m'avoir proposé ce travail et accepté de le diriger. Qu'il soit assuré de ma reconnaissance pour ces conseils pendant toutes ces années de thèse.

Monsieur J.J. Lacoëuilhe, ex-responsable du programme "Ananas" du CIRAD, pour la confiance qu'il m'a toujours accordée.

Monsieur J.B. Danquechin-Dorval, responsable de la société Vitropic, pour sa contribution à cette collaboration en mettant à ma disposition des *vitro*plants d'ananas.

Madame V. Gianinazzi-Pearson, Directeur de Recherche CNRS, pour l'intérêt qu'elle a toujours porté à mon travail et ses suggestions, et pour sa participation au jury de cette thèse.

Au cours de ces travaux, j'ai bénéficié de la participation de plusieurs laboratoires du CIRAD. Je tiens à remercier

Monsieur J. Marchal, chef de service du laboratoire de Biochimie et Physiologie, pour l'ensemble des analyses minérales réalisées par son laboratoire. Je lui suis très reconnaissant de prendre part au jury de cette thèse en tant que rapporteur.

Monsieur J.L. Sarah, responsable du laboratoire de Nématologie, et Monsieur X. Mourichon, responsable du laboratoire de Pathologie, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Leurs connaissances des pathogènes de l'ananas m'ont permis d'avancer mes recherches.

Je tiens à associer mes remerciements à

Monsieur Y.R. Dommergues, Directeur de Recherche Emérite au CNRS, d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail

Mlle J. Monin, Professeur à l'Université de Bourgogne, et Monsieur Y. Mathieu, Directeur de Production chez Vitropic, de bien vouloir participer à ce jury de thèse.

Monsieur A. Trouvelot, Chargé de Recherche INRA, pour les connaissances dont il m'a fait bénéficier.

Je tiens à adresser toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du laboratoire de Phytoparasitologie qui, durant ces années, m'ont soutenu et surtout supporté.

N'étant pas possible de citer toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail, qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

	page
1 - Problématique de l'ananas	2
1.1 - Importance de l'ananas dans le monde	2
1.2 - L'ananas et son milieu	2
1.3 - Croissance et nutrition minérale	2
1.4 - Maladies, ravageurs et moyens de lutte	3
1.5 - Mise en place de plantation	3
1.6 - Vitroplants d'ananas	4
1.6.1 - Production de vitroplants	4
1.6.2 - Vitroplants au champ	5
1.7 - Les mycorhizes de l'ananas	5
2 - Objectifs	8

MATERIELS et METHODES

1 - Matériel végétal	10
1.1 - Vitroplants d'ananas	10
1.2 - Champignons endomycorhizogènes	10
2 - Substrat et conditions de culture	12
2.1 - Substrat de culture	12
2.2 - Conditions de culture	12
3 - Endomycorhization	12
3.1 - Inoculation des champignons endomycorhizogènes	12
3.2 - Colorations et estimation de l'infection endomycorhizienne	14
4 - Evaluation de l'effet endomycorhizien	14
4.1 - Production végétale	14
4.2 - Nutrition minérale	14
4.3 - Composés photosynthétiques	16
5 - Etude de la protection par les endomycorhizes	16
5.1 - Nématode phytophage	16
5.2 - Champignon pathogène tellurique	16

5.3 - Dosage de composés phénoliques racinaires associés aux phénomènes de résistance	17
6 - Analyse de la compatibilité endomycorhizes/pesticides	17
6.1 - Fongicides	17
6.2 - Nématicides	18

RESULTATS

CHAPITRE I : L'ENDOMYCORHIZATION CONTROLEE CHEZ L'ANANAS MICROPROPAGE

1 - Endomycorhization des <i>vitroplants</i>	19
2 - Mise en évidence d'un effet endomycorhizien	21
2.1 - Effet sur la croissance	21
2.2 - Effet sur la nutrition minérale	21
2.2.1 - Nutrition en macroéléments	21
2.2.2 - Nutrition en microéléments	22
2.3 - Discussion	22
3 - Sélection de champignons endomycorhizogènes plus aptes à stimuler la croissance des <i>vitroplants</i>	23
3.1 - Développement de l'infection endomycorhizienne	23
3.2 - Efficacité des champignons symbiotiques	23
3.3 - Nutrition minérale	24
3.4 - Discussion	24
4 - Effet de la fertilisation phosphatée sur le fonctionnement de la symbiose endomycorhizienne	25
4.1 - Conséquence sur la production végétale	25
4.2 - Fonctionnement de la symbiose endomycorhizienne	27
4.3 - Incidence sur la nutrition minérale	27
4.4 - Discussion	27
5 - Contenu en pigments photosynthétiques foliaires et développement de l'infection endomycorhizienne	29
5.1 - Quantités en pigments photosynthétiques	29
5.2 - Discussion	29
CONCLUSION	32

**CHAPITRE II : RÔLE DES ENDOMYCORHIZES SUR LE DEVELOPPEMENT DES
VITROPLANTS D'ANANAS EN CONDITIONS DE STRESS ABIOTIQUE ET
BIOTIQUES**

1 - Rôle des endomycorhizes dans un sol à forte salinité	33
Discussion	33
2 - Influence des endomycorhizes sur la synthèse de composés phénoliques racinaires	34
Discussion	34
3 - Rôles des endomycorhizes lors d'attaques de pathogènes	35
3.1 - Cas de <i>Pratylenchus brachyurus</i> (Godfrey) Filip & Schurr-Steekh	36
3.1.1 - Inoculation endomycorhizienne avant celle des nématodes	36
3.1.2 - Inoculation simultanée des endomycorhizes et du pathogène	36
3.1.2.1 - À la sortie de la <i>vitro</i> culture	36
3.1.2.2 - Au moment du repiquage	37
3.1.3 - Inoculation endomycorhizienne après celle des nématodes	38
3.1.4 - Discussion	38
3.2 - Cas de <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands	39
3.2.1 - Effet de l'apport de <i>P. cinnamomi</i> au moment du repiquage	39
3.2.2 - Effet de l'apport de <i>P. cinnamomi</i> un mois après le repiquage	40
3.2.3 - Discussion	41
CONCLUSION	42

**CHAPITRE III : INFLUENCE DES PESTICIDES SUR LE DEVELOPPEMENT ET
L'ACTIVITE DES ENDOMYCORHIZES**

1 - Effets de fongicides appliqués au sol	43
1.1 - Développement et activité de l'infection endomycorhizienne	43
1.2 - Influence sur la croissance	43
1.3 - Effet sur la nutrition minérale	43
1.4 - Effet du phoséthyl-Al sur la synthèse de composés phénoliques racinaires	44
1.5 - Discussion	45
2 - Application de nématicides	45
2.1 - Incidence sur l'infection endomycorhizienne	45

2.2 - Effet sur la croissance	46
2.3 - Effet sur la nutrition minérale	46
2.4 - Discussion	46
CONCLUSION	50

CHAPITRE IV : UTILISATION D'INOCULI COMMERCIAUX DANS LA PRODUCTION D'ANANAS MICROPROPAGES

1 - Inoculation et croissance de l'ananas	51
1.1 - Croissance et infection endomycorhizienne en sol alcalin	51
1.2 - Croissance et infection endomycorhizienne en sol acide	51
2 - Effet sur la nutrition minérale	52
2.1 - Nutrition minérale en sol alcalin	52
2.2 - Nutrition minérale en sol acide	52
3 - Discussion	53
CONCLUSION	53

DISCUSSION et CONCLUSION GENERALE 55

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 60

ANNEXES : PUBLICATIONS

Annexe 1 : L'endomycorhization de <i>vitroplants</i> d' <i>Ananas comosus</i> : mise en évidence d'un effet mycorhizien. <i>Fruits</i> .	73
Annexe 2 : Screening of VA endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated pineapple plants. <i>Agronomie</i> .	77
Annexe 3 : Influence of phosphate fertilization on fungal alkaline phosphatase activity in relation arbuscular mycorrhizal effects on plant growth. <i>Agriculture, Ecosystems and Environment (soumis)</i> .	83
Annexe 4 : Influence des endomycorhizes à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale d'ananas (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.) dans un sol à forte salinité. <i>Fruits (soumis)</i> .	105
Annexe 5 : Control by arbuscular endomycorrhizae of root colonisation by <i>Pratylenchus brachyurus</i> in pineapple microplants. <i>Agriculture Science of Finland (sous presse)</i> .	120

Annexe 6 : Contribution of endomycorrhizas in biological protection of pineapple (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr.) against <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands. <i>Agriculture Science of Finland</i> .	140
Annexe 7 : Interactions between soil-applied fungicides, endomycorrhiza fungal activity and plant growth. <i>Soil Science (Trends in Agricultural Science)</i> .	151
Annexe 8 : Application of commercial (V)AM fungal inoculants to the establishment of micropropagated grapevine rootstock and pineapple plants. <i>Agronomie</i> .	163

ANNEXE : ANALYSES MINERALES

Annexe 9 : Ensemble des analyses minérales foliaires.	170
---	-----

ANNEXES

Annexe 10 : Culture et entretien de champignons endomycorhizogènes.	188
Annexe 11 : Analyses de sols.	189

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1 - Problématique de l'ananas

1.1 - Importance de l'ananas dans le monde

Le marché annuel de l'ananas est évalué à environ 11000000 tonnes (Guinchard, 1991). Ce volume a progressé ces dernières années surtout par une forte production en Asie (Philippines et Thaïlande) et par l'amélioration des techniques culturales.

Cette culture est très répandue dans les pays situés entre les tropiques, mais seulement une dizaine d'entre eux pratiquent l'exportation. La production est réalisée, soit dans des petites exploitations pour alimenter le marché local, soit dans des plantations de taille moyenne qui se consacrent surtout à l'exportation de fruits frais, soit dans d'importantes unités de production le plus souvent installées autour d'une conserverie (Py *et al.*, 1984).

1.2 - L'ananas et son milieu

L'ananas est une plante pantropicale. Le principal facteur limitant son extension est la température. A l'intérieur de cette aire de répartition, sa caractéristique dominante est, comme beaucoup de Broméliacées, de tolérer des niveaux de pluviométrie assez faibles (Py *et al.*, 1984) permettant de valoriser des sites non exploités des tropiques semi arides (Marzola et Bartholomew, 1979).

Au niveau du sol, la perméabilité est la principale caractéristique physique intéressant l'ananas. La croissance racinaire est bonne dans un sol bien aéré capable d'éliminer les excès d'eau et de renouveler l'air (Bowers, 1929). Au point de vue chimique, ce sont les sols acides les plus intéressants pour la production d'ananas (pH situé entre 4,5 et 5,5) (Godefroy *et al.*, 1976 ; Carracedo *et al.*, 1987).

1.3 - Croissance et nutrition minérale

La croissance de l'ananas est composée de trois phases. On distingue d'abord la croissance végétative des plants (racines, tige et feuilles). Elle est suivie par la phase de développement du fruit et de la couronne. Parallèlement à cette dernière, la troisième phase correspond à la production des rejets, qui peut conduire à un nouveau fruit (deuxième récolte) si les rejets ne sont pas coupés pour être plantés (Py *et al.*, 1984).

En ce qui concerne la nutrition minérale, les deux éléments les plus influents sur la croissance végétative et la production de fruits sont l'azote (N) et le potassium (K) (Martin-Prevel, 1959 ; Lacoeuilhe, 1978). Le phosphore (P), le calcium (Ca) et le magnésium (Mg) ont une action plus faible (Marchal, 1971 ; Martin-Prevel, 1970) et leurs teneurs dans la

plante sont moindres que celles de l'azote et du potassium. Les amendements de phosphore et de magnésium sont réalisés en fumure de fond pendant la préparation du terrain alors que les apports d'azote et de potassium sont fractionnés afin d'optimiser leur utilisation par les plantes (Lacoeuilhe, 1978).

1.4 - Maladies, ravageurs et moyens de lutte

Une des maladies de l'ananas est associée à la présence de *Phytophthora cinnamomi* Rands dans les racines. Il s'agit de la pourriture des racines ou "root rot". Ce pathogène altère le système racinaire, induit des symptômes foliaires (Mehrlich, 1936) et entraîne la production de fruits sans valeur commerciale (Py *et al.*, 1984). Il est même capable de détruire totalement une plantation (Anderson, 1951). Actuellement, sa lutte est effectuée essentiellement par voie chimique (Rochbach et Schenck, 1985) et par quelques approches bio-écologiques telles que l'amélioration du drainage ou la baisse du pH des sols jusqu'à des valeurs de 4,5.

L'ananas subit également des attaques de ravageurs telluriques tels que les nématodes. Ces ravageurs sont présents dans tous les types de sol. Un grand nombre d'espèce est inféodé à l'ananas mais seulement quatre ont un impact économique (Py *et al.*, 1984). *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filip & Schurr-Steekh fait partie de ces derniers. C'est un endoparasite migrateur qui provoque des lésions au niveau de la zone d'élongation des racines (Guérout, 1975). Ce ravageur peut réduire de 35% les rendements en fruit et de 80% la production de rejets (Lacoeuilhe et Guérout, 1976). Cette espèce est présente dans de nombreux pays mais c'est en Côte d'Ivoire qu'elle fait le plus de dégâts (Guérout, 1975) car l'ananas y est cultivé dans des sols à pH favorable à sa prolifération (pH 5 à 5,5).

La lutte contre les nématodes fait intervenir des techniques culturales préventives telles que les rotations avec des plantes pièges (Godfrey et Hoshino, 1934) ou avec des plantes capables d'éloigner ces ravageurs telluriques (Ayala, 1967). De meilleurs résultats sont obtenus en incorporant au sol des nématicides de contact avant plantation (Keetch, 1979). Ces techniques préventives ne suffisent pas, il est nécessaire de traiter en cours de végétation avec des nématicides systémiques (Sarah, 1980).

L'obtention d'hybrides résistants à ce nématode est en bonne voie. Des travaux au champs ont permis de sélectionner des hybrides "Perolera x Cayenne lisse". Certains de ces hybrides se sont révélés indemnes de nématodes (Hugon, 1990). Les résultats obtenus au champ avec les hybrides devront être confirmés par des tests en laboratoire.

1.5 - Mise en place de plantation

L'ananas se multiplie par voie végétative en formant différents types de rejets. Il existe des rejets sur la partie végétative (cayeu, hapa, bulbille), d'autres à l'extrémité des fruits (couronne) et enfin d'autres constitués de plants ayant déjà fructifié (stump, essentiellement pour la variété Queen) (Py *et al.*, 1984). Actuellement, ce sont les rejets

récupérés sur les plants en production, qui sont utilisés pour mettre en place les nouvelles plantations. En présence de plusieurs tailles de rejets, il est préférable d'établir plusieurs parcelles, chacune étant composée de rejets de même importance afin d'homogénéiser la plantation et donc la production.

L'utilisation de rejets nécessite de la main d'oeuvre. Ils doivent être récoltés manuellement puis stockés à l'abri de la pluie. Avant d'être repiqués, un tri basé sur leur vigueur et leur état sanitaire est effectué. Dans le cas des cayeux, il est recommandé de faire un parage (suppression des folioles de la base) afin d'optimiser la reprise. Cette opération est rarement pratiquée car très coûteuse. Puis une désinfection des rejets est réalisée afin de prévenir des maladies et de l'action des ravageurs.

Bien que des travaux se poursuivent toujours pour améliorer les méthodes de production, des *vitroplants* d'ananas sont déjà commercialisés (3 à 4 francs le *vitroplant*).

1.6 - Vitroplants d'ananas

1.6.1 - Production de *vitroplants*

La mise au point de la micropropagation de l'ananas a eu lieu dans les années 1970 soit à partir de l'apex de couronne (Mapes, 1973), soit à partir de bulbilles (Sita *et al.*, 1974), soit à partir de bourgeons latéraux de couronne (Mathews *et al.*, 1976). Cette production induisait la formation d'un grand nombre de variants incompatibles avec la commercialisation d'un tel produit (Wakasa, 1979). Cependant des études récentes montrent que cette variabilité semble maîtrisée (Zepeda et Sagawa, 1981 ; de Wald *et al.*, 1988 ; Cote *et al.*, 1991). L'intérêt de cette biotechnologie est de produire rapidement des plants identiques (génétiquement et physiologiquement) (Pannetier et Lanaud, 1976) et indemnes de virus et de pathogènes.

Les *vitroplants* sont utilisés, en premier lieu, dans le cadre de renouvellements variétaux, de l'introduction de nouvelles variétés et de l'exportation dans des pays non encore producteurs (Cote *et al.*, 1991) ; ils sont employés pour la production de rejets permettant ainsi d'aboutir à la constitution de plantations homogènes.

Le CIRAD/FLHOR entreprend, depuis plus de 10 ans, un programme de sélection et d'amélioration de l'ananas (Loison-Cabot, 1991). La multiplication *in vitro* des hybrides sélectionnés permet de les obtenir rapidement et de réaliser une reproduction conforme. Au départ, cette sélection était surtout axée sur la qualité du fruit laissant peu de place aux tests de résistance (Anonyme, 1987). Actuellement, la sélection s'oriente aussi vers la mise au point de test précoce de résistance. En 1990, Mesnildrey a entrepris de tester plusieurs variétés d'*Ananas comosus* multipliés *in vitro* afin d'estimer leur résistance vis à vis de *Pratylenchus brachyurus*. Ces études n'ont pas révélé de grandes différences d'infestation parmi les différentes variétés d'*A. comosus* étudiées.

1.6.2 - Vitroplants au champ

L'avancée des travaux de *vitro*culture de l'ananas a permis d'entreprendre des expériences au champ afin de tester la fiabilité des plants obtenus avec cette biotechnologie.

En Côte d'Ivoire, les *vitro*plants de certains clones ont une meilleure croissance que les plants obtenus par la multiplication classique et produisent des fruits avec des taux d'acidité plus faible et un meilleur goût (Atse, 1990).

Des essais de même durée ont été réalisés à la Réunion et en Martinique (Cote *et al.*, 1991). De ces expériences, il ressort que la période d'acclimatation des *vitro*plants (de la sortie de la *vitro*culture jusqu'au champ) est très longue (10 mois).

Un essai, réalisé dans les serres de Montpellier, a permis de montrer l'influence de différents substrats de culture sur la croissance des *vitro*plants à la sortie des conditions de *vitro*culture, la tourbe et le mélange terreau/perlite étant les plus appropriés (Folliot et Marchal, 1990). A partir de ces résultats et avec l'idée de réduire la période d'acclimatation, Folliot et Marchal (1991) utilisent une phase diurne supérieure à 12h afin d'exploiter au maximum le potentiel de production de matière sèche lié à la quantité de rayonnement solaire (Friend et Lydon, 1978). Il semble que ceci soit efficace et que le passage ultérieur à la photopériode 12/12h ne pose pas de problème. Les producteurs pourront donc limiter l'ombrage dans les premiers mois de l'acclimatation des *vitro*plants.

1.7 - Les mycorhizes de l'ananas

L'ananas développe à l'état naturel des endomycorhizes à arbuscule (Mourichon, 1981). Selon Mourichon (1986), le développement des champignons endomycorhiziens dans les racines est assez important et le niveau de l'infection est fortement lié à la pluviosité et donc variable avec les saisons.

Ce type de mycorhize est très répandu, il est présent chez près de 80% des végétaux supérieurs dont la plupart des plantes cultivées. Cette symbiose est formée en association avec des champignons appartenant à la classe des Zygomycètes répartis en 6 genres *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Sclerocystis*, *Glomus*, *Acaulospora* et *Entrophospora* (Morton et Benny, 1990) et environ 150 espèces.

Les champignons endomycorhizogènes à arbuscules sont des symbiotes stricts incapables de se développer et de se multiplier en culture pure. Leur conservation se fait sous forme de spores ou de sporocarpes dans le sol. Ce sont les caractéristiques morphologiques (taille, couleur, structure de la paroi, contenu, mode de germination...) qui servent à les identifier.

Comme nous l'avons signalé précédemment, un des intérêts de la micropropagation est de supprimer les micro-organismes pathogènes mais cette biotechnologie élimine également ceux dont l'action est bénéfique à la plante tels que les champignons endomycorhizogènes.

Des travaux de plus en plus nombreux mettent en évidence l'intérêt d'inoculer des végétaux micropropagés avec des champignons mycorrhizogènes. Cette inoculation est réalisée à la sortie de la *vitro*culture et engendre des effets bénéfiques sur la nutrition minérale et la croissance de diverses plantes telles que le framboisier (Morandi *et al.*, 1979) , le pommier (Granger *et al.*, 1983 ; Gianinazzi *et al.*, 1989), le fraisier (Kiernan *et al.*, 1984 ; Chavez et Ferreta-Cerrato, 1990 ; Niemi et Vestberg, 1992), la vigne, le palmier à huile (Ravolanirina *et al.*, 1989), le rosier, le citrus (Gianinazzi *et al.*, 1990) et l'avocat (Vidal *et al.*, 1992).

Jaizme Vega et Azcon (1991) ont montré qu'il était possible d'endomycorhizer des plants micropropagés d'ananas (variété Cayenne lisse) dès la sortie de la *vitro*culture. Cette expérience a été réalisée en serre avec trois champignons endomycorhizogènes dans des sols préalablement désinfectés. L'endomycorhization augmente le pourcentage de reprise des *vitro*plants d'ananas à la sortie de la *vitro*culture et deux des champignons endomycorhizogènes améliorent la croissance aérienne de ces plants.

Les champignons endomycorhizogènes diffèrent donc dans leur capacité à augmenter la croissance d'une même plante (Haas et Krikun, 1985) et Sylvia *et al.* (1993a) ont montré qu'il est nécessaire de sélectionner les champignons symbiotiques afin d'optimiser la croissance des plantes en vue de leur production à grande échelle.

Il est maintenant bien admis que l'effet principal des endomycorhizes est l'amélioration de la nutrition minérale et hydrique des plantes, en particulier l'absorption d'éléments minéraux peu mobiles comme le phosphore (Mosse, 1957 ; Gianinazzi *et al.*, 1982; Harley et Smith, 1983). Dans les sols tropicaux où le niveau de P est souvent faible, la zone d'épuisement de cet élément autour des racines se crée rapidement limitant ainsi son absorption. Chez les plantes endomycorhizées, le développement d'un système racinaire plus ramifié et le réseau d'hyphes permettent l'exploitation du P du sol bien au delà de la zone d'appauvrissement (Rhodes et Gerdemann, 1975 ; Berta *et al.*, 1990) ; de plus, la petite taille des hyphes rend possible l'exploration des zones non accessibles aux systèmes racinaires permettant ainsi d'absorber des quantités plus importantes de P assimilable du sol (Mosse, 1981 ; Sieverding, 1991). Mourichon (1981) émet l'hypothèse que les endomycorhizes permettraient à l'ananas de s'accomoder de sols pauvres en phosphore soluble.

Les hyphes absorbent activement le P (Gianinazzi-Pearson et Gianinazzi, 1986; Smith et Gianinazzi-Pearson, 1988), le transportent rapidement vers les structures intraradiculaires (Pearson et Tinker, 1975 ; Cooper et Tinker, 1978) puis le transfèrent à la plante-hôte. Une enzyme identifiée comme une phosphatase alcaline fongique participerait au métabolisme phosphaté chez les plantes endomycorhizées (Gianinazzi *et al.*, 1992). L'activité de cette enzyme augmente pendant les premiers stades de l'infection coïncidant avec la stimulation de la croissance de la plante (Gianinazzi-Pearson et Gianinazzi, 1978), diminue ensuite avec l'âge de l'infection et est négativement influencée par des apports trop importants

de phosphore dans le sol (Gianinazzi-Pearson et Gianinazzi, 1983). Nous avons utilisé l'activité de cette enzyme fongique comme marqueur du fonctionnement de la symbiose.

L'absorption de l'azote sous forme d'ammonium est accrue chez les plantes endomycorhizées (Ames *et al.*, 1983) grâce à la présence d'enzymes appropriées chez le champignon (Smith *et al.*, 1985). L'endomycorhization peut améliorer la nutrition en potassium (Powell, 1975), en calcium (Ruey-Shyang *et al.*, 1985), en magnésium (Blal *et al.*, 1987) et en oligoéléments tels que le zinc (Zn) (Krishna et Bagyaraj, 1984a ; Sharma *et al.*, 1992), le cuivre (Cu) (Lambert, 1982 ; Pacovsky, 1986) et le soufre (S) (Cooper et Tinker, 1978). Cependant l'effet des endomycorhizes est variable sur l'absorption des micronutriments, il dépend de l'espèce végétale, de ses besoins et du type de sol. Jaizme Vega et Azcon (1991) ont montré que la quantité d'éléments minéraux (N, P et K) chez les plants micropropagés d'ananas est améliorée par deux champignons endomycorhizogènes (*Glomus mosseae* et *G. fasciculatus*). Par ailleurs, les endomycorhizes modifient l'équilibre hormonal permettant par exemple d'avancer la floraison du rosier (Gianinazzi *et al.*, 1990).

La production d'ananas est altérée dans les zones à proximité de la mer (Sideris, 1955). C'est l'excès de chlorure de sodium (NaCl) qui serait responsable des baisses de rendements. Dans l'optique d'implanter l'ananas dans des zones limitrophes de la mer, nous nous sommes intéressés au rôle que pourrait jouer les endomycorhizes chez l'ananas. En effet l'excès de NaCl n'empêche pas certains champignons endomycorhizogènes de se développer (Khan, 1974 ; Pond *et al.*, 1984 ; Rozema *et al.*, 1986 ; van Duin *et al.*, 1989). Certains auteurs (Hirrel et Gerdemann, 1980 ; Ojala *et al.*, 1983 ; Pfeiffer et Bloss, 1988) ont montré que les endomycorhizes sont capables de compenser des réductions de croissance induites par le NaCl. L'amélioration de la nutrition phosphatée serait un des facteurs qui expliquerait la plus importante tolérance des plantes endomycorhizées à ce stress (Duke *et al.*, 1986 ; Hartmond *et al.*, 1987). Toutefois rien n'est connu chez l'ananas.

La production d'ananas peut être confrontée à des attaques par des pathogènes (champignons, nématodes). Dans le cas d'agression par des agents responsables de pourritures racinaires, il a été montré que les endomycorhizes protègent certaines plantes comme le citrus (Davis et Menge, 1980), le soja (Chou et Schmitthener, 1974 ; Schenck, 1981) et le chamaecyparis (Bärtschi *et al.*, 1981). Dans le cas des nématodes, les endomycorhizes réduisent leur population dans le système racinaire (Bagyaraj *et al.*, 1979 ; Saleh et Sikora, 1984) et maintiennent la croissance des plantes infectées (Hussey et Roncadori, 1978 ; Kellam et Schenck, 1980). Les plantes endomycorhizées semblent mettre en place des mécanismes de défense faisant intervenir le métabolisme phénolique et la lignification (Dehne et Schönbeck, 1979 ; Krishna et Bagyaraj, 1984b). La présence des endomycorhizes modifie aussi les exsudations racinaires altérant ainsi l'attraction de certains pathogènes par les racines (MacGuidwin *et al.*, 1985) et diminue la population de micro-organismes

pathogènes de la rhizosphère (Meyer et Linderman, 1986). De plus la nutrition minérale plus équilibrée résultant de la présence des endomycorhizes favorise le développement de plants plus sains et plus vigoureux donc plus résistants aux stress biotiques et abiotiques (Graham et Menge, 1982 ; Hussey et Roncadori, 1982). Actuellement, la contribution des endomycorhizes à la protection des ananas n'a jamais été étudiée.

La lutte contre les pathogènes de l'ananas passe par l'application de pesticides. Aziz *et al.* (1990) ont montré que le phoséthyl-Al n'a pas d'effet sur la colonisation endomycorhizienne des racines d'ananas. Néanmoins, l'effet des pesticides sur les endomycorhizes est variable (Trappe *et al.*, 1984). L'intérêt serait de déterminer les doses d'application de pesticides capables à la fois de maîtriser les pathogènes et d'être compatibles avec le développement des endomycorhizes. Jabaji-Hare et Kendrick (1985, 1987) et Despatie *et al.* (1989) ont montré que certains fongicides n'influencent pas l'infection endomycorhizienne et la croissance de la plante et même que d'autres les stimulent. Par contre certains fongicides affectent négativement la sporulation (Nemec, 1980), la germination des spores, la croissance des hyphes (Bailey et Safir, 1978), l'activité fongique (Kough *et al.*, 1987) et l'infection endomycorhizienne (Jalali et Domsch, 1975 ; de Bertoldi *et al.*, 1977). Cette variabilité est fonction de l'espèce végétale, du champignon endomycorhizogène, de la méthode et la dose d'application du pesticide, des conditions de culture, de l'âge de la symbiose au moment de l'application du pesticide (Spokes *et al.*, 1981).

Peu de travaux ont été réalisés sur l'influence des nématicides sur les endomycorhizes. Les nématicides n'altèrent pas l'infection endomycorhizienne et la croissance des plantes infectées (Nemec, 1985 ; Habte et Manjunath, 1988) et ils peuvent même influencer positivement la colonisation endomycorhizienne dans les racines de coton (Bird *et al.*, 1974) et d'arachide (Germani *et al.*, 1980), et la production de spores (Menge *et al.*, 1979). Aucun de ces travaux n'a concerné l'influence des nématicides sur les endomycorhizes des ananas.

Des entreprises ont été séduites par les effets bénéfiques des endomycorhizes et se sont intéressées à la production d'inoculum. L'utilisation de ces inocula pour la production d'ananas micropropagés nécessite des essais préalables.

2 - Objectifs

Le rôle de **biofertilisant**, de **biorégulateur** et de **bioprotecteur** des endomycorhizes sur la croissance des plantes nous a amené à nous intéresser aux endomycorhizes de l'ananas.

A ce jour, peu d'études ont été effectuées sur les endomycorhizes de cette espèce. En vue d'une production de meilleure qualité, nous avons été conduit à déterminer si l'introduction de champignons endomycorhizogènes dans le cycle de production de *vitroplants* jouerait effectivement un rôle bénéfique sur le développement de ce végétal. Les objectifs de nos recherches ont donc visé à :

- évaluer l'intérêt d'intégrer les endomycorhizes dans le cycle de production d'ananas micropropagés
- comparer le potentiel de plusieurs champignons endomycorhizogènes à stimuler la croissance des ananas micropropagés
- déterminer l'influence de l'apport d'engrais phosphaté sur l'activité de la symbiose et la croissance des ananas
- déterminer la contribution des endomycorhizes à la protection des *vitroplants* d'ananas vis à vis de différentes contraintes telluriques
- étudier l'influence de pesticides sur le développement et l'efficacité des endomycorhizes
- éprouver l'efficacité d'inocula commerciaux sur la production de l'ananas micropropagé

La finalité de ces travaux est de définir les conditions optimales d'une utilisation synergique de **deux biotechnologies que sont la micropropagation et l'endomycorhization contrôlée.**

MATERIELS
et
METHODES

MATERIELS et METHODES

1 - Matériel végétal

1.1 - Vitroplants d'ananas

Les plants micropropagés d'ananas ont été fournis par la société de *vitro*culture, Vitropic S.A., filiale du Centre de Coopération International en Recherches Agronomiques pour le Développement (CIRAD) (Montpellier, France).

Plusieurs variétés ou cultivars et plusieurs clones, provenant tous de l'espèce *Ananas comosus*, ont été utilisés dans le cadre de nos travaux selon leur disponibilité et en fonction de nos résultats :

- variété ou cultivar Queen Tahiti
- variété ou cultivar Cayenne lisse - clone CY0
- clone CY5
- variété ou cultivar Spanish

Les *vitro*plants nous ont été fournis au stade rhizogénèse dans des conteneurs (Sercobox) de 100 plants (FIGURE 1).

1.2 - Champignons endomycorhizogènes

Les champignons utilisés font partie de la collection du laboratoire de Phytoparasitologie (LPA, INRA-CNRS/INRA de Dijon). Les champignons étant des symbiotes stricts incapables de se développer seul, ils doivent être maintenus en culture avec une plante-hôte (Annexe 10).

Les champignons employés au cours des différentes expériences l'ont été en fonction des exigences de l'ananas et des sols utilisés :

- sol acide : *Glomus clarum* (LPA16), *Scutellaspera pellucida* (LPA20), *Glomus* sp. (LPA21), Complexe Soubré (LPA22) et *Glomus* sp. (LPA25).
- sol alcalin : *Glomus intraradices* (LPA8).

Deux inocula commerciaux ont été testés, l'un nous a été fourni par une entreprise anglaise (Agriculture Genetic Compagny (AGC)) et l'autre par une entreprise belge (Phytotec). Ces inocula sont à base de substrat inerte contenant plusieurs champignons endomycorhizogènes (Annexe 8, Matériel et Méthodes). Chaque inoculum commercial a été appliqué aux doses de 1 et 3% mélangé au substrat de culture.

A**B**

FIGURE 1 : Vitroplants d'ananas dans un Sercobox (A) et après leur sortie de *vitro*culture (B)

2 - Substrat et conditions de culture

2.1 - Substrat de culture

Le substrat de culture est composé d'un mélange désinfecté de sol-gravier (1:1, v:v). Le sol est irradié aux rayons γ (10kGy) et les graviers désinfectés à la vapeur.

Au cours des différentes expériences, nous avons utilisé 4 sols présentant diverses caractéristiques (Annexe 11):

- sol de Marlins, provenant du Morvan (pH 5,0 ; 35 ppm de phosphore Olsen)
- sol de Dabou, provenant de palmeraies de l'IRHO de la station de Dabou en Côte d'Ivoire (pH 5,1 ; 8,3 ppm de phosphore Olsen)
- sol de Soubré, provenant de palmeraies de la société Palmindustrie de la région de Soubré en Côte d'Ivoire (pH 5,2 ; 3,9 ppm de phosphore Olsen)
- sol d'Epoisses, provenant du domaine d'Epoisses (centre INRA de Dijon-Bretenières) (pH 8,0 ; 20 ppm de phosphore Olsen)

La salinité du sol est induite par des apports de NaCl mélangés au substrat de culture (Annexe 4, Matériel et Méthodes). Nous avons envisagé l'essai avec le NaCl dans le cadre de l'exploitation de sols situés en bordure de mer.

2.2 - Conditions de culture

Les expériences ont été réalisées en chambre climatisée en conditions tropicales ($300\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 29-25°C, 12/12 h, 70-90 % d'humidité relative). Certaines études ont été effectuées dans des conditions différentes (Annexes 3 et 8) ($300\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 25-25°C, 16/8 h, 60-80 % d'humidité relative), suite à des difficultés d'occupation des salles climatisées.

3 - Endomycorhization

3.1 - Inoculation des champignons endomycorhizogènes

Les ananas micropropagés ont été repiqués en terrine dès la sortie des conditions de *vitro*culture et acclimatés pendant quatre semaines (sevrage) (FIGURE 2). L'inoculation des champignons endomycorhizogènes à arbuscules a été réalisée dès le début du sevrage avec des fragments d'endomycorhizes de *Tephrosia ehlenbergiana* selon la méthode décrite dans le Matériel et Méthodes de l'annexe 1. A la fin du sevrage, les plants ont été repiqués individuellement en pot.

Les inocula commerciaux ont été mélangés au substrat de culture dès la sortie de la *vitro*culture comme les deux champignons endomycorhizogènes (LPA8 et LPA21) employés en référence (Annexe 8, Matériel et Méthode).

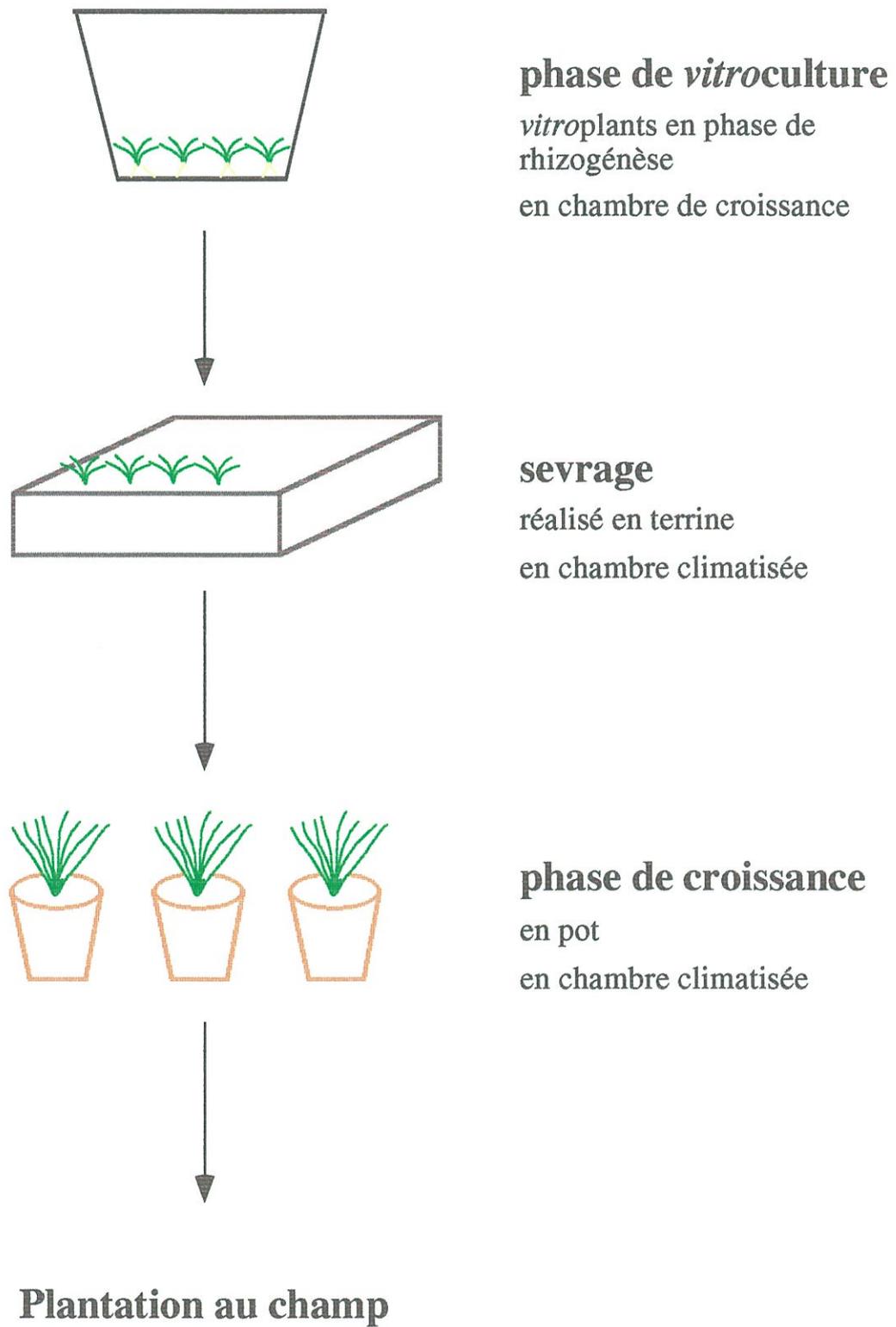


FIGURE 2 : Techniques de culture à partir de plants micropropagés d'ananas

3.2 - Colorations et estimation de l'infection endomycorhizienne

La technique décrite par Philipps et Hayman (1970) a été utilisée pour observer l'infection endomycorhizienne. Les fragments racinaires sont éclaircis dans une solution de KOH puis colorés dans une solution de bleu de trypan (Annexe 1, Matériel et Méthodes) (FIGURE 3A).

Nous avons également visualisé l'infection symbiotique après coloration des activités, succinate déshydrogénase (SDH) (Smith et Gianinazzi-Pearson, 1990) et phosphatase alcaline fongique (Pase) (Tisserant *et al.*, 1993) (Annexe 2, Matériel et Méthodes). Ces deux colorations permettent d'observer respectivement les hyphes vivants (SDH) et fonctionnels (Pase) (FIGURES 3B et 3C).

L'estimation de l'infection a été réalisée sur trente fragments de racine d'environ un centimètre montés entre lame et lamelle. Les fragments ont été observés au microscope photonique et annotés selon la méthode de Trouvelot *et al.* (1986) (Annexe 1, Matériel et Méthodes). Cette méthode calcule plusieurs paramètres de l'infection dont :

F% : fréquence de l'infection

M% : intensité de l'infection développée dans le système racinaire entier

A% : fréquence arbusculaire dans le système racinaire entier

4 - Evaluation de l'effet endomycorhizien

4.1 - Production végétale

Après trois mois de croissance en pot individuel, l'évaluation du développement des plants d'ananas endomycorhizés ou non a été obtenue par mesure de plusieurs paramètres : nombre de feuilles, surface foliaire (Chauvel, 1991), poids de matière fraîche aérienne et racinaire et poids de matière sèche aérienne (Annexe 1, Matériel et Méthodes).

4.2 - Nutrition minérale

L'ensemble des analyses minérales des parties aériennes des plantes endomycorhizées ou non a été effectuée par le laboratoire de Biochimie et de Physiologie du CIRAD/FLHOR (Annexe 4, Matériel et Méthodes).

Le dosage de l'azote (N) a été réalisé après minéralisation de Kjeldhal par colorimétrie à l'indo-phénol, celui du phosphore (P) par colorimétrie au vanado-molybdate, celui du potassium (K) par spectrophotométrie d'émission de flamme, ceux du calcium (Ca), magnésium (Mg), fer (Fe), manganèse (Mn) et zinc (Zn) par spectrophotométrie d'absorption atomique.

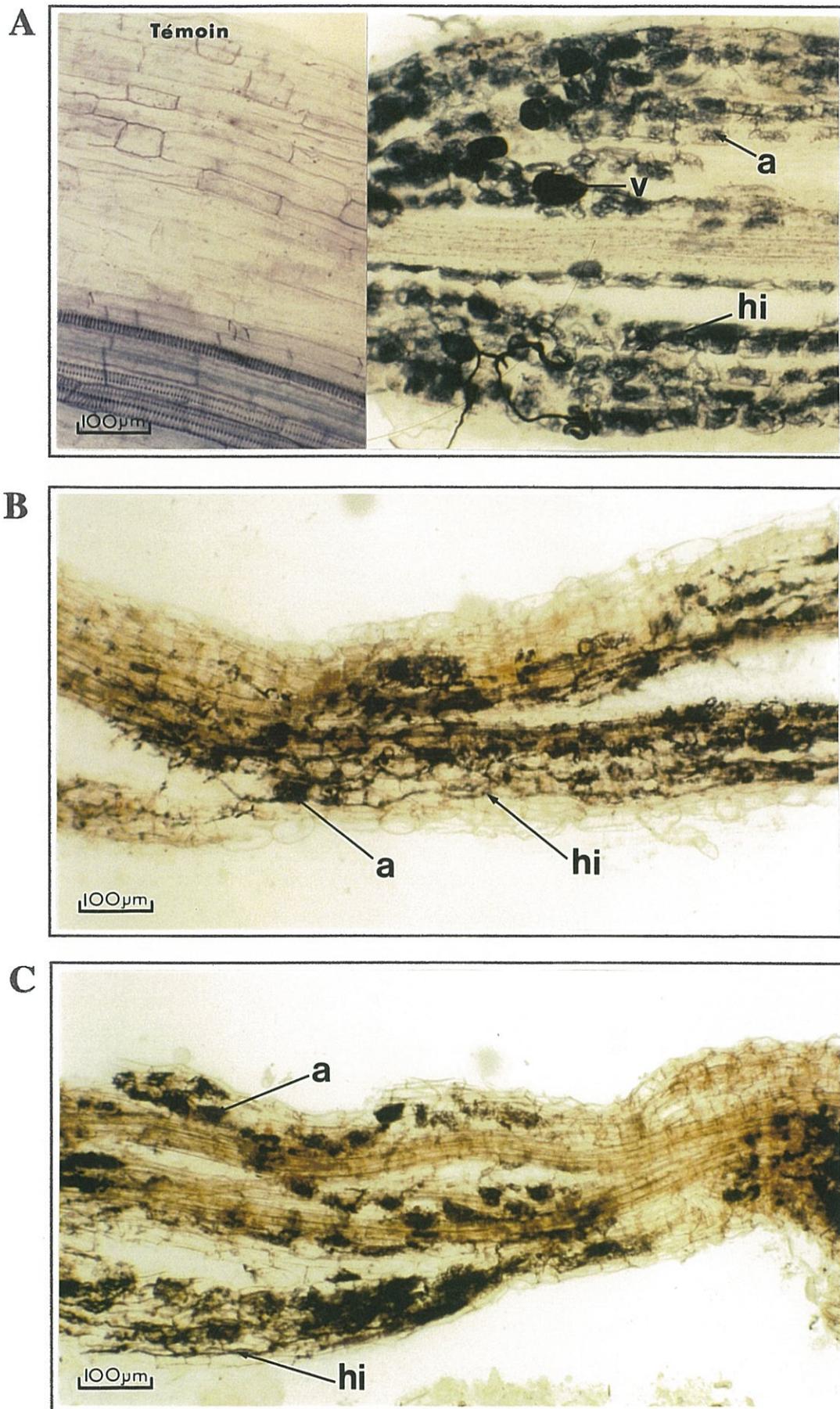


FIGURE 3 : Racine "témoin" non endomycorhizée (A) et infection endomycorhizienne visualisée après coloration au bleu de trypan (A) et des activités succinate déshydrogénase (SDH) (B) et phosphatase alcaline fongique (Pase) (C) dans les racines d'ananas âgées de 4 mois et infectées par *Glomus* sp. (LPA21). a : arbuscule, h i : hyphe interne, v : vésicule.

4.3 - Composés photosynthétiques

Le dosage des pigments photosynthétiques a été réalisé à différents stades du développement des ananas endomycorhizés ou non. Nous avons utilisé la technique spectrophotométrique de Metzner *et al.* (1965).

Les composés ont été extraits dans un mélange composé de 85% d'acétone et 15% d'eau. L'extrait obtenu a été filtré et les mesures ont été réalisées à trois longueurs d'onde: 452,5, 644 et 663 nm. Les concentrations en chlorophylle a et b, et caroténoïdes ont été estimées en utilisant les équations suivantes :

Chlorophylle a = $10,3 \text{ DO}(663) - 0,918 \text{ DO}(644)$ = $\mu\text{g/ml}$ du mélange d'extraction

Chlorophylle b = $19,7 \text{ DO}(644) - 3,87 \text{ DO}(663)$ = $\mu\text{g/ml}$ du mélange d'extraction

Caroténoïdes = $4,2 \text{ DO}(452,5) - (0,0264 \text{ chlorophylle a} + 0,426 \text{ chlorophylle b})$ = $\mu\text{g/ml}$ du mélange d'extraction

Les valeurs calculées des trois pigments photosynthétiques ont été ensuite additionnées afin d'obtenir la teneur totale en pigment photosynthétique. Les valeurs ont été exprimées en milligrammes par plante (partie aérienne).

5 - Etude de la protection par les endomycorhizes

Nous avons choisi d'étudier une situation de stress abiotique (2 et 5 g de NaCl/kg de substrat) et deux situations de stress biotiques représentées par l'inoculation de deux pathogènes des racines de l'ananas ; *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filip & Schurr-Steekh, un nématode, et *Phytophthora cinnamomi* Rands, un champignon.

5.1 - Nématode phytophage

L'inoculation de *P. brachyurus* (laboratoire de Nématologie, CIRAD/FLHOR) a toujours été effectuée à la même concentration (100 nématodes/*vitro*plant) mais à des périodes différentes (dès la sortie de la *vitro*culture ou au moment du repiquage). Les champignons endomycorhizogènes ont été inoculés soit dès la sortie de la *vitro*culture soit au moment du repiquage (Annexe 5, Matériel et Méthodes), c'est à dire avant, en même temps ou après le pathogène.

L'évaluation des populations de nématodes dans les racines des plantes endomycorhizées ou non a été réalisée selon la méthode décrite par Sarah (1980) (Annexe 5, Matériel et Méthodes).

5.2 - Champignon pathogène tellurique

P. cinnamomi (souche 50, laboratoire de Pathologie, CIRAD/FLHOR) a été cultivé en milieu liquide. Après une semaine, cette culture a été diluée dans de l'eau afin d'obtenir plusieurs niveaux de concentration. Les différentes dilutions ont été appliquées au

substrat de culture. L'application a été réalisée après l'endomycorhization soit au moment du repiquage en pot soit un mois plus tard (Annexe 6, Matériel et Méthodes).

5.3 - Dosage de composés phénoliques racinaires associés aux phénomènes de résistance

Les racines endomycorhizées ou non ont été lavées, pesées et découpées. Puis elles ont été broyées à 4°C dans de l'éthanol à 90° et mises à incuber à 4°C à l'obscurité pendant 48 h. Le diffusat a été filtré et les racines broyées ont été à nouveau mises à incuber dans les mêmes conditions pendant 48 h. Le nouveau diffusat a été filtré et les deux filtrats ont été alors mélangés. Le mélange a été ensuite évaporé, séché et mis en solution dans 1 ml d'éthanol pur pour 5 g de racines fraîches. L'extrait a été filtré et conservé à 4°C.

Le dosage a été réalisé selon la méthode de Folin et Ciocalteu (1927). L'extrait a été complété à 10 ml d'eau ultrapure (UP). Un ml du réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté à l'extrait dilué, suivi 3 mn plus tard par 2 ml de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 20 % (20 g Na₂CO₃ pour 100 ml d'eau). Le mélange a été ensuite incubé dans de l'eau bouillante pendant 1 mn et refroidi. Après avoir ajusté le volume d'extrait à 25 ml avec de l'eau UP et attendu une heure, les densités optiques ont été mesurées à la longueur d'onde 725 nm.

A l'aide d'une courbe étalon réalisée avec de l'acide chlorogénique (FIGURE 4), les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide chlorogénique par gramme de tissu racinaire frais.

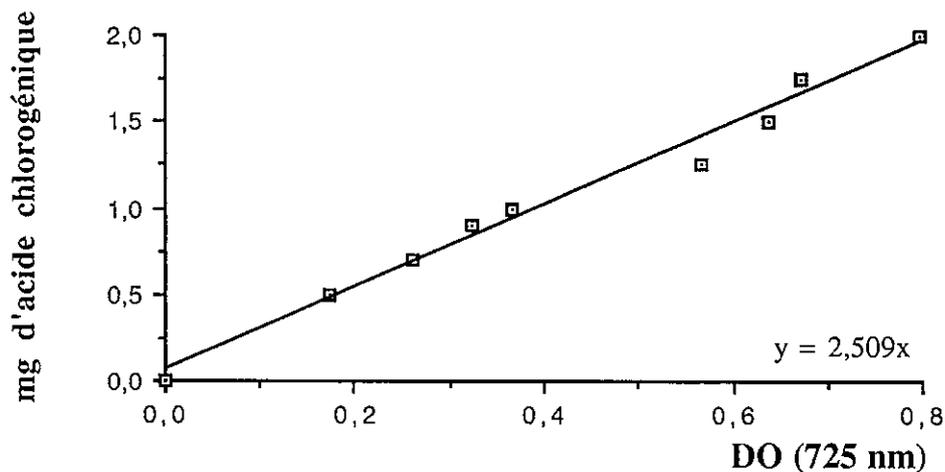


FIGURE 4 : Courbe étalon

6 - Analyse de la compatibilité endomycorhizes/pesticides

6.1 - Fongicides

Quatre fongicides (Annexe 7, tableau 1), dont trois utilisés en production, ont été appliqués aux ananas micropropagés, endomycorhizés ou non dès la sortie de la

*vitro*culture. Leur application a été réalisée au sol après dilution dans de l'eau. Les doses apportées ont été celles recommandées pour le contrôle de *P. cinnamomi* (Annexe 7, Matériel et Méthodes).

6.2 - Nématicides

Parallèlement aux expériences effectuées avec les fongicides, deux nématicides ont été testés (Némacur 10G (matière active (M.A.) : le phénamiphos de formule N-isopropylphosphoramidate de O-éthyle et de O-(méthyl-3-méthyl-thio-4 phényle) et le Mocap (M.A. : l'éthoprophos de formule dithiophosphate de O-éthyle et de S,S-dipropyle)).

Les nématicides (sous forme de granulé) ont été mélangés au substrat de culture au moment du repiquage en pot des ananas endomycorhizés ou non.

Le phénamiphos (action systémique) a été utilisé à trois concentrations : 0,05g M.A./*vitro*plant (dose faible), 0,2g M.A./*vitro*plant (dose moyenne) et 0,4g M.A./*vitro*plant (dose forte). L'éthoprophos (action de contact) a été utilisé à trois concentrations : 0,02g M.A./*vitro*plant (dose faible), 0,07g M.A./*vitro*plant (dose moyenne) et 0,2g M.A./*vitro*plant (dose forte). La dose forte correspond à la dose recommandée pour lutter contre *P. brachyurus* au champ.

RESULTATS

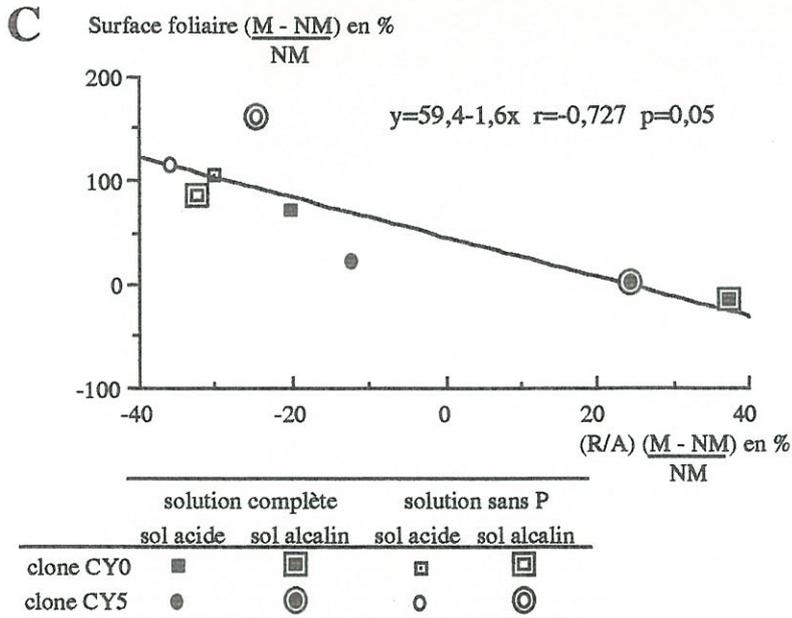
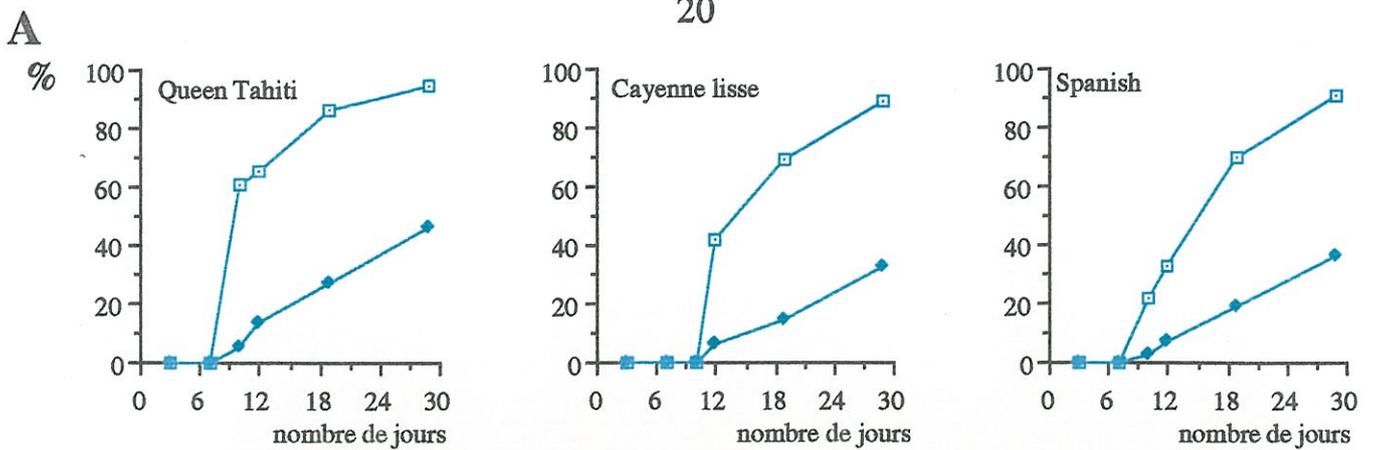
RESULTATS**CHAPITRE I : L'ENDOMYCORHIZATION CONTROLEE CHEZ
L'ANANAS MICROPROPAGE****1 - Endomycorhization des *vitro*plants d'ananas**

Après analyse des différentes étapes de la micropropagation de l'ananas, trois possibilités d'endomycorhization ont été envisagées : pendant la phase de multiplication *in vitro*, au début du sevrage ou au moment du repiquage. Suivant les travaux de Ravolanirina *et al.* (1989), nous avons choisi d'endomycorhizer les *vitro*plants d'ananas pendant le sevrage dans des terrines contenant 30 plants micropropagés. Le peu de substrat utilisé pour chaque terrine (1,4 kg) nous a permis d'inoculer les *vitro*plants dans deux types de sol avec de faibles quantités d'inoculum (3 g de fragments de racines endomycorhizées pour les 30 *vitro*plants).

Les taux d'endomycorhization des deux clones de la variété Cayenne lisse (clone CY0 et CY5) se sont avérés plus élevés avec *Glomus* sp. (LPA21) dans le sol acide qu'avec *Glomus intraradices* (LPA8) dans le sol alcalin. En effet avec LPA21, l'intensité de l'infection (M%) et la fréquence arbusculaire (A%) estimées après quatre mois de culture ont été respectivement de 57 à 82% et de 33 à 59%, alors qu'avec LPA8, les valeurs ont varié de 35 à 65% pour M% et de 17 à 30% pour A% (Annexe 1, tableaux 1, 2, 3 et 4).

Dans le sol acide où sont normalement cultivés les ananas, nous avons étudié la rapidité de l'installation de l'infection endomycorhizienne chez les variétés Queen Tahiti, Cayenne lisse (clone CY0) et Spanish. L'inoculation du champignon endomycorhizogène (LPA21) au début du sevrage permet une installation très rapide de la symbiose ; en effet l'infection est en place dès le dixième jour chez les variétés Queen Tahiti et Spanish et le douzième chez la variété Cayenne lisse (clone CY0) (PLANCHE 1A).

Ces résultats montrent que la méthode utilisée permet un développement rapide de l'infection endomycorhizienne dans les racines des *vitro*plants d'ananas en sol acide. La colonisation rapide des racines par les champignons endomycorhizogènes est considérée comme nécessaire pour une contribution efficace des endomycorhizes à la croissance et à la nutrition minérale, en particulier en P, de la plante (Abbott et Robson, 1978 ; Menge, 1983). La rapidité d'installation de l'infection proviendrait de nos conditions d'endomycorhization à savoir le faible volume de substrat à explorer par les hyphes avant d'arriver en contact avec



D

	NM	M
N %	1,93	2,43
mg/plante	45,93	101,23
P %	0,05	0,15
mg/plante	1,26	6,26
K %	5,39	5,39
mg/plante	128,28	224,76

PLANCHE 1 : Endomycorhization et effet endomycorhizien

A : Fréquence de l'infection (—□—) et intensité de l'infection (—◆—) estimées après coloration au bleu de trypan chez trois variétés (Queen Tahiti, Cayenne lisse, Spanish) d'ananas pendant le sevrage.

B : Effet endomycorhizien sur la croissance de vitroplants de la variété Queen Tahiti âgés de 4 mois et cultivés dans le sol de Marlins (NM : non mycorhizé, M : mycorhizé, -P : solution sans phosphore et +P : solution avec phosphore).

C : Corrélation négative entre l'effet endomycorhizien sur la croissance aérienne et celui sur le rapport de la partie racinaire sur la partie aérienne (R/A) chez deux clones de la variété Cayenne lisse.

D : Effet endomycorhizien sur la nutrition minérale foliaire chez la variété Cayenne lisse (clone CY0) (NM : non mycorhizé, M : mycorhizé).

les racines et de la haute densité des plantes qui favoriserait, par un enrichissement du substrat en exsudats racinaires, le développement des champignons endomycorhizogènes.

2 - Mise en évidence d'un effet endomycorhizien

L'ananas a des besoins limités en P et l'apport excessif de cet élément est connu pour réduire l'effet endomycorhizien. Nous avons donc voulu évaluer l'apport d'une fertilisation avec ou sans P.

2.1 - Effet sur la croissance

Dans les sols acide et alcalin, l'endomycorhization double la croissance aérienne des *vitroplants* de la variété Cayenne lisse (clones CY0 et CY5) ayant reçu la solution sans P (Annexe 1, tableaux 1, 2, 3 et 4). Pour les plantes recevant la solution avec P, l'endomycorhization n'assure plus qu'un gain de production végétale de 20 à 70% dans le sol acide (Annexe 1, tableaux 1 et 3) et aucun dans le sol alcalin (Annexe 1, tableaux 2 et 4). Des résultats analogues ont été obtenus avec la variété Queen Tahiti dans le sol acide (PLANCHE 1B).

Chez la variété Cayenne lisse, le meilleur résultat de croissance aérienne des plantes endomycorhizées a été obtenu avec le clone CY0 dans le sol acide sans fertilisation phosphatée (43,31g), par contre l'apport de P réduit sa croissance dans les deux types de sol (sol acide : 19,28g et sol alcalin : 19,22g) (Annexe 1, tableaux 1 et 2). La croissance des plantes endomycorhizées de ce clone en sol alcalin ne recevant pas la fertilisation phosphatée est intermédiaire (24,96g).

Le rapport du poids de matière fraîche racinaire sur celui de matière fraîche aérienne (R/A) diminue chez les plantes endomycorhizées de la variété Cayenne lisse (Annexe 1, tableaux 1, 2, 3 et 4) et l'effet endomycorhizien sur ce rapport est négativement corrélé avec la stimulation de croissance aérienne par la symbiose (PLANCHE 1C) (Annexe 1, figure 1).

2.2 - Effet sur la nutrition minérale

2.2.1 - Nutrition en macroéléments

L'endomycorhization augmente la nutrition en N, P, K, Ca et Mg des deux clones CY0 et CY5 dans le sol acide (PLANCHE 1D) (Annexe 9, tableaux 1, et 3) ; cependant cet effet est moins important avec l'apport de la fertilisation phosphatée pour le clone CY0.

Dans le sol alcalin, l'endomycorhization et la fertilisation phosphatée influencent positivement l'absorption des éléments N, P, K, Ca et Mg des deux clones (Annexe 9, tableaux 2 et 4).

2.2.2 - Nutrition en oligoéléments

Les concentrations des deux clones CY0 et CY5 en Mn sont inférieures chez les plantes endomycorhizées dans les deux sols (Annexe 9, tableaux 1, 2, 3 et 4).

Pour le Fe et le Zn, les effets sont variables en fonction du clone et du sol. Les endomycorhizes augmentent fortement la nutrition en Fe du clone CY0 dans les deux sols mais l'apport de phosphate annule cet effet bénéfique (Annexe 9, tableaux 1 et 2). Pour ce même clone, les concentrations en Zn sont augmentées à la fois par l'endomycorhization et par la fertilisation phosphatée dans le sol acide (Annexe 9, tableau 1) ; en sol alcalin, par contre cet effet sur les pourcentages en Zn est supprimé par l'apport de P.

Pour le clone CY5 croissant dans les deux types de sol, les concentrations en Fe et Zn sont plus élevées chez les plantes non endomycorhizées (Annexe 9, tableaux 3 et 4).

2.3 - Discussion

L'endomycorhization réalisée au sevrage est donc capable d'influencer positivement la croissance des ananas micropropagés. La meilleure stimulation de croissance a été obtenue dans le sol acide où sont normalement cultivés les ananas (Py *et al.*, 1984) avec un effet endomycorhizien sur la partie aérienne de l'ordre de 107% (clone CY0). Cependant, le développement du système racinaire des plantes endomycorhizées est proportionnellement moins important que celui des plantes non endomycorhizées mais ce système apparaît plus efficace car il assure une meilleure utilisation des éléments minéraux et un développement plus rapide des plantes inoculées.

La fertilisation phosphatée réduit l'effet endomycorhizien sur la croissance de l'ananas ; cela pourrait être la conséquence d'un déséquilibre nutritionnel (Antunes et Cardoso, 1991). En effet, l'apport de P assimilable aurait un effet préjudiciable sur l'absorption d'autres éléments minéraux chez les plantes endomycorhizées du clone CY0 dans le sol acide. De plus, la forte absorption de P chez les plantes endomycorhizées recevant la fertilisation phosphatée induirait une demande trop importante de composés carbonés de la plante par les champignons endomycorhiziens (Koide, 1991). Par contre, l'apport de 32 ppm de P permet à des ananas non endomycorhizés de se développer de façon comparable à ceux inoculés comme l'ont montré Menge *et al.* (1978) chez le citrus et Asimi *et al.* (1980) chez le soja.

La baisse de l'absorption du Mn chez les plantes endomycorhizées pourrait être due à la diminution de la population bactérienne tellurique capable de réduire l'ion Mn^{4+} (Kothari *et al.*, 1991). Ce changement de la composition de la rhizosphère proviendrait des modifications des exsudations racinaires liées à la formation des endomycorhizes (Ratnayake *et al.*, 1978 ; Bagyaraj, 1984).

Ces premiers travaux sur les *vitroplants* d'ananas confirment l'intérêt de l'endomycorhization contrôlée sur la production de *vitroplants* (Gianinazzi *et al.*, 1990) et

montrent qu'il est indispensable de prendre en considération l'existence des endomycorhizes pour raisonner les apports en éléments minéraux.

3 - Sélection de champignons endomycorhizogènes plus aptes à stimuler la croissance des *vitroplants*

Après avoir démontré la possibilité d'améliorer la croissance des *vitroplants* d'ananas grâce aux endomycorhizes, nous avons testé l'effet de plusieurs champignons endomycorhizogènes (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellaspera pellucida* (LPA20), *Glomus* sp. (LPA21), Complexe Soubré (LPA22) et *Glomus* sp. (LPA25)) sur le développement de trois variétés : Queen Tahiti, Cayenne lisse (clone CY0) et Spanish. En effet, les champignons symbiotiques diffèrent dans leur capacité à stimuler le développement des plantes (Haas et Krikun, 1985).

3.1 - Développement de l'infection endomycorhizienne

Chez les trois variétés, les taux d'infection mesurés après coloration au bleu de trypan varient avec les différents champignons endomycorhizogènes (de 70 à 92% pour M% et de 33 à 71% pour A%) et ces variations ne peuvent pas être mises en liaison avec les différentes stimulations de croissance observées chez les plantes inoculées (Annexe 2, tableaux 4 et 5).

3.2 - Efficacité des champignons symbiotiques

La croissance des trois variétés inoculées avec chaque champignon endomycorhizogène est toujours supérieure à celle des plantes non endomycorhizées à l'exception de celle de la variété Cayenne lisse inoculée avec *Scutellaspera pellucida* (LPA20) et *Glomus* sp. (LPA25). Le maximum de croissance est obtenu avec *Glomus* sp. (LPA21) pour les variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse (respectivement, +98% et +56% par rapport au témoin) (Annexe 2, tableaux 1 et 2) et avec *Glomus* sp. (LPA25) pour la variété Spanish (+99%) (Annexe 2, tableau 3).

Le rapport (R/A) est toujours inférieur chez les plantes endomycorhizées avec les différents champignons endomycorhizogènes (Annexe 2, figure 1), cependant l'effet endomycorhizien sur ce rapport est corrélé négativement avec celui sur la croissance aérienne seulement avec la variété Spanish (Annexe 2, figure 2).

Comme les estimations de la colonisation endomycorhizienne après coloration non vitale au bleu de trypan ne sont pas bien corrélées avec l'efficacité de la symbiose sur le développement de l'ananas, nous avons évalué l'infection, chez la variété Spanish, à l'aide des colorations des activités succinate déshydrogénase (SDH) et phosphatase alcaline fongique

(Pase), qui mettent en évidence, respectivement, les parties vivantes et fonctionnelles du champignon.

Les valeurs de la fréquence arbusculaire (A%) estimées après coloration des activités SDH et Pase chez la variété Spanish inoculées avec les champignons endomycorhizogènes LPA16, LPA20, LPA21 et LPA25 sont comparables entre elles, mais elles sont inférieures à celles obtenues avec la coloration non vitale au bleu de trypan.

Par contre, les valeurs de A% estimées après colorations vitale et fonctionnelle chez les plantes endomycorhizées avec LPA22 sont significativement moins importantes que celles évaluées avec les autres champignons (baisse de 32 à 41% pour SDH et de 40 à 70% pour Pase) (Annexe 2, tableau 5) indiquant une vigueur et un fonctionnement moindres de la symbiose dans les racines d'ananas infectées par ce champignon. D'ailleurs, les résultats de croissance des plantes inoculées avec LPA22 sont significativement inférieurs à ceux obtenus chez les plantes inoculées avec les autres champignons endomycorhizogènes. Il apparaît donc que les colorations SDH et Pase donneraient une image réaliste de l'efficacité des endomycorhizes sur la croissance des ananas.

3.3 - Nutrition minérale

L'ensemble des champignons endomycorhizogènes testés améliore la nutrition en P des variétés Queen Tahiti et Spanish (Annexe 9, tableaux 5 et 6). Pour la variété Cayenne lisse, seuls les champignons LPA16 et LPA21 augmentent les quantités de P absorbées par rapport au témoin (Annexe 9, tableau 6).

Tous les champignons endomycorhizogènes augmentent les quantités en N, K et Ca des trois variétés par rapport à celles mesurées chez les plantes non endomycorhizées (Annexe 9, tableau 6). Pour le Mg, les quantités absorbées sont améliorées par tous les champignons chez les variétés Queen Tahiti et Spanish, par contre pour la variété Cayenne lisse, l'absorption de cet élément est seulement augmentée par LPA16, LPA21 et LPA25 (Annexe 9, tableau 6).

3.4 - Discussion

Ces expériences montrent l'intérêt de sélectionner les champignons endomycorhizogènes afin d'obtenir une croissance optimale des ananas micropropagés. Ces résultats montrent aussi que ces symbiotes diffèrent dans leur capacité à stimuler la nutrition en P comme l'ont déjà montré Abbott *et al.* (1992) et Pearson et Jakobsen (1993), respectivement chez le trèfle et le concombre. Chez les trois variétés d'ananas, le champignon endomycorhizogène (LPA21) est le plus efficace pour améliorer la nutrition en P. Sylvia *et al.* (1993a) soulignent que la sélection est indispensable pour appliquer avec succès l'endomycorhization. Nos expériences ont été réalisées dans un milieu de culture sans compétition, il sera nécessaire de déterminer si les champignons ainsi sélectionnés seraient

capables de s'établir et de persister en présence de champignons indigènes (Powell, 1982 ; Wilson, 1984) bien que Habte et Fox (1993) estiment que les populations indigènes ne seraient pas une menace si les champignons introduits dans le sol sont hautement efficaces.

Plus l'effet endomycorhizien sur la croissance aérienne des ananas est important, plus la biomasse racinaire est proportionnellement faible. La présence des endomycorhizes modifie la répartition de la biomasse de la plante rendant le système souterrain plus efficace (Harley et Smith, 1983 ; Gianinazzi et Gianinazzi-Pearson, 1986).

Les niveaux de l'infection estimés après coloration au bleu de trypan chez les trois variétés montrent que cette méthode ne reflète pas l'efficacité de la symbiose endomycorhizienne sur la croissance des ananas conformément aux travaux de Vierheilig et Ocampo (1989). En utilisant les colorations des activités SDH et Pase, nous avons tenté d'expliquer les différences de croissance observées chez les plantes endomycorhizées par le fonctionnement de la symbiose. Le faible niveau des activités SDH et Pase dans les racines des plantes de la variété Spanish inoculées avec LPA22 correspond au plus faible effet des endomycorhizes sur la croissance aérienne. La baisse de la proportion d'hyphes vivants couplée avec la réduction de l'activité Pase pourrait expliquer, au moins partiellement, le très faible effet endomycorhizien sur la croissance des plantes inoculées avec LPA22 (Tisserant *et al.*, 1993).

Pour une meilleure compréhension de l'efficacité des endomycorhizes, d'autres paramètres devraient être analysés tels que la production et la vitalité des hyphes externes (Abbott et Robson, 1985 ; Gueye *et al.*, 1987 ; Sylvia, 1988 ; Saito *et al.*, 1993) et l'efficacité des hyphes à absorber et à transporter le P jusqu'aux racines (Jakobsen *et al.*, 1992).

4 - Effet de la fertilisation phosphatée sur le fonctionnement de la symbiose endomycorhizienne

Le P étant connu pour réduire l'effet endomycorhizien, nous avons voulu analyser son influence sur le fonctionnement des endomycorhizes de l'ananas en utilisant une phosphatase alcaline fongique comme marqueur enzymatique (Tisserant *et al.*, 1993). L'expérience a été réalisée dans trois sols à pH acide (Marlins, Dabou et Soubré) contenant différents niveaux de P.

4.1 - Conséquence sur la production végétale

Dans le sol de Marlins, la fertilisation phosphatée diminue l'effet endomycorhizien sur la croissance (Annexe 3, tableau 2A) ; la même tendance est observée chez les plantes cultivées dans le sol de Dabou (TABLEAU 1). L'effet négatif de la fertilisation sur cet effet endomycorhizien augmente avec le niveau de P dans le sol. Dans le sol de Soubré où le niveau de P du sol est très faible, la fertilisation n'a pas d'influence sur la croissance des plantes endomycorhizées (Annexe 3, tableau 2B).

TABLEAU 1 : Production de matière fraîche aérienne (PMfa) et racinaire (PMfr) et infection endomycorhizienne chez la variété Queen Tahiti âgée de 4 mois, endomycorhizée (M) ou non (NM) et recevant la solution Hoagland sans phosphore (-P) ou avec phosphore (+P) dans le sol de Dabou.

Traitements :		- P		+ P	
		NM	M	NM	M
PMfa (g/plante)		3,82c	29,38a	6,08c	23,30ab
PMfr (g/plante)		0,52b	3,21a	0,58b	2,62a
Infection					
Bleu de trypan	M%	0b	90a	0b	88a
	A%	0b	52a	0b	49a
SDH	M%	0b	63,6a	0b	64,7a
	A%	0b	23,5a	0b	20,9a
Pase	M%	0b	27,4a	0b	30,8a
	A%	0c	9,1a	0c	5,5b
Biomasse racinaire montrant une activité Pase (g/plante) pour A%		-	0,29a	-	0,14b

M% : intensité de l'infection

A% : fréquence arbusculaire

SDH : activité succinate déshydrogénase

Pase : activité phosphatase alcaline

Pour chaque ligne, les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes ($p=0,05$)

4.2 - Fonctionnement de la symbiose endomycorhizienne

L'infection endomycorhizienne est significativement réduite chez les plantes cultivées dans le sol de Marlins après application de la fertilisation phosphatée à l'exception de l'intensité de l'infection (M%) estimée après coloration non vitale (Annexe 3, tableau 2A). Par contre pour les deux autres sols, seule la fréquence arbusculaire (A%) estimée après coloration de l'activité Pase est réduite par la fertilisation (Dabou : -39% et Soubré : -31%) (TABLEAU 1 et Annexe 3, tableau 2B). Dans les sols de Marlins et Dabou, les biomasses racinaires montrant une activité Pase sont significativement supérieures chez les plantes sans apport de P (TABLEAU 1 et Annexe 3, tableau 2A).

Les valeurs de A% estimées après coloration des activités SDH et Pase sont corrélées avec la croissance aérienne des plantes endomycorhizées recevant ou non l'apport de P dans les trois sols (FIGURE 5).

4.3 - Incidence sur la nutrition minérale

Dans les trois sols, les quantités d'éléments minéraux absorbées sont toujours supérieures chez les plantes endomycorhizées quelle que soit la dose de P apportée aux plantes (Annexe 9, tableau 7B). L'endomycorhization augmente les concentrations en P, Ca et Mg (Annexe 9, tableau 7A). Les concentrations en K sont aussi positivement influencées par la symbiose dans les sols Dabou et Soubré. Par contre, les concentrations en N sont supérieures chez les plantes non inoculées dans les trois sols.

4.4 - Discussion

L'infection endomycorhizienne est réduite par la fertilisation phosphatée chez l'ananas cultivé dans le sol dont le niveau de P est le plus élevé (Marlins). Cette réduction pourrait être dûe à des effets directs du P sur le développement des hyphes externes (Sanders, 1975 ; Graham *et al.*, 1982 ; Amijee *et al.*, 1989), sur la pénétration du champignon dans la plante (Schwab *et al.*, 1983a) ou sur le métabolisme phosphaté des champignons symbiotiques. Un excès de phosphate peut aussi influencer la perméabilité membranaire de la plante entraînant des modifications d'exsudats racinaires (Schwab *et al.*, 1983b), qui réduiraient la croissance des hyphes externes retardant l'établissement et le développement de l'infection (Braunberger *et al.*, 1991). D'autres résultats mettent en évidence la sensibilité des spores de champignons endomycorhizogènes en présence de P (Pons et Gianinazzi-Pearson, 1984)

Le nombre d'arbuscules présentant l'activité Pase diminue avec l'application de phosphate de façon d'autant plus importante que la quantité de P disponible dans le sol est élevée, suggérant que cette enzyme serait sous le contrôle d'un mécanisme phospho-dépendant. Ces résultats permettent d'établir une corrélation positive entre la croissance aérienne des ananas et les estimations des colorations vitales et fonctionnelles. Ces

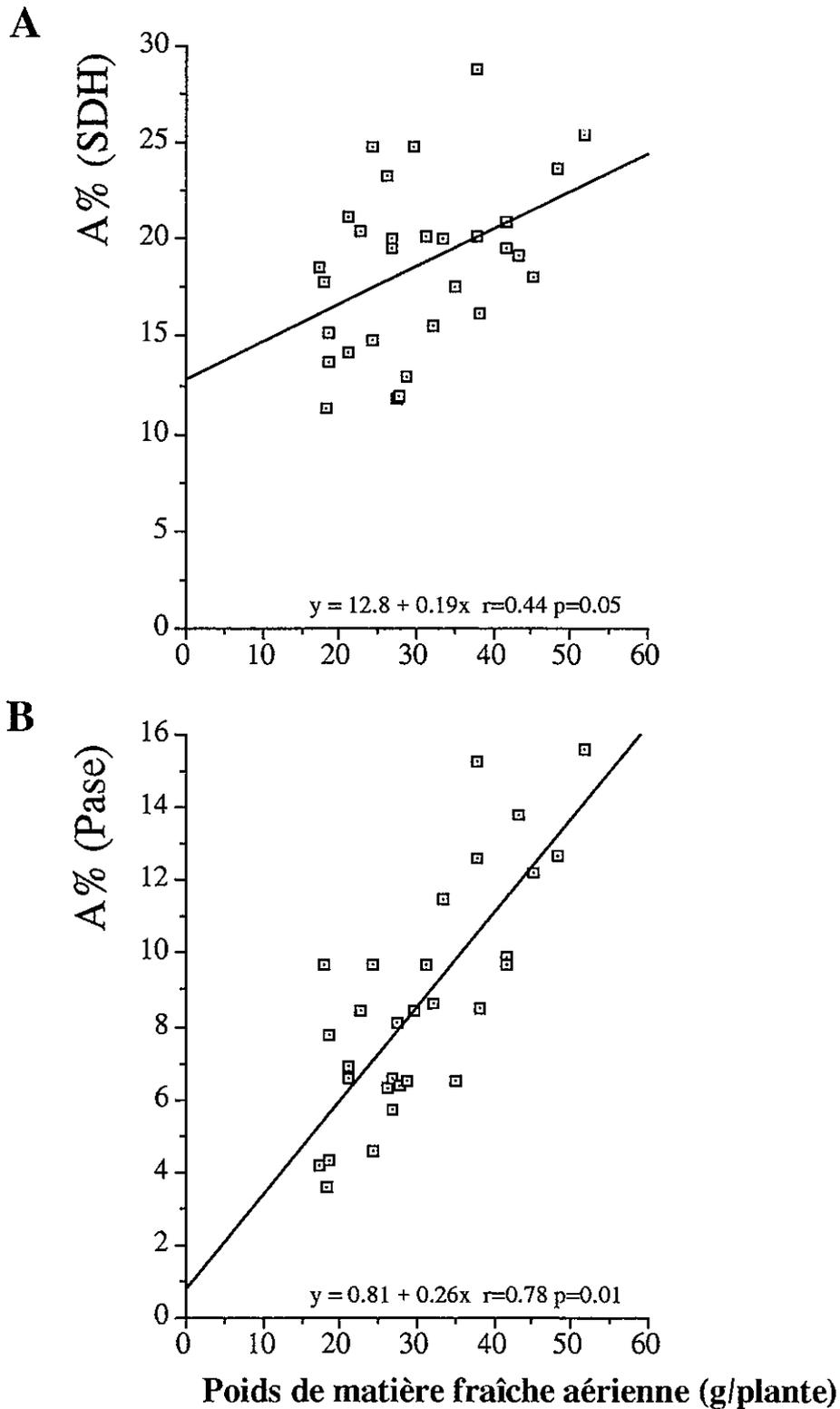


FIGURE 5 : Corrélation entre le poids de matière fraîche aérienne et la fréquence arbusculaire (A%) estimée après coloration des activités succinate déshydrogénase (SDH) (A) et phosphatase alcaline fongique (Pase) (B) obtenus chez des ananas endomycorhizés, cultivés dans les sols de Marlins, Dabou et Soubré et recevant la solution nutritive Hoagland avec ou sans phosphore.

estimations donneraient donc une image précise de l'efficacité de la symbiose sur la croissance des ananas endomycorhizés. Les résultats obtenus après coloration de l'activité SDH dans les racines d'ananas sont en accord avec les travaux réalisés par Smith et Dickson (1991).

5 - Contenu en pigments photosynthétiques foliaires et développement de l'infection endomycorhizienne

La colonisation des racines par les champignons endomycorhizogènes pourrait représenter un coût énergétique important pour la plante (flux d'hydrate de carbone de la plante au champignon). Nous avons voulu savoir si l'installation de l'infection endomycorhizienne n'altérerait pas les teneurs en pigments photosynthétiques chez l'ananas.

5.1 - Concentration en pigments photosynthétiques

L'analyse des contenus en pigments photosynthétiques chez l'ananas a été réalisée en liaison avec celle de sa croissance et son infection endomycorhizienne.

Huit à dix semaines après le repiquage, les quantités de pigments photosynthétiques et la croissance aérienne des trois variétés endomycorhizées deviennent significativement supérieures à celles des plantes non endomycorhizées (FIGURES 6 et 7). Les valeurs maximales estimées après coloration des activités SDH et Pase sont obtenues quatre à six semaines avant cet effet endomycorhizien (FIGURES 6C, 6F et 7C).

Les contenus en pigments photosynthétiques des variétés Queen Tahiti et Cayenné lisse inoculées ou non n'ont pas augmentés entre la dixième et la treizième semaine. Parallèlement, le niveau de l'infection symbiotique estimée après coloration au bleu de trypan chez ces deux variétés diminue à partir de la dixième semaine ce qui correspondrait à une accélération de la croissance racinaire. Par contre chez la variété Spanish, les contenus en pigments photosynthétiques augmentent jusqu'à la treizième semaine.

5.2 -Discussion

L'importante stimulation de croissance observée chez les plantes endomycorhizées se produit après que les activités SDH et Pase des champignons endomycorhiziens aient atteint un maximum. L'augmentation de l'activité Pase refléterait un métabolisme phosphaté plus actif du champignon. Ceci se traduirait par l'amélioration de la nutrition en P des plantes endomycorhizées (Gianinazzi-Pearson et Gianinazzi, 1983 ; Tisserant *et al.*, 1993). Le P intervient dans le processus de photosynthèse (Foyer et Spencer, 1986 ; Nemeč et Vu, 1990).

La stimulation de la quantité de pigments photosynthétiques par les endomycorhizes se produit en même temps que l'effet endomycorhizien sur la croissance. L'amélioration des quantités de pigments photosynthétiques pourrait être un effet de la hausse

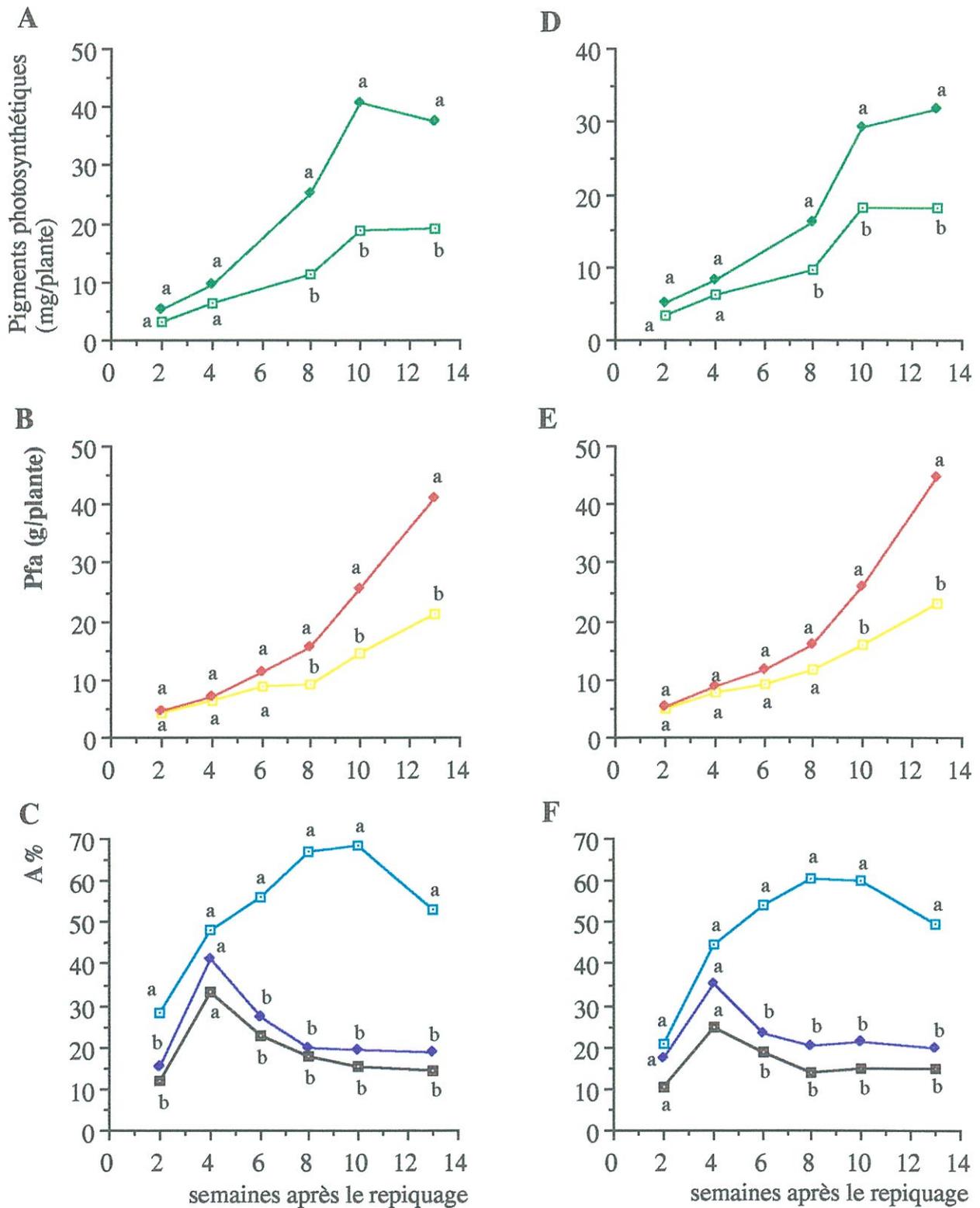


FIGURE 6 : Expériences avec les variétés Queen Tahiti (A, B et C) et Cayenne lisse (D, E et F) cultivées dans le sol de Marlins (pH 5,0)

A et D : Contenus en pigments photosynthétiques totaux dosés dans les parties aériennes des plantes endomycorhizées (—◆—) ou non (—□—)

B et E : Poids de matière fraîche aérienne des plantes endomycorhizées (—◆—) ou non (—□—)

C et F : Fréquence arbusculaire (A%) estimée après coloration au bleu de trypan (—□—) et des activités succinate déshydrogénase (—◆—) et phosphatase alcaline fongique (—■—) dans les racines des plantes endomycorhizées

Pour chaque graphique, les valeurs obtenues pour une même semaine sont significativement différentes lorsqu'elles sont suivies de lettres différentes ($p=0,05$)

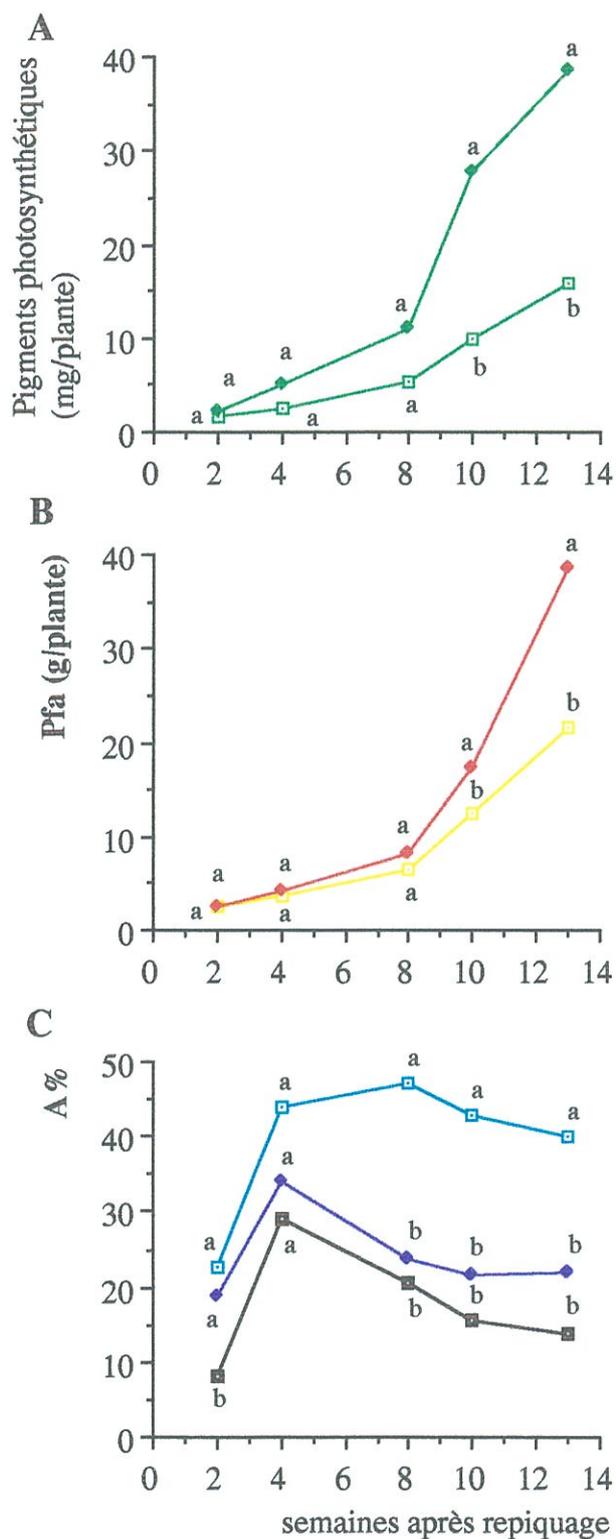


FIGURE 7 : Expérience avec la variété Spanish cultivée dans le sol de Marlins (pH 5,0)

A : Contenus en pigments photosynthétiques totaux dosés dans la partie aérienne des plantes endomycorhizées (—●—) ou non (—□—)

B : Poids de matière fraîche aérienne des plantes endomycorhizées (—●—) ou non (—□—)

C : Fréquence arbusculaire (A %) estimée après coloration au bleu de trypan (—□—) et des activités succinate déshydrogénase (—●—) et phosphatase alcaline fongique (—■—) les racines des plantes endomycorhizées

Pour chaque graphique, les valeurs obtenues pour une même semaine sont significativement différentes lorsqu'elles sont suivies de lettres différentes ($p=0,05$)

de la nutrition en P et expliquerait en partie la forte stimulation de croissance observée chez les ananas endomycorhizés.

CONCLUSION

Nous pouvons dire que l'inoculation endomycorhizienne en terrine au début du sevrage assure une colonisation rapide des racines des *vitroplants* d'ananas par les champignons symbiotiques. L'endomycorhization améliore considérablement la croissance des ananas et cet effet varie selon le champignon endomycorhizogène utilisé. Les meilleurs résultats de croissance sont obtenus avec *Glomus* sp. (LPA21) dans un sol acide où est généralement cultivé l'ananas. Ce champignon symbiotique a été isolé dans un sol analogue à ceux utilisés pour la culture de l'ananas. L'endomycorhization favorise le développement de plantes avec un système racinaire proportionnellement moins important, mais plus efficace que celui des plantes non inoculées. En effet, la nutrition minérale est améliorée par les endomycorhizes. L'endomycorhization influence positivement d'autres aspects de la physiologie de la plante comme la production de pigments photosynthétiques. L'ensemble de ces effets bénéfiques expliquerait la meilleure croissance des ananas endomycorhizés.

Ces résultats soulignent qu'il est nécessaire de bien raisonner les apports d'engrais en prenant en considération la présence des endomycorhizes. En effet, des réductions de croissance des plantes endomycorhizées ont été observées suite à une fertilisation phosphatée trop élevée. Ces réductions seraient liées à des baisses d'efficacité des champignons symbiotiques.

L'utilisation des colorations vitales et fonctionnelles donne une image instantanée de l'efficacité de la symbiose et de son effet sur la croissance de l'ananas. A l'aide de ces colorations, il est désormais possible de suivre *in situ* l'influence réelle d'une endomycorhization contrôlée.

CHAPITRE II : RÔLE DES ENDOMYCORHIZES SUR LE DEVELOPPEMENT DES VITROPLANTS D'ANANAS EN CONDITIONS DE STRESS ABIOTIQUE ET BIOTIQUES

1 - Rôle des endomycorhizes dans un sol à forte salinité

Nous avons étudié la tolérance vis à vis du NaCl (2 ou 5 g de NaCl/kg de substrat) de *vitroplants* endomycorhizés ou non des variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse (clone CY0) dans un sol acide.

Chez la variété Queen Tahiti, l'infection endomycorhizienne n'est pas modifiée par les teneurs en NaCl du sol. L'endomycorhization augmente les croissances aérienne et racinaire des plantes quel que soit le niveau de NaCl dans le sol (Annexe 4, tableau 1). Comme prévu, le rapport (R/A) est réduit par les endomycorhizes et la présence de NaCl dans le sol le diminue encore (Annexe 4, figure 2A).

Par contre chez la variété Cayenne lisse, le NaCl diminue l'infection endomycorhizienne (Annexe 4, figure 1) et cela est accompagné d'une croissance moins importante des plantes inoculées (Annexe 4, tableau 2). Cette perte de croissance est d'autant plus importante que la teneur en NaCl est élevée. Le NaCl diminue le rapport (R/A) des plantes non endomycorhizées mais n'a aucun effet sur celui des plantes endomycorhizées (Annexe 4, figure 2C).

Quel que soit le traitement, les quantités absorbées d'éléments minéraux sont toujours supérieures chez les deux variétés endomycorhizées (Annexe 4, tableaux 3 et 4).

Chez la variété Queen Tahiti, l'endomycorhization augmente les concentrations en P, Ca et Mg, par contre celles en N et K sont supérieures chez les plantes non endomycorhizées (Annexe 4, tableau 3).

Les concentrations en N, P et K des plantes endomycorhizées de la variété Cayenne lisse sont positivement influencées par les deux niveaux de NaCl du sol, en revanche celles des plantes non inoculées le sont seulement avec la teneur la plus faible en NaCl. Pour le Ca et le Mg, seules les concentrations en Ca de la variété Cayenne lisse non endomycorhizée sont améliorées en présence de NaCl (Annexe 4, tableau 4).

Discussion

L'absence d'altération de l'infection symbiotique en présence de NaCl tellurique chez la variété Queen Tahiti permet aux plantes endomycorhizées de maintenir leur

croissance ; cela est en accord avec les résultats que Dixon *et al.* (1993) ont obtenus chez *Leucaena*.

Par contre chez la variété Cayenne lisse, les réductions de croissance et d'infection chez les plantes endomycorhizées sont d'autant plus importantes que le niveau de NaCl dans le sol est élevé ; ceci a déjà été observé chez l'oignon (Ojala *et al.*, 1983). Toutefois, les baisses de croissance ne sont pas liées à une diminution des teneurs en P de ces plantes. En effet, le niveau en P est maintenu chez les plantes endomycorhizées malgré le NaCl du sol. Néanmoins, certains auteurs ont montré que le maintien des teneurs en P chez les plantes endomycorhizées en présence de NaCl dans le sol leur permettait de se développer de façon comparable à celles endomycorhizées en absence de NaCl (Ojala *et al.*, 1983 ; Hartmond *et al.*, 1987). Le NaCl réduirait l'infection endomycorhizienne en agissant sur la germination des spores (Hirrel, 1981 ; Estaun, 1989) et la croissance du champignon symbiotique (White *et al.*, 1989).

Le rapport (R/A) chez la variété Queen Tahiti est réduit chez les plantes endomycorhizées et le NaCl le diminue encore. Cet effet réduirait le contact des racines avec le NaCl du sol. Cette modification résulterait d'une meilleure adaptation au NaCl des plantes endomycorhizées. En effet, Rosendahl et Rosendahl (1991) ont montré que la surface racinaire de concombres endomycorhizés est réduite en présence de NaCl.

2 - Influence des endomycorhizes sur la synthèse de composés phénoliques racinaires

Certains auteurs attribuent aux plantes endomycorhizées une résistance accrue aux stress grâce à une synthèse plus élevée de composés du métabolisme secondaire de la plante, en particulier des composés phénoliques (Dehne et Schönbeck, 1979 ; Krishna et Bagyaraj, 1984b). Nous avons donc analysé si les endomycorhizes sont capables d'influencer la synthèse de tels composés phénoliques racinaires chez trois variétés d'ananas (Queen Tahiti, Cayenne lisse (clone CY0) et Spanish).

Chez les trois variétés, les endomycorhizes provoquent une augmentation des teneurs en composés phénoliques racinaires par rapport aux plantes non endomycorhizés (FIGURE 8). Les teneurs et les augmentations induites par les endomycorhizes ne sont pas les mêmes d'une variété à l'autre ; en effet la synthèse de ces composés est plus importante chez la variété Spanish.

Discussion

Les endomycorhizes influencent positivement la synthèse des composés phénoliques racinaires chez l'ananas et cela est en accord avec les résultats de Krishna et Bagayaraj (1984b). L'augmentation de ces composés est associée non seulement à des stress abiotiques (Bailey, 1982) mais aussi aux phénomènes de résistance vis à vis de pathogènes.

Certains composés phénoliques synthétisés dans les racines des plantes endomycorhizées se fixeraient sur les parois cellulaires des plantes les rendant plus résistantes aux agressions pathogènes (Grandmaison *et al.*, 1993). Ainsi les *vitroplants* d'ananas endomycorhizés seraient plus aptes à se défendre.

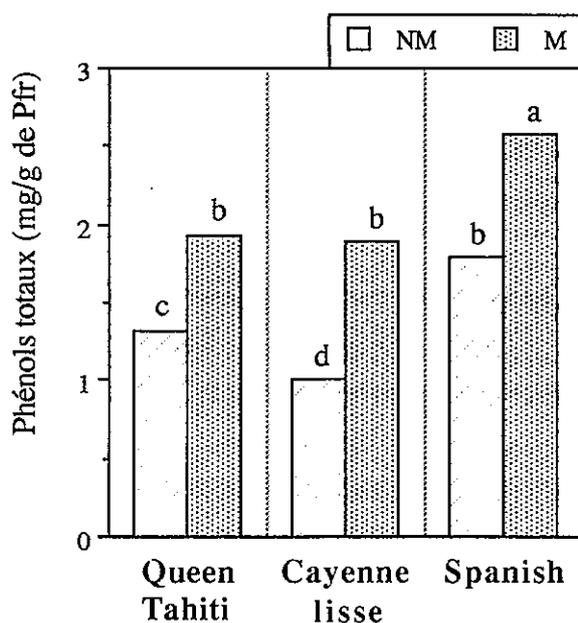


FIGURE 8 : Teneur en composés phénoliques totaux dans les racines de trois variétés d'ananas endomycorhizées (M) ou non (NM), âgées de 4 mois et cultivées dans le sol de Marlines (pH 5,0).

Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes ($p=0,05$)

3 - Rôle des endomycorhizes lors d'attaques de pathogènes

En cours de croissance, les racines d'ananas peuvent être agressées par des pathogènes telluriques. Nous avons voulu analyser l'apport des endomycorhizes à la résistance des plants micropropagés vis à vis de deux pathogènes de l'ananas : *Pratylenchus brachyurus* (nématode) et *Phytophthora cinnamomi* (champignon). Nous avons particulièrement étudié l'influence de la période d'inoculation des champignons endomycorhizogènes par rapport à celle des pathogènes, c'est à dire avant, en même temps ou après le pathogène.

Dans une première expérience, le champignon endomycorhizogène a été inoculé à la sortie de la *vitro*culture avant *P. brachyurus* qui l'a été au moment du repiquage. Dans une autre expérience, les endomycorhizes et les nématodes ont été appliqués

simultanément à la sortie de la *vitro*culture ou au moment du repiquage. La troisième expérience a consisté à introduire le champignon endomycorhizogène au moment du repiquage après que les nématodes aient été inoculés à la sortie de la *vitro*culture.

Dans le cas de *P. cinnamomi*, les endomycorhizes ont été inoculées à la sortie de la *vitro*culture et le champignon pathogène a été appliqué soit au moment du repiquage soit un mois plus tard.

3.1 - Cas de *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filip & Schurr-Steekh

Ce nématode a toujours été appliqué à la même concentration chez les variétés Queen Tahiti, Cayenne lisse (clone CY0) et Spanish.

3.1.1 - Inoculation endomycorhizienne avant celle des nématodes

Seules les fréquences arbusculaires (A%) estimées après coloration des activités SDH et Pase sont réduites par les nématodes chez la variété Queen Tahiti (Annexe 5, tableau 3).

Par contre, les proportions d'arbuscules vivants (A%(SDH)/A%(bleu de trypan) et fonctionnels (A%(Pase)/A%(bleu de trypan)) chez les trois variétés ne sont pas modifiées par les nématodes (Annexe 5, Matériel et Méthodes et tableau 3).

La croissance des plantes endomycorhizées ou non des trois variétés n'est pas modifiée par cette inoculation des nématodes, à l'exception de la croissance racinaire des plantes endomycorhizées de la variété Cayenne lisse qui est diminuée (Annexe 5, tableau 1).

Toutefois, les endomycorhizes réduisent la population des nématodes dans les racines des trois variétés (Annexe 5, tableau 1).

La présence de *P. brachyurus* n'altère pas l'effet positif des endomycorhizes sur les contenus en éléments minéraux chez les trois variétés ; en revanche le pathogène réduit les contenus en P des plantes non endomycorhizées (Annexe 9, tableau 8).

L'effet positif des endomycorhizes sur les concentrations en P, Ca et Mg des trois variétés n'est pas modifié par les nématodes (Annexe 5, tableau 2). Par contre, les concentrations en N et K sont supérieures chez les plantes non endomycorhizées.

3.1.2 - Inoculation simultanée des endomycorhizes et du pathogène

3.1.2.1 - À la sortie de la *vitro*culture

La fréquence arbusculaire visualisée après coloration au bleu de trypan est altérée par les nématodes chez les variétés Queen Tahiti et Spanish (Annexe 5, tableau 3), de plus le pathogène diminue celle estimée après coloration des activités SDH et Pase mais seulement chez la variété Queen Tahiti.

Cependant, les nématodes ne modifient pas les proportions d'arbuscules vivants et fonctionnels chez les trois variétés (Annexe 5, tableau 3).

La croissance aérienne des plantes endomycorhizées des trois variétés n'est pas affectée par les nématodes contrairement à celle des plantes non endomycorhizées (Annexe 5, tableau 1). La croissance racinaire des plantes endomycorhizées ou non des variétés Cayenne lisse et Spanish est réduite par les nématodes. La population des nématodes dans les racines est réduite chez les plantes endomycorhizées des trois variétés (Annexe 5, tableau 1).

Les nématodes apportés simultanément au champignon symbiotique n'altèrent pas non plus l'effet bénéfique des endomycorhizes sur l'absorption des éléments minéraux chez les trois variétés. En revanche, ils réduisent fortement les contenus de tous les éléments minéraux des plantes non endomycorhizées (Annexe 9, tableau 8).

L'effet positif des endomycorhizes sur les concentrations en P, Ca et Mg des variétés Queen Tahiti et Spanish est encore plus net en présence du pathogène (Annexe 5, tableau 2). De plus, les concentrations en N des variétés Queen Tahiti et Spanish sont supérieures chez les plantes endomycorhizées mais seulement en présence des nématodes. Chez la variété Cayenne lisse, l'effet positif des endomycorhizes sur les concentrations en P est encore plus manifeste en présence des nématodes. Par contre, les concentrations en K des trois variétés sont généralement supérieures chez les plantes non endomycorhizées.

3.1.2.2 - Au moment du repiquage

Les nématodes réduisent la fréquence arbusculaire estimée après les trois colorations chez la variété Queen Tahiti (Annexe 5, tableau 3).

En revanche, les proportions d'arbuscules vivants et fonctionnels ne sont pas diminuées par *P. brachyurus* chez les trois variétés (Annexe 5, tableau 3).

Les croissances aérienne et racinaire des plantes endomycorhizées des trois variétés ne sont pas modifiées par les nématodes. Par contre, celles des plantes non endomycorhizées de la variété Queen Tahiti sont fortement réduites par ce pathogène (Annexe 5, tableau 4). La formation des endomycorhizes diminue la population des nématodes dans les racines des trois variétés étudiées (Annexe 5, tableau 4).

La présence des nématodes n'affecte pas l'effet positif des endomycorhizes sur les contenus en éléments minéraux chez les trois variétés, cependant ce pathogène affecte les contenus en P des plantes non endomycorhizées (Annexe 9, tableau 9).

L'effet positif des endomycorhizes sur les concentrations en N, P, Ca et Mg des trois variétés n'est pas altéré par les nématodes sauf pour celles en N des variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse (Annexe 5, tableau 5). En revanche, les concentrations en K des trois variétés sont plus élevées chez les plantes non endomycorhizées.

3.1.3 - Inoculation endomycorhizienne après celle des nématodes

La fréquence arbusculaire (A%) estimée après coloration non vitale est réduite par les nématodes chez les variétés Queen Tahiti et Spanish (Annexe 5, tableau 3). En outre, les nématodes diminuent les valeurs de A% évaluées après coloration des activités SDH et Pase mais seulement chez la variété Queen Tahiti.

Par contre, *P. brachyurus* n'affecte pas les proportions d'arbuscules vivants et fonctionnels chez les trois variétés (Annexe 5, tableau 3).

Les croissances aérienne et racinaire des trois variétés endomycorhizées ne sont pas affectées par l'inoculation précoce des nématodes (Annexe 5, tableau 4), contrairement à celle des plantes non endomycorhizées de la variété Queen Tahiti (Annexe 5, tableau 4).

Les endomycorhizes réduisent le nombre des nématodes seulement dans les racines des ananas de la variété Queen Tahiti (Annexe 5, tableau 4).

L'apport de *P. brachyurus* avant l'endomycorhization n'altère pas les contenus en éléments minéraux chez les plantes endomycorhizées des trois variétés, par contre il baisse ceux des plantes non endomycorhizées (Annexe 9, tableau 9).

L'effet positif des endomycorhizes sur les concentrations en N, P, Ca et Mg est maintenu chez les variétés Queen Tahiti et Spanish malgré la présence des nématodes. Cet effet est maintenu seulement pour le P chez la variété Cayenne lisse (Annexe 5, tableau 5). Par contre, les concentrations en K sont supérieures chez les plantes non endomycorhizées des trois variétés.

3.1.4 - Discussion

La croissance des plantes endomycorhizées des trois variétés n'est pas modifiée par les nématodes quelle que soit leur période d'application par rapport à celle des endomycorhizes et elle est toujours significativement supérieure à celle des plantes non endomycorhizées. Par contre la croissance des *vitroplants* non endomycorhizés est fortement réduite quand les nématodes sont inoculés dès la sortie de la *vitro*culture.

Selon O'Bannon et Nemeč (1979) et Thomas *et al.* (1989), les nématodes réduiraient le développement des champignons endomycorhiziens dans les racines en créant un environnement défavorable à leur installation. Mais cela ne semble pas être le cas chez l'ananas, le pathogène quelle que soit sa période d'application ne modifie pas l'efficacité de la symbiose ; en effet les proportions d'arbuscules vivants et fonctionnels ne sont jamais affectées par *P. brachyurus*.

La nutrition en P des plantes endomycorhizées n'est pas affectée par la présence de *P. brachyurus* ; cela contribuerait à augmenter la résistance à ce pathogène

(Smith et Kaplan, 1988). En effet, le P rendrait les plantes plus tolérantes par une action directe sur les nématodes (Mac Guidwin *et al.*, 1985). Des autres explications seraient que les endomycorhizes altéreraient l'attraction et la pénétration du pathogène dans les racines en modifiant les exsudations racinaires (Kellam et Schenck, 1980) et qu'elles affecteraient l'alimentation et la reproduction des nématodes (Smith, 1987 ; Ingham, 1988).

Les endomycorhizes réduisent la population de *P. brachyurus* dans les racines d'ananas chez lesquelles les nématodes ont été appliqués simultanément ou après l'inoculation symbiotique. La population des nématodes n'est pas réduite par les endomycorhizes inoculées un mois après les nématodes chez les variétés Cayenne lisse et Spanish. Dans ce cas, les nématodes ont pu s'installer sans compétition dans les racines des plantes. Il est donc intéressant d'introduire les endomycorhizes le plus rapidement possible, avant que les plantes ne soient en contact avec des nématodes (Suresh et Bagyaraj, 1984 ; Pinochet *et al.*, 1993).

La population de *P. brachyurus* est moins importante dans les racines de la variété Spanish par rapport à celle déterminée chez les deux autres variétés. Ces résultats peuvent être mis en relation avec les quantités de composés phénoliques dosés dans les racines des trois variétés. En effet, c'est chez la variété Spanish endomycorhizée que la population de nématodes et l'accumulation des composés phénoliques sont les plus importantes. La stimulation de la synthèse de composés phénoliques observée chez les plantes endomycorhizées peut donc être, en partie, à l'origine d'un effet inhibiteur sur le développement de ces nématodes dans les racines d'ananas. Cependant ceci ne semble pas en accord avec les résultats obtenus chez *Cajanus cajan*, chez qui la présence de nématode du genre *Meloidogyne* influencerait négativement l'accumulation d'une phytoaléxine, le cajanol (Marley et Hillocks, 1994).

3.2 - Cas de *Phytophthora cinnamomi* Rands

L'inoculation du champignon endomycorhizogène (à la sortie de la vitroculture) a toujours été réalisée avant celle du champignon pathogène qui a été apporté au moment du repiquage ou un mois plus tard. Plusieurs doses de *P. cinnamomi* ont été testées.

3.2.1 - Effet de l'apport de *P. cinnamomi* au moment du repiquage

L'intensité de l'infection (M%) chez les deux variétés n'est pas altérée par l'apport de *P. cinnamomi* (Annexe 6, figures 1A et 2A).

Par contre, l'apport de *P. cinnamomi* à la dose la plus élevée réduit la fréquence arbusculaire (A%) estimée après coloration au bleu de trypan (-36%) et de l'activité Pase (-34%) chez la variété Queen Tahiti (Annexe 6, figure 1C). Une réduction de A% évaluée après coloration de l'activité Pase (-47%) est aussi observée chez la variété Cayenne lisse avec la dose la plus concentrée (Annexe 6, figure 2C).

Chez la variété Queen Tahiti, *P. cinnamomi* provoque à toutes les doses une réduction des croissances aérienne et racinaire des plantes non endomycorhizées alors que cette baisse n'est observée chez les plantes endomycorhizées qu'à la dose la plus élevée de l'inoculum pathogène (Annexe 6, tableau 1).

Le rapport (R/A) est plus faible chez les plantes endomycorhizées de la variété Queen Tahiti sauf chez celles inoculées par la dose la plus élevée de *P. cinnamomi* (Annexe 6, figure 3A).

Chez la variété Cayenne lisse, *P. cinnamomi* entraîne une baisse de croissance aérienne uniquement chez les plantes non endomycorhizées et seulement aux dilutions les plus concentrées. Par contre, la croissance racinaire des plantes endomycorhizées est diminuée pour les doses les plus élevées du pathogène (Annexe 6, tableau 2). Le rapport (R/A) est toujours réduit par les endomycorhizes chez les plantes de la variété Cayenne lisse (Annexe 6, figure 3C).

Chez la variété Queen Tahiti, *P. cinnamomi* n'altère pas l'effet positif des endomycorhizes sur les teneurs en P, par contre il diminue les concentrations en P des plantes non endomycorhizées (Annexe 6, tableau 3). Les teneurs en N et K tendent à augmenter en présence de *P. cinnamomi* chez les plantes endomycorhizées ou non. Les baisses de concentration en Ca et Mg provoquées par le pathogène sont moins importantes chez les plantes endomycorhizées. *P. cinnamomi* altère le contenu en éléments minéraux aussi bien des plantes endomycorhizées ou non, toutefois les quantités absorbées des plantes endomycorhizées sont toujours plus élevées que celles des plantes non inoculées (Annexe 9, tableau 10).

Chez la variété Cayenne lisse, l'effet positif de l'endomycorhization sur les teneurs en P, Ca et Mg est maintenu en présence du pathogène (Annexe 6, tableau 4). Les concentrations en N et K sont généralement supérieures chez les plantes non endomycorhizées. Les quantités absorbées d'éléments minéraux des plantes endomycorhizées ou non sont négativement influencées en présence du pathogène, cependant les contenus des plantes endomycorhizées sont toujours supérieurs à ceux des plantes non endomycorhizées (Annexe 9, tableau 11).

3.2.2 - Effet de l'apport de *P. cinnamomi* un mois après le repiquage

L'intensité de l'infection (M%) et la fréquence arbusculaire (A%) estimées après les trois colorations chez les deux variétés ne sont pas modifiées par les différentes doses d'application de *P. cinnamomi* (Annexe 6, figures 1B, 1D, 2B et 2D).

Les croissances aérienne et racinaire des plantes non endomycorhizées de la variété Queen Tahiti sont diminuées par le niveau le plus élevé de *P. cinnamomi* alors que celles des plantes endomycorhizées ne sont pas altérées par le pathogène (Annexe 6, tableau

5). On note donc que l'effet négatif sur la croissance aérienne induit par la concentration la plus élevée du pathogène chez cette variété endomycorhizée disparaît quand le pathogène est inoculé un mois plus tard. Par contre, la croissance racinaire des plantes endomycorhizées de cette variété est réduite en présence du pathogène.

Le rapport (R/A) est plus faible chez les plantes endomycorhizées de la variété Queen Tahiti (Annexe 6, figure 3B), sauf chez celles inoculées avec la dose la plus élevée du pathogène.

Chez la variété Cayenne lisse, *P. cinnamomi* n'a pas d'incidence négative sur la croissance des plantes qu'elles soient endomycorhizées ou non (Annexe 6, tableau 6). Comme prévu, le rapport (R/A) est réduit chez les plantes endomycorhizées de cette variété (Annexe 6, figure 3D).

L'effet positif de l'endomycorhization sur les teneurs et les quantités absorbées de P, Ca et Mg n'est pas modifié par le pathogène chez les variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse (Annexe 6, tableaux 7 et 8 et Annexe 9, tableaux 12 et 13). Les contenus en N et K sont supérieurs chez les plantes endomycorhizées des deux variétés, par contre leurs concentrations sont plus élevées chez les plantes non endomycorhizées.

3.2.3 - Discussion

La croissance des plantes endomycorhizées de la variété Cayenne lisse n'est pas modifiée par *P. cinnamomi* tandis que celle de Queen Tahiti est altérée en présence de *P. cinnamomi* mais seulement à la dose la plus élevée du pathogène et uniquement lorsque son application est réalisée au moment du repiquage (inoculation la plus précoce du pathogène). *P. cinnamomi* n'affecte pas la colonisation endomycorhizienne dans les racines de la plante mais il altérerait le fonctionnement du champignon endomycorhizogène quand il est appliqué à la dose la plus concentrée au moment du repiquage. La réduction de croissance s'expliquerait donc, en partie, par une moindre efficacité de la symbiose.

L'influence de *P. cinnamomi* sur la croissance des *vitroplants* d'ananas dépend de plusieurs facteurs dont le taux d'inoculum du pathogène comme l'ont montré Davis et Menge (1981) chez le citrus. Son effet dépend également de l'âge de la plante au moment de l'application du pathogène. Les ananas endomycorhizés ou non sont plus sévèrement affectés par l'inoculation au moment du repiquage de *P. cinnamomi* que ceux inoculés un mois plus tard.

Toutefois, les plantes endomycorhizées résistent mieux à *P. cinnamomi* que les plantes non endomycorhizées, ce qui pourrait s'expliquer par l'augmentation de la synthèse des composés phénoliques participant aux phénomènes de résistance des plantes. De plus, la présence des endomycorhizes modifierait aussi l'exsudation racinaire (Ratnayake *et al.*, 1978) conduisant à des changements de composition de la population microbienne de la rhizosphère (Graham et Menge, 1982). Meyer et Linderman (1986) ont observé une réduction de

production de sporanges et de zoospores de *P. cinnamomi* en présence de racines endomycorhizées.

CONCLUSION

Les endomycorhizes chez l'ananas peuvent être considérées comme agent capable d'améliorer la tolérance à un stress abiotique tel qu'un niveau élevé de NaCl dans le sol et comme agent de bioprotection contribuant à la résistance vis à vis de *P. brachyurus* et *P. cinnamomi*.

Quand l'infection endomycorhizienne n'est pas affectée par des niveaux élevés de NaCl dans le sol, elle influencerait le développement des ananas leur permettant de mieux s'adapter à de telles conditions de stress.

L'effet bénéfique des endomycorhizes comme bioprotecteur sur la croissance de l'ananas pourrait être dû au maintien de l'efficacité de la symbiose permettant l'amélioration de la nutrition minérale. Une autre explication serait la synthèse accrue de composés phénoliques dans les racines endomycorhizées ainsi que les changements d'exsudats racinaires qui réduiraient l'activité des pathogènes. Cependant l'infestation par des nématodes et des champignons pathogènes est très peu probable pendant les phases de sevrage et de croissance en salle climatisée ou en serre avant le transfert au champ. Les résultats de bioprotection obtenus au cours des phases précédant le repiquage en plantation donneraient déjà des indications sur l'effet possible des endomycorhizes au champ. Toutefois des vérifications sont nécessaires à cette échelle afin de confirmer ces résultats.

CHAPITRE III : INFLUENCES DE PESTICIDES SUR LE DEVELOPPEMENT ET L'ACTIVITE DES ENDOMYCORHIZES

1 - Effets de fongicides appliqués au sol

Les fongicides sont couramment utilisés dans les systèmes de production de plantes. Nous avons voulu étudier l'effet de plusieurs fongicides (phoséthyl-Al, étridiazol, captane et manèbe) sur le développement et l'activité de la symbiose ainsi que sur la croissance et la nutrition minérale des *vitro*plants des variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse (clone CY0).

L'inoculation des endomycorhizes et l'application au sol des fongicides ont été réalisées à la sortie de la *vitro*culture. Les fongicides ont été appliqués aux doses recommandées pour contrôler les champignons pathogènes du sol.

1.1 - Développement et activité de l'infection endomycorhizienne

Les valeurs de l'intensité de l'infection (M%) estimées après coloration au bleu de trypan chez les deux variétés sont comprises entre 84 et 93% quel que soit le traitement (Annexe 7, figure 3A et 3C). Par contre, la fréquence arbusculaire (A%) estimée après coloration non vitale est réduite par le captane et le manèbe chez les deux variétés (Annexe 7, figure 3B et 3D).

Par ailleurs, les valeurs de M% et A% estimées après coloration des activités SDH et Pase sont réduites chez les deux variétés seulement après application de l'étridiazol.

1.2 - Influence sur la croissance

L'influence positive des endomycorhizes sur les croissances aérienne et racinaire des deux variétés n'est pas affectée par l'application des fongicides à l'exception de l'étridiazol qui inhibe la croissance aérienne (Annexe 7, tableaux 3A et 3B). De plus, la grande sensibilité des deux variétés non endomycorhizées aux quatre fongicides tend à augmenter l'effet endomycorhizien sur les croissances aérienne et racinaire, sauf pour la variété Queen Tahiti traitée avec l'étridiazol et le captane (Annexe 7, tableau 3C).

Comme prévu, le rapport (R/A) des plantes endomycorhizées est inférieur à celui des plantes non endomycorhizées chez les deux variétés mais l'application des fongicides inverse toujours cet effet (Annexe 7, figure 2).

1.3 - Effet sur la nutrition minérale

Les fongicides n'altèrent pas l'effet positif des endomycorhizes sur les concentrations en P, Ca et Mg chez les deux variétés à l'exception de l'étridiazol chez la variété Queen Tahiti (Annexe 7, tableaux 3D et 3E). En revanche, les concentrations en N et

K sont généralement supérieures chez les plantes non endomycorhizées des deux variétés avec ou sans l'application des fongicides.

L'effet positif des endomycorhizes sur les quantités absorbées en éléments minéraux est maintenu en présence des fongicides chez les deux variétés (Annexe 7, tableaux 3D et 3E). Cependant, les fongicides peuvent influencer les contenus des plantes endomycorhizées ou non. Par exemple, le captane améliore le contenu en éléments minéraux de la variété Queen Tahiti inoculée ou non. Chez la variété Cayenne lisse, le manèbe cause une légère augmentation des contenus en N, P, K, Ca et Mg chez les plantes endomycorhizées, par contre l'étridiazol influence négativement les quantités absorbées d'éléments minéraux par les plantes non inoculées.

1.4 - Effet du phoséthyl-Al sur la synthèse de composés phénoliques racinaires

Nous avons réalisé le dosage des composés phénoliques dans les racines des plantes de la variété Queen Tahiti traitées avec le phoséthyl-Al car ce fongicide est connu pour stimuler des mécanismes de défense des plantes (Leroux, 1981) (Annexe 7, tableau 1).

L'application du phoséthyl-Al augmente la production des composés phénoliques chez les plantes non inoculées (+28%) (FIGURE 9). En revanche, son application diminue, de plus de 50%, la teneur de ces composés dans les racines des plantes endomycorhizées.

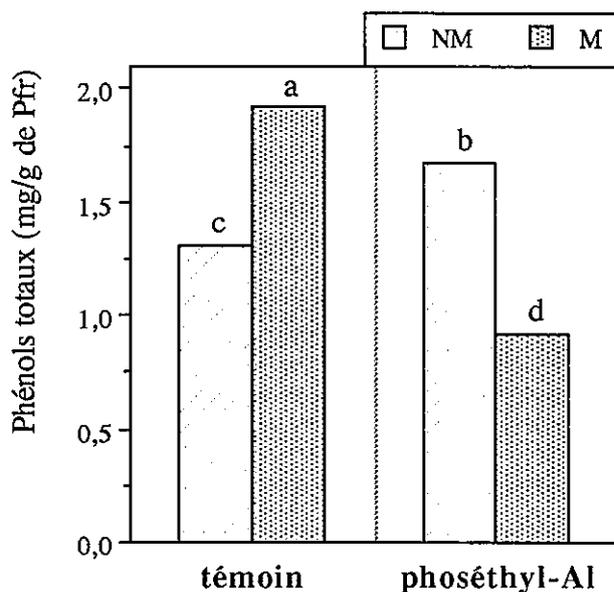


FIGURE 9: Teneurs en composés phénoliques totaux dosés dans les racines de la variété Queen Tahiti endomycorhizée (M) ou non (NM), âgée de 4 mois, cultivée dans le sol de Marllins (pH 5,0) et traitée avec du phoséthyl-Al ou non (témoin).

Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes ($p=0,05$)

1.5 - Discussion

L'infection endomycorhizienne et la croissance de l'ananas ne sont pas affectées par le phoséthyl-Al et cela est en accord avec les résultats d'Aziz *et al.* (1990) obtenus chez cette même plante et avec ceux observés chez d'autres espèces végétales (Jabaji-Hare et Kendrick, 1985 ; Despatie *et al.*, 1989 ; Morandi, 1989 ; Trouvelot *et al.*, 1991). L'influence négative de ce fongicide sur la croissance des ananas non endomycorhizés a été également rapportée par Aziz *et al.* (1990). Le phoséthyl-Al stimule la synthèse des composés phénoliques dans les racines des plantes non endomycorhizées. Par contre, l'association des endomycorhizes et de ce fongicide réduit la teneur de ces composés. Cela pourrait signifier que l'action du phoséthyl-Al ne se ferait pas par l'intermédiaire de mécanismes de défense de la plante mais directement sur le champignon pathogène.

Le captane et le manèbe réduisent la quantité d'arbuscules dans les racines d'ananas micropropagés ; cela est en accord avec les résultats de Nesheim et Linn (1969) obtenus chez le maïs et de Kough *et al.* (1987) sur l'oignon. Cependant l'effet endomycorhizien sur la croissance et la nutrition minérale n'est pas altéré par ces deux fongicides. Ceci s'expliquerait par le fait que les ananas traités avec ces deux fongicides présentent des proportions élevées d'arbuscules vivants (captane : 50% et manèbe : 48%) et fonctionnels (captane : 33% et manèbe : 30%).

Le faible développement des ananas endomycorhizés traités avec l'étridiazol semble lié à la fois aux faibles valeurs de A% évaluées après coloration des activités SDH et Pase et à la fois aux faibles proportions d'arbuscules vivants (26%) et fonctionnels (17%).

2 - Application de nématicides

Chez l'ananas, les dégâts occasionnés par les nématodes ont un fort impact économique et l'utilisation de nématicides est courante (Schneider *et al.*, 1992).

Les nématicides sont appliqués au moment du repiquage après l'inoculation endomycorhizienne réalisée à la sortie de la *vitro*culture. La dose la plus forte de chacun des nématicides a détruit les *vitro*plants endomycorhizés ou non. Cette dose correspondait à celle recommandée pour lutter contre les nématodes au champ (phénamiphos : 0,4g M.A./*vitro*plant et éthoprophos : 0,2g M.A./*vitro*plant)

Aucun *vitro*plant endomycorhizé ou non n'a été tué par les doses moyenne et faible de chacun des nématicides (phénamiphos : 0,2g M.A./*vitro*plant (dose moyenne) et 0,05g M.A./*vitro*plant (dose faible) et éthoprophos : 0,1g M.A./*vitro*plant (dose moyenne) et 0,02g M.A./*vitro*plant (dose faible)).

2.1 - Incidence sur l'infection endomycorhizienne

L'intensité de l'infection (M%) et la fréquence arbusculaire (A%) estimées après les trois colorations chez les trois variétés ne sont pas affectées par les deux nématicides

appliqués aux doses moyenne et faible, à l'exception des valeurs de A% évaluées après coloration de l'activité Pase chez la variété Spanish traitée avec le phénamiphos (dose faible) et l'éthoprophos (dose moyenne) (FIGURE 10).

2.2 - Effet sur la croissance

La croissance aérienne des plantes endomycorhizées des variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse n'est pas altérée par les deux nématocides aux doses moyennes et faibles (TABLEAUX 2 et 3). Les nématocides n'ont aucune influence sur la croissance racinaire des plantes inoculées de la variété Cayenne lisse, par contre ils réduisent celle de la variété Queen Tahiti. Les croissances aérienne et racinaire des plantes non inoculées sont diminuées par l'éthoprophos appliqué aux doses moyennes et faibles chez la variété Queen Tahiti et par la dose moyenne des deux nématocides chez la variété Cayenne lisse. Le rapport (R/A) est toujours réduit par les endomycorhizes chez ces deux variétés.

Chez la variété Spanish, le phénamiphos (dose faible) et l'éthoprophos (dose moyenne) affectent les croissances aérienne et racinaire des plantes endomycorhizées (TABLEAU 4). Les deux nématocides réduisent également la croissance de cette variété non endomycorhizée. Les endomycorhizes n'ont aucun effet sur le rapport (R/A) chez cette variété.

2.3 - Effet sur la nutrition minérale

L'application des nématocides aux doses moyennes et faibles n'altère pas l'effet bénéfique des endomycorhizes sur les concentrations en N, Ca et Mg des trois variétés, à l'exception celui sur le Ca chez la variété Cayenne lisse et celui sur N chez la variété Spanish quand les deux nématocides sont appliqués à la dose moyenne (Annexe 9, tableaux 14A, 15A, 16A). Par contre, les concentrations en K sont généralement supérieures chez les plantes non endomycorhizées.

Chez les variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse, les concentrations en P sont fortement augmentées chez les plantes endomycorhizées traitées avec les deux nématocides aux doses moyennes et faibles et chez celles non inoculées traitées avec la dose moyenne (Annexe 9, tableaux 14A, 15A, 16A).

Les quantités absorbées d'éléments minéraux sont améliorées par les endomycorhizes avec ou sans l'application des nématocides (Annexe 9, tableau 14B, 15B et 16B).

2.4 - Discussion

Ces travaux mettent en évidence qu'il est nécessaire de tester les doses de nématocides à appliquer sur les *vitroplants* d'ananas. En effet, ces *vitroplants* n'ont pas supporté l'application de la dose la plus forte des nématocides (celle recommandées pour lutter contre les nématodes au champ).

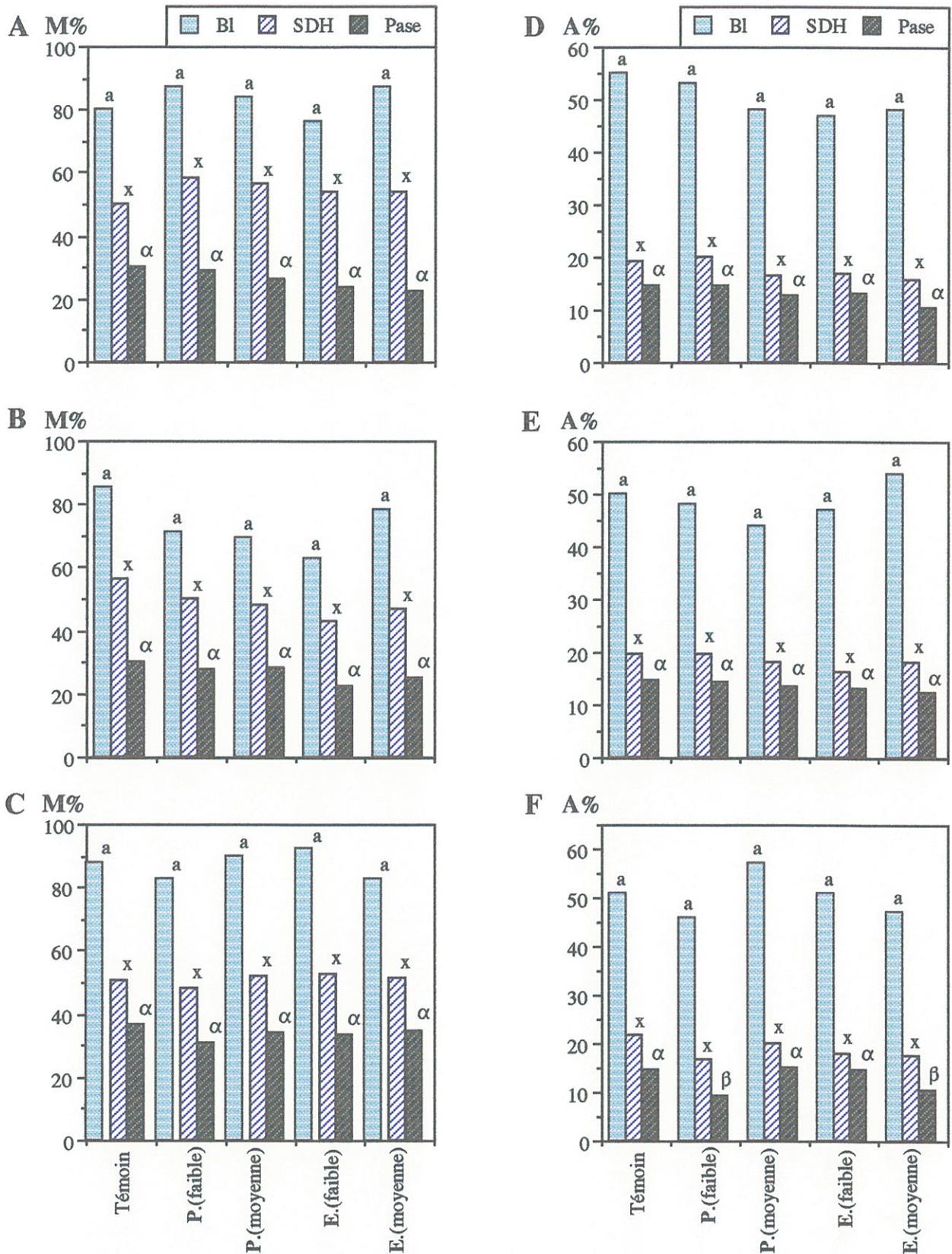


FIGURE 10 : Intensité de l'infection (M%) (A, B et C) et fréquence arbusculaire (A%) (D, E et F) estimées après coloration au bleu de trypan (BI) et des activités succinate déshydrogénase (SDH) et phosphatase alcaline fongique (Pase) des variétés Queen Tahiti (A et D), Cayenne lisse (B et E) et Spanish (C et F) d'ananas endomycorhizés, âgées de 4 mois, cultivées dans le sol de Marlin et traités avec 2 nématocides : phénamiphos (P.): doses faible, moyenne et éthoprophos (E.): doses faible, moyenne, ou non (Témoin).
Pour chaque coloration, les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différents (p=0,05).

TABLEAU 2 : Poids de matière fraîche de la partie aérienne (Pfa) et des racines (Pfr) et poids de matière sèche de la partie aérienne (Psa) de la variété d'ananas Queen Tahiti endomycorhizée (M) ou non (NM), âgée de 4 mois, cultivée dans le sol de Marlines et traitée avec deux nématocides : phénamiphos (doses faible et moyenne) et ethoprophos (doses faible et moyenne) ou non (Témoin)

Traitements			Pfa (g)	Pfr (g)	Psa (g)	R/A
Témoin		NM	21,07c	3,00b	2,19c	0,14a
		M	41,18a	4,18a	4,26a	0,10b
Phénamiphos	dose faible	NM	17,67c	2,67c	1,77c	0,15a
		M	41,79a	3,41b	3,81a	0,08b
Phénamiphos	dose moyenne	NM	19,38c	3,17b	2,03c	0,16a
		M	33,76ab	3,28b	2,92b	0,10b
Ethoprophos	dose faible	NM	10,66d	1,64d	1,16d	0,15a
		M	35,84ab	3,11b	3,17ab	0,09b
Ethoprophos	dose moyenne	NM	9,23d	1,35d	0,97d	0,15a
		M	32,80ab	3,52b	2,92b	0,11b

Pour chaque colonne, les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes ($p=0,05$)

TABLEAU 3 : Poids de matière fraîche de la partie aérienne (Pfa) et des racines (Pfr) et poids de matière sèche de la partie aérienne (Psa) de la variété d'ananas Cayenne lisse endomycorhizée (M) ou non (NM), âgée de 4 mois, cultivée dans le sol de Marlines et traitée avec deux nématocides : phénamiphos (doses faible et moyenne) et ethoprophos (doses faible et moyenne) ou non (Témoin)

Traitements			Pfa (g)	Pfr (g)	Psa (g)	R/A
Témoin		NM	22,92b	3,70b	2,38b	0,16a
		M	44,52a	5,17a	4,02a	0,12b
Phénamiphos	dose faible	NM	24,40b	3,49b	2,28b	0,14a
		M	43,25a	4,50a	3,83a	0,10b
Phénamiphos	dose moyenne	NM	13,68c	2,36c	1,38c	0,17a
		M	41,00a	5,16a	3,66a	0,12b
Ethoprophos	dose faible	NM	27,54b	3,51b	2,52b	0,13ab
		M	42,46a	4,47a	3,83a	0,11b
Ethoprophos	dose moyenne	NM	16,98c	2,50c	1,69c	0,15a
		M	40,59a	5,01a	3,44a	0,12b

Pour chaque colonne, les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes ($p=0,05$)

TABLEAU 4 : Poids de matière fraîche de la partie aérienne (Pfa) et des racines (Pfr) et poids de matière sèche de la partie aérienne (Psa) de la variété d'ananas Spanish endomycorhizée (M) ou non (NM), âgée de 4 mois, cultivée dans le sol de Marlins et traitée avec deux nématocides : phénamiphos (doses faible et moyenne) et ethoprophos (doses faible et moyenne) ou non (Témoin)

Traitements			Pfa (g)	Pfr (g)	Psa (g)	R/A
Témoin		NM	24,27c	2,32b	2,34c	0,10a
		M	42,50a	3,85a	4,11a	0,09ab
Phénamiphos	dose faible	NM	18,42cd	1,71c	1,83d	0,09ab
		M	29,17b	2,25b	2,79b	0,08ab
Phénamiphos	dose moyenne	NM	15,59d	1,63c	1,57d	0,11a
		M	46,52a	4,78a	4,47a	0,10a
Ethoprophos	dose faible	NM	14,78d	1,40c	1,50d	0,10a
		M	36,60ab	3,64a	3,59ab	0,10a
Ethoprophos	dose moyenne	NM	14,08d	1,23c	1,22d	0,09ab
		M	31,23b	2,16b	3,21b	0,07b

Pour chaque colonne, les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes ($p=0,05$)

Chez les variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse, la colonisation et l'activité symbiotiques ainsi que la croissance des ananas endomycorhizés ne sont pas modifiées par l'application des deux nématocides aux doses compatibles avec le développement de la plante. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Backman et Clark (1977) chez l'arachide et Habte et Manjunath (1988) chez *Leucaena*.

La variété Spanish semble la plus sensible à de tels pesticides, le phénamiphos (dose faible) et l'éthoprophos (dose moyenne) affectent l'activité du champignon symbiotique dans les racines. Ceci est accompagné d'une réduction de croissance des plantes endomycorhizées. Cette diminution de l'activité P des endomycorhizes influencée par les nématocides expliquerait, partiellement, la baisse de développement de ces plantes inoculées.

La nutrition en P des plantes endomycorhizées des variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse est améliorée suite à l'application des nématocides. Ces pesticides sont composés en partie de P, que pourraient utiliser les ananas. La récupération de ce P apparaît plus efficace chez les plantes endomycorhizées que chez les plantes non inoculées. Cet effet est observé chez les plantes non endomycorhizées seulement quand les nématocides sont appliqués à la dose la plus concentrée. Les champignons endomycorhizogènes utiliseraient plus efficacement le P des nématocides. Par contre, cet effet n'est pas obtenu chez la variété Spanish.

CONCLUSION

La complexité des résultats met en évidence que chaque pesticide doit être testé pour chaque combinaison plante/champignon endomycorhizogène. L'application de fongicides, tels que le phoséthyl-Al, le captane et le manèbe aux doses recommandées pour lutter contre les champignons pathogènes permet de conserver l'effet bénéfique des endomycorhizes sur le développement des ananas micropropagés. Par contre l'application des fongicides altère la croissance des *vitroplants* non endomycorhizés mettant en évidence l'intérêt d'endomycorhizer les plants afin de supprimer ce stress.

Les *vitroplants* endomycorhizés ou non semblent plus sensibles aux nématocides. En effet, le phénamiphos et l'éthoprophos appliqués aux doses recommandées pour lutter contre les nématodes (dose forte) tuent les *vitroplants* inoculés ou non. En réduisant les doses, ces nématocides deviennent compatibles avec l'inoculation endomycorhizienne des plants micropropagés.

L'association des endomycorhizes avec des pesticides ouvre des perspectives intéressantes de lutte intégrée.

CHAPITRE IV : UTILISATION D'INOCULA COMMERCIAUX DANS LA PRODUCTION D'ANANAS MICROPROPAGES

1 - Inoculation et croissance de l'ananas

Deux inocula commerciaux (AGC et Phytotec) ont été testés afin d'établir leur effet sur la croissance des *vitroplants* de trois variétés d'ananas (Queen Tahiti, Cayenne lisse (clone CY0) et Spanish) et d'observer leur développement dans deux types de sols désinfectés (Marlins pH 5.0 et Epoisses pH 8.0). Pour chaque inoculum, deux doses (1 ou 3% du substrat) ont été utilisées.

Les effets de ces inocula commerciaux ont été confrontés à ceux obtenus chez des plantes inoculées avec deux champignons endomycorhizogènes de la collection du laboratoire de Phytoparasitologie ; (LPA8) et (LPA21) utilisés respectivement en sol alcalin et en sol acide.

1.1 - Croissance et infection endomycorhizienne en sol alcalin

La croissance aérienne des plantes endomycorhizées de la variété Queen Tahiti est supérieure à celle des plantes non inoculées (+88 à 142% selon l'inoculum), par contre les endomycorhizes n'ont aucun effet sur la croissance racinaire (Annexe 8, tableau 2).

Chez les variétés Cayenne lisse et Spanish, les meilleures performances en terme de croissance aérienne ont été obtenues avec l'inoculum AGC (Annexe 8, tableaux 3 et 4). En revanche, le comportement est différent pour le système racinaire ; sa croissance est stimulée par l'inoculum Phytotec chez la variété Cayenne lisse, par contre elle n'est pas influencée par l'inoculation endomycorhizienne chez la variété Spanish.

L'intensité de l'infection (M%) ne diffère pas selon les inocula utilisés chez la variété Queen Tahiti (Annexe 8, tableau 2), par contre elle est supérieure avec LPA8 et AGC chez les plantes des variétés Cayenne lisse et Spanish (Annexe 8, tableaux 3 et 4). Les valeurs de la fréquence arbusculaire (A%) sont plus élevées avec l'inoculum AGC chez les trois variétés.

1.2 - Croissance et infection endomycorhizienne en sol acide

Chez la variété Queen Tahiti, la plus importante stimulation des croissances aérienne et racinaire est obtenue quand les plantes sont endomycorhizées avec LPA21 (Annexe 8, tableau 5). Dans ces conditions, les inocula commerciaux améliorent seulement la croissance racinaire de cette variété.

Chez la variété Cayenne lisse, les meilleurs résultats de croissance aérienne sont obtenus chez les plantes endomycorhizées avec LPA21 (+165%) et l'inoculum Phytotec à 1% (+156%) (Annexe 8, tableau 6). Ce dernier apparaît plus intéressant que l'inoculum AGC (+73% à la dose de 1%). Ces deux inocula sont plus efficace sur la stimulation de croissance à 1% qu'à 3% chez cette variété.

Chez la variété Spanish, les croissances des plantes endomycorhizées par LPA21 (+192%) et Phytotec 3% (+209%) sont plus élevées que celles obtenues avec les autres inoculations (Annexe 8, tableau 7). Dans ce sol, l'inoculum Phytotec est plus efficace qu'AGC pour stimuler le développement de cette variété.

Le niveau de l'infection endomycorhizienne est plus important chez les plantes des trois variétés inoculées avec LPA21 (Annexe 8, tableaux 5, 6 et 7). Aucune différence de niveau d'infection n'est observée dans les racines des variétés endomycorhizées avec les deux inocula commerciaux.

2 - Effet sur la nutrition minérale

2.1 - Nutrition minérale en sol alcalin

L'inoculum AGC et le champignon LPA8 améliorent les concentrations en P des trois variétés (Annexe 9, tableau 17). Les trois types d'inocula endomycorhiziens améliorent aussi les concentrations en K chez les trois variétés. Les concentrations en Mg les plus élevées sont mesurées chez les trois variétés inoculées avec LPA8.

Pour le N et le Ca, les effets sont différents avec les variétés. En effet, les concentrations en N sont améliorées par tous les inocula endomycorhizogènes chez la variété Cayenne lisse, par contre seuls LPA8 et AGC les augmentent chez la variété Spanish et seul LPA8 chez la variété Queen Tahiti. Les deux inocula commerciaux influencent positivement les concentrations en Ca chez les variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse, en revanche cet effet s'inverse chez la variété Spanish.

Les endomycorhizes améliorent les quantités absorbées en éléments minéraux chez les trois variétés (Annexe 9, tableau 18).

2.2 - Nutrition minérale en sol acide

Les concentrations en P les plus élevées sont obtenues chez les trois variétés inoculées avec LPA21 (Annexe 9, tableau 19). Cependant en ce qui concerne uniquement les inocula commerciaux, les concentrations en P sont plus importantes avec la dose de 3% qu'avec celle de 1%.

AGC et Phytotec améliorent les concentrations en N et K chez la variété Spanish, contrairement à ce que l'on observe chez les variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse

(Annexe 9, tableau 19). Les trois variétés inoculées avec LPA21 présentent toujours les plus faibles teneurs en K.

Les concentrations en Mg sont améliorées par les endomycorhizes chez la variété Queen Tahiti, contrairement à celles de la variété Spanish. En revanche, les concentrations en Ca sont inférieures chez les plantes endomycorhizées de ces deux variétés (Queen Tahiti et Spanish).

Les quantités absorbées de N, P, K, Ca et Mg sont toujours supérieures chez les plantes endomycorhizées sauf pour le P chez la variété Queen Tahiti inoculée avec AGC et Phytotec (Annexe 9, tableau 20). On observe en plus que Phytotec assure une meilleure absorption des éléments minéraux qu'AGC chez les variétés Cayenne lisse et Spanish.

3 - Discussion

L'infection endomycorhizienne est généralement plus importante dans le sol acide ainsi que la stimulation de croissance, conformément aux expériences illustrées dans le chapitre I. En sol acide, le champignon endomycorhizogène LPA21 assure, chez les trois variétés, les meilleurs résultats de croissance et de nutrition minérale. Ces résultats seraient expliqués par le fait que ce champignon a été isolé dans un sol acide en région tropicale et donc qu'il est bien adapté aux conditions de culture de l'ananas (Lambert *et al.*, 1980 ; Koslowsky et Boerner, 1989).

Toutefois l'inoculum Phytotec en sol acide permet d'obtenir des résultats de croissance chez les variétés Cayenne lisse et Spanish comparables à ceux observés avec l'inoculation de LPA21. Néanmoins, ces résultats pour chacune des variétés ont été obtenus avec des doses différentes de cet inoculum : 1% chez Cayenne lisse et 3% pour Spanish. Ceci illustre bien qu'il est nécessaire de tester les inocula commerciaux avant de les utiliser en production (Sylvia *et al.*, 1993b).

Dans le sol acide, Phytotec apparaît donc plus approprié qu'AGC pour infecter les plants micropropagés d'ananas et améliorer leur développement.

Dans le sol alcalin, la colonisation symbiotique la plus importante est observée avec l'inoculum AGC ainsi que les meilleurs résultats de croissance et de nutrition minérale.

CONCLUSION

L'utilisation d'inocula commerciaux est techniquement possible, toutefois il est indispensable de les tester avant de les employer pour la production. Des essais doivent définir les paramètres d'application : dose, période, localisation de l'application, ...

Les résultats de ces travaux mettent en évidence les limites des inocula commerciaux. En effet, les champignons endomycorhizogènes composant ces inocula ne leur permettent pas de s'adapter à toutes conditions de culture et d'infecter efficacement les plantes. Par exemple, l'utilisation en sol acide d'un champignon (LPA21) isolé dans un milieu

analogue à celui de la culture de l'ananas, assure chez les trois variétés de meilleurs résultats de croissance et de nutrition minérale que les inocula commerciaux. On peut penser qu'un champignon endomycorhizogène isolé dans une culture d'ananas pourrait donner encore de meilleurs résultats de croissance et de nutrition minérale que ceux obtenus avec LPA21.

**DISCUSSION et
CONCLUSION
GENERALE**

DISCUSSION et CONCLUSION GENERALE

Les endomycorhizes à arbuscules sont naturellement présentes dans la plupart des écosystèmes tropicaux (Diederichs et Moawad, 1993). En conditions naturelles, les racines d'ananas sont infectées par des champignons endomycorhizogènes à arbuscules (Mourichon, 1981).

La micropropagation aboutit à la production de plants dépourvus d'endomycorhizes. L'importance de cette symbiose nous a incité à étudier le rôle des champignons endomycorhizogènes sur la croissance des *vitroplants* d'ananas afin de préciser les conditions de leur utilisation en production de plantes micropropagées.

Trois variétés d'ananas (Queen Tahiti, Cayenne lisse et Spanish), deux types de sol (acide et alcalin) et six champignons endomycorhizogènes, dont cinq provenant de zones analogues à celles où est cultivé l'ananas, ont été utilisés.

Nous avons choisi d'endomycorhizer les *vitroplants* d'ananas dès la sortie de la *vitro*culture (pendant le sevrage) selon la méthode de Ravolanirina *et al.* (1989).

L'utilisation de cette biotechnologie a permis d'endomycorhizer rapidement les *vitroplants* d'ananas et d'obtenir des gains de production de matière végétale pouvant aller jusqu'à 100%. Les meilleurs résultats de croissance chez les plantes endomycorhizées ont été obtenus en sol acide où est généralement cultivé l'ananas.

Dans ce sol, des effets très différents sur la production de biomasse ont été obtenus selon le champignon utilisé, *Glomus* sp. (LPA21) s'étant révélé comme le plus avantageux. Ces résultats soulignent la nécessité de sélectionner pour chaque culture donnée le champignon le plus performant afin d'optimiser sa croissance. Il est intéressant de noter que *Glomus* sp. (LPA21) a été isolé dans une palmeraie de Côte d'Ivoire (Blal, 1989). L'effet bénéfique de ce champignon sur le développement de l'ananas pourrait être du au fait qu'il est adapté aux écosystèmes favorables à la culture de l'ananas. Ainsi, l'efficacité de cette association pourrait provenir d'une compatibilité écologique.

L'analyse des contenus en éléments minéraux a montré que les plantes endomycorhizées présentent un enrichissement notamment en P, N, K, Ca et Mg.

Le P étant connu pour inhiber à forte dose l'effet des endomycorhizes et les besoins en P de l'ananas étant limités, nous avons évalué l'apport d'une fertilisation avec ou sans P sur l'effet endomycorhizien sur la croissance de l'ananas. C'est ainsi que nous avons montré que les ananas endomycorhizés dans un sol acide ne recevant pas de fertilisation phosphatée présentent le meilleur développement. Par contre, l'effet endomycorhizien sur la croissance est réduit chez les ananas recevant l'apport de P. Ces résultats mettent bien en

évidence que dans des sols pourvus en P au moment de la plantation, la présence d'endomycorhizes efficaces rend inutile voire néfaste l'apport de P et soulignent qu'il est indispensable de raisonner les apports d'engrais phosphaté en tenant compte de la présence des endomycorhizes, des besoins de la plante et du milieu de culture. Ces travaux confirment bien le rôle de biofertilisant que les endomycorhizes peuvent jouer (Gianinazzi *et al.*, 1990)

Le P étant capable d'influencer l'effet des endomycorhizes, nous avons voulu étudier son impact sur le fonctionnement de la symbiose en utilisant les colorations vitale et fonctionnelle. Celles-ci sont basées sur les révélations par coloration de deux activités enzymatiques, la succinate déshydrogénase (SDH) et une phosphatase alcaline fongique (Pase), permettant de visualiser respectivement les parties vivantes et fonctionnelles du champignon symbiotique. Nous avons ainsi observé qu'une fertilisation phosphatée (32 ppm de P apporté pendant la culture) dans un sol riche en P (35 ppm de P assimilable), qui se traduit par une réduction de l'effet endomycorhizien, s'accompagne d'une diminution des taux de champignon vivant et fonctionnel dans les racines de l'ananas. Par contre dans un sol pauvre en P (4 ppm de P assimilable), l'apport de la fertilisation phosphatée n'affecte que légèrement l'infection endomycorhizienne et n'a aucune conséquence sur l'effet de la symbiose sur la croissance des plantes. Une analyse plus fine a permis de montrer que les valeurs de la fréquence arbusculaire (A%) estimées après colorations vitales et fonctionnelles sont, contrairement à celles plus élevées obtenues après coloration au bleu de trypan, corrélées avec la croissance aérienne des ananas endomycorhizés. Les colorations vitales et fonctionnelles s'avèrent donc des moyens d'analyse plus appropriés pour observer *in situ* l'efficacité de la symbiose et la relier au développement des plantes comme proposé récemment par Tisserant *et al.* (1993).

Afin de mieux comprendre l'influence des endomycorhizes sur la croissance aérienne des ananas, nous avons analysé si le contenu en pigments photosynthétiques des plantes serait influencé par l'endomycorhization. La symbiose endomycorhizienne augmente la quantité de ces pigments dans les feuilles d'ananas et cette amélioration pourrait être la conséquence d'une meilleure nutrition en P, car on sait que cet élément joue un rôle important dans la photosynthèse (Foyer et Spencer, 1986).

Un autre effet important de la formation des endomycorhizes, que nous avons mis en évidence sur le développement de l'ananas, est son influence sur la répartition de la biomasse aérienne et racinaire des ananas. En effet, les plantes inoculées développent, proportionnellement à la partie aérienne, un plus petit système racinaire cependant plus efficace car il permet une meilleure utilisation des éléments minéraux du sol. Cet effet sur le développement des ananas est d'autant plus important que l'effet endomycorhizien sur leur croissance aérienne est élevé. Cet avantage conféré par l'endomycorhization serait dû au fait d'une part que les champignons endomycorhizogènes augmentent la ramification du système racinaire des plantes (Berta *et al.*, 1990 ; Schellenbaum *et al.*, 1991) et d'autre part que les

hyphes externes du champignon se développent dans la rhizosphère créant ainsi une grande surface de contact entre la plante et le sol (Gianinazzi-Pearson et Gianinazzi, 1981). Ces modifications de développement du système racinaire traduisent vraisemblablement des changements hormonaux liés à la mise en place de la symbiose. En effet, Allen *et al.* (1982) ont montré chez *Bouteloua gracilis* que la répartition d'hormones dans les tissus de plantes endomycorhizées est modifiée et Barea et Azcon-Aguilar (1982) ont démontré que les champignons peuvent synthétiser des phytohormones (acide gibbérellique et cytokinine). Ce rôle **biorégulateur**, que les endomycorhizes exercent sur le développement de l'ananas, pourrait aussi expliquer dans certaines conditions l'effet positif de la symbiose sur la plus grande tolérance des plantes aux stress.

En effet, nous avons montré que l'endomycorhization rend plus tolérant les *vitroplants* d'ananas à des stress abiotiques (forte teneur en NaCl) et biotiques (inoculation d'un nématode (*Pratylenchus brachyurus*) et d'un champignon pathogène (*Phytophthora cinnamomi*)). Cette résistance accrue des ananas endomycorhizés pourrait aussi s'expliquer par l'augmentation des teneurs en composés phénoliques racinaires car ceux-ci sont connus pour être impliqués dans les mécanismes de résistance des plantes (Dehne et Schönbeck, 1979). La population de *P. brachyurus* est d'autant plus faible dans les racines des ananas endomycorhizés que le niveau en composés phénoliques est élevé. Ces résultats mettraient en évidence un possible effet inhibiteur de ces composés sur le développement de *P. brachyurus*.

Un autre explication de la résistance accrue des ananas endomycorhizés serait l'augmentation de leur nutrition en P. En effet, l'amélioration de l'absorption en P diminuerait la perméabilité membranaire des racines ce qui modifierait la composition des exsudats racinaires (Ratnayake *et al.*, 1978). Ces changements influenceraient négativement le développement de champignons pathogènes du sol (Meyer et Linderman, 1986) et l'attraction par les racines des nématodes (MacGuidwin *et al.*, 1985). La symbiose créerait, dans les racines des plantes, un environnement défavorable aux nématodes et aux champignons pathogènes en modifiant le contenu en sucre et en favorisant la synthèse de certains acides aminés (sérine et la phénylalanine : propriétés nématicides) (Suresh et Bagyaraj, 1984 ; Suresh *et al.*, 1985 ; Paulitz et Linderman, 1991).

Les champignons endomycorhizogènes peuvent donc être considérés comme des agents de **bioprotection** au champ vis à vis de micro-organismes telluriques pathogènes (champignons ou des nématodes phytophages). Cette action serait surtout intéressante au champ, cependant elle nécessite la mise en oeuvre de travaux à cette échelle afin de confirmer les résultats observés avant le transfert au champ. Si l'effet de bioprotection est maintenu au champ, l'utilisation des endomycorhizes pourrait donc être envisagée comme un moyen de lutte biologique pour la production de l'ananas. D'autres micro-organismes appelés antagonistes (bactéries, champignons) (Gees et Coffey, 1989 ; Sikora, 1992 ; Stirling *et al.*, 1992) et déjà utilisés dans le cadre de la lutte biologique pour d'autres cultures pourraient être

associés aux champignons endomycorhizogènes pour améliorer la protection des ananas par des moyens non chimiques. En effet, la population de micro-organismes antagonistes augmenterait en présence de champignons endomycorhizogènes (Secilia et Bagyaraj, 1987) et Calvet *et al.* (1993) ont montré que leurs effets peuvent être synergiques. Chez l'ananas, d'autres méthodes non chimiques sont déjà utilisées pour lutter contre les nématodes, c'est le cas de la jachère (Py *et al.*, 1984). Cependant cette technique culturale induit des réductions du potentiel endomycorhizogène et du niveau de fertilité des sols (Sarah, 1987 ; Thompson, 1987). L'utilisation de *vitroplants* préalablement endomycorhizés avec une souche performante rendrait l'inoculation symbiotique d'autant plus intéressante.

Afin de renforcer la protection biologique due en particulier à la formation des endomycorhizes, nous avons cherché à savoir si l'utilisation de cette symbiose était compatible avec celle de pesticides. Parmi les quatre fongicides testés (phoséthyl-Al, captane, manèbe et étridiazol), les trois premiers se sont montrés compatibles avec l'endomycorhization de l'ananas comme l'ont déjà montré Jabaji-Hare et Kendrick (1985) et Morandi (1989) chez d'autres plantes pour le phoséthyl-Al. En effet, le phoséthyl-Al, le captane et le manèbe appliqués dès la sortie de la *vitro*culture à la dose recommandée pour contrôler les champignons pathogènes telluriques n'affectent pas l'effet bénéfique de la symbiose endomycorhizienne alors que l'étridiazol le réduit.

Nous nous sommes aussi intéressé aux interactions endomycorhizes/nématicides (phénamiphos et éthoprophos). L'utilisation de ces pesticides, au moment du repiquage, à la dose préconisée pour lutter contre les nématodes au champ a tué tous les *vitroplants* endomycorhizés ou non. Par contre, leur application à des doses réduites et compatible avec l'endomycorhization ne réduit pas l'effet des endomycorhizes.

L'utilisation associée de champignons endomycorhizogènes et de pesticides apparaît d'autant plus intéressante que toutes les expériences ont montré que l'application des pesticides réduit la croissance des *vitroplants* non endomycorhizés d'ananas. La présence des endomycorhizes, non seulement, rend les ananas plus résistants aux pathogènes et permet une utilisation optimale des pesticides. L'intérêt d'associer les endomycorhizes et les pesticides dans un schéma de lutte intégrée présente aussi l'avantage de réduire les problèmes de pollution en diminuant les apports de pesticides et donc leurs rémanences dans le sol. Par exemple, la persistance de phénamiphos dans un sol permet la production d'un dérivé toxique par oxydation (Schneider *et al.*, 1990).

Ces résultats mettent en évidence que l'endomycorhization contrôlée des ananas micropropagés représente un outil biotechnologique très intéressant afin d'assurer un gain de production. Nous avons montré chez l'ananas les multiples avantages que représentent l'inoculation des endomycorhizes pour la production de *vitroplants*, complétant ainsi les

travaux effectués sur d'autres microplants (Morandi *et al.*, 1979 ; Granger *et al.*, 1983 ; Kiernan *et al.*, 1984 ; Gianinazzi *et al.*, 1990).

Des expériences de plus longue durée sont nécessaires pour vérifier si les effets bénéfiques des endomycorhizes sur la croissance de l'ananas se répercuteront au champ et aussi sont indispensables afin de confirmer l'intérêt de l'inoculation endomycorhizienne afin de voir si les champignons endomycorhizogènes introduits pendant le sevrage continuent à être bénéfiques au champ en présence d'une microflore tellurique indigène.

L'intérêt de cette biotechnologie qu'est l'endomycorhization passe par la production d'inoculum de bonne qualité et aisément applicable. Actuellement, différents inocula commerciaux sont produits sous forme de substrat inerte. L'application de deux de ces inocula à la production d'ananas micropropagés par mélange au substrat de sevrage a montré que leur utilisation est techniquement possible à des doses faibles de l'ordre de 1%. Il est intéressant de remarquer que la souche et la forme d'inoculum (*Glomus* sp. (LPA21) sous forme de fragments d'endomycorhizes), que nous avons utilisées dans l'ensemble des expériences précédentes, permettent de réduire à environ 2‰ la quantité d'inoculum nécessaire et sont donc susceptibles de rendre cette biotechnologie encore plus intéressante lorsqu'elle est couplée à la micropropagation.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott L.K. et Robson A.D., 1978. Growth of subterranean clover in relation to formation of endomycorrhizas by introduced and indigenous fungi in a field soil. *New Phytologist*, 81, 575-585.
- Abbott L.K. et Robson A.D., 1985. Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 99, 245-255.
- Abbott L.K., Robson A.D. et Gazey C., 1992. Selection of inoculant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Dans : *Methods in Microbiology*. Volume 24, Techniques for the Study of Mycorrhiza (Norris J.R., Read D.J. et Varma A.K., eds), Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 1-21.
- Allen M.F., Moore T.S. et Christensen M., 1982. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Canadian Journal of Botany*, 60, 468-471.
- Ames R.N., Reid C.P.P., Porter L.K. et Cambardella C., 1983. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two ¹⁵N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 95, 381-396.
- Amijee F., Tinker P.B. et Stribley D.P., 1989. The development of endomycorrhizal root systems. VII. A detailed study of effects of soil phosphorus on colonization. *New Phytologist*, 111, 435-446.
- Anderson E.J., 1951. The *Phytophthora cinnamomi* problem in pineapple fields of Hawaii. *Phytopathology*, 41, 187-188.
- Anonyme, 1987. Amélioration génétique de l'ananas. *Fruits*, 42, 636-646.
- Antunes V. et Cardoso E.J.B.N., 1991. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. *Plant and Soil*, 131, 11-19.
- Asimi S., Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S., 1980. Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium* in soybeans. *Canadian Journal of Botany*, 58, 2200-2205.
- Atse Y., 1990. Conformité des plants d'ananas issus de culture *in vitro*. Réunion Annuelle IRFA, document interne, n°40, 26 pages.
- Ayala A., 1967. Pangola grass as rotation crop for pineapple nematode control. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*, 51, 94-96.
- Aziz T., Yuen J.E. et Habte M., 1990. Response of pineapple to mycorrhizal inoculation and fosetyl-Al treatment. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 21, 2309-2317.
- Backman P.A. et Clark E.M., 1977. Effect of carbofuran and other pesticides on vesicular-arbuscular mycorrhizae in peanuts. *Nematropica*, 7, 13-16.

- Bagyaraj D.J., 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. Dans : VA Mycorrhiza (Powell C.L. et Bagyaraj D.J., eds), C.R.C. Press Inc., Boca Raton, Florida, 131-153.
- Bagyaraj D.J., Manjunath A. et Reddy D.D.R., 1979. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi with root-knot nematodes in tomato. *Plant and Soil*, 51, 397-403.
- Bärtschi H., Gianinazzi-Pearson V. et Vegh I., 1981. Vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and root rot disease (*Phytophthora cinnamomi*) development in *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 102, 213-218.
- Bailey J.A., 1982. Mechanisms of phytoalexin accumulation. Dans : Phytoalexins (Bailey J.A. et Mansfield J.W., eds), Blackie, Glasgow and London, 289-318.
- Bailey J.E. et Safir G.R., 1978. Effect of benomyl on soybean endomycorrhizae. *Phytopathology*, 68, 1810-1812.
- Barea J.M. et Azcon-Aguilar C., 1982. Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 810-813.
- Berta G., Fusconi A. Trotta A. et Scannerini S., 1990. Morphogenetic modifications induced by mycorrhizal fungus *Glomus* strain E3 in the root system of *Allium porrum* L.. *New Phytologist*, 114, 207-215.
- Bird G.W., Rich J.R. et Glover S.U., 1974. Increased endomycorrhizae of cotton roots in soil treated with nematicides. *Phytopathology*, 64, 48-51.
- Blal B., 1989. Les endomycorhizes VA chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) : Rôle dans la régulation de la croissance et dans la nutrition des jeunes plants de clones micropropagés. Thèse d'Université, Université de Bourgogne, Dijon, 98 pages.
- Blal B., Gianinazzi-Pearson V., Renard J.L. et Gianinazzi S., 1987. Recherches sur le rôle des endomycorhizes dans la croissance du palmier à huile. 112° Congrès National des Sociétés Savantes, II, 103-111.
- Bowers F.A.I., 1929. The root system of pineapple plants. Experiment Station P.P.C.A., University of Hawaii, n° 13.
- Braunberger P.G., Miller M.H. et Peterson R.L., 1991. Effect of phosphorus nutrition on morphological characteristics of vesicular-arbuscular colonization of maize. *New Phytologist*, 119, 107-113.
- Calvet C., Pera J. et Barea J.M., 1993. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil*, 148, 1-6.
- Carracedo A.E., Alvarez C.E., Garcia V. et Garcia C., 1987. Influencia del pH del suelo el desarrollo y produccion de la pina tropical en Canarias. I.- Fertilidad del suelo y nutricion mineral. *Anales de Edafologia y Agrobiologia*, 46, 91-104.

- Chauvel B., 1991. Polymorphisme génétique et sélection de la résistance aux urées substituées chez *Alopecurus myosuroides* Huds. Thèse d'Université, Paris-Sud, centre d'Orsay, 160 pages.
- Chavez M.C.G. et Ferreta-Cerrato R., 1990. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on tissue culture-derived plantlets of strawberry. *HortScience*, 25, 903-905.
- Chou L.G. et Schmitthenner A.F., 1974. Effect of *Rhizobium japonicum* and *Endogone mosseae* on soybean root rot caused by *Pythium ultimum* and *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Disease Reporter*, 58, 221-225.
- Cooper K.M. et Tinker P.B., 1978. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytologist*, 81, 43-52.
- Cote F., Domergue R., Folliot M., Bouffin J. et Marie F., 1991. Micropropagation *in vitro* de l'ananas. *Fruits*, 46, 359-366.
- Davis R.M. et Menge J.A., 1980. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus. *Phytopathology*, 70, 447-452.
- Davis R.M. et Menge J.A., 1981. *Phytophthora parasitica* inoculation and intensity of vesicular-arbuscular mycorrhizae in citrus. *New Phytologist*, 87, 705-715.
- de Bertoldi M., Giovannetti M., Griselli M. et Rambelli A., 1977. Effects of soil applications of benomyl and captan on the growth of onions and the occurrence of endophytic mycorrhizas and rhizosphere microbes. *Annals of applied Biology*, 86, 111-115.
- de Wald M.G., Moore G.A., Sherman W.B. et Evans M.H., 1988. Production of pineapple plants *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 7, 535-537.
- Dehne H.W. et Schönbeck F., 1979. The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. II. Phenol metabolism and lignification. *Phytopathologische Zeitschrift*, 95, 210-216.
- Despatie S., Furlan V. et Fortin J.A., 1989. Effects of successive applications of fosetyl-Al on growth of *Allium cepa* L. associated with endomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 113, 175-180.
- Diederichs C. et Moawad A.M., 1993. The potential of VA mycorrhizae for plant nutrition in the tropics. *Angewandte Botanik*, 67, 91-96.
- Dixon R.K., Garg V.K. et Rao M.V., 1993. Inoculation of *Leucaena* and *Prosopis* seedlings with *Glomus* and *Rhizobium* species in saline soil: rhizosphere relations and seedling growth. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 7, 133-144.
- Duke E.R., Johnson C.R. et Koch K.E., 1986. Accumulation of phosphorus, dry matter and betaine during NaCl stress of split-root citrus seedlings colonized with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on zero, one or two halves. *New Phytologist*, 104, 583-590.
- Estaun M.V., 1989. Effect of sodium chloride and mannitol on germination and hyphal growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 29, 123-129.

- Folin O. et Ciocalteu V., 1927. Tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biochemical Chemistry*, 76, 627-650.
- Folliot M. et Marchal J., 1990. Influence du support de culture sur la vitesse de croissance des *vitroplants* d'ananas en phase d'acclimatation. *Fruits*, 45, 367-376.
- Folliot M. et Marchal J., 1991. Croissance des plants d'ananas issus de culture *in vitro*, pendant la phase d'acclimatation. *Fruits*, 46, 343-349.
- Foyer C. et Spencer C., 1986. The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves. *Planta*, 167, 369-375.
- Friend J.C. et Lydon J., 1978. Effect of daylength on flowering, growth and CAM of pineapple (*A. comosus* (L.)). *Botanical Gazette*, 140, 280-283.
- Gees R. et Coffey M.D., 1989. Evaluation of a strain of *Myrothecium roridum* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 79, 1079-1084.
- Germani G., Diem H.G. et Dommergues Y.R., 1980. Influence of 1,2 dibromo-3-chloropropane fumigation on nematode population, mycorrhizal infection, N₂ fixation and yield of field-grown groundnut. *Revue Nématologique*, 3, 75-79.
- Gianinazzi S. et Gianinazzi-Pearson V., 1986. Connaissances actuelles des bases physiologiques et biochimiques des effets des endomycorhizes sur le comportement des plantes. *Physiologie végétale*, 24, 253-262.
- Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. et Trouvelot A., 1982. Les Mycorhizes, Partie Intégrante de la Plante : Biologie et Perspective d'Utilisation. INRA-Presses, Paris, France. 397 pages.
- Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V., Tisserant B. et Lemoine M.C., 1992. Protein activities as potential markers of functional endomycorrhizas *in planta*. Dans : *Mycorrhizas in Ecosystems* (Read D.J., Lewis D.H., Fitter A.H. et Alexander I.J., eds), C.A.B International Inc., Oxon, GB, 333-339.
- Gianinazzi S., Trouvelot A. et Gianinazzi-Pearson V., 1989. Valorisation par les endomycorhizes en agriculture : une réflexion nécessaire pour l'arboriculture fruitière et d'ornement. C.R. 8^o Colloque sur les recherches fruitières, INRA-CTIFL, Bordeaux, France, 119-130.
- Gianinazzi S., Trouvelot A. et Gianinazzi-Pearson V., 1990. Role and use of mycorrhizas in horticultural crop production. Dans : 23 I.H.C. Plenary Lectures, International Society for Horticultural Science, Firenze, Italie, 25-30.
- Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S., 1978. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiological Plant Pathology*, 12, 45-53.
- Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S., 1981. Role of endomycorrhizal fungi in phosphorus cycling in the ecosystem. Dans : *The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem* (Wicklow D.T. et Carroll G.C., eds), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 637-652.

- Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S., 1983. The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. *Plant and Soil*, 71, 197-209.
- Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S., 1986. The physiology of improved phosphate nutrition in mycorrhizal plants. Dans : *Physiological and Genetic Aspects of Mycorrhizae* (Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S., eds), INRA Press, Paris, France, 101-111.
- Godefroy J., Lacoëuilhe J.J. et Marchal J., 1976. Effets du chaulage sur la culture de l'ananas (var. Cayenne lisse) dans un sol ferrallitique fortement désaturé. *Fruits*, 31, 603-615.
- Godfrey G.H. et Hoshino H., 1934. The trap crop as a mean of reducing root-knot nematode infection. *Phytopathology*, 24, 635-647.
- Graham J.H. et Menge J.A., 1982. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on take-all disease of wheat. *Phytopathology*, 72, 95-98.
- Graham J.H., Linderman R.G. et Menge J.A., 1982. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to colonization and growth of troyer citrange. *New Phytologist*, 91, 183-189.
- Grandmaison J., Olah G.M., van Calsteren M.R. et Furlan V., 1993. Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza*, 3, 155-164.
- Granger R.L., Plenchette C. et Fortin I.A., 1983. Effect of a vesicular arbuscular (VA) endomycorrhizal fungus (*Glomus epigaeum*) on the growth and leaf mineral content of two apple clones propagated *in vitro*. *Canadian Journal of Plant Science*, 63, 551-555.
- Guérout R., 1975. Nematodes of pineapple : a review. *Pest Articles & News Summaries*, 21, 123-140.
- Gueye M., Diem H.G. et Dommergues Y.R., 1987. Variation in N₂ fixation, N and P contents of mycorrhizal *Vigna unguiculata* in relation to the progressive development of extra-radical hyphae of *Glomus mosseae*. *MIRCEN Journal*, 3, 75-86.
- Guinchard, 1991. L'ananas : production et exportation en quelques chiffres. *Fruits*, 46, 321-322.
- Haas J.H. et Krikun J., 1985. Efficacy of endomycorrhizal fungus isolates and inoculum quantities required for growth response. *New Phytologist*, 100, 613-621.
- Habte M. et Manjunath A., 1988. Influence of phenamiphos on the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Leucaena leucocephala*. *Biology and Fertility of Soils*, 5, 313-316.
- Habte M. et Fox R.L., 1993. Effectiveness of VAM fungi in nonsterile soils before and after optimization of P in soil solution. *Plant and Soil*, 151, 219-226.
- Harley J.L. et Smith S.E., 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press Inc., London, New York. 483 pages.
- Hartmond U., Schaesberg N.V., Graham J.H. et Syvertsen J.P., 1987. Salinity and flooding stress effects on mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus rootstock seedlings. *Plant and Soil*, 104, 37-43.

- Hirrel M.C., 1981. The effect of sodium chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. *Mycologia*, 73, 610-617.
- Hirrel M.C. et Gerdemann J.W., 1980. Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science Society of American Journal*, 44, 654-655.
- Hugon R., 1990. Sensibilité à *Pratylenchus brachyurus* des différentes variétés d'ananas en Côte d'Ivoire. Réunion Annuelle IRFA, document interne, n° 18, 3 pages.
- Hussey R.S. et Roncadori R.W., 1978. Interaction of *Pratylenchus brachyurus* and *Gigaspora margarita* on cotton. *Journal of Nematology*, 10, 16-20.
- Hussey R.S. et Roncadori R.W., 1982. Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant Disease*, 66, 9-14.
- Ingham R.E., 1988. Interactions between nematodes and vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 24, 169-182.
- Jabaji-Hare S.H. et Kendrick W.B., 1985. Effects of fosetyl-Al on root exudation and on composition of extracts of mycorrhizal and nonmycorrhizal leek roots. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7, 118-126.
- Jabaji-Hare S.H. et Kendrick W.B., 1987. Response of an endomycorrhizal fungus in *Allium porrum* L. to different concentrations of the systemic fungicides, metalaxyl (Ridomil) and fosetyl-Al (Aliette). *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 95-99.
- Jaizme Vega M.C. et Azcon R., 1991. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) in the Canary Islands. *Fruits*, 46, 47-50.
- Jakobsen I., Abbott L.K. et Robson A.D., 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. : 2. Hyphal transport of ³²P over defined distances. *New Phytologist*, 120, 509-516.
- Jalali B.L. et Domsch K.H., 1975. Effect of systemic fungitoxant on the development of endotrophic mycorrhiza. Dans : *Endomycorrhizas* (Sanders F.E., Mosse B. et Tinker P.B., eds), Academic Press, London, New York, San Francisco, 619-626.
- Keetch D.P., 1979. Pineapple nematode control with fumigant nematicides. *Pineapple Series H 19. Farming in South Africa*.
- Kellam M.K. et Schenck N.C., 1980. Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and root-knot nematode on soybean. *Phytopathology*, 70, 293-296.
- Khan A.G., 1974. The occurrence of mycorrhizas in halophytes, hydrophytes and xerophytes, and of *Endogone* spores in adjacent soils. *Journal of General Microbiology*, 81, 7-14.
- Kiernan J.M., Hendrix J.W., Stoltz L.P. et Maronek D.M., 1984. Characterisation of strawberry plants produced by tissue culture and infected with specific mycorrhizal fungi. *HortScience*, 19, 883-885.
- Koide R.T., 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytologist*, 117, 365-386.

- Koslowsky S.D. et Boerner R.E., 1989. Interactive effects of aluminum, phosphorus and mycorrhizae on growth and nutrient uptake of *Panicum virgatum* L. (Poaceae). *Environment Pollution*, 61, 170-125.
- Kothari S.K., Marschner H. et Römheld V., 1991. Contribution of the VA mycorrhizal hyphae in acquisition of phosphorus and zinc by maize grown in a calcareous soil. *Plant and Soil*, 131, 177-185.
- Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S., 1987. Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide applications. *New Phytologist*, 106, 707-715.
- Krishna K.R. et Bagyaraj D.J., 1984a. Growth and nutrient uptake of peanut inoculated with the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* compared with non-inoculated ones. *Plant and Soil*, 77, 405-408.
- Krishna K.R. et Bagyaraj D.J., 1984b. Phenols in mycorrhizal roots of *Arachis hypogea*. *Experimenta*, 40, 85-86.
- Lacoeuilhe J.J., 1978. La fumure N-K de l'ananas en Côte d'Ivoire. *Fruits*, 33, 341-348.
- Lacoeuilhe J.J. et Guérout R., 1976. Action du nématode *Pratylenchus brachyurus* sur la croissance, la nutrition et les rendements de l'ananas 'Cayenne lisse'. Influence de la localisation de la fumure. *Fruits*, 31, 147-156.
- Lambert D.H., 1982. Response of sweetgum to mycorrhizae, phosphorus, copper, zinc and sewage sludge. *Canadian Journal of Forestry Research*, 12, 1024-1027.
- Lambert D.H., Cole H. et Baker D.E., 1980. Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytologist*, 85, 513-520.
- Leroux P., 1981. Les modes d'action des substances antifongiques à usage agricoles. *La Défense des Végétaux*, 207, 59-83.
- Loison-Cabot C., 1991. De 1978 à 1990 : douze années de recherche sur l'amélioration génétique de l'ananas. *Fruits*, 46, 367-371.
- MacGuidwin A.E., Bird G.W. et Safir G.R., 1985. Influence of *Glomus fasciculatum* on *Meloidogyne hapla* infecting *Allium cepa*. *Journal of Nematology*, 17, 389-395.
- Mapes M.O., 1973. Tissue culture of bromeliads. *The International Plant Propagators Society*, 23, 47-55.
- Marchal J., 1971. Le phosphore chez l'ananas. *Fruits*, 26, 189-206.
- Martin-Prevel P., 1959. Carence en potasse sur ananas en Guinée. *Fruits*, 14, 285-289.
- Martin-Prevel P., 1970. Note de synthèse sur les essais fertilisation réalisés en Côte d'Ivoire. Document interne IRFA.
- Marzola D.L. et Bartholomew D.P., 1979. Photosynthetic pathway and biomass energy production. *Science*, 205, 555-559.
- Marley P.S. et Hillock R.J., 1994. Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathology*, 43, 172-176.

- Mathews V.H., Rangan T.H. et Narayanaswami S., 1976. Micropropagation of *Ananas sativus in vitro*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 79, 450-455.
- Mehrlich F.P., 1936. Pathogenicity and variation in *Phytophthora* species causing heart rot of pineapple plants. Phytopathology, 26, 23-43.
- Menge J.A., 1983. Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. Canadian Journal of Botany, 61, 1015-1024.
- Menge J.A., Johnson E.L.V. et Minassian V., 1979. Effect of heat treatment and three pesticides upon the growth and reproduction of the mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatus*. New Phytologist, 82, 473-480.
- Menge J.A., Johnson E.L.V. et Platt R.G., 1978. Mycorrhizal dependency of several *Citrus* cultivars under three nutrient regimes. New Phytologist, 81, 553-559.
- Mesnildrey L., 1990. Contribution à la mise au point d'un test précoce de sensibilité de l'ananas au nématode *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey). DAA, ENSAM, 53 pages.
- Metzner H., Rau H. et Senger H., 1965. Untersuchungen zur synchronisierbarkeit einzelner pigment. Mangol Mutanten, Vol. Chlorella Planta, 65, 186.
- Meyer J.R. et Linderman R.G., 1986. Selective influence on population of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. Soil Biology and Biochemistry, 18, 191-196.
- Morandi D., 1989. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. Plant Physiology and Biochemistry, 27, 697-701.
- Morandi D., Gianinazzi S. et Gianinazzi-Pearson V., 1979. Intérêt de l'endomycorhization dans la reprise et la croissance du framboisier issu de multiplication végétative *in vitro*. Annales d'Amélioration des Plantes, 29, 623-630.
- Morton J.B. et Benny G.L., 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. Mycotaxon, 37, 471-491.
- Mosse B., 1957. Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. Nature, 179, 922.
- Mosse B., 1981. Vesicular-arbuscular Mycorrhiza Research for Tropical Agriculture. Research Bulletin 194. University of Hawaii, 82 pages.
- Mourichon X., 1981. Mise en évidence d'une association endomycorhizogène chez l'ananas en Côte d'Ivoire. Fruits, 36, 745-749.
- Mourichon X., 1986. Dynamique saisonnière de l'association endomycorhizogène de l'ananas. Réunion Annuelle IRFA, document interne, n° 9, 3 pages.
- Nemec S., 1980. Effects of 11 fungicides on endomycorrhizal development in sour orange. Canadian Journal of Botany, 58, 522-526.
- Nemec S., 1985. Influence of selected pesticides on *Glomus* species and their infection in citrus. Plant and Soil, 84, 133-137.

- Nemec S. et Vu J.C.V., 1990. Effects of soil phosphorus and *Glomus intraradices* on growth, nonstructural carbohydrates, and photosynthetic activity of *Citrus aurantium*. *Plant and Soil*, 128, 257-263.
- Nesheim O.N. et Linn M.B., 1969. Deleterious effect of certain fungitoxicants on the formation of mycorrhizae on corn by *Endogone fasciculata* and corn root development. *Phytopathology*, 59, 297-300.
- Niemi M. et Vestberg M., 1992. Inoculation of commercially grown strawberry with VA mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 144, 133-142.
- O'Bannon J.H. et Nemec S., 1979. The response of *Citrus limon* to a symbiot, *Glomus etunicatus*, and a pathogen, *Radopholus similis*. *Journal of Nematology*, 11, 270-275.
- Ojala J.C., Jarrell W.M., Menge J.A. et Johnson E.L.V., 1983. Influence of mycorrhizal fungi on the mineral nutrition and yield of onion in saline soil. *Agronomy Journal*, 75, 255-259.
- Pacovsky R.S., 1986. Micronutrient uptake and distribution in mycorrhizal or phosphorus-fertilized soybeans. *Plant and Soil*, 95, 379-388.
- Pannetier C. et Lanaud C., 1976. Divers aspects de l'utilisation possible des cultures *in vitro* pour la multiplication végétative de l'*Ananas comosus*. *Fruits*, 31, 739-750.
- Paulitz T.C. et Linderman R.G., 1991. Mycorrhizal interactions with soil organisms. Dans : *Handbook of applied mycology* (Arora D.K., Rai B., Mukerji K.G. et Knudsen G.R., eds), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 77-129.
- Pearson J.N. et Jakobsen I., 1993. The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labelling with ³²P and ³³P. *New Phytologist*, 124, 489-494.
- Pearson V. et Tinker P.B., 1975. Measurement of phosphorus fluxes in the external hyphae of endomycorrhizas. Dans : *Endomycorrhizas* (Sanders F.E., Mosse B. et Tinker P.B., eds), Academic Press, London, New-York, 277-287.
- Pfeiffer C.M. et Bloss H.E., 1988. Growth and nutrition of guayule (*Parthenium argentatum*) in a saline soil as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilization. *New Phytologist*, 108, 315-321.
- Philipps J.M. et Hayman D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 158-161.
- Pinochet J., Camprubi A. et Calvet C., 1993. Effects of the root-lesion *Pratylenchus vulnus* and the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the growth of EMLA-26 apple rootstock. *Mycorrhiza*, 4, 79-83.
- Pond E.C., Menge J.A. et Jarrell W.M., 1984. Improved growth of tomato in salinized soil by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi collected from saline soils. *Mycologia*, 76, 74-84.
- Pons F. et Gianinazzi-Pearson V., 1984. Influence du phosphore, du potassium, de l'azote et du pH sur le comportement *in vitro* de champignons endomycorhizogènes à vésicules et arbuscules. *Cryptogamie, Mycologie*, 5, 87-100.

- Powell C.L., 1975. Potassium uptake by endotrophic mycorrhizas. Dans : Endomycorrhizas (Sanders F.E., Mosse B. et Tinker P.B., eds), Academic Press Inc., London, New-York, 461-467.
- Powell C.L., 1982. Selection of efficient VA mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 68, 3-9.
- Py C., Lacoëuilhe J.J. et Teisson C., 1984. L'ananas : sa culture, ses produits. Techniques agricoles et productions tropicales. G.-P. Maisonneuve & Larose, Paris (V°). 562 pages.
- Ratnayake M., Leonard R.T. et Menge J.A., 1978. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytologist*, 81, 543-552.
- Ravolanirina F., Blal B., Gianinazzi S. et Gianinazzi-Pearson V., 1989. Mise au point d'une méthode rapide d'endomycorhization de *vitro*plants. *Fruits*, 44, 165-170.
- Rhodes L.H. et Gerdemann J.W., 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non mycorrhizal systems. *New Phytologist*, 75, 555-561.
- Rochbach K.G. et Schenck S., 1985. Control of pineapple heart rot, caused by *Phytophthora parasitica* and *P. cinnamomi*, with metalaxyl, fosetyl-Al, and phosphorus acid. *Plant Disease*, 69, 320-323.
- Rosendahl C.N. et Rosendahl S., 1991. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) on the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 31, 313-318.
- Rozema J., Arp W., van Diggelen J., van Esbroek M., Broekman R. et Punte H., 1986. Occurrence and ecological significance of vesicular-arbuscular mycorrhiza in the salt marsh environment. *Acta Botanica Neerlandica*, 35, 457-467.
- Ruey-Shyang H., Smith W.K. et Yost R.S., 1985. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth, water relation, and leaf orientation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *New Phytologist*, 99, 229-243.
- Saito M., Stribley D.P. et Hepper C.M., 1993. Succinate dehydrogenase activity of external and internal hyphae of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann and Trappe, during mycorrhizal colonization of roots of leek (*Allium porrum* L.), as revealed by *in situ* histochemical staining. *Mycorrhiza*, 4, 59-62.
- Saleh H. et Sikora R.A., 1984. Relationship between *Glomus fasciculatum* root colonization of cotton and its effect on *Meloidogyne incognita*. *Nematologica*, 30, 230-237.
- Sanders F.E., 1975. The effect of foliar-applied phosphate on the mycorrhizal infections of onion roots. Dans : Endomycorrhizas (Sanders F.E., Mosse B. et Tinker P.B., eds), Academic Press, London, 261-276.
- Sarah J.L., 1980. Utilisation de nématicides endothérapeutiques dans la lutte contre *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) en culture d'ananas. I. Activité préventive et curative sur les infestations racinaires par applications foliaires. *Fruits*, 35, 745-757.
- Sarah J.L., 1987. Utilisation d'une jachère travaillée pour lutter contre les nématodes parasites de l'ananas. *Fruits*, 42, 357-360.

- Schellenbaum L., Berta G., Ravolanirina F., Tisserant B., Gianinazzi S. et Fitter A.H., 1991. Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). *Annals of Botany*, 68, 135-141.
- Schenck N.C., 1981. Can mycorrhizae control root disease? *Plant Disease*, 65, 230-234.
- Schneider R.C., Green R.E., Apt W.J., Bartholomew D.P. et Caswell, E.P., 1990. Field movement and persistence of fenamiphos in drip-irrigated pineapple soils. *Pesticide Science*, 30, 243-257.
- Schneider R.C., Zhang J., Anders M.M., Bartholomew D.P. et Caswell-Chen E.P., 1992. Nematicide efficacy, root growth and fruit yield in drip-irrigated pineapple parasitized by *Rotylechulus reniformis*. *Journal of Nematology*, 24, 540-547.
- Schwab S.M., Menge J.A. et Leonard R.T., 1983a. Comparison of stages of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in sudangrass grown at two levels of phosphorus nutrition. *American Journal of Botany*, 70, 1225-1232.
- Schwab S.M., Menge J.A. et Leonard R.T., 1983b. Quantitative and qualitative effects of phosphorus on extracts and exudates of sudgrass roots in relation to vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiology*, 73, 761-765.
- Secilia J. et Bagyaraj D.J., 1987. Bacterial and actinomycetes with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 1069-1073.
- Sharma A.K., Srivastava P.C., Johri B.N. et Rathore V.S., 1992. Kinetics of zinc uptake by mycorrhizal (VAM) and non-mycorrhizal corn (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, 13, 206-210.
- Sideris C.P., 1955. Effects of sea water sprays on pineapple plants. *Phytopathology*, 45, 590-594.
- Sieverding E., 1991. *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems*. GTZ, Roosdorf, Germany. 371 pages.
- Sikora R.A., 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 245-270.
- Sita G.L., Singh R. et Iyer C.P.A., 1974. Plantlets through shoot-tips cultures in pineapple. *Currents Science*, 43, 724-725.
- Smith G.S., 1987. Interactions of nematodes with mycorrhizal fungi. Dans : *Vistas on Nematology* (Veech J.A. et Dickson D.W., eds), Society of Nematologists, Hyattsville, MD, 292-300.
- Smith G.S. et Kaplan D.T., 1988. Influence of mycorrhizal fungus, phosphorus, and burrowing nematode interactions on growth of rough lemon citrus seedlings. *Journal of Nematology*, 20, 539-544.
- Smith S.E. et Dickson S., 1991. Quantification of active vesicular-arbuscular mycorrhizal infection using image analysis and other techniques. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18, 637-648.

- Smith S.E. et Gianinazzi-Pearson V., 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 221-244.
- Smith S.E. et Gianinazzi-Pearson V., 1990. Phosphate uptake and vesicular-arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. : effect of photon irradiance and phosphate nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology*, 17, 177-188.
- Smith S.E., St John B., Smith F.A. et Nicholas J.D., 1985. Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: Effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytologist*, 99, 221-227.
- Spokes J.R., MacDonald R.M. et Hayman D.S., 1981. Effects of plant protection chemicals on vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Pesticide Science*, 12, 346-350.
- Stirling A.M., Hayward A.C. et Pegg K.G., 1992. Evaluation of the biological control potential of bacteria isolated from a soil suppressive to *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Plant Pathology*, 21, 133-142.
- Suresh C.K. et Bagyaraj D.J., 1984. Interaction between a vesicular arbuscular mycorrhiza and a root-knot nematode and its effect on growth and chemical composition of tomato. *Nematology Mediterranea*, 12, 31-39.
- Suresh C.K., Bagyaraj D.J. et Reddy D.D.D.R., 1985. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on survival, penetration and development of root-knot nematode in tomato. *Plant and Soil*, 87, 305-308.
- Sylvia D.M., 1988. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 20, 39-43.
- Sylvia D.M., Jarstfer A.G. et Vosatke M., 1993a. Comparisons of vesicular-arbuscular mycorrhizal species and inocula formulations in a commercial nursery and on diverse Florida beaches. *Biology and Fertility of Soils*, 16, 139-144.
- Sylvia D.M., Wilson D.O., Graham J.H., Maddox J.J., Millner P., Morton J.B., Skipper H.D., Wright S.F. et Jarstfer A.G., 1993b. Evaluation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in diverse plants and soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 705-713.
- Thomas G.V., Sundararaju P., Ali S.S. et Ghai S.K., 1989. Individual and interactive effects of VA mycorrhizal fungi and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on cardamom. *Tropical Agriculture*, 66, 21-24.
- Thompson J.P., 1987. Decline of vesicular-arbuscular mycorrhizae in long fallow disorder of field crops and its expression in phosphorus deficiency of sunflower. *Australian Journal of Agriculture Research*, 38, 847-867.
- Tisserant B., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. et Gollote A., 1993. *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular endomycorrhizal infections. *Mycological Research*, 97, 245-250.
- Trappe J.M., Molina R. et Castellano M., 1984. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. *Annual Review of Phytopathology*, 22, 331-359.

- Trouvelot A., Abdel-Fattah G.M., Gianinazzi S. et Gianinazzi-Pearson V., 1991. Differential effects of fungicides on VAM fungal viability and efficiency. Dans : Mycorrhizas in Ecosystems (Read D.J., Lewis D.H., Fitter A.H. et Alexander I.J., eds), CAB International Inc., Oxon, GB, 404.
- Trouvelot A., Kough J. et Gianinazzi-Pearson V., 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Dans : Mycorrhizae : Physiology and Genetics (Gianinazzi-Pearson V. et Gianinazzi S., eds), INRA-Press, Paris, 217-221.
- van Duin W.E., Rozema J. et Ernst W.H.O., 1989. Seasonal and spatial variation in the occurrence of vesicular-arbuscular (VA) mycorrhiza in salt marsh plants. Agriculture, Ecosystems and Environment, 29, 107-110.
- Vidal M.T., Azcon-Aguilar C. et Barea J.M., 1992. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. HortScience, 27, 785-787.
- Vierheilig H. et Ocampo J.A., 1989. Relationship between SDH-activity and VA mycorrhizal infection. Agriculture, Ecosystems and Environment, 29, 439-442.
- Wakasa K., 1979. Variation in plants differentiated from the tissue culture of pineapple. Japan Journal Breeding, 29, 13-22.
- White J.A., Munn L.C. et Williams S.E., 1989. Edaphic and reclamation aspects of vesicular-arbuscular mycorrhizae in Wyoming red desert soils. Soil Science Society of American Journal, 53, 86-90.
- Wilson J.M., 1984. Competition for infection between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, 97, 427-435.
- Zepeda C. et Sagawa Y., 1981. *In vitro* propagation of pineapple. HortScience, 16, 495.

ANNEXES PUBLICATIONS

Annexe 1

L'endomycorhization de vitroplants d'*Ananas comosus* : mise en évidence d'un effet mycorhizien. *Fruits*.

Annexe 2

Screening of VA endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated pineapple plants. *Agronomie*.

Annexe 3

Influence of phosphate fertilization on fungal alkaline phosphatase activity in relation arbuscular mycorrhizal effects on plant growth. *Agriculture, Ecosystems and Environment (soumis)*.

Annexe 4

Influence des endomycorhizes à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale d'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dans un sol à forte salinité. *Fruits (soumis)*.

Annexe 5

Control by arbuscular endomycorrhizae of root colonisation by *Pratylenchus brachyurus* in pineapple microplants. *Agriculture Science of Finland (sous presse)*.

Annexe 6

Contribution of endomycorrhizas in biological protection of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) against *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Agriculture Science of Finland*.

Annexe 7

Interactions between soil-applied fungicides, endomycorrhiza fungal activity and plant growth. *Soil Science (Trends in Agricultural Science)*.

Annexe 8

Application of commercial (V)AM fungal inoculants to the establishment of micropropagated grapevine rootstock and pineapple plants. *Agronomie*.

L'endomycorhization de vitroplants d'*Ananas comosus*: mise en évidence d'un effet mycorhizien.

J.P. GUILLEMIN, S. GIANINAZZI et
Vivienne GIANINAZZI-PEARSON*

INTRODUCTION

L'ananas, comme la plupart des espèces végétales, développe à l'état naturel des endomycorhizes à vésicules et à arbuscules (VA) (MOURICHON, 1981). Ces symbioses, partie intégrante de la plante, sont connues pour influencer positivement plusieurs aspects de la physiologie de l'hôte : la nutrition minérale (en particulier phosphatée), l'absorption de l'eau du sol, la production d'hormones et la résistance à des maladies d'origine tellurique (GIANINAZZI *et al.*, 1982).

La production d'ananas se fait de plus en plus par multiplication végétative *in vitro*. Cette méthode aboutit à des plantes indemnes d'endomycorhizes. Des expériences réalisées avec d'autres espèces (pommier, poirier ...) et portant sur l'introduction de champignons endomycorhizogènes dans le processus de micropropagation ont démontré l'intérêt de l'endomycorhization pour la reprise et la croissance des microboutures (GIANINAZZI *et al.*, 1988). Récemment RAVOLANIRINA *et al.*, (1989 a), en comparant chez la vigne, l'effet sur la croissance de l'endomycorhization *in vitro* et post-*in vitro*, ont conclu que cette dernière favorise au mieux la croissance des plantes. Suite à ces études, une méthode rapide d'endomycorhization post-*in vitro* de vitroplants de vigne et palmier à huile a été mise au point (RAVOLANIRINA *et al.*, 1989 b). Cet article relate nos premiers résultats dans l'application de cette nouvelle biotechnologie aux vitroplants d'ananas.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal.

Deux clones (CY0 et CY5) de vitroplants d'ananas (*Ananas comosus* L. variété Cayenne), fournis par Vitropro SA (Montpellier), ont été utilisés.

* - Laboratoire de Phytoparasitologie INRA-CNRS - Station de Génétique et Amélioration des Plantes - INRA - BV 1540 - 21034 DIJON Cedex, France.

Endomycorhization.

Les plants d'ananas sont endomycorhizés dans des sols acide à pH 5.0 (Marlins) ou alcalin à pH 8.0 (Epoisses), irradiés aux rayons gamma (10 kGy). Dans le sol acide, les plantes sont inoculées avec un isolat de *Glomus* sp. (LPA 21) multiplié sur *Tephrosia ehlenbergiana* L. et provenant de Dabou (Côte d'Ivoire). Dans le sol alcalin, les plantes le sont avec *Glomus intraradices* (LPA 8) multiplié sur *Allium cepa* L.

L'inoculation est réalisée à la sortie du tube pendant le sevrage dans des terrines avec des fragments d'endomycorhizes de *T. ehlenbergiana* et d'*A. cepa* respectivement (RAVOLANIRINA *et al.*, 1989). Après 4 semaines, les vitroplants sont repiqués dans des pots de 400 g contenant de la terre irradiée aux rayons gamma et du gravier (TG 50:50). A partir du repiquage chaque plante reçoit par semaine 2 fois 20 ml d'une solution nutritive d'Hoagland n° 2 complète (COTE, 1988) ou sans phosphore (NH₄ H₂PO₄ remplacé par NH₄Cl). Chaque traitement est constitué d'un lot de 5 plantes.

L'estimation de la croissance est déterminée chez des ananas 4 mois après la sortie des conditions axéniques par la mesure du nombre de feuilles, du poids de matière fraîche de la partie aérienne et des racines, du poids de matière sèche de la partie aérienne et de la surface foliaire.

L'estimation de l'infection endomycorhizienne VA est effectuée avec la méthode de TROUVELOT *et al.* (1986) après éclaircissement et coloration des racines au bleu de trypan (PHILIPPS et HAYMAN, 1970).

RESULTAT ET DISCUSSION

La méthode d'inoculation utilisée a permis d'endomycorhizer les deux clones de vitroplants d'ananas aussi

TABLEAU 1 - Influence de l'endomycorhization sur la croissance, dans un sol acide à pH 5,0 d'*Ananas comosus* variété Cayenne, clone CY0 âgé de 4 mois, inoculé avec *Glomus* sp. (Gd) et ayant reçu une solution d'Hoagland avec (+P) ou sans (-P) phosphore.

	Témoin (-P)	Gd (-P)	Témoin (+P)	Gd (+P)
Nombre de feuilles	21.0a	23.2a	17.2b	21.2a
Pf. des parties aériennes (g) (A)	20.91b	43.31a	11.36b	19.28b
Pf. des racines (g) (R)	2.42a	3.52a	1.22b	1.66b
R/A (p. 100)	11.6	8.1	10.7	8.6
Ps. des parties aériennes (g)	2.38b	4.17a	1.41c	1.44c
Surface foliaire (cm ²)	220.9b	454.4a	133.9c	229.1b
M p. 100	0b	79a	0b	57a
A p. 100	0b	49a	0b	33a

TABLEAU 2 - Influence de l'endomycorhization sur la croissance, dans un sol alcalin à pH 8,0, d'*Ananas comosus* variété Cayenne, clone CY0 âgé de 4 mois, inoculé avec *Glomus intraradices* (Gi) et ayant reçu une solution d'Hoagland avec (+P) ou sans (-P) phosphore.

	Témoin (-P)	Gi (-P)	Témoin (+P)	Gi(+P)
Nombre de feuilles	17.0b	21.8a	21.4a	21.6a
Pf. des parties aériennes (g) (A)	12.78b	24.96a	21.19a	19.22a
Pf. des racines (g) (R)	1.73b	2.30a	1.57b	1.96b
R/A (p. 100)	13.5	9.2	7.4	10.2
Ps. des parties aériennes (g)	1.41b	2.41a	2.37a	2.35a
Surface foliaire (cm ²)	141.7b	263.1a	233.7a	271.3a
M p. 100	0c	65a	0c	35b
A p. 100	0b	27a	0b	17a

TABLEAU 3 - Influence de l'endomycorhization sur la croissance, dans un sol acide à pH 5.0 d'*Ananas comosus* variété Cayenne, clone CY5 âgé de 4 mois, inoculé avec *Glomus* sp. (Gd) et ayant reçu une solution d'Hoagland avec (+P) ou sans (-P) phosphore.

	Témoin (-P)	Gd(-P)	Témoin (+P)	Gd(+P)
Nombre de feuilles	19.0b	23.2a	21.0a	22.2a
Pf. des parties aériennes (g) (A)	12.32b	28.02a	17.99ab	21.84ab
Pf. des racines (g) (R)	1.67b	2.50a	1.77ab	1.90ab
R/A (p. 100)	13.6	8.9	9.8	8.7
Ps. des parties aériennes (g)	1.19b	2.85a	1.49b	2.12ab
Surface foliaire (cm ²)	148.4c	325.7a	216.3b	261.2b
M p. 100	0b	82a	0b	77a
A p. 100	0b	59a	0b	48a

TABLEAU 4 - Influence de l'endomycorhization sur la croissance, dans un sol alcalin pH 8,0 d'*Ananas comosus* variété Cayenne, clone CY5 âgé de 4 mois, inoculé avec *Glomus intraradices* (Gi) et ayant reçu une solution d'Hoagland avec (+P) ou sans (-P) phosphore.

	Témoin (-P)	Gi (-P)	Témoin (+P)	Gi (+P)
Nombre de feuilles	15.4b	20.4a	21.8a	21.2a
Pf. des parties aériennes (g) (A)	6.63b	18.98a	21.29a	21.22a
Pf. des racines (g) (R)	0.81b	1.74a	1.57a	1.96a
R/A (p. 100)	12.2	9.2	7.4	9.2
Ps. des parties aériennes (g)	0.96b	1.91a	2.37a	2.35a
Surface foliaire (cm ²)	77.4b	202.7a	234.2a	232.0a
M p. 100	0b	58a	0b	48 a
A p. 100	0b	30a	0b	26a

Pour chaque ligne du tableau, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes à $P < 0,05$ selon le test de NEWMAN-KEULS.

Pf. : poids de matière fraîche.

Ps. : poids de matière sèche

M p. 100 : intensité de l'infection endomycorhizienne.

A p. 100 : teneur en arbuscules.

bien avec *Glomus* sp. qu'avec *G. intraradices*. Quand les plantes sont infectées avec *Glomus* sp., les valeurs de l'infection endomycorhizienne sont plus élevées que celles observées avec *G. intraradices*. Pour les deux clones, l'intensité de l'infection endomycorhizienne (M p. 100) et la teneur en arbuscules (A p. 100) sont plus élevées chez les plantes ayant reçu la solution sans phosphore aussi bien dans le sol acide que dans le sol alcalin ; toutefois ces différences sont plus marquées dans le cas du clone CY0 (tableaux 1, 2, 3 et 4).

L'effet endomycorhizien sur la croissance des 2 clones ayant reçu une solution sans phosphore est détectable dès le troisième mois après la sortie des conditions axéniques. Les mesures des paramètres de croissance (nombre de feuilles, poids de matière fraîche de la partie aérienne et des racines, poids de matière sèche de la partie aérienne et des surfaces foliaires) sont toutes significativement supérieures chez les ananas endomycorhizés sauf pour le nombre de feuilles et le poids de matière fraîche des racines dans le cas du clone CY0 sur sol acide (tableaux 1, 2, 3 et 4). Le clone CY5 est plus dépendant des endomycorhizes que CY0 : dans le sol acide, le gain, en surface foliaire pour le clone CY5 endomycorhizé, est de 227 p. 100, alors que pour le clone CY0, il est seulement de 207 p. 100. Dans le sol alcalin, on observe le même phénomène : la dépendance endomycorhizienne du clone CY5 est supérieure (286 p. 100) à celle du clone CY0 (196 p. 100).

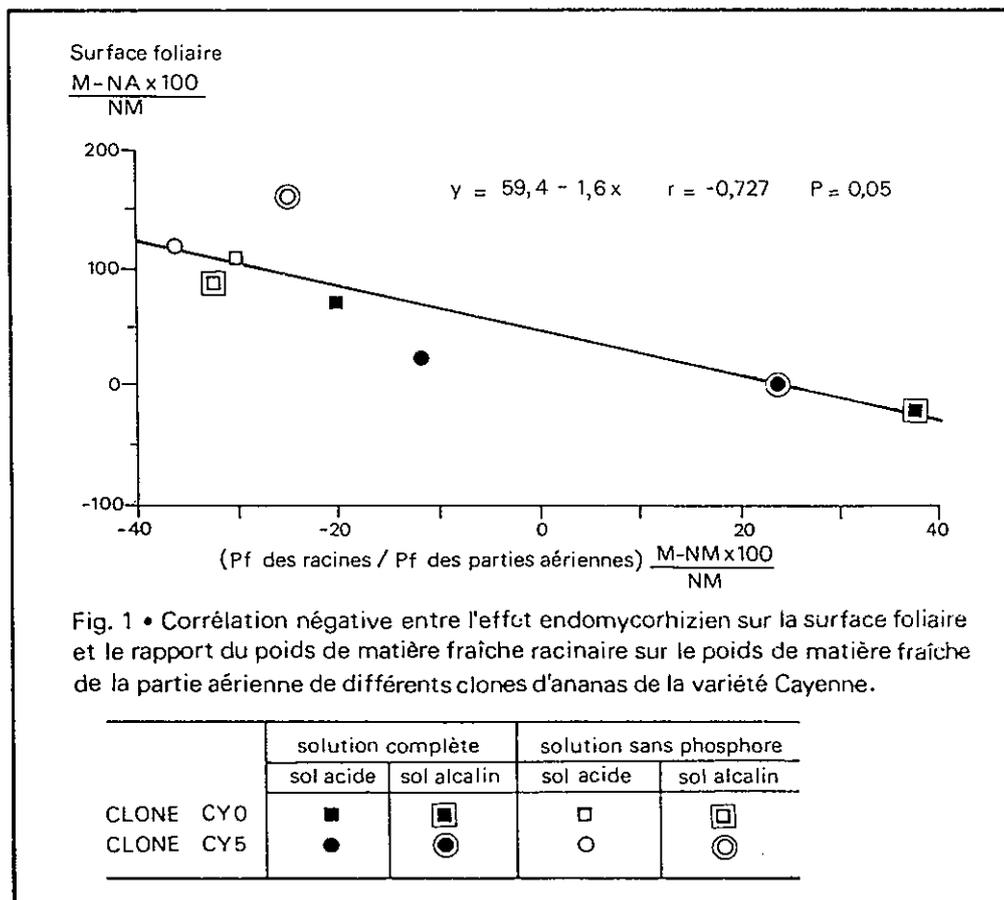
Chez les ananas recevant la solution complète, l'effet endomycorhizien ne s'exprime pas de façon aussi importante que chez les plantes ayant reçu une solution sans phos-

phore. Dans le sol acide, un meilleur développement des plantes endomycorhizées est néanmoins obtenu pour le clone CY0, mais la différence est significative uniquement au niveau du nombre de feuilles et de leur surface foliaire (tableau 1). Pour le clone CY5, la tendance est la même, mais aucun paramètre de croissance n'est significativement supérieur au témoin (tableau 3). Dans le sol alcalin, l'effet endomycorhizien ne s'exprime pas avec l'apport de phosphore (tableaux 2 et 4), bien que pour les deux clones endomycorhizés, le poids de matière fraîche des racines soit légèrement supérieur et que l'endomycorhization du clone CY0 se traduit par une surface foliaire plus développée.

Si l'on compare les valeurs obtenues dans tous les traitements, on constate que les plantes qui se développent le plus rapidement sont celles qui sont endomycorhizées sur du sol acide et qui n'ont pas reçu de phosphore (tableaux 1, 2, 3 et 4).

Le rapport du poids de matière fraîche racinaire sur le poids de matière fraîche aérienne diminue chez les ananas endomycorhizés (tableaux 1, 2, 3 et 4) et cette baisse est corrélée négativement avec l'intensité de l'effet endomycorhizien de la croissance aérienne (figure 1). Cela signifie que les plantes endomycorhizées développent un système racinaire moins important mais plus efficace que celui des plantes non inoculées. Dans le sol alcalin, quand l'effet endomycorhizien ne s'exprime pas, le rapport racine: partie aérienne chez les plantes inoculées augmente, traduisant la baisse de l'efficacité de leurs organes souterrains.

En conclusion, nous pouvons dire que l'endomycorhi-



zation de vitroplants d'ananas améliore considérablement leur croissance. Le meilleur effet endomycorhizien est obtenu dans le sol acide où sont habituellement cultivés les ananas (PY *et al.*, 1984) et quand les plantes ne reçoivent pas de phosphore. Le phosphore favorise le développement des plantes témoins, mais réduit l'effet endomycorhizien dans les sols acides et le fait disparaître dans les sols alcalins. De plus, dans ce dernier cas, l'endomycorhization amène les plantes à produire plus de racines pour pallier la perte d'efficacité de leurs organes souterrains. Ces effets sur le développement du système racinaire doivent vraisemblablement traduire des modifications physiologiques liées à la mise en place et au fonctionnement de la symbiose endomycorhizienne qui pourraient aussi expliquer, au moins partiellement, la plus grande résistance de certaines plantes endomycorhizées, vis-à-vis des différents stress biotiques et abiotiques (GIANINAZZI-PEARSON et GIANINAZZI,

1986). Ces expériences sur l'ananas montrent comme dans le cas d'autres plantes micropropagées l'intérêt d'introduire cette biotechnologie qu'est l'endomycorhization contrôlée dans les processus de production des vitroplants (GIANINAZZI *et al.*, 1988 ; CHAVEZ et FERRERA-CERRATO, 1990,; VIDAL M.T., communication personnelle).

Au moment de soumettre cette publication, nous avons eu connaissance de l'article de JAIZME-VEGA et AZCON qui vient d'être publié par cette même revue (FRUITS, 1991, 46, 1, 47-50). Cet article met aussi en évidence, dans des conditions différentes des nôtres, l'intérêt d'endomycorhizer des plants micropropagés d'ananas.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHAVEZ (M.C. G.) and FERRERA-CERRATO (R.). 1990.
Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on tissue culture-derived plantlets of strawberry.
HortScience, 25, 8, 903-905.
- COTE (F.X.). 1988.
Photosynthèse et photorespiration d'une plante à métabolisme acide crassulacéen : *Ananas comosus* (L.) MERR : études des échanges gazeux.
Thèse d'Université, Université Paul Sabatier de Toulouse (Sciences), 99 p.
- GIANINAZZI (S.), GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne) et TROUVELOT (A.). 1982.
«Les mycorhizes, partie intégrante de la plante : biologie et perspectives d'utilisation».
Les Colloques de l'INRA n° 13, INRA-Press, Paris, 397 p.
- GIANINAZZI (S.), TROUVELOT (A.) et GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne). 1988.
Valorisation par les endomycorhizes en agriculture : Une réflexion nécessaire pour l'arboriculture fruitière et d'ornement.
C.R. 8e Colloque sur les Recherches fruitières, INRA-CTIFL, 119-130.
- GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne) et GIANINAZZI (S.). 1986.
Connaissances actuelles des bases physiologiques et biochimiques des effets des endomycorhizes sur le comportement des plantes.
Physiol. Veg., 24, 253-262.
- MOURICHON (X.). 1981.
Mise en évidence d'une association endomycorhizogène chez l'ananas en Côte d'Ivoire.
Fruits, 36 (12), 745-749.
- PHILIPPS (J.M.) and HAYMAN (D.S.). 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.
- PY (C.), LACOEUILHE (J.J.) et TEISSON (C.). 1984.
L'ananas : sa culture, ses produits.
in : «Techniques agricoles et productions tropicales», Maisonneuve G.P. et Larose, Paris (Ve) eds, 562 p.
- RAVOLANIRINA (Florine), GIANINAZZI (S.), TROUVELOT (A.) and CARRE (Monique). 1989 a.
Production of endomycorrhizal explants of micropropagated grapevine rootstocks.
Agriculture, Ecosystems and Environment, 29, 323-327.
- RAVOLANIRINA (Florine), BLAB (B.), GIANINAZZI (S.) and GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne). 1989 b.
Mise au point d'une méthode rapide d'endomycorhization de vitroplants.
Fruits, 44 (3), 165-170.
- TROUVELOT (A.), KOUGH (J.L.) et GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne). 1986.
Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche des méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle.
Dans : «Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae», Gianinazzi-Pearson (Vivienne) and Gianinazzi (S.) eds. Proceedings of the 1st European Symposium, INRA-Press, Paris, 217-221.

Screening of arbuscular endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated pineapple plants

JP Guillemin, S Gianinazzi *, A Trouvelot

INRA-CNRS, laboratoire de Phytoparasitologie, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes,
INRA, BV 1540, 21034 Dijon cédex, France

(COST Meeting, 21-23 May 1992, Dijon, France)

Summary — Several arbuscular endomycorrhizal fungi (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellospora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp. (LPA21), *Glomus* sp (LPA22) and *Glomus* sp (LPA25)) were tested for plant growth effects and infection development in Queen Tahiti, Smooth Cayenne (clone CY₀) and Spanish varieties of micropropagated pineapple growing in an acid soil under growth chamber tropical conditions. Endomycorrhizal plants of all 3 pineapple varieties grew better than non-mycorrhizal plants. However, increase in plant growth was not related to infection development. Screening of different isolates of arbuscular endomycorrhizal fungi showed some specificity of fungi for promoting growth of the different pineapple varieties. Queen Tahiti and Smooth Cayenne pineapple plants associated with *Glomus* sp (LPA21) grew better than those infected with the other fungi, whilst best growth was obtained for the Spanish variety by inoculating plants with *Glomus* sp (LPA25). The root/shoot ratio was modified by endomycorrhizal inoculation, infected pineapple plants showing a greater increase in shoot production in comparison to root production.

micropropagated pineapple / arbuscular endomycorrhizal fungi / plant growth / infection development

Résumé — Sélection de champignons endomycorhizogènes à arbuscules efficaces pour l'établissement d'ananas micropropagés. Plusieurs champignons endomycorhizogènes à arbuscules (*Glomus clarum* (LPA₁₆), *Scutellospora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp (LPA21), *Glomus* sp (LPA22) and *Glomus* sp (LPA25)) ont été testés pour leur développement et leur effet sur la croissance de 3 variétés d'ananas micropropagés (Queen Tahiti, Cayenne lisse (clone CY₀) et Spanish) cultivés dans un sol acide et dans une salle climatisée aux conditions tropicales. Pour les 3 variétés d'ananas testées, les vitroplants endomycorhizés présentent une meilleure croissance que les non inoculés. Cependant l'augmentation de croissance n'est pas liée avec l'importance de l'infection. La sélection des différents champignons endomycorhizogènes montrent une certaine spécificité fongique vis à vis des différentes variétés d'ananas. Ainsi les vitroplants des variétés Queen Tahiti et Cayenne lisse, associés avec *Glomus* sp (LPA21), présentent une meilleure croissance que ceux infectés avec les autres champignons tandis que la meilleure croissance pour la variété Spanish a été obtenue avec *Glomus* sp (LPA25). Le rapport du poids de matière fraîche racinaire sur le poids de matière fraîche aérienne est modifié par la présence de champignons endomycorhizogènes; l'effet endomycorhizien sur la croissance de la partie aérienne est supérieur à celui obtenu sur la partie racinaire des vitroplants.

ananas micropropagés / champignons endomycorhizogènes à arbuscules / croissance de la plante-hôte / infection endomycorhizienne

INTRODUCTION

Micropropagation is a technique of increasing importance for the production of many crops (Sasson, 1992). This includes pineapples which form arbuscular endomycorrhiza (Mourichon, 1981) as do nearly all cultivated plants (Powell and Bagyaraj, 1984; Gianinazzi *et al*, 1990). Endomycorrhization can modify root architecture to give a root system which is better adapt-

ed for uptake of mineral nutrient and water (Berta *et al*, 1990), as well as increasing hormone production (Allen, 1985) and resistance to pesticides or root pathogens (Gianinazzi *et al*, 1982; Harley and Smith, 1983). Endomycorrhizal formation is suppressed by practices employed in micropropagation, and it is thus important to consider introducing symbiotic fungi during plant production. However, arbuscular endomycorrhizal fungi differ in their ability to enhance plant

* Correspondence and reprints

growth, and to optimise yields it is necessary to screen for the most efficient isolates before developing mass inoculation (Haas and Krikun, 1985). Abbott and Robson (1978) suggested that characteristics of effective isolates are to infect roots rapidly and to efficiently translocate nutrients to plants.

Previous studies on the Smooth Cayenne (clone CY0) variety of pineapple showed that infection with the arbuscular endomycorrhizal fungus *Glomus* sp (LPA21) improved growth under simulated tropical conditions (Guillemain *et al*, 1991). The present paper reports a series of experiments carried out to compare the effect of several arbuscular endomycorrhizal fungi on plant growth and infection development in several varieties of micropropagated pineapple.

MATERIALS AND METHODS

Three micropropagated pineapple varieties (Queen Tahiti, Smooth Cayenne (clone CY0) and Spanish) were each inoculated with 1 of 5 arbuscular endomycorrhizal fungi: *Glomus clarum* (LPA16), *Scutellispora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp (LPA21), *Glomus* sp (LPA22) and *Glomus* sp (LPA25).

Experiments were carried out in an acid soil (pH 5.0) under simulated tropical conditions (300 $\mu\text{E. s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 28–25 °C, 12 h day and 70–90% relative humidity). Pineapple microplants were inoculated during a *post vitro* acclimatization period with root fragments of *Tephrosia ehlenbergiana* infected by one of the fungal isolates (Guillemain *et al*, 1991). One g of infected roots was used to inoculate 10 microplants. After 1 month, pineapple plants were transplanted individually to pots containing 400 g of soil: gravel mix (1:1, v:v). Each pot was watered daily with distilled water and

weekly with 2 x 20 ml Hoagland No 2 solution (Hoagland and Aron, 1950) without phosphate. After 3 months, growth was evaluated via several parameters: leaf area (cm^2), shoot and root fresh mass (g) and shoot dry mass (g).

Infection development was estimated by the method of Trouvelot *et al* (1986) after clearing and staining with trypan blue (Philipps and Hayman, 1970). Roots of the Spanish variety were stained also for succinate dehydrogenase (SDH) (Smith and Gianinazzi-Pearson, 1990) and alkaline phosphatase (ALP) (Tisserant *et al*, 1992) activity in order to evaluate living (SDH) and functional (ALP) fungal infections.

Each treatment comprised 5 replicates and all data was analysed by ANOVA and Newman-Keuls test.

RESULTS

Plant growth

Endomycorrhizal plants of all 3 pineapple varieties grew better than non-mycorrhizal plants. However, there were differences among the combinations of plant varieties and fungal isolates.

Optimum growth of Queen Tahiti (table I) and Smooth Cayenne varieties (table II) was obtained with *Glomus* sp (LPA21); leaf area and shoot fresh and dry mass were significantly higher than those of non-mycorrhizal plants. Both varieties infected with *G clarum* (LPA16) also had a significantly higher leaf area.

Spanish variety responded to inoculation with all 5 fungi, with significant effects on all plant growth parameters (table III). Largest increases in shoot growth were obtained with *Glomus* sp

Table I. Leaf area, shoot and root fresh mass and shoot dry mass of uninoculated and endomycorrhizal (*Glomus clarum*(LPA16), *Scutellispora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp (LPA21), *Glomus* sp (LPA22) and *Glomus* sp (LPA25)) plants of the Queen Tahiti pineapple variety.

Fungal strains	Leaf area (cm^2)	Shoot fresh mass (g)	Root fresh mass (g)	Shoot dry mass (g)
Control	249.2 ^c	21.03 ^b	1.90 ^a	2.27 ^b
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	444.3 ^{ab}	36.05 ^{ab}	2.42 ^a	4.26 ^{ab}
<i>Scutellospora pellucida</i> (LPA20)	363.8 ^{abc}	30.05 ^{ab}	1.98 ^a	3.61 ^b
<i>Glomus</i> sp (LPA21)	514.4 ^a	41.57 ^a	3.21 ^a	4.57 ^a
<i>Glomus</i> sp (LPA22)	445.5 ^{ab}	35.05 ^{ab}	2.56 ^a	4.15 ^{ab}
<i>Glomus</i> sp (LPA25)	298.0 ^{bc}	24.75 ^{ab}	2.42 ^a	2.85 ^b

Values in a column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table II. Leaf area, shoot and root fresh mass and shoot dry mass of uninoculated and endomycorrhizal (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellospora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp (LPA21), *Glomus* sp (LPA22) and *Glomus* sp (LPA25)) plants of the Smooth Cayenne pineapple variety.

Fungal strains	Leaf area (cm ²)	Shoot fresh mass (g)	Root fresh mass (g)	Shoot dry mass (g)
Control	413.7 ^b	32.79 ^b	3.46 ^{ab}	2.95 ^a
<i>Glomus clarum</i> (LPA ₁₆)	607.4 ^a	48.82 ^a	3.98 ^{ab}	4.22 ^a
<i>Scutellospora pellucida</i> (LPA ₂₀)	473.0 ^{ab}	38.39 ^b	2.94 ^b	3.36 ^a
<i>Glomus</i> sp (LPA ₂₁)	640.1 ^a	51.07 ^a	4.18 ^a	4.26 ^a
<i>Glomus</i> sp (LPA ₂₂)	515.9 ^{ab}	41.13 ^{ab}	2.80 ^b	3.68 ^a
<i>Glomus</i> sp (LPA ₂₅)	494.7 ^{ab}	34.78 ^b	3.18 ^{ab}	3.98 ^a

Values in a column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table III. Leaf area, shoot and root fresh mass and shoot dry mass of uninoculated and endomycorrhizal (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellospora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp (LPA21), *Glomus* sp (LPA22) and *Glomus* sp (LPA25)) plants of the Spanish pineapple variety.

Fungal strains	Leaf area (cm ²)	Shoot fresh mass (g)	Root fresh mass (g)	Shoot dry mass (g)
Uninoculated	311.4 ^d	21.70 ^d	2.27 ^d	2.05 ^d
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	537.1 ^b	37.06 ^{ab}	3.69 ^a	3.64 ^{ab}
<i>Scutellospora pellucida</i> (LPA20)	519.7 ^b	36.84 ^{ab}	3.59 ^a	3.81 ^{ab}
<i>Glomus</i> sp (LPA21)	539.1 ^b	38.46 ^{ab}	3.77 ^a	3.71 ^{ab}
<i>Glomus</i> sp (LPA22)	411.7 ^c	27.60 ^c	2.81 ^b	2.75 ^c
<i>Glomus</i> sp (LPA25)	620.7 ^a	43.37 ^a	3.50 ^a	4.27 ^a

Values in a column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

(LPA25), whilst effects on root growth were similar for *G. clarum* (LPA16), *Scutellospora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp (LPA21) and *Glomus* sp (LPA25). The *Glomus* sp (LPA22) was generally less effective in improving plant growth.

Root/shoot ratio

Root/shoot ratios were modified by inoculation with arbuscular endomycorrhizal fungi (fig 1) and were generally lower than in non-mycorrhizal plants, with the exception of Queen Tahiti infected with *Glomus* sp (LPA25) (fig 1A) which was also the least effective isolate for growth of this pineapple variety. The endomycorrhizal effect on leaf area was negatively correlated ($P = 0.05$)

with the endomycorrhizal effect on root/shoot ratio for Spanish variety but not for Queen Tahiti and Smooth Cayenne varieties (fig 2).

Infection development

Levels of infection observed with trypan blue staining differed between isolates (tables IV, V) but were not related to growth increases in any of the inoculated plants. Endomycorrhizal infection intensity (M%) for the Spanish variety by SDH staining (table V) was significantly lower with the fungal isolate LPA22. This isolate also gave a lower arbuscular frequency (A%), evaluated by both SDH and ALP staining, than the other isolates (table V).

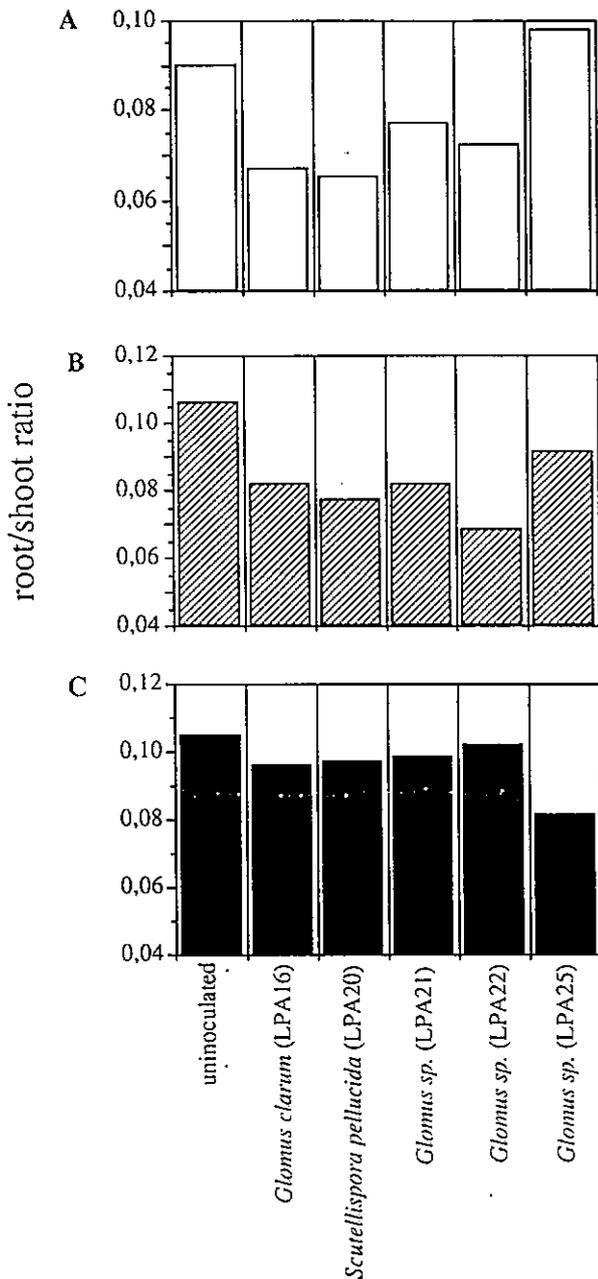


Fig 1. Root/shoot ratio of uninoculated and endomycorrhizal (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellispora pellucida* (LPA20), *Glomus sp* (LPA21), *Glomus sp* (LPA22) and *Glomus sp* (LPA25) plants of Queen Tahiti (A), Smooth Cayenne (B) and Spanish (C) pineapple varieties.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Screening of different arbuscular endomycorrhizal fungi for their growth-promoting effects on 3 pineapple varieties indicated some specificity of isolates. Of the fungal isolates tested, *Glomus sp* (LPA21) appeared to be most effective for growth of the Queen Tahiti and Smooth Cayenne varieties of pineapple, and *Glomus sp*

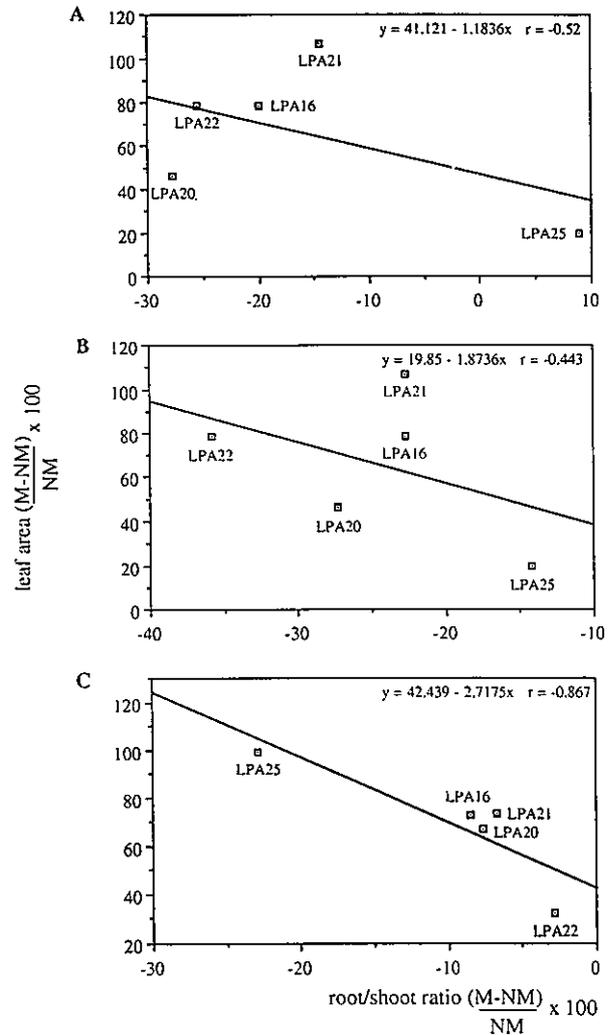


Fig 2. Negative correlations between endomycorrhizal effects on leaf area and on root/shoot ratio of Queen Tahiti (A), Smooth Cayenne (B) and Spanish (C) pineapple varieties.

(LPA25) for the Spanish variety. These observed differences in effectivity underline the necessity to select arbuscular endomycorrhizal fungal isolates. However, these tests were carried out under conditions without competition from other fungi. If such results are to be translated into field predictions, it is necessary to know whether these efficient fungi are also able to establish and persist in the presence of competition by indigenous arbuscular endomycorrhizal fungi (Powell, 1982). Furthermore, it would be of interest to test whether inoculating with a mixture of fungal isolates is more efficient in promoting the growth of different pineapple varieties than inoculation with individual fungal isolates. Sieverding (1989), however, has suggested that it would be more interesting to find one isolate that is effective with a wide range of plant species, since interactions can occur between different isolates in mixtures.

Table IV. Percent endomycorrhizal infection (M%: intensity of infection and A%: arbuscule frequency) observed with trypan blue staining in roots of uninoculated and endomycorrhizal (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellospora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp (LPA21), *Glomus* sp (LPA22) and *Glomus* sp (LPA25)) plants of Queen Tahiti and Smooth Cayenne pineapple variety.

Fungal strains	Queen Tahiti		Smooth Cayenne	
	M%	A%	M%	A%
Uninoculated	0 ^d	0 ^d	0 ^c	0 ^d
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	74 ^c	36 ^c	87 ^a	69 ^a
<i>Scutellospora pellucida</i> (LPA20)	82 ^b	54 ^b	71 ^b	40 ^c
<i>Glomus</i> sp (LPA21)	91 ^a	69 ^a	79 ^{ab}	58 ^b
<i>Glomus</i> sp (LPA22)	92 ^a	71 ^a	83 ^{ab}	68 ^a
<i>Glomus</i> sp (LPA25)	87 ^{ab}	53 ^b	89 ^a	57 ^b

Values in a column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table V. Percent endomycorrhizal infection (M%: intensity of infection and A%: arbuscule frequency) observed with trypan blue, succinate dehydrogenase (SDH) and alkaline phosphatase (APL) staining in roots of uninoculated and endomycorrhizal (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellospora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp (LPA21), *Glomus* sp (LPA22) and *Glomus* sp (LPA25)) plants of Spanish pineapple variety.

Fungal strain	Trypan blue		SDH		ALP	
	M%	A%	M%	A%	M%	A%
Control	0 ^c	0 ^c	0 ^d	0 ^c	0 ^b	0 ^d
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	74 ^{ab}	36 ^a	51 ^a	22 ^a	36 ^a	17 ^a
<i>Scutellospora pellucida</i> (LPA20)	70 ^b	35 ^a	52 ^a	19 ^a	32 ^a	15 ^b
<i>Glomus</i> sp (LPA21)	85 ^{ab}	40 ^a	54 ^a	22 ^a	35 ^a	14 ^b
<i>Glomus</i> sp (LPA22)	92 ^a	33 ^a	36 ^c	13 ^b	30 ^a	10 ^c
<i>Glomus</i> sp (LPA25)	69 ^b	35 ^a	43 ^b	20 ^a	33 ^a	14 ^b

Values in a column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

The root/shoot ratio of pineapples (a C_4 /CAM plant) was decreased by endomycorrhizal infection, so that endomycorrhizal plants showed a greater increase in shoot production than root production. Such modifications in biomass distribution have often been observed in C_3 plants (Harley and Smith, 1983; Gianinazzi and Gianinazzi-Pearson, 1986; Schubert and Hayman, 1986). The root/shoot ratio was negatively correlated with the endomycorrhizal effect on growth of the 3 varieties of pineapple, but this correlation was less important for the Queen Tahiti and Smooth Cayenne varieties (figs 2A,B). Although endomycorrhizal growth effects were greatest in these 2 varieties when infected with *Glomus* sp

(LPA₂₁), this arbuscular endomycorrhizal fungus induced a proportionally greater root production in comparison to the other fungi tested.

Levels of infection observed with trypan blue staining were not related to increased plant growth in any of the 3 varieties. However, the lower SDH and ALP activities present in roots of the Spanish variety may partly explain the lower growth responses in these plants. However, Vierheilig and Ocampo (1989) have suggested that SDH activity does not indicate the efficiency of an arbuscular endomycorrhizal fungus in promoting plant growth. The efficiency of a fungus for the enhancement of plant growth could perhaps be better assessed by ALP activity in endo-

mycorrhizal roots (Tisserant *et al*, 1992). For a better understanding of the physiological basis of variations in the effectivity of arbuscular endomycorrhizal fungi, other parameters should also be analysed, such as external hypha production (network around the roots) (Abbott and Robson, 1985), longevity of hyphae in soil (Sylvia, 1988), efficiency of uptake and transport of phosphorus to the host roots (Sylvia and Burks, 1988; Jakobsen *et al*, 1992), and interactions between external hyphae and mycophagous invertebrates (Rabatin and Stinner, 1991).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Vitropics (Montpellier, France) for supplying the micropropagated plant material and V Gianinazzi-Pearson for valuable discussions and revision of the manuscript.

REFERENCES

- Abbott LK, Robson AD (1978) Growth of subterranean clover in relation to formation of endomycorrhizas by introduced and indigenous fungi in a field soil. *New Phytol* 81, 575-585
- Abbott LK, Robson AD (1985) Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 99, 245-255
- Allen MF (1985) Phytohormone action: an integrative approach to understanding diverse mycorrhizal responses. In: *Proc 6th N Am Conf Mycorrhizae* (R Molina, ed) For Sci Lab, Corvallis, OR, 158-160
- Berta G, Fusconi A, Trotta A, Scannerini S (1990) Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E₃ in the root system of *Allium porrum* L. *New Phytol* 114, 207-215
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1986) Connaissances actuelles des bases physiologiques et biochimiques des effets des endomycorhizes sur le comportement des plantes. *Physiol Vég* 24, 253-262
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Trouvelot A (1982) *Les Mycorhizes, Partie Intégrante de la Plante: Biologie et Perspective d'Utilisation*. Coll INRA, No 13, INRA, Paris
- Gianinazzi S, Trouvelot A, Gianinazzi-Pearson V (1990) Role and use of mycorrhizas in horticultural crop production. In: *23 IHC Plenary Lectures*. Int Soc Hort Sci, Florence, Italy, 25-30
- Guillemin JP, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1991) L'endomycorhization de vitoplants d'*Ananas comosus*: mise en évidence d'un effet mycorrhizien. *Fruits* 46 (spéc *Ananas*), 355-358
- Haas JH, Krikun J (1985) Efficacy of endomycorrhizal fungus isolates and inoculum quantities required for growth response. *New Phytol* 100, 613-621
- Harley JL, Smith SE (1983) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press Inc, London
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circ Calif Agric Exp Stn* No 347
- Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD (1992) External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 2. Hyphal transport of ³²P over defined distances. *New Phytol* 120, 509-516
- Mourichon X (1981) Mise en évidence d'une association endomycorhizogène chez l'ananas en Côte d'Ivoire. *Fruits* 36 (12), 745-749
- Philipps 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
- Powell CL (1982) Selection of efficient VA mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 68, 3-9
- Powell CL, Bagyaraj DJ (1984) *VA Mycorrhiza*. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL
- Rabatin SC, Stinner BR (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhizae, plant, and invertebrate interactions in soil. In: *Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interaction* (Barbosa P, Krischik VA, Jones CG, eds) John Wiley and Sons Inc, NY, 141-168
- Sasson A (1992) La micropropagation des plantes: réalité et priorité. *Biofutur* 111, 34-38
- Schubert A, Hayman DS (1986) Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XVI. Effectiveness of different endophytes at different levels of soil phosphate. *New Phytol* 103, 79-90
- Sieverding E (1989) Should VAM inocula contain single or several fungal species? *Agric Ecosystems Environ* 29, 391-396
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V (1990) Phosphate uptake and vesicular-arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effect of photon irradiance and phosphate nutrition. *Aust J Plant Physiol* 17, 177-188
- Sylvia DM (1988) Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 20 (1), 39-43
- Sylvia DM, Burks JN (1988) Selection of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus for practical inoculation of *Uniola paniculata*. *Mycologia* 80, 565-568
- Tisserant B, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Golote A (1992) *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular endomycorrhizal infections. *Mycol Res* 97 (in press)
- Trouvelot A, Kough J, Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Mycorrhizae: Physiology and Genetics* (Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, eds) INRA Press, Paris, 217-221
- Vierheilig H, Ocampo JA (1989) Relationship between SDH-activity and VA mycorrhizal infection. *Agric Ecosystems Environ* 29, 439-442

Agriculture, Ecosystems and Environment, 1994 (soumis)

1
2 **Influence of phosphate fertilization on fungal alkaline**
3 **phosphatase and succinate dehydrogenase activities in**
4 **arbuscular mycorrhiza of soybean and pineapple**
5
6

7 J.P. Guillemin, M.O. Orozco^a, V. Gianinazzi-Pearson^b and S. Gianinazzi

8
9 Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS, Station de Génétique et
10 d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, 21034 Dijon Cedex, France

11 ^a Institute of Systematics and Ecology, Cuban Academy of Science, Havana, Cuba

12
13 ^b To whom correspondence should be addressed
14

15 Keywords: arbuscular mycorrhiza, pineapple, soybean, phosphate, fungal alkaline
16 phosphatase
17
18
19
20
21

22 ABSTRACT
23

24 Guillemin J.P., Orozco M.O., Gianinazzi-Pearson V. and Gianinazzi S.,
25 1993. Influence of phosphate fertilization on fungal alkaline phosphatase
26 activity in arbuscular mycorrhiza. Agric. Ecosystems Environ.,
27

28 Effects of phosphate fertilization on the physiological activity of
29 arbuscular mycorrhizal infection were studied using fungal succinate

30 dehydrogenase and alkaline phosphatase activities as enzyme markers.
31 Two plants, soybean and pineapple, were used because of their different
32 growth rates and response to phosphate. Total mycorrhizal infection,
33 estimated by trypan blue staining, was reduced by phosphate fertilization
34 of soybean and pineapple in P-sufficient soils. In a P-deficient soil, fungal
35 infection in pineapple roots was not modified by fertilizer application. The
36 level of total mycorrhizal infection was not related to plant growth. Fungal
37 alkaline phosphatase staining and to a lesser extent succinate
38 dehydrogenase activity showed a relationship to plant growth; the potential
39 of this procedure for estimating endomycorrhizal infection as a marker of
40 efficiency of the symbiosis is discussed.

41

42

43

44 INTRODUCTION

45

46 It is well known that arbuscular mycorrhiza, an integral part of most
47 plants in nature (Gianinazzi et al., 1982), can increase phosphorus
48 assimilation by plant roots (Bowen et al., 1975; Koide, 1991). This is
49 largely due to external hyphae absorbing P beyond the depletion zones
50 around roots and root hairs, and transporting it to root tissues (Smith and
51 Gianinazzi-Pearson, 1988). Several reports have shown that increasing
52 concentrations of soluble phosphate in soils can decrease fungal
53 colonization of roots. This reduction could result from direct inhibition of
54 external hyphal growth and spread rates (Sanders, 1975; Graham et al.,
55 1982), or from indirect effects inducing changes in the endomycorrhizal
56 infection (Asimi et al., 1980; Plenchette et al., 1983; Schwab et al., 1983).
57 However, where soil concentration of available phosphate is extremely

58 low, small additions of phosphate can positively influence infection
59 (Schubert and Hayman, 1986).

60 Phosphorus nutrition of plants through arbuscular mycorrhiza
61 involves metabolically dependent processes (Gianinazzi-Pearson and
62 Gianinazzi, 1986; Smith and Gianinazzi-Pearson, 1988). One enzyme that
63 has been identified as active in arbuscular mycorrhiza, by gel
64 electrophoresis and electron microscopy, is fungal alkaline phosphatase
65 (Gianinazzi-Pearson and Gianinazzi, 1976; 1978; Gianinazzi et al., 1979;
66 Ollivier et al., 1983). It has been suggested that this enzyme may somehow
67 be involved in the processes of phosphorus acquisition in mycorrhizal
68 plants (Gianinazzi et al., 1992). Tisserant et al. (1993) have recently
69 developed a technique for light microscope observation and estimation of
70 alkaline phosphatase activity in root pieces. By this method, they have
71 shown that the amount of enzymically active fungal biomass increases
72 sharply prior to growth stimulation, then decreases with age of the
73 infection. Development of arbuscular mycorrhizal infection is reduced by
74 phosphate additions to soil (Mosse, 1973; Braunberger et al., 1991),
75 although the exact mechanisms involved are unknown.

76 With present environmental concern about adverse impacts of
77 chemical intrants in agriculture, it is necessary to better understand how
78 these affect the activity of symbiotic soil micro-organisms, like arbuscular
79 mycorrhizal fungi, which play an important role in plant development. In
80 the present work, we have used the technique of Tisserant et al. (1993) to
81 study the influence of phosphate fertilization on the physiological activity
82 of arbuscular mycorrhizal infection using fungal alkaline phosphatase
83 activity as a potential marker of efficiency of the symbiosis and succinate
84 dehydrogenase as a vital stain of metabolically active fungus (Smith and
85 Gianinazzi-Pearson, 1990). We have analyzed short-term and long-term
86 effects of phosphate applications on fungal development and activity using

87 respectively fast-growing, high-P-requiring, soybean at growth stages
88 before flowering or seed production and slow-growing, low-P-requiring,
89 pineapple during its long vegetative period.

90

91

92 MATERIALS AND METHODS

93

94 Plant inoculation and growth

95

96 Soybean (Glycine max (L.) Merr., cv. Mapple Arrow) seeds were
97 surface sterilized for 30 minutes in a 7% calcium hypochlorite solution and
98 germinated for four days in vermiculite moistened with distilled water.
99 Seedlings were inoculated with chopped onion root fragments infected
100 with Glomus mosseae (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe (Rothamsted
101 isolate, LPA5), during transplanting to soil. One plant was outplanted per
102 pot containing 400g disinfected (γ irradiated, 10kGy) alkaline, clay loam
103 soil (Epoisses, pH 7.8 (H₂O), 30 ppm available Olsen P). Plants were
104 grown either without additional P or with 110 mg kg⁻¹ of P (added as
105 KH₂PO₄) mixed into the soil. Each plant was inoculated with
106 Bradyrhizobium japonicum (USDA strain), watered daily with reverse-
107 osmosed water and fed with 32 mg S (K₂SO₄ solution) at four weeks (to
108 ensure that this was not a limiting element for the N fixing legume). Plants
109 were grown in a temperately climatized chamber (250 μ E s⁻¹ m⁻², 22/18°C,
110 16h day, 70-80% relative humidity) and harvested after four or six weeks.

111 Microplants of pineapple (Ananas comosus (L.) Merr., Queen Tahiti
112 variety) were inoculated during a post vitro acclimatization period with
113 root fragments of Tephrosia ehlenbergiana L. (Guillemin et al., 1991)
114 infected with Glomus sp. (LPA21) isolated from an Ivory Coast soil.
115 Experiments were conducted in two irradiated acid soils of different

116 available P status (Marlins, pH 5.0 (H₂O), 35 ppm available Olsen P, and
117 Soubré, pH 5.2 (H₂O), 3.9 ppm available Olsen P) under simulated tropical
118 conditions (300 μ E s⁻¹ m⁻², 25/25°C, 16h day, 70-80% relative humidity).
119 After 28 days, plants were transplanted individually to pots containing
120 400g of a disinfected soil : gravel (1:1, v:v) mix and grown for 13 weeks.
121 Each pot was watered daily with reverse-osmosed water and weekly with
122 40 ml Hoagland n^o2 solution (32 ppm P=3.3 mg kg⁻¹ soil) (Hoagland and
123 Arnon, 1950) or 40 ml of the same solution without P.

124

125 Measurements

126

127 Plant growth was evaluated by shoot and root fresh mass (g), and
128 phosphorus concentration (% of dry matter) was analyzed by the vanado-
129 molybdate colorimetric method (Jackson, 1958). Infection development
130 was evaluated by the method of Trouvelot et al. (1986) and expressed as
131 intensity of infection (M: % of root cortex with infection) or arbuscule
132 frequency (A: % of root cortex with arbuscules). Estimations were
133 performed after clearing and staining with trypan blue (TB) (Philipps and
134 Hayman, 1970), or by staining for succinate dehydrogenase (SDH) (Smith
135 and Gianinazzi-Pearson, 1990) or fungal alkaline phosphatase (ALP)
136 (Tisserant et al., 1993) activities, to measure total (TB), living (SDH) or
137 functional (ALP) mycorrhizal infection, respectively. Active fungal
138 biomass (g) in roots was represented by the part of root fresh mass showing
139 fungal ALP activity, for intensity of infection (M%) and for arbuscule
140 frequency (A%). Data from 4 to 5 replicate plants were statistically
141 analyzed by Newman-Keuls test.

142 RESULTS

143

144 Short-term experiment on soybean

145

146 Results are given in Table 1. There was a positive mycorrhizal effect
147 on shoot growth in soybean which increased with time. This was smaller
148 for the fertilized plants due to a lack of response of mycorrhizal plants to
149 the phosphate addition, whilst nonmycorrhizal plants showed a growth
150 enhancement with fertilization. Fungal inoculation and phosphate
151 application did not significantly modify root growth as measured at either
152 harvest. In the absence of phosphate fertilizer, the P concentration of
153 shoots was greater in mycorrhizal plants. After four weeks, the P
154 concentration in shoots was higher for fertilized plants, but after six weeks
155 it did not differ between fertilized plants and mycorrhizal plants without
156 fertilizer. After four weeks, both intensity of infection (M%) and arbuscule
157 frequency (A%) revealed by all three staining procedures were
158 significantly decreased by fertilizer application (Table 1A). The ALP-
159 active fungal biomass of root was reduced by phosphate application at four
160 weeks, but there was no effect two weeks later. After six weeks, total
161 infection estimated by trypan blue staining had increased but it continued
162 to be lower with fertilizer application (Table 1B). In contrast, the intensity
163 of infection and arbuscule frequency showing succinate dehydrogenase
164 activity decreased between 4 and 6 weeks in unfertilized plants and
165 increased in phosphate-fed plants. Fungal alkaline phosphatase activity
166 also increased between 4 and 6 weeks in fertilized plants and became
167 similar to values for unfertilized plants. These changes in the metabolic
168 activity of the fungal biomass from 4 to 6 weeks plant growth did not alter
169 the proportion of SDH-active infection showing ALP activity; the relative
170 proportion (ALP:SDH) was consistently lower in fertilized plants

171 (M%=0.47 and A%=0.33 at 4 weeks; M%=0.46 and A%=0.30 at 6 weeks)
172 than in unfertilized plants (M%=0.67 and A%=0.42 at 4 weeks; M%=0.97
173 and A%=0.51 at 6 weeks).

174

175 Long-term experiment on pineapple

176

177 Results are given in Table 2. Growth was better in endomycorrhizal
178 than nonmycorrhizal pineapple whatever the soil or fertilization treatment.
179 Nonmycorrhizal pineapple plants did not respond to phosphate
180 applications, but there were effects of applied phosphate on mycorrhizal
181 plants and these differed depending on the soil. Phosphate fertilization
182 decreased shoot and root growth of mycorrhizal plants and consequently
183 the mycorrhizal effect on shoot growth in the higher P-containing Marlins
184 soil (Table 2A), but not in the P-deficient Soubré soil (Table 2B).
185 Mycorrhizal infection and phosphate application positively affected P
186 concentrations in plant shoots.

187 Values for percentage of mycorrhizal infection as revealed by any
188 staining procedure did not differ greatly in the native soils in spite of the
189 differences in their available P contents. However, because of differences
190 in root development, ALP-active fungal biomass in roots was considerably
191 higher in plants growing in Marlins soil (Table 2A). Phosphate fertilization
192 of Marlins soil, which had the highest native available P compared to the
193 other soils, lowered the level of SDH-active fungal infection and ALP-
194 active fungal biomass in roots (Table 2A). However, only arbuscule
195 frequency estimated by alkaline phosphatase staining was lowered when
196 phosphate was added to Soubré soil (Table 2B). Thus, this was the only
197 parameter of infection that was reduced in both soils alike with applied P.
198 The level of infection after trypan blue staining did not relate to plant
199 growth, but estimations of arbuscular infection showing alkaline

200 phosphatase or succinate dehydrogenase activities were correlated with
201 plant growth in either soil (Fig. 1). No consistent changes were found in
202 the proportion of SDH-active infection showing ALP activity between soils
203 or phosphate fertilizer treatments.

204

205

206 DISCUSSION

207

208 No short-term effects of phosphate fertilization on shoot and root
209 growth were observed in fast-growing mycorrhizal soybeans, although the
210 positive response to phosphate of nonmycorrhizal plants reduced the
211 overall mycorrhizal growth effect. In contrast, phosphate fertilization had a
212 long term negative effect on slow growing mycorrhizal pineapple
213 microplants in the P-sufficient Marlins soil, although not in the P-deficient
214 Soubré soil. This could have been due to P toxicity (Antunes and Cardoso,
215 1991) since pineapple has a low P requirement and therefore should be
216 particularly sensitive to excess phosphate (Marchal, 1971; Herrera Altuve,
217 1975). Alternatively, P uptake by mycorrhizal plants under unlimited P
218 conditions could also represent a higher energy cost to the plant and so
219 depress growth (Koide, 1991). In conclusion, the present observations
220 indicate that the available P concentration existing in soils can determine
221 the effects of added phosphate on the growth of mycorrhizal pineapple
222 plants.

223 There is much evidence that high concentrations of soil P result in
224 reductions in arbuscular mycorrhizal infections evaluated by trypan blue
225 staining (Mosse, 1973; Graham et al., 1981; Trouvelot et al., 1986; Amijee
226 et al., 1989; de Miranda et al., 1989; Braunberger et al., 1991), and such an
227 effect was observed in soybean roots. Significant reductions in arbuscule

228 frequency were also observed in pineapple roots with phosphate
229 fertilization for the P-sufficient soil.

230 In the present experiment, phosphate application appears to be
231 simply delaying infection in soybean (fast-growing plant). Indeed, the
232 differences in total infection levels decreased considerably between P-
233 fertilized and unfertilized plants from 4 to 6 weeks of growth. Furthermore,
234 infection stained for SDH activity at six weeks was higher in roots of
235 phosphate-fertilized plants than in roots of unfertilized plants, suggesting
236 that the fungal tissue may be younger in the former and therefore that
237 proportionally more fungal biomass was living at six weeks in the roots of
238 fertilized plants. Smith and Gianinazzi-Pearson (1990) observed a similar
239 effect of phosphate on the development of living fungal tissue in
240 endomycorrhizal roots of Allium porrum. Delay of arbuscular mycorrhizal
241 formation by phosphate fertilization may be due to direct effects on hyphal
242 growth from propagules (spores) (Pons and Gianinazzi-Pearson, 1984),
243 and/or reduction in growth of external hyphae (Schwab et al., 1983), and/or
244 the development of entry point hyphae (Amijee et al., 1989; Smith and
245 Gianinazzi-Pearson, 1990), and/or resistance to fungal penetration of the
246 host plant (Schwab et al., 1983a). The physiological basis of these effects
247 is not known but it has been suggested that delayed or reduced fungal
248 development may be the result of a reduced carbohydrate supply from the
249 plant to the fungus at high soil P (Schwab et al., 1983b).

250 The long-term effect of phosphate fertilization on mycorrhizal
251 infection in pineapple growing in Marlins soil, on the contrary, cannot be
252 explained by a simple delay in infection development. Trypan blue staining
253 gave similar levels, but the amount of metabolically active fungal biomass
254 was lower in the phosphate fertilized plants. It has also been suggested that
255 arbuscular mycorrhiza development could be under a direct physiological
256 control through the internal P status of plant tissues (Sanders, 1975), which

257 could affect membrane permeability and therefore exchange processes
258 between fungal hyphae and host cells (Menge et al., 1978). However, the
259 amount of metabolically active fungal biomass in pineapple was also
260 consistently lower in the P-deficient Soubré soil, without any relation to
261 the P concentration in plant tissues. In Marlins soil, an excess of soil
262 phosphate (to which pineapple is sensitive) may have restricted the supply
263 of carbohydrate to the symbiotic fungi and so reduced their beneficial
264 activity (Hetrick, 1989), through a modification in their phosphate
265 metabolism.

266 In the present study, shoot growth of soybean or pineapple plants
267 was not directly related to the level of total trypan blue stained mycorrhizal
268 infection, supporting previous conclusions that this parameter is not a good
269 indicator of arbuscular mycorrhiza efficiency for plant growth (Schubert
270 and Hayman, 1986; Vierheilig and Ocampo, 1989). ALP activity of
271 arbuscular mycorrhizal fungi in soybean roots estimated from
272 electrophoretically separated isoenzymes was reduced by phosphate
273 fertilization (Gianinazzi-Pearson and Gianinazzi, 1983); in a similar way
274 here fertilization decreased percentage mycorrhizal infection as revealed
275 by ALP activity staining of roots after four weeks' plant growth, but this
276 effect disappeared after six weeks. However, phosphate fertilization did
277 influence the activity of the symbiosis and reduced the proportion of living
278 fungus showing ALP enzyme activity by 4 weeks (0.67 without P and 0.47
279 with P) and by 6 weeks (0.97 without P and 0.46 with P). A less active
280 fungal phosphate metabolism in the presence of high phosphate application
281 may contribute to the lack of response of the mycorrhizal soybean to the
282 fertilizer.

283 Vierheilig and Ocampo (1989) suggested that the amount of living
284 mycelium stained for succinate dehydrogenase activity cannot be used as
285 an indicator of efficiency of the arbuscular mycorrhizal symbiosis for plant

286 growth, but Smith and Dickson (1991) have shown that the frequency of
287 SDH-active arbuscules could reflect a surface area for nutrient exchange
288 between living symbionts and therefore symbiotic efficiency. Our results
289 for the slow-growing pineapple support this hypothesis (Fig. 1). The
290 coupling of this estimation to the staining procedure for ALP activity
291 within symbiotic fungi (Tisserant et al., 1993) could give a more
292 meaningful evaluation of the efficiency of the fungal symbiosis for plant
293 growth. For pineapple, we have observed a significant positive correlation
294 between arbuscule frequency (A%) after ALP activity staining and
295 mycorrhizal plant growth (Fig. 1). Furthermore, the proportion of
296 arbuscules showing ALP activity decreased with phosphate fertilization by
297 31% in Soubré and 50% in Marlins soils and the ALP-active fungal
298 biomass of root estimated from A% was reduced 29% and 160%,
299 respectively. These decreases in ALP-active infection coincided with
300 depressions in the growth of pineapple plants following phosphate
301 fertilization.

302 The external phase of infection also needs to be considered to better
303 understand the impact of these fungi. Graham et al. (1982) suggested that
304 the amount of external mycelium is indicative of efficiency of an
305 arbuscular mycorrhizal infection, and Sylvia (1988) showed that longevity
306 and activity of external hyphae might contribute to this. Recently, Pearson
307 and Jakobsen (1993) have reported variations between fungi in the ability
308 of their external hyphae to transport P to the root. More investigations are
309 therefore required into factors affecting the relationship between
310 physiological activities of internal and external mycelia and arbuscular
311 mycorrhizal efficiency for plant growth.

312

313

314

315 ACKNOWLEDGEMENTS

316

317 The authors thank Vitropic S.A. (Montpellier, France) for supplying
318 the micropropagated plant material and Dr J. Marchal (CIRAD, FLHOR,
319 Montpellier, France) for the mineral analysis.

320

321

322 REFERENCES

323

324 Amijee, F., Tinker, P.B. and Stribley, D.P., 1989. The development of
325 endomycorrhizal root systems. VII. A detailed study of effects of soil
326 phosphorus on colonization. *New Phytol.*, 111: 435-446.

327 Antunes, V. and Cardoso, E.J.B.N., 1991. Growth and nutrient status of
328 citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application.
329 *Plant Soil*, 131: 11-19.

330 Asimi, S., Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S., 1980. Influence of
331 increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular-
332 arbuscular mycorrhizae and Rhizobium in soybeans. *Can. J. Bot.*, 58:
333 2200-2205.

334 Bowen, G.D., Bevege, D.I. and Mosse, B., 1975. Phosphate physiology of
335 vesicular-arbuscular mycorrhizas. In: F.E. Sanders, B. Mosse and P.B.
336 Tinker (Editors), *Endomycorrhizas*. Academic Press, London, New-
337 York, San Francisco, pp. 241-260.

338 Braunberger, P.G., Miller, M.H. and Peterson, R.L., 1991. Effect of
339 phosphorus nutrition on morphological characteristics of vesicular-
340 arbuscular colonization of maize. *New Phytol.*, 119: 107-113.

341 de Miranda, J.C.C., Harris, P.J. and Wild, A., 1989. Effects of soil and
342 plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in
343 sorghum plant. *New Phytol.*, 112: 405-410.

- 344 Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. and Dexheimer, J., 1979. Enzymatic
345 studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III.
346 Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion
347 roots infected by Glomus mosseae (Nicol. & Gerd.). *New Phytol.*, 82:
348 127-132.
- 349 Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. and Trouvelot, A. (Editors), 1982.
350 Mycorrhizae, an integral part of plants : biology and perspectives for
351 their use. INRA-Press, Paris, France. 397 pp.
- 352 Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Tisserant, B. and Lemoine, M.C.,
353 1992. Protein activities as potential markers of functional
354 endomycorrhizas in planta. In: D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter and
355 I.J. Alexander (Editors), *Mycorrhizas in Ecosystems*. C.A.B
356 International Inc., Oxon, GB, pp. 333-339.
- 357 Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S., 1976. Enzymatic studies on the
358 metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Effect of mycorrhiza
359 formation and phosphorus nutrition on soluble phosphatase activities in
360 onion roots. *Physiol. Vég.*, 14: 833-841.
- 361 Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S., 1978. Enzymatic studies on the
362 metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. Soluble alkaline
363 phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiol.*
364 *Plant Path.*, 12: 45-53.
- 365 Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S., 1983. The physiology of
366 vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. *Plant Soil*, 71: 197-209.
- 367 Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S., 1986. The physiology of
368 improved phosphate nutrition in mycorrhizal plants. In: V. Gianinazzi-
369 Pearson and S. Gianinazzi (Editors), *Physiological and Genetic Aspects*
370 *of Mycorrhizae*. INRA Press, Paris, pp. 101-111.

- 371 Graham, J.H., Leonard, R.T. and Menge, J.A., 1981. Membrane-mediated
372 in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-
373 arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol.*, 68: 548-552.
- 374 Graham, J.H., Linderman, R.G. and Menge, J.A., 1982. Development of
375 external hyphae by different isolates of mycorrhizal Glomus spp. in
376 relation to colonization and growth of troyer citrange. *New Phytol.*, 91:
377 183-189.
- 378 Guillemin, J.P., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V., 1991.
379 Endomycorrhization of vitroplants of Ananas comosus : demonstration
380 of a mycorrhizal effect. *Fruits*, 46: 355-358 (in french).
- 381 Herrera Altuve, J.A., 1975. Study of P absorption and localization of
382 superphosphates in pineapple, comparing two levels of N and K, and
383 two techniques of application. *Fruits*, 30: 395-401 (in french).
- 384 Hetrick, B.A.D., 1989. Acquisition of phosphorus by VA mycorrhizal
385 fungi and the growth responses of their host plants. In: L. Boddy, R.M.
386 Marchand and D.J. Read (Editors), *Nitrogen, Phosphorus and Sulphur*
387 *Utilization by Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 205-
388 226.
- 389 Hoagland, D.R. and Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for
390 growing plants without soil. *Cir. Calif. Agric. Exp. Stn.*, 347: 1-32.
- 391 Jackson, M.L., 1958. *Soil Chemical Analysis*. Printice Hall Inc.,
392 Englewood Cliffs, New York, pp. 153-154.
- 393 Koide, R.T., 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to
394 mycorrhizal infection. *New Phytol.*, 117: 365-386.
- 395 Marchal, J., 1971. Phosphorus in pineapple. *Fruits*, 26: 189-206 (in french).
- 396 Menge, J.A., Steirle, D., Bagyaraj, D.J., Johnson, E.L.V. and Leonard,
397 R.T., 1978. Phosphorus concentrations in plants responsible for
398 inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytol.*, 80: 575-578.

- 399 Mosse, B., 1973. Plant growth responses to vesicular-arbuscular
400 mycorrhiza. IV. In soil given additional phosphate. *New Phytol.*, 72:
401 127-136.
- 402 Ollivier, B., Bertheau, Y., Diem, H.G. and Gianinazzi-Pearson, V., 1983.
403 Influence of Vigna unguiculata varieties on the effect of three vesicular-
404 arbuscular mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.*, 61: 354-358 (in
405 french).
- 406 Pearson, J.N. and Jakobsen, I., 1993. The relative contribution of hyphae
407 and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants,
408 measured by dual labelling with ^{32}P and ^{33}P . *New Phytol.*, 124: 489-494.
- 409 Philipps, J.M. and Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing
410 roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi
411 for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55: 158-161.
- 412 Plenchette, C., Furlan, V. and Fortin, J.A., 1983. Responses of
413 endomycorrhizal plants grown in a calcined montmorillonite clay to
414 different levels of soluble phosphorus. I. Effect on growth and
415 mycorrhizal development. *Can. J. Bot.*, 61: 1377-1383.
- 416 Pons, F. and Gianinazzi-Pearson, V., 1984. Influence du phosphore, du
417 potassium, de l'azote et du pH sur le comportement in vitro de
418 champignons endomycorhizogènes à vésicules et arbuscules. *Cryptog.*
419 *Mycol.*, 5: 87-100.
- 420 Sanders, F.E., 1975. The effect of foliar-applied phosphate on the
421 mycorrhizal infections of onion roots. In: F.E. Sanders, B. Mosse and
422 P.B. Tinker (Editors), *Endomycorrhizas*. Academic Press, London, pp.
423 261-276.
- 424 Schubert, A. and Hayman, D.S., 1986. Plant growth responses to vesicular-
425 arbuscular mycorrhiza : XVI. Effectiveness of different endophytes at
426 different levels of soil phosphate. *New Phytol.*, 103: 79-90.

- 427 Schwab, S.M., Menge, J.A. and Leonard, R.T., 1983a. Comparison of
428 stages of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in sudangrass
429 grown at two levels of phosphorus nutrition. *Am. J. Bot.*, 70: 1225-1232.
- 430 Schwab, S.M., Menge, J.A. and Leonard, R.T., 1983b. Quantitative and
431 qualitative effects of phosphorus on extracts and exudates of sundgrass
432 roots in relation to vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant*
433 *Physiol.*, 73: 761-765.
- 434 Smith, S.E. and Gianinazzi-Pearson, V., 1988. Physiological interactions
435 between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann.*
436 *Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 39: 221-244.
- 437 Smith, S.E. and Gianinazzi-Pearson, V., 1990. Phosphate uptake and
438 vesicular-arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. : effect of
439 photon irradiance and phosphate nutrition. *Aust. J. Plant Physiol.*, 17:
440 177-188.
- 441 Smith, S.E. and Dickson, S., 1991. Quantification of active vesicular-
442 arbuscular mycorrhizal infection using image analysis and other
443 technique. *Aust. J. Plant Physiol.*, 18: 637-648.
- 444 Sylvia, D.M., 1988. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular
445 mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.*, 20: 39-43.
- 446 Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. and Gollote, A., 1993.
447 In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity
448 for analysis of efficient arbuscular endomycorrhizal infections. *Mycol.*
449 *Res.*, 97: 245-250.
- 450 Trouvelot, A., Kough, J. and Gianinazzi-Pearson, V., 1986. Evaluation of
451 VA infection levels in root systems. Research for estimation methods
452 having a functional significance. In: V. Gianinazzi-Pearson and S.
453 Gianinazzi (Editors), *Physiological and Genetical Aspects of*
454 *Mycorrhizae*. INRA-Press, Paris, pp. 217-221 (in french).

- 455 Vierheilig, H. and Ocampo, J.A., 1989. Relationship between SDH-activity
456 and VA mycorrhizal infection. *Agric. Ecosystems Environ.*, 29: 439-
457 442.
458

Table 1

Shoot and root fresh mass, mycorrhizal effect on shoot growth, P concentration and endomycorrhizal infection (M%: intensity of infection and A%: arbuscule frequency) observed with trypan blue (TB), succinate dehydrogenase (SDH) and alkaline phosphatase (ALP) staining of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) soybean without additional phosphate (-P) or with 110 ppm of phosphate (+P) after 4 and 6 weeks

A) 4 weeks after planting

		-P		+P	
		NM	M	NM	M
Shoot fresh mass (g):		3.16a	4.06a	4.30a	4.64a
Root fresh mass (g):		1.97a	2.05a	2.20a	2.33a
P concentration (%):		0.03c	0.05b	0.07a	0.07a
Infection:					
TB	M%	0c	45.2a	0c	14.1b
	A%	0c	24.8a	0c	6.3b
SDH	M%	0c	41.2a	0c	20.8b
	A%	0c	20.6a	0c	10.2b
ALP	M%	0c	27.8a	0c	9.8b
	A%	0c	8.9a	0c	3.4b
ALP-active fungal biomass (g) per root system:					
	for M%	-	0.57a	-	0.23b
	for A%	-	0.18a	-	0.08b

Values for each line followed by different letters were significantly different ($p=0.05$).

B) 6 weeks after planting

		-P		+P	
		NM	M	NM	M
Shoot fresh mass (g):		5.163c	7.40ab	6.67b	8.30a
Root fresh mass (g):		3.36a	3.57a	4.30a	3.63a
P concentration (%):		0.03b	0.07a	0.07a	0.07a
Infection:					
TB	M%	0b	78.0a	0b	59.9b
	A%	0c	32.2a	0c	19.5b
SDH	M%	0c	28.7b	0c	47.4a
	A%	0c	14.2b	0c	23.5a
ALP	M%	0b	27.6a	0b	21.9a
	A%	0b	7.2a	0b	7.0a
ALP-active fungal biomass (g) per root system:					
for M%		-	0.98a	-	0.79a
for A%		-	0.26a	-	0.25a

Values for each line followed by different letters were significantly different ($p=0.05$).

Table 2

Shoot and root fresh mass, mycorrhizal effect on shoot growth, P concentration and endomycorrhizal infection (M%: intensity of infection and A%: arbuscule frequency) observed with trypan blue (TB), succinate dehydrogenase (SDH) and alkaline phosphatase (ALP) staining of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) watered with Hoagland solution without phosphorus (-P) or with phosphorus (+P) after 17 weeks in Marlins and Soubré soils

A) Marlins soil

		-P		+P	
		NM	M	NM	M
Shoot fresh mass (g):		11.94c	46.06a	16.59c	28.32b
Root fresh mass (g):		1.87c	6.06a	2.04c	3.90b
P concentration (%):		0.10	0.19	0.12	0.24
Infection:					
TB	M%	0b	93a	0b	92a
	A%	0c	65a	0c	55b
SDH	M%	0c	61.0a	0c	41.5b
	A%	0c	21.4a	0c	15.1b
ALP	M%	0c	29.3a	0c	21.1b
	A%	0c	12.8a	0c	7.5b
ALP-active fungal biomass (g) per root system:					
	for M%	-	1.78a	-	0.59b
	for A%	-	0.78a	-	0.29b

Values in each line followed by different letters were significantly different ($p=0.05$) for each soil

B) Soubré soil

		-P		+P	
		NM	M	NM	M
Shoot fresh mass (g):		9.79b	26.50a	8.19b	29.63a
Root fresh mass (g):		1.50b	3.36a	0.94b	3.79a
P concentration (%):		0.05	0.16	0.08	0.23
Infection:					
TB	M%	0b	89a	0b	89a
	A%	0b	48a	0b	48a
SDH	M%	0b	50.0a	0b	45.5a
	A%	0b	17.3a	0b	14.2a
ALP	M%	0b	26.0a	0b	25.1a
	A%	0c	10.8a	0c	7.4b
ALP-active fungal biomass (g) per root system:					
	for M%	-	0.58a	-	0.54a
	for A%	-	0.36a	-	0.28a

Values in each line followed by different letters were significantly different ($p=0.05$) for each soil

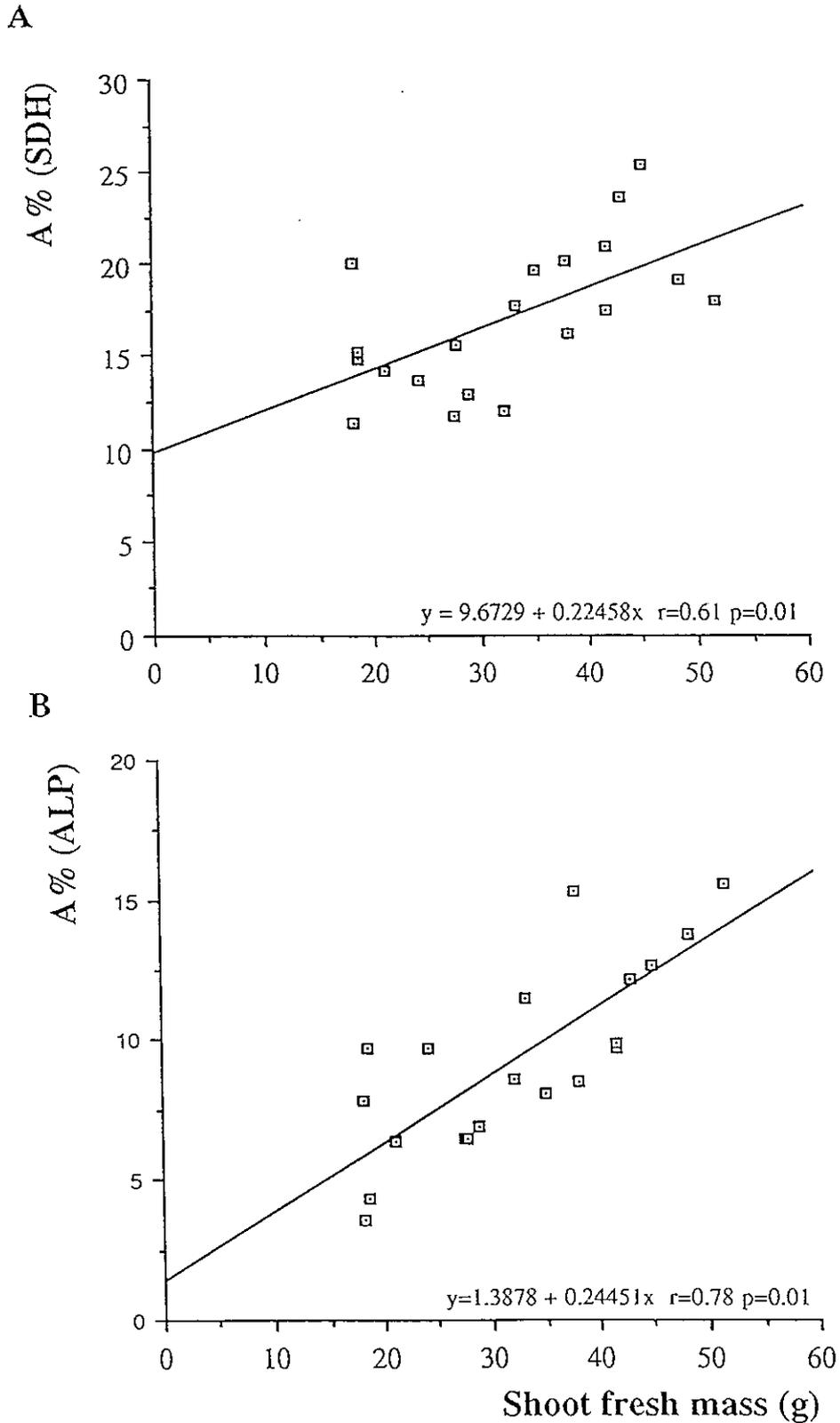


Fig. 1. Correlation between shoot fresh mass of endomycorrhizal pineapple and arbuscular frequency (A%) estimated after succinate dehydrogenase (SDH) (A) and alkaline phosphatase (ALP) (B) stainings

Fruits (soumis)

Influence des endomycorhizes à arbuscules sur la croissance et la nutrition minérale de l'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dans un sol à forte salinité

J.P. GUILLEMIN, S. GIANINAZZI, Vivienne GIANINAZZI-PEARSON et J. MARCHAL¹

Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, 21034 Dijon Cedex, France

¹ *Laboratoire de Physiologie et Biochimie, CIRAD, FLHOR, Avenue du Val de Montferrand, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France*

Résumé

Les sols à forte teneur en chlorure de sodium (NaCl) sont considérés comme peu propices à la production de l'ananas. Des *vitroplants* de deux variétés, Queen Tahiti and Cayenne lisse (clone CY0), sont inoculés avec un champignon endomycorhizogène (*Glomus* sp. (LPA21)) avant d'être repiqués dans un sol à forte salinité. Le NaCl n'influence pas la colonisation endomycorhizienne chez la variété Queen Tahiti ce qui permettrait aux plantes inoculées de maintenir leur croissance. Par contre, l'altération de l'infection symbiotique en présence de NaCl chez la variété Cayenne lisse pourrait être une cause des réductions de croissance. Pour cette variété, le maintien du niveau de P dans la partie aérienne des plantes endomycorhizées dans le sol à forte salinité ne permet pas d'assurer, seul, une croissance comparable à celle des plantes dans le sol sans NaCl. Cette étude met en évidence des différences variétales et montre l'importance des endomycorhizes dans de telles conditions.

Abstract

Soils with high level of sodium chloride (NaCl) are considered as little interesting for pineapple production. Microplants of both varieties, Queen Tahiti and Smooth Cayenne (clone CY0), were inoculated with an endomycorrhizal fungus (*Glomus* sp. (LPA21)) before outplanted in soil with salinity. NaCl did not influenced endomycorrhizal colonization of Queen Tahiti variety, thus endomycorrhiza could insure plant growth. However, alteration of endomycorrhizal infection for Smooth Cayenne variety with high level of NaCl could partly explain growth reduction. For this variety, the stability of P nutrition in shoot of endomycorrhizal plants observed with high level of NaCl can not insure alone growth of inoculated plants. These studies showed varietal differences and that endomycorrhiza can protect against abiotic stress.

Mots clés : *Ananas comosus* (L.) Merr, endomycorhizes à arbuscules, chlorure de sodium, croissance, nutrition minérale, infection endomycorhizienne

INTRODUCTION

Un apport excessif d'éléments minéraux peut provoquer des effets néfastes sur le développement de l'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr). Dans les plantations d'ananas à proximité de la mer, les apports de sels sous forme de chlorure de sodium (NaCl) provoquent des bandes nécrotiques sur les feuilles (Sideris, 1955). Cet excès de NaCl induit également une baisse du poids et de la qualité des fruits (Sideris, 1955). Les effets négatifs sont surtout attribués à l'ion chlorure (Morard et Garcia, 1977), et Su (1961) a montré que cet ion altère le remplissage des yeux, décale les dates de floraison et donc la récolte. Par conséquent, les sols contenant de forte teneur de NaCl ne sont considérés comme peu intéressants pour la production de l'ananas.

La présence de NaCl dans un sol influence la composition de la flore endomycorhizienne (Stahl et Wiallams, 1986), certains champignons symbiotiques sont capables de se développer dans de telles conditions (Pond *et al.*, 1984) ; l'association endomycorhizienne a été observée dans des environnements à forte salinité chez plusieurs espèces végétales (Khan, 1974 ; Rosema *et al.*, 1986 ; van Duin *et al.*, 1989 ; Cooke et Lefor, 1990 ; Sengupta et Chaudhuri, 1990). Les endomycorhizes sont connues pour influencer positivement la nutrition minérale et la résistance des plantes à des stress aussi bien abiotiques que biotiques (Gianinazzi *et al.*, 1982 ; Harley et Smith, 1983). Plusieurs articles rapportent que l'endomycorhization est capable de compenser les diminutions de croissance induite par le NaCl observée chez les plantes non infectées (Hirrel et Gerdemann, 1980 ; Ojala *et al.*, 1983 ; Pfeiffer et Bloss, 1988 ; Dixon *et al.*, 1993). Cette tolérance des plantes à la forte salinité serait due, au moins partiellement, à l'augmentation de la nutrition minérale, en particulier en phosphore. Cependant, Guttay (1976) a montré que pour l'érable du Canada, les endomycorhizes n'ont pas été capables de compenser la croissance de ce dernier.

Cette étude a pour but d'étudier la tolérance des *vitroplants* endomycorhizés d'ananas dans un sol à fortes teneurs en NaCl afin d'évaluer l'importance de cette symbiose dans de telles conditions de culture.

MATERIEL ET METHODES

Deux variétés d'ananas micropropagés (Queen Tahiti et Cayenne lisse (clone CY0)) et le champignon endomycorhizogène *Glomus* sp. (LPA21) ont été utilisés et les expériences ont été conduites dans une salle climatisée aux conditions tropicales ($300\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-2}$, 29-25°C, 12/12h, 70-90% d'humidité relative) et dans un sol acide (Marlins, pH 5.0, 35 ppm de P) stérilisé aux rayons γ (10kGy).

Les *vitroplants* sont inoculés ou non à la sortie des conditions axéniques avec des fragments d'endomycorhizes de *Tephrosia ehlenbergiana* selon la méthode décrite par Guillemain *et al.* (1991). A la fin de la période d'acclimatation appelée sevrage (4 semaines),

les plants sont repiqués individuellement dans des pots contenant 400g d'un mélange de terre irradiée et de gravier stérilisé à la vapeur (1:1, v:v). Chaque pot est arrosé quotidiennement avec de l'eau et reçoit deux fois par semaine 20 ml de solution nutritive Hoagland n°2 (Hoagland et Arnon, 1950) sans phosphore. Le NaCl est apporté au mélange de terre:gravier au moment du repiquage à raison 0, 2 et 5 g par kg de substrat de culture.

Après trois mois de croissance, les paramètres suivants ont été évalués : surface foliaire (cm²), poids de matière fraîche de la partie aérienne et racinaire (g) et poids de matière sèche de la partie aérienne (g). N, P, K, Ca et Mg ont été analysés (Warner and Jones 1967, Anonymous 1968, 1972). L'infection endomycorhizienne est estimée avec la méthode de Trouvelot *et al.* (1986) après coloration non vitale des racines au bleu de trypan (Philipps et Hayman, 1970). Pour la variété Cayenne lisse, la coloration des activités succinate déshydrogénase (SDH) (Smith et Gianinazzi-Pearson, 1990) et phosphatase alcaline (PAL) (Tisserant *et al.*, 1993) a été réalisée et a permis d'observer les hyphes vivants (SDH) et fonctionnels (PAL).

RESULTATS

L'intensité de l'infection (M%) et la fréquence arbusculaire (A%) évaluées après coloration non vitale chez la variété Queen Tahiti ne sont pas modifiées par la salinité (figure 1A). De même l'endomycorhization améliore la croissance des plantes, y compris aux doses les plus élevées de NaCl. Toutefois en présence de NaCl/kg de sol, l'effet endomycorhizien est moins important (-22% à 2g de NaCl et -39% à 5g de NaCl) (tableau 1). L'augmentation de la salinité du sol réduit le rapport racine/partie aérienne des plantes endomycorhizées mais il reste inférieure aux témoins (figure 2A). Par contre, la taux de matière sèche de la partie aérienne augmente chez les plantes endomycorhizées avec élévation de la salinité (figure 2B).

Chez la variété Cayenne lisse, l'intensité de l'infection (M%) totale est significativement réduite à la dose la plus élevée de NaCl dans le sol (figure 1B) et la fréquence des arbuscules (A%) l'est pour les deux niveaux de salinité (figure 1C). En ce qui concerne la coloration de l'activité SDH, seules les valeurs de A% sont significativement diminuées par la salinité la plus élevée (figure 1C). L'estimation de l'infection endomycorhizienne après coloration de l'activité Pase donne des valeurs plus faibles chez les plantes en présence de NaCl aussi bien pour M% que pour A% (figures 1B, 1C). Cela se traduit par une réduction plus importante de la croissance des plantes endomycorhizées (-56% à 2 g de NaCl et -228% à 5g de NaCl).

La variété Cayenne lisse est plus sensible à la salinité que la variété Queen Tahiti et en présence de la plus forte teneur en NaCl, la croissance des *vitro*plants est fortement altérée (tableau 2). Le rapport R/A chez cette variété est inversé par le plus haut niveau de salinité (figure 2C) et ces taux de matière sèche aérienne sont augmentées chez les plantes non endomycorhizées (figure 2D).

L'endomycorhization accroît les teneurs et les quantités en P, Ca et Mg dans la partie aérienne chez la variété Queen Tahiti avec ou sans apport de NaCl. Pour N et K, les teneurs sont plus faibles chez les plantes endomycorhizées probablement du à un effet de dilution. Plus l'effet endomycorhizien est important, plus les teneurs sont faibles (tableau 3). Les quantités absorbées de N et K sont toujours supérieures chez les plantes endomycorhizées (tableau 3). Chez la variété Cayenne lisse, l'augmentation de la salinité se traduit par des teneurs accrues en N, K et P chez les plantes endomycorhizées. Par contre la salinité induit un faible effet négatif sur les teneurs en Mg (tableau 4). Les concentrations en Ca sont toujours plus élevées chez cette variété que la variété Queen Tahiti (tableaux 3, 4). Les plantes endomycorhizées de la variété Cayenne lisse absorbent de plus grande quantité d'élément minéraux que les plantes non endomycorhizées (tableau 4).

DISCUSSION

Les endomycorhizes sont connues pour améliorer la tolérance au NaCl des plantes telles que l'oignon, la tomate, le piment et le goyavier (Hirrel et Gerdemann, 1980 ; Ojala *et al.*, 1983 ; Poss *et al.*, 1985 ; Pfeiffer et Bloss, 1988). Par contre pour le citrus, la résistance à la salinité n'est pas augmentée par la présence des endomycorhizes (Graham et Syvertsen, 1987, 1989). L'ensemble de ces travaux effectué sur les effets de la salinité sur la croissance des plantes montrent des effets variables en fonction de la plante étudiée. En ce qui concerne l'ananas, les effets sont distincts avec la variété bien que les plantes endomycorhizées présentent toujours une meilleure croissance. La variété Queen Tahiti est plus tolérante au NaCl. La variété Cayenne lisse endomycorhizée ou non voit sa croissance diminuée d'autant plus que le taux de NaCl s'élève. Ce type d'influence de la teneur a été aussi observée sur la croissance de citrus par Graham et Syvertsen (1989). Par contre, l'augmentation de la salinité n'a pas de conséquence sur la croissance d'une graminée (*Distichlis spicata*) (Allen et Cunningham, 1983).

La tolérance au NaCl observée chez certaines plantes est attribuée par plusieurs auteurs à une meilleure nutrition minérale, en particulier en phosphore (Ojala *et al.*, 1983 ; Duke *et al.*, 1986 ; Hartmond *et al.*, 1987). En présence de NaCl, l'effet endomycorhizien sur le phosphore est plus marqué. Toutefois chez les ananas nonmycorhizées de la variété Queen Tahiti, la croissance n'est pas altérée malgré la baisse des teneurs de phosphore. Le maintien du niveau de phosphore chez la variété Cayenne lisse endomycorhizée n'a pas permis d'assurer une croissance comparable à celle des plantes n'ayant pas reçu de NaCl. Le phosphore ne semble pas capable, à lui seul, de stabiliser la croissance de l'ananas. D'autres mécanismes doivent être impliqués. En accord avec Allen et Cunningham (1983), et Poss *et al.* (1985), nous avons constaté que la concentration en potassium augmente chez toutes les plantes endomycorhizées en présence de NaCl. Afin de réduire l'absorption de sodium, les pompes à K^+-Na^+ induiraient un accroissement de l'entrée de K dans la plante (Raines, 1972

; Yeo, 1983), ce mécanisme semble plus actif en présence des endomycorhizes. Les endomycorhizes améliorent l'assimilation de l'ammonium, connu pour être peu mobile dans le sol (Barea *et al.*, 1987 ; Frey et Schüepp, 1993), en stimulant l'activité de la glutamine synthétase (Smith *et al.*, 1985). Chez les deux variétés d'ananas, les plantes endomycorhizées renferment de plus grandes quantités d'azote. Dans les sols acides, l'azote est plus présente sous forme de d'ammonium et on peut considérer que les endomycorhizes interviendraient en augmentant l'absorption de l'azote sous forme d'ammonium (Barea, 1991).

Le développement de l'infection endomycorhizienne pourrait jouer un rôle dans la tolérance au NaCl. En accord avec les résultats obtenus chez le citrus (Graham et Syvertsen, 1989), l'absence d'altération de la colonisation symbiotique par le NaCl chez la variété Queen Tahiti permettrait aux plantes endomycorhizées de maintenir leur croissance. D'autres travaux ont montré que l'application de NaCl réduit la colonisation symbiotique dans les racines des plantes (Ojala *et al.*, 1983 ; Duke *et al.*, 1987). Le NaCl présent à 12 g/kg de sol diminue la croissance et l'infection endomycorhizienne de l'oignon et du piment (Hirrel et Gerdemann, 1980), de telles baisses sont observées avec des niveaux plus faibles de salinité chez la variété Cayenne lisse. L'intensité de l'infection endomycorhizienne de la variété Cayenne lisse a été estimée après coloration non vitale et des activités SDH et Pase. L'évaluation de l'infection basée sur la fréquence arbusculaire (A%) après coloration de l'activité Pase serait celle qui refléterait le mieux l'efficacité de la symbiose (Guillemin *et al.*, 1993). En présence de NaCl, la proportion d'arbuscules montrant une activité Pase par rapport à la fréquence arbusculaire totale n'est pas modifiée (témoin : 23%, 2g de NaCl/kg de sol : 20% et 5g de NaCl/kg de sol : 21%). C'est donc la baisse significative de la quantité de champignon efficace qui pourrait être une des causes de la réduction de croissance des ananas endomycorhizés. Le NaCl pourrait avoir un effet direct sur la mise en place et le développement de l'infection symbiotique. Hirrel (1981) et Estaun (1989) ont montré que la germination de *Gigaspora margarita* et de *Glomus mosseae* est altérée par la salinité. La croissance des champignons endomycorhiziens est réduite dans des sols à forte salinité (White *et al.*, 1989).

Les endomycorhizes influencent la physiologie de l'ananas, en effet, elles réduisent la proportion racinaire chez la variété Queen Tahiti par rapport à celle de la partie aérienne, cet effet est amplifié en présence de NaCl dans le sol. Rosendahl et Rosendahl (1991) ont montré une diminution de la surface racinaire en présence de NaCl dans la sol, la réduction du développement racinaire permettrait une meilleure tolérance à ce stress. Ce phénomène n'est pas observé chez les plantes endomycorhizées de la variété Cayenne lisse qui résistent beaucoup moins bien au NaCl. Des sojas verts endomycorhizés accumulent de plus grande quantité de proline, facteur considéré capable d'améliorer la tolérance au NaCl (Jindal *et al.*, 1993).

Les endomycorhizes sont connues pour aussi améliorer la tolérance de certaines plantes au stress hydrique (Levy et Krikun, 1980). Ces deux phénomènes soulignent l'intérêt de la colonisation endomycorhizienne dans des régions arides ou semi-arides (Jasper *et al.*, 1989).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Vitropic S.A. (Montpellier, France) pour les *vitroplants* d'ananas.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALLEN (Edith B.) et CUNNINGHAM (G.L.). 1983.

Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Distichlis spicata* under three salinity levels.

New Phytol., 93, 227-236.

ANONYMOUS, 1968.

Comité Inter Instituts pour le diagnostic foliaire. Méthode de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux.

Coll. Eur. Méd. sur le contrôle de l'alimentation des Plantes cultivées, Seville, 12-20.

ANONYMOUS, 1972.

Comité Inter Instituts pour le diagnostic foliaire. Méthode de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux.

Coll. Eur. Méd. sur le contrôle de l'alimentation des Plantes cultivées, Budapest, 144-150.

BAREA (J.M.) 1991.

Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility.

In : *Advances in Soil Science*, Volume 15. Springer-Verlag, Inc., New York : 1-40.

BAREA (J.M.), AZCON-AGUILAR (Conception) et AZCON (R.) 1987.

Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N₂ fixation and N uptake from soil as assessed with a N¹⁵ technique under field conditions.

New Phytol., 106, 717-725.

COOKE (J.C.) et LEFOR (M.W.) 1990

Comparaison of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plants from disturbed and adjacent undisturbed regions of a coastal salt marsh in Clinton, Connecticut, USA.

Environ. Management, 14, 131-137.

DIXON (R.K.), GARG (V.K.) et RAO (M.V.). 1993.

Inoculation of *Leucaena* and *Prosopis* seedlings with *Glomus* and *Rhizobium* species in saline soil: rhizosphere relations and seedling growth.

Arid Soil Res. Rehabil., 7, 133-144.

DUKE (E.R.), JOHNSON (C.R.) et KOCH (K.E.). 1986.

Accumulation of phosphorus, dry matter and betaine during NaCl stress of split-root citrus seedlings colonized with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on zero, one or two halves.

New Phytol., 104, 583-590.

ESTAUN (M.Victoria). 1989.

Effect of sodium chloride and mannitol on germination and hyphal growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*.

Agric. Ecosystems Environ., 29, 123-129.

FREY (B.) et SCHÜEPP (H.) 1993.

Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L.

New Phytol., 124, 221-230.

GIANINAZZI (S.), GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne) et TROUVELOT (A.). 1982.

"Les Mycorhizes, Partie Intégrante de la Plante : Biologie et Perspective d'Utilisation."

INRA-Presses, Paris, France, 397 p.

GRAHAM (J.H.) et SYVERTSEN (J.P.). 1987.

Salinity stress effects on mycorrhizal and P-fertilized non-mycorrhizal citrus species

In : *Mycorrhizal in the Next Decade: Practical Applications and Research Priorities*. University of Florida, Gainesville : Sylvia (D.M.), Hung (L.L.) and Graham (J.H.) eds, 249.

GRAHAM (J.H.) et SYVERTSEN (J.P.). 1989.

Vesicular-arbuscular mycorrhizas increase chloride concentration in citrus seedlings.

New Phytol., 113, 29-36.

GUILLEMIN (J.P.), GIANINAZZI (S.) et GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne). 1991.

L'endomycorhization de *vitro*plants d'*Ananas comosus* : mise en évidence d'un effet mycorrhizien.

Fruits, 46, 355-358.

GUILLEMIN (J.P.), OROZCO (Maria O.), GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne). et GIANINAZZI (S.). 1993

Influence of phosphate fertilization on fungal alkaline phosphatase activity in arbuscular mycorrhiza.

Agric. Ecosystems Environ., soumis.

GUTTAY (A.J.R.). 1976.

Impact of deicing salts upon the endomycorrhizae of roadside sugar maples.

Soil Sci. Soc. Am.J., 40, 952-954.

HARLEY (J.L.) et SMITH (Sally E.). 1983

Mycorrhizal Symbiosis

Academic Press Inc, London-New York, 483p.

HARTMOND (U.), SCHAESBERG (N.V.), GRAHAM (J.H.) et SYVERTSEN (J.P.). 1987.

Salinity and flooding stress effects on mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus rootstock seedlings.

Plant Soil, 104, 37-43.

HIRREL (M.C.) et GERDEMANN (J.W.). 1980.

Improved growth of onion and bell pepper in saline soils by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi.

Soil Sci. Soc. Am.J., 44, 654-655.

HIRREL (M.C.). 1981.

The effect of sodium chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*.

Mycologia, 73, 610-617.

HOAGLAND (D.R.) et ARNON (D.I.). 1950.

The water-culture method for growing plants without soil.

Cit. Calif. Agric. Exp. Stn., 347, 1-32.

JASPER (D.A.), ABBOTT (L.K.) et ROBSON (A.D.). 1989.

Acacias respond to additions of phosphorus and to inoculation with VA mycorrhizal fungi in soils stockpiled during mineral sand mining.

Plant Soil, 115, 99-108.

JINDAL (V.), ATWAL (A.), SEKHON (B.S.) et SINGH (R.). 1993.

Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on metabolism of moong plants under NaCl salinity.

Plant Physiol. Biochem., 31, 475-481.

KHAN (A.G.). 1974.

The occurrence of mycorrhizas in halophytes, hydrophytes and xerophytes, and of *Endogone* spores in adjacent soils.

J. Gen. Microbiol., 81, 7-14.

LEVY (Y.) et KRIKUN (J.). 1980.

Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza on *Citrus jambhiri* water relation.

New Phytol., 85, 25-31.

MORARD (P.) et GARCIA (M.). 1977.

La salinité due au chlorure de sodium et les végétaux supérieurs.

Fruits, 32, 263-267.

OJALA (J.C.), JARRELL (W.M.), MENGE (J.A.) et JOHNSON (E.L.V.). 1983.

Influence of mycorrhizal fungi on the mineral nutrition and yield of onion in saline soil.

Agron.J., 75, 255-259.

PFEIFFER (C.M.) et BLOSS (H.E.). 1988.

Growth and nutrition of guayule (*Parthenium argentatum*) in a saline soil as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilization.

New Phytol., 108, 315-321.

PHILIPPS (J.M.) et HAYMAN (D.S.). 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.

POND (E.C.), MENGE (J.A.) et JARRELL (W.M.). 1984.

Improved growth of tomato in salinized soil by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi collected from saline soils.

Mycologia, 76, 74-84.

POSS (J.A.), POND (E.C.), MENGE (J.A.) et JARRELL (W.M.). 1985.

Effect of salinity on mycorrhizal onion and tomato in soil with and without additional phosphate.

Plant Soil, 88, 307-319.

RAINES (D.W.). 1972.

Salt transport by plants in relation to salinity.

Ann. Rev. Plant Physiol., 23, 367-388.

ROSENDAHL (Connie N.) et ROSENDAHL (S.). 1991.

Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) on the response of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salt stress.

Environ. Experim. Bot., 31, 313-318.

ROZEMA (J.), ARP (W.), van DIGGELEN (J.), van ESBROEK (M.), BROEKMAN (R.) et PUNTE (H.). 1986.

Occurrence and ecological significance of vesicular-arbuscular mycorrhiza in the salt marsh environment.

Acta Bot. Neerl., 35, 457-467.

SENGUPTA (A.) et CHAUDHURI (S.). 1990.

Vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in pioneer salt marsh plants of the Ganges river delta in West Bengal (India)

Plant Soil, 122, 111-113.

SIDERIS (C.P.). 1955.

Effects of sea water sprays on pineapple plants.

Phytopathology, 45, 590-594.

SMITH (Sally E.) et GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne). 1990.

Phosphate uptake and vesicular-arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. : effect of photon irradiance and phosphate nutrition.

Aust. J. Plant Physiol., 17, 177-188.

SMITH (Sally E.), ST JOHN (B.J.), SMITH (F.A.) et NICHOLAS (D.J.D.) 1985.

Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition

New Phytol., 99, 211-227.

SU (N.R.). 1961.

Potassium requirements of formosan pineapple soils.

Soils Fertilizers, 24, 60-73.

STAHL (P.D.) et WILLIAMS (S.E.). 1986.

Oil shale process water affects activity of vesicular-arbuscular fungi and *Rhizobium* 4 years after application to soil.

Soil. Biol. Biochem., 18, 451-455.

TISSERANT (B.), GIANINAZZI-PEARSON (Vivienne), GIANINAZZI (S.) et GOLLOTE (Armelle). 1993.

In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular endomycorrhizal infections.

Mycol. Res., 97, 245-250.

van DUIN (W.E.), ROZEMA (J.) et ERNST (W.H.O.). 1989.

Seasonal and spatial variation in the occurrence of vesicular-arbuscular (VA) mycorrhiza in salt marsh plants.

Agric. Ecosystems Environ., 29, 107-110.

WARNER (M.H.) et JONES (J.B.) 1967.

Determination of total tissue using a Technicon Kjeldahl Nitrogen apparatus.

Technicon Symposia. In : Automation in analytical chemistry. Vol. I. Publish : Mediad Inco, New York, 145-148.

WHITE (J.M.), MUNN (L.C.) et WILLIAMS (S.E.) 1989.

Edaphic and reclamation aspects of vesicular-arbuscular mycorrhizae in Wyoming red desert soils.

Soil Sci. Soc. Am. J., 53, 86-90.

YEO (A.R.) 1983.

Salinity resistance: Physiologies and prices.

Physiol. Plant., 58, 214-222.

TABLEAU 1 - Surface foliaire (cm²), poids de matière fraîche de la partie aérienne (Pf. aérien) et des racines (Pf. racinaire) (g) et poids de matière sèche de la partie aérienne (Ps. aérien) (g) d'ananas de la variété Queen Tahiti nonmycorhizés (NM) et endomycorhizés (M) à trois niveaux de salinité (0, 2 et 5 g de NaCl/kg de sol).

Salinité (NaCl)	0g/kg de sol		2g/kg de sol		5g/kg de sol	
	NM	M	NM	M	NM	M
Surface foliaire	249,2c	514,4a	225,1c	452,4a	212,0c	365,0ab
Pf. aérien	21,03c	41,57a	21,40c	37,80a	19,24c	30,75ab
Pf. racinaire	1,90b	3,21a	1,70b	2,63a	1,52b	2,04ab
Ps. aérien	2,27b	4,57a	2,41b	4,75a	2,13b	3,75a

Pour chaque ligne, les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes à P<0,05.

TABLEAU 2 - Surface foliaire (cm²), poids de matière fraîche de la partie aérienne (Pf. aérien) et des racines (Pf. racinaire) (g) et poids de matière sèche de la partie aérienne (Ps. aérien) (g) d'ananas de la variété Cayenne lisse nonmycorhizés (NM) et endomycorhizés (M) à trois niveaux de salinité (0, 2 et 5 g de NaCl/kg de sol).

Salinité (NaCl)	0g/kg de sol		2g/kg de sol		5g/kg de sol	
	NM	M	NM	M	NM	M
Surface foliaire	299,7b	640,9a	251,6bc	361,3b	81,3d	167,8c
Pf. aérien	23,54bc	54,87a	19,82c	30,52b	5,53e	12,52d
Pf. racinaire	2,63b	5,48a	2,01b	2,86b	0,44d	1,19c
Ps. aérien	2,08b	5,02a	1,70bc	2,53b	0,56d	1,10c

Pour chaque ligne, les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes à P<0,05.

TABLEAU 3 - Teneur (% de matière sèche) et contenu (g) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas de la variété Queen Tahiti nonmycorhizés (NM) et endomycorhizés (M) à trois niveaux de salinité (0, 2 et 5 g de NaCl/kg de sol).

Salinité (NaCl)		0g/kg de sol		2g/kg de sol		5g/kg de sol	
Mycorhization		NM	M	NM	M	NM	M
N	teneur	2,24	1,61	2,06	1,88	2,11	1,94
	contenu	5,08	7,36	4,96	8,93	4,49	7,28
P	teneur	0,15	0,18	0,09	0,18	0,07	0,16
	contenu	0,34	0,83	0,22	0,86	0,15	0,60
K	teneur	5,13	2,94	5,23	3,84	5,26	4,13
	contenu	11,65	13,44	12,60	18,24	11,21	15,49
Ca	teneur	0,65	0,82	0,69	0,86	0,61	0,75
	contenu	1,48	3,75	1,66	4,09	1,30	2,81
Mg	teneur	0,28	0,32	0,29	0,34	0,27	0,32
	contenu	0,64	1,52	0,70	1,62	0,58	1,20

TABLEAU 4 - Teneur (% de matière sèche) et contenu (g) en éléments minéraux dans la partie aérienne d'ananas de la variété Cayenne lisse nonmycorhizés (NM) et endomycorhizés (M) à trois niveaux de salinité (0, 2 et 5 g de NaCl/kg de sol).

Salinité (NaCl)		0g/kg de sol		2g/kg de sol		5g/kg de sol	
Mycorhization		NM	M	NM	M	NM	M
N	teneur	2,03	1,99	2,59	2,34	1,93	2,43
	contenu	4,22	9,99	4,40	5,92	1,08	2,67
P	teneur	0,13	0,13	0,15	0,19	0,10	0,16
	contenu	0,27	0,65	0,26	0,48	0,06	0,18
K	teneur	4,46	4,07	5,61	5,11	3,56	5,00
	contenu	9,28	20,43	9,54	12,92	2,00	5,50
Ca	teneur	1,05	1,17	1,13	1,11	1,21	1,01
	contenu	2,18	5,87	1,92	2,78	0,68	1,11
Mg	teneur	0,35	0,34	0,27	0,29	0,29	0,26
	contenu	0,73	1,71	0,46	0,73	0,16	0,29

Fig. 1 - Intensité de l'infection endomycorhizienne (M%) et fréquence arbusculaire (A%) observées après la coloration (1) chez la variété Queen Tahiti (A) et observées après les colorations (1, 2 et 3) chez la variété Cayenne lisse (B, C) croissant à trois niveaux de salinité (0, 2 et 5 g de NaCl/kg de sol). Les valeurs pour chaque coloration suivies par des lettres différentes sont significativement différentes à $P < 0,05$.

(1) coloration au bleu de trypan, (2) coloration de l'activités succinate déshydrogénase (SDH) et (3) coloration de l'activité phosphatase alcaline (Pase)

Fig. 2 - Rapport du poids de la matière fraîche de la partie racinaire sur le poids de la matière fraîche de la partie aérienne (A, C) et taux de matière sèche (%) de la partie aérienne d'ananas (B, D) et des variétés Queen Tahiti (A, B) et Cayenne lisse (C, D) nonmycorhizés (NM) et endomycorhizés (M) à trois niveaux de salinité (0, 2 et 5 g de NaCl/kg de sol). Les valeurs pour chaque paramètre suivies par des lettres différentes sont significativement différentes à $P < 0,05$.

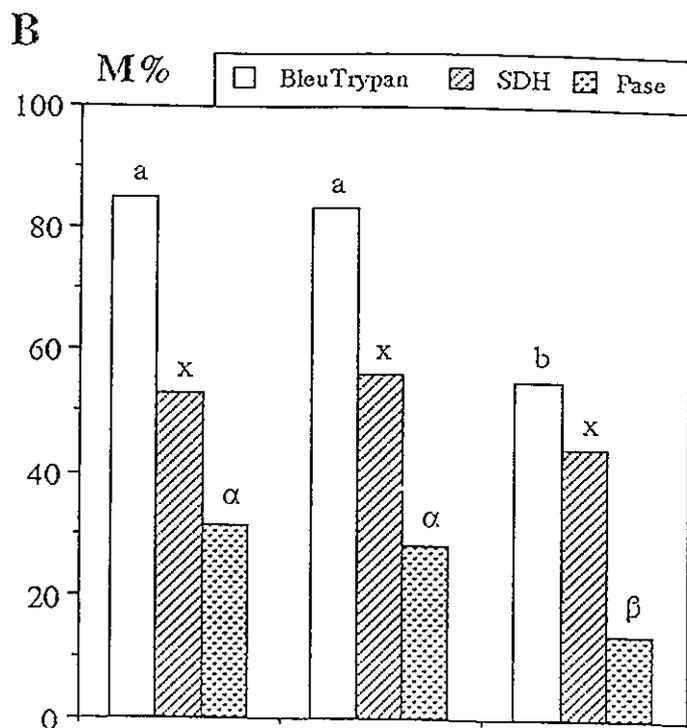
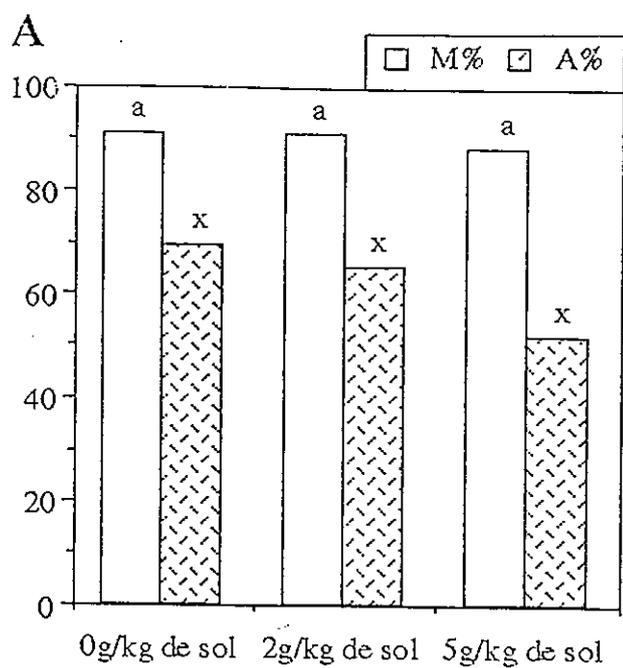
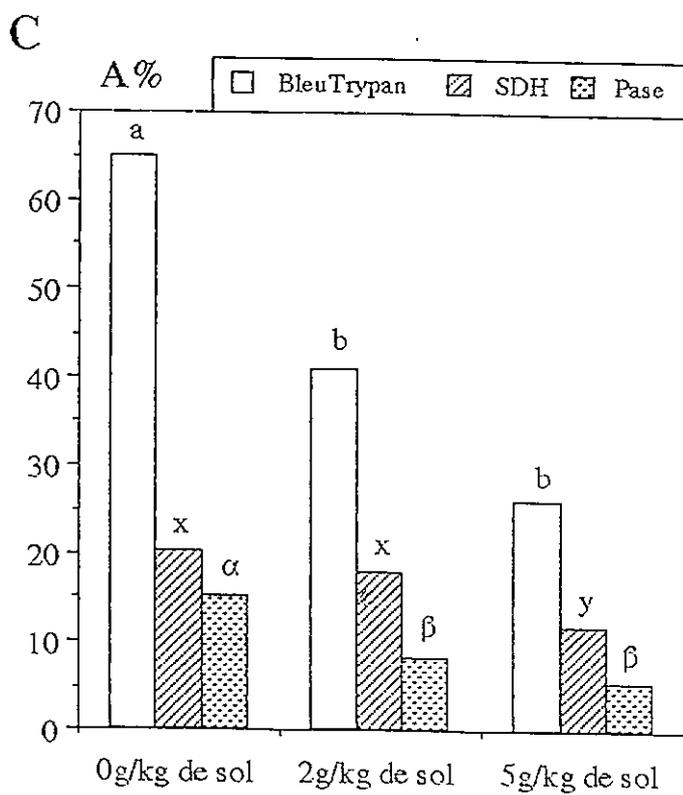


Figure 1 :



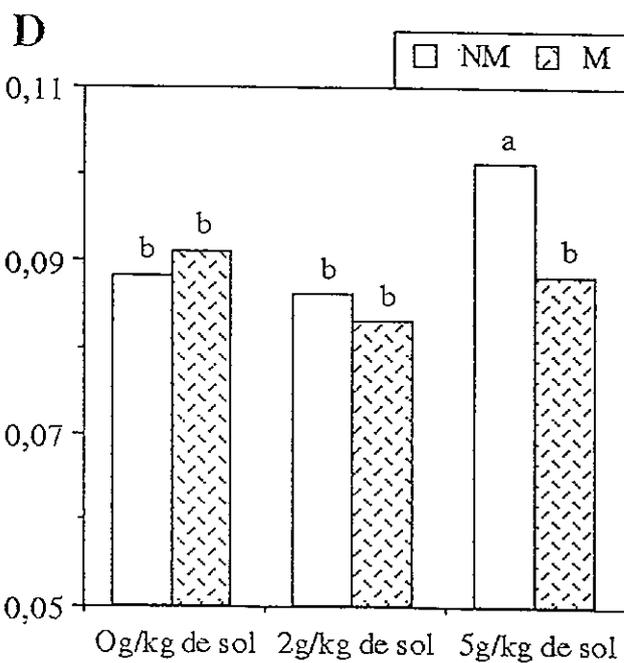
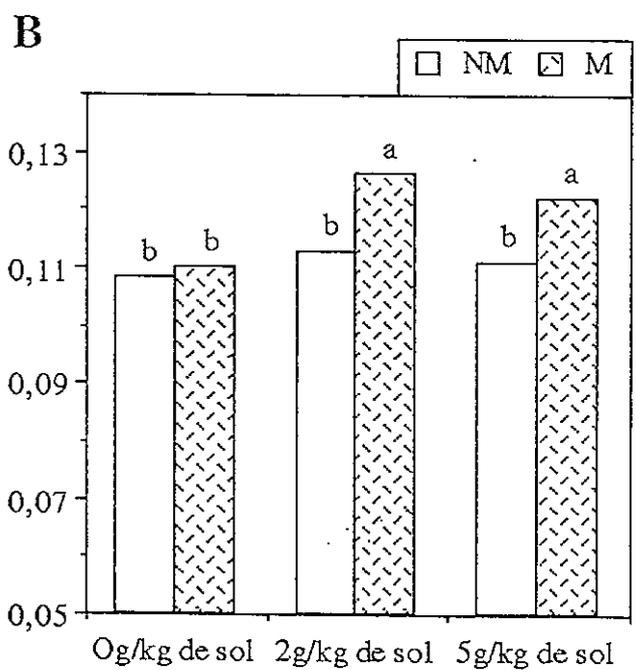
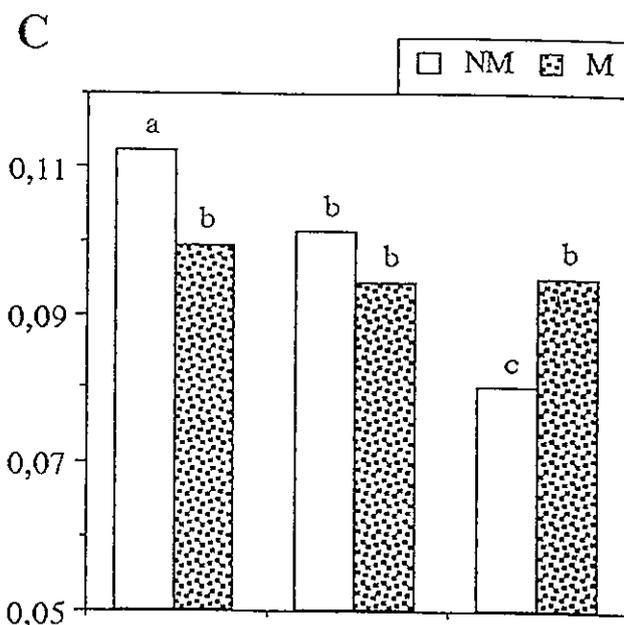
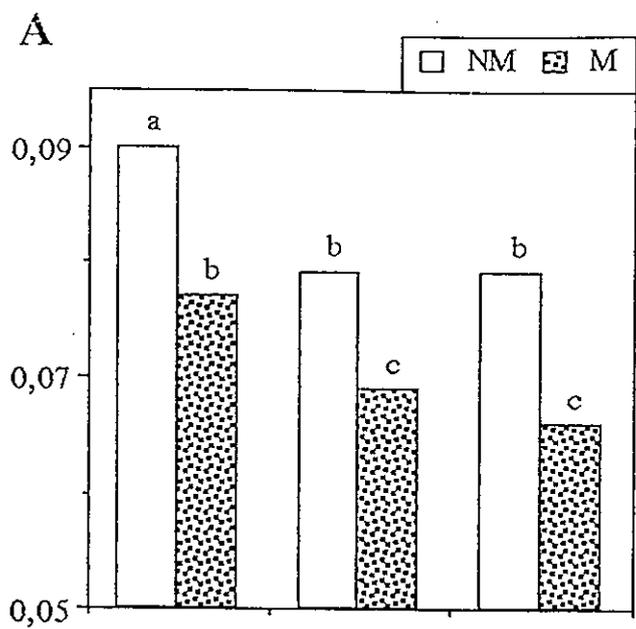


Figure 2 :

Agricultural Science of Finland, 1994 (sous presse)

1
2
3 CONTROL BY ARBUSCULAR
4 ENDOMYCORRHIZAE OF *PRATYLENCHUS*
5 *BRACHYURUS* IN PINEAPPLE MICROPLANTS
6
7

8 JEAN-PHILIPPE GUILLEMIN ¹⁾, SILVIO GIANINAZZI ¹⁾, VIVIENNE
9 GIANINAZZI-PEARSON ¹⁾ and JEAN MARCHAL ²⁾
10

11 ¹⁾*Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS, Station de Génétique et*
12 *d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, 21034 Dijon Cedex, France*
13

14 ²⁾*Laboratoire de Physiologie et Biochimie, CIRAD, FLHOR, Avenue du*
15 *Val de Montferrant, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France*
16
17
18
19
20

21 GUILLEMIN, J.P. ¹⁾, GIANINAZZI, S. ¹⁾, GIANINAZZI-PEARSON,
22 V. ¹⁾ and MARCHAL, J. ²⁾ 1993. Control by arbuscular
23 endomycorrhizae of root colonisation by *Pratylenchus*
24 *brachyurus* in pineapple microplants. Agric. Sci. Finl. (1)
25 Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS, Station de
26 Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, Dijon
27 Cédex, France, ²⁾ Laboratoire de Physiologie et Biochimie,

28 CIRAD, FLHOR, Avenue du Val de Montferrant, BP 5035,
29 34032 Montpellier Cedex 01, France).

30

31 *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filip & Schurr-Steekh. has
32 been reported in association with pineapple roots and is
33 considered as an important pathogen on pineapple. Microplants
34 of Queen Tahiti, Smooth Cayenne and Spanish varieties were
35 inoculated with *Glomus* sp. (LPA21) and/or *P. brachyurus* at
36 transplanting from axenic conditions or one month later. The
37 presence of the nematode did not affect shoot growth of
38 endomycorrhizal plants. Late *P. brachyurus* inoculation did not
39 influence growth of nonmycorrhizal plants while early pathogen
40 application caused reductions in nonmycorrhizal plant growth.
41 Nematode number per g of root was significantly decreased for
42 endomycorrhizal plants when pathogen was introduced at
43 outplanting or one month later. Nematode inoculation affected
44 endomycorrhizal colonization estimated by non vital staining for
45 the Queen Tahiti and Spanish varieties but did not alter
46 development of metabolically active arbuscules in roots of the
47 three varieties. P concentration of endomycorrhizal shoots was
48 higher for all treatments and *P. brachyurus* tended to decrease
49 mineral concentration of nonmycorrhizal plants with early
50 nematode application.

51

52 Key words: *Ananas comosus*, endomycorrhizal infection,
53 *vitro*plant, pathogen nematode, interactions, integrated control

54

55

56 **Introduction**

57

58 Arbuscular endomycorrhizal fungi (AMF) and soilborne pathogens occur
59 together in the rhizosphere around plant roots. Arbuscular
60 endomycorrhizae can positively influence plant development by improving
61 mineral nutrition, water uptake, hormone production, resistance to root
62 pathogen or tolerance to pesticides (GIANINAZZI et al. 1982). GUILLEMIN
63 et al. (1991) have shown the benefits to the growth of pineapple
64 microplants of inoculation with endomycorrhizal fungi.

65 Nematodes are considered an important factor in reducing pineapple
66 production. *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey) Filip & Schurr-Steekh.
67 causes widespread damage in pineapple plantations, particularly in the
68 Ivory Coast. It was described for the first time in pineapple roots by
69 GODFREY (1929) in Hawaii. This nematode penetrates the elongation zone
70 of roots and develops in the cortical tissue and vascular cylinder
71 (GUÉROUT 1975). Secondary roots can then be destroyed by nematode
72 infestation giving a root system that is essentially composed of primary
73 roots (CASWELL et al. 1990). This endopathogen also modifies vegetative
74 plant growth, with reductions in leaf area, and causes a delay in shoot
75 development (LACOEUILHE and GUÉROUT 1976. KEETCH 1982).
76 Decreases in fruit yield can be in the region of 30 to 35% and the number
77 of suckers may be reduced to 80% (LACOEUILHE and GUÉROUT 1976,
78 KEETCH 1982). *P.brachyurus* has a high impact in the Ivory Coast
79 (GUÉROUT 1975), because pineapple is often grown in soil with a pH
80 adapted to nematode proliferation (pH 5 to 5.5) (SARAH 1991).

81 The potential of AMF to alleviate nematode-induced plant stress has been
82 previously investigated in different plant species but variable host-plant
83 responses to pathogen-endomycorrhiza interactions have been reported

84 (e.g. BAGYARAJ et al. 1979, KELLAM and SCHENCK 1980, CASON et al.
85 1983, ELLIOT et al. 1984, COOPER and GRANDISON 1986, SMITH 1987,
86 INGHAM 1988, THOMAS et al. 1989). In the present work, we have tested
87 interactive effects of AMF and *P.brachyurus* on plant growth,
88 endomycorrhizal infection development and root-colonising nematode
89 populations of micropropagated pineapple.

90

91

92 **Material and methods**

93

94 Three micropropagated pineapple varieties (*Ananas comosus* (L.) Merr.,
95 Queen Tahiti, Smooth Cayenne (clone CY0) and Spanish varieties) were
96 tested. Plants were raised in a growth chamber under simulated tropical
97 conditions ($300\mu\text{E s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, 29-25°C, 12h day and 70%-90% relative
98 humidity) in a γ -irradiated (10kGy) acid soil (pH 5.0). Pineapple
99 microplants were inoculated with root fragments of *Tephrosia*
100 *ehlenbergiana* infected with an isolate of *Glomus* sp. (LPA21) in trays
101 containing a soil:gravel (1:1, v:v) mix during a four-week acclimatization
102 period (M) (GUILLEMIN et al. 1991) or when one month-old weaned
103 microplants were transplanted individually to pots (1+M). Each pot
104 contained 400g of the soil:gravel mix and was watered daily with distilled
105 water and weekly with 2x20 ml of Hoagland n°2 solution (HOAGLAND and
106 ARNON 1950) without phosphate.

107 Inoculation of *Pratylenchus brachyurus* was performed with about 100
108 nematodes per microplant at outplanting from axenic conditions
109 (Nematode) or one month later at the end of the weaning period
110 (Nematode+1).

111 After 3 months in pots, several growth parameters were evaluated: leaf
 112 area (cm²), shoot and root fresh mass (g) and shoot dry mass (g) and the N,
 113 P, K, Ca and Mg concentrations of shoots determined (WARNER and
 114 JONES 1957, Comité Inter Instituts pour le diagnostic foliaire 1968, 1972).
 115 Endomycorrhiza development was estimated microscopically by the
 116 method of TROUVELOT et al. (1986) after clearing roots and staining
 117 fungal tissue with trypan blue (PHILIPPS and HAYMAN 1970), or for
 118 succinate dehydrogenase (SDH) (SMITH and GIANINAZZI-PEARSON 1990)
 119 or alkaline phosphatase (ALP) (TISSERANT et al. 1993) activities.
 120 Arbuscule frequency (A%) was also estimated and the proportion of living
 121 and functional arbuscules calculated as follows:

$$122 \quad \text{Proportion of living arbuscules} = \frac{\text{A\% after staining of SDH activity}}{\text{A\% after staining with trypan blue}}$$

$$125 \quad \text{Proportion of functional arbuscules} = \frac{\text{A\% after staining of ALP activity}}{\text{A\% after staining with trypan blue}}$$

128 *P. brachyurus* in roots was extracted using the non-destructive procedure
 129 described by SARAH (1991).

130 All treatments were tested in the same experiment for Smooth Cayenne and
 131 Spanish varieties however two experiments were done for Queen Tahiti
 132 variety. Each treatment consisted of 5 replicates and statistical analysis of
 133 data was performed using Newman-Keuls test following ANOVA.

134

135

136 **Results**

137 Both early (M) and late (I+M) inoculation with the AMF significantly
 138 increased the growth of plants compared with nonmycorrhizal controls
 139 whether they were infested or not with *P. brachyurus* (Tables 1 and 4).

140

141 **1 - Endomycorrhiza inoculation at transplanting from axenic**
142 **conditions**

143

144 With the single exception of Queen Tahiti variety root growth, both shoot
145 and root growth of nonmycorrhizal microplants were significantly reduced
146 when nematodes were introduced at the beginning of the acclimatization
147 period. However, shoot growth of the three pineapple varieties was not
148 significantly modified by nematode infestation in plants inoculated with
149 the *Glomus* sp. at outplanting from axenic conditions (Table 1). Growth
150 reductions due to the nematode were very limited and only occurred for
151 leaf area (Spanish variety) and roots (Smooth Cayenne and Spanish
152 varieties).

153 Nematode number per g. of root was significantly lower in
154 endomycorrhizal than nonmycorrhizal roots for all three pineapple
155 varieties (Table 1). Timing of *P. brachyurus* inoculation did not affect
156 nematode numbers developing in the Queen Tahiti and Smooth Cayenne
157 varieties, but later inoculation did reduce pathogen infestation in the
158 Spanish variety (Table 1).

159 Nematode infestation caused a reduction in P uptake by nonmycorrhizal
160 plants, particularly for the Smooth Cayenne and Spanish varieties, but not
161 in endomycorrhizal plants (Table 2). For the Spanish variety, N, Ca and
162 Mg concentrations of nonmycorrhizal plants were also decreased by
163 nematode infestation at transplanting. However, in endomycorrhizal plants
164 P, Ca and Mg concentrations in shoots of the three varieties inoculated
165 with the nematodes were comparable to those of endomycorrhizal plants
166 growing in the absence of nematodes (Table 2).

167 Nematode application at outplanting significantly reduced arbuscule
168 frequency (A%) for the Queen Tahiti and Spanish varieties after trypan

169 blue staining (Table 3) but this reduction disappeared with pathogen
170 inoculation one month later. This showed that it was of greatest benefit to
171 establish endomycorrhizal colonization as soon as possible. Reduction of
172 A% was also observed after staining for SDH and ALP activities in the
173 Queen Tahiti variety (Table 3). The proportion of living and functional
174 arbuscules was not altered by nematode infestation (Table 3).

175

176 2 - Endomycorrhizal inoculation at outplanting to pots

177

178 Growth of endomycorrhizal plants was significantly greater than of
179 nonmycorrhizal plants (Table 4). Inoculation with *P. brachyurus* at
180 outplanting reduced the growth of nonmycorrhizal but not
181 endomycorrhizal plants (Table 4).

182 The nematode population was reduced in endomycorrhizal plants with both
183 timings of the pathogen application for the Queen Tahiti variety (Table 4)
184 but this reduction was observed for the Smooth Cayenne and Spanish
185 varieties only when nematodes and endomycorrhizae were inoculated
186 simultaneously. Endomycorrhiza development after nematode application
187 did not influence nematode infestation of roots of the Smooth Cayenne and
188 Spanish varieties. Timing of pathogen application influenced its presence
189 in the roots of the Spanish variety; indeed the population was greater when
190 the pathogen was introduced before inoculation with the AMF.

191 Nematodes negatively affected P uptake by nonmycorrhizal but not
192 endomycorrhizal plants (Table 5). Endomycorrhiza formation enhanced Ca
193 and Mg contents of the Queen Tahiti and Spanish varieties and N
194 concentration for the Spanish variety. K contents were higher for the
195 nonmycorrhizal plants.

196 *P. brachyurus* application at outplanting significantly reduced arbuscule
197 frequency (A%) determined after trypan blue staining in the Queen Tahiti
198 and Spanish varieties (Table 3). A% evaluated by SDH and ALP activities
199 was negatively affected by nematodes for the Queen Tahiti variety.
200 However, the proportion of living and functional arbuscules was not
201 modified by *P. brachyurus* for the three pineapple varieties (Table 3).

202

203

204 **Discussion**

205

206 Although *P. brachyurus* reduced the growth of nonmycorrhizal plants in all
207 three pineapple varieties, in those colonized by AMF growth was not
208 significantly affected. Precolonization of roots by AMF can therefore
209 reduce the harmful effects of nematodes on plant growth. Simultaneous
210 symbiont and pathogen inoculation at transplanting to pots did not affect
211 the growth of endomycorrhizal pineapple. However, simultaneous
212 inoculation of the AMF and nematodes at outplanting from axenic
213 conditions slightly reduced growth of endomycorrhizal plants of the Queen
214 Tahiti and Smooth Cayenne varieties. Both micro-organisms can be an
215 important photosynthate sink for very young micropropagated plantlets.
216 Effects of the nematode on young microplants of pineapple during the
217 acclimatization period are not irreversible; indeed, late endomycorrhizal
218 colonization at transplanting to pots can compensate growth reductions of
219 plants inoculated with nematodes at outplanting from axenic conditions.
220 Micropropagated plantlets could tolerate better the nematode inoculation at
221 outplanting from axenic conditions followed one month later by
222 endomycorrhizal inoculation than both symbiotic and pathogen
223 inoculations at the beginning of the acclimatization period. The application

224 of nematodes at outplanting from axenic conditions without
225 endomycorrhizal inoculation significantly reduced plant growth but this
226 effect was not observed when plants were infested by nematodes one
227 month later. This supports previous observations that older plants can
228 tolerate pathogen infestation better than younger plants (COOPER and
229 GRANDISON 1986).

230 Pathogen effects on endomycorrhizal colonization estimated after non vital
231 staining varied with the pineapple variety. When nematodes were applied
232 at transplanting this significantly reduced arbuscule frequency (A%) in the
233 Queen Tahiti and Spanish varieties. The ability of nematodes to reduce
234 endomycorrhizal development has also been observed by several authors
235 (e.g. O'BANNON and NEMEC 1979, ELLIOT et al. 1984), and it has been
236 suggested that nematodes could induce an unfavourable environment for
237 infection by the fungal symbiont (THOMAS et al. 1989). Although
238 nematode infestation negatively influenced values for A% of Queen Tahiti
239 variety estimated by SDH and ALP activities, *P. brachyurus* did not affect
240 the proportion of living and functional arbuscules of the three pineapple
241 varieties, and consequently did not influence the efficiency of the
242 symbiosis for pineapple. This could partly explain the lack of effect of *P.*
243 *brachyurus* on the growth of endomycorrhizal plants.

244 Several reports have shown that endomycorrhizal colonization decreases
245 nematode populations in root systems (e.g. BAGYARAJ et al. 1979, SALEH
246 and SIKORA 1984), and SMITH et al. (1986) showed that AMF can enhance
247 plant tolerance to nematodes in field conditions. In this study, numbers of
248 nematodes were also significantly reduced in the roots of endomycorrhizal
249 pineapple of the three varieties in comparison to nonmycorrhizal plants,
250 whether nematodes were applied simultaneously with or after the AMF.
251 Reductions in nematode infection have been attributed to modifications in

252 plant physiology caused by the symbiotic fungi. AMF are able to ensure an
253 adequate P nutrition in presence of nematodes and since P is considered as
254 an important factor in plant tolerance (SMITH and KAPLAN 1988), higher
255 concentrations of this element in endomycorrhizal tissues could have a
256 direct action reducing nematode numbers in roots (MACGUIDWIN et al.
257 1985). Changes in root exudates may also alter root attractiveness for
258 nematodes (MACGUIDWIN et al. 1985), or induce physical and chemical
259 barriers to root penetration (KELLAM and SCHENCK 1980).
260 Endomycorrhizal colonization could also represent a competition for
261 photosynthates in roots (SMITH 1987), and thus produce a less favourable
262 environment for the nematodes (KELLAM and SCHENCK 1980) or
263 influence the quality of food reserves of nematodes (MACGUIDWIN et al.
264 1985). Endomycorrhizal plants have higher sugar contents, modified
265 hormone balance and modifications in the composition of amino acids (e.g
266 increases in serine and phenylalanine which are nematicidal) (SURESH et
267 al. 1985). Presence of a fungal symbiont in roots can affect the normal life
268 cycle of nematodes (CASON et al. 1983) and reduce nematode size
269 (SITARAMAIAH and SIKORA 1982).

270 Other micro-organisms such as bacteria and fungi are also considered as
271 antagonists to nematodes (CAYROL et al. 1992), and the combination of
272 AMF with one or several antagonists could produce a more beneficial
273 synergistic action on plant protection and growth. Fallow could be also
274 used to combat nematode populations in soil (STIRLING and NIKULIN
275 1993), but this approach risks decreasing endomycorrhizal potential and
276 reducing soil fertility (SARAH 1987) unless inoculation with efficient AMF
277 after fallow is ensured. The control of nematodes in pineapple, which
278 avoids excess use of nematicides, clearly requires an integrated approach.
279 The results reported here suggest that endomycorrhizae, which are not

280 affected by nematicides (HABTE and MANJUNATH 1988), could be a
281 valuable component in a scheme of integrated protection against
282 nematodes.

283

284

285 **Acknowledgements**

286

287 The authors thank Vitropic S.A. (Montpellier, France) for supplying
288 the micropropagated plant material and Dr J.L. Sarah (CIRAD, FHLOR,
289 Montpellier, France) for supplying *P. brachyurus*.

290

291

292 **References**

293

294 BAGYARAJ, D.J., MANJUNATH, A. & REDDY, D.D.R. 1979. Interaction of
295 vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi with root-knot nematodes in
296 tomato. *Plant and Soil* 51: 397-403.

297 CASON, K.M.T., HUSSEY, R.S. & RONCADORI, R.W. 1983. Interaction of
298 vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus with
299 *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of Nematology* 15: 410-417.

300 CASWELL, E.P., SARAH, J.L. & APT, W.J. 1990. Nematode parasites of
301 pineapple. In: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (eds.). *Plant parasitic*
302 *nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International. p.
303 519-537.

304 CAYROL, J.C., DJIAN-CAPORALION, C. & PANCHAUD-MATTEI, E. 1992.
305 La lutte biologique contre les nématodes phytoparasites. *Courrier de la*
306 *Cellule Environnement de l'INRA* 17: 31-44.

- 307 Comité Inter Instituts pour le diagnostic foliaire 1968. Méthode de
308 référence pour la détermination des éléments minéraux dans les
309 végétaux. Coll. Eur. Méd. sur le contrôle de l'alimentation des Plantes
310 cultivées, Séville. p. 12-20.
- 311 Comité Inter Instituts pour le diagnostic foliaire 1972. Méthode de
312 référence pour la détermination des éléments minéraux dans les
313 végétaux. Coll. Eur. Méd. sur le contrôle de l'alimentation des Plantes
314 cultivées, Budapest. p. 144-150.
- 315 COOPER, K.M. & GRANDISON, G.S. 1986. Interaction of vesicular-
316 arbuscular mycorrhizal fungi and root-knot nematode on cultivars of
317 tomato and white clover susceptible to *Meloidogyne hapla*. Annals of
318 Applied Biology 108: 555-565.
- 319 ELLIOT, A.P., BIRD, G.W. & SAFIR, G.R. 1984. Joint influence of
320 *Pratylenchus penetrans* (nematoda) and *Glomus fasciculatum*
321 (phytomyceta) on the ontogeny of *Phaseolus vulgaris*. Nematropica 14:
322 111-119.
- 323 GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V. & TROUVELOT, A. 1982. Les
324 Mycorhizes, Partie Intégrante de la Plante: Biologie et Perspective
325 d'Utilisation. 397 p. INRA-Press, Paris, France.
- 326 GODFREY, G.H. 1929. A destructive root disease of pineapple and other
327 plants due to *Tylenchus brachyurus*. Phytopathology 19: 611-629.
- 328 GUÉROUT, R. 1975. Nematodes of pineapple: a review. Pest Articles &
329 News Summaries 21: 123-140.
- 330 GUILLEMIN, J.P., GIANINAZZI, S. & GIANINAZZI-PEARSON, V. 1991.
331 L'endomycorhization de *vitroplants* d'*Ananas comosus*: mise en
332 évidence d'un effet mycorhizien. Fruits 46: 355-358.

- 333 HABTE, M. & MANJUNATH, A. 1988. Influence of phenamiphos on the
334 vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Leucaena leucocephala*.
335 *Biology and Fertility of Soils* 5: 313-316.
- 336 HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1950. The water-culture method for
337 growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station
338 Circular 347: 1-32.
- 339 INGHAM, R.E. 1988. Interactions between nematodes and vesicular-
340 arbuscular mycorrhizae. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 24:
341 169-182.
- 342 KEETCH, D.P. 1982. Nematode pests of pineapple. In: Keetch, D.P. &
343 Heyns, J. (eds.). *Nematology in South Africa*. Department of Agriculture
344 and Fisheries, Pretoria. p. 19-29.
- 345 KELLAM, M.K. & SCHENCK, N.C. 1980. Interactions between a vesicular-
346 arbuscular mycorrhizal fungus and root-knot nematode on soybean.
347 *Phytopathology* 70: 293-296.
- 348 LACOEUILHE, J.J. & GUÉROUT, R. 1976. Action du nématode
349 *Pratylenchus brachyurus* sur la croissance, la nutrition et les rendements
350 de l'ananas 'Cayenne lisse'. Influence de la localisation de la fumure.
351 *Fruits* 31: 147-156.
- 352 MACGUIDWIN, A.E., BIRD, G.W. & SAFIR, G.R. 1985. Influence of
353 *Glomus fasciculatum* on *Meloidogyne hapla* infecting *Allium cepa*.
354 *Journal of Nematology* 17: 389-395.
- 355 O'BANNON, J.H. & NEMEC, S. 1979. The response of *Citrus limon* to a
356 symbiot, *Glomus etunicatus*, and a pathogen, *Radopholus similis*.
357 *Journal of Nematology* 11: 270-275.
- 358 PHILIPPS, J.M. & HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedures for clearing
359 roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi

- 360 for rapid assessment of infection. Transactions of the British
361 Mycological Society 55: 158-161.
- 362 SALEH, H. & SIKORA, R.A. 1984. Relationship between *Glomus*
363 *fasciculatum* root colonization of cotton and its effect on *Meloidogyne*
364 *incognita*. Nematologica 30: 230-237.
- 365 SARAH, J.L. 1987. Utilisation d'une jachère travaillée pour lutter contre les
366 nématodes parasites de l'ananas. Fruits 42: 357-360.
- 367 SARAH, J.L. 1991. Effect of soil pH on development of *Pratylenchus*
368 *brachyurus* populations in pineapple roots. Nematropica 21: 211-216.
- 369 SITARAMAIAH, K. & SIKORA, R.A. 1982. Effect of the mycorrhizal
370 fungus *Glomus fasciculatus* on the host-parasite relationship of
371 *Rotylenchulus reniformis* in tomato. Nematologica 28: 412-419.
- 372 SMITH, G.S. 1987. Interactions of nematodes with mycorrhizal fungi. In:
373 Veech, J.A. & Dickson, D.W. (eds.). Vistas on Nematology. Society of
374 Nematologists, Hyattsville, MD. p. 292-300.
- 375 SMITH, G.S. & KAPLAN, D.T. 1988. Influence of mycorrhizal fungus,
376 phosphorus, and burrowing nematode interactions on growth of rough
377 lemon citrus seedlings. Journal of Nematology 20: 539-544.
- 378 SMITH, G.S., RONCADORI, R.W. & HUSSEY, R.S. 1986. Interaction of
379 endomycorrhizal fungi, superphosphate, and *Meloidogyne incognita* on
380 cotton in microplot and field studies. Journal of Nematology 18: 208-
381 216.
- 382 SMITH, S.E. & GIANINAZZI-PEARSON, V. 1990. Phosphate uptake and
383 vesicular-arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. : effect of
384 photon irradiance and phosphate nutrition. Australian Journal of Plant
385 Physiology 17: 177-188.
- 386 STIRLING, G.R. & NIKULIN, A. 1993. Population dynamics of plant
387 parasitic nematodes in Queensland pineapple fields and the effects of

- 388 these nematodes on pineapple production. Australian Journal of
389 Experimental Agriculture 33: 197-206.
- 390 SURESH, C.K., BAGYARAJ, D.J. & REDDY, D.D.R. 1985. Effect of
391 vesicular-arbuscular mycorrhiza on survival, penetration and
392 development of root-knot nematode in tomato. Plant and Soil 87: 305-
393 308.
- 394 THOMAS, G.V., SUNDARARAJU, P., ALI, S.S. & GHAI, S.K. 1989.
395 Individual and interactive effects of VA mycorrhizal fungi and root-knot
396 nematode, *Meloidogyne incognita*, on cardamom. Tropical Agriculture
397 66: 21-24.
- 398 TISSERANT, B., GIANINAZZI-PEARSON, V., GIANINAZZI, S. & GOLLOTE,
399 A. 1993. *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase
400 activity for analysis of efficient arbuscular endomycorrhizal infections.
401 Mycological Research 97: 245-250.
- 402 TROUVELOT, A., KOUGH, J. & GIANINAZZI-PEARSON, V. 1986. Mesure
403 du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de
404 méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In:
405 Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. (eds.). Mycorrhizae:
406 Physiology and Genetics. INRA-Press, Paris. p. 217-221.
- 407 WARNER, M.H. & JONES, J.B. 1967. Determination of total tissue using a
408 Technicon Kjeldahl Nitrogen apparatus. Technicon Symposia 1966,
409 Automation in analytical chemistry, Vol. I. Mediad Inc., New York. p.
410 145-148.

Table 1: Leaf area (LA), shoot (SFM) and root (RFM) fresh mass, shoot dry mass (SDM) and number of nematodes per g. of roots (Nem root) of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal at transplanting from axenic conditions (M) pineapple: uninoculated (Control), inoculated at outplanting from axenic conditions (Nematode) and one month later (Nematode+1).

A - Queen Tahiti variety

		LA (cm ²)	SFM (g)	RFM (g)	SDM (g)	Nem. root
Control	NM	186.9b	15.26b	1.76b	1.54b	0c
	M	460.7a	36.01a	4.00a	3.70a	0c
Nematode	NM	100.5c	7.35c	1.25b	0.91b	396a
	M	353.7ab	27.31ab	3.12a	3.16a	232b
Nematode+1	NM	209.0b	13.58b	1.71b	1.51b	330a
	M	444.4a	34.16a	3.96a	3.58a	250b

B - Smooth Cayenne variety

		LA (cm ²)	SFM (g)	RFM (g)	SDM (g)	Nem. root
Control	NM	299.8c	23.35c	2.63c	2.08b	0c
	M	640.9a	54.87a	5.48a	5.02a	0c
Nematode	NM	178.6d	13.82d	1.64d	1.39c	456a
	M	540.6ab	42.86ab	3.44b	4.58a	267b
Nematode+1	NM	232.7cd	19.75c	2.11c	2.09b	418a
	M	547.5ab	48.38a	4.06b	4.64a	212b

C - Spanish variety

		LA (cm ²)	SFM (g)	RFM (g)	SDM (g)	Nem. root
Control	NM	313.2c	21.70b	2.05c	2.25c	0d
	M	537.1a	38.48a	3.97a	3.91a	0d
Nematode	NM	96.4d	5.72c	0.75d	0.74d	350a
	M	476.9b	34.47a	2.77b	3.40ab	157b
Nematode+1	NM	263.1c	19.57b	2.26c	1.97c	180b
	M	543.6a	39.83a	3.40a	4.04a	46c

Values in a column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2: Mineral concentration (% of dry mass) (N, P, K, Ca and Mg) of shoots of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal at outplanting from axenic conditions (M) pineapple: uninoculated (Control), inoculated at outplanting from axenic conditions (Nematode) and one month later (Nematode+1).

A - Queen Tahiti variety

		N	P	K	Ca	Mg
Control	NM	2.04	0.08	4.60	0.81	0.29
	M	1.70	0.18	3.59	0.96	0.37
Nematode	NM	1.65	0.08	3.64	0.82	0.28
	M	1.87	0.15	3.77	1.00	0.37
Nematode+1	NM	1.83	0.05	4.01	0.87	0.28
	M	1.77	0.18	3.49	1.04	0.37

B - Smooth Cayenne variety

		N	P	K	Ca	Mg
Control	NM	2.03	0.13	4.46	1.05	0.35
	M	1.99	0.13	4.07	1.17	0.34
Nematode	NM	1.93	0.07	4.52	1.08	0.35
	M	1.81	0.14	3.54	1.09	0.32
Nematode+1	NM	2.09	0.09	4.90	1.11	0.30
	M	1.76	0.14	3.62	1.22	0.34

C - Spanish variety

		N	P	K	Ca	Mg
Control	NM	1.88	0.13	4.13	0.75	0.26
	M	1.63	0.12	3.30	0.82	0.28
Nematode	NM	1.41	0.04	3.67	0.60	0.19
	M	1.67	0.14	3.06	0.95	0.30
Nematode+1	NM	1.82	0.09	4.06	0.89	0.26
	M	1.64	0.14	3.01	0.90	0.30

Table 3: Arbuscular frequency observed after staining with trypan blue (TB) or for succinate dehydrogenase (SDH) or alkaline phosphatase activities and proportion of living (SDH/TB) and functional (ALP/TB) arbuscules of endomycorrhizal pineapple roots at outplanting from axenic conditions (M) and at transplanting to pots (I+M) for the Queen Tahiti, Smooth Cayenne and Spanish varieties : uninoculated (Control), inoculated at outplanting from axenic conditions (Nematode) and one month later (Nematode+1).

		Frequency of arbuscules (A %) detected by staining for				
		Total fungal tissue (TB)	SDH activity (%)	SDH/TB	ALP activity (%)	ALP/TB
Queen Tahiti variety						
M	Control	63a	24.5a	0.39a	16.4a	0.26a
	Nematode	46b	14.7b	0.32a	9.4b	0.21a
	Nematode+1	56ab	17.4b	0.31a	12.0b	0.22a
I+M	Control	65a	19.0a	0.29a	12.7a	0.20a
	Nematode	33b	12.7b	0.38a	8.0b	0.24a
	Nematode+1	38b	13.6b	0.36a	9.2b	0.24a
Smooth Cayenne variety						
M	Control	65a	20.3a	0.31a	15.8a	0.24a
	Nematode	50a	20.0a	0.40a	13.9a	0.27a
	Nematode+1	51a	17.5a	0.34a	14.0a	0.27a
I+M	Control	53a	13.8a	0.26a	11.0a	0.21a
	Nematode	60a	10.9a	0.18a	8.0a	0.13a
	Nematode+1	68a	14.9a	0.22a	10.3a	0.15a
Spanish variety						
M	Control	50a	21.6a	0.43a	13.8a	0.28a
	Nematode	29b	16.5a	0.56a	10.2a	0.35a
	Nematode+1	38ab	18.6a	0.49a	10.0a	0.27a
I+M	Control	40a	18.6a	0.46a	12.2a	0.30a
	Nematode	31b	16.7a	0.54a	9.4a	0.30a
	Nematode+1	35ab	14.4a	0.41a	9.4a	0.27a

Values for each compartment followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 4: Leaf area (LA), shoot (SFM) and root (RFM) fresh mass, shoot dry mass (SDM) and number of nematodes per g. of roots (Nem root) of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal at transplanting to pot (1+M) pineapple: uninoculated (Control), inoculated at outplanting from axenic conditions (Nematode) and one month later (Nematode+1).

A - Queen Tahiti variety

		LA (cm ²)	SFM (g)	RFM (g)	SDM (g)	Nem. root
Control	NM	312.4b	24.82b	2.52b	2.58b	0c
	1+M	452.9a	33.85a	3.19a	3.36a	0c
Nematode	NM	136.9c	10.95c	1.19c	1.13c	564a
	1+M	389.5ab	31.62a	2.74ab	3.00a	300b
Nematode+1	NM	176.7c	13.11c	1.26c	1.28c	465a
	1+M	433.8a	35.26a	2.77ab	3.53a	304b

B - Smooth Cayenne variety

		LA (cm ²)	SFM (g)	RFM (g)	SDM (g)	Nem. root
Control	NM	299.8b	23.35b	2.63b	2.08b	0c
	1+M	471.7a	34.65a	3.06a	3.07a	0c
Nematode	NM	178.6c	13.82c	1.64c	1.39c	456a
	1+M	362.3ab	31.24a	2.84a	3.65a	389a
Nematode+1	NM	232.7bc	19.75b	2.11b	2.09b	418a
	1+M	485.1a	35.47a	3.05a	3.85a	293b

C - Spanish variety

		LA (cm ²)	SFM (g)	RFM (g)	SDM (g)	Nem. root
Control	NM	313.2b	21.70b	2.05b	2.25b	0d
	1+M	483.5a	33.45a	2.92a	3.23a	0d
Nematode	NM	96.4c	5.72c	0.75c	0.74c	350a
	1+M	465.0a	33.68a	2.29ab	3.40a	330a
Nematode+1	NM	263.1b	19.57b	2.26ab	1.97b	180b
	1+M	432.7a	31.29a	2.65a	2.85a	122c

Values in a column followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 5: Mineral concentration (% of dry mass) (N, P, K, Ca and Mg) of shoots of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal at transplanting to pots (I+M) pineapple: uninoculated (Control), inoculated at outplanting from axenic conditions (Nematode) and one month later (Nematode+1).

A - Queen Tahiti variety

		N	P	K	Ca	Mg
Control	NM	1.72	0.10	3.83	0.83	0.33
	I+M	1.76	0.17	3.74	0.79	0.33
Nematode	NM	1.83	0.05	4.60	0.67	0.24
	I+M	1.95	0.13	3.91	0.88	0.34
Nematode+1	NM	2.22	0.08	5.25	0.74	0.27
	I+M	1.81	0.12	3.42	0.91	0.32

B - Smooth Cayenne variety

		N	P	K	Ca	Mg
Control	NM	2.03	0.13	4.46	1.05	0.35
	I+M	2.26	0.16	4.46	1.18	0.33
Nematode	NM	1.93	0.07	4.52	1.08	0.35
	I+M	1.70	0.16	3.38	1.03	0.33
Nematode+1	NM	2.09	0.09	4.90	1.11	0.30
	I+M	1.85	0.16	3.68	1.13	0.35

C - Spanish variety

		N	P	K	Ca	Mg
Control	NM	1.88	0.13	4.13	0.75	0.26
	I+M	1.97	0.16	4.01	0.83	0.27
Nematode	NM	1.41	0.04	3.67	0.60	0.19
	I+M	1.74	0.13	3.18	0.83	0.26
Nematode+1	NM	1.82	0.09	4.06	0.89	0.26
	I+M	1.98	0.14	3.98	0.91	0.27

Contribution of arbuscular mycorrhizas to biological protection of micropropagated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) against *Phytophthora cinnamomi* Rands

JEAN-PHILIPPE GUILLEMIN, SILVIO GIANINAZZI, VIVIENNE GIANINAZZI-PEARSON and JEAN MARCHAL

GUILLEMIN, J.P.¹, GIANINAZZI, S.¹, GIANINAZZI-PEARSON, V.¹ & MARCHAL, J.² 1994. Contribution of endomycorrhizas to biological protection of micropropagated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) against *Phytophthora cinnamomi* Rands. Agricultural Science in Finland 3: 000-000. (¹ Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, 21034 Dijon Cedex, France and ² Laboratoire de Physiologie et Biochimie, CIRAD, FLHOR, Avenue du Val de Montferrand, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France.)

Phytophthora cinnamomi Rands causes root rot of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) and the development of this disease is harmful for fruit production. Micropropagated plants of two varieties, Queen Tahiti and Smooth Cayenne (clone CY0), were inoculated at transplanting from axenic conditions with an arbuscular mycorrhizal fungus to evaluate the importance of endomycorrhiza development for biological protection against *P. cinnamomi*. Growth and mineral nutrition of endomycorrhizal plants were not affected by different inoculum levels of *P. cinnamomi*, whilst they were reduced for non mycorrhizal plants. Root/shoot ratio of endomycorrhizal plants was lower than that of non mycorrhizal plants, and the pathogen did not modify this effect except at highest inoculum levels of *P. cinnamomi*. Endomycorrhizal colonization was not altered by the pathogen; however symbiotic functioning was reduced by the highest concentration of inoculum of *P. cinnamomi*. Endomycorrhization is an interesting biotechnology for the production of micropropagated pineapple.

Key words: arbuscular endomycorrhizal infection, bioprotection agent, pathogen fungus, pineapple microplant, plant growth

Introduction

In soil, plant roots develop in the presence of micro-organisms, some of which can have a positive (e.g. arbuscular mycorrhizal fungi (AMF)) or negative (e.g. pathogen fungi) impact on plant growth. Root rot of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.), caused by the soilborne fungus *Phytophthora cinnamomi* Rands, is a major problem in pineapple production (MEHRLICH 1936). This pathogen damages root systems, negatively in-

fluences shoot development (MEHRLICH 1934) causes the production of fruits without commercial interest (PY et al. 1984) and is able to devastate plantations (ANDERSON 1951). The disease is presently controlled by chemical applications (PEGG 1977, ROCHBACH and SCHENCK 1985) and/or by modifying the soil environment before planting (drainage, pH reduction).

Several reports have indicated the bioprotective effect of endomycorrhiza formation against pathogens (GIANINAZZI et al. 1982, PAULITZ and

LINDERMAN 1991). However results are contradictory for *P.cinnamomi*. Whilst an important decrease in root rot disease was observed for endomycorrhizal plants of *Chamaecyparis lawsoniana* L. (BÄRTSCHI et al. 1981), the impact of the disease was not modified by endomycorrhization of avocado (MATARÉ and HATTING 1978) or citrus (DAVIS et al. 1978). The aim of this work was to evaluate the success of AMF as biological control agents against damage by *P.cinnamomi* in pineapple plant production.

Materials and methods

Two micropropagated pineapple varieties, Queen Tahiti and Smooth Cayenne (clone CY0), were used. Experiments were carried out under simulated tropical conditions (300 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$, 29–25°C, 12h/12h, 70–90% relative humidity). Micropropagated plants were inoculated at transplanting from axenic conditions with root fragments of *Tephrosia ehlenbergiana* infected by an isolate of *Glomus* sp. (LPA21). Inoculation was performed in seed trays containing a mix (1:1, v:v) of γ -irradiated (10kGy) acid soil (Marlins, pH 5.0) and steam-sterilized gravel (GUILLEMIN et al. 1991). Four weeks later, micropropagated plants were individually outplanted to pots containing 400g of the soil-gravel mix. Plants were watered daily with distilled water and twice weekly 20ml of Hoagland no.2 nutrient solution (HOAGLAND and ARNON 1950) without phosphate was supplied.

P.cinnamomi (strain 50, Laboratoire de Pathologie, CIRAD, FLHOR, Montpellier, France) was grown in 30ml of liquid culture at 25°C (LOUVEL 1975). After one week, the macerated *P.cinnamomi* culture was diluted in water from 10-fold to 10000-fold (levels 4 to 1). After pre-inoculation with AMF, 30ml inoculum was applied to each plant at outplanting to pots, or one month later. For the later application, only two dilution levels (1 : 10 (level 4) and 1 : 100 (level 3)) were used.

Plant growth was evaluated by leaf area (CHAUVÉL 1991), shoot and root fresh weight and shoot dry weight. N, P, K, Ca and Mg contents of shoots were analysed (WARNER and JONES 1967, Comité

Inter Instituts pour le diagnostic foliaire 1968, 1972). Endomycorrhizal colonization was evaluated by the TROUVELOT et al. (1986) method (intensity of infection in the root cortex (M%) and arbuscular frequency in the root cortex (A%)) after clearing and staining with trypan blue (PHILIPPS and HAYMAN 1970) and after staining for succinate dehydrogenase (SDH) (living) (SMITH and GIANINAZZI-PEARSON 1990) or alkaline phosphatase (ALP) (functional) (TISSERANT et al. 1993) activities.

Each treatment consisted of 5 replicates and all data was analysed statistically by Newman-Keuls tests.

Results

Development of the endomycorrhizal infection

The endomycorrhizal colonization was well developed in roots of both pineapple varieties. Evaluations of infection intensity (M%) were between 83% and 91% after non vital staining with trypan blue (Fig. 1). Values of M% estimated after staining for SDH and ALP activities, to evaluate living and functional infection respectively, were lower, fluctuating between 48% and 63% for the former, and between 27% and 38% for the latter (Fig. 1a, 1b, 2a, 2b). *P.cinnamomi* did not significantly affect infection intensity (M%) for either inoculation time, that is at transplanting to pots (Fig. 1a, 2a) or one month later (Fig. 1b, 2b).

Arbuscule frequency (A%) estimated by trypan blue and ALP staining was significantly reduced for the Queen Tahiti variety in presence of the highest inoculum level of *P.cinnamomi* at outplanting to pots (Fig. 1c). For the Smooth Cayenne variety, reduction of A% was observed only for ALP staining and after inoculation of highest concentration of the pathogen at outplanting to pots (Fig. 2c).

Development of *P.cinnamomi* infection

No necroses were observed on roots of non-mycorrhizal and endomycorrhizal plants infected by

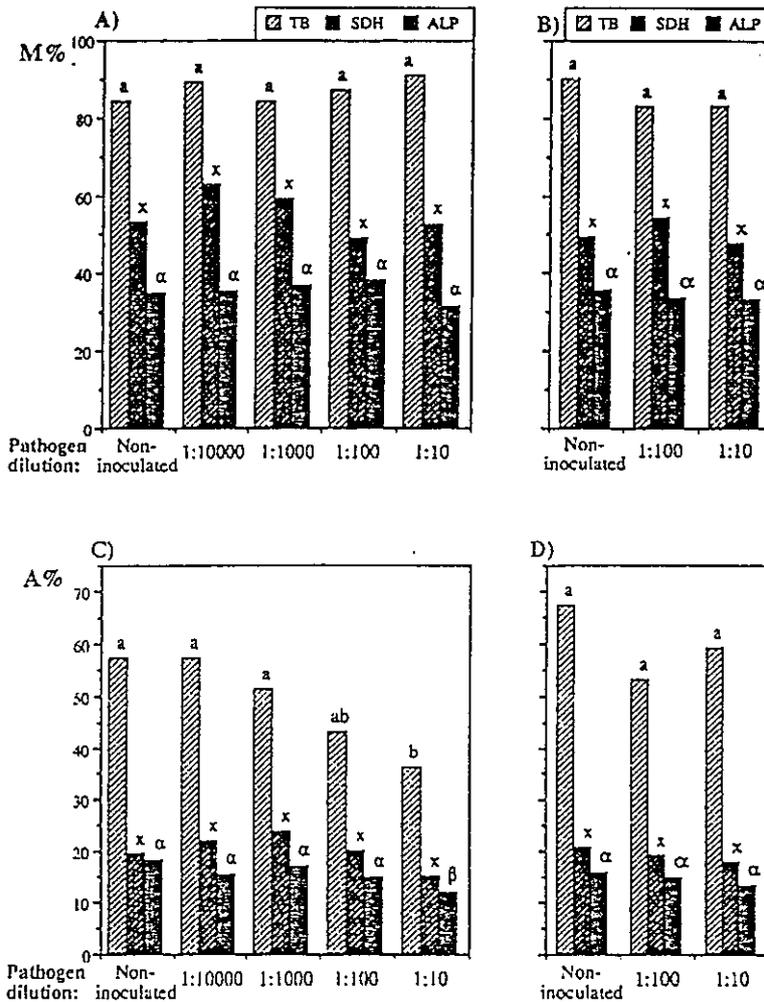


Fig. 1. Intensity of infection (M%) (A and B) and arbuscular frequency (A%) (C and D) observed after trypan blue (TB), succinate dehydrogenase (SDH) and alkaline phosphatase (ALP) staining of roots of endomycorrhizal Queen Tahiti variety of pineapple inoculated with *P. cinnamomi* at different dilutions at outplanting to pots (A and C) and one month later (B and D). Values for each staining followed by different letters are significantly different ($p = 0.05$).

P. cinnamomi at any concentrations of the pathogen inoculum.

Plant growth

The important development of the AMF in roots of both pineapple varieties was reflected in the better growth of endomycorrhizal plants, with or without *P. cinnamomi* (Tables 1, 2, 3, 4).

Effect of *P. cinnamomi* at outplanting to pots

P. cinnamomi significantly decreased shoot growth of non-mycorrhizal plants of the Queen Tahiti

variety at all dilutions whilst such a negative effect was only observed for endomycorrhizal plants at the highest inoculum level of the pathogen (Table 1). All concentrations of *P. cinnamomi* significantly decreased root growth of non-mycorrhizal plants whilst root growth of endomycorrhizal plants was only negatively influenced by the two higher levels of pathogen inoculum (Table 1). Shoot and root growth of endomycorrhizal plants, whether infected or not by *P. cinnamomi*, was always greater than that of non-mycorrhizal plants.

Plants of the Smooth Cayenne variety tolerat-

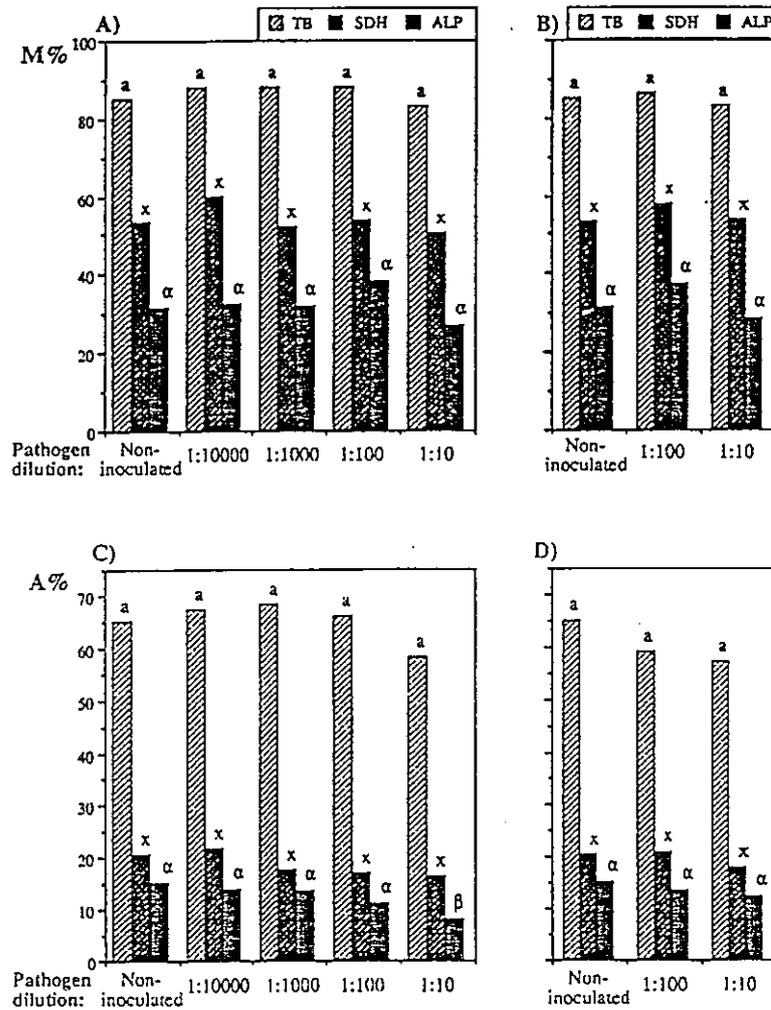


Fig. 2. Intensity of infection (M%) (A and B) and arbuscular frequency (A%) (C and D) observed after trypan blue (TB), succinate dehydrogenase (SDH) and alkaline phosphatase (ALP) staining of roots of endomycorrhizal Smooth Cayenne variety of pineapple inoculated with *P. cinnamomi* at different dilutions at outplanting to pots (A and C) and one month after later (B and D). Values for each staining followed by different letters are significantly different ($p = 0.05$).

ed *P.cinnamomi* better. Only the inoculum dilutions of 1:100 and 1:10 affected shoot growth of non-mycorrhizal plants. For endomycorrhizal plants, shoot growth was not significantly affected by the pathogen at any concentration (Table 2). However, root growth of endomycorrhizal plants was altered by higher levels of pathogen inoculum, but values were always greater than those of non-mycorrhizal plants, with or without the pathogen.

In these experiments, root/shoot ratios (R/A) of endomycorrhizal plants were always lower than those of non-mycorrhizal plants for both pineap-

ple varieties except for endomycorrhizal plants of the Queen Tahiti variety in presence of the highest level of *P.cinnamomi* inoculum (Fig. 3a, 3c).

In the absence of *P.cinnamomi*, endomycorrhiza formation improved shoot mineral contents of the Queen Tahiti variety (Table 5). Pathogen inoculation caused a reduction in the P concentration of non-mycorrhizal plants. Decreases in Ca and Mg nutrition were less important for *P.cinnamomi*-inoculated endomycorrhizal plants. However, N and K concentrations tended to increase in the presence of *P.cinnamomi* in all plants (Table 5).

Table 1. Leaf area (cm²), shoot (g) and root (g) fresh mass and shoot dry (g) mass of endomycorrhizal (M) and nonmycorrhizal (NM) Queen Tahiti variety of pineapple, inoculated at outplanting to pots with *Phytophthora cinnamomi* at different dilutions.

Pathogen dilution		Leaf area	Shoot fresh mass	Root fresh mass	Shoot dry mass
Non-inoculated	NM	312.4b	24.82b	2.52b	2.58b
	M	482.9a	37.52a	3.52a	3.99a
1 : 10000	NM	221.5c	16.84c	1.78c	1.74c
	M	484.1a	33.80a	3.22ab	3.61a
1 : 1000	NM	165.9c	13.23c	1.45c	1.43c
	M	437.1a	32.65a	3.09ab	3.30a
1 : 100	NM	223.3c	16.62c	1.80c	1.72c
	M	463.5a	33.66a	2.83b	3.51a
1 : 10	NM	240.9c	17.75c	1.63c	1.85c
	M	344.0b	26.07b	2.85b	2.43b

Values in a column followed by different letters are significantly different ($p = 0.05$)

Table 2. Leaf area (cm²), shoot (g) and root (g) fresh mass and shoot dry (g) mass of endomycorrhizal (M) and nonmycorrhizal (NM) Smooth Cayenne variety of pineapple, inoculated at outplanting to pots with *Phytophthora cinnamomi* at different dilutions.

Pathogen dilution		Leaf area	Shoot fresh mass	Root fresh mass	Shoot dry mass
Non-inoculated	NM	299.7b	23.25b	2.63c	2.88b
	M	640.9a	54.87a	5.48a	5.02a
1 : 10000	NM	285.5b	22.37b	2.42c	2.31b
	M	527.9a	46.14a	4.16ab	4.10a
1 : 1000	NM	373.9b	23.45b	2.52c	2.43b
	M	544.3a	45.44a	4.35ab	4.36a
1 : 100	NM	241.0b	18.27c	2.03cd	1.73c
	M	479.2a	39.05ab	3.64b	3.43ab
1 : 10	NM	166.6c	12.65c	1.74d	1.24c
	M	502.2a	39.02ab	3.86b	3.71a

Values in a column followed by different letters are significantly different ($p = 0.05$)

Table 3. Leaf area (cm²), shoot (g) and root (g) fresh mass and shoot dry (g) mass of endomycorrhizal (M) and nonmycorrhizal (NM) Queen Tahiti variety of pineapple, inoculated one month after outplanting to pots with *Phytophthora cinnamomi* at different dilutions.

Pathogen dilution		Leaf area	Shoot fresh mass	Root fresh mass	Shoot dry mass
Non-inoculated	NM	278.1b	22.14c	2.49c	2.09b
	M	637.0a	49.03a	5.04a	4.64a
1 : 100	NM	272.6b	21.86c	2.29c	2.09b
	M	590.9a	40.14ab	3.77b	4.08a
1 : 10	NM	230.2c	16.99d	1.49d	1.59c
	M	549.8a	38.14ab	4.15ab	3.94a

Values in a column followed by different letters are significantly different ($p = 0.05$)

Table 4. Leaf area (cm²), shoot (g) and root (g) fresh mass and shoot dry (g) mass of endomycorrhizal (M) and nonmycorrhizal (NM) Smooth Cayenne variety of pineapple, inoculated one month after outplanting with *Phytophthora cinnamomi* at different dilutions.

Pathogen dilution		Leaf area	Shoot fresh mass	Root fresh mass	Shoot dry mass
Non-inoculated	NM	299.7b	23.25b	2.63b	2.88b
	M	640.9a	54.87a	5.48a	5.02a
1:100	NM	244.2b	20.07b	2.54b	2.02b
	M	540.6a	46.16a	4.40a	4.44a
1:10	NM	287.7b	23.06b	2.44b	2.25b
	M	523.1a	44.22a	4.18a	4.01a

Values in a column followed by different letters are significantly different ($p = 0.05$)

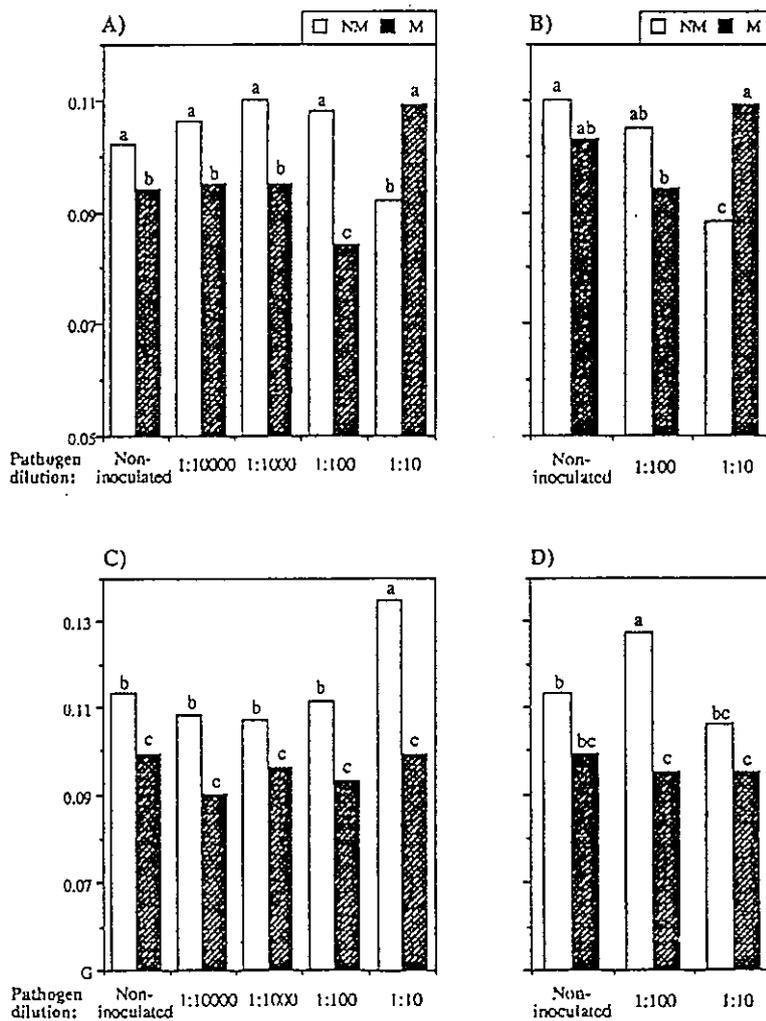


Fig. 3. Root/shoot ratios of non-mycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Queen Tahiti (A, B) and Smooth Cayenne (C, D) varieties of pineapple inoculated with *Phytophthora cinnamomi* at different dilutions: A, C) at outplanting to pots and B, D) one month later. Values followed by different letters are significantly different ($p = 0.05$).

Table 5. Mineral concentration (% of dry mass) of shoot of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Queen Tahiti variety of pineapple inoculated with *Phytophthora cinnamomi* at different dilutions at outplanting to pots

Pathogen dilution		N	P	K	Ca	Mg
Non-inoculated	NM	1.72	0.10	3.83	0.83	0.33
	M	1.83	0.12	3.87	0.91	0.36
1 : 10000	NM	1.82	0.07	4.40	0.64	0.27
	M	1.87	0.14	4.03	0.84	0.36
1 : 1000	NM	1.80	0.06	4.47	0.68	0.27
	M	1.90	0.11	4.03	0.76	0.31
1 : 100	NM	2.45	0.08	4.62	0.74	0.28
	M	1.89	0.11	4.10	0.83	0.34
1 : 10	NM	1.90	0.09	4.40	0.82	0.32
	M	2.22	0.14	4.42	0.90	0.36

Table 6. Mineral concentration (% of dry mass) of shoot of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Smooth Cayenne variety of pineapple inoculated with *Phytophthora cinnamomi* at different dilutions at outplanting to pots

Pathogen dilution		N	P	K	Ca	Mg
Non-inoculated	NM	2.03	0.13	4.46	1.05	0.35
	M	1.99	0.13	4.07	1.17	0.34
1 : 10000	NM	2.21	0.11	4.68	1.11	0.32
	M	1.99	0.17	3.81	1.19	0.35
1 : 1000	NM	2.04	0.11	3.90	1.12	0.34
	M	2.02	0.15	4.14	1.23	0.35
1 : 100	NM	1.95	0.09	4.20	1.05	0.33
	M	1.96	0.17	3.94	1.23	0.38
1 : 10	NM	2.07	0.08	4.71	1.07	0.33
	M	1.99	0.17	3.68	1.18	0.37

For the Smooth Cayenne variety, positive effects of endomycorrhiza on P, Ca and Mg nutrition was more important in presence of the pathogen (Table 6). N and K concentrations were not modified by *P.cinnamomi* inoculation and were generally slightly lower for endomycorrhizal plants (Table 6).

Effect of P. cinnamomi one month after outplanting to pots

In contrast to non-mycorrhizal plants, shoot growth of endomycorrhizal plants of the Queen

Tahiti variety was not altered by *P.cinnamomi* inoculation (Table 3). However, the root growth of both endomycorrhizal or non-mycorrhizal plants of this variety was reduced by the pathogen (Table 3). *P.cinnamomi* did not affect shoot or root growth of the Smooth Cayenne variety (Table 4).

As could be expected, root/shoot ratios were lower in endomycorrhizal plants, with the exception of the Queen Tahiti variety in presence of the highest level of *P. cinnamomi* inoculum (Fig. 3b, 3d).

Endomycorrhization increased P, Ca and Mg

Table 7. Mineral concentration (% of dry mass) of shoot of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Queen Tahiti variety of pineapple inoculated with *Phytophthora cinnamomi* at different dilutions one month after outplanting to pots

Pathogen dilution		N	P	K	Ca	Mg
Non-inoculated	NM	2.21	0.09	5.12	0.80	0.27
	M	1.77	0.15	3.54	1.03	0.36
1 : 100	NM	1.97	0.08	5.04	0.73	0.28
	M	1.63	0.14	3.57	0.96	0.38
1 : 10	NM	2.33	0.11	5.11	0.84	0.32
	M	1.75	0.15	3.95	0.99	0.37

Table 8. Mineral concentration (% of dry mass) of shoot of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Smooth Cayenne variety of pineapple inoculated with *Phytophthora cinnamomi* at different dilutions one month after outplanting to pots

Pathogen dilution		N	P	K	Ca	Mg
Non-inoculated	NM	2.03	0.13	4.46	1.05	0.35
	M	1.99	0.13	4.07	1.17	0.34
1 : 100	NM	2.18	0.12	4.87	1.02	0.33
	M	2.27	0.15	4.28	1.24	0.35
1 : 10	NM	2.19	0.08	4.66	1.18	0.33
	M	1.94	0.17	3.89	1.21	0.36

nutrition of the Queen Tahiti variety with and without *P. cinnamomi* (Table 7). However, N concentration of endomycorrhizal plants was less (phenomenon of dilution). The effect of the symbiotic fungus on P nutrition was more important in presence of the pathogen for the Smooth Cayenne variety (Table 8). For both varieties, N and K contents were lower in endomycorrhizal plants and *P. cinnamomi* inoculation did not modify this effect (Tables 7, 8).

Discussion

Experiments with both pineapple varieties showed that the endomycorrhizal effect on plant growth was not influenced by *P. cinnamomi*, except for the Queen Tahiti variety in the presence of the highest concentration of pathogen, when patho-

gen inoculation was carried out at outplanting to pots. The negative effect of *P. cinnamomi* on nonmycorrhizal plants was likewise important for the Queen Tahiti variety when inoculation was performed at outplanting to pots. Pathogen inoculation did not alter endomycorrhizal colonization of this variety roots but the highest concentration of inoculum depressed fungal activity (arbuscule formation, ALP activity and endomycorrhizal effect). The reduction in endomycorrhizal plant growth could be explained by a less efficient endomycorrhizal symbiosis in the presence of *P. cinnamomi*.

The influence of the pathogen depends on several factors. Although root necroses were not observed both varieties of micropropagated pineapple showed varying susceptibility to negative effects of *P. cinnamomi*. Better shoot growth of the Smooth Cayenne variety following colonization

by AMF was less affected by *P. cinnamomi* than that of the Queen Tahiti variety. The level of pathogen inoculum influenced plant growth in a similar way to that reported by DAVIS and MENGE (1981) for citrus, with growth of endomycorrhizal pineapple being decreased at higher levels of *P. cinnamomi* inoculum. The protective effect of the symbiosis can also change with the AMF. BÄRTSCHI et al. (1981) showed that it was more interesting to inoculate with a mixture of symbiotic fungi to ensure good plant growth and a good level of tolerance towards the pathogen. Such a mixture could contain efficient fungi for both mineral nutrition and protection, and so act synergistically to provide more efficient tolerance to the pathogen.

It is well known that AMF positively influence P nutrition of plants (HARLEY and SMITH 1983) and increases in P nutrition have been suggested to decrease root membrane permeability, therefore reducing and modifying root exudation (RATNAYAKE et al. 1978). Root exudates of endomycorrhizal plants have been reported to contain more arginine and reducing sugars (BALTRUSCHAT and SCHÖNBECK 1975), and changes in exudate composition can modify rhizosphere populations and decrease pathogen activity (GRAHAM and MENGE 1982). MEYER and LINDERMAN (1986) reported reductions in sporangia and zoospore production by *P. cinnamomi* in rhizosphere soil extracts from endomycorrhizal roots. Better absorption of P by endomycorrhizal roots could also counterbalance pathogen damage (DAVIS and MENGE 1980), but P is probably not the only factor contributing to pathogen tolerance (GRAHAM and EGEL 1988). The present study on pineapple shows that the influence of *P. cinnamomi* also depends on the age of the two varieties at the time of pathogen inoculation and that this is modified by endomycorrhiza infection. Non-mycorrhizal plants were more severely affected by early inoculation with the pathogen but no such difference was observed with endomycorrhiza formation, indicating modifications in the physiology of the plant. Endomycorrhiza can influence other aspects of plant physiology than mineral nutrition. As could be expected, they modified

biomass distribution in pineapple, root production being lower in relation to that of shoots. However, the application of the highest inoculum level of *P. cinnamomi* inversed this proportion for Queen Tahiti variety, suggesting that the endomycorrhizal plants may have produced a more important root system to support the pathogen. AMF can also influence phenol metabolism and root lignification (DEHNE and SCHÖNBECK 1979), making plants better adapted to resist to pathogen aggressions.

Other micro-organisms can show a potential for biological control of *Phytophthora* root rot, such as antagonistic bacteria and fungi (BROADBENT and BAKER 1974, GEES and COFFEY 1989, OWNLEY and BENSON 1992). CALVET et al. (1993) have reported the synergistic action of a fungal antagonist with an AMF in increasing marigold growth in the presence of *Pythium ultimum*. This effect may be through increases in the population of the antagonistic micro-organism under the influence of AMF (SECILIA and BAGYARAJ 1987), and opens the possibility of using both groups of mycoflora for improving biocontrol of the root pathogen.

Conclusion

AMF can be considered as potential biological control agents contributing to tolerance to *P. cinnamomi* in pineapple; the Smooth Cayenne variety may be more tolerant to *P. cinnamomi* aggression. It will be interesting to use this biotechnology in association with other antagonists, or with reasonable pesticide applications (AZIZ et al. 1990, GUILLEMIN et al. 1993), when pathogen pressure is very important. Furthermore, introduction of endomycorrhization during early stages of pineapple plant production represents an interesting technology towards improving plant development with decreases in chemical input.

Acknowledgements. The authors thank Vitropic S.A. (Montpellier, France) for supplying the micropropagated plant material and Dr Mourichon X. (CIRAD, FLHOR, Montpellier, France) for *Phytophthora cinnamomi* Rands.

References

- ANDERSON, E.J. 1951. The *Phytophthora cinnamomi* problem in pineapple fields of Hawaii. *Phytopathology* 41: 187-188.
- AZIZ, T., YUEN J.E. & HABTE M. 1990. Response of pineapple to mycorrhizal inoculation and fosetyl-Al treatment. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 21: 2309-2317.
- BALTRUSCHAT, H. & SCHÖNBECK, F. 1975. The influence of endotrophic mycorrhiza on the infestation of tobacco by *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathologische Zeitschrift* 84: 172-188.
- BÄRTSCHI, H., GIANINAZZI-PEARSON, V. & VEGH, I. 1981. Vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and root rot disease (*Phytophthora cinnamomi*) development in *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathologische Zeitschrift* 102: 213-218.
- BROADBENT, P. & BAKER, K.F. 1974. Association of bacteria with sporangium formation and breakdown of sporangia in *Phytophthora* spp.. *Australian Journal of Agricultural Research* 25: 139-145.
- CALVET, C., PERA, J. & BAREA, J.M. 1993. Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant and Soil* 148: 1-6.
- CHAUVEL, B. 1991. Polymorphisme génétique et sélection de la résistance aux urées substituées chez *Alopecurus myosuroides* Huds. Thesis of University, Paris-Sud, Orsay, 160 p.
- Comité Inter Instituts pour le diagnostic foliaire 1968. Méthode de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Coll. Eur. Méd. sur le contrôle de l'alimentation des Plantes cultivées, Seville. p. 12-20.
- 1972. Méthode de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Coll. Eur. Méd. sur le contrôle de l'alimentation des Plantes cultivées, Budapest. p. 144-150.
- DAVIS, R.M., MENGE, J.A. & ZENTMYER, G.A. 1978. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Phytophthora* root rot of three crop plants. *Phytopathology* 68: 1614-1617.
- & MENGE, J.A. 1980. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus. *Phytopathology* 70: 447-452.
- & MENGE, J.A. 1981. *Phytophthora parasitica* inoculation and intensity of vesicular-arbuscular mycorrhizae in citrus. *New Phytologist* 87: 705-715.
- DEHNE, H.W. & SCHÖNBECK, F. 1979. The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. II. Phenol metabolism and lignification. *Phytopathologische Zeitschrift* 95: 210-216.
- GEES, R. & COFFEY, M.D. 1989. Evaluation of a strain of *Myrothecium roridum* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 79: 1079-1084.
- GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V. & TROUVELOT, A. 1982. Les Mycorhizes, Partie Intégrante de la Plante : Biologie et Perspective d'Utilisation. INRA Press, Paris, France. 397 p.
- GRAHAM, J.H. & EGEL, D.S. 1988. *Phytophthora* root rot development on mycorrhizal and phosphorus-fertilized nonmycorrhizal sweet orange seedlings. *Plant Disease* 72: 611-614.
- & MENGE, J.A. 1982. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on take-all disease of wheat. *Phytopathology* 72: 95-98.
- GUILLEMIN, J.P., GIANINAZZI, S. & GIANINAZZI-PEARSON, V. 1991. L'endomycorhization de vitroplants d'*Ananas comosus* : mise en évidence d'un effet mycorrhizien. *Fruits* 46: 355-358.
- , ABDEL-FATTAH, G.M., TROUVELOT, A., GIANINAZZI, S. & GIANINAZZI-PEARSON, V. 1993. Interactions between soil-applied fungicides, endomycorrhiza fungal activity and plant growth. *Trends in Agricultural Sciences. Soil Science* 1: 161-172.
- HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Inc., London-New York. 483 p.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1-32.
- LOUVEL, D. 1975. Etude des relations entre l'ananas et le *Phytophthora parasitica*: mise au point d'une technique d'inoculation, localisation des niveaux de la résistance. *Fruits* 30: 669-679.
- MATARÉ, R. & HATTING, M.J. 1978. Effect of mycorrhizal status of avocado seedlings on root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant and Soil* 49: 433-435.
- MEHRLICH, F.P. 1934. Control of *Phytophthora* heart rot of pineapple plants. *Phytopathology* 24: 173-196.
- 1936. Pathogenicity and variation in *Phytophthora* species causing heart rot of pineapple plants. *Phytopathology* 26: 23-43.
- MEYER, J.R. & LINDERMAN, R.G. 1986. Selective influence on population of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 191-196.
- OWNLEY, B.H. & BENSON, D.M. 1992. Evaluation of *Penicillium janthinellum* as a biological control of *Phytophthora* root rot of azalea. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117: 407-410.
- PAULITZ, T.C. & LINDERMAN, R.G. 1991. Mycorrhizal interactions with soil organisms. In: Arora, D.K. et al. (eds). *Handbook of Applied Mycology*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong. p. 77-129.
- PEGG, K.G. 1977. Soil application of element sulphur as a control of *Phytophthora cinnamomi* root and heart rot of pineapple. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 17: 859-865.
- PHILLIPPS, J.M. & HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and ve-

- sicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158–161.
- PY, C., LACOEUILHE, J.J. & TEISSON, C. 1984. L'ananas: sa culture, ses produits. G.P. Maisonneuve & Larose, Paris (V°). 562 p.
- RATNAYAKE, M., LEONARD, R.T. & MENGE, J.A. 1978. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. New Phytologist 81: 543–552.
- ROCHBACH, K.G. & SCHENCK, S. 1985. Control of pineapple heart rot, caused by *Phytophthora parasitica* and *P. cinnamomi*, with metalaxyl, fosetyl-Al, and phosphorous acid. Plant Disease 69: 320–323.
- SECILIA, J. & BAGYARAJ, D.J. 1987. Bacterial and actinomycetes with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. Canadian Journal of Microbiology 33: 1069–1073.
- SMITH, S.E. & GIANINAZZI-PEARSON, V. 1990. Phosphate uptake and vesicular-arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effect of photon irradiance and phosphate nutrition. Australian Journal of Plant Physiology 17: 177–188.
- TISSERANT, B., GIANINAZZI-PEARSON, V., GIANINAZZI, S. & GOLLOTE, A. 1993. *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular endomycorrhizal infections. Mycological Research 97: 245–250.
- TROUVELOT, A., KOUGH, J. & GIANINAZZI-PEARSON, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. (eds.). Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. INRA Press, Paris. p. 217–221.
- WARNER, M.H. & JONES, J.B. 1967. Determination of total tissue using a Technicon Kjeldahl Nitrogen apparatus. Technicon Symposia 1966, Automation in analytical chemistry, Vol. I. Mediad Inc., New York. p. 145–148.

Manuscript received December 1993

SELOSTUS

Mykorritsientien merkitys biologisena torjuntakeinona *Phytophthora cinnamomi*-tautia vastaan mikrolisätyllä ananaksella (*Ananas comosus* (L.) Merr).

JEAN-PHILIPPE GUILLEMIN¹, SILVIO GIANINAZZI¹, VIVIENNE GIANINAZZI-PEARSON¹ ja JEAN MARCHAL²

¹Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS, Dijon, Ranska ja ²Laboratoire de Physiologie et Biochimie, CIRAD, FLHOR, Montpellier, Ranska

Phytophthora cinnamomi Rands aiheuttaa ananaksessa saatoa alentavaa juurilahoa. Tutkimuksessa selvitettiin arbuskelimykorrhizasienisiirorostuksen vaikutusta *P. cinnamomi*-sientä vastaan ananaslajeilla Queen Tahiti ja Smooth Cayenne. Mykorritsiasieni siirrostettiin ananaksen pikkutaimiin *in vitro* -vaiheen jälkeen. Erisuuruiset *P. cinnamomi*-tartutemäärät eivät vaikuttaneet mykorritsallisten kasvien kasvuun ja ravinteiden ottoon, mutta mykorritsatoimilla kasveilla *P. cinnamomi* alensi sekä kasvua että ra-

vinteiden ottoa. Mykorritsallisten kasvien juuri/verso -suhte oli pienempi kuin mykorritsattomien kasvien eikä *P. cinnamomi* vaikuttanut suhteeseen muulloin kuin käytettäessä suurimpia tartutemääriä. Taudinaiheuttajan vaikutus juurten mykorritsiasieni-infektioon oli vähäinen, mutta symbioosin toiminta heikkeni suurimmilla *P. cinnamomi*-tartutemäärillä. Mykorritsientien hyödyntäminen on mielenkiintoinen bioteknologian sovellutus mikrolisätyjen ananastaimien tuotannossa.

Interactions between soil-applied fungicides, endomycorrhiza fungal activity and plant growth

J.P. Guillemain, G.M. Abdel-Fattah¹, A. Trouvelot, S. Gianinazzi and V. Gianinazzi - Pearson

Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, Dijon Cédex, France

¹ Botany Department, Faculty of Science, Mansoura University, Egypt

ABSTRACT

Previous reports have shown that fungicides affect endomycorrhizas. In the present work, the effects of several soil-applied fungicides were tested on plant growth, endomycorrhizal infection development and nutrient uptake in pot-grown soybean (cv. Amsoy 71) and micropropagated pineapple (Queen Tahiti and Smooth Cayenne varieties). Positive endomycorrhizal effects on shoot and root growth of soybean were unaffected by application of fosetyl-Al, captan and mancozeb ; however, benomyl and quitozen significantly depressed shoot growth of endomycorrhizal plants but significantly increased root growth. Mineral assimilation by endomycorrhizal plants was significantly greater than in nonmycorrhizal plants except for benomyl and quitozen application. Significantly higher values of endomycorrhizal infection were observed with trypan blue staining in fosetyl-Al and mancozeb treated plants. Benomyl and quitozen significantly reduced these values. No significant effect of any fungicide on endomycorrhizal pineapple growth was observed except for plants treated with etridiazol. Root/shoot ratio was inverted by the fungicide applications. Mineral uptake into shoots of both pineapple varieties increased in all endomycorrhizal plants and this positive effect was only slightly affected by fungicide application.

INTRODUCTION

The root systems of almost all plants harbour arbuscular endomycorrhiza fungi and

the symbiotic association that is formed has beneficial effects on plant growth mainly by increasing the uptake of poorly mobile soil elements (P, Cu, Zn) (Harley and Smith 1983 ; Gianinazzi-Pearson and Gianinazzi 1988a). The practical use of endomycorrhizal fungi in plant production systems (Gianinazzi et al. 1990 ; Jeffries and Dodd 1991) necessitates the use of fungicides (applied to control soil fungal pathogens) that do not have damaging effects on the symbiosis. Many previous reports show that fungicides affect endomycorrhizas (Trappe et al. 1984). They can decrease endomycorrhizal infection (Jalali and Domsch 1975 ; de Bertoldi et al. 1977 ; Bärtschi 1982) and fungal sporulation (Nemec 1980), through reduced spore germination, hyphal growth (Bailey and Safir 1978) or fungal activity (Kough et al. 1987). Fungicides also decrease phosphorus uptake by endomycorrhizal plants (Fitter and Nichols 1988) and this may be due to a decrease in the efficiency of the endomycorrhizal root system (Verkade and Hamilton 1983) or to direct toxic effects on the flow of phosphorus in external mycelium (Hale and Sanders 1982). However, some like fosetyl-Al can stimulate or have no effect on infection development and plant growth (Jabaji-Hare and Kendrick 1985, 1987 ; Despatie et al. 1989 ; Vyas 1990). The effects of fungicides on endomycorrhiza will be influenced by many variables : plant species, fungal strains, age of the symbiosis, soils, application rates and procedures, as well as growth conditions (Spokes et al. 1981).

In the present work, we observed the effects of several soil-applied fungicides on plant growth, endomycorrhizal infection development and nutrient uptake in pot-grown soybean and

pineapple, with the aim of defining efficient combinations between plants, endomycorrhizal fungi and fungicides.

For soybean, fungicides reported to have different effects on endomycorrhizal infection were tested: benomyl and quitozen, known to be inhibitory; fosetyl-Al, shown to be beneficial; captan and mancozeb, reported to have variable effects. For pineapple, the tested fungicides were those commonly applied in production: fosetyl-Al, captan, maneb (close to mancozeb) and etridiazol.

MATERIALS AND METHODS

Experiment I

The experiment was conducted in a disinfected (γ irradiated, 10kGy) alkaline soil (pH 7.8, 30ppm available P) in a growth chamber (250 μ E m⁻² s⁻¹, 22/18°C, 16h day, 70-80% relative humidity). Soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. Amsoy 71) seeds were surface sterilized 30 minutes in a 7% calcium hypochlorite solution and germinated 4 days in vermiculite

moistened with distilled water. After 5 days, germinated seedlings were transplanted into plastic pots containing 400g soil and half were inoculated with fresh, chopped root fragments of onion infected with *Glomus mosseae* (LPA5). There was one plant per pot and each pot was watered daily with osmoted water. All plants were inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* (USDA strain G3) and grown 8 weeks; after 4 weeks, each plant was fed with 32mg S (K₂SO₄ as a solution).

Five fungicides (fosetyl-Al (Aliette), benomyl (Benlate), captan (Phytocape 83), mancozeb (Dithane M45) and quitozen (Cryptonol spécial E)) (table 1) were tested and applied at field rates, i.e. 40.0, 50.0, 20.7, 40.0 and 21.0 mg of active ingredient of kg soil⁻¹, respectively. Fungicides were added as a 20ml aqueous solution applied to soil of non mycorrhizal and endomycorrhizal plants. Each treatment consisted of 4 replicates.

Plant growth was evaluated using several parameters: fresh mass of shoot (SFM) and root (RFM) and dry mass of shoot (SDM) (g). The endomycorrhizal response was calculated for shoot and root growth by:

Table 1 : Fungicides tested

Active component	Commercial name	Formula	Characteristic	Mode of action
fosetyl-Al	ALIETTE	aluminium tris-O-ethyl phosphonate	systemic	Stimulates plant resistance mechanisms to pathogens
benomyl	BENLATE	methyl 1-butylcarbamoyl 2-benzimidazolyl carbamate	systemic	Inhibition of fungal mitosis
etridiazol	AATERRA M	5-ethoxy-3-trichloromethyl 1,2,4 thiadiazol	systemic	Inhibition of respiration
captan	PHYTOCAPE 83	N-(trichloromethyl-thio) tetrahydro -3a,4,7,7a isoindolinedione-1,3	non systemic	Interference with enzyme systems within fungal cells
maneb	ORGANIL 66	manganese N,N' ethylene bis dithiocarbamate	non systemic	Like captan
mancozeb	DITHANE M45	manganese N,N' ethylene bis dithiocarbamate plus zinc	non systemic	Like captan
quitozen	CRYPTONOL SPECIAL E	pentachloronitrobenzene	non systemic	Toxic for mycellium Action on AMPc or P450 cytochrome

$\frac{\text{[fresh endomycorrhizal-nonmycorrhizal mass]} \times 100}{\text{fresh nonmycorrhizal mass}}$

Infection development was estimated microscopically as infection intensity (M%) or arbuscular frequency (A%) (Trouvelot et al. 1986) either after trypan blue staining (Philipps and Hayman 1970), and after staining for succinate dehydrogenase (SDH) activity (Smith and Gianinazzi-Pearson 1990) to evaluate living fungal infections.

Shoot and root nitrogen and phosphorus contents were assayed by the Kjeldahl (Jackson 1973) and nitrovanadomolybdate (Jackson 1958) methods.

Statistical analysis of data was carried out of Newman-Keuls test.

Experiment II

The experiment was conducted in a disinfected acid soil (pH 5.0, 35ppm available P) under artificial tropical conditions (300 μ E m⁻² s⁻¹, 29/25°C, 12h day, 70-90% relative humidity). Two micropropagated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) varieties (Queen Tahiti and Smooth Cayenne (clone CY0)) were used.

The microplants were inoculated with chopped root pieces of *Tephrosia ehlenbergiana* infected by a *Glomus* sp. (isolate LPA21, from Dabou, Ivory Coast) during a four-week acclimatization period (Guillemin et al. 1991). One gram of infected root was used to inoculate 10 plants. After this period, the pineapple plants were transplanted to pots containing 400g of a soil : gravel mix (1:1) and grown for 3 months. Each pot contained one plant. Plants were watered daily with osmosed water and weekly with 2x20ml of Hoagland n°2 solution (Hoagland and Arnon 1950) without phosphate.

Four fungicides (fosetyl-Al (Aliette), etridiazol (Aaterra M), captan (Phytocape 83) and maneb (Organil 66R)) (table 1) were tested and applied at field rates recommended for root disease control, i.e. 10.0, 3.0, 1.2 and 1.5 g.m⁻², respectively. Each fungicide was applied twice: once at the beginning of the acclimatization period, and a second time at transplanting to pots. Fungicide rates were applied as 20 ml of aqueous solution to soil of nonmycorrhizal and endomycorrhizal plants. Each treatment consisted of 5 replicates.

Plant growth was evaluated by leaf area (LA) (cm²) and fresh and dry mass of shoot (SFM, SDM) and root (RFM) (g). The endomycorrhizal effects on shoot and root growth was calculated as described above.

Infection development was estimated microscopically as described above. Roots of pineapple were stained also for alkaline phosphatase (ALP) (Tisserant et al. 1993) activity to evaluate functional (ALP) fungal infection.

Mineral elements (N, P, K, Ca, Mg) were analyzed by the CIRAD Laboratory, Montpellier, France.

Data were statistically analyzed using Newman-Keuls test.

RESULTS

Experiment I

Soybeans colonized by *Glomus mosseae* were significantly larger than non inoculated plants (table 2A). Shoot and root growth of endomycorrhizal plants were unaffected by application of fosetyl-Al and mancozeb and only slightly decreased by captan, as compared to untreated plants. In contrast, benomyl and quintozen significantly depressed shoot growth of endomycorrhizal plants but significantly increased root growth, as compared to untreated plants (table 2A).

Table 2A : Shoot (SFM) and root (RFM) fresh mass and shoot dry (SDM) mass of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) soybeans

Fungicide treatments		SFM (g)	RFM (g)	SDM (g)
untreated	NM	7.16d	8.98cd	2.03ef
	M	12.12ab	8.33ef	3.07abc
fosetyl-Al	NM	7.13d	6.94g	1.89f
	M	13.27a	7.63efg	3.35a
benomyl	NM	7.39d	8.53de	2.10ef
	M	8.80c	10.44ab	2.46de
captan	NM	7.66cd	8.53de	2.21ef
	M	11.22b	7.30fg	2.78bcd
mancozeb	NM	8.81c	10.78a	2.68cd
	M	12.53a	7.64ef	3.15ab
quintozen	NM	6.87d	8.19def	2.04ef
	M	7.55cd	9.69bc	2.26ef

Values in a column followed by different letters are significantly different (P<0.05)

In all treatments, except for benomyl and quintozen, endomycorrhizal plants had not only higher total fresh mass but also much lower root/shoot ratios than the equivalent nonmycorrhizal plants (figure 1A). Higher root/shoot ratios of inoculated plants with benomyl and quintozen was related to a higher root production. Growth of uninoculated plants was only significantly affected by mancozeb which positively influenced growth, and fosetyl-AI which negatively affected root growth (table 2A). The endomycorrhizal effect on shoot growth was considerably reduced by benomyl and quintozen, due to the negative effect of these two fungicides on endomycorrhizal plant growth (table 2B).

Both nitrogen (N) and phosphorus (P) assimilation by endomycorrhizal plants was significantly greater than in nonmycorrhizal plants, except for phosphorus following benomyl application or quintozen treatment (table 2C). Values were highest when fosetyl-AI was added to endomycorrhizal plants. Captan application

had no effect on P assimilation by endomycorrhizal and nonmycorrhizal plants but it significantly reduced N nutrition in endomycorrhizal plants. Fungicide application had little effect on N and P assimilation in nonmycorrhizal plants. Inoculation by *G. mosseae* significantly improved nodulation without fungicide applications (table 2D) and this was maintained after captan or mancozeb treatment. A significant stimulation was observed in nodule formation in fosetyl-AI-treated plants. However, benomyl and quintozen significantly reduced both number and dry weight of nodules of endomycorrhizal plants to a level similar to that of untreated nonmycorrhizal soybeans (table 2D). This probably contributed the lower values for N assimilation in soybean treated with these fungicides.

Significantly higher values for intensity of infection (M%) and arbuscule frequency (A%) were observed with trypan blue staining in fosetyl-AI and mancozeb treated plants (figures

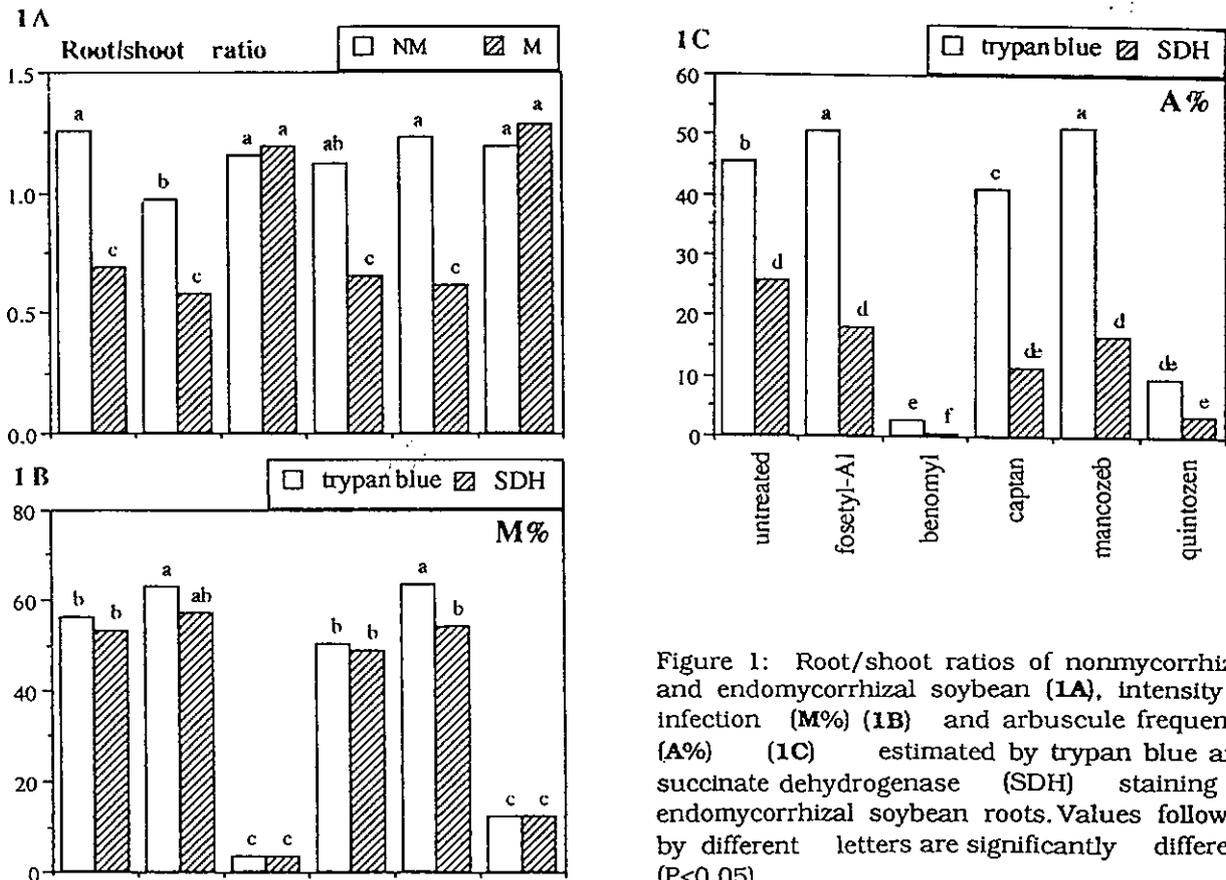


Figure 1: Root/shoot ratios of nonmycorrhizal and endomycorrhizal soybean (1A), intensity of infection (M%) (1B) and arbuscule frequency (A%) (1C) estimated by trypan blue and succinate dehydrogenase (SDH) staining of endomycorrhizal soybean roots. Values followed by different letters are significantly different (P<0.05).

Interactions between fungicides and endomycorrhizas

Table 2B : Endomycorrhizal effects (%) on shoot and root growth of soybeans

Fungicide treatments	endomycorrhizal effect (%)	
	shoot	root
untreated	69	-7
fosetyl-Al	86	10
benomyl	19	22
captan	46	-14
mancozeb	42	-29
quintozen	10	18

Table 2C : N and P uptake (mg plant⁻¹) and content (%) of shoots of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) soybeans

Fungicide treatment		shoot N		shoot P	
		mg plant ⁻¹	%	mg plant ⁻¹	%
untreated	NM	44.40f	2.15de	1.80d	0.09d
	M	107.33b	3.33b	5.75b	0.19ab
fosetyl-Al	NM	44.69f	2.18de	1.89d	0.10d
	M	122.43a	3.59a	6.80a	0.20a
benomyl	NM	44.45f	2.18de	1.82d	0.08d
	M	50.80e	2.21d	2.01cd	0.08d
captan	NM	48.18ef	2.19d	1.75d	0.08d
	M	81.03c	2.96c	5.42b	0.18b
mancozeb	NM	56.71d	1.99ef	2.17cd	0.08d
	M	110.05b	3.40b	6.31a	0.20a
quintozen	NM	42.34f	1.91f	1.63d	0.08d
	M	50.79e	2.31de	2.23cd	0.10d

Values in a column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$)

1B & C). Benomyl and quintozen significantly reduced M% and A% whilst captan induced a reduction only in values for A%. The intensity of infection showing SDH activity was comparable to that observed with trypan blue staining (figure 1B). However, vital SDH staining for frequency of living arbuscules always gave smaller values than with trypan blue (figure 1C). Fungicide application reduced the frequency of SDH-active

Table 2D : Number and dry weight of nodules of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) soybeans without fungicides, and of endomycorrhizal soybeans with fungicides

Fungicide treatments		nodule	dry weight
		number plant ⁻¹	g plant ⁻¹
untreated	NM	37c	0.057e
	M	71b	0.166a
fosetyl-Al	M	94a	0.156ab
benomyl	M	47c	0.095d
captan	M	66b	0.122c
mancozeb	M	69b	0.136bc
quintozen	M	45c	0.090d

Values in a column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$)

arbuscules, especially in plants treated with benomyl where only 19% of trypan blue stained arbuscules showed SDH activity, as compared to 57% in untreated plants. Quintozen had less effect on the frequency of SDH-active arbuscules, as compared to its effect on total endomycorrhizal infection evaluated by trypan blue staining. Consequently, the greatly reduced growth and P uptake of benomyl and quintozen treated endomycorrhizal plants must be due to the very poor development of the infection, and in particular to the lack of active arbuscules.

Experiment II

The only fungicide to affect pineapple growth was captan which positively affected leaf area of Queen Tahiti variety (tables 3A & B). Etridiazol treatment tended to decrease shoot growth (18-20%) of endomycorrhizal plants of both pineapple varieties (tables 3A & B). It similarly affected growth of the nonmycorrhizal Smooth Cayenne variety (-30%), whilst slight increases in shoot growth were observed in the treated nonmycorrhizal Queen Tahiti variety. There was a non-significant but marked negative effect (-20 to -50%) of fosetyl-Al on shoot and root growth of nonmycorrhizal plants of both varieties (tables 3A & B).

The greater sensitivity of nonmycorrhizal plants to fungicide application led to an increased endomycorrhizal effect on shoot growth

Table 3A : Leaf area (LA), shoot (SFM) and root (RFM) fresh mass and shoot dry mass (SDM) of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Queen Tahiti variety of pineapple

Fungicide treatments		LA (cm ²)	SFM (g)	RFM (g)	SDM (g)
untreated	NM	186.90d	15.26cd	1.76b	1.24b
	M	460.74b	36.01ab	4.00a	3.70a
fosetyl-Al	NM	109.10d	10.36d	0.99b	1.20b
	M	483.14b	40.37ab	5.83a	4.30a
etridiazol	NM	238.66cd	18.38cd	1.58b	1.50b
	M	380.96bc	29.31b	5.10a	3.64a
captan	NM	339.90c	24.62c	2.62b	2.35b
	M	627.93a	48.36a	6.70a	5.05a
maneb	NM	170.55d	11.31d	1.65b	1.24b
	M	444.60b	34.41ab	4.31a	3.50a

Values in a column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 3B : Leaf area (LA), shoot (SFM) and root (RFM) fresh mass and shoot dry mass (SDM) of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Smooth Cayenne (clone CYO) variety of pineapple

Fungicide treatments		LA (cm ²)	SFM (g)	RFM (g)	SDM (g)
untreated	NM	244.33b	19.97b	2.49b	1.91b
	M	459.60a	38.25a	4.40a	3.73a
fosetyl-Al	NM	199.40b	15.04b	1.81b	1.59b
	M	456.60a	36.61a	4.77a	3.10a
etridiazol	NM	166.70b	13.19b	1.93b	1.29b
	M	345.50ab	30.72ab	4.55a	2.85a
captan	NM	187.60b	20.68b	2.26b	1.65b
	M	531.40a	44.22a	5.50a	4.08a
maneb	NM	220.10b	16.51b	1.96b	1.66b
	M	542.90a	44.78a	6.53a	4.38a

Values in a column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$)

of treated plants, with the exception of etridiazol and captan in the Queen Tahiti variety (table 3C). The latter was due to the fact that etridiazol caused a decrease in shoot growth of endomycorrhizal plants, whereas captan

enhanced shoot growth of nonmycorrhizal plants more than endomycorrhizal plants. The effect of endomycorrhiza infection on root growth was amplified by fungicide application in both pineapple varieties (table 3C). Root/shoot ratio was influenced by fungicide application, particularly for Queen Tahiti variety plants treated with fosetyl-Al and etridiazol (figures 2A & B). Root/shoot ratios of endomycorrhizal pineapple plants were always slightly smaller than those of nonmycorrhizal plant, as previously reported (Guillemin *et al.* 1991), but this was inverted by the fungicide applications.

Mineral uptake into shoots of the two varieties increased in all endomycorrhizal plants and this positive effect was only slightly affected by fungicide application (tables 3D, E). However, etridiazol and captan increased mineral absorption by nonmycorrhizal plants of the Queen Tahiti variety (table 3D); these increases were related to greater plant growth (table 3A). Likewise, in relation to plant size, etridiazol negatively influenced mineral uptake into shoots of the Smooth Cayenne variety whereas maneb caused a small increase in immobilization of N, K, Ca and Mg by endomycorrhizal plants (table 3E). For both varieties, shoot P, Ca and Mg contents of endomycorrhizal plants were similar or greater than those of nonmycorrhizal plants, except for the etridiazol treated Queen Tahiti variety of pineapple (tables 3D & E). On the contrary, N contents were consistently lower in endomycorrhizal plants except for both varieties treated with maneb and Smooth Cayenne variety treated with fosetyl-Al (tables 3D & E).

Table 3C : Endomycorrhizal effects (%) on shoot and root growth of Queen Tahiti and Smooth Cayenne varieties of pineapple

Fungicide treatments	Varieties			
	Queen Tahiti		Smooth Cayenne	
	endomycorrhizal effect (%)			
	shoot	root	shoot	root
untreated	136	127	96	77
fosetyl-Al	290	489	143	164
etridiazol	60	223	133	136
captan	96	156	114	143
maneb	204	161	171	233

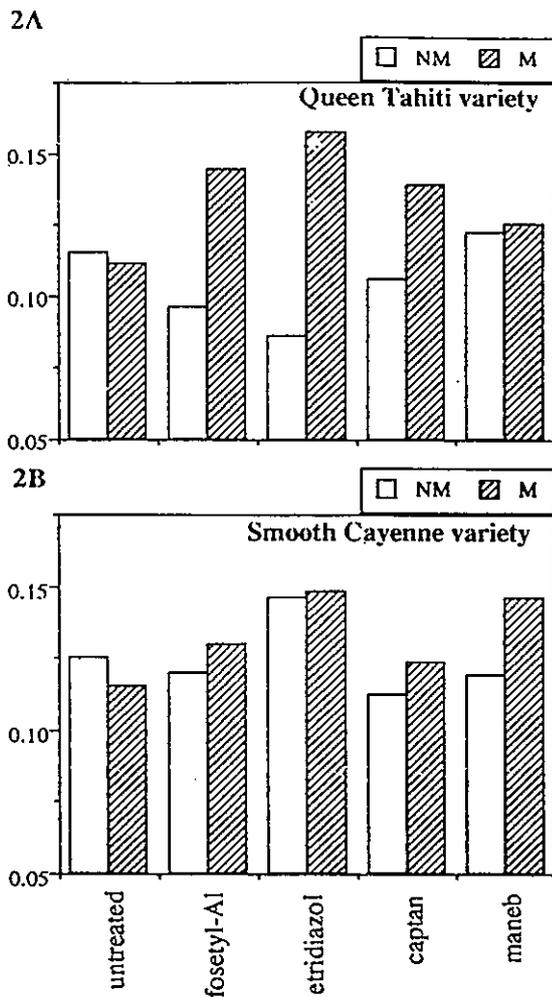


Figure 2: Root/shoot ratios of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Queen Tahiti (2A) and Smooth Cayenne (2B) varieties of pineapple.

None of the fungicides affected endomycorrhiza infection development estimated after trypan blue staining, but captan and maneb applications decreased arbuscule frequency (figures 3A, B, C & D). However, the relative proportion of SDH and ALP active arbuscules was greater with these two fungicides. Intensity of infection and arbuscule frequency evaluated by fungal SDH and ALP activities were significantly reduced by etridiazol application in both pineapple varieties (figures 3A, B, C & D). Thus, plants with a higher

Table 3D : Mineral uptake (mg plant^{-1}) and contents (%) of shoots of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Queen Tahiti variety of pineapple

Fungicide treatments			Mineral element				
			N	P	K	Ca	Mg
untreated	mg	NM	25	0.94	57	10	3.56
		M	63	6.70	133	35	13.54
	%	NM	2.04	0.08	4.60	0.81	0.29
		M	1.70	0.18	3.59	0.96	0.37
foseyl-Al	mg	NM	19	1.32	40	9	3.44
		M	62	6.02	131	42	14.96
	%	NM	1.59	0.11	3.33	0.75	0.29
		M	1.45	0.14	3.04	0.97	0.35
etridiazol	mg	NM	35	2.70	70	14	5.48
		M	61	5.82	126	33	12.74
	%	NM	2.34	0.19	4.65	0.95	0.37
		M	1.67	0.16	3.45	0.92	0.35
captan	mg	NM	46	3.64	95	22	8.25
		M	78	8.23	159	51	18.28
	%	NM	1.96	0.15	4.06	0.94	0.35
		M	1.55	0.16	3.14	1.01	0.36
maneb	mg	NM	21	0.63	50	10	3.68
		M	61	6.34	118	37	13.27
	%	NM	1.69	0.05	4.00	0.82	0.30
		M	1.74	0.18	3.36	1.05	0.38

proportion of arbuscular infection that was active (maneb and captan) were those showing greater growth and mineral uptake, whilst those where a lower proportion of infection was active (etridiazol) had lower growth and mineral contents.

DISCUSSION

Previous studies have frequently reported different effects of fungicides on endomycorrhiza which may be due partly to variations in plant species, endomycorrhizal strains, method or rate of application fungicide, growth conditions, or the age of symbiosis at the time of application (Spokes et al. 1981). The results from the present experiments further underline the complexity in interactions between fungicides, plants and endomycorrhizal fungi. By more detailed analyses, we have been able to better define fungicide effects on endomycorrhiza and

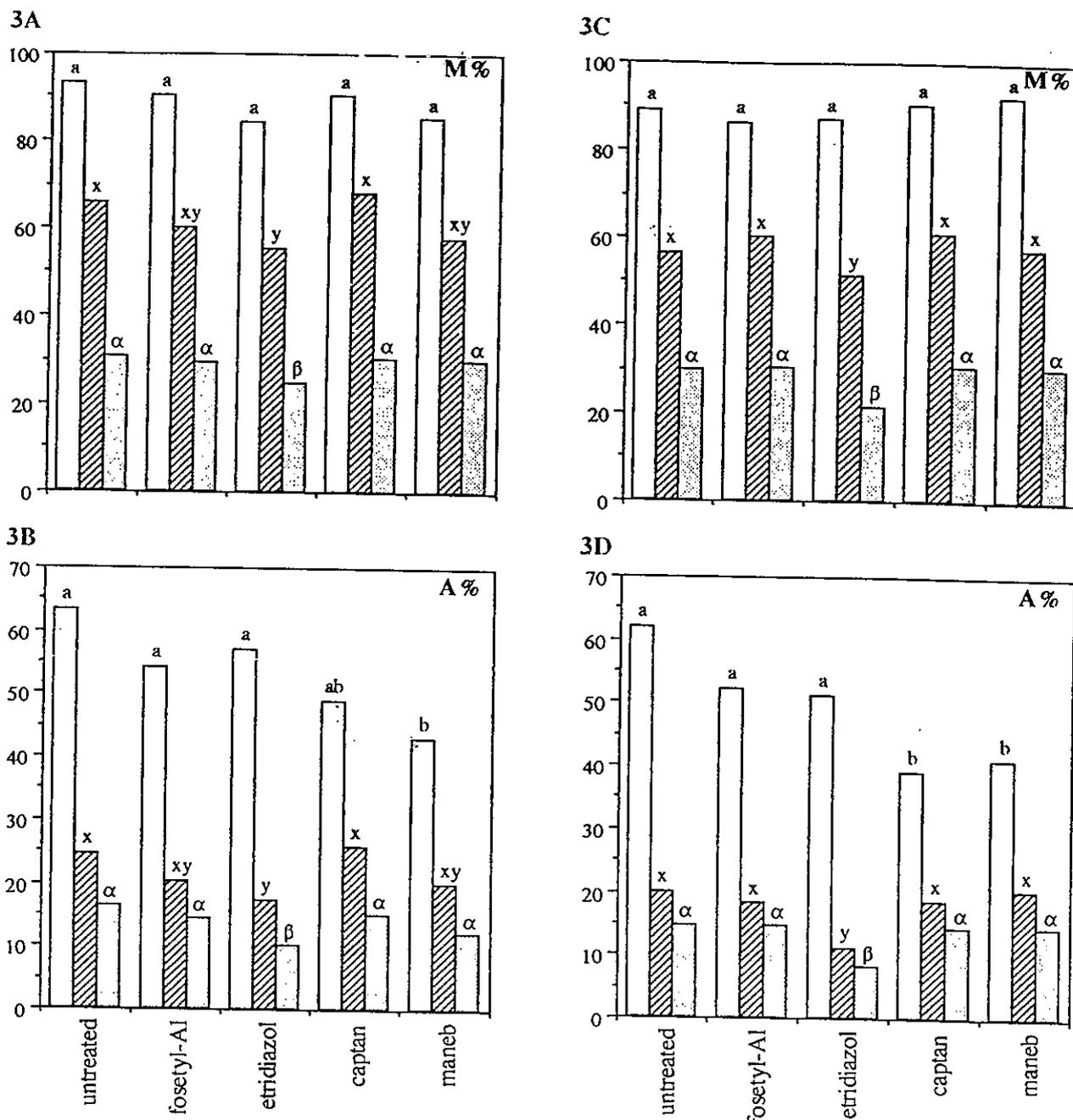


Figure 3: Intensity of infection (M%) (3A, 3C) and arbuscule frequency (A%) (3B, 3D) observed by trypan blue \square , succinate dehydrogenase ▨ and alkaline phosphatase ▩ staining of roots of endomycorrhizal Queen Tahiti (3A, 3B) and Smooth Cayenne (3C, 3D) varieties of pineapple. Values for each staining followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Interactions between fungicides and endomycorrhizas

Table 3E : Mineral uptake (mg plant⁻¹) and contents (%) of shoots of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) Smooth Cayenne (clone CYO) variety of pineapple

Fungicide treatments		N	Mineral element				
			P	K	Ca	Mg	
untreated	mg	NM	39	1.89	85	20	6.97
		M	63	6.53	134	41	14.55
	%	NM	2.06	0.10	4.45	1.06	0.37
		M	1.70	0.18	3.60	1.11	0.39
fosetyl-Al	mg	NM	30	1.48	65	16	5.93
		M	61	6.11	128	32	12.00
	%	NM	1.91	0.09	4.08	0.99	0.37
		M	1.97	0.20	4.14	1.04	0.39
etridiazol	mg	NM	26	1.25	56	14	4.76
		M	56	6.30	111	33	10.83
	%	NM	2.01	0.10	4.33	1.07	0.37
		M	1.95	0.22	3.91	1.14	0.38
captan	mg	NM	39	1.50	90	17	5.81
		M	72	7.87	144	46	15.91
	%	NM	2.35	0.09	5.45	1.05	0.35
		M	1.76	0.19	3.53	1.14	0.39
maneb	mg	NM	31	2.01	65	16	6.19
		M	85	6.61	147	52	17.65
	%	NM	1.90	0.12	3.94	0.97	0.37
		M	1.93	0.15	3.36	1.18	0.40

determine whether certain have a more general action which is independent of the plant, fungal species or culture conditions.

Plant growth

Similar results were obtained for fosetyl-Al applied at field rates with both endomycorrhizal plant species (soybean and pineapple) since their growth was maintained with this fungicide (table 4), confirming previous data with the same or other plants (Jabaji-Hare and Kendrick 1985; Despatie et al. 1989; Morandi 1989; Trouvelot et al. 1991). In contrast, fosetyl-Al had a negative effect on the growth of nonmycorrhizal soybean and pineapple, as reported by Aziz et al. (1990) for similar rates (60mg kg soil⁻¹) of application to pineapple. It can therefore be concluded that endomycorrhizal inoculation compensates for this negative effect, and is therefore an important factor for a better tolerance of the fungicide.

Captan, mancozeb and maneb have an identical action on fungi (table 1), and the three fungicides did not alter growth of endomycorrhizal plants of soybean or pineapple (table 4). However, captan and mancozeb increased growth of nonmycorrhizal pineapple and soybean, respectively. Whilst captan has previously been reported to have little effect on the growth of some endomycorrhizal plant species (Nemec 1980), it significantly decreased the growth of endomycorrhizal onion (de Bertoldi

Table 4 : Effects of fungicide applications on plant growth, P nutrition and endomycorrhizal infection of nonmycorrhizal (NM) and endomycorrhizal (M) soybean (S) and pineapple (P) as compared to untreated plants

		Fungicide treatments								
		fosetyl-Al		captan		mancozeb/ maneb		benomyl	quintozen	etridiazol
		S	P	S	P	S	P	S	S	P
plant growth	NM	-r	-	0	+Q	+	0	0	0	0
	M	0	0	0	0	0	0	+r/-s	+r/-s	-
P nutrition	NM	0	0	0	0	0	0	0	0	+Q/0C
	M	0	0	0	0	0	0	-	-	0
infection	M%	+	0	0	0	+	0	-	-	-SDH/ALP
	A%	+	0	-	-	+	-	-	-	-SDH/ALP

+ : positive effect; 0 : no effect; - : negative effect

s : only shoot affected; r : only root affected; Q : only Queen Tahiti variety affected; C : only Smooth Cayenne variety affected

SDH/ALP : only enzymically active infection affected

et al. 1977). Mancozeb only caused a slight reduction in groundnut biomass (Parvathi *et al.* 1985a).

Previous studies have already reported the negative effect of quintozen (Jalali 1979 ; Parvathi *et al.* 1985a) and benomyl (Trappe *et al.* 1984 ; Parvathi *et al.* 1985b) on endomycorrhizal plants. Shoot growth of endomycorrhizal soybean was similarly decreased by both fungicides in the present investigation. However, root growth of endomycorrhizal plants was surprisingly enhanced by benomyl and quintozen. These results are in contradiction with those obtained on tulip, poplar and onion by Verkade and Hamilton (1983) and Manjunath and Bagyaraj (1984), respectively. Variations may be related to fungicide rate. For example, Bailey and Safir (1978) observed a decrease in growth of soybean at a rate of 125 mg kg of soil⁻¹, whereas there was a small increase with rates of 2,5 and 25 mg kg of soil⁻¹. Benomyl application had no effect on the growth of nonmycorrhizal soybean, as reported for strawberry (Boatman *et al.* 1978), but contrary to that observed with non mycorrhizal tulip, poplar (Verkade and Hamilton, 1983) or onion (Boatman *et al.* 1978). This could again be related to application rates or to the sensitivity of plant species to fungicide toxicity.

Different effects on plant growth were observed with etridiazol applied at the same rate to endomycorrhizal pineapple (present results) and leek (Trouvelot *et al.* 1991). However, the fact that growth conditions were different (in pot for pineapple and in the field for leek) can partly explain the differences. The fungicide would remain more concentrated around roots in the closed environment of pots than in the field where it can be displaced by running off or leaching through the soil. In fact, if etridiazol application rates are increased for leek under field conditions (5g m⁻²), plant growth is negatively affected (Trouvelot, unpublished data) similar to pineapple in pots with 3g m⁻².

Mineral contents

Mineral contents of shoots increased in response to endomycorrhizal inoculation and appeared to be linked to shoot growth for both pineapple and soybean. For example, shoot growth and mineral content were best with fosetyl-Al application for endomycorrhizal soybean, with captan for endomycorrhizal Queen Tahiti pineapple variety and with maneb for endomycorrhizal Smooth Cayenne pineapple

variety. Fungicide application did not affect P nutrition of endomycorrhizal or nonmycorrhizal soybean and pineapple in comparison to untreated plants, except for endomycorrhizal soybean treated with benomyl and quintozen (table 4). Reduced P assimilation has been previously reported for endomycorrhizal onion, strawberry and pea treated with benomyl (Boatman *et al.* 1978 ; Fitter and Nichols 1988) and for endomycorrhizal onion treated with quintozen (Gray and Gerdemann 1969). Benomyl reduces hyphal inflow rates of P to endomycorrhizal root (Hale and Sanders 1982) and, in fact, the breakdown product of benomyl, into methyl-2 benzimidazole carbamate, is known to interfere with transport in fungal hyphae by inhibiting the formation of cytoplasmic microtubules (Howard and Aist 1980). Quintozen also acts directly on fungal metabolism.

The effect of fungicides on assimilation of other mineral elements by endomycorrhizal plants varied depending on the species, and this raises the question whether the fungicides act at the absorption sites or elsewhere in the physiological processes of the plant or of the fungi.

Endomycorrhizal infection

Non-vital staining

Endomycorrhizal infection of pineapple was not affected by fosetyl-Al in agreement with observations of Aziz *et al.* (1990), but it was significantly increased for soybean as reported by Morandi (1989). Fosetyl-Al has been observed to increase root exudation of soluble sugars by endomycorrhizal leeks (Jabaji-Hare and Kendrick 1985). Root exudates are considered to enhance spread of endomycorrhizal fungi, so contributing to an increased mycelial contact with roots (Ratnayake *et al.* 1978 ; Bécard and Piché 1989 ; Gianinazzi-Pearson *et al.* 1989). Fosetyl-Al has also been reported to positively influence production of phytoalexins in inoculated roots (Morandi 1989), without having effects on endomycorrhizal colonization. This accumulation of antimicrobial substances could add to the advantage of the fungicide in protecting against soil-borne plant pathogens.

Captan, maneb and mancozeb act similarly on fungi (table 4). The former two negatively influenced arbuscule formation in the endomycorrhizal infection of both pineapple and

soybean. Indeed, captan application has already been reported to decrease infection in corn (Nesheim and Linn 1969) and onion (Kough et al. 1987) roots, and mancozeb application in groundnut roots (Parvathi et al. 1985a). These fungicides are not systemics but interfere with fungal enzyme systems; they could negatively influence the metabolism of endomycorrhizal fungi leading to a decrease in infection development. Mancozeb, however, induced the opposite response in soybean roots, by slightly increasing endomycorrhizal colonization. This effect could be due to different sensibilities of fungal strains.

The decrease in infection observed in soybean treated with benomyl concurs with results from previous studies on different endomycorrhizal systems (Jalali and Domsch 1975 ; de Bertoldi et al. 1977 ; Bailey and Safir 1978 ; Fitter and Nichols 1988). This fungicide also reduced germination of chlamydo-spores and hyphal growth of *Glomus caledonium* (Carr and Hinkley 1985). The fact that the degradation product of benomyl, methyl-2 benzimidazole carbamate, inhibits mitosis (Menge 1982) could contribute to the decrease in endomycorrhizal colonization of roots. Quintozen application also inhibited endomycorrhizal colonization of soybean, confirming the negative effect already reported for several endomycorrhizal plants (Nesheim and Linn 1969 ; El-Giahmi et al. 1976 ; Menge et al. 1979 ; Rhodes and Larsen 1981). The mode of action of quintozen could be related to its interacting with AMPc or with the P450 cytochrome enzyme of mycelium (Leroux 1981).

Etridiazol, at the same rate of application, did not affect endomycorrhizal infection of pineapple in pots and increased infection in leek roots in the field (Trouvelot et al. 1991), in comparison to untreated plants. As for plant growth, this difference in effect could be due to the different conditions of plant development.

Vital and functional activities

Use of SDH and ALP staining which assay living and active infections, respectively, indicated changes in the metabolic activity of the endomycorrhizal infection following the application of certain fungicides. This was also reflected in the development of arbuscules which are considered the major sites of endocellular and biotrophic activity between both symbionts (Gianinazzi-Pearson and Gianinazzi 1988b).

For soybean, benomyl, captan and

mancozeb decreased arbuscule frequency estimated by SDH staining, as found by Kough et al. (1987) after captan and benomyl treatment of endomycorrhizal onions. Although quintozen and benomyl strongly reduced total endomycorrhizal colonization, they did not affect the percentage of living arbuscules (benomyl : 20% and quintozen : 36%), as compared to fungicides that did not decrease infection (fosetyl-Al : 36% and mancozeb : 32%). The poor growth of inoculated soybeans treated with benomyl and quintozen was therefore directly due to the very low level of endomycorrhizal infection. The smaller plant growth of etridiazol-treated pineapples was related to a lower arbuscule frequency evaluated by SDH and ALP staining (table 4).

CONCLUSION

Certain fungicide treatments are compatible with the positive effects of controlled endomycorrhization on plant growth and with development of the endomycorrhizal infection. Fosetyl-Al application is particularly interesting, as compared to captan, mancozeb and maneb, since it can also stimulate the defense mechanisms of the host-plant. However, fungicides should be tested for each plant-fungal species combination before their use. The identification of fungicides like fosetyl-Al, captan, maneb and mancozeb, which conserve beneficial effects of endomycorrhization on plant growth whilst eliminating pathogens, opens interesting perspectives for combining endomycorrhizas and fungicide applications in plant production systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Vitropic S.A. (Montpellier, France) for supplying the micropropagated plant material and Dr Marchal J. (CIRAD, Montpellier, France) for the mineral analysis of pineapple.

REFERENCES

- Aziz T., Yuen J.E. & Habte M. 1990. *Commun in Soil Sci Plant Anal*, 21 : 2309-2317
- Bailey J.E. & Safir G.R. 1978. *Phytopathology*, 68 : 1810-1812
- Bärtschi H. 1982. In: S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson and A. Trouvelot (Eds.) *Les Mycorrhizes, Partie Intégrante de la Plante : Biologie et Perspectives d'Utilisation*, INRA-Presses, Paris, pp259-266
- Bécard G. & Piché Y. 1989. *New Phytol*, 112 :

- 77-83
- Boatman N., Paget D., Hayman D.S. & Mosse B. 1978. *Trans Br Mycol Soc*, 70 : 443-450
- Carr G.R. & Hinkley M.A. 1985. *Soil Biol Biochem*, 17 : 313-316
- de Bertoldi M., Giovannetti M., Griselli M. & Rambelli A. 1977. *Ann Appl Biol*, 86 : 111-115
- Despatie S., Furlan V. & Fortin J.A. 1989. *Plant Soil*, 113 : 175-180
- El-Giahmi A.A., Nicolson T.H. & Daft M.J. 1976. *Trans Br Mycol Soc*, 67 : 172-173
- Fitter A.H. & Nichols R. 1988. *New Phytol*, 110 : 201-206
- Gianinazzi S., Trouvelot A. & Gianinazzi-Pearson V. 1990. 23 Int. Hort. Cong. Plenary Lectures, Parretti Grafiche, Florence, pp 25-30
- Gianinazzi-Pearson V. & Gianinazzi S. 1988a. In: L. Boddy, R. Marchand and D. J. Read (Eds.) Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi, Cambridge University Press, Cambridge, pp227-241
- Gianinazzi-Pearson V. & Gianinazzi S. 1988b. In: S. Scannerini, D. C. Smith, P. Bonfante-Fasolo and V. Gianinazzi-Pearson (Eds.) Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp73-84
- Gianinazzi-Pearson V., Branzanti B. & Gianinazzi S. 1989. *Symbiosis*, 7 : 243-255
- Gray L.E. & Gerdemann J.W. 1969. *Plant Soil*, 30 : 415-421
- Guillemin J.P., Gianinazzi S. & Gianinazzi-Pearson V. 1991. *Fruits*, 46 : 355-358
- Hale K.A. & Sanders F.E. 1982. *J Plant Nutr*, 5 : 1355-1367
- Harley J.L. & Smith S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*, Academic Press Inc., London - New York
- Hoagland D.R. & Arnon D.I. 1950. *Cir Calif Agric Exp Strn*, N° 347
- Howard R.J. & Aist J.R. 1980. *J Cell Biol*, 87 : 55-64
- Jabaji-Hare S.H. & Kendrick W.B. 1985. *Can J Plant Pathol*, 7 : 118-126
- Jabaji-Hare S.H. & Kendrick W.B. 1987. *Soil Biol Biochem*, 19 : 95-99
- Jackson M.L. 1958. *Soil Chemical Analysis*, Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.
- Jackson M.L. 1973. *Soil Chemical Analysis*, Prentice Hall of India Ltd., New Delhi
- Jalali B.L. & Domsch K.H. 1975. In: F. E. Sanders, B. Mosse and P. B. Tinker (Eds.) *Endomycorrhizas*, Academic Press, London, New York, San Francisco, pp 619-626
- Jalali B.L. 1979. In: B. Schippers and W. Gams (Eds.) *Soil-Borne Plant Pathogens*, Academic, London, pp 525-530.
- Jeffries P. & Dodd J.C. 1991. In: D. K. Arora, B. Rai, K. G. Mukerji and G. R. Knudsen (Eds.) *Handbook of Applied Mycology 1 : Soil and Plants*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, pp 155-185
- Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. & Gianinazzi S. 1987. *New Phytol*, 106 : 707-715
- Leroux P. 1981. *La Défense des Végétaux*, 207 : 59-83
- Manjunath A. & Bagyaraj D.J. 1984. *Plant Soil*, 80 : 147-150
- Menge J.A., Johnson E.L.V. & Minasian V. 1979. *New Phytol*, 82 : 473-480
- Menge J.A. 1982. *Phytopathology*, 72 : 1125-1132
- Morandi D. 1989. *Plant Physiol Biochem*, 27 : 697-701
- Nemec S. 1980. *Can J Bot*, 58 : 522-526
- Nesheim O.N. & Linn M.B. 1969. *Phytopathology*, 59 : 297-300
- Parvathi K., Venkateswarlu K. & Rao A.S. 1985a. *Can J Bot*, 63 : 1673-1675
- Parvathi K., Venkateswarlu K. & Rao A.S. 1985b. *Trans Br Mycol Soc*, 84 : 29-33
- Phillips J.M. & Hayman D.S. 1970. *Trans Br Mycol Soc*, 55 : 158-161
- Ratnayake M., Leonard R.T. & Menge J.A. 1978. *New Phytol*, 81 : 543-552
- Rhodes L.H. & Larsen P.O. 1981. *Plant Dis*, 65 : 145-147
- Smith S.E. & Gianinazzi-Pearson V. 1990. *Aust J Plant Physiol*, 17 : 177-188
- Spokes J.R., MacDonald R.M. & Hayman D.S. 1981. *Pestic Sci*, 12 : 346-350
- Tisserant B., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. & Gollotte A. 1993. *Mycol. Res.*, 97 : 245-250
- Trappe J.M., Molina R. & Castellano M. 1984. *Ann Rev Phytopathol*, 22 : 331-359
- Trouvelot A., Abdel-Fattah G.M., Gianinazzi S. & Gianinazzi-Pearson V. 1991. In: D. J. Read, D. H. Lewis, A. H. Fitter and I. J. Alexander (Eds.) *Mycorrhizas in Ecosystems*, CAB International, Inc., Oxon, GB, pp 404
- Trouvelot A., Kough J. & Gianinazzi-Pearson V. 1986. In: V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (Eds.) *Mycorrhizae : Physiology and Genetics*, INRA-Press, Paris, pp 217-221
- Verkade S.D. & Hamilton D.F. 1983. *Scientia Horti*, 21 : 253-260
- Vyas S.C. 1990. In: Proc. 8th NACOM, Innovation and Hierarchical Integration, Jackson, Wyoming, pp 300

Application of commercial arbuscular endomycorrhizal fungal inoculants to the establishment of micropropagated grapevine rootstock and pineapple plants

P Lovato *, JP Guillemin, S Gianinazzi **

INRA-CNRS, laboratoire de Phytoparasitologie, Station de génétique et d'amélioration des plantes,
INRA, BV 1540, 21034 Dijon Cédex, France

(COST Meeting, 21-23 May 1992, Dijon, France)

Summary — Commercial inoculants of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi were tested on 2 plant species. Micropropagated grapevine plantlets were grown in a greenhouse and inoculated with 2 commercial inoculants applied to the growth substrata. No physical or chemical effect of the sterilized inoculants was observed. Mycorrhizal grapevine plants showed a 3-fold increase in shoot growth as compared to control plants. Almost all root pieces were infected and the percentage of root length showing presence of the mycorrhizal fungus was \approx 30%. The same inoculants were compared to efficient fungal isolates in micropropagated pineapple plants of 3 varieties grown in a controlled environment chamber with simulated tropical conditions. Plants grew better in acid than in alkaline soil, and *Glomus* sp (isolate LPA21) was more efficient in acid soil than both commercial inoculants. An increased inoculant dose from 1% to 3% sometimes caused an increase in root infection with increases or decreases in plant growth depending on pineapple variety or type of inoculum used. One inoculant tended to improve growth in alkaline soil, while another was more efficient in acid soil. The implications of the use of these products are discussed.

grapevine / pineapple / micropropagation / arbuscular endomycorrhiza / plant growth / infection development

Résumé — Utilisation d'inoculum commerciaux de champignons endomycorhiziens pour l'établissement de porte-greffe de vigne et de plantes d'ananas micropropagés. Des inocula commerciaux de champignons endomycorhizogènes à arbuscules ont été éprouvés sur 2 plantes micropropagées, la vigne et l'ananas. Les porte-greffes de vignes micropropagés sont infectés avec 2 inoculum commerciaux mélangés aux substrats de culture et placés en serre. L'apport des inoculum commerciaux stérilisés n'a pas affecté la croissance des vitroplants écartant les effets chimiques et physiques de ces inocula. La croissance des vignes mycorrhizées a été 3 fois supérieure à celle des plantes non-mycorhizées. Presque toutes les racines ont été infectées et le développement de l'infection est de l'ordre de 30%. Ces mêmes inoculum ont été comparés à des isolats endomycorhizogènes capables de stimuler la croissance des trois variétés de vitroplants d'ananas. Ces plantes présentaient une meilleure croissance dans le sol acide que dans le sol alcalin. Dans le sol acide, l'isolat de *Glomus* sp. (LPA21) est plus efficace sur la croissance des ananas que les inoculum commerciaux. L'augmentation des doses d'inoculum de 1% à 3% est souvent liée à une élévation de l'infection endomycorhizienne. Par contre, les effets sur la croissance varient selon les combinaisons plante-hôte / inoculum utilisées. Un des inoculum commerciaux semble avoir été plus performant sur la croissance des vitroplants d'ananas dans le sol alcalin, tandis que l'autre inoculum l'était plus dans le sol acide. Les conséquences de l'utilisation de ces produits sont discutées.

vigne / ananas / micropropagation / endomycorhize à arbuscule / croissance / infection endomycorhizienne

* On leave from the Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

** Correspondence and reprints

Infection development (M%) was assessed as described above, and arbuscule frequency in the root cortex (A%) was also evaluated.

RESULTS

Experiment 1

The application of commercial inoculants was beneficial to the establishment and growth of micropropagated grapevine plantlets. There was a significant positive effect on the growth of the micropropagated grapevine rootstock which showed a 3-fold increase in root and shoot growth (table I). The treatments with the sterilized substrata showed no significant difference from the uninoculated control.

Infection level was expressed by 2 parameters (table I). The first, F%, showed that > 90% of the root pieces examined were infected, indicating a high soil receptivity vis-à-vis the inoculants. The second parameter, M%, expressed the intensity of the infection developing within root tissues. With the AGC inoculant, 40% of the root length was mycorrhizal, while this parameter attained = 30% for the Phytotec inoculant. There was no difference between the application rates of 1 or 5%, which shows that the inoculants had an infection potential high enough to promote growth at the lowest concentration used.

Experiment 2

Growth of pineapple plants differed markedly in acid and alkaline soils, so these will be examined

separately. Plant growth and endomycorrhizal infection parameters were generally lower in alkaline than in acid soil.

In alkaline soil, inoculation of plants of the Queen Tahiti variety (table II) caused better growth as expressed by leaf area and shoot fresh and dry mass than that of uninoculated plants, but there were no significant differences among the inocula. No significant differences were observed in root fresh mass, although plants inoculated with AGC inoculants tended to have lower root fresh mass than the other treatments. For infection parameters, AGC inoculant caused a higher frequency of arbuscules than the other inoculi.

For Smooth Cayenne variety plants (table III), AGC inoculant showed the best performance expressed in terms of leaf area, shoot fresh mass and dry mass. There were smaller differences in root fresh mass, although the same tendency was found. The highest levels of infection were obtained with AGC inoculant and *G intraradices*. The striking feature with this variety was that plants with the best growth had the highest levels of infection intensity and arbuscule frequency.

For the Spanish variety (table IV), differences among inocula in effects on shoot fresh and dry mass and root fresh mass were less significant. However, there was a clear tendency for the AGC inoculant to promote increases in leaf area. The AGC inoculant also resulted in the highest levels of infection intensity and arbuscule frequency in this variety, and these were significantly greater in comparison to plants inoculated with the Phytotec inoculant. These results clearly show that the AGC inoculant promoted better growth of pineapple plants in the alkaline soil than the Phytotec inoculant.

Table I. Shoot and root fresh mass, shoot dry mass and endomycorrhizal infection (frequency of infection (F%) and intensity of infection (M%)) of grapevine rootstock SO₄ 102 growing in γ -irradiated alkaline soil alone (control), or with addition of sterile or non-sterile AGC inoculant at 2 application rates or Phytotec inoculant at 5% rate.

	Control	Sterile AGC		AGC		Phytotec
		1%	5%	1%	5%	
Shoot fresh mass (g)	1.95 ^b	1.37 ^b	2.42 ^b	7.25 ^a	6.24 ^a	7.36 ^a
Root fresh mass (g)	2.17 ^b	1.67 ^b	3.50 ^b	7.57 ^a	7.04 ^a	7.38 ^a
Shoot dry mass (g)	0.57 ^b	0.39 ^b	0.75 ^b	2.02 ^a	1.79 ^a	1.99 ^a
Frequency of infection (F%)				93 ^a	83 ^a	89 ^a
Intensity of infection (M%)				39 ^a	37 ^a	28 ^a

Values in each line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table II. Leaf area, shoot and root fresh mass, shoot dry mass and endomycorrhizal infection (intensity of infection (M%) and arbuscule frequency (A%)) of plants of the Queen Tahiti pineapple variety; uninoculated and inoculated with *Glomus intraradices* or commercial inoculants (AGC 1% or 3%, Phytotec 1% or 3%) in an alkaline soil.

		Uninoculated	Glomus intraradices	AGC		Phytotec	
				1%	3%	1%	3%
Leaf area	(cm ²)	61.1 ^b	99.9 ^a	145.1 ^a	141.9 ^a	125.4 ^a	145.4 ^a
Shoot fresh mass	(g)	4.26 ^b	8.02 ^a	10.32 ^a	8.91 ^a	8.10 ^a	9.59 ^a
Root fresh mass	(g)	0.83 ^a	1.28 ^a	1.07 ^a	0.98 ^a	1.43 ^a	1.61 ^a
Shoot dry mass	(g)	0.51 ^b	0.72 ^a	1.17 ^a	1.10 ^a	0.97 ^a	1.12 ^a
Intensity of infection	(M%)	0 ^b	56 ^a	63 ^a	55 ^a	36 ^a	46 ^a
Arbuscule	(A%)	0 ^c	24 ^{ab}	35 ^a	33 ^a	18 ^b	28 ^{ab}

Values in each line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table III. Leaf area, shoot and root fresh mass, shoot dry mass and endomycorrhizal infection (intensity of infection (M%) and arbuscule frequency (A%)) of plants of the Smooth Cayenne pineapple variety, uninoculated and inoculated with *Glomus intraradices* or commercial inoculants (AGC 1% or 3%, Phytotec 1% or 3%) in an alkaline soil.

		Uninoculated	Glomus intraradices	AGC		Phytotec	
				1%	3%	1%	3%
Leaf area	(cm ²)	50.7 ^c	120.6 ^b	160.2 ^{ab}	208.0 ^a	109.4 ^b	113.6 ^b
Shoot fresh mass	(g)	3.45 ^c	9.19 ^b	12.34 ^{ab}	16.11 ^a	8.05 ^b	10.98 ^b
Root fresh mass	(g)	0.48 ^b	0.90 ^{ab}	1.15 ^{ab}	1.41 ^{ab}	1.40 ^{ab}	1.68 ^a
Shoot dry mass	(g)	0.43 ^c	0.97 ^b	1.31 ^{ab}	1.64 ^a	0.86 ^b	1.14 ^b
Intensity of infection	(M%)	0 ^d	64 ^{ab}	69 ^{ab}	74 ^a	20 ^c	47 ^b
Arbuscule frequency	(A%)	0 ^d	35 ^b	48 ^a	51 ^a	5 ^c	13 ^c

Values in each line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

In the acid soil, responses to the inocula varied with the plant variety. The Queen Tahiti variety (table V) showed best growth when inoculated with *Glomus* sp (LPA21). In general, plants treated with the commercial inoculants had growth parameters which, except for root fresh mass, did not differ significantly from those of uninoculated plants. There was an important difference in the infectivity of the different inocula in this variety. Infection levels were highest with *Glomus* sp (LPA21) and lowest for the Phytotec inoculant at 1%.

The *Glomus* sp (LPA21) inoculum also promoted best growth in plants of the Smooth Cay-

enne variety (table VI), and of the 2 commercial products, the Phytotec inoculant tended to promote better growth than that from AGC. There was, however, no significant difference in infection parameters among the commercial inoculants, although these were lower than those observed in plants infected by *Glomus* sp (LPA21).

Highest values in shoot fresh and dry mass as well as leaf area were obtained in Spanish variety plants (table VII) by inoculation with *Glomus* sp (LPA21) or Phytotec at 3%. This was not related to the level of infection, which was similar for the commercial inoculants but, as for the other 2 varieties, it was highest in *Glomus* sp (LPA21).

Table IV. Leaf area, shoot and root fresh mass, shoot dry mass and endomycorrhizal infection (intensity of infection (M%) and arbuscule frequency (A%)) of plants of the Spanish pineapple variety; uninoculated and inoculated with *Glomus intraradices* or commercial inoculants (AGC 1% or 3%, Phytotec 1% or 3%) in an alkaline soil.

		Uninoculated	Glomus intraradices	AGC		Phytotec	
				1%	3%	1%	3%
Leaf area	(cm ²)	106.4 ^c	130.3 ^{bc}	231.2 ^a	219.7 ^{ab}	181.5 ^{abc}	169.5 ^{abc}
Shoot fresh mass	(g)	6.80 ^b	9.88 ^{ab}	15.98 ^a	14.36 ^a	11.75 ^{ab}	10.48 ^{ab}
Root fresh mass	(g)	0.83 ^a	1.82 ^a	1.53 ^a	1.74 ^a	1.20 ^a	1.61 ^a
Shoot dry mass	(g)	0.78 ^b	1.24 ^{ab}	1.77 ^a	1.60 ^{ab}	1.47 ^{ab}	1.33 ^{ab}
Intensity of infection	(M%)	0 ^c	51 ^a	63 ^a	66 ^a	19 ^b	15 ^b
Arbuscule frequency	(A%)	0 ^d	23 ^b	37 ^a	39 ^a	4 ^c	3 ^c

Values in each line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table V. Leaf area, shoot and root fresh mass, shoot dry mass and endomycorrhizal infection (intensity of infection (M%) and arbuscule frequency (A%)) of plants of the Queen Tahiti pineapple variety; uninoculated and inoculated with *Glomus* sp or commercial inoculants (AGC 1% or 3%, Phytotec 1% or 3%) in an acid soil.

		Uninoculated	Glomus sp	AGC		Phytotec	
				1%	3%	1%	3%
Leaf area	(cm ²)	116.9 ^b	423.6 ^a	244.8 ^b	242.7 ^b	279.3 ^b	195.9 ^b
Shoot fresh mass	(g)	8.38 ^b	32.76 ^a	18.54 ^b	17.78 ^b	19.39 ^b	13.99 ^b
Root fresh mass	(g)	0.95 ^b	3.10 ^a	2.71 ^a	2.27 ^a	2.78 ^a	1.78 ^{ab}
Shoot dry mass	(g)	1.04 ^b	3.38 ^a	2.01 ^{ab}	2.01 ^{ab}	2.23 ^{ab}	1.57 ^b
Intensity of infection	(M%)	0 ^d	89 ^a	46 ^b	47 ^b	13 ^c	37 ^b
Arbuscule frequency	(A%)	0 ^c	57 ^a	17 ^b	20 ^b	8 ^b	10 ^b

Values in each line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table VI. Leaf area, shoot and root fresh mass, shoot dry mass and endomycorrhizal infection (intensity of infection (M%) and arbuscule frequency (A%)) of plants of the Smooth Cayenne pineapple variety; uninoculated and inoculated with *Glomus* sp or commercial inoculants (AGC 1% or 3%, Phytotec 1% or 3%) in an acid soil.

		Uninoculated	Glomus sp	AGC		Phytotec	
				1%	3%	1%	3%
Leaf area	(cm ²)	133.3 ^b	318.8 ^a	204.8 ^{ab}	132.4 ^b	305.1 ^a	220.1 ^{ab}
Shoot fresh mass	(g)	10.21 ^b	27.07 ^a	17.62 ^{ab}	9.96 ^b	26.10 ^a	19.00 ^{ab}
Root fresh mass	(g)	1.50 ^b	2.67 ^{ab}	2.01 ^b	1.31 ^b	3.51 ^a	2.39 ^{ab}
Shoot dry mass	(g)	1.04 ^c	3.29 ^a	1.76 ^{bc}	1.05 ^c	2.67 ^{ab}	1.91 ^{bc}
Intensity of infection	(M%)	0 ^c	87 ^a	42 ^b	36 ^b	29 ^b	51 ^b
Arbuscule frequency	(A%)	0 ^c	65 ^a	25 ^b	15 ^b	18 ^b	24 ^b

Values in each line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table VII. Leaf area, shoot and root fresh mass, shoot dry mass and endomycorrhizal infection (intensity of infection (M%) and arbuscule frequency (A%)) of plants of the Spanish pineapple variety; uninoculated and inoculated with *Glomus* sp or commercial inoculants (AGC 1% or 3%, Phytotec 1% or 3%) in an acid soil.

		Uninoculated	<i>Glomus</i> sp	AGC		Phytotec	
				1%	3%	1%	3%
Leaf area	(cm ²)	160.6 ^b	346.7 ^a	226.1 ^{ab}	251.1 ^{ab}	279.2 ^{ab}	384.2 ^a
Shoot fresh mass	(g)	10.02 ^b	29.21 ^a	15.63 ^b	17.93 ^b	19.51 ^b	30.93 ^a
Root fresh mass	(g)	1.40 ^b	2.55 ^{ab}	2.34 ^{ab}	2.49 ^{ab}	2.73 ^{ab}	4.01 ^a
Shoot dry mass	(g)	0.72 ^c	2.69 ^{ab}	1.81 ^b	1.92 ^b	2.18 ^b	3.29 ^a
Intensity of infection	(M%)	0 ^c	87 ^a	35 ^b	39 ^b	30 ^b	34 ^b
Arbuscule frequency	(A%)	0 ^c	69 ^a	12 ^b	22 ^b	10 ^b	17 ^b

Values in each line followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

There were no clear-cut doses for the commercial inoculants. In the alkaline soil, increasing the dose of the AGC inoculant caused a relative increase in the growth of Smooth Cayenne plants (table III). In the acid soil, increasing the dose of Phytotec caused poorer growth of the Queen Tahiti and Smooth Cayenne varieties (tables V and VI), but caused an increase in growth of plants of the Spanish variety (table VII). Furthermore, the 3% dose of the AGC inoculant caused a decrease in shoot mass and in leaf area of Smooth Cayenne variety plants to values similar to uninoculated controls (table VII).

DISCUSSION

The absence of differences in plant growth between the control grapevine plants and those receiving the γ -irradiated inoculant showed that positive effects were due to the inoculum, and that there was no chemical or physical effect of these substrata on plant growth. However, it should be kept in mind that the positive effects may have been due to other biological agents besides the endomycorrhizal fungi possibly present in the inoculum (Koslowsky and Boerner, 1989; Paulitz and Linderman, 1991). These biological effects may involve factors such as phosphorus solubilizing microorganisms (Azcon-Aguilar *et al*, 1986) or plant-growth promoting bacteria (Kloepper *et al*, 1980).

The grapevine plants showing better growth had lower infection levels, which reinforces the concept that the intensity of infection is a relative

parameter (Abbott and Robson, 1978). In fact, a high level of infection may cause a drain of photosynthates (Clapperton and Reid, 1992), which is not compensated for by improved mineral nutrition of the host plant. This is illustrated in some of the data obtained with pineapple plants in the acid soil. For example, increases in the intensity of infection and arbuscule frequency of Queen Tahiti and Smooth Cayenne varieties were linked to decrease in plant growth, especially leaf area. Koide (1985) found that shoot parameters in sunflower were affected by the energy sink represented by formation of endomycorrhiza. The optimal level of infection depends on the efficiency and turnover of the different factors involved, such as photosynthetic rates, fungal transport and transfer systems, etc. The present experiments underline the complexity of these interactions since the effects on pineapple plant growth following an increase in fungal infection varied both with the plant variety and the fungal isolate.

These observations illustrate the necessity of considering plant performance as the essential aspect when evaluating inocula or inoculant products. Furthermore, mycorrhizal efficiency has to be considered within a well-defined set of conditions: it is dependent on the plant species or variety, the efficiency of the fungal isolate as well as the adaptability of the inocula to different soil conditions. Pineapple, for example, is a plant which grows better in acid than in alkaline soils (Guillemin *et al*, 1991), but in the present work it became clear that the fungal inoculants also behaved differently depending on the test conditions. In the alkaline soil, the AGC inoculant was

consistently superior to the Phytotec inoculant in promoting plant growth and root infection. However, in the acid soil, where the pineapple plants generally grew better, these differences were less evident and lower values occurred in infection parameters than in the alkaline soil.

The greater ability of the *Glomus* sp (LPA21) strain to promote pineapple plant growth in the acid soil in comparison to both commercial inocula may be explained by the fact that this isolate is from an acid soil and is therefore better adapted to such conditions. Koslowsky and Boerner (1989) have also reported that an isolate from a strongly acid soil is more efficient under such conditions than one from neutral soil. The commercial inocula are in principle formulated to face a wide range of soil conditions, but the data obtained in the present study suggest that they consist predominantly of isolates which perform better at neutral pH.

The development of an AM fungal inoculant which performs well in a wide range of plants and soil conditions is an ideal target, but this has to be attained in a realistic manner. In the present study, where inoculants were tested in combinations of different environmental conditions, soils and plant species or varieties, it is evident that limitations exist in their use. However, the results obtained confirm that utilization of commercial inoculants is technically feasible, even though further experimentation is necessary to carefully define parameters such as optimal doses to be used, efficiency under different soil conditions, and host specificity in response to the endomycorrhizal fungi used.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was made possible via research grants from the CNPq-RHAE Program, Brazilian Ministry of Science and Technology (PL) and the French Ministry of Research and Technology (JPG). The authors thank Vitropics SA (Montpellier, France) for supplying the pineapple microplants, AGC and Phytotec for supplying the inoculants and V Gianinazzi-Pearson for valuable discussions and revision of the manuscript.

REFERENCES

- Abbott LK, Robson AD (1978) Growth of subterranean clover in relation to formation of endomycorrhizas by introduced and indigenous fungi in a field soil. *New Phytol* 81, 575-585
- Azcon-Aguilar C, Gianinazzi-Pearson V, Fardeau JC, Gianinazzi S (1986) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria on growth and nutrition of soybean in a neutral-calcareous soil amended with ^{32}P - ^{45}Ca -tricalcium phosphate. *Plant Soil* 96, 3-15
- Blal B, Gianinazzi-Pearson V (1989) Interest of mycorrhiza for the production of micropropagated oil palm clones. *Agric Ecosystems Environ* 29, 39-43
- Carre M, Martin-Tanguy J, Mussillon P, Martin C (1979) La culture de méristèmes et la multiplication végétative *in vitro* au service de la pépinière. *Publ INRA ANPPF INVUELEC. Petits fruits* 14, 8-65
- Clapperton MJ, Reid DM (1992) A relationship between plant growth and increasing VA mycorrhizal inoculum density. *New Phytol* 120, 227-234
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Trouvelot A (1982) *Les Mycorrhizes, Partie Intégrante de la Plante Biologie et Perspectives d'Utilisation*. Coll INRA 13, INRA, Paris
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Trouvelot A (1990a) Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with emphasis on high value crops. In: *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth* (Whips J, Lumsden B, eds) Cambridge Univ Press, Cambridge, 41-54
- Gianinazzi S, Trouvelot A, Gianinazzi-Pearson V (1990b) Role and use of mycorrhizas in horticultural crop production. In: *23 IHC Plenary Lectures*. Int Soc Hortic Sci, Florence, Italy, 25-30
- Guillemin JP, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1991) L'endomycorrhization de vitroplants d'*Ananas comosus* : mise en évidence d'un effet mycorrhizien. *Fruits* 46, 355-358
- Guillemin JP, Gianinazzi S, Trouvelot A (1992) Screening of VA endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated plants. *Agronomie* (in press)
- Harley JL, Smith SE (1983) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London
- Hewitt, EJ (1966) *Sand and Water Culture Methods Used in the Studies of Plant Nutrition*. Tech Comm 22. Commonw Agric Bur, London, 430-434
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circ Calif Agric Exp Stn* 347
- Kiernan JM, Hendrix JW, Stoltz LP, Maronek DM (1984) Characterisation of strawberry plants produced by tissue culture and infected with specific mycorrhizal fungi. *HortSci* 19, 883-885
- Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant-growth promoting bacteria. *Nature* 286, 885-886
- Koide R (1985) The nature of growth depression in sunflower caused by vesicular arbuscular mycorrhizal infection. *New Phytol* 99, 449-462
- Koslowsky SD, Boerner RE (1989) Interactive effects of aluminum, phosphorus and mycorrhizae on

- growth and nutrient uptake of *Panicum virgatum* L (Poaceae). *Environ Pollut* 61, 107-125
- Menge JA (1977) Utilization of mycorrhizal fungi in *Citrus* nurseries. *Proc Int Soc Citricult* 1, 129-132
- Paulitz TC, Linderman RG (1991) Mycorrhizal interactions with soil organisms. In: *Handbook of Applied Mycology* (Arora DK, Rai B, Mukerji KG, Knudsen GR, eds) Marcel Dekker, New York, 77-129
- 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, 158-160
- Ravolanirina F, Blal B, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1989) Mise au point d'une méthode rapide d'endomycorhization de vitroplants. *Fruits* 44,
- Sieverding E (1991) *Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems*. GTZ, Rossdorf, Germany
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, eds) INRA Press, Paris, 217-221
- Wood T (1987) Commercial production of VA mycorrhiza inoculum axenic versus non axenic conditions. In: *Mycorrhizae in the Next Decade: Practical Applications and Research Priorities* (Sylvia DM, Hung LL, Graham JH, eds) INVAM, Florida Univ, Gainesville, FL, 274

ANNEXE ANALYSES MINÉRALES

Annexe 9

Ensemble des analyses minérales foliaires composé de 20 tableaux

Tableau 1 : Analyse minérale foliaire d'ananas de la variété Cayenne lisse (clone CY0) âgée de 4 mois, cultivée dans le sol de Marins (pH 5,0), endomycorhizée avec *Glomus* sp. (LPA21) ou non (Témoin) et ayant reçue la solution nutritive Hoagland avec (+P) ou sans (-P) phosphore.

A - Concentration (% ou ppm de matière sèche)

		Témoin (-P)	LPA21 (-P)	Témoin (+P)	LPA21 (+P)
%	N	1,93	2,43	2,01	2,13
	P	0,05	0,15	0,14	0,22
	K	5,39	5,39	5,44	5,10
	Ca	0,68	0,89	0,82	0,72
	Mg	0,34	0,33	0,34	0,35
ppm	Mn	249	166	199	191
	Fe	62	137	82	95
	Zn	13	18	18	19

B - Quantité (mg/plante)

		Témoin (-P)	LPA21 (-P)	Témoin (+P)	LPA21 (+P)
N		45,93	101,33	28,34	30,67
P		1,26	6,26	1,96	3,12
K		128,28	224,76	76,70	73,44
Ca		16,18	36,90	11,58	10,37
Mg		8,07	13,72	4,82	5,05
Mn		0,59	0,69	0,28	0,28
Fe		0,15	0,57	0,12	0,14
Zn		0,03	0,07	0,02	0,03

Tableau 2 : Analyse minérale foliaire d'ananas de la variété Cayenne lisse (clone CY0) âgée de 4 mois, cultivée dans le sol d'Époisses (pH 8,0), endomycorhizée avec *Glomus intraradices* (LPA8) ou non (Témoin) et ayant reçue la solution nutritive Hoagland avec (+P) ou sans (-P) phosphore.

A - Concentration (% ou ppm de matière sèche)

		Témoin (-P)	LPA8 (-P)	Témoin (+P)	LPA8 (+P)
%	N	2,06	2,23	2,04	2,05
	P	0,04	0,12	0,11	0,14
	K	4,89	5,46	5,59	5,39
	Ca	1,52	1,81	1,72	1,65
	Mg	0,25	0,26	0,25	0,25
ppm	Mn	51	51	59	52
	Fe	80	219	76	76
	Zn	11	12	10	9

B - Quantité (mg/plante)

		Témoin (-P)	LPA8 (-P)	Témoin (+P)	LPA8 (+P)
N		23,48	53,74	48,34	48,18
P		0,56	2,89	2,61	3,29
K		68,95	131,57	132,48	126,67
Ca		21,43	43,62	40,76	38,78
Mg		3,52	6,27	5,93	5,78
Mn		0,07	0,12	0,14	0,12
Fe		0,11	0,53	0,18	0,18
Zn		0,02	0,03	0,02	0,02

Tableau 3 : Analyse minérale foliaire d'ananas de la variété Cayenne lisse (clone CY5) âgée de 4 mois, cultivée dans le sol de Marlins (pH 5,0), endomycorhizée avec *Glomus* sp. (LPA21) ou non (Témoin) et ayant reçue la solution nutritive Hoagland avec (+P) ou sans (-P) phosphore.

A - Concentration (% ou ppm de matière sèche)

		Témoin (-P)	LPA21 (-P)	Témoin (+P)	LPA21 (+P)
%	N	2,03	2,27	2,06	2,44
	P	0,06	0,17	0,15	0,20
	K	5,69	5,14	5,53	5,82
	Ca	0,79	0,71	0,76	0,82
	Mg	0,37	0,37	0,33	0,34
ppm	Mn	296	171	202	173
	Fe	84	88	101	57
	Zn	18	18	22	18

B - Quantité (mg/plante)

		Témoin (-P)	LPA21 (-P)	Témoin (+P)	LPA21 (+P)
N		24,16	64,70	30,69	51,73
P		0,70	4,93	2,21	4,16
K		67,71	146,49	82,40	123,38
Ca		9,39	20,30	11,35	17,57
Mg		4,38	10,52	4,98	7,17
Mn		0,35	0,49	0,30	0,37
Fe		0,10	0,25	0,15	0,12
Zn		0,02	0,05	0,03	0,04

Tableau 4 : Analyse minérale foliaire d'ananas de la variété Cayenne lisse (clone CY5) âgée de 4 mois, cultivée dans le sol d'Epoisses (pH 8,0), endomycorhizée avec *Glomus intraradices* (LPA8) ou non (Témoin) et ayant reçue la solution nutritive Hoagland avec (+P) ou sans (-P) phosphore.

A - Concentration (% ou ppm de matière sèche)

		Témoin (-P)	LPA8 (-P)	Témoin (+P)	LPA8 (+P)
%	N	2,01	1,71	1,82	1,83
	P	0,04	0,10	0,12	0,14
	K	4,48	5,02	5,18	5,13
	Ca	1,64	1,52	1,70	1,62
	Mg	0,23	0,25	0,26	0,25
ppm	Mn	44	57	134	71
	Fe	291	90	281	60
	Zn	17	15	15	10

B - Quantité (mg/plante)

		Témoin (-P)	LPA8 (-P)	Témoin (+P)	LPA8 (+P)
N		19,30	32,66	43,13	43,01
P		0,38	1,99	2,94	3,24
K		43,01	95,88	122,77	120,56
Ca		15,73	29,01	40,17	38,07
Mg		2,19	4,70	6,21	5,80
Mn		0,04	0,11	0,32	0,17
Fe		0,28	0,17	0,67	0,14
Zn		0,02	0,03	0,04	0,03

Tableau 5 : Concentration (% de matière sèche) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas âgé de 4 mois et endomycorhizé (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellaspera pellucida* (LPA20), *Glomus* sp. (LPA21), *Glomus* sp. (LPA22) et *Glomus* sp. (LPA25)) ou non (Témoin) dans le sol de Marins (pH 5,0).

A - variété Queen Tahiti

	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	2,24	0,15	5,13	0,65	0,28
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	2,25	0,16	4,96	0,71	0,27
<i>Scutellaspera pellucida</i> (LPA20)	2,53	0,14	6,01	0,58	0,24
<i>Glomus</i> sp. (LPA21)	1,61	0,18	2,94	0,82	0,35
<i>Glomus</i> sp. (LPA22)	2,34	0,15	5,88	0,61	0,22
<i>Glomus</i> sp. (LPA25)	2,36	0,20	5,75	0,62	0,29

B - variété Cayenne lisse

	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	2,42	0,18	5,75	0,72	0,29
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	2,49	0,16	6,19	0,85	0,25
<i>Scutellaspera pellucida</i> (LPA20)	2,73	0,14	6,39	0,84	0,25
<i>Glomus</i> sp. (LPA21)	2,30	0,17	5,15	0,82	0,29
<i>Glomus</i> sp. (LPA22)	2,68	0,15	6,08	0,72	0,24
<i>Glomus</i> sp. (LPA25)	2,25	0,12	5,42	0,81	0,28

C - variété Spanish

	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	1,89	0,13	4,13	0,75	0,26
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	1,51	0,13	3,24	0,93	0,27
<i>Scutellaspera pellucida</i> (LPA20)	1,67	0,11	3,73	0,80	0,25
<i>Glomus</i> sp. (LPA21)	1,96	0,16	4,01	0,83	0,27
<i>Glomus</i> sp. (LPA22)	1,82	0,13	3,91	0,81	0,27
<i>Glomus</i> sp. (LPA25)	1,74	0,14	3,62	0,93	0,28

Tableau 6 : Contenu (mg/plante) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas âgé de 4 mois et endomycorhizé (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellaspera pellucida* (LPA20), *Glomus* sp. (LPA21), *Glomus* sp. (LPA22) et *Glomus* sp. (LPA25)) ou non (Témoin) dans le sol de Marins (pH 5,0).

A - variété Queen Tahiti

	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	50,85	3,14	116,5	14,76	6,36
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	95,85	6,82	211,3	30,25	11,50
<i>Scutellaspera pellucida</i> (LPA20)	91,33	5,05	217,0	20,94	8,66
<i>Glomus</i> sp. (LPA21)	73,58	8,23	134,4	34,47	16,00
<i>Glomus</i> sp. (LPA22)	97,11	6,23	244,0	25,32	9,13
<i>Glomus</i> sp. (LPA25)	67,26	5,70	163,9	17,67	8,27

B - variété Cayenne lisse

	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	71,39	5,31	169,6	21,24	8,56
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	105,08	6,75	261,2	35,87	10,55
<i>Scutellaspera pellucida</i> (LPA20)	91,73	4,71	214,7	28,22	8,40
<i>Glomus</i> sp. (LPA21)	97,98	7,24	219,4	34,92	12,35
<i>Glomus</i> sp. (LPA22)	98,62	5,52	223,7	26,50	8,83
<i>Glomus</i> sp. (LPA25)	89,55	4,78	215,7	32,24	11,14

B - variété Spanish

	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	38,75	2,67	84,7	15,38	5,33
<i>Glomus clarum</i> (LPA16)	54,96	4,73	117,9	33,85	9,83
<i>Scutellaspera pellucida</i> (LPA20)	63,63	4,19	142,1	30,48	9,53
<i>Glomus</i> sp. (LPA21)	72,72	5,94	148,8	30,79	10,02
<i>Glomus</i> sp. (LPA22)	50,05	3,58	107,5	22,28	7,43
<i>Glomus</i> sp. (LPA25)	74,30	5,98	154,6	39,71	11,96

Tableau 7 : Analyse minérale foliaire d'ananas de la variété Queen Tahiti âgé de 4 mois, endomycorhizé (M) ou (NM) et recevant la solution nutritive Hoagland avec (+P) ou sans (-P) phosphore dans trois sols acides (Marlins, Dabou et Soubré).

A - Concentrations (% de matière sèche)

			N	P	K	Ca	Mg
Marlins	-P	NM	2,19	0,10	4,28	1,00	0,26
		M	1,66	0,19	3,55	1,01	0,33
	+P	NM	2,00	0,12	4,59	0,86	0,26
		M	1,90	0,24	4,13	0,95	0,31
Dabou	-P	NM	1,65	0,07	3,09	1,01	0,19
		M	1,73	0,12	4,27	1,05	0,24
	+P	NM	1,71	0,10	3,87	1,08	0,25
		M	1,70	0,21	4,57	1,10	0,25
Soubré	-P	NM	1,73	0,05	3,46	1,57	0,21
		M	1,55	0,16	3,62	1,68	0,29
	+P	NM	1,66	0,08	3,38	1,57	0,25
		M	1,57	0,23	3,57	1,65	0,28

B - Quantités (mg/plante)

			N	P	K	Ca	Mg
Marlins	-P	NM	28,69	1,31	56,07	13,10	3,40
		M	75,20	8,61	160,82	45,75	14,95
	+P	NM	35,00	2,10	80,33	15,05	4,55
		M	65,74	8,30	142,90	32,87	10,73
Dabou	-P	NM	8,09	0,34	15,14	5,44	0,93
		M	53,11	3,68	131,09	32,24	7,37
	+P	NM	11,29	0,66	25,54	7,13	1,65
		M	40,63	5,02	109,22	26,29	5,98
Soubré	-P	NM	18,51	0,54	37,02	16,80	2,25
		M	40,15	4,14	93,76	43,51	7,51
	+P	NM	14,44	0,70	29,41	13,66	2,18
		M	46,47	6,81	105,67	48,84	8,29

Tableau 8 : Contenu (mg/plante) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas âgé de 4 mois, cultivé dans le sol de Marlin (pH 5,0), endomycorhizé à la sortie de la vitroculture (M) ou non (NM) et inoculé avec *Pratylenchus brachyurus* : pas d'inoculation (Témoin), inoculation à la sortie de la vitroculture (Nematode) ou au moment du repiquage (Nematode+1).

A - variété Queen Tahiti

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	31,42	1,23	70,84	12,47	4,47
	M	62,90	6,66	132,83	35,52	13,69
Nematode	NM	15,02	0,73	33,12	7,46	2,55
	M	59,09	4,74	119,13	31,6	11,69
Nematode+1	NM	27,63	0,76	60,55	13,14	4,23
	M	63,37	6,44	124,94	37,23	13,25

B - variété Cayenne lisse

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	50,34	3,22	110,61	26,04	8,68
	M	99,90	6,53	204,31	58,73	17,07
Nematode	NM	26,83	0,97	62,83	15,01	4,87
	M	82,90	6,41	162,13	49,92	14,66
Nematode+1	NM	43,68	1,88	102,41	23,20	6,27
	M	81,66	6,50	167,97	56,61	15,78

C - variété Spanish

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	42,30	2,93	92,93	16,86	5,85
	M	63,73	4,69	129,03	32,06	10,95
Nematode	NM	10,43	0,30	27,16	4,44	1,41
	M	56,78	4,76	104,04	32,30	10,20
Nematode+1	NM	35,85	1,77	79,98	17,53	5,12
	M	66,26	5,66	121,60	36,36	12,12

Tableau 9 : Contenu (mg/plante) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas âgé de 4 mois, cultivé dans le sol de Marlins (pH 5,0), endomycorhizé au moment du repiquage (1+M) ou non (NM) et inoculé avec *Pratylenchus brachyurus* : pas d'inoculation (Témoin), inoculation à la sortie de la *vitro*culture (Nematode) ou au moment du repiquage (Nematode+1).

A - variété Queen Tahiti

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	43,34	2,52	96,52	20,92	8,32
	1+M	56,14	5,42	119,31	25,20	10,53
Nematode	NM	20,68	0,57	51,98	7,51	2,71
	1+M	58,50	3,90	117,30	26,40	10,20
Nematode+1	NM	28,42	1,02	67,20	9,47	3,46
	1+M	63,89	4,24	120,73	32,12	11,30

B - variété Cayenne lisse

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	50,34	3,22	110,61	26,04	8,68
	1+M	69,38	4,91	136,92	36,23	10,13
Nematode	NM	26,83	0,97	62,83	15,01	4,87
	1+M	62,05	5,84	123,37	37,60	12,05
Nematode+1	NM	43,68	1,88	102,41	23,20	6,27
	1+M	71,23	6,16	141,68	43,51	13,48

C - variété Spanish

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	42,30	2,93	92,93	16,86	5,85
	1+M	63,63	5,17	129,52	26,81	8,72
Nematode	NM	10,43	0,30	27,16	4,44	1,41
	1+M	59,16	4,42	108,12	28,22	8,84
Nematode+1	NM	35,85	1,77	79,98	17,53	5,12
	1+M	56,43	3,99	113,43	25,94	7,70

Tableau 10 : Contenu (mg/plante) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas de la variété Queen Tahiti âgé de 4 mois, endomycorhizé (M) ou non (NM) et inoculé au moment du repiquage avec *Phytophthora cinnamomi* à différentes dilutions (1:10000, 1:1000, 1:100, 1:10) dans le sol de Marins (pH 5,0).

Dilutions du pathogène :		N	P	K	Ca	Mg
Non inoculé	NM	44,38	2,58	98,81	21,41	8,51
	M	73,00	4,79	154,41	36,31	14,36
1 : 10000	NM	31,67	1,22	76,56	11,14	4,70
	M	67,51	5,05	145,48	30,32	13,00
1 : 1000	NM	25,74	2,17	63,92	9,72	3,86
	M	62,70	3,63	132,99	25,08	10,23
1 : 100	NM	42,14	1,38	79,46	12,73	4,82
	M	66,34	3,86	143,91	29,13	11,93
1 : 10	NM	35,15	1,67	81,40	15,17	5,92
	M	53,95	3,40	107,41	21,87	8,75

Tableau 11 : Contenu (mg/plante) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas de la variété Cayenne lisse âgé de 4 mois, endomycorhizé (M) ou non (NM) et inoculé au moment du repiquage avec *Phytophthora cinnamomi* à différentes dilutions (1:10000, 1:1000, 1:100, 1:10) dans le sol de Marins (pH 5,0).

Dilutions du pathogène :		N	P	K	Ca	Mg
Non inoculé	NM	58,46	3,74	128,45	30,24	10,08
	M	99,90	6,53	204,31	58,73	17,07
1 : 10000	NM	51,05	2,54	108,11	25,64	7,39
	M	81,59	6,97	156,21	48,79	14,35
1 : 1000	NM	49,57	2,67	94,77	27,22	8,26
	M	88,07	6,54	180,50	53,63	15,26
1 : 100	NM	33,74	1,56	72,66	18,17	5,71
	M	67,23	5,83	135,14	43,19	13,03
1 : 10	NM	25,67	0,99	58,40	13,27	4,09
	M	73,83	6,31	136,53	43,78	13,73

Tableau 12 : Contenu (mg/plante) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas de la variété Queen Tahiti âgé de 4 mois, endomycorhizé (M) ou non (NM) et inoculé un mois après le repiquage avec *Phytophthora cinnamomi* à différentes dilutions (1:100, 1:10) dans le sol de Marllins (pH 5,0).

Dilutions du pathogène :		N	P	K	Ca	Mg
Non inoculé	NM	46,19	1,88	107,01	16,72	5,64
	M	82,13	6,96	164,26	47,79	16,70
1 : 100	NM	41,17	1,67	105,34	15,26	5,85
	M	66,50	5,71	145,66	39,17	15,50
1 : 10	NM	37,05	1,75	81,25	13,36	5,09
	M	68,95	5,91	155,63	39,01	14,58

Tableau 13 : Contenu (mg/plante) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas de la variété Cayenne lisse âgé de 4 mois, endomycorhizé (M) ou non (NM) et inoculé un mois après le repiquage avec *Phytophthora cinnamomi* à différentes dilutions (1:100, 1:10) dans le sol de Marllins (pH 5,0).

Dilutions du pathogène :		N	P	K	Ca	Mg
Non inoculé	NM	58,46	3,74	128,45	30,24	10,08
	M	99,90	6,53	204,31	58,73	17,07
1 : 100	NM	44,04	2,42	98,37	20,60	6,67
	M	100,79	6,66	190,03	55,06	15,54
1 : 10	NM	49,28	1,80	104,85	26,55	7,43
	M	77,79	6,82	155,99	48,52	14,44

Tableau 14 : Analyse minérale foliaire d'ananas de la variété Queen Tahiti âgé de 4 mois, endomycorhizé (M) ou non (NM) et traité ou non (Témoin) avec deux nématocides : Phénomiphos (doses faible et moyenne) et Ethoprophos (doses faible et moyenne) dans le sol de Marins (pH 5,0).

A - Concentrations (% de matière sèche)

<i>Traitements</i>		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	1,61	0,09	4,05	0,65	0,25
	M	1,48	0,18	2,99	0,95	0,33
Phénomiphos dose faible	NM	1,74	0,08	4,01	0,67	0,25
	M	2,20	0,23	4,53	0,98	0,34
Phénomiphos dose moyenne	NM	1,85	0,11	4,52	0,71	0,25
	M	2,39	0,22	4,81	0,87	0,34
Ethoprophos dose faible	NM	1,93	0,07	5,15	0,74	0,26
	M	2,30	0,21	4,77	0,92	0,32
Ethoprophos dose moyenne	NM	1,88	0,12	4,41	0,79	0,29
	M	1,90	0,20	3,98	0,87	0,33

B - Quantités (mg/plante)

<i>Traitements</i>		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	35,26	1,97	88,70	14,24	5,48
	M	63,05	7,67	127,37	40,47	14,06
Phénomiphos dose faible	NM	30,80	1,42	70,98	11,86	4,43
	M	83,82	8,76	172,59	37,34	12,95
Phénomiphos dose moyenne	NM	37,56	2,23	91,76	14,41	5,08
	M	69,79	6,42	140,45	25,04	9,93
Ethoprophos dose faible	NM	22,39	0,81	59,74	8,58	3,02
	M	72,91	6,66	151,21	29,16	10,14
Ethoprophos dose moyenne	NM	18,24	1,16	42,78	7,66	2,81
	M	55,48	5,84	116,22	25,40	9,64

Tableau 15 : Analyse minérale foliaire d'ananas de la variété Cayenne lisse âgé de 4 mois, endomycorhizé (M) ou non (NM) et traité ou non (Témoin) avec deux nématicides : Phénomiphos (doses faible et moyenne) et Ethoprophos (doses faible et moyenne) dans le sol de Marlins (pH 5,0).

A - Concentration (% de matière sèche)

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	1,60	0,08	3,37	0,98	0,31
	M	1,69	0,15	3,29	1,08	0,32
Phénomiphos dose faible	NM	2,00	0,07	5,19	0,82	0,30
	M	2,19	0,23	4,32	1,11	0,38
Phénomiphos dose moyenne	NM	1,85	0,13	4,00	1,08	0,33
	M	2,01	0,21	4,53	0,99	0,34
Ethoprophos dose faible	NM	1,80	0,09	4,08	0,95	0,31
	M	2,24	0,22	4,37	1,05	0,35
Ethoprophos dose moyenne	NM	2,05	0,13	4,56	1,11	0,33
	M	2,15	0,19	4,45	1,00	0,32

B - Quantités (mg/plante)

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	38,08	1,90	80,21	23,32	7,38
	M	67,94	6,03	132,26	43,42	12,86
Phénomiphos dose faible	NM	27,60	0,97	71,62	11,32	4,14
	M	83,88	8,81	165,46	42,51	14,55
Phénomiphos dose moyenne	NM	42,18	2,96	91,20	24,62	7,52
	M	73,57	7,69	165,80	36,23	12,44
Ethoprophos dose faible	NM	30,42	1,52	68,95	16,16	5,24
	M	85,79	8,43	167,37	40,22	13,41
Ethoprophos dose moyenne	NM	51,66	3,28	114,92	27,97	8,32
	M	73,96	6,54	153,08	34,40	11,01

Tableau 16 : Analyse minérale foliaire d'ananas de la variété Spanish âgé de 4 mois, endomycorhizé (M) ou non (NM) et traité ou non (Témoin) avec deux nématicides : Phénamiphos (doses faible et moyenne) et Ethoprophos (doses faible et moyenne) dans le sol de Marlins (pH 5,0).

A - Concentration (% de matière sèche)

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	1,55	0,09	3,72	0,78	0,25
	M	1,60	0,13	3,35	0,85	0,25
Phénamiphos	dose NM	1,61	0,07	3,87	0,72	0,23
	faible M	1,74	0,14	3,79	0,86	0,27
Phénamiphos	dose NM	1,80	0,07	4,35	0,73	0,22
	moyenne M	1,51	0,16	3,33	0,91	0,28
Ethoprophos	dose NM	1,58	0,08	3,64	0,78	0,23
	faible M	1,69	0,14	3,58	0,94	0,27
Ethoprophos	dose NM	1,72	0,06	4,09	0,71	0,22
	moyenne M	1,61	0,14	3,56	0,88	0,26

B - Quantités (mg/plante)

Traitements		N	P	K	Ca	Mg
Témoin	NM	36,27	2,11	87,05	18,25	5,85
	M	65,76	5,34	135,69	34,94	10,28
Phénamiphos	dose NM	29,46	1,28	70,82	13,18	4,21
	faible M	48,55	3,91	105,74	23,99	7,53
Phénamiphos	dose NM	28,26	1,10	68,30	11,46	3,45
	moyenne M	67,50	7,15	148,85	40,68	12,52
Ethoprophos	dose NM	23,70	1,20	54,60	11,70	3,45
	faible M	60,67	5,03	128,52	33,75	9,69
Ethoprophos	dose NM	20,98	0,73	49,90	8,66	2,68
	moyenne M	51,68	4,49	114,28	28,25	8,35

Tableau 17 : Concentration (% de matière sèche) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas âgé de 4 mois, cultivé dans le sol d'Epoisses (pH 8,0) et endomycorhizé avec *Glomus intraradices* (LPA8), avec des inocula commerciaux (AGC à la dose de 1% ou de 3%, Phytotec à la dose de 1% ou 3%) ou non (Témoin).

A - variété Queen Tahiti

Traitements :	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	2,08	0,06	2,93	2,08	0,24
LPA8	2,43	0,13	4,60	1,64	0,31
AGC 1%	1,95	0,14	3,64	2,51	0,23
AGC 3%	1,88	0,12	3,59	1,93	0,27
Phytotec 1%	2,00	0,06	3,30	2,20	0,21
Phytotec 3%	1,88	0,05	3,90	2,20	0,27

B - variété Cayenne lisse

Traitements :	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	1,89	0,06	3,22	2,34	0,28
LPA8	2,51	0,12	4,33	2,11	0,34
AGC 1%	2,31	0,14	4,48	2,84	0,26
AGC 3%	2,37	0,13	4,43	2,88	0,27
Phytotec 1%	2,21	0,06	3,79	2,98	0,26
Phytotec 3%	2,13	0,09	4,01	2,65	0,27

C - variété Spanish

Traitements :	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	1,95	0,06	3,26	2,83	0,25
LPA8	2,10	0,15	3,70	2,68	0,28
AGC 1%	2,00	0,13	3,77	2,02	0,26
AGC 3%	2,02	0,14	3,92	2,27	0,24
Phytotec 1%	1,77	0,06	3,29	2,07	0,22
Phytotec 3%	1,65	0,06	3,55	1,70	0,20

Tableau 18 : Contenu (mg/plante) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas âgé de 4 mois, cultivé dans le sol d'Epoisses (pH 8,0) et endomycorhizé avec *Glomus intraradices* (LPA8), avec des inocula commerciaux (AGC à la dose de 1% ou de 3%, Phytotec à la dose de 1% ou 3%) ou non (Témoin).

A - variété Queen Tahiti

Traitements :	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	10,61	0,31	14,94	10,61	1,22
LPA8	17,50	0,94	33,12	11,81	2,23
AGC 1%	22,82	1,64	42,59	29,37	2,69
AGC 3%	20,68	1,32	39,49	21,34	2,97
Phytotec 1%	19,40	0,58	32,01	21,34	2,04
Phytotec 3%	21,06	0,56	43,68	24,64	3,02

B - variété Cayenne lisse

Traitements :	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	8,13	0,26	13,85	10,06	1,20
LPA8	24,35	1,15	41,57	20,47	3,26
AGC 1%	30,26	1,83	58,69	37,20	3,41
AGC 3%	38,87	2,13	72,65	47,23	4,43
Phytotec 1%	19,00	0,52	31,84	25,03	2,18
Phytotec 3%	24,28	1,03	45,71	30,21	3,08

C - variété Spanish

Traitements :	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	15,21	0,47	25,43	22,07	1,95
LPA8	26,04	1,86	45,88	33,23	3,47
AGC 1%	35,40	2,30	66,73	35,75	4,60
AGC 3%	32,32	2,24	62,72	36,32	3,84
Phytotec 1%	26,02	0,88	48,36	30,43	3,23
Phytotec 3%	21,95	0,80	47,22	22,61	2,66

Tableau 19 : Concentration (% de matière sèche) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas âgé de 4 mois, cultivé dans le sol de Marlin (pH 5,0) et endomycorhizé avec *Glomus* sp. (LPA21), avec des inocula commerciaux (AGC à la dose de 1% ou de 3%, Phytotec à la dose de 1% ou 3%) ou non (Témoin).

A - variété Queen Tahiti

<i>Traitements :</i>	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	2,46	0,14	4,80	1,38	0,28
LPA21	2,21	0,14	4,03	1,37	0,39
AGC 1%	2,31	0,07	4,65	1,16	0,34
AGC 3%	2,36	0,09	4,73	1,18	0,35
Phytotec 1%	2,36	0,06	4,38	1,11	0,33
Phytotec 3%	2,24	0,07	4,16	1,36	0,39

B - variété Cayenne lisse

<i>Traitements :</i>	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	2,67	0,10	5,20	1,43	0,37
LPA21	2,21	0,16	4,06	1,27	0,37
AGC 1%	2,42	0,09	4,88	1,39	0,36
AGC 3%	2,32	0,10	4,36	1,68	0,44
Phytotec 1%	2,49	0,08	4,85	1,37	0,35
Phytotec 3%	2,57	0,08	5,13	1,47	0,36

C - variété Spanish

<i>Traitements :</i>	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	2,06	0,08	4,00	1,59	0,40
LPA21	2,12	0,17	3,82	1,14	0,30
AGC 1%	2,06	0,07	4,29	1,11	0,28
AGC 3%	2,31	0,10	4,78	1,27	0,28
Phytotec 1%	2,25	0,07	4,29	1,33	0,33
Phytotec 3%	2,18	0,09	4,61	1,25	0,29

Tableau 20 : Contenu (mg/plante) en éléments minéraux de la partie aérienne d'ananas âgé de 4 mois, cultivé dans le sol de Marlin (pH 5,0) et endomycorhizé avec *Glomus* sp. (LPA21), avec des inocula commerciaux (AGC à la dose de 1% ou de 3%, Phytotec à la dose de 1% ou 3%) ou non (Témoin).

A - variété Queen Tahiti

Traitements :	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	25,84	1,46	49,92	14,35	2,91
LPA21	74,70	4,73	136,21	46,31	13,18
AGC 1%	46,43	1,41	93,47	23,32	6,83
AGC 3%	47,44	1,81	95,07	23,72	7,04
Phytotec 1%	52,63	1,34	97,67	24,75	7,36
Phytotec 3%	35,17	1,10	65,31	21,35	6,12

B - variété Cayenne lisse

Traitements :	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	27,77	1,04	54,08	14,87	3,85
LPA21	72,71	5,26	133,57	41,78	12,17
AGC 1%	42,59	1,58	85,89	24,46	6,34
AGC 3%	24,36	1,05	45,78	17,64	4,62
Phytotec 1%	66,48	2,14	129,50	36,58	9,35
Phytotec 3%	49,09	1,53	97,98	28,08	6,88

C - variété Spanish

Traitements :	N	P	K	Ca	Mg
Témoin	14,83	0,58	28,80	11,45	2,88
LPA21	57,03	4,57	102,76	30,67	8,07
AGC 1%	37,29	1,27	77,65	20,09	5,07
AGC 3%	44,35	1,92	91,78	24,38	5,38
Phytotec 1%	49,05	1,53	93,52	28,99	7,19
Phytotec 3%	71,72	2,96	151,67	41,13	9,54

ANNEXES

Annexe 10

Culture et entretien des champignons endomycorhizogènes à arbuscules

Annexe 11

Analyses de sols (Marlins, Dabou, Soubré et Epoisses)

Culture et entretien des champignons endomycorhizogènes à arbuscules

Etant donné que les champignons endomycorhizogènes à arbuscules ne peuvent pas être multipliés en culture pure, il est nécessaire de les maintenir en culture en présence d'une plante-hôte.

Nous avons choisi comme plante-hôte des Légumineuses ; *Tephrosia ehlenbergiana* pour les champignons isolés dans des zones tropicales (*Glomus clarum* (LPA16), *Scutellaspora pellucida* (LPA20), *Glomus* sp. (LPA21), Complexe Soubré (LPA22) et *Glomus* sp. (LPA25)) et *Trifolium* sp. pour celui isolé sous climat tempéré (*Glomus intraradices* (LPA8)). Cette plante peut être également appelée plante-support.

Ces plantes sont utilisées car elles présentent les avantages suivants :

- grande dépendance vis à vis des endomycorhizes.
- système racinaire permettant un bon développement de l'infection endomycorhizienne.
- système racinaire dense bien adapté à la production massive d'inoculum sous forme d'endomycorhizes.

Une fois isolé, un champignon symbiotique est placé en présence d'une plante-hôte adaptée. C'est à partir de différents isolements qu'a été constituée la collection de champignon avec laquelle nous avons travaillé. **Cette collection doit être régulièrement entretenue afin de disposer en permanence d'inoculum fongique de bonne qualité (endomycorhizes utilisées dans les expériences).**

L'entretien de la collection est réalisé tous les six mois. Ce sont les racines endomycorhizées de la précédente collection qui sont utilisées, après vérification, pour infecter la plante-support. Ces plantes sont repiquées dans un sol désinfecté (aux rayons gamma) et adapté aux exigences chimiques de chaque champignon. Elles reçoivent chacune un millilitre de suspension liquide de *Bradyrhizobium* sp. préalablement isolé à partir de nodosités prélevées sur les racines de la même espèce.

Les plantes-hôtes inoculées de la collection sont placées ensuite dans des chambres climatisées réglées en fonction des différentes exigences climatiques de chaque champignon endomycorhizogène à arbuscule.

Caractéristiques physico-chimiques des sols Marlins, Dabou, Soubré et Epoisses.

SOLS	Marlins	Dabou	Soubré	Epoisses
Argile (%)	17,9	9,2	15,3	43,0
Limon (%)	28,0	4,1	8,4	51,0
Sable (%)	54,1	86,7	76,3	6,0
Matière organique (%)	5,28	1,07	1,33	2,50
C (%)	3,07	0,62	0,77	1,44
N (%)	0,28	0,06	0,06	0,16
C/N	11,12	10,00	12,00	8,6
Ca échangeable (meq/100g)	2,20	0,66	0,75	30,20
Mg échangeable (meq/100g)	0,42	0,28	0,27	0,90
K échangeable (meq/100g)	0,98	0,08	0,05	0,80
Na échangeable (meq/100g)	0,03	0,28	0,18	0,05
CEC (meq/100g)	12,8	1,41	1,29	22,4
P Olsen (ppm)	35,0	8,3	3,9	20,5
pH (H ₂ O)	5,0	5,1	5,2	8,0

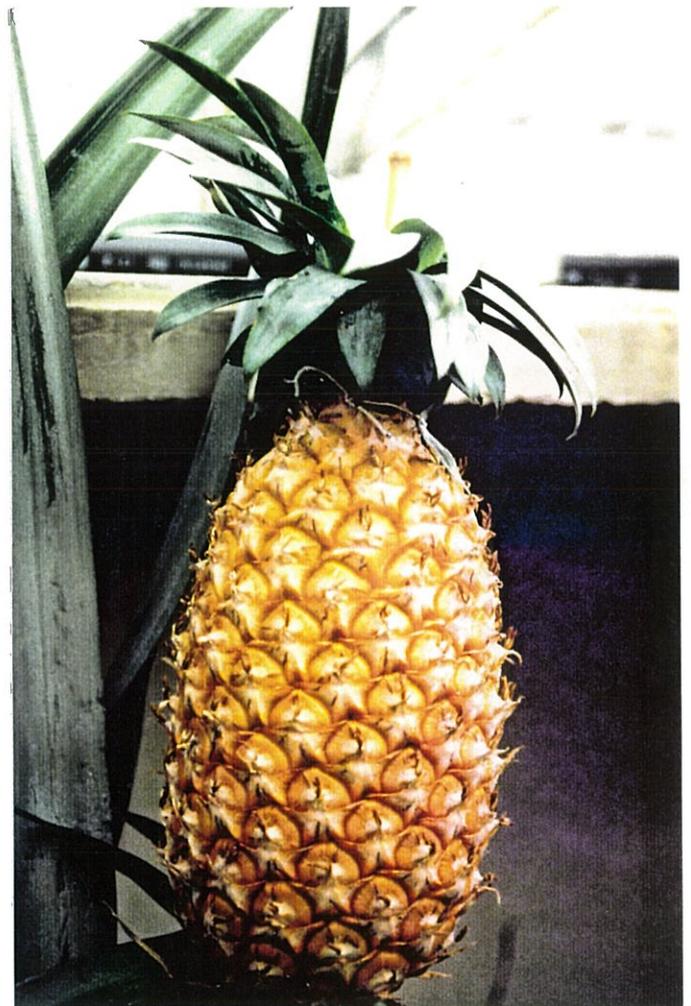
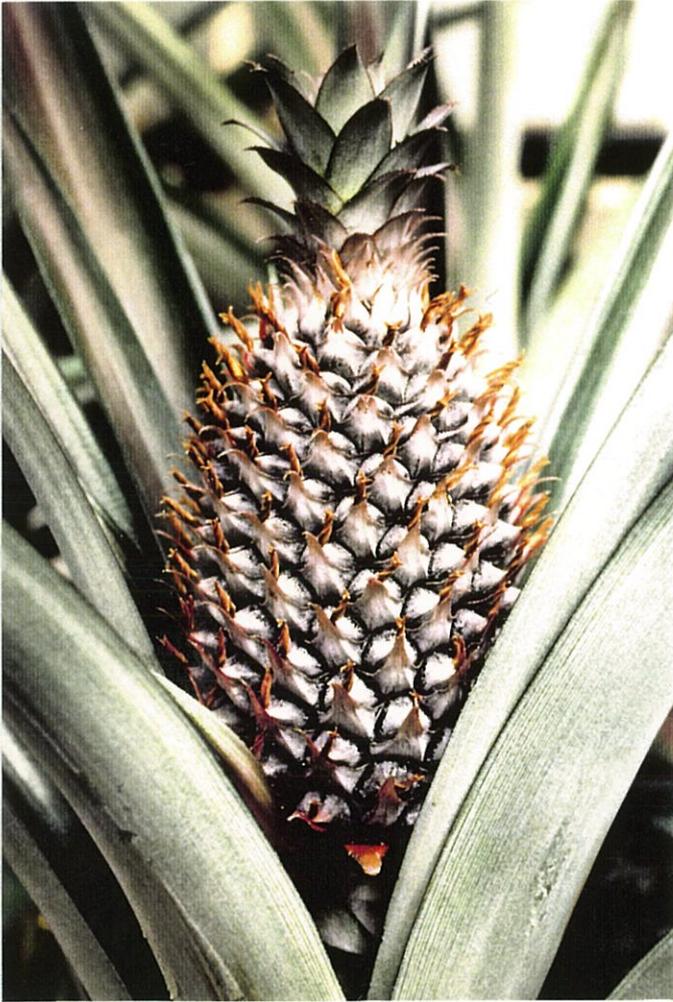
Les analyses des sols Marlins et Epoisses ont été réalisées par le laboratoire d'analyse des sols de l'INRA à Arras.

Les analyses des sols Dabou et Soubré ont été réalisées par le laboratoire d'analyse des sols du CIRAD à Montpellier

Et c'est ainsi que se termine la culture de l'ananas à Dijon,



Variété Queen Tahiti



Variété Cayenne lisse

Résumé

Contribution des endomycorhizes à la production de plants micropropagés d'ananas (*Ananas comosus* (L.) Merr)

La micropropagation est une biotechnologie qui permet de produire des plants indemnes de maladie mais élimine la symbiose endomycorhizienne. Nos expériences ont été réalisées, en salle climatisée sous conditions tropicales, avec trois variétés d'ananas micropropagés (Queen T: hiti, Cayenne lisse et Spanish) et cinq champignons endomycorhizogènes. L'endomycorhization des ananas dès la sortie de la *vitro*culture améliore leur nutrition minérale (biofertilisant), leur croissance et leur contenu en pigments photosynthétiques ; le champignon *Glomus* sp. (LPA21) s'est avéré le plus efficace. Une corrélation négative a été observée entre l'effet endomycorhizien sur le développement de la partie aérienne et sur celui de la partie racinaire indiquant un effet biorégulateur des champignons sur la croissance de la plante ; ceci menant à l'obtention d'un système racinaire plus petit mais plus efficace. L'effet endomycorhizien sur la croissance est réduit quand les ananas sont cultivés en présence d'un niveau trop élevé de P tellurique. Dans ce cas, on observe des baisses des taux d'infection estimés après coloration des activités succinate déshydrogénase et phosphatase alcaline fongique, représentant respectivement les parties vitales et fonctionnelles du champignon. Ces estimations donnent une image plus réaliste, que les colorations non vitales, de l'efficacité de la symbiose. Les endomycorhizes augmentent la tolérance des ananas à des sols à forte salinité (NaCl) et vis à vis de pathogènes du sol (un nématode: *Pratylenchus brachyurus*, et un champignon : *Phytophthora cinnamomi*) ; vraisemblablement par une hausse des teneurs en composés phénoliques racinaires. Les champignons endomycorhizogènes peuvent donc être considérés comme des agents de bioprotection. L'application de fongicides (foséthyl-Al, étridiazol, captane et manèbe) et de nématicides (phénamiphos et ethoprophos) est compatible sous certaines conditions avec le développement et l'activité de la symbiose ; les endomycorhizes peuvent donc être incluses dans un schéma de lutte intégrée. L'utilisation d'inoculi commerciaux confirme que cette biotechnologie peut ouvrir des perspectives intéressantes à la production de plants micropropagés.

Mots clés : *Ananas comosus*, champignons endomycorhizogènes, endomycorhizes à arbuscules, plants micropropagés, biofertilisant, biorégulateur, bioprotecteur, lutte intégrée.

Abstract

Contribution of endomycorrhiza in production of micropropagated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr)

Micropropagation is a biotechnology that produces plants without disease but also suppresses endomycorrhiza formation. Experiments were carried out with three varieties of pineapple (Queen Tahiti, Smooth Cayenne and Spanish) and with five endomycorrhizal fungi under a simulated tropical environment. Endomycorrhization of pineapple *vitro*plants at outplanting from *in vitro* conditions positively affected their mineral nutrition (biofertilizer), growth and contents of photosynthetic pigments; the fungus *Glomus* sp. (LPA21) was the most effective. A negative correlation were observed between shoot stimulation and root development indicating a **bioregulating** effect of fungi on plant growth; thus endomycorrhizal plants possess a more efficient underground organ. The endomycorrhizal effect on growth was reduced when plants grew in soil with a high level of P. In this case, growth reduction was linked with a decrease in fungal succinate dehydrogenase and alkaline phosphatase activities in roots, reflecting living and functional mycelium, respectively. These estimations could give a more meaningful evaluation of the efficiency of the symbiosis than those evaluated by non vital staining. NaCl stress damage was reduced in endomycorrhizal plants. The presence of endomycorrhizal fungi in pineapple roots also enhanced tolerance to two soil pathogens; a nematode (*Pratylenchus brachyurus*) and a fungus (*Phytophthora cinnamomi*); probably by increasing phenolic contents of roots. Endomycorrhizal fungi can therefore act as **bioprotection** agents. Application of several fungicides (fosetyl-Al, etridiazol, captan and maneb) or nematocides (fenamiphos and ethoprophos) was compatible, under certain conditions, with endomycorrhiza development and activity. Endomycorrhizas therefore need to be considered as a component of integrated pest management. Using commercial inoculants we have confirmed results showing that endomycorrhizal biotechnology can open interesting perspectives for *vitro*plant production.

Key words: *Ananas comosus*, arbuscular endomycorrhiza, endomycorrhizal fungi, micropropagated plants, biofertilizer, bioregulator, bioprotection, integrated control.