

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



Institut National Polytechnique

FÉLIX HOUPHOUËT-BOIGNY



Année Universitaire : 2016 - 2017

N° D'ORDRE : 003/2017

THESE

SCIENCES AGRONOMIQUES ET GENIE RURAL

Présentée pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE FELIX HOUPHOUËT-BOIGNY
DE CÔTE D'IVOIRE**

Spécialité: Microbiologie environnementale, Agriculture durable

Par :

SERY DROLET JEAN-MARC

Thème :

INGENIERIE ECOLOGIQUE ENDOMYCORHIZIENNE
POUR UNE CULTURE DURABLE DU MANIOC (MANIHOT
ESCULENTA CRANTZ, EUPHORBIACEAE)
EN COTE D'IVOIRE

Soutenue publiquement le 06 mars 2017 devant le jury composé de :

M. Koné Mongomake , Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua, UNA	Président
M. Zézé Adolphe , Professeur Titulaire, Ecole Doctorale Polytechnique, INP-HB	Directeur de Thèse
M. Koné Daouda , Professeur Titulaire, Université Félix Houphouët Boigny, UFHB	Rapporteur
M. Zoro Bi Irié Arsène , Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua, UNA	Rapporteur
Mme. Dogbo Dénezon Odette Professeur Titulaire, Université Nangui Abrogoua, UNA	Examinatrice

DEDICACE

A Feu Mon père Drolé Séry Jacques

A Feu Mon grand-frère Séri Aipo Laurent

A toute la famille Séry

AVANT-PROPOS

La rédaction de ce mémoire a été possible grâce à des travaux de recherche financés par le Programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest (PPAAO/WAAPP) dans le cadre du projet IVO-RHIZE (Projets 047/PPAAO/2012 et 028/CS/PPAAO/2015). Ce travail a été également possible grâce à l'appui financier et scientifique de l'Agence Universaire de la Francophonie (AUF) à travers le programme de mobilité offert dans le cadre du collège doctoral en Biotechnologies végétale et Agro-alimentaire.

L'objectif global du projet IVO-RHIZE a été de contribuer à l'amélioration de la productivité du bananier plantain, de l'igname et du manioc en Côte d'Ivoire à partir d'une technologie d'ingénierie écologique utilisant l'endomycorhization. Le projet IVO-RHIZE a été exécuté au sein du Laboratoire de Biotechnologies Végétale et Microbienne (LBVM) dirigé par le Professeur Adolphe Zézé et est basé à l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny de Yamoussoukro.

REMERCIEMENTS

Le présent travail est le fruit de la collaboration entre plusieurs institutions et personnes. Je voudrais ici exprimer à toutes et à tous ma reconnaissance pour leur contribution.

Je tiens tout d'abord à remercier les responsables des différentes institutions. Monsieur KOFFI N'guessan Directeur Général de l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny et Monsieur YAO Kouassi Benjamin Directeur de l'Ecole Doctorale Polytechnique.

Je remercie le Professeur ZEZE Adolphe, coordonnateur du projet IVO-RHIZE, Directeur du Laboratoire de Biotechnologies Végétale et Microbienne (LBVM) et Directeur de cette thèse, qui m'a initié à la recherche scientifique. Je voudrais lui exprimer toute ma reconnaissance en ayant accepté de m'intégrer au sein du LBVM pour cette thèse.

Je remercie le Professeur BROU Yao Casimir, Directeur de l'Unité Mixte de Recherche et d'Innovation en Sciences Agronomiques et Génie Rural de l'Ecole Doctorale Polytechnique pour sa disponibilité et ses conseils.

Je remercie le Professeur WILF Daniel, Directeur de l'Unité Mixte de Recherche en Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté (France) pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité Mixte de Recherche en Agroécologie.

Je remercie le Docteur Diederik VAN TUINEN Chargé de Recherche à l'Unité Mixte de Recherche en Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté qui a encadré mes travaux lors de mes différents séjours en France. Il a été très disponible et j'ai bénéficié de ses conseils. Je lui suis reconnaissant pour sa grande sollicitude qui m'a été très utile dans ce travail.

Je remercie tous les membres du Laboratoire d'agroécologie-INRA/dijon travaillant sur la symbiose mycorhizienne, particulièrement à Monsieur MOUNIER Arnaud pour sa disponibilité et son aide lors des analyses bioinformatiques.

Je remercie tous les membres du comité du collège doctoral en Biotechnologies végétale et Agroalimentaire de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) à savoir Monsieur BOULKROUNE Khalef, Madame MAOUCHE Rachida, le Professeur HAMON Serge, le Professeur SY Mame-Oureye, le Professeur DOUADI Khelifi sans oublier Madame BIRNA Catinca et Madame KANE Matel.

Je remercie le Professeur KONE Mongomaké pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie le Professeur KONE Daouda, rapporteur de cette thèse pour ses critiques et pour avoir accepté de participer au jury d'examen.

Je remercie le Professeur ZORO Bi Irié Arsène, rapporteur de cette thèse pour les conseils utiles à la finalisation de ce mémoire de thèse.

Je remercie le Professeur DOGBO Dénezon Odette pour avoir accepté de participer au jury d'examen de cette thèse.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance aux membres du Laboratoire de Biotechnologies Végétale et Microbienne (LBVM), notamment KOUADIO Niangoran Aka Marie-Stéphanie, AMOA Amoa Jésus, GBONGUE Louis Raymond, DOGA Dabé, GNANGUI Sara Laetitia Elphège, ANOMA Méssikéli et particulièrement Dr FOTSO Beaulys, Dr. NANDJUI Jacob sans oublier Dr. VOKO Bi Rosin Don Rodrigue.

Je remercie tous les membres du Laboratoire de Biotechnologies Végétale et Microbienne.

Enfin, je ne peux terminer ces propos sans remercier les membres de ma famille, ma mère GBESSI Goulé Odette, ma tante YAO Amoin Madéleine, mes frères et sœurs SERY Thérèse, SERI Blanche Hermine, SERI Yoboué Cindy, SERI Guié Franck pour leur amour et leur soutien.

Je remercie tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Que Dieu les bénisse.

RESUME

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz), culture alimentaire de base en Côte d'Ivoire est confrontée à une baisse de rendement. L'objectif de la présente thèse est de développer une ingénierie écologique en vue de sélectionner des souches performantes de champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) associés au manioc pour une culture durable.

La diversité des communautés de CMA associés à la rhizosphère du manioc en Côte d'Ivoire a été caractérisée à l'aide de l'outil moléculaire Illumina Miseq. Des souches identifiées ont été sélectionnées sur la base de critères spécifiques. Une série de test a été faite afin d'évaluer leur potentialité à améliorer les paramètres agronomiques, la tolérance du manioc aux stress abiotiques (stress hydrique) et biotiques (nématodes) en serre d'une part et sur le rendement en conditions de champ d'autre part.

Il ressort de cette étude que cinq genres (*Rhizophagus*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Funneliformis*, *Septoglomus*) et huit des vingt-cinq espèces de CMA identifiées sont dominants dans la culture du manioc. Les principales espèces sont *Rhizophagus* sp, *Rhizophagus irregulare*, *Glomus* sp, *Acaulospora colombiana*, *Funneliformis mosseae*, *Septoglomus* sp, *Rhizophagus intraradices* et *Acaulospora spinosa*. Cette diversité varie d'une zone à l'autre et est tributaire des caractéristiques du sol (pH, phosphore assimilable, matière organique). Sur la base de critères d'ubiquité et d'abondance, deux espèces *Acaulospora colombiana* (numéro d'accession KX168435) et *Ambispora appendicula* (numéro d'accession KX168436) ont été sélectionnées. En conditions contrôlées, il a été démontré que *A. colombiana* a significativement amélioré la croissance du manioc et augmenté la tolérance au stress hydrique. En revanche, *A. colombiana* et *A. appendicula* ont conféré des effets bioprotecteurs aux plants de manioc contre les nématodes du genre *Meloidogyne* spp. allant de la résistance à la tolérance. La capacité des deux souches à améliorer le rendement du manioc en conditions de production sur deux parcelles d'expérimentation en milieu paysan à Duokro et à l'INP-HB a été effective. *A. colombiana* utilisée seule comme inoculum a permis d'obtenir un gain en rendement de 16,6% sur le site tandis que la double inoculation *A. colombiana* + *A. appendicula* a amélioré le rendement en manioc sur les deux sites de 17,8 à 19,4%. Cette nouvelle stratégie d'ingénierie écologique de sélection de CMA natifs performants est robuste et peut être appliquée à d'autres cultures pour une agriculture durable

Mots clés: Diversité, CMA, ingénierie écologique, rendement, manioc, tolérance, *Meloidogyne* spp, stress hydrique

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), a basic food crop in Côte d'Ivoire, is facing a decline in yield. The objective of this thesis is to develop an ecological engineering to select efficient strains of mycorrhizal arbuscular fungi (AMF) associated with cassava for sustainable cultivation.

The diversity of AMF communities associated with the cassava rhizosphere in Côte d'Ivoire has been characterized using the molecular tool Illumina Miseq. Strains were selected on the basis of these specific criteria. A series of tests were carried out to evaluate their potential to improve agronomic parameters, cassava tolerance to abiotic stresses (water stress) and biotic (nematodes) in greenhouses on the one hand, and yields in field conditions on the other.

It emerged from this study that a significant AMF's diversity is associated with cassava. Five genera (*Rhizophagus*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Funneliformis* and *Septoglomus*) and eight of the 25 identified AMF species are dominant in cassava. The main species are *Rhizophagus* sp, *Rhizophagus irregulare*, *Glomus* sp, *Acaulospora colombiana*, *Funneliformis mosseae*, *Septoglomus* sp, *Rhizophagus intraradices* and *Acaulospora spinosa*. This diversity varies from one area to another and is dependent on soil characteristics (pH, phosphorus available, organic matter). On the basis of ubiquity and abundance criteria, two species *Acaulospora colombiana* (accession number KX168435) and *Ambispora appendicula* (accession number KX168436) were selected. Under controlled conditions, *A. colombiana* has been shown to have significantly improved cassava growth and increased tolerance to water stress. On the other hand, *A. colombiana* and *A. appendicula* confer bioprotective effects on cassava plants against nematodes of the genus *Meloidogyne* spp. ranging from resistance to tolerance. The ability of the two strains to improve the yield of cassava under production conditions on two experimental plots in farms at Duokro and the INP-HB was effective. *A. colombiana* alone used as inoculum yielded a 16.6% yield gain at the site while double inoculation *A. colombiana* + *A. appendicula* improved cassava yield at both sites by 17.8 To 19.4%. This new ecological engineering strategy for selecting native CMAs is robust and can be applied to other crops for sustainable agriculture.

Key words: Diversity, AMF, ecological engineering, yield, cassava, tolerance, *Meloidogyne* spp, water stress

TABLE DES MATIERES

DEDICACE	II
AVANT-PROPOS.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RESUME	VI
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIERES	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES	XVII
LISTE DES ANNEXES.....	XX
LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS	XXI
INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	7
CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LE MANIOC	8
1.1. Origine et distribution du manioc	8
1.2. Taxonomie et morphologie du manioc.....	8
1.2.1. Taxonomie	8
1.2.2. Morphologie du manioc.....	9
1.3. Ecologie du manioc	10
1.4. Production, composition nutritionnelle et importance socio-économique	11
1.4.1. Production et composition nutritionnelle du manioc.....	11
1.4.2. Importance socio-économique du manioc	13
1.5. Culture du manioc en Côte d’Ivoire	14
1.6. Contraintes de production du manioc en Côte d’Ivoire.....	14
1.6.1. Pauvreté des sols, l’eau et les facteurs agronomiques	14
1.6.2. Les adventices.....	15
1.6.3. Les maladies	16

1.6.4. Les ravageurs (insectes parasites).....	16
1.6.5. Les nématodes	17

CHAPITRE 2 : INGENIERIE ECOLOGIQUE ET AGRICULTURE DURABLE 19

2.1. Généralités.....	19
2.2. Ingénierie génétique pour une agriculture durable.....	20
2.3. Ingénierie écologique pour une agriculture durable	20

CHAPITRE 3 : SYMBIOSE MYCORHIZIENNE 22

3.1. Généralités sur la symbiose mycorhizienne	22
3.2. Endomycorhizes ou champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA).....	23
3.3. Morphologie et mode de reproduction des CMA	24
3.4. Cycle de développement des CMA	26
3.5. Systématique traditionnelle des CMA	27
3.6. Emergence de la taxonomie moléculaire dans l'étude de la diversité.....	28
3.6.1. ADN nucléaire ribosomique (ADNr)	28
3.6.2. Amorces universelles et amorces spécifiques aux CMA.....	30
3.6.3. Taxonomie moléculaire dans l'étude de la diversité des CMA	30
3.6.4. Technologie de Sequençages Nouvelles Générations (NGS).....	32
3.7. Taxonomie actuelle et études de diversité des CMA	33

CHAPITRE 4 : COMPOSANTES ET MESURES DE LA DIVERSITE DANS LES COMMUNAUTES 36

4.1. Composantes de la diversité.....	36
4.2. Niveaux de la diversité	36
4.3. Indices de diversité des communautés	38
4.3.1. Mesure de la diversité α et γ	38
4.3.2. Mesure de la diversité β : indice de Bray-Curtis	39

CHAPITRE 5 : RÔLE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES DANS LES AGRO-SYSTEMES	41
5.1. Amélioration de la croissance et de la nutrition minérale des plantes	41
5.2. Nutrition hydrique et tolérance au stress hydrique	42
5.3. Aggrégation des sols	42
5.4. Lutte contre les ravageurs et pathogènes	43
5.4.1. Généralités	43
5.4.2. Lutte contre les nématodes du genre <i>Meloidogyne</i> spp.	44
CHAPITRE 6 : APPLICATIONS DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES EN AGRICULTURE	46
6.1. Biofertilisants, biostimulants et inoculum à base de CMA en agriculture.....	46
6.2. Technologies de production d'inoculum de CMA	47
6.3. Inoculation mycorhizienne en agriculture dans le monde	48
6.4. Bilan de la technologie d'endomycorhization du manioc en agriculture	50
PARTIE 2 : MATERIEL ET APPROCHE METHODOLOGIQUE	52
CHAPITRE 7 : PRESENTATION DES SITES D'ETUDES	53
7.1. Zones d'études.....	53
7.1.1. Zone agroécologique d'Abengourou	55
7.1.2. Zone agroécologique d'Azaguié.....	56
7.1.3. Zone agroécologique de Yamoussoukro	58
7.2. Sites d'expérimentation.....	59
CHAPITRE 8 : MATERIEL ET METHODES	61
8.1. Matériel biologique.....	61
8.1.1. Sols et substrats de culture.....	61
8.1.2. Matériel végétal	61

8.1.3. Matériel fongique	61
8.2. Matériel Technique.....	61
8.2.1. Echantillonnage des sols.....	61
8.2.2. Piégeage, dénombrement et identification morphologique des spores.....	62
8.2.3. Etude moléculaire des communautés de CMA et l'identification des souches performantes associées au manioc.....	62
8.2.4. Extraction, comptage et coloration des nématodes	63
8.2.5. Evaluation sur la croissance du manioc et la tolérance au stress hydrique	63
8.2.6. Analyse chimique des feuilles de manioc.....	63
8.3. Méthodes de collecte des échantillons de sols.....	63
8.4. Méthode d'analyse physico-chimique des sols d'expérimentations	64
8.4.1. pH eau.....	65
8.4.2. Bases échangeables et Taux de saturation	65
8.4.3. Matière organique	66
8.4.4. Phosphore	67
8.4.5. Texture du sol	67
8.5. Méthode d'analyse physico-chimique des échantillons de feuilles de manioc.....	68
8.5.1. Dosage du Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ et P dans les échantillons végétaux	68
8.5.2. Dosage de l'azote total dans les échantillons végétaux (Méthode Kjeldhal)	68
8.6. Méthode d'études des communautés de CMA des échantillons de sols.....	69
8.6.1. Extraction et purification d'ADN de 1g de sol par Fast Prep.....	69
8.6.2. Nested PCR suivie du séquençage haut débit Illumina Miseq	70
8.6.3. Analyse bio-informatique des séquences obtenues	71
8.6.4. Analyses de la diversité α et β des CMA associés au manioc	71
8.7. Méthode de sélection, d'identification des CMA d'intérêts et production d'inoculum mycorhiziens (Technologie de « Pot culture »).....	72
8.7.1. Piégeage des sols des champs avec le manioc Yavo	72
8.7.2. Dénombrement des spores.....	73
8.7.3. Extraction des spores abondantes après piégeage avec du manioc	73

8.7.4. Culture monosporelle des souches abondantes et ubiquitaires issues des sols échantillonnés	74
8.7.5. Estimation de la colonisation racinaire des plants de monoculture.....	74
8.7.6. Identification morphologique des souches isolées	75
8.7.7. Identification moléculaire des morphoespèces sélectionnées	76
8.7.8. Production d'inoculum avec les morphoespèces locales sélectionnées	76
8.8. Evaluation en serre de l'efficacité des CMA natifs sur la croissance, la nutrition minérale, les <i>Meloidogynes</i> et le stress hydrique du manioc.....	77
8.8.1. Méthode d'évaluation de l'impact des espèces de CMA isolées sur la croissance et la nutrition minérale du manioc.....	77
8.8.2. Méthode d'évaluation de l'impact des espèces de CMA isolées sur la tolérance du manioc aux nématodes à galles du genre <i>Meloidogyne</i> spp.	77
8.8.3. Impact de l'inoculation des souches locales de CMA sur la tolérance du manioc au stress hydrique.	79
8.9. Evaluation en champ de l'efficacité de souches locales <i>Acaulospora colombiana</i> et <i>Ambispora appendicula</i> et industrielles <i>Rhizophagus intraradices</i> sur les performances agronomiques du manioc.	80
8.9.1. Dispositif expérimental et condition de culture.....	80
8.9.2. Suivi et collecte des données	82
8.9.3. Calendrier de culture du manioc sur le site de la ferme de l'INP-HB.....	84
8.9.4. Calendrier de culture du manioc sur le site de Duokro	84
8.9.5. Analyses statistiques.....	85
PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	86
CHAPITRE 9 : RESULTATS	87
9.1. Etude moléculaire de la diversité des communautés de CMA associés au manioc dans trois zones agroécologiques en Côte d'Ivoire et impact des propriétés phycochimiques des sols sur leur structuration.	87
9.1.1. Analyse des séquences des zones agroécologiques	87
9.1.2. Répartition des OTUs entre les différentes zones agroécologiques	87
9.1.3. Analyse phylogénétique des OTUs majoritaires	89

9.1.4. Richesse spécifique des CMA associés au manioc	90
9.1.5. Richesse spécifique par zone agroécologique des genres et des espèces de CMA associés au manioc	92
9.1.6. Distribution des espèces dans les trois zones agroécologiques	95
9.1.7. Indices de diversité	97
9.1.8. Relations entre les paramètres physico-chimiques et les communautés de CMA	99
9.1.9. Impact des propriétés physico-chimiques sur la structuration des genres et des espèces de CMA de la rhizosphère du manioc	104
9.2. Sélection, identification et production d'inoculum mycorhiziens de souches de CMA locales performantes	109
9.2.1. Sélection et identification morphologique des espèces de CMA potentiellement utiles pour l'inoculation du manioc.....	109
9.2.2. Identification moléculaire des espèces de CMA d'intérêts pour l'inoculation du manioc.....	111
9.2.3. Production d'inocula à partir des souches identifiées.....	112
9.3. Evaluation en serre de l'efficacité des CMA natifs sur la croissance, la nutrition minérale, les <i>Meloidogynes</i> et le stress hydrique du manioc.....	114
9.3.1. Efficacité de <i>A. colombiana</i> et de <i>A. appendicula</i> en inoculation simple ou double sur la croissance du manioc et la nutrition minérale	114
9.3.2. Tolérance des plantes de manioc inoculées avec <i>A. colombiana</i> et <i>A. appendicula</i> aux nématodes à galles du genre <i>Meloidogyne</i> spp.....	115
9.3.3. Développement des plantes après inoculation simple et double de <i>A. colombiana</i> et <i>A. appendicula</i> lors de stress hydrique	115
9.4. Evaluation en champ de l'efficacité de souches locales <i>Acaulospora colombiana</i> et <i>Ambispora appendicula</i> et industrielle <i>Rhizophagus intraradices</i> sur les performances agronomiques du manioc.	121
9.4.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols des parcelles expérimentales de Yamoussoukro et Duokro.....	121
9.4.2. Diversité des champignons mycorhiziens présents dans les sols des parcelles expérimentales de Yamoussoukro et de Duokro	122

9.5. Effets des traitements et des sites sur l'ensemble des paramètres agronomiques du manioc sur les parcelles (Yamoussoukro et de Duokro)	124
9.5.1. Mycorhization et croissance du manioc à Yamoussoukro et Duokro	125
9.5.2. Biomasse totale fraîche et sèche du manioc à Yamoussoukro et Duokro	130
9.5.3. Nutrition minérale du manioc à Yamoussoukro et Duokro.....	134
9.5.4. Rendement et gain en performance du manioc à Yamoussoukro et Duokro	136
9.5.5. Impacts généraux des traitements sur les paramètres agronomiques du manioc.....	139
CHAPITRE 10 : DISCUSSION.....	141
10.1. Etude moléculaire de la diversité des communautés de CMA associés au manioc dans trois zones agroécologiques en Côte d'Ivoire et impact des propriétés phyco-chimiques des sols sur leur structuration.	141
10.2. Sélection, identification et production d'inoculum mycorhizien de souches locales performantes de CMA.....	147
10.3. Evaluation en serre de l'efficacité des CMA natifs sur la croissance, la nutrition minérale, les <i>Meloidogynes</i> et le stress hydrique du manioc.....	149
10.4. Evaluation en champ de l'efficacité de souches locales <i>Acaulospora colombiana</i> et <i>Ambispora appendicula</i> et industrielle <i>Rhizophagus intraradices</i> sur les performances agronomiques du manioc.	152
CHAPITRE 11 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	157
11.1. Conclusion	157
11.2. Perspectives	158
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET ANNEXE.	159
PUBLICATION	191

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Statistiques du manioc par zones de production (FAO, 2013).....	11
Tableau 2. Composition nutritionnelle des feuilles et des racines de manioc (Sylvestre et Arraudeau, 1983).....	12
Tableau 3. Classification des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) selon Redecker <i>et al.</i> (2013)	35
Tableau 4. Coordonnées géographiques des points d'échantillonnage	54
Tableau 5. Analyse physico-chimique des sols des champs de manioc à Abengourou (Voko, 2014).....	56
Tableau 6. Analyse physico-chimique des sols des champs de manioc à Azaguié (Voko, 2014).....	58
Tableau 7. Analyse physico-chimique des sols des champs de manioc Yamoussoukro (Voko, 2014).....	59
Tableau 8. Coordonnées géographiques des champs expérimentaux	60
Tableau 9. Les caractéristiques des parcelles.....	83
Tableau 10. Quantité d'inoculum et d'engrais chimiques.....	84
Tableau 11. Calendrier cultural sur le site de Yamoussoukro (INP-HB)	84
Tableau 12. Calendrier cultural du manioc sur le site de Duokro.....	85
Tableau 13. Nombre de séquences et d'Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) par zone agroécologique	87
Tableau 14. Genres de champignons mycorhiziens à arbuscules et nombre d'Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) associés au manioc.	90
Tableau 15. Espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules associés au manioc	91
Tableau 16. Distribution des espèces dans les trois zones agroécologiques.....	96
Tableau 17. Répartition de la diversité α au sein de chaque zone agroécologique.....	98
Tableau 18. Indice de dissimilarité de Bray-Curtis.....	99
Tableau 19. Caractéristiques physico-chimiques moyennes des sols des champs des trois zones agroécologiques.....	101
Tableau 20. Matrice de corrélation (Pearson (n)) entre la diversité et les paramètres physico-chimiques du sol.....	104
Tableau 21. Processus de sélection morphologique des souches efficaces de champignons mycorhiziens à arbuscules.....	110

Tableau 22. Identification finale des morphoespèces indigènes à partir des critères morphologiques et moléculaires des spores	111
Tableau 23. Impact de l'inoculation de <i>A. colombiana</i> et de <i>A. appendicula</i> sur la nutrition minérale et la croissance du manioc après 4 mois.	117
Tableau 24. Impact de <i>A. colombiana</i> et de <i>A. appendicula</i> sur la population de nématodes et la croissance du manioc.....	118
Tableau 25. Impact de <i>Acaulospra colombiana</i> et <i>Ambispora appendicula</i> sur la croissance et les paramètres physiologiques.....	119
Tableau 26. Caractéristiques physico-chimiques des sols des parcelles.....	122
Tableau 27. Communauté de champignons mycorhiziens à arbuscules sur la parcelle de Duokro.....	123
Tableau 28. Communauté de champignons mycorhiziens à arbuscules sur la parcelle de la ferme.....	123
Tableau 29. Indices de diversité alpha	124
Tableau 30. Effets des traitements et des sites sur les performances agronomiques du manioc.	124
Tableau 31. Nutrition minérale du manioc à Yamoussoukro.....	134
Tableau 32. Nutrition minérale du manioc à Duokro.....	135

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Morphologie générale du manioc : A-plante entière, B-fruit, C-racine tubéreuse ..	10
Figure 2. Cycle de développement de <i>Meloidogyne</i> spp. sur racines de manioc (Djian-Caporalino <i>et al.</i> , 2008).....	18
Figure 3. Différents types d'associations mycorhiziennes (Sélosse et Le Tacon, 1998).....	23
Figure 4. Morphologie des champignons mycorhiziens à arbuscules (Fortin <i>et al.</i> , 2008)	24
Figure 5. Cycle de développement des champignons mycorhiziens (Modifié de Balestrini et Lanfranco, 2006)	27
Figure 6. Gène ribosomal et les trois sous-unités 18 (SSU), 5.8 S et 28 S (LSU) (Van Tuinen <i>et al.</i> , 1998).....	29
Figure 7. Clonage et construction d'une banque d'ADN (The national health museum, copyright, 1999-2009).....	32
Figure 8. Représentation schématique de la diversité alpha, beta et gamma (Saheki et Shiro, 2014).....	37
Figure 9. Exemples de production au champ d'inoculum mycorhiziens (Agritech.tnau, 2014)	47
Figure 10. Culture aéroponique d'inoculum de champignons mycorhiziens à arbuscules (INVAM, 2016).....	48
Figure 11. Culture <i>in vitro</i> de champignons mycorhiziens à arbuscules (INVAM, 2016)	48
Figure 12. Localisation des trois zones agroécologiques sur la carte de la végétation de la Côte d'Ivoire.	53
Figure 13. Schéma du prélèvement des échantillons de sol (Haung et cares, 2004).....	65
Figure 14. Plants de manioc en serre inoculés avec les sols prélevés au champ.....	73
Figure 15. Taux d'infection racinaire selon Trouvelot <i>et al.</i> , 1986	75
Figure 16. Schéma du dispositif expérimental	83
Figure 17. Diagramme de Venn de la répartition des Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) entre les trois zones	88
Figure 18. Courbe moléculaire de raréfaction des Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) pour les trois zones agroécologiques.....	88
Figure 19. Arbre phylogénétique des Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) majoritaires représentant 75 % de la diversité des glomérromycètes basée sur les séquences LSU-D2 rDNA.....	89

Figure 20. Répartition des genres et espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules dans la rhizosphère du manioc à Abengourou.....	93
Figure 21. Répartition des genres et espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules dans la rhizosphère du manioc à Yamoussoukro.....	94
Figure 22. Répartition des genres et des espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules dans la rhizosphère du manioc à Azaguié	94
Figure 23. Analyse en composante principale de la repartition de la diversité et des caractéristiques physico-chimiques des trois zones agroécologiques	103
Figure 24. Répartition des genres (A) et espèces (B) dans la rhizosphère du manioc en fonction du pH eau	105
Figure 25. Répartition des genres (A) et des espèces (B) chez le manioc en fonction des classes de teneur en phosphore assimilable.....	107
Figure 26. Répartition des genres (A) et des espèces (B) en fonction de la teneur en matière organique.....	108
Figure 27. Spores de champignons mycorhiziens à arbuscules utilisées dans cette étude, identification morphologique à partir de chaque morphotype.	109
Figure 28. Identification phylogénétique avec MEGA 6 (Tamura <i>et al.</i> , 2013) et les séquences des gènes de référence SSU-ITS-LSU. Les souches de CMA identifiées sont LBVM01 et LBVM02.....	112
Figure 29. Evolution de la mycorhization des souches indigènes en serre pour chaque inoculum.....	113
Figure 30. Structures mycorhiziennes dans les racines de manioc A. <i>A. appendicula</i> et B. <i>A. colombiana</i>	113
Figure 31. Evolution de la fréquence de mycorhization de 100 % du régime hydrique (1 à 2 mois) à (10 %) pendant le stress hydrique (2 à 4 months). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.....	120
Figure 32. Colonisation mycorhizienne et croissance du manioc à Yamoussoukro et Duokro. Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %	127
Figure 33. Colonisation mycorhizienne et croissance du manioc à Yamoussoukro et Duokro en présence du NPK.	129
Figure 34. Biomasse fraîche et sèche à Yamoussoukro (A) et à Duokro (B) pour une inoculation de champignons mycorhiziens à arbuscules sans NPK.....	131

Figure 35. Biomasse fraîche et sèche à Yamoussoukro (A) et à Duokro (B) pour une inoculation simultanée engrais + champignons mycorhiziens à arbuscules.	133
Figure 36. Rendement et gain en racines tubéreuses fraîches de manioc à Yamoussoukro (A) et Duokro (B) pour une inoculation de champignons mycorhiziens à arbuscules uniquement.	137
Figure 37. Rendement en racines tubéreuses fraîches de manioc à Yamoussoukro (A) et Duokro (B) pour une inoculation champignons mycorhiziens à arbuscules + engrais NPK.	138
Figure 38. Classification des traitements selon leurs efficacités sur les paramètres agronomiques du manioc à Yamoussoukro (A) et à Duokro	140

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Contributions des variables aux axes factoriels basées sur les corrélations entre la diversité et les paramètres physico-chimiques des sols	189
Annexe 2. Contributions des observations aux axes factoriels basées sur les corrélations entre la diversité et les paramètres physico-chimiques des sols.....	190

LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS

ACP :	Analyse en Composantes Principales
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr :	Acide DésoxyriboNucléique ribosomique
ANOVA:	ANalyse Of Variance
ARN :	Acide RiboNucléique
C :	Carbone
C/N :	rapport entre proportion en carbone organique total et proportion en azote total
Ca²⁺ :	Calcium
CC :	Capacité au champ
CEC :	Capacité d'Echange Cationique
Chl <i>a</i> :	Chlorophylle <i>a</i>
CMA :	Champignons Mycorhiziens à Arbuscules
DFR-ARA :	Département de Formation et de Recherche Agriculture et Ressources Animales
FAO :	Food and Agriculture Organisation
FIRCA	Fond Interprofessionnel pour la Recherche et le Conseil Agricoles
GPS :	Geographic Positioning System
Ha :	Hectare
INP-HB :	Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny de Yamoussoukro
INVAM :	International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi
ITS :	Internal Transcribed Spacer
K⁺ :	Potassium
Kg :	Kilogramme
LBVM :	Laboratoire de Biotechnologies Végétale et Microbienne
M.O :	Matière Organique
mg :	Milligramme
Mg²⁺ :	Magnésium
N :	Azote total
Na⁺ :	Sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPK	Azote, Phosphore, Potassium
P total :	Phosphore total
P.ass :	Phosphore assimilable
pb :	paire de base
PCR :	Polymerase Chain Reaction
pH :	potentiel de l'ion Hydronium
PPAAO :	Programme de Productivité Agricole en Afrique de l'Ouest
t :	Tonne
UMRI :	Unité Mixte de Recherche et d'Innovation
V :	Taux de Saturation en bases

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est une plante à racines tubérisées riches en amidon appartenant à la famille des Euphorbiaceae. Il est originaire d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud plus particulièrement du Sud-Ouest du bassin amazonien (Silvestre et Arreaudau, 1983). Il est aujourd'hui largement cultivé et récolté comme plante annuelle dans les régions tropicales et subtropicales où il a été introduit dès le XVIème siècle par les portugais depuis le rivage saharien jusqu'à la forêt équatoriale (Silvestre et Arreaudau, 1983). Le manioc est un aliment de base pour plus de 800 millions de personnes vivant dans les pays en développement (Burns *et al.*, 2010). Il est cultivé par les petits exploitants agricoles, dans plus de 100 pays tropicaux et subtropicaux. En 2013, la production de tubercules frais dans le monde s'élevait à 252 millions de tonnes. Elle provient de 92 pays et se répartit essentiellement entre l'Afrique (55,9 %), l'Asie (30,4 %) et l'Amérique (13,8 %). Cette plante a la capacité de se développer sur les sols pauvres (Silvestre et Arreaudau, 1983) avec des rendements raisonnables pour un apport limité d'intrants. Cette plante peut servir de culture de subsistance ou de culture de rente, offrant ainsi une grande flexibilité aux agriculteurs. Cette capacité d'adaptation lui fait jouer une multitude de fonctions au sein des systèmes tropicaux de culture et de production (de Foresta et Schwartz, 1991).

En Afrique de l'Ouest en général, le manioc joue un rôle important dans la sécurité alimentaire, la création d'emplois et la génération de revenus pour les exploitations familiales dans plusieurs régions des tropiques humides où la faim et la famine prévalent (Ugwu et Ukpai, 2002). Le manioc est devenu une culture polyvalente qui apporte une réponse, à la fois aux priorités des pays en développement, aux tendances de l'économie mondiale et au défi posé par le changement climatique (FAO, 2013). En Côte d'Ivoire, le manioc constitue la deuxième culture vivrière de base après l'igname, avec une production annuelle estimée en 2014 à 2,5 millions de tonnes (FAO, 2014). Grâce à ses multiples modes de consommation, le manioc intègre les habitudes alimentaires de la plupart des populations ivoiriennes.

Malgré son importance, plusieurs contraintes entravent sa production dans la région ouest-africaine, particulièrement en Côte d'Ivoire (Amani *et al.*, 2007). Cette importante culture est réalisée en Côte d'Ivoire sur des exploitations de faibles tailles, par des paysans à faibles revenus et généralement sans accès aux fertilisants. Les pressions démographiques et l'introduction généralisée de nouvelles cultures non vivrières, telle que l'hévéaculture, dans les principales zones de production du manioc empêchent de plus en plus l'extension des exploitations et entraînent la surexploitation des aires déjà existantes. Les effets à long terme, de ce modèle de production sans

plan de fertilisation sont la baisse des rendements (Cadavid *et al.*, 1998) due à la perte des éléments minéraux exportés par les cultures successives et à la dégradation des sols par érosion (Howeler, 2002). Par ailleurs, la culture du manioc épuise les sols (Silvestre et Arreaudau, 1983) au regard des mobilisations minérales qu'entraîne sa culture. En Côte d'Ivoire, depuis 2005, on assiste à une baisse des rendements par unité de surface cultivée (FAO, 2014). Ces faibles rendements sont dûs entre autres à la perte de la fertilité des sols, à la pénibilité des pratiques culturales, à la difficulté d'approvisionnement en matériels sains de plantation et à la forte pression des maladies et ravageurs, tels que la maladie de la mosaïque du manioc, les nématodes à galles etc qui aggravent les pertes de récolte (Amani *et al.*, 2007 ; Jatala et Bridge, 1990). En Thaïlande, les rendements du manioc cultivé de façon permanente sur des sols non fertilisés ont baissé passant de 26-30 t/ha à 10-12 t/ha après 20 à 30 années de culture (Tongglum, 1992).

Hormis les contraintes de productivité qui réduisent les pertes de récolte; il faut signaler la vulnérabilité des pays de l'Afrique subsaharienne dont la Côte d'Ivoire au changement climatique incluant la baisse des niveaux de précipitations (Diomandé *et al.*, 2013) et un raccourcissement des périodes de pluies (Dje, 2007). Ce facteur non négligeable limite également la culture du manioc dans les zones tropicales et subtropicales (N'guetta, 1986). Le manioc, bien que connu pour sa capacité à tolérer le déficit hydrique indépendamment de la variété utilisée voit sa production nette de biomasse réduite en période de stress hydrique (Cock, 1988) ce qui affecte grandement le rendement.

L'utilisation des engrais minéraux permettrait de maintenir les rendements et dans certains cas de les améliorer (Howeler, 2002). Toutefois, ce moyen, relativement coûteux pour les paysans, pourrait également à long terme avoir des impacts négatifs sur la productivité des sols et sur l'environnement. Une augmentation du coût des engrais phosphatés est annoncée du fait de l'épuisement probable des réserves en phosphates d'ici 50 à 100 ans (Cordell *et al.*, 2009 ; Gilbert, 2009). Non seulement les engrais minéraux ont un impact économique et politique en raison de leur provenance de sources non renouvelables, mais leur utilisation a également des impacts environnementaux directs et indirects majeurs, depuis leur extraction des mines jusqu'à l'application aux champs. Il s'agit d'autres arguments importants quant à la remise en question de la dépendance de l'agriculture moderne à ces intrants. Les technologies permettant d'améliorer les rendements et d'assurer des productions durables s'imposent en Côte d'Ivoire car il faut faire face à la pression foncière, à la paupérisation généralisée et à la demande de plus en plus croissante du manioc sur le marché. Aussi, l'un des enjeux actuels pour l'agriculture ivoirienne est de concevoir des systèmes agricoles durables et résilients tout en préservant les équilibres écologiques. Le

virage vers une agriculture durable productive et moins dépendante des intrants chimiques phosphatés ne pourra se faire sans une gestion des interactions biologiques dans les agroécosystèmes, comme les mycorhizes (Adesemoye et Kloepper, 2009 ; Plenchette *et al.*, 2005). La maîtrise de cet enjeu passe par une meilleure connaissance des ressources des écosystèmes et le développement de technologies basées sur ces ressources. Les technologies utilisées doivent s'appuyer sur les mécanismes qui gouvernent naturellement les systèmes écologiques.

L'ingénierie écologique est au cœur de cette stratégie qui vise à s'appuyer sur des mécanismes naturels pour une intensification durable en agriculture. La microflore symbiotique à travers sa diversité et son abondance, joue un rôle fondamental dans la restauration et le maintien de la fertilité des sols, dans la protection contre les agents biotiques (pathogènes telluriques tels que les nématodes à galles) et abiotiques (baisse de la pluviométrie, déficit hydrique etc) et dans la nutrition minérale des plantes. Ces microsymbiontes, en l'occurrence les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) impliqués dans la mobilisation du phosphore (Jakobsen *et al.*, 2002 ; Van der Heijden *et al.*, 1998) et de l'eau (Smith et Read, 1997), peuvent ainsi contribuer à l'adaptation des plantes à des sols pauvres. Des solutions alternatives pour améliorer durablement le rendement du manioc en Côte d'Ivoire pourraient consister en l'utilisation des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA).

En effet, les CMA facilitent l'absorption des éléments minéraux du sol parmi lesquels le potassium, l'azote, le calcium et le phosphore, qui sont indispensables à la bonne productivité du manioc (Sittibusaya, 1993). Il a été montré que l'utilisation d'inocula de CMA permet de réduire l'effet des stress hydriques chez le manioc, grâce à une optimisation de sa nutrition hydrique (Oyetunji *et al.*, 2003). En définitive, grâce à son effet bénéfique, l'utilisation de la technologie d'endomycorhization permettrait d'accroître le rendement du manioc sur des sols à faibles niveaux de fertilité (Osonubi *et al.*, 1995). Au Nigéria, des études ont montré une amélioration du rendement du manioc mycorhizé de plus de 20 % dans les zones de savane (Oyetunji et Osonubi, 2007).

Cependant malgré le fait que les CMA aient été trouvés associés au manioc, en Côte d'Ivoire il n'y a pas d'étude moléculaire sur la diversité et la structuration des communautés de CMA qui y sont associées. Cette étude moléculaire viendra combler les limites de l'identification morphologique. Elle est nécessaire pour une identification correcte et approfondie des espèces pour une utilisation à long terme en agriculture. La diversité des champignons dans l'écosystème du sol est le principal goulot d'étranglement dans les études d'écologie mycorhizienne (Öpik *et al.*, 2009).

De plus les données sur la diversité des CMA associés au manioc en Afrique sub-saharienne et en Côte d'Ivoire en particulier sont rares. Des études systématiques traditionnelles récentes menées en Côte d'Ivoire et en Afrique du Sud, ont montré que la rhizosphère des champs de manioc était peuplée d'espèces de CMA (Straker *et al.*, 2010 ; Voko *et al.*, 2013). Toutefois, la répartition, l'abondance et la viabilité des espèces de CMA endogènes peuvent dépendre de la variété de manioc, du système cultural et des conditions physiques et chimiques du sol (Shukla *et al.*, 2009). Aussi la mise en valeur des effets bénéfiques des CMA par l'outil biotechnologique nécessite-elle une connaissance préalable des communautés de CMA endogènes. Cette systématique dite « traditionnelle » est basée sur l'hypothèse que les spores à morphologie similaire sont apparentées phylogénétiquement. Le peu de variations morphologiques entre les spores rend cependant difficile l'identification des espèces de CMA (Sanders *et al.*, 1995 ; Redecker et Raab, 2006). Les études systématiques morphologiques doivent être complétées et actualisées par la caractérisation moléculaire en particulier l'amplification et le séquençage de différentes régions de l'ADNr codant les ARNr 18S, ARNr 5.8S et ARNr 28S suivie de l'étude des relations phylogénétiques (Schübler *et al.*, 2001). La technologie de séquençage à haut débit telle que la plateforme Illumina MiSeq est fondamentale pour enquêter sur les communautés fongiques. Ces études taxonomiques de la diversité des CMA associés au manioc permettraient à long terme une optimisation de leur potentiel agronomique (Sieverding, 1989a).

En Côte d'Ivoire, vu l'importance du manioc, il serait nécessaire de développer l'ingénierie écologique d'inoculation utilisant les champignons endomycorhiziens. Ce travail de recherche s'inscrit dans le cadre du projet IVO-RHIZE financé par le PPAO à travers le Fonds Interprofessionnels pour la Recherche et le Conseil Agricole (FIRCA). L'objectif général de cette étude est de développer la technologie d'inoculation utilisant les champignons endomycorhiziens locaux pour une amélioration durable des performances agronomiques du manioc en Côte d'Ivoire. En d'autres termes, la stimulation de la symbiose mycorhizienne locale peut constituer une alternative durable de production pour accroître les performances agronomiques du manioc en Côte d'Ivoire. De nombreuses études ont révélées que les souches natives de CMA sont plus performantes que les souches exogènes ou industrielles (Berruti *et al.*, 2016). Dans cette perspective, l'intérêt a été porté sur les communautés natives de CMA associées au manioc dans trois zones agroécologiques de Côte d'Ivoire : la zone d'Abengourou à l'Est en aire de forêt dense humide (Guillaumet et Adjanohoun, 1971), la zone d'Azaguié au Sud-Est également en aire forestière mais avec un relief prédominé par des bas-fonds et la zone de Yamoussoukro au Centre dont la végétation est une mosaïque de savane guinéenne et de forêt semi-décidue (N'Guessan,

1990). L'intégration de cette technologie dans l'agriculture en général et particulièrement en culture de manioc nécessite que des souches endogènes performantes de ces champignons soient identifiées. Pour atteindre l'objectif de l'étude, cinq hypothèses sont émises :

H1. La diversité des CMA et la structuration des communautés associées au manioc obtenues par l'identification moléculaire sont différentes en fonction des zones agroécologiques.

H2. Les conditions physicochimiques des sols des zones agroécologiques ont un impact sur la composition et la diversité des communautés de CMA endogènes obtenues via l'outil moléculaire.

H3. Les critères d'abondance relative et d'ubiquité d'une souche donnée constituent des facteurs déterminants dans le choix de souches de CMA efficaces ayant un impact sur la nutrition minérale et les paramètres agronomiques du manioc.

H4. Les souches locales de CMA réduisent l'effet du déficit hydrique et ont un impact sur les agents pathogènes du manioc comme les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* spp.

H5. Les souches locales de CMA sont aussi efficaces que la souche industrielle *Rhizophagus intraradices* sur le manioc en condition de production du manioc en champ.

Quatre objectifs spécifiques découlent de ces hypothèses :

- (1) la détermination de la diversité, de la structuration des communautés de CMA de chaque zone agroécologique et l'impact des paramètres physico-chimiques du sol.
- (2) la sélection, l'identification de souches locales de CMA performantes et la production d'inoculum.
- (3) l'évaluation en serre de l'efficacité des souches locales performantes de CMA sur la nutrition minérale, la croissance du manioc, le stress hydrique du manioc et la lutte contre les nématodes à galles.
- (4) l'évaluation en champ de l'efficacité des souches performantes sélectionnées en serre par des tests multi-locaux.

PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LE MANIOC

1.1. Origine et distribution du manioc

Le manioc est une plante à racines tubéreuses tropicale originaire d'Amérique Centrale et du Sud ; Il a été domestiqué par les civilisations précolombiennes. Il aurait été cultivé pour la première fois dans la région Nord-est du Brésil, le long des côtes de la Colombie et du Venezuela où il semble avoir constitué la première denrée de base des peuplements agricoles de l'hémisphère occidental. Le manioc fut apporté en Inde par les portugais au 17^e siècle. Vers 1850, il fut transporté directement du Brésil à Java, à Singapour et en Malaisie. Il a été introduit dans les territoires du Pacifique Sud durant la première moitié du 19^e siècle par les missionnaires et les voyageurs, mais son importance varie d'une île à l'autre. En Afrique, la culture du manioc s'est développée au 19^e et au 20^e siècle, encouragée par les autorités administratives qui ont reconnu sa valeur comme aliment de secours en cas de famine. Sa culture n'aurait progressé que lentement et ne se serait réellement développée qu'à la fin du 19^e siècle (Silvestre et Arraudeau, 1983). Introduit dans le bassin du Congo dès 1558 par les portugais, le manioc se répandit ensuite rapidement en Angola, au Zaïre, au Congo et au Gabon, et plus tard en Afrique de l'Ouest. Il fut introduit séparément sur la côte orientale de l'Afrique et à Madagascar au 18^{ème} siècle par les marchands portugais et arabes, puis devint rapidement un aliment de base dans de nombreuses régions de plaine sous les tropiques (Bradbury *et al.*, 2013). Aujourd'hui, on cultive le manioc dans toutes les zones tropicales et subtropicales, à peu près entre le 30°N et 30°S de part et d'autre de l'équateur et jusqu'à 1 500 m d'altitude.

1.2. Taxonomie et morphologie du manioc

1.2.1. Taxonomie

La classification classique du manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est la suivante :

Règne	: Plantae
Embranchement	: Magnoliophyta
Classe	: Magnoliopsida
Ordre	: Euphorbiales
Famille	: Euphorbiaceae
Genre	: <i>Manihot</i>
Espèce	: <i>Manihot esculenta</i>

La famille des Euphorbiaceae compte plus de 300 genres et 8 000 espèces presque toutes tropicales (Komi, 1994). Le genre *Manihot* de la tribu des Manihotées comprend 99 espèces

(Rogers et Appan, 1973) dont une seule est cultivée pour ses racines tubérisées : *Manihot esculenta* Crantz. Le manioc est une plante cyanogénétique (Delange et Ahluwalia, 1982). Il existe des variétés dont la chair de la racine tubéreuse est douce et d'autres qui ont une chair amère. L'amertume est liée à la libération au niveau de tous ses organes, lors d'une blessure, d'acide cyanhydrique, composé produit par l'hydrolyse enzymatique de deux cyanoglucosides, la linamarine et la lotaustraline. On les trouve habituellement dans des proportions de 95 % pour la linamarine et de 5 % pour la lotaustraline (McMahon *et al.*, 1995). Les teneurs élevées en glucosides peuvent être parfois létales en cas d'alimentation. Les techniques de transformation telles que le rouissage, la fermentation, le chauffage et le séchage au soleil font baisser à des doses acceptables le niveau parfois toxique du glucoside cyanogénétique, qui est soluble et volatil.

1.2.2. Morphologie du manioc

Le manioc est un arbuste dont la taille varie de un à quatre mètres suivant la variété et les conditions de culture (Figure 1-A). Il porte une à plusieurs tiges ramifiées ou non (Memento, 2002). Le système racinaire d'un plant issu d'une bouture comporte des racines pivotantes et des racines secondaires. Tous ces types de racines sont d'abord traçantes et peuvent s'enfoncer ensuite verticalement dans le sol. Les racines tubérisées (Figure 1-C) constituent la principale partie utile du manioc. La tige, de couleur variable suivant l'âge et la variété, présente un aspect noueux du fait de la présence de cicatrices pétiolées proéminentes. Selon la variété, la tige peut donner des ramifications, une ou plusieurs fois au cours du cycle. On distingue deux types de ramifications : celles issues de la floraison par transformation du méristème végétatif terminal en méristème floral accompagnée du développement de deux à quatre branches et celles issues du développement de bourgeons latéraux par levée de dominance apicale (Raffaillac, 1987). Les feuilles sont alternées, simples et caduques; elles sont disposées en spirales sur la tige. Les colorations vont du vert au rouge pourpre pour les pétioles et du vert au rouge cuivré pour les jeunes feuilles non encore complètement développées. Les fleurs forment une inflorescence composée d'un axe central de 2 à 10 cm de long et de plusieurs axes latéraux constituant une panicule protogyne. Les fleurs femelles, peu nombreuses, sont situées à la base de l'inflorescence et s'ouvrent les premières. Le fruit est une capsule déhiscente à trois loges contenant chacune généralement une graine (Figure 1-B).

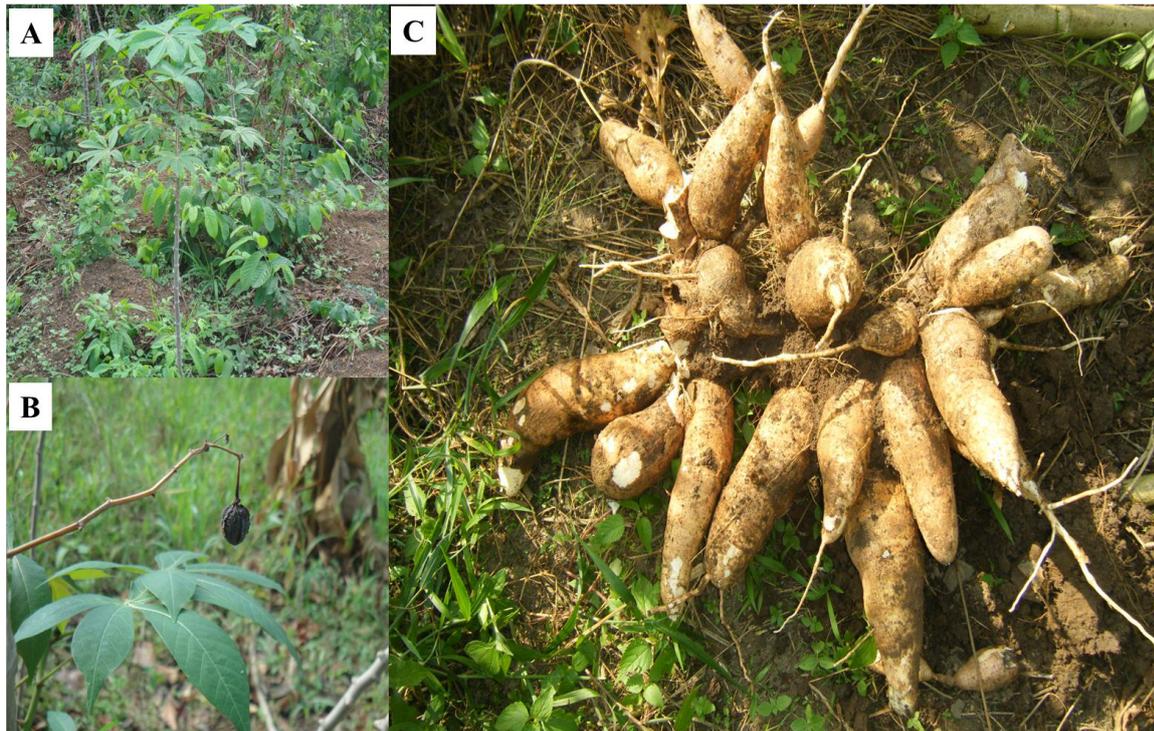


Figure 1. Morphologie générale du manioc : A-plante entière, B-fruit, C-racine tubéreuse

1.3. Ecologie du manioc

Le manioc est une plante rustique pouvant s'adapter à des situations écologiques variées et souvent défavorables à d'autres espèces. Particulièrement tolérant à la sécheresse, le manioc peut être cultivé dans les zones à faible pluviométrie. Une moyenne comprise entre 1000 et 2000 mm annuels est généralement satisfaisante. La reprise des boutures et l'installation de la plante tolèrent une alimentation hydrique qui peut être faible mais régulière. Une fois développée, la plante supporte bien la sécheresse et une forte pluviométrie si le sol est bien drainé. L'engorgement des sols provoque le pourrissement des racines. La productivité en racine tubéreuse souffre particulièrement des alternances humidité/sécheresse. Le manioc croît sur des sols variés : alluvionnaires récents, férraliques ou tourbeux. Les meilleurs sols sont profonds, à bonne réserve en eau, de texture sablo-limoneuse ou argilo-sableuse (Silvestre et Arraudeau, 1983). Mais on trouve le manioc sur des sols à dominante sableuse (podzols en Amazonie) et sur tous les types de sols du moment qu'il n'y a pas d'engorgement et qu'il est suffisamment profond pour permettre le développement des racines tubérisées. Le pH optimum se situe à 5,5 mais le manioc supporte des sols de pH compris entre 4 et 7,5 (Silvestre et Arraudeau, 1983).

1.4. Production, composition nutritionnelle et importance socio-économique

1.4.1. Production et composition nutritionnelle du manioc

Le manioc est l'une des cultures vivrières les plus importantes au monde, avec une production mondiale annuelle d'environ 252,2 millions de tonnes en 2013. En 2013, les principaux pays producteurs (Tableau 1) à l'échelle mondiale étaient les suivants : le Nigeria, la Thaïlande, l'Indonésie, le Brésil, la République Démocratique du Congo. En Côte d'Ivoire le manioc est produit dans tout le pays mais principalement dans le Sud, l'Ouest et le Centre. La production annuelle atteint environ 2,4 millions de tonnes, avec un rendement moyen de 6,5 tonnes par hectare (N'zué, 2005). Les rendements des producteurs de manioc africains sont inférieurs de 37 à 64 % à la valeur mondiale du fait de nombreuses contraintes de production. En 2013, le Nigeria a atteint un rendement de 14,1 tonnes/ha, similaire à celui du Brésil, mais inférieur d'environ 37 % à celui de l'Indonésie (22,5 tonnes/ha) et de la Thaïlande (21,8 tonnes/ha) (FAO, 2014).

Tableau 1. Statistiques du manioc par zones de production (FAO, 2013)

Zones de production	Production		Surface cultivée (10 ³ ha)	Rendement (T.ha ⁻¹ . an ⁻¹)
	(10 ⁶ t)	(% mondial)		
Monde	252,2	100	19644	12,8387
Amérique	33,01	13,8	2 405,6	12,8328
Asie	76,7	30,4	3 912,85	19,5973
Afrique	141,9	55,9	13 047	10,8045
Afrique de l'ouest	76,06	30,16	5 709,26	13,32
Nigéria	52,4	21	3 737,1	14,02
Ghana	14,24	6	889,36	16,01
Bénin	3,6	1,4	258,52	13,92
Côte d'Ivoire	2,36	0,94	352,62	6,7
Guinée	1,056	0,41	125	8,44

Au plan nutritionnel, la racine tubéreuse du manioc est un aliment essentiellement énergétique riche en amidon, peu encombré de glucides non digestibles. Elle est assez bien pourvue en acide ascorbique (vitamine C) mais pauvre en lipides, en sels minéraux, autres vitamines et en protides. Les feuilles par contre, contiennent des taux élevés en protéines (Amani *et al.*, 2007).

Tableau 2. Composition nutritionnelle des feuilles et des racines de manioc (Sylvestre et Arraudeau, 1983).

Composition	Feuilles	Racines épluchées	Racines entières
Eau (%)	85	60	65
Glucides (% Matières Sèches)	41	91 (68 à 78 % amidon)	89
Lipides (% Matières Sèches)	6	0,5	1
Cendres (% Matières Sèches)	8	2,5	3
Fibres (% Matières Sèches)	20	4	4,5
Glucosides cyanogéniques (mg/kg de poids frais)	380 à 590	30 à 240	140-640

Ce sont les racines tubérisées qui jouent le plus grand rôle alimentaire, mais les feuilles sont aussi consommées pour leur qualité nutritive pouvant compléter celles des racines. L'intérêt alimentaire des tubercules réside dans l'excellente qualité de l'amidon du manioc. Cet amidon présente de très bonnes propriétés de digestibilité. En effet, l'amidon de manioc contient 70 % d'amylopectine et 20 % d'amylose. L'amidon de manioc cuit, a une digestibilité de plus de 75 %. En dépit de leur très faible quantité, les protéines des racines de manioc sont riches en acides aminés essentiels. Cependant, le manioc contient un glucoside cyanogénique, qui en se dégradant, donne de l'acide cyanhydrique. Les différentes transformations subies par les racines tubérisées du manioc avant consommation éliminent suffisamment l'acide cyanhydrique pour éviter toute intoxication (Wilson, 2003). L'intérêt des feuilles de manioc réside dans leur teneur élevée en protéines mais surtout dans la qualité des acides aminés qui composent ces protéines. A l'exception de la méthionine pour laquelle la feuille de manioc

connaît un déficit élevé, les protéines peuvent être considérées comme équilibrées, comparées à celles de l'œuf qui est la source de référence en matière de protéine (Amani *et al.*, 2007).

1.4.2. Importance socio-économique du manioc

La demande mondiale de manioc a augmenté de manière significative entre 2004 et 2013 en raison de son attractivité en tant que culture assurant la sécurité alimentaire de populations de plus en plus nombreuses au sein des marchés émergents d'une part, et d'autre part, de la demande croissante de produits dérivés du manioc transformés de manière industrielle.

L'Afrique représente moins de 1% du total des exportations. En outre, la surface de la production de manioc est dominée par les petits exploitants agricoles (dont 25 % de femmes), et la récolte de la racine constitue une source de subsistance pour au moins 300 millions de personnes. La quasi-totalité du manioc (90 %) produit en Afrique est utilisée en tant qu'aliment de base pour la consommation humaine, fournissant des calories à environ 500 millions de personnes et représentant environ 37% des besoins énergétiques alimentaires de la population (FAO, 2010). Selon *l'International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, la consommation par habitant par année en Afrique est de 58 kg. Il existe en Côte d'Ivoire plus de 20 produits dérivés du manioc (attiéké, pâte de manioc, placali, foutou, toh, farine, amidon, gari, pain, gâteau...). Les deux premiers font l'objet de commerce au niveau national et international (N'zué, 2005).

Dans plusieurs pays africains, le manioc est non seulement perçu comme une culture de sécurité alimentaire, mais aussi comme une matière première pour différents types d'industries. Dans certains pays, des efforts concertés sont entrepris, parfois grâce à un puissant soutien politique au plus haut niveau, pour faire du manioc un moteur de la croissance économique. En effet, le manioc peut être converti en un grand nombre de produits, depuis les produits traditionnels et les nouveaux aliments jusqu'au fourrage pour bétail, en passant par l'éthanol, l'amidon, ainsi que de nombreux autres produits dérivés. L'étude intitulée « *Global Cassava Development Strategy* », commandée par la FIDA et la FAO, ainsi que l'étude « *Vision 2020* » du GCRAI, qui porte sur les racines et les tubercules, ont insisté sur le potentiel considérable du manioc pour stimuler le développement industriel en milieu rural, augmenter les revenus ruraux et contribuer à la sécurité alimentaire. Les produits dérivés du manioc peuvent être classés en quatre catégories : les cossettes de manioc, la farine de manioc de haute qualité, l'amidon et l'éthanol. Tous ces produits pouvant être tirés du manioc sont déjà utilisés dans de nombreuses régions du monde, ce qui démontre le

potentiel considérable du manioc sur le plan de la valeur ajoutée et de l'utilisation dans l'industrie en Afrique.

1.5. Culture du manioc en Côte d'Ivoire

En Côte d'Ivoire, le manioc se cultive aussi bien en zone forestière humide au Sud qu'en zone de savane sèche au Nord (Camille, 1984), avec toutefois une prédominance en zone forestière (Kouadio *et al.*, 2010). Les variétés de manioc cultivées en Côte d'Ivoire sont multiples. Selon l'ORSTOM, l'IRAT et l'IDESSA, la Côte d'Ivoire possède près d'une centaine de cultivars locaux dont Agba ouffoué, Agba sampié, Agba Kangba, Agba Koumassi, Bonoua Rouge, Nanitafléma etc. (Kouakou, 1990). Des variétés améliorées produites localement par le CNRA ou issues de l'IITA ont été introduites. Certaines variétés se sont imposées. Il s'agit des variétés Bocou, Yavo, Bingerville etc. Le système de culture du manioc utilisé en Côte d'Ivoire est caractérisé par une agriculture manuelle extensive du type défriche-brûlis avec un faible apport d'intrants. Dans cette pratique culturale, la jachère occupe une place de choix dans la reconstruction de la fertilité des sols (Kouakou, 1990). Malheureusement, la rareté des terres écourte la durée de la jachère (1 à 3 ans) dans la zone guinéenne (Ndabalishye, 1995). Par ailleurs, les fortes pressions démographiques et l'augmentation de la demande en produits dérivés du manioc ont entraîné une surexploitation des terres cultivées et une baisse de la productivité (Igué, 2000). Cependant, dans la zone forestière ivoirienne, l'extension en surface des cultures pérennes de rente restreint les terres cultivables. Ce sont donc des parcelles de qualité médiocre (niveau de fertilité, topographie) cultivée sur de longues périodes qui sont consacrées à la culture du manioc (Rafailac et Nedelec, 1984). De ce fait, plusieurs contraintes entravent la production du manioc dans la région Ouest-africaine et particulièrement en Côte d'Ivoire. Il en résulte de faibles rendements.

1.6. Contraintes de production du manioc en Côte d'Ivoire

En Afrique, la pauvreté des sols, les facteurs agronomiques, les adventivces, les maladies, les ravageurs constituent des contraintes à la production du manioc. Celles-ci sont à l'origine des faibles rendements. Les efforts visant à accroître la production doivent passer par la connaissance des obstacles pour mieux les éliminer ou les maîtriser.

1.6.1. Pauvreté des sols, l'eau et les facteurs agronomiques

Plusieurs facteurs importants ayant trait au sol et à l'agronomie affectent la production du manioc : l'érosion, le manque de fertilité du sol et l'eau ainsi que le recours à des pratiques

culturelles inadaptées. Une culture continue du manioc, sans prendre de mesures efficaces de lutte contre l'érosion, peut aboutir à une dégradation grave et irréversible du sol. Les sols tropicaux sont caractérisés par une carence marquée en phosphore biodisponible (Schwartz, 1994). En effet, moins de 1 % du phosphore total est assimilable par les plantes (Bolan *et al.*, 1991). Cette faible disponibilité du phosphore dans la solution du sol limite la nutrition phosphatée des plantes et partant la productivité agricole et forestière (Schwartz, 1994). Les sols des pays d'Afrique subsaharienne en particulier ont un faible niveau de fertilité intrinsèque (Akanza, 2011) lié à des contraintes naturelles spécifiques à chaque zone agroécologique. Les effets à long terme, enregistrés ailleurs, de modèle de production sans plan de fertilisation sont la baisse des rendements (Cadavid *et al.*, 1998) due à la perte des éléments minéraux exportés par les cultures successives et à la dégradation des sols par érosion (Howeler, 2002).

Hormis la faible fertilité des sols, l'eau constitue un facteur limitant à la production du manioc. Les sécheresses récurrentes et les sols à faible capacité de rétention d'eau contribuent aussi à réduire substantiellement les rendements. Les pays d'Afrique subsaharienne dont la Côte d'Ivoire sont vulnérables au changement climatique incluant la sécheresse (Kouassi *et al.*, 2012). Des alternances de période de sécheresse avec des périodes de reprises sont très préjudiciables à la production du manioc (Silvestre, 1983). Le manioc peut supporter des périodes de sécheresse mais est très sensible au déficit hydrique dans le sol pendant les trois premiers mois qui suivent sa plantation. Tout stress hydrique subi à n'importe quel moment de cette période initiale entraîne une réduction sensible de la croissance des racines et des parties aériennes et compromet par la suite le développement des racines tubéreuses (FAO, 2013). Cette réduction est fonction cependant de la variété, du type de sol, de l'âge de la plante à la récolte et de l'intensité et de la distribution des précipitations pendant une année donnée (FAO, 2013). Enfin, il faut noter le manque de matériels sains de plantation et le non respect des bonnes pratiques culturales par les paysans (variétés améliorées, densités, etc.).

1.6.2. Les adventices

Le développement lent et les dommages graves causés aux plantes par les maladies et les parasites rendent les cultures de manioc très vulnérables à la concurrence des mauvaises herbes pendant les 10 à 12 premières semaines de croissance. On a souvent observé une perte totale de la récolte par suite des effets composés des mauvaises herbes, des maladies et des parasites (Melifonwu, 2000). La croissance démographique et le raccourcissement concomitant des périodes de jachère favorisent la croissance et l'établissement des mauvaises

herbes annuelles, des graminées vivaces et des espèces de mauvaises herbes dicotylédones semi-ligneuses et vivaces.

1.6.3. Les maladies

Les principales maladies touchant le manioc en Afrique sont la mosaïque du manioc (CMV), la brûlure bactérienne (bactériose) du manioc (BBM) et l'antracnose du manioc (AM). La mosaïque du manioc est l'une des maladies les plus graves et les plus répandues dans toutes les régions productrices de manioc en Afrique et elle provoque des chutes de rendement allant jusqu'à 90 % dans les cultures durement touchées (Delange et Ahluwalia, 1982). La BBM est considérée comme une maladie très grave dans les principaux pays producteurs de manioc en Afrique. L'agent pathogène responsable de cette maladie est *Xanthomonas campestris* pv *manihoti*. Elle a été formellement identifiée en Côte d'Ivoire en 2014. Une forte incidence de BBM peut provoquer une perte de la récolte (18 %-92 %) car la plupart des variétés locales sont très vulnérables à cette maladie (Umemura et Kawano, 1983). L'antracnose, due à *Colletotrichum* spp., est une maladie de la tige dans les régions de savane herbeuse de l'Afrique centrale où les sols sont peu fertiles et acides et où les populations de l'insecte (*Pseudoteraptus devastans*), qui est associé à la transmission de la maladie, sont élevées. A ces maladies fongiques du manioc, il faut ajouter de la cercosporiose et de la pourriture brune.

1.6.4. Les ravageurs (insectes parasites)

Les insectes parasites et les criquets sont les principaux ravageurs du manioc. En Afrique, les principaux insectes parasites sont la cochenille (CM) (*Phenacoccus manihoti*) et la teigne (TM) (*Mononychellus tanajoa*). La CM menace maintenant la production de manioc dans les deux tiers des régions productrices d'Afrique. Généralement, les dégâts apparaissent en premier sur les apex. Les feuilles endommagées se dessèchent et les tiges se rabougrissent. Plusieurs attaques provoquent une grave perte de feuilles et une baisse du rendement des racines atteignant jusqu'à 60%. La TM, également originaire de l'Amérique latine, a été signalée pour la première fois en Ouganda en 1972 (Nyiira, 1972). Elle est maintenant présente dans presque tous les pays producteurs de manioc d'Afrique. Cet insecte ravage surtout les jeunes feuilles, ce qui provoque une diminution considérable de 95 % de la surface foliaire. On a constaté une perte de rendement de 40 % (Nyiira, 1972) et la production de feuilles peut également être gravement touchée. Les criquets (*Zonocerus* spp.) sont des ennemis en saison sèche et le seul parasite qui se nourrit de toute la feuille. On mentionne

souvent que les criquets provoquent des dégâts importants au manioc en Afrique occidentale (Lerü et Calatayud, 1994).

1.6.5. Les nématodes

Au moins 45 espèces de nématodes sont associées à la culture du manioc. Ces organismes attaquent les racines les rendant plus sensibles aux agents responsables des pourritures racinaires. Les nématodes des lésions, *Rratylenchus branchyurus*, le nématode spiralé, *Helicotylenchus erythrinae* et le nématode réniforme *Rotylenchus relinformis* se rencontrent également chez le manioc. Cependant, le manioc est très vulnérable aux nématodes cécidogènes (*Meloidogyne incognita* et *M. javanica*). *Meloidogyne incognita* constitue un problème particulièrement grave dans les aires productrices d'Afrique. D'autres espèces appartenant aux genres *Meloidogyne* ont été signalées sur le manioc dont *M. hapla* et *M. aenaria*. Les nématodes à galles sont les principaux agents infestant le manioc (Jatala et Bridge, 1990). Ils forment des galles au niveau du système racinaire au cours de leur cycle de développement.

1.6.5.1. Biologie des nématodes à galles

Le cycle de développement de ces nématodes est divisé en trois stades : l'œuf, quatre sous stades juvéniles (Juvénile 1 à Juvénile 4) et le stade adulte (Coyne *et al.*, 2010). A l'intérieur des œufs s'effectue un développement embryonnaire donnant des Juvéniles 1 qui vont subir au bout de 15 jours une première mue pour devenir des juvéniles 2. Ces derniers sont ensuite libérés dans le sol où ils se déplacent puis pénètrent dans la zone sous-apicale des racines en croissance. Ce déplacement est activé et orienté par les exsudats racinaires de la plante perçus par le nématode grâce à ses chémorécepteurs (Coyne *et al.*, 2010). Les juvéniles 2 migrent ensuite à travers les cellules épidermiques et les cellules corticales. Ils se logent près du cylindre central pour se nourrir (Prot, 1984). Ils subissent deux autres mues à intervalles de 15 jours puis une dernière mue quatre jours après. Au cours de ces mues s'effectue la différenciation sexuelle pour atteindre le stade adulte. Les mâles sortent des racines et se déplacent dans le sol où ils vivent aux dépens de leurs réserves (à 50 % lipidiques) contenues dans l'intestin (Demeure *et al.*, 1980). Les femelles, définitivement inféodées aux cellules du cylindre central, induisent la formation de "cellules géantes" polynucléées nécessaires à l'alimentation du parasite. Elles deviennent ovoïdes et au bout de 15 à 30 jours commencent à pondre des œufs contenus dans une matrice gélatineuse. Ces œufs sont libérés dans le sol et le cycle redémarre (Figure 2).

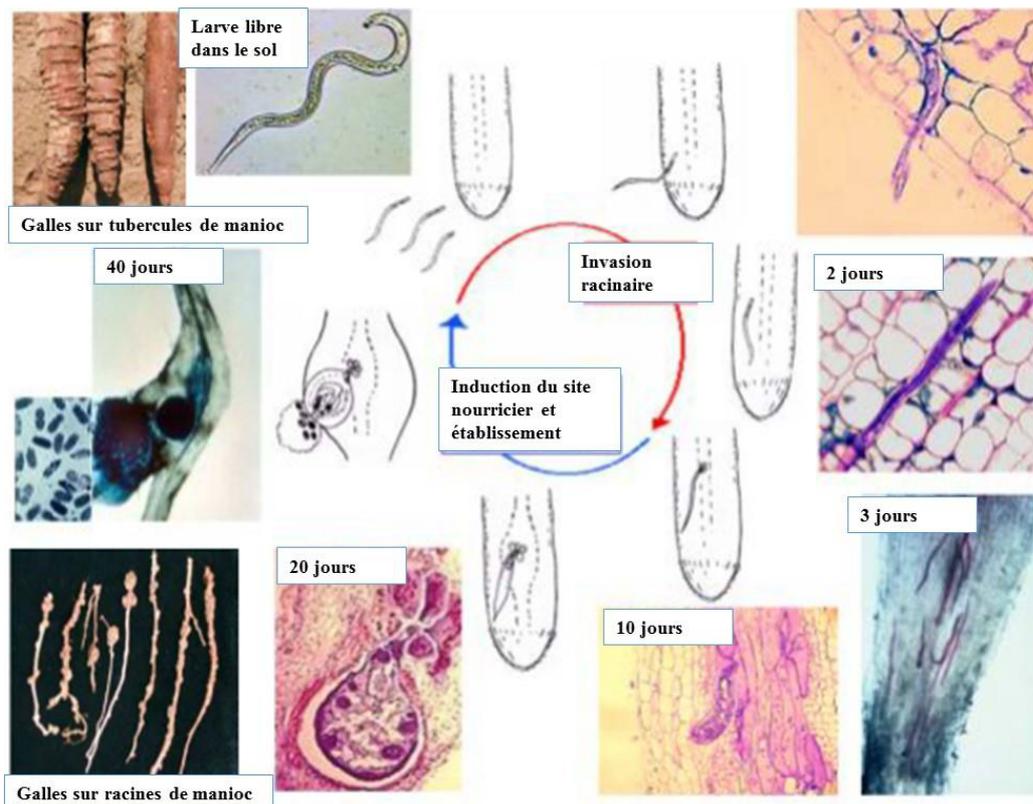


Figure 2. Cycle de développement de *Meloidogyne* spp. sur racines de manioc (Djian-Caporalino *et al.*, 2008).

1.6.5.2. Dégâts occasionnés par *Meloidogyne* sur le manioc

L'attaque de ces organismes se solde par une perte de vigueur de la plante et une baisse de production comprise entre 17 % et 50 %. Certaines pertes de rendement sont évaluées à 87% (Coyne, 1994). On obtient également des boutures de qualité inférieure en raison des tiges minces qui poussent après une attaque de nématodes. Il y'a relativement peu de travaux sur les dégâts des nématodes sur la productivité du manioc (Coyne, 1994). La croissance racinaire des plants infectés est arrêtée par une véritable dévitalisation de l'extrémité de leurs racines. Les réactions des cultivars de manioc vis-à-vis des nématodes est fonction des génotypes (Coyne, 1994). Avec une extension de la monoculture à grande échelle, là où la pression pour l'utilisation des terres a augmenté, les nématodes pourraient constituer une menace de plus en plus grande pour la production du manioc. Du fait des restrictions d'emploi des nématicides chimiques, le problème se révèle de plus en plus préoccupant même dans les exploitations menées en conventionnel et peut devenir dramatique dans les années à venir. On note ainsi un regain d'intérêt de la profession pour la recherche de méthodes écologiques alternatives.

CHAPITRE 2 : INGENIERIE ECOLOGIQUE ET AGRICULTURE DURABLE

2.1. Généralités

Depuis un siècle environ, l'intensification de la production agricole s'est traduite par une forte diminution de la diversité végétale dans les parcelles cultivées des pays développés. L'agriculture intensive se caractérise par la mise en place de cultures pures, une utilisation importante des intrants chimiques (engrais, pesticides) et une mécanisation poussée (Cook et Weller, 2004). En effet, le principe de cultures pures sur des grandes superficies a rendu nécessaire l'emploi de pesticides afin de protéger les cultures contre les insectes et champignons phytopathogènes, mais aussi pour lutter contre la végétation compétitrice dont la vitesse de croissance est souvent supérieure à celle des plantes cultivées. Le succès de cette stratégie de spécialisation des parcelles est incontestable en termes de productivité. La contrepartie est une artificialisation toujours croissante des parcelles cultivées, qui nécessitent de plus en plus d'intrants pour assurer des conditions de croissance optimales à des peuplements monospécifiques. Les conséquences environnementales sont de plus en plus inquiétantes et décriés. Après un siècle de progrès remarquables et continus en productivité, les enjeux se sont modifiés : la durabilité des systèmes de production est maintenant une préoccupation majeure, d'autant que les énergies fossiles deviennent inéluctablement plus rares et chères. L'agriculture se trouve aujourd'hui face à la nécessité d'un changement profond pour répondre aux enjeux actuels qu'ils soient environnementaux, climatiques, alimentaires, sociaux ou économiques.

Les démarches durables visent à sortir de la dépendance à la pétrochimie et aux intrants à forte nuisance environnementale (pesticides, engrais, etc.) pour s'orienter vers de nouvelles formes d'énergie, une efficacité économique et le respect des ressources naturelles. L'agriculture durable prend en compte la gestion des paysages, la qualité de l'air, de l'eau et des sols en produisant une alimentation saine. L'agriculture durable invite donc à promouvoir et à pratiquer une agriculture économiquement viable, saine pour l'environnement et socialement équitable (Tilman *et al.*, 2002). L'agriculture durable est une agriculture soutenable car elle répond aux besoins d'aujourd'hui (aliments sains, eau de qualité, emploi et qualité de vie) sans remettre en cause les ressources naturelles pour les générations futures (Cook et Weller, 2004). Dans ce contexte, deux options sont explorées pour améliorer la durabilité des systèmes de culture, que nous pourrions qualifier d'un côté d'ingénierie

génétique, et de l'autre d'ingénierie écologique sur laquelle nous mettrons l'accent dans notre étude.

2.2. Ingénierie génétique pour une agriculture durable

L'ingénierie génétique mise sur de nouvelles percées dans l'amélioration des cultures, notamment par transgénèse (Ortiz, 1998), qui pourrait permettre de réduire la dépendance énergétique de l'agriculture (Huang *et al.*, 2002). Le mécanisme essentiel en serait une diminution des besoins en produits de synthèse, nécessaires notamment à la protection des cultures contre les mauvaises herbes, les maladies et le stress abiotique.

2.3. Ingénierie écologique pour une agriculture durable

L'ingénierie écologique propose de modifier les systèmes de culture pour utiliser des mécanismes naturels peu coûteux en énergie, en s'inspirant des principes de l'écologie (Altieri *et al.*, 2005). Odum (1962) a été l'un des premiers à proposer la notion d'ingénierie écologique, pour désigner une stratégie qu'il définissait comme « une manipulation douce de l'environnement consistant à utiliser de faibles quantités d'énergie pour piloter des systèmes productifs qui utilisent essentiellement des ressources naturelles ». En ce sens elle s'oppose à l'artificialisation des milieux cultivés qui a caractérisé l'agriculture du 20^e siècle. Ces pratiques remettent en cause le dogme de la culture pure, et proposent de cultiver des mélanges d'espèces, ce qui peut prendre de nombreuses formes (cultures associées, agroforesterie, systèmes de culture avec couverture végétale permanente du sol, gestion de mosaïques d'habitats pour maintenir une biodiversité maîtrisée au sein même de l'agrosystème cultivé). Les applications les plus visibles concernent également la protection des cultures (Gurr *et al.*, 2004), que ce soit dans les stratégies de lutte biologique, de lutte intégrée, ou plus récemment l'utilisation de biostimulants et biofertilisants. Mais d'autres résultats récents montrent que la productivité même des systèmes de culture pourrait être améliorée par certaines pratiques inspirées de l'écologie des systèmes naturels comme la stimulation de la symbiose mycorhizienne. Certains auteurs préconisent d'utiliser les techniques inspirées par l'ingénierie écologique surtout pour l'agriculture tropicale de subsistance qui ne peuvent faire appel aux produits de synthèse (Altieri, 2002).

En Afrique où l'on rencontre la majorité des producteurs les plus pauvres, les engrais peuvent coûter six fois plus qu'en Europe ou en Amérique (Sanchez, 2002). Concernant les pesticides, ces produits chimiques dangereux et polluants, sont progressivement mis à l'index dans certains pays comme les herbicides à base de glyphosate (Kremer, 2009 ; Pilling et Jepson,

2006), les nématicides et autres alors que les solutions de remplacement n'existent pas encore. Ils sont tout aussi inaccessibles pour les paysans. Devant cette situation, les recherches en ingénierie écologique connaissent un regain d'intérêt et sont actuellement développées à l'échelle mondiale. Nous pouvons citer le recours aux champignons prédateurs qui piègent et capturent les nématodes, les hyperparasites des insectes ravageurs, les champignons ovicides, les bactéries antagonistes, les toxines produites par les microorganismes et les plantes et enfin les endomycorhizes. Ces derniers interviendraient dans la biofertilisation des plantes et agiraient comme agents de biocontrôle contre certains agents pathogènes dont les nématodes. Aujourd'hui, face aux défis de la sécurité alimentaire, la génération de technologies nouvelles permettant d'assurer une production durable s'avère nécessaire. L'agriculture conventionnelle doit s'orienter vers des systèmes de cultures plus durables à faibles intrants. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) intervenant dans la symbiose mycorhizienne apparaissent comme des organismes telluriques importants à prendre en compte pour la formulation de biofertilisants, des biostimulants et agents de biocontrôle.

CHAPITRE 3 : SYMBIOSE MYCORHIZIENNE

3.1. Généralités sur la symbiose mycorhizienne

La majorité des plantes supérieures terrestres vivent en étroite symbiose avec les champignons. Il s'agit d'un phénomène fondamental et universel qui s'élabore au niveau du système racinaire des plantes vasculaires et des bryophytes. Les organes résultant de cette association sont appelés mycorhizes. D'origine gréco-latine, le terme mycorhize (« mukês » pour champignon et « rhiza » pour racine) décrit de nombreuses et diverses associations racine-champignon. Actuellement, on définit donc les mycorhizes comme étant des associations symbiotiques contractées par les racines des végétaux avec certains champignons du sol. On les trouve dans de nombreux environnements et leur succès écologique reflète une forte diversité des capacités génétiques et physiologiques des champignons endophytes (Bonfante et Anca, 2009). Environ 6000 espèces ont été enregistrées comme mycorhiziennes. Les symbioses mycorhiziennes (353 - 462 Millions d'années) ont joué un rôle crucial dans l'évolution des plantes terrestres, bien que quelques groupes Chenopodiaceae, Caryophyllaceae, Brassicaceae, Urticaceae, Cyperaceae, Juncaceae, et Amaranthaceae se soient affranchis tardivement de toute relation avec des champignons symbiotiques (Selosse et Le Tacon, 1998 ; Cardoso et Kuyper, 2006). L'association racine-champignon est basée sur des profits réciproques et des échanges bilatéraux d'éléments nécessaires au bon développement des deux partenaires. Les symbioses mycorhiziennes jouent un rôle essentiel dans l'absorption des nutriments dans les écosystèmes terrestres. En effet, les champignons, grâce à leur structure mycélienne, fournissent des éléments minéraux et de l'eau à la plante, en échange de squelettes carbonés issus de la photosynthèse. Les différents types de mycorhizes (Figure 3) existant se distinguent à la fois par les groupes taxonomiques, des partenaires symbiotiques impliqués et par les structures typiques formées par la symbiose. Ainsi, les structures générées par l'association mycorhizienne peuvent être classées sur la base de critères écologiques, morphologiques et physiologiques. On distingue plusieurs types de mycorhizes : les endomycorhizes, les ectomycorhizes, et les ectendomycorhizes, ainsi que les mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes et orchidoïdes.

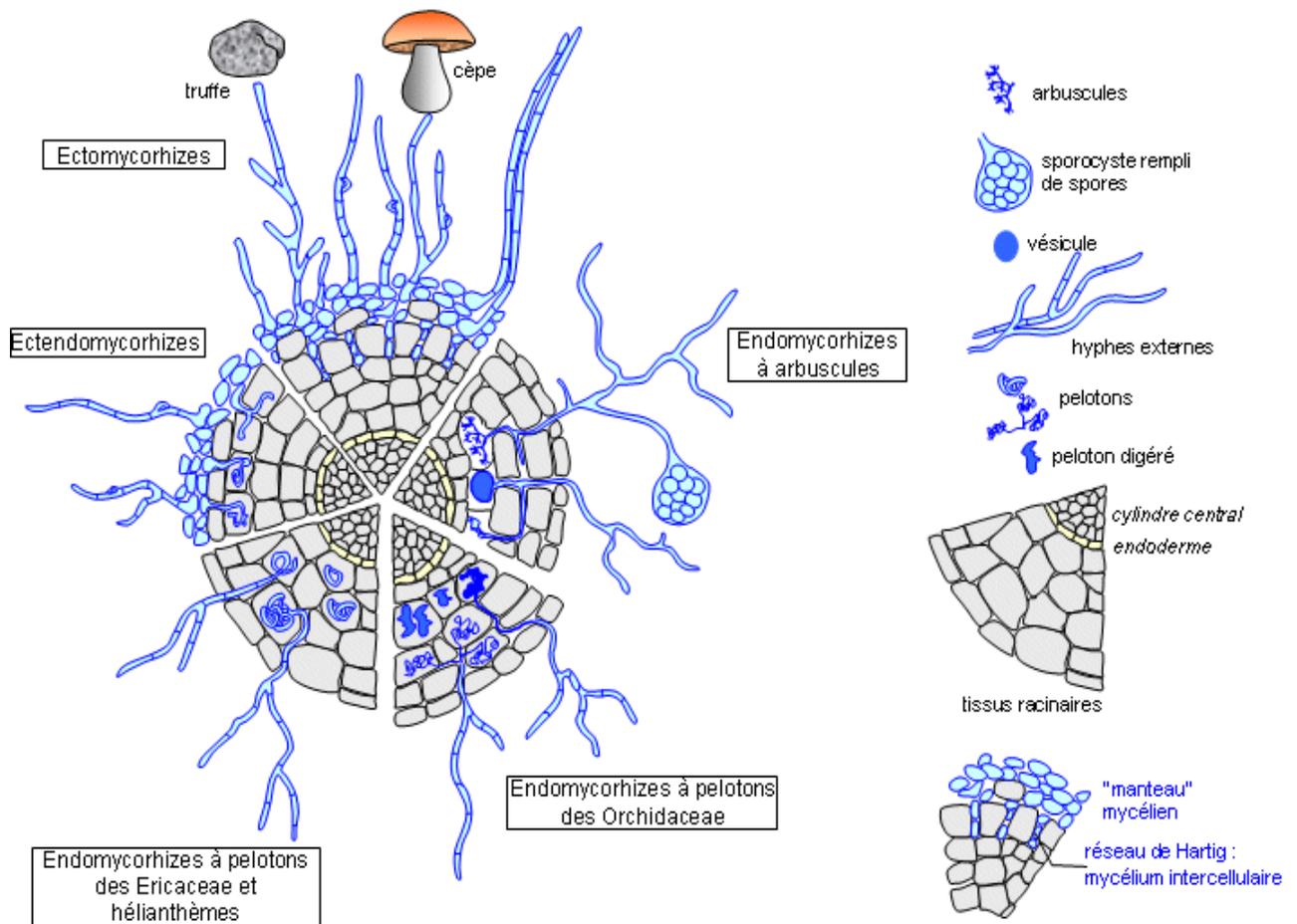


Figure 3. Différents types d'associations mycorhiziennes (Sélosse et Le Tacon, 1998)

Dans la partie qui suit, nous nous intéresserons particulièrement aux endomycorhizes arbusculaires ou aux champignons endomycorhiziens à arbuscules et/ou vésicules constituant le type de mycorhizes le plus ancien.

3.2. Endomycorhizes ou champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) qui constituent l'objet de notre étude sont le type de mycorhizes le plus répandu et le plus ancien, qui auraient coévolué avec les plantes terrestres depuis au moins 460 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000). À ce jour, on dénombre environ 240 espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules distribuées dans quatre ordres, 11 familles et 25 genres, capables de former ce type de mycorhizes (Redecker *et al.*, 2013). Ils appartiennent tous aux glomérormycètes (anciennement appelées Glomales). Ce sont des mycosymbiotes obligatoires dont le cycle biologique dans le sol repose entièrement sur la présence de racines vivantes de la plante hôte. Ce sont des espèces à large spectre d'hôtes. Les glomérormycètes développent un réseau de filaments

mycéliens de type siphonné ou cénotique. À ce jour, aucune forme de reproduction sexuée n'a encore été décrite chez les glomérormycètes. Ils se propagent d'une façon végétative principalement via la formation de grosses spores généralement sphériques (Fortin *et al.*, 2008). Les mycorhizes arbusculaires se caractérisent par l'absence du manteau fongique autour de la racine (Figure 4). Dans les cellules corticales, le champignon développe des arbuscules et dans la plupart des cas, des vésicules. Ces arbuscules permettent d'accroître considérablement la surface de contact entre le champignon et la plante, augmentant de ce fait les échanges de nutriments entre les symbiotes. Ces structures sont développées par tous les CMA. Comme les arbuscules, les vésicules sont localisées à l'intérieur des cellules corticales, mais on les retrouve également intercalées entre celles-ci. De formes variables, elles renferment en abondance des lipides et de nombreux noyaux. Les vésicules qui contiennent des gouttelettes lipidiques constituent des organes de réserve, de reproduction et de survie. Nous utiliserons dans la suite du document le terme champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) pour désigner en général les endomycorhizes.

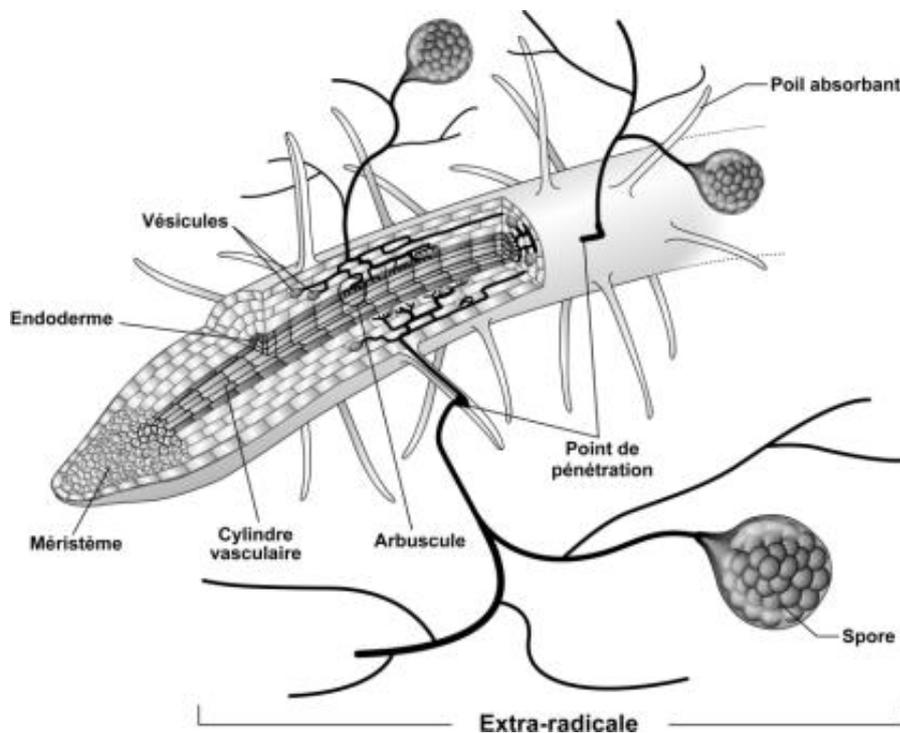


Figure 4. Morphologie des champignons mycorhiziens à arbuscules (Fortin *et al.*, 2008)

3.3. Morphologie et mode de reproduction des CMA

Les CMA sont des organismes plurinucléés qui ont une morphologie rudimentaire quoique peu commune. Ils sont formés d'hyphes coenocytiques qui permettent aux noyaux de bouger

librement dans le mycélium (Bago *et al.*, 1999). La reproduction sexuée n'a jamais été observée et des études confirment que les CMA sont des anciens asexués (Gandolfi *et al.*, 2003). La sexualité des CMA reste encore largement méconnue. Des événements d'anastomoses ont été observés chez les champignons des genres *Glomus*, *Scutellospora* et *Gigaspora* (de la Providencia *et al.*, 2004). Ces anastomoses sont plus fréquentes chez le genre *Glomus* et peuvent se produire entre différentes espèces de *Glomus* issues d'un même isolat, conduisant à des échanges de noyaux et de cytoplasme (Giovannetti *et al.*, 2001). Les anastomoses permettent de maintenir la variabilité génétique des CMA. Une anastomose est la fusion somatique de deux hyphes du même mycélium ou de deux mycélia différents représentant deux individus différents. Les premières études sur les anastomoses des CMA n'ont reporté que des fusions d'hyphes entre des individus du même isolat dans le genre *Glomus* (Giovannetti *et al.*, 2003), mais récemment il a été démontré que des anastomoses et des échanges génétiques étaient possibles entre différents isolats chez *Glomus intraradices* (Croll *et al.*, 2009). Toutefois, aucune anastomose n'a été observée entre deux espèces différentes (Giovannetti *et al.*, 1999), mais on ne peut encore éliminer l'hypothèse selon laquelle un échange de noyaux puisse se faire entre deux espèces différentes (Rodriguez *et al.*, 2004).

Les spores sont des structures unicellulaires, de forme généralement sphérique et de taille variant de 30 à 800 μm de diamètre (Alexandre, 2009). Elles possèdent une paroi épaisse formée d'une ou de plusieurs couches de différentes textures, reliées au réseau filamenteux par un hyphe suspenseur de morphologie variée. Ces caractères peuvent être influencés par différents facteurs comme le degré de maturité de la spore et les conditions du milieu. Les spores sont produites par les CMA pour assurer leur descendance au moyen de la reproduction asexuée. Les spores sont de forme glomoïde (sphérique) ou acaulosporoïde (forme ovale, allongée), mais certaines espèces comme l'espèce *Archaeospora leptoticha* sont dimorphiques et possèdent donc les deux types de spore (Redecker et Raab, 2006) et les espèces du genre *Ambispora* spp. (INVAM, 2016). La paroi de la spore est chitineuse et la forme, la couleur et la taille varient en fonction des espèces. Chez les CMA, le nombre de noyaux par spore varie selon les espèces, il est d'environ 800 chez *Scutellospora castanea* (Hosny *et al.*, 1999) et jusqu'à 35 000 chez *Gigaspora decipiens* (Viera et Glenn, 1990).

3.4. Cycle de développement des CMA

Les CMA sont des individus asexués qui réalisent leur cycle de vie dans le sol. Des spores sont observées dans le sol et dans les racines. Elles servent d'organes de réserve et de propagation. Les CMA sont des biotrophes obligatoires, ils ont besoin d'un partenaire végétal pour subvenir à leur nutrition et accomplir leur cycle de développement. La seule phase dans leur cycle de vie où le champignon ne dépend pas de la plante hôte est celle de la germination des spores (Bago *et al.*, 2000), car elles utilisent leurs réserves en carbone accumulées lors de leur développement. Durant cette phase de germination qui peut durer jusqu'à 3 à 4 semaines, les hyphes arrivent à proximité d'une racine et changent de morphologie par une ramification prononcée, stimulées par des exsudats racinaires (Harrison, 2005). Le passage à l'étape pré-symbiotique se fait par la reconnaissance de molécules exsudées par les racines de la plante hôte. La croissance et la ramification des hyphes germinatifs sont alors fortement stimulées (Bécard *et al.*, 2004). Grâce à ce phénomène très précoce, la probabilité de contact entre le champignon et les racines augmente. Le champignon émet également des molécules non encore caractérisées, les facteurs Myc, qui permettent à la plante de le reconnaître comme un possible symbionte. Une fois en contact avec la racine, les hyphes forment des appressoria qui pénétreront les racines par pression mécanique. Le champignon colonise la racine et forme des hyphes dans les espaces intercellulaires du cortex racinaire. Le champignon colonise les cellules corticales de la racine sans toutefois pénétrer la membrane plasmique pour former l'organe d'échange de la symbiose : l'arbuscule. C'est à partir de cette structure que se font les échanges entre la plante et le champignon (Harrison, 2005). Le champignon produit des spores à partir de son mycélium extraracinaire, après différenciation des structures intraracinaires. Cela se fait seulement après que le champignon ait réalisé un certain seuil de biomasse mycorhizienne. En général, c'est au bout d'un à trois mois qu'on peut avoir une sporulation (INVAM, 2009). Le temps de sporulation dépend aussi de l'espèce de champignon et de la plante hôte, les spores arrivent à maturité de manière asynchrone dans le sol (Manga *et al.*, 2007). Les nouvelles spores, hyphes, etc. produites peuvent infecter d'autres racines et le cycle reprend (Figure 5).

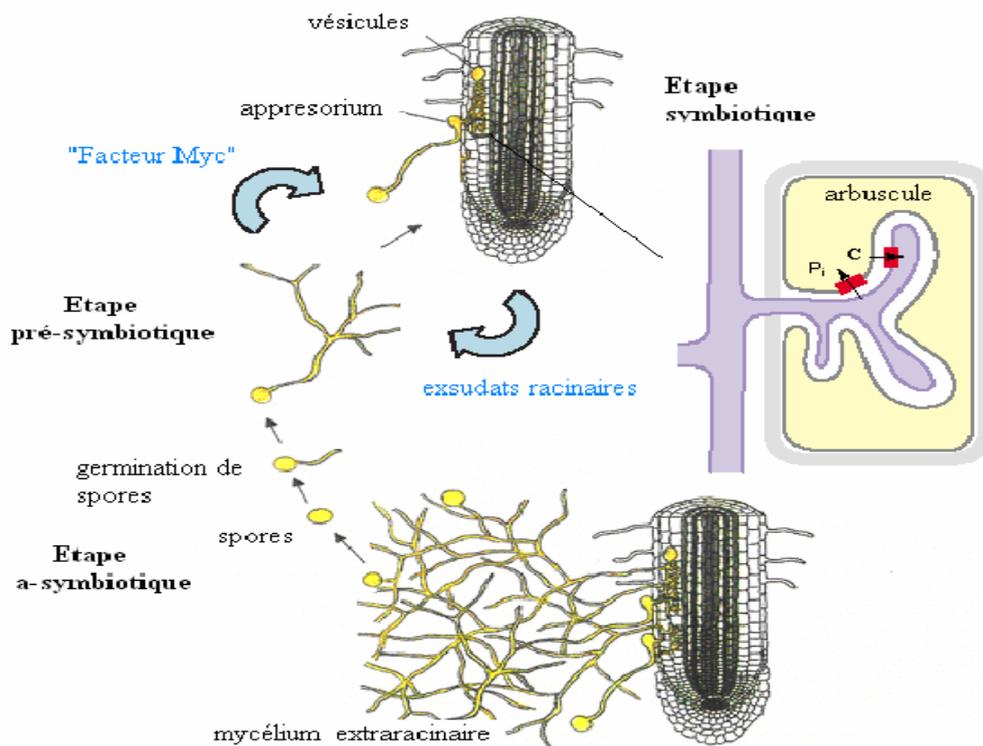


Figure 5. Cycle de développement des champignons mycorhiziens (Modifié de Balestrini et Lanfranco, 2006)

Un même champignon peut coloniser de nombreuses espèces végétales inversement une plante peut être colonisée par plusieurs espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules. Il existe cependant des associations préférentielles, ce phénomène étant sans doute plus important dans la nature. Ces préférences pourraient être liées entre autres, au contenu des exsudats racinaires de différentes espèces végétales ou aux modes de colonisation différents des champignons (Smith et Read, 2008).

3.5. Systématique traditionnelle des CMA

La taxonomie des champignons mycorhiziens à arbuscules a d'abord été construite par morphotypage des spores, en tenant compte à la fois des similitudes structurales entre les spores mais aussi des caractères ayant une importance phylogénétique (Morton et Benny, 1990 ; Schenck et Pérez, 1990). Cette systématique dite « traditionnelle » est basée sur l'hypothèse que les spores à morphologie similaire sont apparentées phylogénétiquement. Elle a d'abord conduit à classer les CMA dans l'ordre paraphylétique des Glomales (Morton et Benny, 1990), qui se subdivise en deux sous-ordres (Glomineae et Gigasporineae), trois familles et six genres, et qui les sépare des Endogonales non mycorhiziens. En 1990, toujours sur la base des études morphologiques, les

champignons mycorhiziens à arbuscules ont été organisés en trois familles (*Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae*, et *Glomeraceae*) et six genres (*Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* et *Scutellospora*) avec en ordre les Glomerales (Morton et Benny, 1990) du phylum des Zygomycètes. Environ 200 espèces de CMA ont été décrites par morphotypage (Walker et Trappe, 1993). Ce n'est que récemment que Schüßler *et al.* (2001) ont proposé de placer les champignons mycorhiziens à arbuscules dans le phylum Glomeromycota. Le peu de variations morphologiques entre les spores rend cependant difficile l'identification des espèces (Redecker et Raab, 2006). Il faut aussi ajouter l'habilité des espèces à former des spores dimorphiques, la description ambiguë ou incomplète des espèces et un possible changement spontané des caractéristiques des spores (Morton et Msiska, 2010b). L'identification et la quantification des CMA sont aussi difficiles car ils n'ont pas de stade sexuel connu et ne sont pas cultivables en l'absence d'hôte (Edwards *et al.*, 1997). Il résulte de ces contraintes que la systématique traditionnelle des Glomales sensu Morton et Benny (1990) est jugée « artificielle » et doit être revue (Schüßler *et al.*, 2001a). Par ailleurs, le comptage des spores et leur identification ne reflètent pas suffisamment la structure des communautés réellement actives dans les racines. En effet, la production de spores n'est pas toujours corrélée avec la colonisation des racines (Merryweather et Fitter, 1998) car la sporulation de certains membres des Glomeromycota est assez discontinue voire absente (Schüßler *et al.*, 2001a). De nos jours, la méthode de plus en plus utilisée, mais coûteuse pour identifier les genres et /ou espèces de CMA est la biologie moléculaire, en particulier l'amplification et le séquençage de différentes régions de l'ADN nucléaire ribosomique suivie de l'étude des relations phylogénétiques (Krüger *et al.*, 2009 ; Krüger *et al.*, 2012).

3.6. Emergence de la taxonomie moléculaire dans l'étude de la diversité

3.6.1. ADN nucléaire ribosomique (ADNr)

Les gènes ribosomiaux (Figure 6) sont des copies multiples des gènes organisés en tandem dans le génome. Chaque gène ribosomal codant pour trois sous-unités (18S (SSU), 5.8 S et 28S (LSU)) séparées l'une de l'autre par une région non transcrite. Les gènes se sont séparés les uns des autres par un espacement intergénique (IGS).

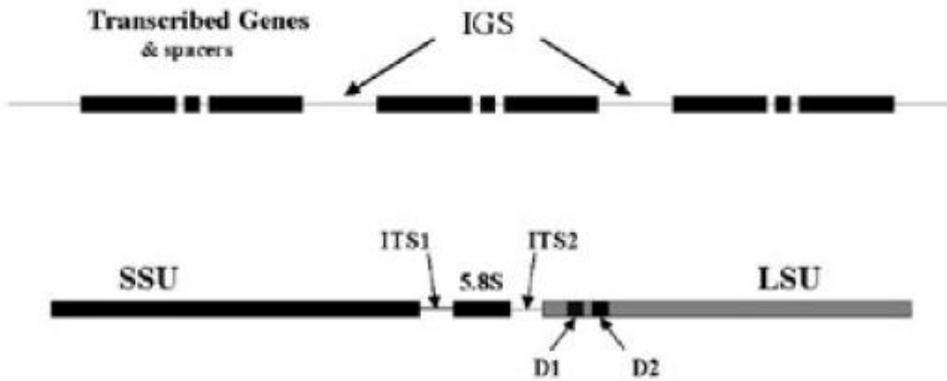


Figure 6. Gène ribosomal et les trois sous-unités 18 (SSU), 5.8 S et 28 S (LSU) (Van Tuinen *et al.*, 1998)

Les caractéristiques diverses des ARNr et ADNr ont fait d'eux une cible de choix pour des études taxonomiques et phylogénétiques. Des études comparatives des séquences nucléotidiques des gènes ribosomiques ont fourni des données pour l'analyse des relations phylogénétiques et taxonomiques sur un large éventail d'organismes. Le polymorphisme nucléotidique n'est pas uniformément réparti tout au long du ribosome. ITS et IGS sont des régions variables qui mutent plus fréquemment que les trois régions conservées des sous-unités de codage (18S, 5.8S, 25S). L'ITS (*Internal Transcribed Spacer*) est une portion d'ADN nucléaire située entre les séquences des gènes codant les unités 18S, 5.8S et 28S de l'ARNr ; leur séquence est variable au niveau interspécifique et très conservée au niveau intraspécifique, c'est pourquoi l'ITS est utilisé comme « code-barres » d'identification moléculaire des espèces fongiques. La région ITS comme la région IGS, a évolué beaucoup plus vite et les différences de séquences entre les différentes populations d'espèces, ou dans une seule spore dans le cas de Gloméromycètes, peuvent être détectées. L'extrémité 5' de la sous-unité ribosomique LSU abrite deux grands domaines d'information polymorphes (D1 et D2). Le polymorphisme observé dans ces domaines et entre le taxon, permettent également d'identifier des séquences nucléotidiques qui peuvent être utilisés pour concevoir des amorces avec différents niveaux de spécificité ou de discrimination pour l'identification moléculaire des espèces de CMA (van Tuinen *et al.*, 1998a). L'ADN peut être extrait à partir d'une spore (Schwarzott et Schüßler, 2001), d'un échantillon racinaire (Edwards *et al.*, 1997) ou de sol (Farmer *et al.*, 2007). La majorité de l'ADN extrait du sol provient de divers microorganismes, les amorces employées doivent donc être très spécifiques des Gloméromycètes.

3.6.2. Amorces universelles et amorces spécifiques aux CMA

Les séquences de l'ADN nucléaire qui codent les ARNr sont suffisamment bien conservées. Elles sont présentes en multiples copies et sont polymorphes d'une espèce à l'autre. Elles sont donc utilisables pour obtenir des phylogénies de bonne résolution (Simon *et al.*, 1992). La séquence qui code l'ARNr 18S de la petite sous-unité 40S du ribosome (SSU) des champignons, peut être amplifiée à l'aide des amorces spécifiques aux Glomeromycota VANS1 (Simon *et al.*, 1992), AM1 (Helgason *et al.*, 1998). La sous-unité LSU de l'ADNr spécifique aux glomérormycètes peut être amplifiée avec les amorces FLR3 et FLR4 (Gollote *et al.*, 2004). Des amorces spécifiques des CMA (SSUmAf-LSUmAr/SSUmCf-LSUmBr) de 1,5 kb ont été élaborées par Krüger *et al.* (2009). Les régions ciblées ITS2, LSU-D1 et LSU-D2 de 400 pb chacune ont été testées, mais individuellement n'étaient pas assez robustes pour une résolution au niveau des espèces pour les espèces *Rhizophagus* étroitement liées. L'utilisation par contre du fragment de 1,5 kb de Krüger *et al.* (2009) comme épine dorsale phylogénétique, permet la reconnaissance des espèces pour des régions ciblées courtes. Des amorces ont été développées spécifiquement pour une espèce de champignon mycorrhizien donnée (Zézé *et al.*, 1996; van Tuinen *et al.*, 1998) ou pour une famille donnée (Simon *et al.*, 1993).

L'étude de la variabilité génétique et des relations phylogéniques des champignons mycorrhiziens associés à une plante ou d'un sol donné peut se faire avec une PCR de la grande sous-unité à l'aide d'amorces universelles et spécifiques. Dans le cas de cette étude, une première amplification est effectuée à l'aide des amorces eukaryotes universelles LR1 et NDL22, flanquant les domaines D1 et D2 de la grande sous-unité ribosomale (van Tuinen *et al.*, 1998). Le produit d'amplification obtenu est utilisé comme ADN matrice pour une seconde amplification en combinant l'amorce eukaryote spécifique LR1 à FLR4 (Gollote *et al.*, 2004) qui est une amorce spécifique aux champignons endomycorhizogènes que l'on utilise aussi pour l'ADN du sol. La combinaison d'amorces LR1/FLR2 (Trouvelot *et al.*, 1999) est utilisée pour le cas des racines.

3.6.3. Taxonomie moléculaire dans l'étude de la diversité des CMA

L'étude de la diversité des communautés et des populations de CMA, tout comme celle de la taxonomie et de la phylogénie de ce phylum a évolué passant du comptage de spores dans le sol et de leur identification par des critères morphologiques à l'établissement d'autres méthodes et en particulier à l'élaboration de méthodes moléculaires basées sur l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) d'extrait d'ADNr.

Les outils de biologie moléculaire seront les plus employés, notamment parce que les gènes ne sont pas affectés par des changements de caractères durant l'ontogénèse ou la différenciation des organes des champignons (Redecker *et al.*, 1997). Selon la nature du marqueur génétique choisi, la PCR peut être simple, à savoir une seule paire d'amorce, ou nichée (=PCR gigogne) par l'emploi de deux PCR successives nécessitant chacune un couple d'amorces dont la seconde paire est souvent plus spécifique que la première. Cette dernière est souvent utilisée lorsque le marqueur ciblé est en simple copie dans le génome ou lorsque l'ADN est en faible quantité. Les produits PCR sont le plus souvent séquencés par la méthode de Sanger qui nécessite, dans la plupart des cas, un clonage préalable des produits PCR puisque plusieurs espèces, populations et isolats y sont présents. Le clonage (Figure 7) permet l'insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur permettant ainsi d'en obtenir plusieurs copies. On en dispose ainsi en grandes quantités pour des PCR et de séquençage.

Cette méthode a été utilisée dans les analyses de populations intraspécifiques de CMA mais plus largement dans les analyses de communautés de CMA notamment car elle permet l'obtention de séquences allant jusqu'à 1000 bp en un seul séquençage. Mais cette méthode de séquençage est coûteuse dans le cas de nombreux échantillons, par exemple lors de l'analyse de communautés. Afin d'éviter un séquençage systématique des produits PCR obtenus, plusieurs méthodes de hautes résolutions, appelées empreintes moléculaires, ont été développées. Ainsi, l'électrophorèse sur gel avec gradient dénaturant (DGGE) (Hassan *et al.*, 2011), l'électrophorèse sur gel à gradient de température (TGGE) (Cornejo *et al.*, 2004), le polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) (Sanchez-Castro *et al.*, 2012), le polymorphisme de longueur du fragment de restriction terminal (T-RFLP) (Lekberg *et al.*, 2007; Watanarajanaporn *et al.*, 2013) ou l'analyse du polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (RFLP) (Appoloni *et al.*, 2008) ont été utilisés dans les analyses des communautés ou des populations de CMA. Puis l'automatisation du séquençage a abouti au développement de la méthode de séquençage haut-débit appelé Séquençages Nouvelles Générations (NGS). Les séquences obtenues lors de l'étude sont alors regroupées par homologie de séquences formant des Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs). L'homologie entre séquences est déterminée par le marqueur utilisé durant l'étude et son pouvoir de résolution spécifique qui est généralement de l'ordre de 97-99 %. Une séquence est utilisée comme étant représentative de chaque OTU. Cette séquence représentative, souvent consensus, est assignée phylogénétiquement, par homologie, à une base de données de séquences de référence pour lesquelles l'espèce et l'isolat sont connus. La position de l'OTU dans l'arbre alors créé permet de déterminer l'espèce de CMA, voire l'isolat, à laquelle

appartient cet OTU. Il n'est pas rare que des OTUs n'aient pas d'identité spécifique précise. En effet, les bases de données contiennent de nombreuses séquences environnementales qui ne correspondent pas aux espèces décrites car les CMA, rappelons-le, ne sont pas aisées à cultiver seuls.

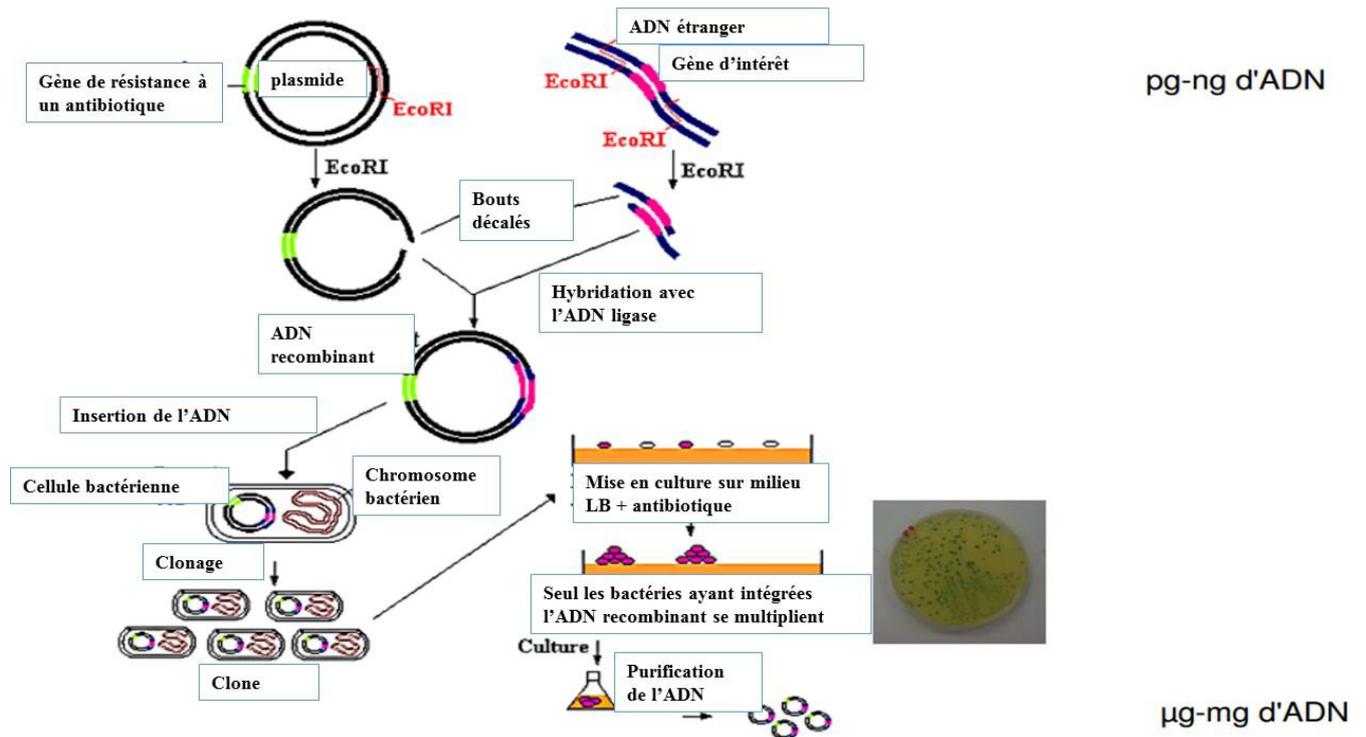


Figure 7. Clonage et construction d'une banque d'ADN (The national health museum, copyright, 1999-2009)

3.6.4. Technologie de Séquençages Nouvelles Générations (NGS)

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un Fragment d'ADN donné. Deux méthodes ont été développées dans les années 70, l'une par l'équipe de Walter Gilbert, aux États-Unis, et l'autre par celle de Frederick Sanger, au Royaume-Uni.

L'approche de Sanger 1977, est une méthode par synthèse enzymatique qui consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléase en présence d'un mélange des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et une faible concentration de quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) chacun associé à un

marqueur fluorescent différent. Une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ces didésoxynucléotides empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes, qui se terminent à toutes les positions dans la séquence. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur un gel de polyacrylamide ce qui permet ainsi de lire la suite de chacune des bases dans la séquence. Une dernière étape de traitement bioinformatique permet alors la reconstruction d'un génome entier à partir de tous les fragments séquencés. La méthode Sanger a été automatisée par capillaire, elle est devenue la méthode dominante durant plus de deux décennies pour les projets de séquençage de génome (Hutchison, 2007) et a conduit à un certain nombre d'accomplissements de grande ampleur, tels que le séquençage du génome humain en 2000 (Lander *et al.*, 2001) et du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Cependant, la méthode Sanger reste lourde en termes de temps et de coût, et nécessite des investissements importants en termes d'infrastructures.

Les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) permettent à des millions de réactions de séquençage d'avoir lieu en même temps dans de petits volumes de réaction. De plus, elles ne nécessitent pas de clonage de l'ADN dans une banque de plasmides, ce qui, en plus d'économiser du temps de travail, a l'avantage d'éviter les biais de clonage. Ces séquenceurs de « nouvelle » génération ont permis de s'affranchir d'un certain nombre de biais de la méthode Sanger comme la nécessité de cloner l'ADN à séquencer. Toutefois, ces méthodes produisent des lectures de séquence plus courtes que celles générées par le séquençage Sanger par capillaire (650 à 1000pb), ainsi que des taux d'erreurs plus élevés. Actuellement, les trois plateformes de séquençage NGS les plus populaires sont 454, Illumina/Solexa et SOLID. Elles sont généralement divisées en deux catégories : les plateformes produisant de larges quantités de lectures courtes (Illumina/Solexa et SOLID) et les plateformes produisant des lectures plus longues en moindre quantité (454). Il est à noter que chacune de ces plateformes est en constante évolution, ce qui entraîne une augmentation du débit, de la longueur et de la qualité des lectures de séquences.

3.7. Taxonomie actuelle et études de diversité des CMA

Au départ, les CMA étaient classés dans le phylum des Zygomycètes (Morton et Redecker, 2001). Puis, des analyses moléculaires utilisant des gènes ribosomaux ont démontré que les CMA seraient plutôt le groupe frère des Basidiomycètes et des Ascomycètes, déplaçant ainsi les CMA dans un nouveau phylum monophylétique, les Glomeromycota (Schüssler *et al.*,

2001). En février 2013, des chercheurs proposèrent un consensus (Redecker *et al.*, 2013) (Tableau 3).

Environ 240 espèces ont été décrites à l'échelle mondiale. Leur présence et la diversité des communautés dépendent principalement de la nature du sol et du mode d'exploitation. C'est pourquoi ils représentent de bons bioindicateurs des sols agricoles (Oehl *et al.*, 2011a). Favoriser des communautés spécifiques de champignons mycorhiziens pourrait représenter une contribution importante en vue d'un système cultural garantissant une absorption efficace de l'eau et des nutriments (Köhl *et al.*, 2014).

Tableau 3. Classification des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) selon Redecker *et al.* (2013)

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre			
Glomeromycota	Glomeromycètes	Diversisporales	Diversisporaceae	<i>Tricispora</i> <i>Otospora</i> <i>Diversispora</i> <i>Corymbiglomus</i> <i>Redeckera</i>			
			Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>			
			Sacculosporaceae	<i>Sacculospora</i>			
			Pascisporaceae	<i>Pascispora</i>			
			Gigasporaceae	<i>Scutellospora</i> <i>Gigaspora</i> <i>Intraornatospora</i> <i>Paradentiscutata</i> <i>Dentiscutata</i> <i>Cetraspora</i> <i>Racocetra</i>			
				Glomerales	Claroïdeoglomeraceae	<i>Claroïdeoglomus</i>	
					Glomeraceae	<i>Glomus</i> <i>Funneliformis</i> <i>Septoglomus</i> <i>Rhizophagus</i> <i>Sclerocystis</i>	
				Archaeosporomycètes	Archaeosporales	Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>
						Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
						Archeosporaceae	<i>Archeospora</i>
			Paraglomeromycètes	Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>	

CHAPITRE 4 : COMPOSANTES ET MESURES DE LA DIVERSITE DANS LES COMMUNAUTES

4.1. Composantes de la diversité

On distingue plusieurs composantes permettant de décrire la diversité en espèces d'une communauté : la richesse spécifique, l'équitabilité, la régularité et la divergence.

- La richesse spécifique est le nombre de classes (espèce, genre, famille, ordre) présentes dans le système étudié. Cette définition assume deux hypothèses : les classes sont bien définies et elles sont équidistantes (c'est-à-dire que la richesse augmente d'une unité lorsqu'on rajoute une espèce, que cette espèce soit proche ou distante des autres). L'indice de richesse le plus utilisé et le plus simple est le nombre d'espèces S .

- L'équitabilité représente la régularité de la distribution des espèces. Elle tient compte du fait qu'une espèce représentée abondamment ou par un seul individu n'apporte pas la même contribution à l'écosystème. Par exemple, en considérant que le nombre total d'individus dans une communauté est limité, si une espèce est dominante, elle entraînera, mathématiquement, la rareté d'autres espèces. Les indices d'équitabilité les plus couramment utilisés sont les indices de Simpson (Manguran, 2004) et de Shannon-Wiener (Manguran, 2004). qui évaluent à la fois la richesse et l'équitabilité.

- La régularité et la divergence tiennent compte du fait que deux espèces du même genre sont plus proches que deux espèces de familles différentes. Cette notion est implémentée dans les mesures de diversité phylogénétique et de diversité fonctionnelle. Les mesures de divergences sont construites à partir de la dissimilarité entre classes avec ou sans pondération par la fréquence. Les mesures de régularité décrivent quant à elles la façon dont les espèces occupent l'espace des niches (régularité fonctionnelle). Ce concept complète celui d'équitabilité dans les mesures classiques de diversité : la diversité augmente avec la richesse, l'équitabilité et la régularité.

4.2. Niveaux de la diversité

La diversité peut être décrite à plusieurs niveaux, on parle de diversité α , β et γ (Whittaker, 1960) (Figure 8).

La diversité α représente la diversité locale qui va être mesurée à l'intérieur d'un habitat uniforme et de taille fixe.

La diversité β consiste à comparer la diversité des espèces entre habitats ou écosystèmes ou le long de gradients environnementaux. Cet indice donne une indication de la variation en composition d'espèces dans l'ensemble des habitats ou parmi des communautés.

La diversité γ mesure la diversité sur la totalité du système étudié, c'est-à-dire sur la totalité des habitats pris en compte. Sa mesure s'effectue donc de la même manière que celle de la diversité α (c'est-à-dire via les mêmes indices de diversité). La diversité α sera donc plutôt définie au niveau de la communauté, alors que la diversité γ sera définie au niveau de la méta-communauté.

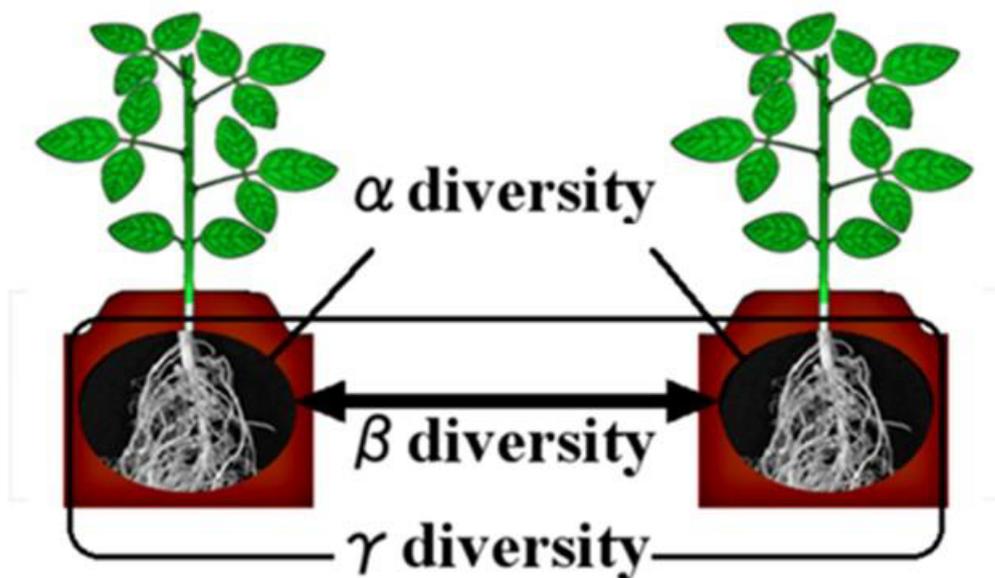


Figure 8. Représentation schématique de la diversité alpha, beta et gamma (Saheki et Shiro, 2014)

Les estimateurs de la diversité (alpha) à l'intérieur de la communauté ont été proposés et affinés pendant des décennies (Magurran, 2004). Pour l'étude de diversité sur la symbiose mycorhizienne associée à la culture du manioc, trois mesures de la diversité alpha sont couramment utilisées: les courbes de raréfaction, les estimateurs de la richesse des espèces (souvent en conjonction avec les courbes de raréfaction) et les indices de diversité communautaire.

4.3. Indices de diversité des communautés

Il existe un large panel d'indices permettant de décrire la diversité, ici nous ne traiterons que de ceux utilisés le plus fréquemment.

4.3.1. Mesure de la diversité α et γ

4.3.1.1. Chao 1

Les estimateurs de la richesse spécifique déterminent le nombre total d'espèces présentes dans une communauté. L'indice de Chao 1 est couramment utilisé, et est basé sur le nombre de classes rares (c'est-à-dire OTU) trouvées dans un échantillon (Manguran, 2004).

$$S_{est} = S_{obs} + \left(\frac{([f_1])^2}{2f_2} \right)$$

Où S_{est} est le nombre estimé d'espèces, S_{obs} est le nombre observé d'espèces, f_1 est le nombre de taxons singleton (taxons représentés par une seule lecture dans cette communauté) et f_2 est le nombre de taxons doubleton. Si un échantillon contient de nombreux singletons, il est probable que des OTUs non détectés existent, et l'indice Chao 1 estimera une plus grande richesse en espèces que pour un échantillon sans OTU rares. Le logiciel Qiime permet de calculer l'indice Chao1.

4.3.1.2. Indice de Simpson

Cet indice mesure la probabilité que deux individus sélectionnés n'appartiennent pas à la même espèce. Il tient compte de l'abondance et de la richesse en espèces de la communauté. L'indice de Simpson (Manguran, 2004) est sensible aux variations d'importance des espèces les plus abondantes.

$$D = 1 - \sum_i^s P_i^2$$

S est le nombre total d'espèces dans la communauté, c'est-à-dire la richesse spécifique, P_i est la proportion d'individus de chaque espèce i au sein de l'échantillon. L'indice de Simpson dépend donc de la richesse spécifique et de l'équitabilité. L'indice varie entre 0 quand l'échantillon est constitué d'une seule espèce et tend vers 1 avec l'augmentation du nombre d'espèces. Parce que c'est contre-intuitif, l'indice réciproque de Simpson ($1/D$) est utilisé. Pour ce cas, plus le nombre est élevé, plus la diversité est importante.

4.3.1.3. Indice de Shannon-Wiener

Tout comme l'indice de Simpson, l'indice de Shannon-Wiener (Manguran, 2004) exprime la diversité d'une communauté en tenant compte de l'abondance et de la richesse en espèces. A la différence de l'indice de Simpson, celui de Shannon donne un « poids » à l'abondance, ainsi, le « poids » des espèces abondantes va être légèrement réduit comparé aux espèces rares.

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

Une communauté présentant une espèce dominante aura un indice H' plus petit qu'une communauté dans laquelle les espèces ont une abondance proche. L'indice varie entre 0 quand la l'échantillon est constitué d'une seule espèce et tend vers lnS lorsque toutes les espèces ont la même abondance.

L'indice de diversité de Shannon H' est souvent accompagné de l'indice d'équitabilité J de Pielou (Manguran, 2004).

4.3.1.4. Indice d'équitabilité J de Pielou (Manguran, 2004).

Il représente le rapport de H à l'indice maximal théorique dans le peuplement (H max). L'indice d'équitabilité permet de mesurer la répartition des individus au sein des espèces, indépendamment de la richesse spécifique. Sa valeur varie de 0 (dominance d'une des espèces) à 1 (équirépartition des individus dans les espèces) :

$$J = \frac{H}{H_{\max}} ; H_{\max} = \text{Log}2S$$

4.3.2. Mesure de la diversité β : indice de Bray-Curtis

La diversité β , c'est-à-dire la comparaison de la diversité des espèces entre écosystèmes, a été calculée à partir des indices de similarité tel que l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis. Les indices de similarité permettent de comparer différents sites entre eux sur la base de leur composition et de l'abondance spécifique. La distance de Bray-Curtis est un indice de dissimilarité utilisé en écologie. Il porte le nom de ses auteurs, J. Roger Bray et John T. Curtis. L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis (Manguran, 2004.) est compris entre 0 (les deux échantillons ont la même composition) à 1 (les échantillons sont totalement dissemblables) (Bloom, 1981). L'équation pour deux échantillons (j et k) comparés est la suivante :

$$BC_{jk} = 1 - \frac{2 \sum_{i=1}^p \min(N_{ij}, N_{ik})}{\sum_{i=1}^p (N_{ij} + N_{ik})}$$

Où N_{ij} est l'abondance d'une espèce i dans l'échantillon j et N_{ik} l'abondance de la même espèce i dans l'échantillon k . Le terme $\min(N_{ij}, N_{ik})$ correspond au minimum obtenu pour deux comptes sur les mêmes échantillons. Les sommes situés au numérateurs et dénominateur sont réalisées sur l'ensemble des espèces présentes dans les échantillons. L'indice de Bray-Curtis peut être utilisé pour déterminer si les communautés sont significativement différentes, pour comparer de nombreuses communautés simultanément en utilisant des techniques de regroupement et d'ordination.

CHAPITRE 5 : RÔLE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES DANS LES AGRO-SYSTEMES

5.1. Amélioration de la croissance et de la nutrition minérale des plantes

L'effet majeur des champignons mycorhiziens dans les écosystèmes non perturbés est l'amélioration de la croissance des plantes mycorhizées par rapport aux plantes non mycorhizées (Karagiannidis et Hadjisavva-Zinoviadi, 1998). L'accroissement de la biomasse végétale est lié à l'apport de nutriments limitants par le champignon. En effet, en explorant un plus vaste volume de sol que les racines, le mycélium des CMA permet de compléter la nutrition de la plante en éléments limitants. Dans certains cas de sols acides ($\text{pH} < 5$), où ce sont des éléments comme le Ca, Mg ou K qui sont déficients, les plantes mycorhizées montrent ainsi des concentrations foliaires en ces éléments supérieures aux plantes non mycorhizées (Clark, 1997). Mais le plus souvent, ce sont les composés azotés et les phosphates qui sont les facteurs limitants pour la croissance de la plante et il a été bien montré, en utilisant des dispositifs à compartiments, que les hyphes extraradiculaires du champignon sont capables de prélever et de transporter ces éléments jusqu'aux racines, en particulier le phosphore (Cui et Caldwell, 1996). Le phosphore est en effet prélevé sous forme d'orthophosphates (phosphate inorganique Pi) par les plantes, or cette forme minérale du phosphore est en quantité limitée dans le sol et, sous l'action du prélèvement racinaire, il se crée rapidement des zones d'appauvrissement autour des racines à cause d'un apport relativement lent en P de la part de la phase solide du sol et de la faible diffusion de P dans le sol. La présence du champignon est donc essentielle pour explorer le sol à la recherche de cet élément peu mobile et fournir à la plante ce dont elle a besoin pour se développer. Pour accéder aux pools de phosphore du sol inaccessibles aux plantes, les CMA seraient capables d'hydrolyser le P organique en P inorganique pour le transférer à la plante hôte (Koide et Kabir, 2000).

Par contre, contrairement aux ectomycorhizes et aux endomycorhizes éricoïdes, trouvées dans des sols à fortes teneurs en matière organique, les mycorhizes à arbuscules n'ont pas de propriétés ligninolytiques permettant de minéraliser les éléments nutritifs dans les sols très organiques, ce qui indique une certaine adaptation des différents types de champignons mycorhiziens à leur habitat (Read et Perez-Moreno, 2003). L'amélioration du prélèvement des éléments limitants est ainsi associée à une augmentation de la biomasse des plantes mycorhizées, néanmoins l'efficacité de cet effet est variable selon les conditions de sol

(teneur en P, C organique, pH, CEC, texture...) mais aussi selon l'association plante-champignon (Monzon et Azcón, 1996).

5.2. Nutrition hydrique et tolérance au stress hydrique

Les champignons endomycorhiziens entraînent une augmentation de la résistance de la plante au manque d'eau (Sylvia *et al.*, 1993). Le mycélium du champignon d'une plante mycorhizée explore un volume de sol beaucoup plus important qu'une plante normale. Les fines hyphes du champignon peuvent aller chercher l'eau à des endroits inaccessibles pour les grosses racines de la plante. Une expérience réalisée sur *Rosa hybrida* L. a montré que les champignons endomycorhiziens *Glomus intraradices* et *Glomus deserticola* permettent un maintien de la turgescence au niveau du feuillage lors de déficits hydriques (Augé, 2001). Plusieurs expériences portant sur un large éventail de plantes, comme le maïs (Sylvia *et al.*, 1993), le blé (Al-Karaki et Al-Raddad, 1997) démontrent que les plantes mycorhizées ont une bien meilleure résistance aux stress hydriques. Les stress osmotiques sont fréquemment rencontrés par les plantes et l'association avec les CMA permet de réduire les symptômes du stress en complément à des mécanismes protecteurs intrinsèques de la plante (Ruiz-Lozano, 2003). La réponse des plantes mycorhizées en condition de sécheresse se traduit par de meilleurs taux de transpiration et de photosynthèse, une conductance stomatique et des teneurs en N et P dans les feuilles plus élevées, traduisant une meilleure croissance que les plantes non mycorhizées (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995). Les mécanismes impliqués dans la protection des plantes mycorhizées face au stress hydrique seraient liés à une meilleure nutrition phosphatée qui améliore la photosynthèse et accroît la biomasse de la plante, mais aussi à un meilleur accès à l'eau du sol et au maintien de l'équilibre hydrique dans la plante (Augé, 2001).

5.3. Aggrégation des sols

Un autre effet des CMA est leur action sur la structure du sol. Les hyphes fongiques ont la propriété d'agir sur la macro-aggrégation des constituants du sol et donc sur la stabilité du sol (Tisdall *et al.*, 1991). La stabilité des sols est très importante dans la lutte contre l'érosion, le maintien des nutriments et de la matière organique. En effet, la lixiviation entraîne une baisse de la productivité en agriculture (Schreiner et Bethlenfalvay, 1995).

L'enchevêtrement des racines fines et du mycélium fongique joue un rôle physique dans la liaison des microaggrégats (diamètre < 250 µm) entre eux pour former des macroaggrégats (>250 µm) stables, la stabilité de ces macro-aggrégats étant corrélée à la longueur d'hyphes

dans le sol (Miller et Jastrow, 1990). La liaison des microagrégats est due à la production en grande quantité de polysaccharides par le mycélium extraradriculaire ; les CMA produisent en effet une glycoprotéine : la glomaline (Wright et Upadhyaya, 1998) qui influence la stabilité du sol et dont la concentration dans les sols dépend de la plante hôte et du champignon associé (Rillig et Steinberg, 2002). Cette protéine fongique a été identifiée comme étant un homologue d'une « heat shock protein » qui est une protéine de réponse au stress (Gadkar et Rillig, 2006). Les conditions de stress seraient en effet un facteur influençant la production de glomaline car celle-ci est produite en plus grande quantité lorsque la croissance du mycélium est limitée (Rillig et Steinberg, 2002). De plus, les hyphes accélèrent l'altération des roches, permettant ainsi d'augmenter la disponibilité en minéraux. La contamination des sols en divers polluants, dont les métaux lourds constituent un autre stress abiotique qui peut être atténué par la symbiose mycorhizienne. Les CMA favorisent en effet la croissance des plantes sur des sols contaminés par les métaux lourds (Leyval, 2005).

5.4. Lutte contre les ravageurs et pathogènes

5.4.1. Généralités

Des études portant sur l'interaction entre les plantes inoculées avec les CMA et les insectes (Wardle *et al.*, 2004) ont montré à la fois des effets positifs et négatifs sur la croissance et le taux de survie des insectes (Bennett et Bever, 2007). Cependant cela est fonction de la plante hôte. Divers effets ont été observés entre les interactions CMA et les champignons pathogènes. Les CMA ont tendance à diminuer les effets nocifs des agents pathogènes fongiques par un impact négatif sur le développement de l'agent pathogène, ce qui conduit à une augmentation des rendements des cultures. Par exemple, la pomme de terre mycorhizée avec *G. etunicatum* et infectée par *Rhizoctonia solani* (*Solanum* spp.) produit plus de poids frais de tubercules que les plantules non-mycorhizées (Borowicz, 2001).

La technique d'endomycorhization a été utilisée pour améliorer la résistance contre les champignons pathogènes tels que *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* sur le bananier (cv maca) (Borges *et al.*, 2007), *Sclerotium cepivorum* sur l'oignon (*Allium* spp.) (Torres-Barragan *et al.*, 1996), *Fusarium* spp. sur le coton (*G. hirsutum*), la tomate (*Solanum lycopersicum* spp.) et le concombre (Zhipeng *et al.*, 2005), *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* sur la tomate (Akköprü et Demir, 2005) et *Pythium ultimum* sur trèfle blanc (*Trifolium repens*) (Carlsen *et al.*, 2008). En outre, l'incidence accrue de l'agent pathogène a été rapportée chez des plantes mycorhizées par rapport aux plants témoins non mycorrhizés. Par exemple, dans des plants de tabac mycorhizés infestés par les feuilles pathogènes *Botrytis*

cinerea, les traitements mycorhiziens ont entraîné une augmentation de la gravité des symptômes de la maladie (lésions nécrotiques) lorsque inoculées avec *G. intraradices* par rapport aux traitements non mycorhiziens (Shaul *et al.*, 1999). Au nombre des pathogènes, il faut aussi noter les bactéries pathogènes. L'interaction entre les CMA et les bactéries pathogènes a été récemment évaluée (Liu *et al.*, 2007). Les auteurs ont montré que, les plants de *Medicago Truncatula* mycorhizés et infestés avec le *campestris Xanthomonas*, avaient une résistance accrue aux bactéries pathogènes par rapport aux traitements non mycorhizés. En ce qui concerne l'interaction avec le virus, un nombre limité d'études ont évalué l'interaction entre les CMA et les virus (Shaul *et al.*, 1999). Les auteurs ont rapporté que les plantes de tabac colonisées par *G. intraradices* et infestées par le virus de la mosaïque du tabac ont montré une incidence plus élevée de la maladie du virus que ceux des plantes non mycorhiziées. Pour les nématodes parasites des plantes en général, ils sont préjudiciables à la croissance des plantes et au rendement contrairement aux CMA. Les nématodes parasites des plantes et les CMA compétissent pour la nourriture et l'espace. Les effets de ces deux organismes sur la croissance des plantes et de leur interaction ont été examinés par de nombreux auteurs (Borowicz, 2001 ; Borowicz, 2006). En générale, les études menées suggèrent que les CMA augmentent la résistance à l'infestation par les nématodes en ralentissant le développement des nématodes. Mais il est maintenant clair que l'effet net des CMA sur les nématodes varie selon les conditions environnementales, le génotype des plantes, des espèces de nématodes et les isolats fongiques. Dans la suite, l'interaction entre les CMA et les nématodes endoparasites sédentaires *Meloidogyne* spp est évoqué.

5.4.2. Lutte contre les nématodes du genre *Meloidogyne* spp.

Les CMA et les nématodes parasites ont le même site d'action : le système racinaire des plantes. Les effets de ces deux organismes sur la croissance des plantes et leurs interactions ont été décrits par de nombreux auteurs (Borowicz, 2001 ; Hol et Cook, 2005 ; Borowicz, 2006). Pour ce qui concerne les nématodes endoparasites sédentaires du genre *Meloidogyne* spp. Les effets négatifs des CMA sur les *Meloidogynes* sont beaucoup évoqués dans plusieurs études sur les interactions CMA-nématodes. Par exemple Li *et al.* (2006) ont montré que l'inoculation avec *Glomus versiforme* améliorerait la résistance contre *M. incognita* probablement due à l'activation transcriptionnelle du gène chitinase VCH3 de classe III. Castillo *et al.* (2006) ont étudié les effets de l'inoculation simultanée ou non de *Elaeagnus angustifolia* avec une seule ou plusieurs souches de CMA (*G. intraradices*, *G. mosseae* et *G. viscosum*, et les nématodes *M. incognita* et *M. javanica*) en condition contrôlées. Ils ont

trouvé que les CMA dans les plants d'olivier ont significativement réduit la sévérité des galles racinaires de 36,8% et la population des deux nématodes de 35,7 %, ce qui indique un effet protecteur contre *Meloidogyne* spp en condition contrôlée. Castillo et al (2006) ont noté en présence de *M. incognita* et *M. javanica* une augmentation de la croissance des plantes mycorhizées de 88,9 % par rapport aux témoins. Chez la tomate par exemple, Diedhiou et al., (2003) ont noté que les plants pré-inoculés avec *G. coronatum* stimulaient la croissance et réduisaient l'infestation des nématodes.

Comme la plupart des espèces de nématodes phytophages vivent dans les racines, on conçoit qu'il existe une interaction constante entre elles et les mycorhizes. Cette interaction peut revêtir plusieurs aspects : compétition trophique intra-racinaire (Smith et Read, 2008), la plante est rendue plus résistante grâce à l'amélioration nutritionnelle que lui confère la symbiose mycorhizienne (Smith et Read, 2008) ; le masquage du pouvoir attractif exercé par les racines vis-à-vis des nématodes et les changements anatomiques du système racinaire (Hooker et al., 1994). Le développement d'un réseau d'hyphe épais et dense autour des racines pourrait constituer une barrière mécanique d'autant plus efficace (Vigo et al., 2000). On ajoute à cela l'activation des mécanismes indirectes de défenses (Slezack et al., 2001). Ces quelques essais illustrent parfaitement l'effet bénéfique de la mycorhization sur plusieurs cultures et vis-à-vis de plusieurs nématodes phytophages. Mais on sait encore peu de choses du mode d'action des endomycorhizes sur les nématodes. Cependant une étude des interactions plantes-mycorhizées-nématodes-parasites conclue que les nématodes endoparasites et les CMA sont mutuellement inhibiteurs quoique la réponse dépende du cultivar, du type de nématodes, de la souche de champignons, du statut nutritionnel, de la période d'inoculation et de récolte (Ingham, 1988). Quels pourraient être donc l'effet des souches endogènes des CMA sur les nématodes du genre *Meloidogyne* spp du manioc en Côte d'Ivoire ?

CHAPITRE 6 : APPLICATIONS DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES EN AGRICULTURE

6.1. Biofertilisants, biostimulants et inoculum à base de CMA en agriculture

Les champignons mycorhiziens peuvent selon la formulation constituer un biofertilisant facilitant l'accès des plantes aux nutriments (Srivastava et Sharma, 2011). Un biofertilisant est un fertilisant d'origine biologique. Les biofertilisants peuvent être des engrais obtenus par fermentation de déchets (animaux ou végétaux), des bactéries fixatrices d'azotes (ex : *Rhizobium*) apportées au sol pour faciliter la fixation de l'azote par les légumineuses, ou des champignons permettant la formation de mycorhizes sur certaines espèces (Mazoyer, 2002). Cette approche est économiquement viable, respectueuse de l'environnement, et socialement équitable (Lichtfouse *et al.*, 2009). La réponse de la croissance des plantes aux mycorhizes peut être positive, neutre ou négative (Smith et Smith, 2011). Contrairement aux bactéries azotées fixatrices, les CMA n'apportent pas des minéraux nutritifs dans le sol et ne sont donc pas strictement des biofertilisants (Cardoso *et al.*, 2010). On peut aussi les classer dans la catégorie des biostimulants. Selon l'EBIC (European Biostimulants Industry Consortium, 2012), les biostimulants contiennent des substances ou des microorganismes qui ont pour fonction lorsqu'ils sont appliqués aux plantes ou à la rhizosphère, de stimuler les processus naturels pour accroître l'absorption et l'efficacité des nutriments, la tolérance aux stress abiotiques et la qualité des récoltes.

Il existe différents types de cultures et d'inoculants microbiens disponibles sur le marché aujourd'hui, et les résultats sont souvent difficiles à extrapoler aux conditions sur le terrain. Un inoculant est un volume réduit du champignon utilisé pour inoculer un substrat et coloniser une plante (Fortin *et al.*, 2008). Les inoculants fongiques de CMA dans les produits commerciaux contiennent généralement une ou quelques espèces de *Glomus*, en particulier *G. intraradices* ou d'autres espèces telles que *Entrophospora colombiana* (*Acaulospora colombiana*), *Acaulospora appendicula* (*Ambispora appendicula*) (Akhtar et Siddiqui, 2008 ; Baar, 2008 ; Opik *et al.*, 2008 ; Vazquez-Hernandez *et al.*, 2011 ; Boonlue *et al.*, 2012). La réactivité de la plante à l'inoculation avec des souches sélectionnées de CMA devrait être une condition préalable à l'adoption de cette pratique.

6.2. Technologies de production d'inoculum de CMA

La production d'inoculum microbien est une procédure complexe qui implique l'expertise en ingénierie écologique et la capacité à répondre aux exigences légales, éthiques, éducatives et commerciales. Ceci est particulièrement le cas pour les micro-organismes symbiotes obligatoires tels que les champignons mycorhiziens à arbuscules parce que satisfaisant aux exigences mentionnées ci-dessus. La satisfaction à ces exigences est étroitement associée à la méthode particulière de production de l'inoculum. Les inocula fongiques sont couramment produits en association avec les plantes hôtes dans une serre ou dans des chambres de croissance en utilisant des 'cultures en pot' contenant des substrat tel que l'argile expansée et la vermiculite (IJdo *et al.*, 2011). D'autres techniques de production ainsi que des techniques de culture au champ (Figure 9), de culture sans substrat (hydroponique et aéroponique, Figure 10) et des méthodes de culture in vitro (Figure 11) sont expérimentées (IJdo *et al.*, 2011). Toutes ces techniques vont permettre une meilleure qualité des produits commerciaux. Le succès d'un inoculum prend en compte l'aspect (1) économiquement viable à produire, (2) l'état de la viabilité et de la fonction des espèces (3) facile à transporter et à disperser lors de l'application. Une étape de base est la sélection des champignons mycorhiziens à arbuscules qui dépend des conditions environnementales de la localité, le sol et la plante hôte. Les CMA doivent être capables de coloniser les racines rapidement après inoculation, absorber le phosphate dans le sol de manière efficace et de le transférer à la plante. Ils doivent être persistants dans le sol, à même de rétablir la symbiose mycorhizienne au cours des saisons suivantes. Les propagules qui doivent rester viables pendant et après la production d'inoculum (Tanu Prakash et Adholeya, 2006).



Figure 9. Exemples de production au champ d'inoculum mycorhiziens (Agritech.tnau, 2014)

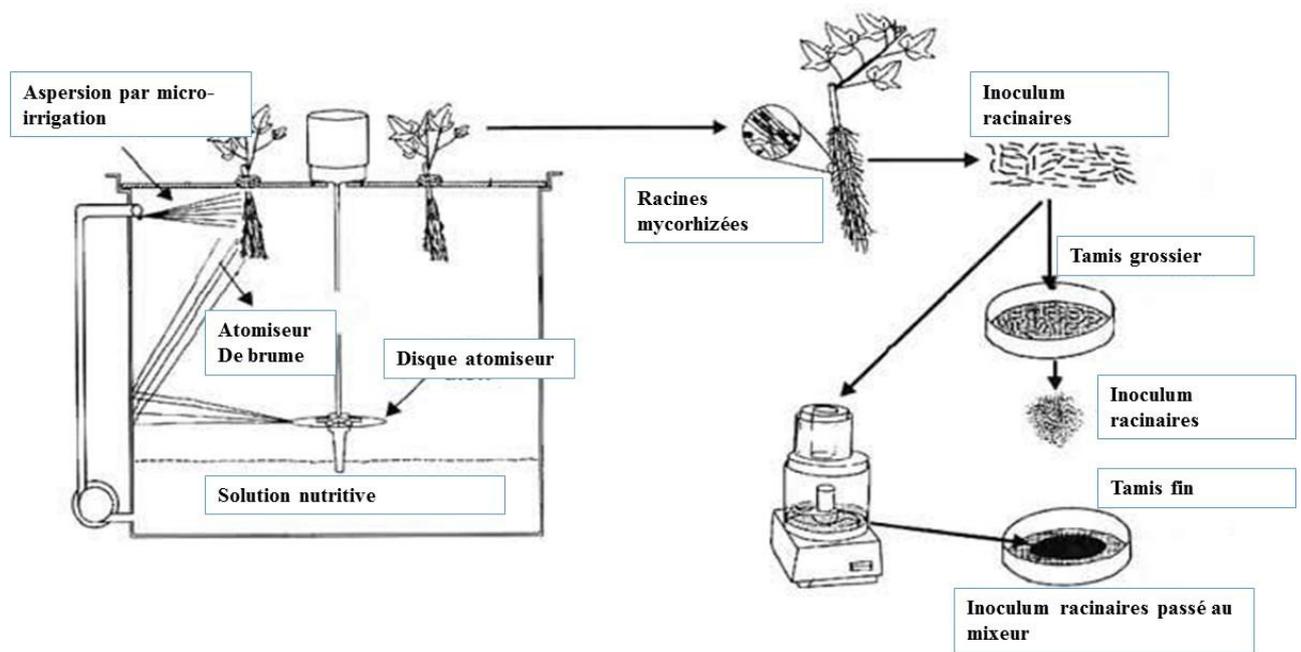


Figure 10. Culture aéronique d'inoculum de champignons mycorhiziens à arbuscules (INVAM, 2016)

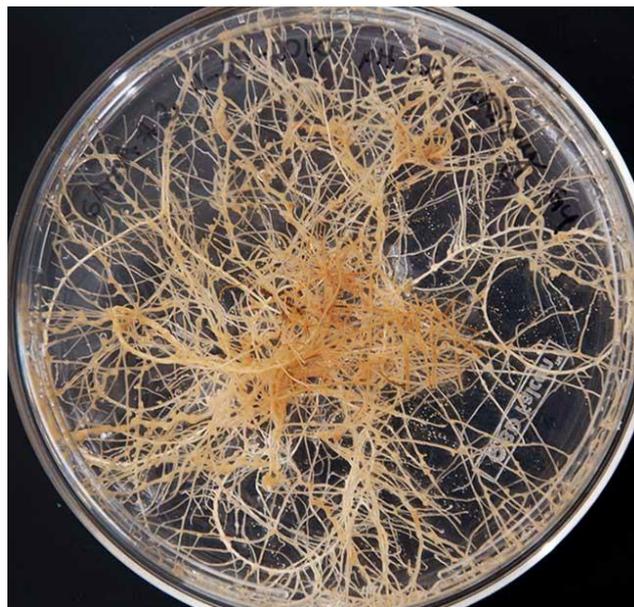


Figure 11. Culture *in vitro* de champignons mycorhiziens à arbuscules (INVAM, 2016)

6.3. Inoculation mycorhizienne en agriculture dans le monde

L'application d'inoculants mycorhiziens commerciaux dans l'agriculture vise à entraîner une meilleure mycorhization des cultures par l'introduction d'une ou de plusieurs souches étrangères ou indigènes performantes de CMA. Les espèces qui sont couramment utilisées pour les inoculums commerciaux sont des espèces qui sont naturellement très répandues dans les écosystèmes, produisent beaucoup de spores et ont comme avantage de coloniser une

grande variété de plantes hôtes (Dalpé et Monreal, 2004 ; Fortin *et al.*, 2008). L'inoculation des terres agricoles par des souches sélectionnées à haute performance est peu répandue dans l'agriculture intensive en Europe et en Amérique du nord. Toutefois, les pays en développement tels que Cuba et l'Inde, où les intrants chimiques sont peu accessibles, sont de vrais pionniers quant au développement de cette biotechnologie. Depuis déjà plusieurs années, ces pays en développement ont mis en pratique l'inoculation de leurs cultures par des souches sélectionnées à haute performance. Il s'agit de l'inoculation mycorrhizienne des cultures à Cuba avec la série d'inoculants mycorrhiziens EcoMic à base de propagules de plusieurs espèces comme *Glomus fasciculatum*, *Glomus mossae*, *Glomus claroideum* et *Glomus clarum* (Fernandez, 2003). En moyenne, l'inoculation avec EcoMic a produit une augmentation des rendements entre 40 et 50 % selon le type de production agricole. Comme Cuba, l'Inde est aussi reconnue mondialement pour ses progrès dans le développement d'inoculants mycorrhiziens. L'inoculum développé, est fait d'une seule souche mycorrhizienne appartenant à l'espèce *Glomus intraradices* (Hamel et plenchette, 2007). Contrairement à ce qui se fait à Cuba et en Inde, l'inoculation mycorrhizienne est une pratique agricole plutôt marginale et très récente au Canada. Les principaux acteurs au Canada sont l'entreprise québécoise Premier Tech Biotechnologies (PTB) et ses inoculants Mykepro qui est reconnue comme un leader mondial dans la production et la commercialisation d'inoculants mycorrhiziens. Les inoculants MykePro sont faits d'une seule souche mycorrhizienne appartenant à l'espèce *Glomus intraradices*, récemment renommée *Rhizophagus intraradices* en 2013, soit la même espèce que celle utilisée en Inde. La souche mycorrhizienne de Mykepro a été isolée par Valentin Furian et André Fortin dans les années 80 dans une pépinière de pont-rouge, près de Québec. Elle a été sélectionnée pour ses propriétés agronomiques performantes et sa capacité à être cultivée *in vitro* en laboratoire et à l'échelle industrielle (Gagné et le Quéré, 2014). Cette souche à l'avantage de coloniser un nombre important de plantes hôtes et est aussi résistante aux entreposages prolongés, ce qui facilite la commercialisation et la conservation du produit (Dalpé et Monreal, 2004). Les inoculants Mykepro se trouvent sur le marché en différentes formules, soit granulaire, en poudre ou liquide, et à différentes concentrations selon les cultures cibles (Gagné et Le Quéré, 2014).

6.4. Bilan de la technologie d'endomycorhization du manioc en agriculture

L'utilisation des champignons mycorhiziens en agriculture particulièrement en culture de manioc est à ces débuts. L'essentiel des travaux réalisés en Côte d'Ivoire en particulier ont porté essentiellement sur l'étude de la diversité morphologique de ces champignons mycorhiziens. Ces études sur les communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules associées au manioc en Côte d'Ivoire ont révélé une importante diversité (Voko *et al.*, 2013). Elles ont montré que le manioc était fortement mycotrophe. Cependant dans d'autres pays d'Afrique et en Amérique latine, des études plus poussées ont été conduites. Des études réalisées en zone tropicale en Amérique du Sud par Sieverding (1989b) ont montré que l'adaptation du manioc sur divers milieux était liée à sa capacité à établir des relations symbiotiques avec un grand nombre d'espèces de CMA. De plus, en zone tropicale les genres *Glomus* et *Acaulospora* sont prédominant dans la rizosphère du manioc (Sieverding, 1989a, b ; Gai et Liu, 2003). Tandis que l'espèce *Glomus clarum* (*Glomus manihotis*) est décrite comme la plus invasive et la plus compétitive des CMA associés au manioc (Sieverding et Toro, 1989). En Afrique du Sud, des études menées sur deux régions productrices de manioc, Mpumulanga et Limpopo, ont prouvé que la rhizosphère des plants de manioc étaient également peuplées de plusieurs espèces de CMA dont *Acaulospora scrobiculata*, *Glomus rubiforme*, *Gigaspora sp.*, *Acaulospora mellea*, *Acaulospora tuberculata*, *Claroideoglomus etunicatum*, et *Scutellospora sp.* (Straker *et al.*, 2010). Au Nigéria dans les zones de savanes, la production du manioc a été améliorée de 20% grâce à l'utilisation des CMA (Oyetunji et Osonubi, 2007).

Il faut noter que les quelques tests d'efficacité réalisés sur la culture de manioc ont été faite avec des souches exogènes (Ceballo *et al.*, 2013) et la grande majorité en condition expérimentale. Il a y été prouvé également que les CMA accroissent le rendement du manioc sur des sols à faible niveau de fertilité (Osonubi *et al.*, 1995). Il a été rapporté les effets bénéfiques de l'inoculation des plants de manioc par les CMA, en particulier sur la croissance du manioc en début de cycle pour des niveaux faibles de phosphate dans le sol (Kang *et al.*, 1980, Carretero, 2009). Les plants inoculés avec les CMA étaient 10 à 20 fois plus grand que les plantes non-mycorhizées cultivées dans des sols stériles (Howeler et Sieverding, 1983).

Dans une série d'études pionnières (résumé par Sieverding en 1991), des effets impressionnant de l'inoculation de CMA ont été observés en champ en Colombie où le rendement du manioc a été augmenté de 5 tonnes à l'hectare. Pendant que les plants de

manioc sont toujours mycorhizés au champ, ces études démontrent que le manioc est dépendant des CMA pour la croissance. Plusieurs études montrent que différentes espèces de CMA ont des effets variables sur la croissance des plantes (Bever *et al.*, 2001 ; Vogelsang *et al.*, 2006). L'efficacité de l'association dépend donc de la plante hôte (Plenchette *et al.*, 1983) et du cultivar (Declerck *et al.*, 1995), des espèces/souches fongiques (Yano-Melo *et al.*, 1999), des pratiques culturales (Adriano-Anaya *et al.*, 2006) et des conditions de l'environnement (Öpik *et al.*, 2006). En effet, les rendements du manioc en champ varient grandement suivant l'inoculation avec différentes espèces de CMA ayant ou pas d'effets ; comparés aux plantes non inoculées colonisées par les champignons mycorhiziens natifs on a observé une augmentation du rendement d'environ 20% (Sierverding *et al.*, 1991). Cela montre la nécessité de tenir compte de l'identité du champignon pour faire l'inoculation du manioc. Les succès associés à l'augmentation des rendements des cultures et à la réduction des besoins en fertilisants chimiques qu'a permis l'inoculation mycorhizienne dans les pays en voie de développement font réfléchir sur le potentiel qu'auront les inoculants en Côte d'Ivoire pour favoriser une agriculture plus productive, moins exigeante en intrants minéraux phosphatés et durable. Est ce que de telles retombées de l'inoculation mycorhizienne pourraient être observées en Côte d'Ivoire sur la culture du manioc ?

**PARTIE 2 : MATERIEL ET
APPROCHE
METHODOLOGIQUE**

CHAPITRE 7 : PRESENTATION DES SITES D'ETUDES

7.1. Zones d'études

La Côte d'Ivoire est située en Afrique de l'Ouest dans la zone intertropicale humide. Elle s'étend sur une superficie de 322 462 km². En 2002, la surface mise en culture représentait 6 900 000 ha dont 267 616 ha pour la culture du manioc (Fao, 2013). Dès 1972, le manioc était présent dans toutes les régions de Côte d'Ivoire (Haeringer, 1972). La plante s'est parfaitement adaptée à tous les systèmes cultureux aussi bien en zone forestière humide du sud qu'en savane sèche du nord (Camille, 1984). Pour l'étude des communautés de champignons endomycorhiziens associées à la culture du manioc en Côte d'Ivoire, trois zones agroécologiques différentes (Abengourou, Azaguié et Yamoussoukro) ont été retenues (Figure 12).



Figure 12. Localisation des trois zones agroécologiques sur la carte de la végétation de la Côte d'Ivoire.

Les coordonnées géographiques des points d'échantillonnage sont données dans le Tableau 4 suivant :

Tableau 4. Coordonnées géographiques des points d'échantillonnage

Zones	Champs	Variétés de manioc	Surface (ha)	Points	Coordonnées GPS		
					Nord	Ouest	Altitude (mètre)
ABENGOUROU	Aniansué 1 (AB1)	Agniaoufoué/Yavo	1-2	Ab 1/1	06°40'20.10"	003°38'57.72"	166
				Ab 1/2	06°40'20.64"	003°38'56.34"	164
				Ab 1/3	06°40'20.28"	003°38'58.56"	164
	Aniansué 2 (AB2)	Agniaoufoué	2-3	Ab 2/1	06°39'51.96"	003°41'07.80"	170
				Ab 2/2	06°39'53.82"	003°41'06.66"	167
				Ab 2/3	06°39'50.76"	003°41'06.06"	164
	Dramanekro1 (AB3)	Yavo	1-2	Ab 3/1	06°42'38.40"	003°37'03.36"	176
				Ab 3/2	06°42'37.44"	003°37'04.80"	176
				Ab 3/3	06°42'37.32"	003°37'05.34"	177
	Dramanekro2 (AB4)	Yavo/bonoua	1-2	Ab 4/1	06°41'48.96"	003°38'19.08"	151
				Ab 4/2	06°41'50.82"	003°38'17.94"	154
				Ab 4/3	06°41'51.60"	003°38'16.50"	152
AZAGUIE	Ahoua 1 (AZ1)	Yassé/Dankoi	1-2	Az 1/1	05°40'21.06"	004°02'33.42"	51
				Az 1/2	05°40'22.38"	004°02'32.64"	50
				Az 1/3	05°40'22.86"	004°02'31.38"	50
	Ahoua 2 (AZ2)	Yassé/Dankoi	1-2	Az 2/1	05°38'36.30"	004°03'24.54"	48
				Az 2/2	05°38'34.32"	004°03'18.36"	47
				Az 2/3	05°38'35.88"	004°03'21.36"	46
	M'Bromé 1 (AZ3)	Akaman/Yassé/Dankoi	2-3	Az 3/1	05°39'38.28"	004°09'00.00"	53
				Az 3/2	05°39'37.14"	004°08'57.60"	49
				Az 3/3	05°39'35.94"	004°08'57.54"	47
	M'Bromé 2 (AZ4)	Bonoua/Akaman/Dankoi	2-3	Az 4/1	05°40'04.98"	004°08'43.44"	46
				Az 4/2	05°40'01.56"	004°08'43.32"	47
				Az 4/3	05°39'58.74"	004°08'43.32"	52
YAMOOUSSOUKRO	Logbakro 1 (YA1)	Olékanga	1-2	Ya 1/1	06°44'13.50"	005°12'24.60"	223
				Ya 1/2	06°44'14.28"	005°12'24.60"	225
				Ya 1/3	06°44'15.42"	005°12'23.10"	225
	Logbakro 2 (YA2)	Olékanga/Yavo	1-2	Ya 2/1	06°44'01.68"	005°11'44.22"	207
				Ya 2/2	06°44'02.64"	005°11'45.60"	210
				Ya 2/3	06°44'02.34"	005°11'46.86"	210
	Céman (YA3)	Yavo	1-2	Ya 3/1	06°53'14.46"	005°17'54.96"	237
				Ya 3/2	06°53'15.06"	005°17'54.90"	233
				Ya 3/3	06°53'15.42"	005°17'54.00"	235
	Zambakro (YA4)	Bonoua/Yassé	2-3	Ya 4/1	06°43'30.12"	005°24'15.48"	162
				Ya 4/2	06°43'30.36"	005°24'14.52"	159
				Ya 4/3	06°43'28.68"	005°24'14.16"	159

7.1.1. Zone agroécologique d'Abengourou

Abengourou est situé à l'Est de la Côte d'Ivoire entre le 6^e et le 7^e degré de longitude Ouest et entre le 4^e et le 3^e degré latitude Est. Le climat est de type subéquatorial (appelé aussi climat attiéen). Il comprend deux saisons de pluies (Mars-Juillet et Septembre-Octobre) qui alternent avec deux saisons sèches (Novembre-Mars et Août). La pluviométrie oscille entre 1200 mm et 1800 mm et la température moyenne annuelle varie entre 25 et 28° C. L'humidité relative de l'air varie de 44 % en janvier à 85 % en juillet-août. La végétation (Guillaumet et Adjanohoun, 1971) est constituée par la forêt dense humide. Les sols (Yoro *et al.*, 1995) sont en général des sols ferrallitiques. La zone forestière de la Côte d'Ivoire, est une zone de forte production de manioc (Kouadio *et al.*, 2011). Dans le cadre de cette étude, quatre champs de monoculture de manioc (Aniansué 1, Aniansué 2, Dramanekro 1 et Dramanekro 2) distants d'au moins 3 km ont été retenus. Les coordonnées géographiques des points d'échantillonnage sont données dans le Tableau V et les caractéristiques physico-chimiques des sols de champs de manioc à Abengourou (Voko, 2014) dans le Tableau 5.

Tableau 5. Analyse physico-chimique des sols des champs de manioc à Abengourou (Voko, 2014)

Sites (Champs)	Aniansué 1	Aniansué 2	Dramanekro 1	Dramanekro 2
Analyse physique du sol				
Argile (%)	5,12 ^a ±0,09	6,32 ^a ±1,3	13,6 ^a ±13,09	1,67 ^a ±1,08
Limon fin (%)	26,16 ^b ±7,7	38,65 ^{ab} ±4,36	30,77 ^b ±10,5	49,7 ^a ±1,9
Limon grossier (%)	19,48 ^a ±10,86	4,26 ^b ±0,18	8,23 ^{ab} ±5	17,62 ^{ab} ±1,37
Sable grossier (%)	26,31 ^a ±3,42	23,88 ^{ab} ±6,7	24,86 ^{ab} ±6	13,73 ^b ±0,8
Sable fin (%)	22,93 ^{ab} ±0,11	26,87 ^a ±1,5	22,54 ^{ab} ±5,1	17,24 ^b ±1,96
Analyse chimique du sol				
pH	6,41 ^b ± 0,04	5,50 ^a ± 0,25	5,87 ± ^{ab} 0, 29	6,27 ^{ab} ± 0,11
C (%)	2,67 ^a ±0,20	3,15 ^a ± 0,1	2,28 ^a ±0,52	2,68 ^a ± 0,31
N (%)	0,28 ^a ± 0,02	0,30 ^a ± 0,01	0,25 ^a ± 0,04	0,32 ^a ± 0,02
C/N	9,49 ^{ab} ±0,81	10,60 ^b ± 0,39	9,06 ^{ab} ± 0,6	8,27 ^a ± 0,37
O.M %	4,59 ^a ±0,34	5,41 ^a ± 0,24	4,01 ^a ± 0,89	4,61 ^a ± 0,54
P. total (ppm)	448,0 ^a ±30,29	399,92 ^a ± 5,6	419,57 ^a ± 88,3	381,33 ^a ± 10,7
P. ass (ppm)	22,62 ^a ±1,94	55,95 ^b ± 3,89	23,57 ^{ab} ± 4,66	29,76 ^{ab} ± 7,78
CEC (cmol.kg-1)	20,67 ^{ab} ± 1,3	23,67 ^b ± 0,14	17,92 ^a ± 1,47	18,6 ^a ± 0,84
Ca ²⁺ (cmol.kg-1)	2,71 ^{ab} ± 0,9	2,27 ^a ± 0,12	2,81 ^{ab} ± 0,29	3,18 ^b ± 0,17
Mg ²⁺ (cmol.kg-1)	1,69 ^{ab} ± 0,16	1,38 ^{ab} ± 0,17	1,17 ^b ± 0,13	1,84 ^a ± 0,10
K ⁺ (cmol.kg-1)	0,11 ^a ± 0,01	0,20 ^b ± 0,01	0,16 ^{ab} ± 0,02	0,24 ^b ± 0,04
Na ⁺ (cmol.kg-1)	0,46 ^c ± 0,03	0,33 ^{bc} ± 0,04	0,15 ^a ± 0,05	0,18 ^{ab} ± 0,03
V(%)	24,14 ^b ± 0,43	17,67 ^a ± 1,3	23,90 ^b ± 0,85	29,27 ^c ± 0,14

Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes au seul de 5 % selon l'ANOVA de Kruskal-Wallis. pH : potentiel de l'ion hydronium, C % : proportion en carbone organique total, N % : proportion en azote total, C/N : rapport entre proportion en carbone organique total et proportion en azote total, OM % : teneur en matière organique, P total : phosphore total, P. assimilable : phosphore assimilable, CEC : capacité d'échange cationique, Ca²⁺ : teneur en calcium, Mg²⁺ : teneur en magnésium, K⁺ : teneur en potassium, Na⁺ : teneur en sodium, V(%) : taux de saturation en base

7.1.2. Zone agroécologique d'Azaguié

La localité d'Azaguié, située au Sud-Est de la Côte d'Ivoire en zone forestière, fait partie des régions pionnières de la production du manioc de ce pays (Chaléard, 1988). Le climat d'Azaguié est un climat tropical humide (type Attiéen) à température élevée (supérieur à 27°C) et ensoleillé avec quatre saisons (deux saisons des pluies dont la plus grande est centrée sur Juin et la petite sur Octobre (Mollard, 1993) ; deux saisons sèches de fin août jusqu'à fin

septembre et de décembre à début avril). La moyenne annuelle des précipitations est de 1700 mm (Mollard, 1993). La température élevée et la pluviométrie abondante sont les composantes d'un climat à fort potentiel (Mollard, 1993). Azaguié est situé en zone forestière. Le sol d'Azaguié appartient à la catégorie des sols ferrallitiques. Le taux de matière organique, la capacité d'échange et le taux de saturation en bases des sols ferrallitiques de la région sont faibles, les classant dans le sous-groupe "désaturé". Ils se divisent en plusieurs niveaux d'aptitudes culturales, les sols ferrallitiques fortement désaturés remaniés qui sont médiocres pour l'agriculture et les sols ferrallitiques fortement désaturés remaniés appauvris (en argile) sur sable tertiaire qui sont favorables à l'agriculture. Dans le cadre de cette étude, quatre champs de monoculture de manioc (Ahoua 1, Ahoua 2, Mbromé 1 et Mbromé 2) distants d'au moins 3 km ont été retenus. Les caractéristiques physico-chimiques des sols de champs de manioc à Azaguié (Voko, 2014) sont présentées dans le Tableau 6.

Tableau 6. Analyse physico-chimique des sols des champs de manioc à Azaguié (Voko, 2014)

Sites	Ahoua 1	Ahoua 2	Mbromé 1	Mbromé 2
Analyse physique du sol				
Argile (%)	6,32 ^a ±3,9	6,844 ^a ±6,4	3,75 ^a ±0,94	4,99 ^a ±0,3
Limon fin (%)	11,4 ^b ±2,1	20,49 ^a ±4,1	23,12 ^a ±2,06	23,61 ^a ±2,12
Limon grossier (%)	23,3 ^{ab} ±1,4	26,8 ^a ±6,5	17,2 ^b ±2,9	14,97 ^b ±0,7
Sable grossier (%)	23,64 ^a ±8,78	14,04 ^a ±2,42	19,64 ^a ±2,85	20,93 ^a ±0,34
Sable fin (%)	35,3 ^a ±12,9	31,83 ^a ±6,5	36,27 ^a ±1,7	35,48 ^a ±1,5
Analyse chimique du sol				
pH	5,19 ^b ±0,132	5,00 ^{ab} ±0,27	4,97 ^{ab} ±0,203	4,51 ^a ±0,31
C (%)	1,12 ^a ±0,141	0,99 ^a ±0,246	1,22 ^a ±0,185	1,38 ^a ±0,094
N (%)	0,14 ^a ±0,053	0,15 ^{ab} ±0,047	0,18 ^{ab} ±0,007	0,22 ^b ±0,017
C/N	9,66 ^a ±2,14	6,82 ^a ±0,45	6,72 ^a ±0,556	6,24 ^a ±0,174
O.M %	1,93 ^a ±0,243	1,70 ^a ±0,425	2,10 ^a ±0,32	2,39 ^a ±0,16
P. total (ppm)	227 ^a ±44,324	243,7 ^a ±102,84	164 ^a ±20,46	224,3 ^a ±25,95
P. ass (ppm)	29,76 ^a ±6,734	30,71 ^a ±9,258	19,00 ^a ±0,816	25,00 ^a ±3,74
CEC (cmol.kg-1)	5,84 ^a ±1,224	7,94 ^a ±2,57	17,1 ^b ±5,67	12,21 ^{ab} ±3,56
Ca ²⁺ (cmol.kg-1)	0,54 ^a ±0,042	0,61 ^a ±0,28	0,39 ^a ±0,097	0,44 ^a ±0,056
Mg ²⁺ (cmol.kg-1)	0,50 ^a ±0,19	0,23 ^a ±0,157	0,26 ^a ±0,049	0,26 ^a ±0,033
K ⁺ (cmol.kg-1)	0,04 ^a ±0,007	0,04 ^a ±0,006	0,043 ^a ±0,011	0,11 ^b ±0,052
Na ⁺ (cmol.kg-1)	0,08 ^a ±0,091	0,24 ^a ±0,164	0,26 ^a ±0,077	0,243 ^a ±0,013
V(%)	20,91 ^c ±4,79	15,52 ^{bc} ±4,77	5,97 ^a ±1,237	9,726 ^{ab} ±3,7

Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon l'ANOVA de Kruskal-Wallis.

7.1.3. Zone agroécologique de Yamoussoukro

La zone de Yamoussoukro est localisée au centre de la Côte d'Ivoire. Elle est située entre 6° et 8° de latitude nord et entre 4° et 6° de longitude ouest. Le climat du département de Yamoussoukro est de type subéquatorial marqué par un régime pluviométrique bimodal avec quatre saisons. Les pluviométries moyennes oscillent entre 1100 mm à 1600 mm et les températures moyennes annuelles varient de 24,6°C à et 27,9°C. La végétation est une mosaïque de savane guinéenne et de forêt dense humide semi-décidue type à *Aubrevillea kerstingii* (N'Guessan, 1990). Dans le cadre de cette étude quatre champs de monoculture de manioc (Logbakro 1, Logbakro 2, Céman et Zambakro) distants d'au moins 3 km ont été retenus. Les caractéristiques physico-chimiques des sols de champs de manioc à Yamoussoukro (Voko, 2014) dans le Tableau 7.

Tableau 7. Analyse physico-chimique des sols des champs de manioc Yamoussoukro (Voko, 2014)

Sites	Logbakro 1	Logbakro 2	Ceman	Zambakro
Analyse physique du sol				
Argile (%)	2,485 ^a ±0,3	6,37 ^a ±5,5	6,6 ^a ±6,5	5,3 ^a ±4,43
Limon fin (%)	25,92 ^a ±5,87	23,13 ^a ±5,8	21,16 ^a ±6,02	20,7 ^a ±8,04
Limon grossier (%)	7,61 ^a ±0,6	16,44 ^a ±12,4	15,57 ^a ±11,4	15,02 ^a ±11,25
Sable grossier (%)	29,7 ^a ±2,9	28,3 ^a ±11,14	29,46 ^a ±10,4	29,53 ^a ±11,11
Sable fin (%)	34,27 ^a ±8,17	25,7 ^a ±1,04	27,16 ^a ±2,2	29,38 ^a ±3,4
Analyse chimique du sol				
pH	6,28 ^a ±0,903	5,77 ^a ±0,287	6,39 ^a ±0,061	6,56 ^a ±0,31
C (%)	1,44 ^b ±0,344	0,93 ^a ±0,042	1,59 ^b ±0,047	0,94 ^a ±0,248
N (%)	0,15 ^{ab} ±0,035	0,11 ^a ±0,01	0,17 ^b ±0,01	0,14 ^{ab} ±0,025
C/N	9,67 ^a ±0,611	8,55 ^a ±0,621	9,31 ^a ±0,293	7,08 ^a ±1,67
O.M %	2,49 ^b ±0,593	1,61 ^a ±0,072	2,75 ^b ±0,08	1,62 ^a ±0,43
P. total (ppm)	317 ^b ±68,06	157 ^a ±59,4	208,30 ^{ab} ±31,33	212,30 ^{ab} ±40,61
P. assimilable (ppm)	17,86 ^a ±10,10	20,95 ^a ±2,99	19,52 ^a ±7,96	21,90 ^a ±5,72
CEC (cmol.kg-1)	9,48 ^a ±1,817	7,52 ^a ±2,189	14,747 ^b ±2,97	7,04 ^a ±1,35
Ca²⁺ (cmol.kg-1)	2,24 ^a ±1,280	1,69 ^a ±0,66	1,06 ^a ±0,63	1,64 ^a ±0,09
Mg²⁺ (cmol.kg-1)	0,72 ^a ±0,261	0,33 ^a ±0,046	0,61 ^a ±0,27	0,42 ^a ±0,098
K⁺ (cmol.kg-1)	0,16 ^a ±0,0826	0,28 ^a ±0,168	0,102 ^a ±0,04	0,17 ^a ±0,053
Na⁺ (cmol.kg-1)	0,24 ^a ±0,0116	0,16 ^a ±0,104	0,16 ^a ±0,095	0,15 ^a ±0,094
V(%)	36,54 ^b ±15,45	31,68 ^b ±4,22	14,17 ^a ±5,62	35,56 ^b ±9,46

Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 % selon l'ANOVA de Kruskal-Wallis.

7.2. Sites d'expérimentation

Deux sites d'expérimentation d'une surface de 0,25 Ha ont été utilisés pour les essais en champ. Il s'agit du site de Yamoussoukro situé à la ferme de l'ESA (Ecole Supérieure d'Agronomie-INP-HB) et le Site de Duokro situé à environ 15 Km de celui de Yamoussoukro. Les coordonnées géographiques des deux sites sont consignées dans le Tableau 8. Des échantillons de sols ont été prélevés sur chaque site d'expérimentation pour déterminer leur état physico-chimique et la diversité mycorhizienne par le séquençage Illumina Miseq.

Tableau 8. Coordonnées géographiques des champs expérimentaux

Champs	Aire (ha)	Points	Coordonnées géographiques		
			Nord	Ouest	Altitude (m)
Yamoussoukro (Ferme INP-HB)	0,25	Y1	06°53'14.70"	005°13'13.08"	237
		Y2	06°53'13.80"	005°13'13.26"	237
		Y3	06°53'27.18"	005°13'21.42"	237
		Y4	06°53'27.24"	005°13'21.66"	237
Duokro (Champ paysan)	0,25	D1	06°37'23.46"	005°13'27.06"	213
		D2	06°37'.339"	005°13'09.66"	209
		D3	06°37'20.34"	005°13'08.82"	210
		D4	06°37'19.68"	005°13'08.76"	218

CHAPITRE 8 : MATERIEL ET METHODES

8.1. Matériel biologique

8.1.1. Sols et substrats de culture

Les sols des champs de manioc des zones agroécologiques (Abengourou, Azaguié et Yamoussoukro) et les sols des parcelles d'expérimentations ont servi pour les études physico-chimiques et pour l'extraction d'ADN dans le cadre de l'étude moléculaire de la diversité des champignons mycoriziens à arbuscules. Le terreau et le sable ont servi dans la formulation des différents substrats pour le piégeage, la production d'inoculum et pour les essais en serre.

8.1.2. Matériel végétal

La variété améliorée de manioc TME7 'Yavo' fournie par l'ANADER (Agence National de Developpement Rural) de Yamoussoussoukro a été utilisée pour les expérimentations. Cette variété a un cycle de 8 mois et est connue pour être résistante au virus de la maladie de la mosaïque du manioc. Elle a été utilisée dans toutes les expérimentations aussi bien en serre qu'aux champs Elle a aussi servi de plante piège pour la multiplication des spores et les cultures monosporales. Des semences de tomate ont été utilisées. La tomate a été utilisée comme plante piège pour la multiplication et l'extraction des nématodes à galles du genre *Meloidogyne* spp. L'extraction des nématodes s'est faite à partir des racines galleuses. Ces nématodes ont servis d'inoculum pour l'évaluation de l'efficacité des inoculums de CMA comme agent de biocontrôle.

8.1.3. Matériel fongique

Les spores de CMA des sols de champs de manioc ont permis l'étude morphologique des CMA et l'identification moléculaire des souches performantes de CMA endogènes associés à la culture du manioc en Côte d'Ivoire. L'inoculum Mykepro (P 501) est fait à base de la souche *Rhizophagus intraradices* et a été fourni par la société Primer Technologie Biotechnologie (PTB). Ce produit est sous la formulation poudre. Le numero du lot utilisé est 4715716 avec 500 spores/g.

8.2. Matériel Technique

8.2.1. Echantillonnage des sols

Un ensemble de matériel a été utilisé pour prélever les échantillons au champ. Il s'agit : d'un ruban mètre pour les mesures, d'une tarière, de l'eau de Javel 12°, deux seaux, de 150 sacs

plastiques solides, de 150 sacs plastiques de 2 kg, de 300 étiquettes cartonnées, de marqueurs et stylos.

8.2.2. Piégeage, dénombrement et identification morphologique des spores

Les matériels dont les noms suivent ont été utilisés. Il s'agit de pots en plastique (2L et 10L), d'un autoclave, d'une pelle, de sable de mer stérilisé, du terreau stérilisé et d'un désinfectant. L'étude morphologique des CMA a nécessité une loupe binoculaire, une série de quatre tamis de mailles 500 μm , 125 μm , 90 μm et 45 μm , une centrifugeuse, des tubes à centrifugeuse, un microscope optique, des lames et des lamelles, un agitateur magnétique, des béciers de 2 L, une balance de précision, des boîtes de Pétri et du papier buvard, des pinces, des tubes à essai, du papier filtre, le PVLG (polyvinyle Lacto-glycérol) pour les montages permanents entre lames et lamelles de spores intactes ou cassées, ou de fragments des racines mycorhizées, le réactif de Melzer pour la coloration des spores et le bleu trypan à 0,05% pour la coloration des structures fongiques dans les racines des plantes

8.2.3. Etude moléculaire des communautés de CMA et l'identification des souches performantes associées au manioc

Le matériel pour l'extraction d'ADN des spores + l'identification moléculaire est constitué d'un mortier, d'un kit d'extraction d'ADN (DNeasy Plant extraction), du milieu LB, d'ampicilline, Xgal 2 %, Bactérie *E. coli* compétente et d'un kit Topo cloning TA Kits (Invitrogen). Le matériel pour l'extraction d'ADN des échantillons de sols a quant à lui nécessité la préparation de solutions (SDS, NaCl, Tris-HCl, EDTA, H₂O up.), de matériel spécifique (un broyeur FastPrep), des colonnes microbiospin, un bain-marie, une unité de filtration Millipore Sterifil filtration system 250ml (à autoclaver) + pompe à vide, (Polyvinylpyrrolidone) tamisé entre 40 et 125 μm , de consommables (billes 0,1mm silice, billes 1,4mm céramique, billes verre 4mm, cônes 5ml-10ml, tubes Falcon de 15mL adaptés à l'appareil Fast Prep, parafilm, filtres 0,22 μm -4mm- nitrocellulose GSTF (Sigma) pour unité de filtration). Du matériel est utilisé conjointement dans les deux manipulations. Il s'agit d'une balance de précision, de micropipette P10/P100/P200/P5000/P10000, de vortex, d'eau autoclavée milliQ filtrée, d'amorces LR1, NDL22, FLR4, FLR2, un thermocycleur, une cuve d'électrophorèse, d'une lampe UV et système de visualisation de gel, de tampon MP biomédical, de dNTP, d'eau pure et de Taq MP biomédical 15U/ μl .

8.2.4. Extraction, comptage et coloration des nématodes

Nous avons eu recours pour l'extraction des nématodes du sol et des racines à des tamis 40 µm, 25 µm, d'une passoire de ménage à maille grossière, d'un plateau de taille légèrement supérieure au tamis, de tissu de papier, du cleaness, de béciers, d'une pissette d'eau, d'un marqueur indélébile, de couteaux, de ciseaux, d'une balance, de javel, d'une bouteille schoot et d'une éprouvette graduée. L'estimation de la population de nématode s'est faite sous loupe binoculaire et a nécessité le matériel suivant une plaque de comptage, un microscope Motic BA310, du lactoglycerol + 0.05-0.1 % fuchsine acide, de l'éosine 9 %, des pipettes, le reactif de Folin et ciocalteu, l'acetone, l'acide gallique, du carbonate de sodium Na₂CO₃ et un spectrophotomètre Jenway 7315 pour le dosage du phénol.

8.2.5. Evaluation sur la croissance du manioc et la tolérance au stress hydrique

Un spectrophotomètre Jenway 7315 pour le dosage de la chlorophylle et des sucres totaux, des mortiers en porcelaine, une mini-centrifugeuse, l'éthanol, des cônes de 15 ml et une étuve. Pour les essais au champ, on a utilisé des dabas, des machettes, un ruban mètre, des houes, un pied à coulisse, des sachets de 2L et des sachets de 5L.

8.2.6. Analyse chimique des feuilles de manioc

Pour le dosage des éléments minéraux Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ et P dans les échantillons végétaux, un four à moufle et un creuset en porcelaine ont été nécessaires. Les réactifs suivants ont été utilisés HNO₃, HCl N, HCl 0,5N, H₂SO₄, NaOH, l'indicateur à l'acide borique, le catalyseur au sulfate de potassium, la solution d'acide sulfurique, d'acide salicylique et le peroxyde d'hydrogène. L'appareil de minéralisation Kjeldhal et matras micro-kedjhal de 50 ou 100 ml ont aussi été utilisés.

8.3. Méthodes de collecte des échantillons de sols

L'échantillonnage des trois zones agroécologiques a été effectué dans le mois de Décembre 2012 pendant la saison sèche. Dans chaque zone agroécologique, 4 champs de manioc distants de 3 km minimum ont été retenus. Ainsi, dans chaque champ, des échantillons de sol sont prélevés en 3 endroits (3 échantillons par champ) distants de 20 m minimum. A partir de chaque endroit, deux cercles concentriques de rayon de 3 m et 6 m sont délimités. Sur le premier cercle, il est défini quatre points de prélèvements élémentaires équidistants et sur le deuxième cercle, il est défini 8 points de prélèvements élémentaires équidistants (Figure 13). On obtient ainsi 12 points de prélèvement élémentaires pour un échantillon. Le sol a été prélevé au pied des plants de manioc à l'aide d'une tarière dans la strate de 0-20 cm de

profondeur. Le sol de chaque fouille (550 à 600 g par fouille) est récupéré dans un seau puis mélangé pour constituer un échantillon composite (6,6 kg à 7,2 kg) de 12 prélèvements élémentaires. Ce mélange est transposé dans un sachet en polyéthylène codifié selon la zone, le champ et la répétition. Tout le matériel est rincé à l'eau puis désinfecté avec de l'eau de javel 10 % à 12° avant de passer d'un échantillon à un autre. Trente-six échantillons de sols ont été collectés pour les trois zones en raison de 12 échantillons par zones. Ces échantillons de sol ont servi pour les analyses physico-chimiques, l'étude moléculaire de la diversité des CMA et la sélection des souches compétantes de CMA. La caractérisation physico-chimique a été faite (Voko., 2014) et les données figurent dans les tableaux donnés plus hauts. Des échantillons de sols ont été prélevés également sur les parcelles expérimentales après labour pour des analyses pédologiques. Trois échantillons composites ont été prélevés par parcelles. Pour chaque échantillon composite 10 échantillons ont été prélevés. Dans chaque champ échantillonné, des prélèvements de terre en des points distants de 20 m ont été faite sur un parcours en zigzag et la terre de chaque fouille a été récupérée dans un sachet en polyéthylène, puis mélangée pour constituer un échantillon composite. Les prélèvements se sont faits à l'aide d'une tarière de 20 cm de diamètre. Avant de passer d'un champ à un autre la tarière est désinfectée avec de l'eau de javel.

8.4. Méthode d'analyse physico-chimique des sols d'expérimentations

Pour chaque échantillon de sol des sites d'expérimentation, 100 g ont été prélevés et envoyés à l'état brut au Laboratoire de Pédologie de l'Institut National Polytechnique-Félix Houphouët-Boigny pour des analyses de sol. Les paramètres chimiques et physiques ont été déterminés. Le pH (pH eau), la *CEC* et les bases échangeables permettent une détermination rapide de la situation physico-chimique des sols. Au plan agronomique, ces paramètres, notamment le pH, sont d'abord des indicateurs de l'état de fertilité d'un sol. Ils renseignent sur sa dégradation chimique éventuelle due à une désaturation, la présence de certains sels toxiques, son activité microbienne, et sur son niveau d'assimilabilité des éléments par la plante (Pansu et Gautheyrou, 2003).

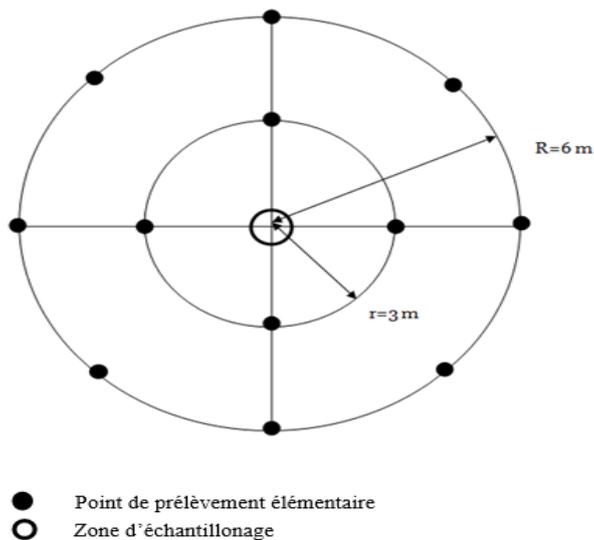


Figure 13. Schéma du prélèvement des échantillons de sol (Haung et cares, 2004)

8.4.1. pH eau

Le pH eau a été mesuré par électrométrie à l'aide d'un pH-mètre, sur une suspension de 20 g de sol dans 50 ml d'eau distillée. Pour le rapport sol/eau, la norme 1/2,5 (NF X-31-103, 1988) a été retenue. La gamme de solubilité la plus intéressante se situe entre 5,5 et 6,5 (Pansu et Gautheyrou, 2003). Les normes d'interprétation du pH d'après le référentiel pédagogique de l'INRA (INRA, 1995) ont été définies par classe :

- Sha: sols hyper-acides (pH inférieur à 3,5),
- Sta : sols très acides (pH compris entre 3,5 et 5,0),
- Sa: sols acides (pH compris entre 5,0 et 6,5),
- Sn: sols neutres (pH compris entre 6,5 et 7,5),
- Sb: sols basiques (pH compris entre 7,5 et 8,7),
- Stb : sols très basiques (pH supérieur à 8,7).

8.4.2. Bases échangeables et Taux de saturation

Les bases échangeables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+) et la CEC (cmol.kg^{-1}) ont été mesurées sur une suspension de KCl après agitation mécanique de 5 g d'échantillon de sol. La norme d'interprétation de la capacité d'échange cationique (CEC) (Calvet et Villemin, 1986) ont été définies par classe:

- Ctf : sols à CEC très faible (CEC inférieur à 5 cmol/kg),
- Cf : sols à CEC faible (CEC compris entre 5 et 10 cmol/kg),
- Cm : sols à CEC moyenne (CEC comprise entre 10 et 15 cmol/kg),
- Ce : sols à CEC élevée (CEC comprise entre 15 et 20 cmol/kg)

Cte : sols à CEC très élevée (CEC supérieure à 20)

La capacité d'échange cationique est déterminée comme le degré ou la possibilité d'un substrat de stocker les éléments nutritifs (Duchaufour, 1977).

Le taux de saturation en base V a été calculé avec la formule suivante : $V = (\sum[X]/CEC) \cdot 100$ avec x : ion et [X] : concentration de l'ion. Le taux de saturation (Soltner, 1992) du complexe absorbant est un précieux indicateur pédologique et agronomique quant à la richesse chimique du sol. Toutefois, il faut se garder d'établir une équivalence automatique entre taux de saturation et niveau trophique. Car le niveau trophique (fertilité) du sol dépend de beaucoup d'autres facteurs tels que : la teneur en argile, la structuration, l'aération, le pH, la profondeur d'enracinement, la teneur en bases, en N, P, K etc. Selon la valeur du taux de saturation, on peut ajouter un adjectif au nom du sol : Saturé (95-100%) ; quasi-saturé (80-95%) ; meso-saturé (50-80%), oligo-saturé (30-50%), désaturé (15-30%) et hyper-désaturé (0-15%).

8.4.3. Matière organique

Les analyses de la matière organique ont pris en compte le carbone organique total et l'azote total. Les sols ont été tamisés puis séchés à température ambiante. Le carbone organique total a été mesuré par voie humide à température de réaction de 120°C (Voko *et al.*, 2013). La matière organique (M.O) est calculée par convention internationale selon la relation suivante : $M.O (\%) = \text{carbone} \times 1,724$. La norme d'interprétation pour la matière organique est présentée. Elle se définit selon les classes suivantes :

Motp : < 1 Très pauvre en M.O

Mop : 1 à 2 Pauvre en M.O

Mom : 2 à 4 Moyenne en M.O

Mor : > 4 Riche en M.O

L'azote total a été déterminée par la méthode Kjeldahl (Mohammad et Flowers, 2004) qui consiste à attaquer à chaud la matière vivante par l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré en présence de catalyseurs (SO_4K_2 , SO_4Cu , Sélénium) ; puis la solution d'extraction est distillée avec un excès de soude et titrée par H_2SO_4 (1 N). La norme d'interprétation pour l'azote (Calvet et Villemin, 1986) est : sols très pauvres (proportion d'azote inférieur à 0,05 %), sols pauvres (proportion d'azote comprise entre 0,05 et 0,1 %), sols moyens (proportion d'azote comprise entre 0,1 et 0,5 %), sols riches (proportion d'azote comprise entre 0,15 et 0,25 %) et sols très riches (proportion d'azote supérieure à 0,25 %).

Le rapport C/N, déduit des valeurs du carbone et de l'azote totaux, fournit d'utiles indications sur l'évolution de la matière organique, de l'activité biologique du sol et la conduite de la fumure azotée. La répartition dans des classes est la suivante :

C-Nf : < 8 Faible= Décomposition rapide de la matière organique

C-Nn : 9 à 11 Normal= Bonne décomposition de la matière organique

C-Ne : >12 Elevé= Activité biologique est réduite et la minéralisation rencontre des difficultés.

Un C/N inférieur à 8 est faible ; un C/N compris entre 8 et 12 est normal ; un C/N supérieur à 12 est fort (Gagnard *et al.*, 1988). Plus le rapport C/N est élevé (>12), plus l'activité biologique est réduite et la minéralisation rencontre des difficultés. Cela traduit des conditions d'anaérobiose et d'acidité excessive.

8.4.4. Phosphore

Le phosphore (P), essentiellement à l'état d'orthophosphates liés au calcium (apatites), est un élément majeur relativement peu abondant dont les teneurs moyennes estimées sont de l'ordre de 0,1 %. On détermine en général le P total et le P assimilable (Pansu et Gautheyrou, 2003). Le P total, comprenant les phosphores organique et inorganique, est déterminé après minéralisation totale par voie humide en attaquant 5 g de sol broyé avec un réactif composé d'acide perchlorique 60 %, d'acide nitrique d = 1,4 et d'eau distillée. Le P assimilable correspondant au phosphore biologique le plus disponible (forme labiles organiques et inorganiques et P microbien) est extrait dans le bicarbonate de sodium à pH 8,5 (Voko *et al.*, 2013). Les normes d'interprétation du phosphore assimilable (Calvet et Villemin, 1986) selon les classes sont les suivantes :

StpP : < 30 sol très pauvre en phosphore

spP : 30 – 50 sol pauvre en phosphore

smpP : 50 - 100 sol moyennement pauvre en phosphore

srP : 100 – 200 sol riche en phosphore

8.4.5. Texture du sol

Afin de déterminer la texture des différents sols, la granulométrie a été établie par la méthode « Pipette Robinson » (Anderson et Ingram, 1993). L'analyse granulométrique a pour objectif de classer les particules minérales du sol par catégories de diamètre. Les proportions des

classes de particules ont été définies selon la norme française NF X31 107 (Baize, 2000) et les textures ont été déterminées grâce au triangle textural USDA (Soil Survey Staff, 1998).

8.5. Méthode d'analyse physico-chimique des échantillons de feuilles de manioc

Pour chaque expérimentation aussi bien en serre et qu'au champ, 30 g de feuilles de manioc ont été prélevés et après séchage à l'étuve à 80°C envoyés au Laboratoire de Pédologie de l'Institut National Polytechnique-Félix Houphouët-Boigny pour des analyses chimiques.

8.5.1. Dosage du Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ et P dans les échantillons végétaux

Pour le dosage des éléments minéraux, 0,5 g de poudre végétale a été finement broyée et séchée à l'étuve à 60° dans un creuset en porcelaine de 30 ml. Il a été ensuite placé dans le four à moufle réglé à 450°-500 °C pendant 6 à 8 heures. La cendre obtenue est refroidie sur une feuille d'amiante et 5 ml de solution d' HNO_3 ont été ajoutées. L'ensemble est chauffé à siccité au bain-marie ou sur une plaque chauffante à température modérée. L'échantillon est ensuite replacé dans le four à moufle et chauffé à 400°C pendant 10-15 minutes jusqu'à obtention de cendres blanches ou grises. Il est ensuite refroidi sur une feuille d'amiante. 10 ml d'HCLN sont ajoutées et la solution est filtrée dans un ballon de 50 ml. Le creuset ainsi que le filtre sont rincés avec 10 ml d'HCLN. L'opération est répétée trois fois et complétée au trait avec une solution d'HCl 0.5N. Le filtrat est dosé pour déterminer la teneur en Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ et P.

8.5.2. Dosage de l'azote total dans les échantillons végétaux (Méthode Kjeldhal)

Le matériel végétal (1g) est écrasé et tamisé à l'aide d'un tamis de 40 μm . L'échantillon est fractionné en 2 portions contenant 1 mg N (25 à 50 mg de sol). Les portions sont emballées dans du papier pelure. Elles sont placées dans un matras de kjeldhal de 50 ml. 2 ml d'eau distillée sont ajoutées et le tout est laissé reposer pendant 30 minutes. Il faut ajouter à cela 0,02 g de ponce broyée, 1,33 g de catalyseur K_2SO_4 et 1,5 ml d' H_2SO_4 concentré. Le tout est chauffé modérément sur une rampe d'attaque jusqu'à disparition de l'écume. Ensuite porter à ébullition douce afin que l' H_2SO_4 se condense au tiers de la longueur du col de la fiole. Le cas échéant les dépôts présents sur le col sont éliminés avec quelques gouttes de H_2SO_4 à 30 %. Après clarification (30 min environ) le tout est maintenu pendant une demi-heure. Il est laissé refroidir. Il faut ajouter et doucement, 10ml d'eau déionisée et continuer à agiter jusqu'à mise en suspension des particules non dissoutes. L'alambic est rincé à la vapeur pendant 5 minutes et laissé chauffer le liquide. Ensuite il faut introduire 5 ml de l'indicateur à

l'acide borique dans un erlenmeyer de 50 ml et le placer au dessus du réfrigérant de l'appareil à distillation, l'extrémité de ce dernier se trouvant à 4 cm de la surface du liquide. Il faut relier la fiole contenant la solution minéralisée et diluée au condensateur. Il faut ensuite ajouter 10 ml de solution $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ - NaOH (50 %) dans l'entonnoir. Il faut ouvrir le robinet lorsque le niveau de NaOH n'atteint plus qu'un ml ; rincer rapidement avec 15 ml d'eau. Lorsque le niveau atteint à nouveau 1 à 2 ml, fermer le robinet. Il faut démarrer immédiatement la distillation en fermant le tuyau d'évacuation et ouvrir le robinet d'arriver de la vapeur. Lorsque le niveau de l'erlenmeyer atteint 35 ml, arrêter la distillation en fermant d'abord le robinet d'arrivée puis en ouvrant le robinet d'évacuation.

8.6. Méthode d'études des communautés de CMA des échantillons de sols

8.6.1. Extraction et purification d'ADN de 1g de sol par Fast Prep

L'objectif est d'extraire l'ADN génomique total à partir de 1 g de sol équivalent sec. Il s'agit d'obtenir des ADN non dégradés et suffisamment purifiés pour qu'ils ne contiennent pas d'impuretés interférant avec les réactions enzymatiques. La méthode Fast Prep (Dequiedt *et al.*, 2011 ; Terrat *et al.*, 2012 ; Plassart *et al.*, 2012) est utilisée pour l'extraction d'ADN des organismes du sol au niveau de la Plateforme Génosol-INRA/Dijon. La lyse est mécanique (agitation en présence de billes) et chimique : dénaturation des protéines et des lipides par l'action d'un détergent (SDS) à haute température suivie d'une précipitation des complexes protéines/lipides-SDS dénaturés. Pour séparer l'ADN des protéines dénaturées, la déprotéinisation consiste à précipiter les protéines en présence d'une forte concentration en sel. Les précipités sont séparés par centrifugation à haute vitesse. Le surnageant limpide contient les ADNs. Une précipitation à l'isopropanol et un lavage à l'éthanol permet de récupérer un ADN dit « sale » c'est-à-dire contenant encore des éléments polluants (protéines, sucres, macromolécules phénoliques, acides humiques, etc.). L'ADN obtenu est ensuite quantifié sur gel agarose 1% par électrophorèse avant d'être purifié sur colonne Microspin de PVPP ensuite par un Kit GeneClean® Turbo (MP Bio). Les ADNs sales du sol sont purifiés. La purification se fait par deux méthodes successives et différentes. La première étape est un tamis moléculaire réalisé sur colonne Microbiospin (Biorad) de PVPP (Ranjard *et al.*, 2003). Le PVPP (PolyVinyl PpolyPirrolidone), polymère de haut poids moléculaire réalise un complexe avec les composés phénoliques et les alcaloïdes. La seconde étape est une colonne d'exclusion fournie dans le kit GeneClean® Turbo (MP Bio). Ces deux étapes sont complémentaires pour permettre d'éliminer d'éventuels éléments polluants tels les protéines, sucres, macromolécules phénoliques, acides humiques.

L'ADN en solution aqueuse obtenu est conservé à -20°C en DNAtèque et est la base des futures analyses moléculaires.

8.6.2. Nested PCR suivie du séquençage haut débit Illumina Miseq

La PCR gigogne (van Tuinen *et al.*, 1998) nous a permis d'amplifier l'ADN ribosomique des champignons endomycorhiziens du sol des trente-six échantillons de sol prélevés. Cette méthode consiste à amplifier l'ADN, dans un premier temps à l'aide d'amorces universelles, puis à l'aide d'amorces spécifiques aux champignons mycorhiziens à arbuscules. L'ADN extrait est amplifié via une nested PCR en utilisant les amorces eukaryotes universelles LR1 [5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAGGA-3'] et NDL22 [5'-TGG TCC GTG TTT CAA GAC G-3'] dans la première amplification. Dans le cas de notre étude, la première amplification effectuée à l'aide des amorces eukaryotes universelles LR1 et NDL22, cible les domaines D1 et D2 de la grande sous-unité ribosomale (van Tuinen *et al.*, 1998). Pour la deuxième PCR les amorces spécifiques aux gloméromycètes FLR3 (5'-TTG AAA GGG AAA CGA TTG AAG T-3') et FLR4 (5'-TAC GTC AAC ATC CTTAAC GAA-3') (Golotte *et al.*, 2004; van Tuinen *et al.*, 1998) amplifie la région D2 de la sous unité 28S de l'ADNr (LSU-D2). Pour les deux PCR, le milieu réactionnel est composé pour un échantillon de 18 µl du mélange PCR, plus 2 µL d'ADN. L'ADN est dilué au 1/10 de l'extrait ADN initiale du sol pour la PCR1 et au 1/100 du produit de la PCR1 pour la PCR2. Le mélange PCR est composé de 4 µL tampon 10 * concentrés (MP Biomédical), 1µL dNTP (1 mM), 1µL LR1 (100 µM), 1µL NDL22 (100 µM), 0,2 µL Taq polymérase (MP Biomédical, 15U/µL), 11 µL d'eau ultra-pure stérile. La réaction d'amplification se fait dans un thermocycleur en utilisant le programme suivant : une dénaturation pendant 5 min à 95 °C, suivie de 30 cycles de 94 °C (1 min), 58 °C (30 sec), 72 °C (45 sec), 72 °C pendant 5 min et 25° C pendant 1sec. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %) dans un tampon TAE (Tris 40 mM pH 7,8, acide acétique 20 mM, EDTA 2 mM) et la visualisation des bandes d'amplification se fait sous ultraviolets après coloration du gel au bromure d'éthidium. La taille des molécules à résoudre est donnée par un marqueur de taille (1Kb plus DNA Ladder-invitrogen). La taille des fragments espérés pour la première PCR avec les amorces LR1 et NDL22 est 750 bp et 350 bp pour la deuxième paire d'amorces FLR3-FLR4. Le séquençage haut débit Illumina a été fait au niveau de la plateforme génomique de l'INRA de Toulouse Midi-Pyrénées. Pour chaque échantillon 30ng/µl de produits PCR2 dans un volume de 50 µl sont utilisés. Les opérations successives ont été faites : dosage au nanodrop, contrôle qualité (nanodrop + Fragment Analyzer),

réalisation du pool équimolaire, qPCR automatisée, analyse et enfin le séquençage avec la plateforme Illumina Miseq (Metzker, 2010).

8.6.3. Analyse bio-informatique des séquences obtenues

L'analyse bio-informatique des séquences de sols obtenues s'est fait au laboratoire d'Agroécologie de Dijon selon le pipeline adapté défini par Balint et collaborateurs, 2014. Ce pipeline comprend un ensemble de procédures ayant pour but (1) d'assurer la qualité des séquences ; (2) assembler par paire les données issues du NGS (reads) ; (3) un demultiplexage solide; (4) l'extraction de la zone informative LSU; et (5) l'identification des OTUs des CMA. La qualité des séquences est assurée par l'assemblage des reads et la suppression des reads de faible qualité, la suppression des chimères, le clustering. L'appariement des reads Forwards et reverse séquencés est important pour reconstituer complètement la région LSU et par la suite réaliser un demultiplexage solide. Cette région hautement variable la LSU fait l'objet du blast (Nilsson *et al.*, 2010). Les reads sont groupés en OTUs en utilisant des séquences similaires à 97% (clustering) avant d'entamer les études phylogénétiques et de diversités écologiques. Les analyses de séquences ont été faites avec les bases de données NCBI et MAARJAM et les analyses phylogénétiques ont été faites avec les logiciels MEGA 6.06 en utilisant la neighbor-joining method (Saitou et Nei, 1987).

8.6.4. Analyses de la diversité α et β des CMA associés au manioc

La diversité α a été calculée avec les indices de Chao1, la réciproque de Simpson, l'indice de Shannon-Wiener et l'indice d'équitabilité de piélou. Une étape de normalisation des données a été appliquée avant analyses de la diversité. Chaque ensemble de données a été sous-échantillonné au plus petit nombre de lectures obtenu pour un ensemble de données. Cette normalisation a été réalisée en utilisant QIIME. Pour estimer asymptotiquement la richesse des CMA de chaque site, les OTU observées (S) et l'indice Chao1 ont été calculés par analyse de courbes de raréfaction. Ces analyses ont été construites avec le pipeline QIIME. L'indice de Simpson ($H' = \frac{1}{\sum p_i^2}$) et celui de Shannon-Wiener ($H' = -\sum p_i \cdot \ln p_i$) (p_i abondance relative de la i ème espèce) sont calculés pour estimer la diversité des CMA par l'approche métagénomique. Aussi, l'équitabilité des communautés a été évalué par l'indice d'équitabilité de piélou ($J' = H' / \ln S$). Le nombre de séquences attribuées à chaque OTU a été considéré comme un estimateur de l'abondance des espèces moléculaires. On a effectué une ANOVA pour évaluer l'effet des zones agroécologiques sur la diversité des communautés de champignons mycorrhiziens. L'analyse de la diversité β a été estimée avec l'indice de

dissimilarité de Bray-Curtis. Les indices de dissimilarité de Bray-Curtis (Manguran, 2004) ont été calculés avec le logiciel XLSTAT d'évaluation 18.07.

8.7. Méthode de sélection, d'identification des CMA d'intérêts et production d'inoculum mycorhiziens (Technologie de « Pot culture »)

8.7.1. Piégeage des sols des champs avec le manioc Yavo

Les échantillons de sols collectés dans les trois zones agroécologiques (Azaguié, Yamoussoukro et Abengourou) considérées comme des zones importantes de production de manioc en Côte d'Ivoire ont été utilisés pour le piégeage (Kouadio *et al.*, 2011). Dans les sols directement échantillonnés, toutes les spores ne sont pas toujours présentes ou sont rares. Il est donc nécessaire d'utiliser ces sols comme inoculum en vue de permettre une apparition éventuelle de toutes les spores. La variété de manioc Yavo plante cible de cette technologie d'endomycorhization a été choisie comme plante-hôte (Figure 14). Ce choix se justifie par le fait que toutes les spores initialement trouvées dans les sols des champs ne sont pas forcément associées au manioc. Elles peuvent aussi être attribués aux plantes adventices. Ce bio-essai, permet, ainsi, d'obtenir des spores de tout âge effectivement associées au manioc en qualité et en quantité pour des études de systématique, étude moléculaire et pour initier des cultures mono-spécifiques pour la production d'inoculum (Morton, 1993). Des boutures de manioc de 25 cm désinfectées à l'eau de javel 12° à 10% puis rincées une fois pendant 2 minutes à l'eau stérile ont été utilisées pour l'expérimentation. Trente six pots de culture de 10L correspondant aux 36 échantillons de sols collectés ont été mis en culture en serre. Quatre pots témoins contenant du substrat stérile ont été également réalisés. Le substrat de culture est composé de 2kg de sols des champs associés à 8kg d'un mélange Terreau +sable de mer (3/1 ; v/v). Ce mélange Terreau + sable de mer (3/1; v/v) a été stérilisé à 120 °C, 2 Kg/cm², 1h deux jours successifs (Bâ *et al.*, 2000). Chaque pot de culture a reçu 10kg de substrat de culture. Des boutures de manioc de 25 cm de la variété TME-7 « Yavo » résistante à la mosaïque ont été utilisées pour l'expérimentation. Les pots ont été mis en culture dans une serre (température comprise entre 27 et 30°C et humidité comprise entre 75 et 85 %). Les pots ont été arrosés une fois chaque deux jours (400 ml d'eau : capacité au champ des pots de culture) pendant 4 mois. Aucun amendement n'est apporté aux plantes. Après 4 mois de culture, 50 g de sol de chaque échantillon séché à l'air libre est utilisé pour extraire les spores selon la méthode de tamisage humide décrite par Gerdemann et Nicolson (1963) puis une identification morphologique sommaire des morphoespèces.



Figure 14. Plants de manioc en serre inoculés avec les sols prélevés au champ

8.7.2. Dénombrement des spores

La procédure de dénombrement utilisée est celle recommandée par la collection INVAM, 2016 (<http://www.invam.caf.wvu.edu>). Elle permet de déterminer l'abondance (ou densité) des spores. Le contenu de chaque béccher est transféré dans des boîtes de Pétri et observé à la loupe binoculaire au grossissement 40x. Les spores sont premièrement comptées dans au moins 10 champs de vision. S'il se trouve en moyenne moins de quatre spores par champ (faible densité de spores), un comptage exhaustif est fait dans tout le contenu du béccher. Dans le cas contraire, le dénombrement des spores est effectué dans 40 champs de visions et multiplié par 289 (nombre total de champs de vision dans la boîte de Pétri). Les spores issues du tamis de 45 µm de diamètre de maille ont été dénombrées suivant cette procédure. Pour les faibles densités de spores, le comptage est alors réalisé dans 1 ml de suspension de spores à quatre reprises, dans un verre à montre. Le nombre total de spores est obtenu en multipliant par 10 le nombre moyen de spores contenu dans le millilitre de suspension. Les spores des tamis de 90 et 125 µm de diamètre de mailles ont été ainsi dénombrées. La densité (spores.g⁻¹) de spores est alors déterminée pour chaque échantillon de sol. Elle se définit comme étant le nombre de spores dans 1g de sol sec.

$$\text{Densité (spores/g)} = \frac{\text{Nombre de spores}}{\text{Quantité de sol}}$$

8.7.3. Extraction des spores abondantes après piégeage avec du manioc

Les CMA ont été extraits dans 50 g de sol du substrat de culture après quatre mois de culture en pot sous arrosage normale par la méthode du tamisage humique de Gerdermann (Gerdermann et Nicolson, 1963) décrite plus bas. L'abondance relative et l'ubiquité des morphoespèces ont

été déterminées. L'abondance relative (Ar) des morphoespèces identifiées a été déterminée suivant la formule :

$$Ar (\%) = 100x \frac{\text{Nombre de spores d'un genre ou d'une morphoespèce}}{\text{Nombre total de spores}}$$

L'ubiquité traduite par le calcul de la fréquence d'observation de chaque espèce (Fs) est calculée suivant la formule :

$$Fs (\%) = 100x \frac{\text{Nombre d'échantillons contenant une espèce}}{\text{Nombre total d'échantillons}}$$

La fréquence d'observation traduit le nombre de fois qu'une morphoespèce a été trouvée divisé par le nombre totale de champs. Chaque morphoespèce dominante est mis en culture en présence de mini-boutures de manioc dans des pots de 2 L contenant uniquement du substrat stérilisé (Terreau+Sable de mer (3: 1 v/v)).

8.7.4. Culture monosporelle des souches abondantes et ubiquitaires issues des sols échantillonnés

Chaque morphoespèce dominante issue du piégeage est mise en culture en présence de mini-boutures de manioc dans des pots de 2 L contenant uniquement du substrat stérilisé (Terreau+Sable de mer (3: 1 v/v)). Dix spores pour chacune des morphoespèces abondantes sont mises en culture dans des pots de 2 L pendant une période de 4 mois. Ces pots sont arrosés une fois chaque deux jours avec 400 ml d'eau courante. Aucun amendement n'a été fait à ce niveau. A la fin du cycle de développement les morphoespèces définitives seront retenues sur la base de la fréquence d'observation, l'abondance relative et leur taux de colonisation de la racine de manioc durant le bioessai.

8.7.5. Estimation de la colonisation racinaire des plants de monoculture

Les racines fines de manioc prélevées le 4^e mois après mise en culture, ont été lavées à l'eau courante dans un tamis de 500 µm de diamètre de maille puis découpées en fragments de 1cm de long. Ces fragments racinaires ont été immergés dans une solution de 15 à 20 ml de KOH (10 %) et chauffés sur une plaque chauffante à 80 °C pendant 1 heure. Les racines très pigmentées ont été immergées dans une solution de KOH additionnée d'eau oxygénée (15 ml d'eau + 1 ml KOH + 1 ml d'eau oxygénée à 30 %) pendant 5 minutes au maximum. Elles sont ensuite chauffées dans du HCL à 1 % à 80 °C pendant 1 h, puis rincées à l'eau courante. Elles sont ensuite réchauffées à 80°C pendant 30 mn dans le colorant bleu trypan à 0,05 % (Voko *et al.*, 2013). Le traitement avec le KOH a pour but d'éliminer le cytoplasme des cellules. Ainsi,

on obtient une meilleure coloration des vésicules et arbuscules avec le bleu trypan. 10 fragments de racines par plante sont déposés dans du glycérol (50 %) entre lame et lamelle (Kormanik et McGraw, 1982), soit au total 30 fragments par traitement. Les fragments sous microscope sont observés et évalués conformément à la gamme de classe indiquée (Figure 15) par Trouvelot *et al.* (1986). Ces classes donnent une estimation rapide du niveau de colonisation de chaque fragment de racine et l'abondance des arbuscules. Les taux d'infection sont cotés de 0 à 5. Chaque cote correspond à une classe de taux d'infection Cote 0 : 0 % ; cote 1 : 0 à 1 % ; cote 2 : 1 % à 10% ; cote 3 : 10 % à 50 % ; cote 4 : 50 % à 90 % ; cote 5 : > 90 %. Ainsi, La fréquence F(%) et l'intensité I(%) de mycorhization sont calculées selon les formules proposées par Trouvelot *et al.*, 1986 :

$$F(\%) = 100x \frac{\text{Nombre de fragments mycorhizés}}{\text{Nombre total de fragments observés}} \quad I(\%) = \frac{95N5 + 70N4 + 30N3 + 5N2 + N1}{\text{Nombre total de fragments observés}}$$

N5 = nombre de fragment correspondant à la cote 5 ; N4 = nombre de fragment correspondant à la cote 4 ; N3 = nombre de fragment correspondant à la cote 3 ; N2 = nombre de fragment correspondant à la cote 2 ; N1 = nombre de fragment correspondant à la cote 1

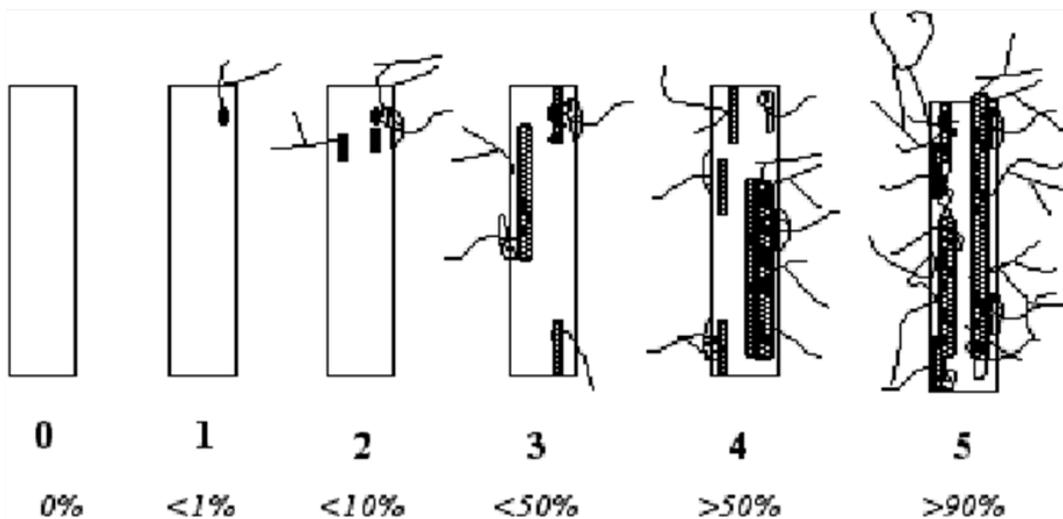


Figure 15. Taux d'infection racinaire selon Trouvelot *et al.*, 1986

8.7.6. Identification morphologique des souches isolées

L'identification morphologique des CMA est basée sur l'observation de certains paramètres morphologiques. Il s'agit, entre autres, de la taille (diamètre de la spore, épaisseur des parois, épaisseur des couches des parois) mesurée grâce à la règle du microscope, la forme, la couleur, les structures d'attache de la spore, les structures des parois externe et interne. La

coloration dans le réactif de Melzer constitue aussi un paramètre d'identification morphologique. Lors du dénombrement, les spores ont été prélevées à l'aide d'une pince ou d'une seringue Eppendorf surmontée d'un embout, puis montées entre lame et lamelle dans du PVLG (Polyvinyl Lacto-glycérol) ou dans un mélange de PVLG + de réactif de Melzer (1 :1, v/v) ; le réactif de Melzer est préparé à partir de 100 g d'hydrate de chlore, 1,5 g d'iode, 5 g d'iodure de potassium et 100 g d'eau distillée. Les spores peuvent être cassées afin de mettre en évidence les structures de leurs parois. Les montages ainsi réalisés ont été observés sous un microscope optique Motic BA310 avec caméra intégrée.

Les spores observées et décrites ont été identifiées à l'aide de la clé de Schenck et Pérez (1990), des collections d'espèces d'INVAM (2013) et Blaszkowski (2013) http://invam.caf.wvu.edu/myc_info et <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jbaszkowski/>.

8.7.7. Identification moléculaire des morphoespèces sélectionnées

Pour chaque morphoespèce sélectionnée, 10 spores sont collectées dans un tube eppendorf de 1,5 ml pour l'extraction de l'ADN à l'aide du kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Une première PCR est faite en utilisant les amorces LR1 et LSUmAr (Stockinger *et al.*, 2009; Van Tuinen *et al.*, 1998). Une seconde PCR utilisant les amorces LR1 et LSUmBr (Kruger *et al.*, 2009; Stockinger *et al.*, 2010) est ensuite faite en 30 cycles (95 °C 5 min; 94° C 1 min; 58 °C 30 s; 72 °C 45 s; 72 °C 5 min; 25 °C 1 sec). Les produits PCR sont contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Pour le séquençage, les produits PCR ont été purifiés avec le kit (Nucleospin Extract II) et clonés avec le TOPO TA Cloning ® Kit (Invitrogen).

Trois clones positifs ont été envoyés pour le séquençage. L'analyse des séquences a été faite par blast avec les bases de données NCBI et MAARJAM et les analyses phylogénétiques ont été faites avec le logiciel MEGA 6.06 en utilisant la méthode neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987).

8.7.8. Production d'inoculum avec les morphoespèces locales sélectionnées

Chacune des espèces de CMA finalement sélectionnée a été mise en culture individuellement et en complexe en présence de la variété de manioc Yavo pendant 4 mois dans un substrat stérile (Terreau+ sable de mer ; 3 :1, v/v). L'évolution des paramètres de mycorhization a été suivie durant ces quatre mois. L'inoculum obtenu à la fin du cycle de 4 mois est sous la forme de 50g de substrat stéril contenant des fragments de racines mycorhizées, des hyphes et environ 350 spores. Les caractéristiques chimiques du substrat sont (pH = 7.1; matière organique = 2.81 %; Azote = 0.15 % ; phosphore disponible = 55 ppm) et pour le sable (pH = 6.7; matière organique = 0.17 %; azote = 0.01 %; phosphore disponible = 2 ppm).

8.8. Evaluation en serre de l'efficacité des CMA natifs sur la croissance, la nutrition minérale, les *Meloidogynes* et le stress hydrique du manioc

8.8.1. Méthode d'évaluation de l'impact des espèces de CMA isolées sur la croissance et la nutrition minérale du manioc

8.8.1.1. Dispositif expérimental et condition de culture

L'expérimentation a été faite selon un dispositif en bloc factoriel complètement randomisé avec trois combinaisons différentes des souches de CMA sélectionnées (S1, S2 et S1S2) et le contrôle S0. L'expérience en serre a été faite durant quatre mois. En général les feuilles de manioc et les racines sont bien développées au bout de quatre mois. A ce stade, le stress biotique et abiotique peut affecter les paramètres de croissance du manioc (Cock, 1988). Par conséquent, toutes les expériences ont été conduites sur quatre mois sur les plantes de manioc. Les pots de culture ont été remplis avec 8 kg de substrat (sol + sable; 3: 1, v / v). Chaque pot contient une plante qui a été arrosée tous les jours avec 400 ml d'eau sans engrais. Dans toutes les expériences, les racines fines de manioc ont été échantillonnées quatre mois après culture pour évaluer la colonisation mycorhizienne.

8.8.1.2. Evaluation de l'efficacité des souches de CMA sur la croissance et la nutrition minérale du manioc

L'évaluation de l'efficacité de l'inoculation des CMA sur la croissance et la nutrition minérale du manioc a pris en compte la mesure de la taille des plantes de manioc (cm), la surface foliaire (cm²), la matière fraîche et sèche totale (g). La matière fraîche des plantes a été déterminée à l'aide d'une balance OHAUS et la matière sèche après séchage à 80°C pendant 48 heures au four. La teneur en éléments minéraux de 8 feuilles de manioc (nitrate, phosphore, potassium, magnésium et calcium) a été déterminée après quatre mois de culture par la méthode de minéralisation et calcination utilisant un instrument Tecator model 40 (Sidney, 1984). La teneur en nitrate a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (1883). Trois répétitions par mesure ont été faites.

8.8.2. Méthode d'évaluation de l'impact des espèces de CMA isolées sur la tolérance du manioc aux nématodes à galles du genre *Meloidogyne* spp.

8.8.2.1. Préparation de l'inoculum de nématodes

Des galles racinaires de tomates ont été prélevées dans des champs infestés. Elles ont été ensuite mises en culture sous serre en présence de plants de tomate. L'inoculum de nématodes est obtenu à partir d'oeufs et de juvéniles de nématodes issus de galles racinaires de tomate

cultivée en serre durant 3 mois. L'inoculum est préparé en découpant finement les galles de racines de tomates qui sont immergées dans une bouteille schoot contenant du NaClO 0,25 % et secouée pendant 2 minutes (Hussey et Baker, 1973). Les oeufs et les nématodes juveniles (J2) sont recueillis dans un tamis de 25 μm après un passage dans un tamis de maille 40 μm . Ils sont rincés à l'eau courante, concentrer puis compter à l'aide de loupe binoculaire X40. Ils sont recueillis dans des tubes de 15 ml. Une suspension de 1000 nématodes (oeufs + juveniles) a été utilisée pour l'inoculation des plantes de manioc.

8.8.2.2. Dispositif expérimental et condition de culture

Une expérience d'une durée de quatre mois a été menée selon un dispositif en bloc factoriel complètement randomisé 4x2x3 avec trois répétitions. Deux facteurs définissent les traitements des plants de manioc : (i) chaque souche sélectionnée a été utilisée soit seul (S1, S2) soit en coinoculation (S1S2) et un contrôle non inoculé S0. (ii) L'inoculation des nématodes à galles s'est faite en deux phases : une inoculation différée CMA puis un mois après apport des nématodes (I4) et une inoculation simultanée CMA-nématodes (I2). Chaque pot de culture a été rempli avec 8 kg de substrat (sol + sable; 3: 1, v / v). Chaque pot contient une plante qui a été arrosée tous les jours avec 400 ml d'eau sans engrais. Des aliquotes de 1000 nématodes (juvéniles + œufs) en suspension dans l'eau distillée ont été chargés dans des trous de 5 cm de profondeur équidistants autour de chaque plante.

8.8.2.3. Evaluation de l'impact de l'inoculation mycorhizienne sur la population de nématodes à galles.

Le dénombrement des nématodes et des œufs s'est fait à la loupe binoculaire respectivement selon la méthode de coloration à la fuchsine acide pour les nématodes et à l'éosine pour le second (Daykin *et al.*, 1985). Le contenu total en polyphénols des racines des plantes inoculées avec les nématodes a été estimé selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de Folin et Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Un gramme de racines fraîches a été homogénéisé dans 10 ml d'éthanol à 80 % à l'aide de mortier et d'un pilon. Le mélange a été centrifugé à 10 000 rpm pendant 20 min et le surnageant a été collecté. Le surnageant a été séché et le résidu dissous dans 5 ml d'eau distillée. Des aliquots de 0,2 ml ont été recueillis dans des tubes puis complétés à 3ml. Pour chaque échantillon, 0,5 ml de folin-Ciocalteu a été ajouté puis 2 ml de Na₂Co₃ à 20 %. La teneur des racines en polyphénols a été obtenue après deux heures d'incubation à température ambiante par mesure de l'absorbance à 765 nm. La quantification a été faite en se basant sur la courbe standard de l'acide gallique en mg/L équivalent acide gallique (mg/L EAG). Le dosage s'est fait à l'aide d'un spectrophotomètre

Jenway 7315. La biomasse (matière fraîche totale, matière sèche totale) et la teneur en éléments minéraux des feuilles ont été déterminées quatre mois après culture.

8.8.3. Impact de l'inoculation des souches locales de CMA sur la tolérance du manioc au stress hydrique.

8.8.3.1. Dispositif expérimental et condition de culture

Pour estimer l'effet du déficit hydrique induit par un arrêt d'arrosage sur plusieurs paramètres morpho-physiologiques et agronomiques du manioc en serre. Les plants de manioc ont été cultivés en serre dans des pots de dix litres. La suppression de l'apport en eau a été faite à un stade de développement crucial pendant que les autres plants ont été arrosés normalement à la capacité au champ. La capacité au champ a été déterminée dans les pots par la méthode de saturation et de redistribution de l'eau du sol (Colombani *et al.*, 1973). Une expérimentation d'une période de quatre mois a donc été conduite selon un dispositif factoriel 4x2x6 en bloc complètement randomisé avec trois répétitions. Deux facteurs ont été définis pour le traitement des plantes : (i) chaque espèce sélectionnée a été utilisée soit seule (S1, S2) soit ensemble (S1S2) et un témoin non inoculé (S0) ; (ii) le régime hydrique appliqué ; toutes les plantes ont été arrosées normalement à la capacité au champ durant deux mois après le planting (2 MAP). Chaque traitement a ensuite été subdivisé en deux lots. Le premier lot a reçu un arrosage adéquat à la capacité au Champ (CC=400 ml) chaque deux jours jusqu'au 4^e mois pendant que le deuxième lot a été soumis à un déficit hydrique en recevant pendant deux mois une quantité d'eau correspondant à 10 % CC. Le nombre total de plants était de 48.

8.8.3.2. Evaluation de l'impact du stress hydrique et des CMA locaux sur les paramètres agronomiques et agro-physiologiques du manioc

La colonisation mycorhizienne des plantes traitées a été déterminée mensuellement selon la méthode de Trouvelot (1986). La surface foliaire a aussi été mesurée le 3^e et le 4^e mois. La surface foliaire (S) moyenne mensuelle a été déterminée à l'aide de la formule de Connor, (1981): $S (m^2) = \sum_{i=1}^n 1.26L^{1.789}$ (L= Longueur du lobe médian de la feuille) adaptée à la variété de manioc « Yavo ».

Les biomasses fraîche et sèche ont été pesées après quatre mois de culture. La biomasse sèche est obtenue après passage à l'étuve à 80 °c pendant 48 heures. La teneur en éléments minéraux des feuilles a été déterminée (Sidney, 1984) dans les feuilles de manioc à 4 mois après mise en culture. Les feuilles de manioc sont déshydratées à 65 °C pendant 24 heures

dans un four à moufle. Le dosage du P dans les échantillons s'est fait après minéralisation par calcination. La teneur en nitrate a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (1883).

La teneur en pigments chlorophylliens (a) a été déterminée par la méthode d'Arnon (1949). Dans cette méthode, 1 g de feuilles de manioc est broyé dans 10ml d'éthanol à 80 %. Le broyage est répété plusieurs fois afin d'extraire la totalité des pigments chlorophylliens. L'extrait obtenu est filtré avec du papier watman. La densité optique de la totalité des filtrats obtenus est mesurée à 663 nm et 645 nm à l'aide du spectrophotomètre Jenway 7315. La teneur en chlorophylle a est : chl a = 12 (Do 663) – 2,67 (Do 645). Les concentrations en chlorophylle sont exprimées en mg/g.

Pour la teneur en sucre soluble des feuilles (TS), la méthode au phénol de Dubois et collaborateurs (1956) a été utilisée. Selon cette méthode, à 100 mg de matière fraîche, placés dans des tubes à essai, on ajoute 3ml d'éthanol à 80 % pour l'extraction des sucres. On laisse à température ambiante pendant 48 heures. Au moment du dosage, les tubes sont placés dans une étuve à 80 ° C pour faire évaporer l'alcool. Dans chaque tube, on ajoute 20 ml d'eau distillée. C'est la solution à analyser. Dans des tubes à essai propre, on introduit 1 ml de la solution à doser auquel on ajoute 1 ml de solution de phénol à 5 % (le phénol est dilué dans de l'eau distillée). Les tubes sont soigneusement agités. On ajoute alors 5 ml d'acide sulfurique concentré à l'aide d'une burette dont le jet tombe brutalement sur la surface du liquide. La température atteint alors environ 110 °C. Après une agitation rapide (agitateur vortex) les tubes sont maintenus pendant 45 mn à 5 °C. Après un séjour de 30 mn à l'obscurité, les mesures d'absorbance sont effectuées à une longueur d'ondes de 485 nm à l'aide du spectrophotomètre Jenway 7315. Enfin les résultats des densités optiques sont rapportés sur un courbe étalon des sucres solubles (exprimée en glucose).

8.9. Evaluation en champ de l'efficacité de souches locales *Acaulospora colombiana* et *Ambispora appendicula* et industrielles *Rhizophagus intraradices* sur les performances agronomiques du manioc.

8.9.1. Dispositif expérimental et condition de culture

La variété de manioc utilisée sur les deux sites Duokro et Yamoussoukro est la variété YAVO (TME 7). C'est l'une des variétés les plus utilisées par les producteurs. Elle fait aussi l'objet de vulgarisation sur le plan national. Les champignons mycorhiziens à arbuscules utilisés sont de deux types. Les inocula fongiques locaux faits à base des souches indigènes *Acaulospora colombiana* (S1), *Ambispora appendicula* (S2) et du complexe des deux souches *Acaulospora*

colombiana-Ambispora appendicula (S1S2) d'une part. D'autre part, un inoculum commercial Mykepro P501 fait à base de la souche étrangère *Rhizophagus intraradices*.

Pour l'évaluation de l'efficacité d'inocula à base de CMA, un dispositif factoriel en bloc complètement randomisé (bloc de Fisher) avec deux facteurs a été mis en place (Figure 16). Le premier facteur est le type d'inocula mycorhizien avec cinq traitements : *Acaulospora colombiana*, *Ambispora appendicula*, le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula*, l'inoculum commercial Mykepro P501 et le témoin non inoculé. Le deuxième facteur est la fertilisation chimique NPK avec deux traitements : les sous-parcelles avec fertilisant NPK (15 g N -10 g P-25 g K par plant) et celles sans fertilisant NPK. La fertilisation chimique s'est faite un mois après le planting.

Dix traitements combinés (objets) ont été considérés. Les dix traitements sont les suivants : **T1**-*Ambispora appendicula* ; **T2**-*Acaulospora colombiana* ; **T3**-Complexe *Ambispora appendicula-Acaulospora colombiana* ; **T4**-Mykepro P501 ; **T5**-Mykepro P501 + NPK ; **T6**-*Ambispora appendicula* + NPK ; **T7**- *Acaulospora colombiana* + NPK ; **T8**- Complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* + NPK ; **T9**-NPK et **T10**-Témoin. Chaque traitement a trois répétitions pour un total de 30 parcelles élémentaires.

Il y a trois blocs par parcelle, chaque bloc contient dix traitements. Des billons dont les caractéristiques sont : largeur à la base: 80 cm, hauteur: 20 cm, allée entre deux billons : 20 cm ; ont été réalisés sur chaque bloc suivant les courbes de niveau. Les blocs sont rangés perpendiculairement à la pente du terrain. Chaque sous parcelle comprend 40 plantes dont 16 plantes inoculées et 2 lignées de 24 plants de bordure pour limiter l'effet de bordure. La densité de plantation est de 10 000 plantes/ha donc 2500 plants pour un quart d'hectare. Le dispositif expérimental est le même pour les deux sites.

Des boutures de manioc de 25 cm avec 5 à 6 nœuds pour une épaisseur de 1,5 à 2,5 cm sont utilisées pour le planting. Les boutures sont coupées diagonalement. Des trous de 20 cm de profondeur sont creusés et les boutures sont enterrées. Aucune irrigation et aucun traitement pesticide n'ont été faits sur ces deux sites. L'itinéraire technique classique pour la culture manioc a pour la suite été appliqué jusqu'à la récolte.

L'inoculation des plants avec les CMA s'est fait dès la plantation. Les plantes ont été inoculées avec 100 g/plante d'inocula locaux pour les CMA indigènes contenant 1000 spores + racines mycorhizées. Pour l'inoculum commercial 6 g/plante contenant 3000 spores + racines mycorhizées ont été apportés en fumure de fond qui correspond au triple de la dose

appliquée en zone tempérée. 16 Kg d'inoculum locaux et 1,5 Kg de Mykepro P501 ont été utilisés pour les deux parcelles. Quant aux fertilisants chimiques NPK, ils sont apportés au collet de la plante pour un total des deux parcelles de 15 Kg de N, 10 Kg de P et 25 Kg de Mg. Dans le cadre de cette étude des billons ont été réalisés suivant les courbes de niveau dont les caractéristiques sont : largeur à la base : 80 cm, hauteur : 20 cm, allée entre deux billons : 20 cm). Les caractéristiques des parcelles élémentaires, les quantités d'inoculum et d'engrais minéraux apportés sont données respectivement dans les Tableaux (9 et 10).

8.9.2. Suivi et collecte des données

L'évaluation de l'efficacité des inocula consistera à déterminer l'effet des inocula sur la croissance, la nutrition minérale et le rendement du manioc. Il est important de préciser également que les mesures ont été destructives à certains stades du développement sur les deux parcelles. En ce qui concerne le manioc, la hauteur du plant, les paramètres de mycorhization, les biomasses aériennes et souterraines ont été évaluées à chaque trimestre pendant 9 mois. Le premier trimestre correspondant à la première phase de développement foliaire et le début de la tubérisation (accumulation des réserves d'amidon). Le deuxième trimestre correspondant à la deuxième phase du développement de la plante au cours de laquelle la croissance est plus rapide. A partir du troisième trimestre on a débuté la récolte. Après la récolte, la détermination des niveaux en éléments minéraux des feuilles comme l'azote, le phosphore, le potassium, le sodium et le calcium a été effectuée pour les plants de manioc. 30 g de feuilles de manioc ont été prélevés par traitement et analysés après séchage à l'étuve à 80 °c. Le dosage du Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ et P dans les échantillons végétaux se fait par minéralisation par calcination. Le dosage de l'azote total dans les échantillons végétaux s'est fait par la méthode de Kjeldhal (Bremner, 1982). A chaque trimestre, 9 plantes par traitement sont collectées puis la hauteur, la biomasse racinaire et aérienne fraîche sont mesurés respectivement avec une règle et une balance OHAUS. La Biomasse racinaire et aérienne sèche est obtenue après séchage à l'étuve jusqu'à avoir une masse constante pendant une semaine à 80 °C. Les biomasses racinaires et aériennes sont découpées en morceaux pour faciliter le séchage.

Les paramètres de mycorhization, l'intensité et la fréquence de mycorhization ont été évalués. Les racines fines des plants de manioc pour chaque traitement ont été prélevées pour l'estimation de la colonisation mycorhizienne. Les racines sont lavées à l'eau distillée et coupées en fragments de 1-2 cm de longueur. Ces racines sont éclaircies dans du KOH (10 %) et colorées au bleu trypan dans lactoglycerol (Voko *et al.*, 2013). Dix fragments de racines par

plants sont déposés dans du glycérol 50 % entre lame et lamelle sous microscope optique (Neeraj *et al.*, 1990). Les racines colonisées sont observées et évaluées selon les classes définies par Trouvelot et collaborateurs (1986). Les taux de mycorhization sont groupés pour chaque répétition d'un traitement pour les études statistiques. La récolte de racines tubéreuses fraîches est faite le troisième trimestre. Les racines tubéreuses sont pesées et la masse est ramenée en t/ha pour déterminer le rendement. Lorsque qu'une différence significative est observée au niveau du rendement par rapports aux parcelles sans CMA. Le gain (Gr) en rendement comparativement aux parcelles non traitées et à la fertilisation chimique NPK a été calculé. La formule utilisée est la suivante :

$$\text{Gr (\%)} = 100 * \left(\frac{\text{Rendement avec CMA} - \text{Rendement sans CMA (témoin ou NPK)}}{\text{Rendement sans CMA (témoin ou NPK)}} \right)$$

Toutes les méthodes sont similaires pour les deux sites.

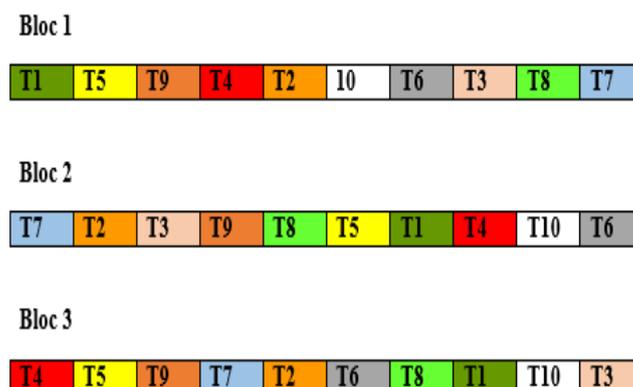


Figure 16. Schéma du dispositif expérimental

Tableau 9. Les caractéristiques des parcelles

Activités	Manioc
Préparation du terrain	Billonnage
Densité	1 m x 1 m
Disposition des plants	12 x 3
Nombre de plant par parcelle	40
Nombre total de plants par parcelle	1200 plants
Surface totale par parcelle	36 m ²
Surface totale	1080 m ²

Tableau 10. Quantité d'inoculum et d'engrais chimiques

Plantes	Manioc
Plantes à inoculées par parcelle	16 plants à inoculés par parcelle
Quantité <i>Acaulospora colombiana</i> (100g±1000 spores+racines)	8 kg par champ (16 kg pour les 2 champs)
Quantité <i>Ambispora appendicula</i> (100g± 1000 spores+ racines)	8 kg par champ (16 kg pour les deux champs)
Quantité N (15g/plant)	15 kg pour les 2 champs
NPK P (10g/plant)	10 kg pour les 2 champs
Kcl (25g/plant)	25 kg pour les 2 champs
Quantité Mykepro pour 16 plants (96 plants par site)	576 g d'inocula par site
Quantité Mykepro pour 40 plants (240 plants par site)	1440 g d'inocula par site

8.9.3. Calendrier de culture du manioc sur le site de la ferme de l'INP-HB

La parcelle de la ferme de l'ESA (INP-HB) a été mise en place en juin (Tableau 11) et a respecté le calendrier cultural suivant :

Tableau 11. Calendrier cultural sur le site de Yamoussoukro (INP-HB)

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Défrichage	X	X										
Préparation-sol			X	X	X							
Bouturage							planting					
Entretien										Collecte 1		Collecte2
Récolte												Collecte 3

8.9.4. Calendrier de culture du manioc sur le site de Duokro

La parcelle paysanne de Duokro a été mise en place un mois après celle de la ferme de l'ESA-INP-HB (Tableau 12). Elle a suivi le calendrier cultural suivant.

Tableau 12. Calendrier culturel du manioc sur le site de Duokro

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Défrichage	X	X										
Préparation- sol			X	X	X							
Bouturage								planting				
Entretien										Collecte 1		
Récolte		Collecte 2			Collecte 3							

8.9.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel STATISTICA version 7.1. Un test multivarié (MANOVA) a été fait. Il a permis de tester dans un premier temps l'effet des 10 traitements appliqués aux parcelles de manioc sur l'ensemble des paramètres agronomiques (Matière fraîche totale, rendement et hauteur des tiges) par la combinaison des variables dépendantes, en incluant les effets d'interaction. Ensuite pour tester la significativité des traitements sur chaque paramètre agronomique et sur la colonisation mycorhizienne des racines, des analyses de variance à un facteur (ANOVA) ont été utilisées. Le test PPDS (Plus Petite Différence Significative) de Fischer a été utilisé pour déterminer lesquels de ces traitements sont différents des autres à $P < 0.05$. Des classifications hiérarchiques par dendrogramme ont été faites pour apprécier l'efficacité des traitements sur l'ensemble des paramètres agronomiques. Des Analyses en Composantes Principales (ACP), des matrices de corrélations de Pearson, ont été utilisées pour tester l'impact des paramètres physico-chimiques sur la diversité des CMA. Elles ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT version d'évaluation 18.07.

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 9 : RESULTATS

9.1. Etude moléculaire de la diversité des communautés de CMA associés au manioc dans trois zones agroécologiques en Côte d'Ivoire et impact des propriétés phyco-chimiques des sols sur leur structuration.

9.1.1. Analyse des séquences des zones agroécologiques

Un nombre total de 479641 séquences a été obtenu après traitement bioinformatique des séquences initiales (Tableau 13). La zone d'Azaguié a le plus grand de nombre de séquences (36,42 %) suivie d'Abengourou (32,56 %) et de Yamoussoukro (31,02 %). Au total 1409 OTUs (Operational Taxonomic Unit ou Unité Taxonomique Opérationnelle) sont associés à la rhizosphère du manioc. La zone agroécologique d'Azaguié a le plus grand nombre d'OTUs (951) suivie de Yamoussoukro (908) et d'Abengourou (809).

9.1.2. Répartition des OTUs entre les différentes zones agroécologiques

La répartition des OTUs entre les trois zones (Figure 17) révèle que ces trois zones ont 440 OTUs en commun. Les sites de Yamoussoukro et Azaguié ont le plus grand nombre d'OTU en commun. Néanmoins en ce qui concerne les OTUs spécifiques à chaque zone agroécologique, Yamoussoukro a le plus grand nombre d'OTUs spécifiques avec 218, suivi d'Azaguié 194 et d'Abengourou 178. Les courbes de raréfaction des OTUs ont atteint les asymptotes dans tous les cas, démontrant que l'effort de séquençage était suffisant pour couvrir toute la diversité présente dans chaque zone agroécologique (Figure 18).

Tableau 13. Nombre de séquences et d'Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) par zone agroécologique

Zone agroécologiques	Nombre de séquences	Fréquence des séquences (%)	Nombre d'OTUs*
Azaguié	174677	36,42	951
Abengourou	156201	32,56	809
Yamoussoukro	148763	31,02	908
Total	479641	100	1409

Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs)

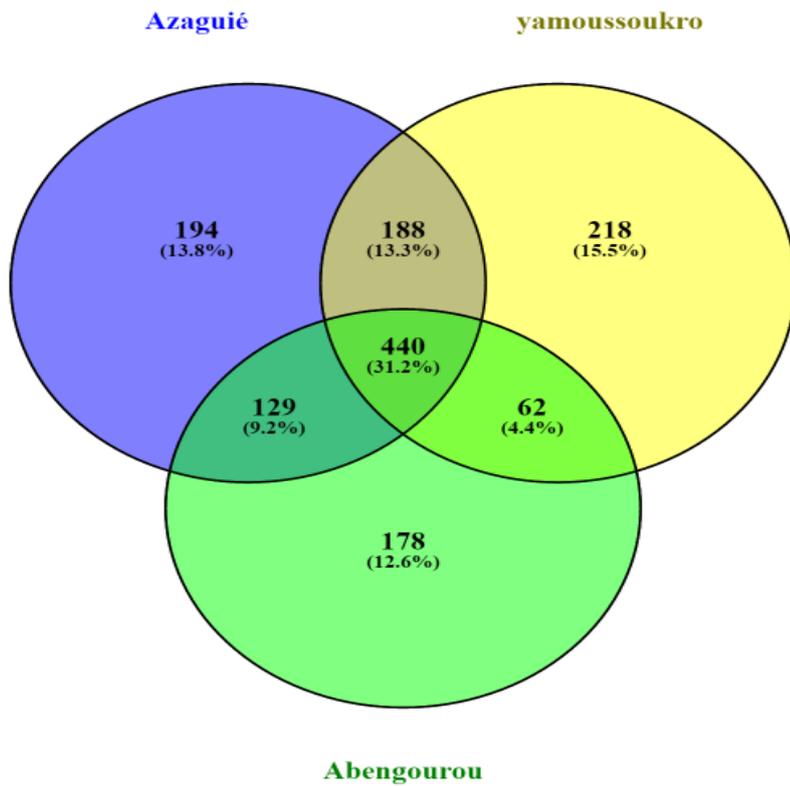


Figure 17. Diagramme de Venn de la répartition des Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) entre les trois zones

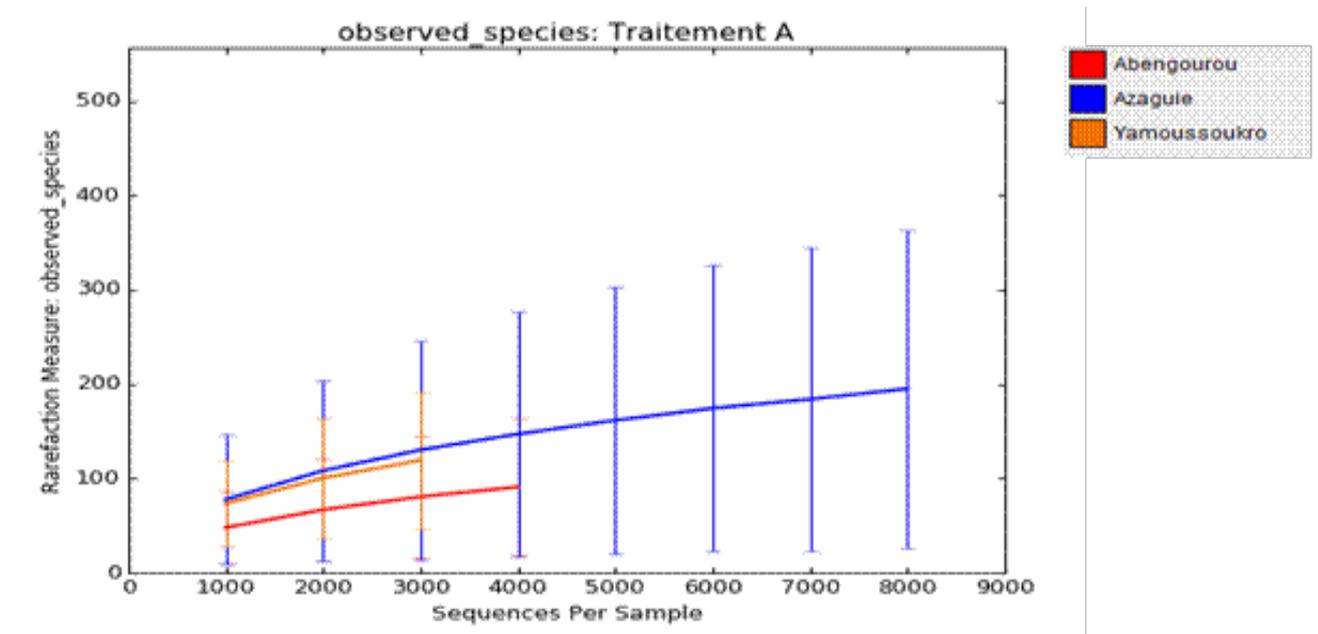


Figure 18. Courbe moléculaire de raréfaction des Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) pour les trois zones agroécologiques.

9.1.3. Analyse phylogénétique des OTUs majoritaires

Vingt-un OTUs représentent 75 % de la diversité des CMA observés dans la rhizosphère du manioc (Figure 19). Ces 21 OTUs majoritaires sont répartis en cinq genres que sont *Rhizophagus*, *Funneliformis*, *Septoglosum*, *Glomus* et *Acaulospora*. Le genre *Rhizophagus* est composé de trois espèces : *Rhizophagus* sp, *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus irregulare* ; le genre *Funneliformis* d'une espèce *Funneliformis mosseae* pareil pour *septoglosum* avec *septoglosum* sp et *glomus* avec *glomus* sp. Le genre *Acaulospora* avec *Acaulospora spinosa* et *Acaulospora colombiana*. Les OTU 2 (*Rhizophagus irregulare* : 20,8 %) ; OTU 5 (*Rhizophagus* sp : 10,24 %), OTU 11 (*Glomus* sp : 6,44 %), OTU 14 (*Funneliformis mosseae* : 5,67 %), OTU 1800 (*Rhizophagus* sp : 5,34 %), OTU 33 (*Septoglosum* sp : 3,8 %), et l'OTU 2215 (*Acaulospora colombiana* : 3,65 %) sont majoritaires et représentent environ 56 % de l'ensemble des OTUs.

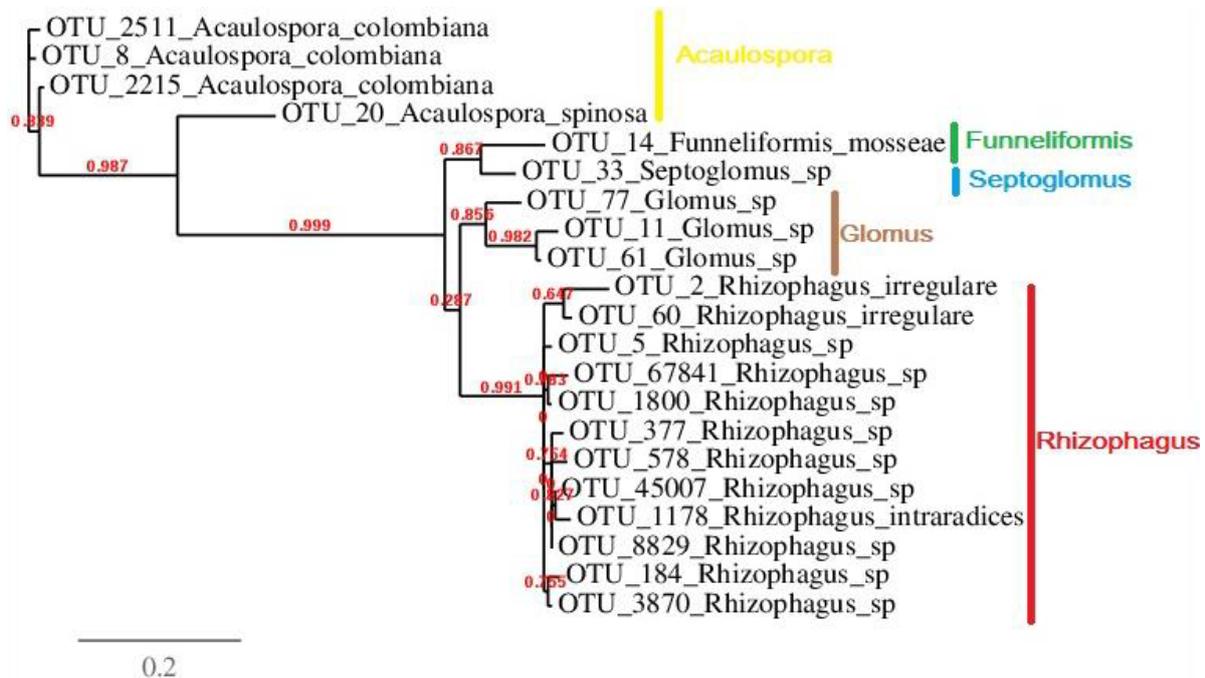


Figure 19. Arbre phylogénétique des Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) majoritaires représentant 75 % de la diversité des gloméromycètes basée sur les séquences LSU-D2 rDNA.

9.1.4. Richesse spécifique des CMA associés au manioc

9.1.4.1. Genres de CMA et nombre d'OTUs associés au manioc

97,67 % des OTUs majoritaires (Tableau 14) rencontrés dans la rhizosphère du manioc appartiennent à 5 genres comme précédemment décrit, le genre majoritaire est le genre *Rhizophagus* avec 65,27 % suivi de *glomus* 11,7 %, *Acaulospora* 9,52 %, *Funneliformis* 5,75 % et *Septoglomus* 5,44 %. Les genres qui contiennent le plus grand nombre d'OTUs sont *Rhizophagus*, *glomus* et *Acaulospora*. A cela s'ajoute 2,33 % qui sont des genres minoritaires avec 7 représentants. 1,92 % des OTUs n'ont pas pu être identifiés au niveau du genre.

Tableau 14. Genres de champignons mycorrhiziens à arbuscules et nombre d'Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTOs ou OTUs) associés au manioc.

Nombre de genres	Genre	Nombre d'OTU*	Fréquence (%)	Nature
5	<i>Rhizophagus</i>	1076	65,27	Majoritaires (97,67 %)
	<i>Glomus</i>	121	11,69	
	<i>Acaulospora</i>	122	9,52	
	<i>Funneliformis</i>	9	5,75	
	<i>Septoglomus</i>	28	5,44	
7	<i>Intraornatospora</i>	1	0,22	Minoritaires (2,33 %)
	<i>Paraglomus</i>	9	0,07	
	<i>Diversispora</i>	2	0,07	
	<i>Dentiscutata</i>	1	0,03	
	<i>Ambispora</i>	1	0,01	
	<i>Claroideoglomus</i>	14	0,007	
	<i>Racocetra</i>	2	0,001	
	Genres non identifiés	23	1,92	

OTU/UTO= Unité Taxonomique Opérationnelle

9.1.4.2. Espèces de CMA associés au manioc

Au total 25 espèces de CMA ont été trouvées associées à la rhizosphère du manioc (Tableau 15), parmi celles-ci 8 espèces jugées majoritaires représentent 96% de la diversité et 17 espèces minoritaires 4 % de la diversité. Ce sont *Rhizophagus* sp, *Rhizophagus irregulare*,

Glomus sp, *Acaulospora colombiana*, *Funneliformis mosseae*, *Septoglomus* sp, *Rhizophagus intraradices* et *Acaulospora spinosa*.

Tableau 15. Espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules associés au manioc

Nombre d'espèces	Espèces	Nombre d'OTU*	Fréquence (%)	Nature
8	<i>Rhizophagus</i> sp	655	37,11	Majoritaire (96 %)
	<i>Rhizophagus irregulare</i>	176	24,89	
	<i>Glomus</i> sp	119	11,66	
	<i>Acaulospora colombiana</i>	102	6,73	
	<i>Funneliformis mosseae</i>	1	5,67	
	<i>Septoglomus</i> sp	25	5,43	
	<i>Rhizophagus intraradices</i>	129	2,62	
	<i>Acaulospora spinosa</i>	12	1,9	
17	<i>Rhizophagus arbabicus</i>	116	0,64	Minoritaire (4 %)
	<i>Acaulospora</i> sp	4	0,51	
	<i>Acaulospora longula</i>	2	0,33	
	<i>Intraornatospora</i> sp	1	0,22	
	<i>Funneliformis</i> sp	7	0,07	
	<i>Paraglomus</i> sp	7	0,07	
	<i>Claroideoglomus</i> sp	15	0,07	
	<i>Acaulospora cavernata</i>	1	0,05	
	<i>Dentiscutata</i> sp	1	0,03	
	<i>Glomus deserticola</i>	2	0,02	
	<i>Ambispora appendicula</i>	1	0,01	
	<i>Diversispora aurantium</i>	1	0,01	
	<i>Septoglomus jasnowskiae</i>	3	0,004	
	<i>Racocetra fulgida</i>	1	0,001	
	<i>Paraglomus laccatum</i>	1	0,0004	
	<i>Acaulospora alpina</i>	1	0,0002	
	<i>Racocetra castanea</i>	1	0,0002	
Espèces non identifiées	25	1,9237		

OTU/UTO= Unité Taxonomique Opérationnelle

9.1.5. Richesse spécifique par zone agroécologique des genres et des espèces de CMA associés au manioc .

9.1.5.1. Zone agroécologique d'Abengourou

La communauté de CMA de la zone agroécologique d'Abengourou se regroupe dans 9 genres (Figure 20) et est dominée par les genres *Rhizophagus* (55,7 %), *Septoglo mus* (16,6 %), *Glomus* (13,9 %) et *Acaulospora* (7,4 %). Ces 4 genres représentent environ 93,6 % des individus. Dix-huit espèces ont été identifiées associées à la rhizosphère du manioc, ce sont *Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus* sp, *Septoglo mus* sp, *Glomus* sp, *Acaulospora spinosa*, *Acaulospora* sp, *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus arabicus*, *Funneliformis* sp, *Claroideoglo mus* sp, *Glomus deserticola*, *Diversispora aurantium*, *Acaulospora colombiana*, *Ambispora appendicula*, *Septoglo mus jasnowskae*, *Dentiscutata* sp, *Acaulospora cavernata* et *Funneliformis mosseae*. Les espèces les plus abondantes en termes de fréquence sont les suivantes : *Rhizophagus irregulare* (33,2 %), *Rhizophagus* sp (21,5 %), *Septoglo mus* sp (16,6 %), *Glomus* sp (13,8 %), *Acaulospora spinosa* (5,8 %), *Acaulospora* sp. (1,5 %).

9.1.5.2. Zone agroécologique de Yamoussoukro

Au niveau du site de Yamoussoukro, 10 genres ont été identifiés (Figure 21), parmi ceux-ci les plus abondants sont *Rhizophagus* (38,4 %), *Acaulospora* (22,6 %), *Glomus* (19,8 %) et *Funneliformis* (18,3 %). La zone de Yamoussoukro constitue sans doute l'une des zones les plus diversifiées avec une équitable répartition des espèces en somme 19 espèces sont identifiées. Ce sont *Rhizophagus* sp, *Acaulospora colombiana*, *Glomus* sp, *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus intraradices*, *Acaulospora longula*, *Rhizophagus arabicus*, *Intraornatospora* sp, *Septoglo mus* sp, *Dentiscutata* sp, *Ambispora appendicula*, *Funneliformis* sp, *Septoglo mus jasnowskae*, *Claroideoglo mus* sp, *Acaulospora cavernata*, *Acaulospora* sp, *Paraglo mus laccatum* et *Paraglo mus* sp. Parmi celles-ci les plus importantes sont *Rhizophagus* sp (22,8 %), *Acaulospora colombiana* (21,6%), *Glomus* sp (19,8 %), *Funneliformis mosseae* (18,3 %), *Rhizophagus irregulare* (9,5 %), *Rhizophagus intraradices* (5,2 %) et *Acaulospora longula* (0,7 %). Ces 7 espèces représentent 97,9 % de la diversité.

9.1.5.3. Zone agroécologique d'Azaguié

Le site d'Azaguié a enregistré le plus grand nombre de genres de CMA, au total 11 genres de CMA ont été identifiés (Figure 22). Cependant la grande majorité des espèces identifiées se retrouve dans le genre *Rhizophagus* (96,6 %) et en seconde position le genre *Glomus* (2,8 %).

Tous deux représentent donc 99,4 % de la diversité de la zone. Contrairement aux zones d'Abengourou et de Yamoussoukro, la zone d'Azaguié est dominée par un genre de champignon mycorhizien à arbuscule. Au niveau des espèces 19 espèces de CMA ont été identifiées, ce sont : *Rhizophagus* sp, *Rhizophagus irregulare*, *Glomus* sp, *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus arabicus*, *Paraglomus* sp, *Acaulospora cavernata*, *Acaulospora colombiana*, *Dentiscutata* sp, *Septoglomus* sp, *Acaulospora* sp, *Acaulospora spinosa*, *Claroideoglomus* sp, *Racocetra fulgida*, *Acaulospora alpina*, *Ambispora appendicula*, *Funneliformis mosseae*, *Racocetra castanea* et *Septoglomus jasnowskiae*. Les plus abondantes sont *Rhizophagus* sp (63,2 %), *Rhizophagus irregulare* (30,6 %), *Glomus* sp (2,8 %) et *Rhizophagus intraradices* (2,3 %).

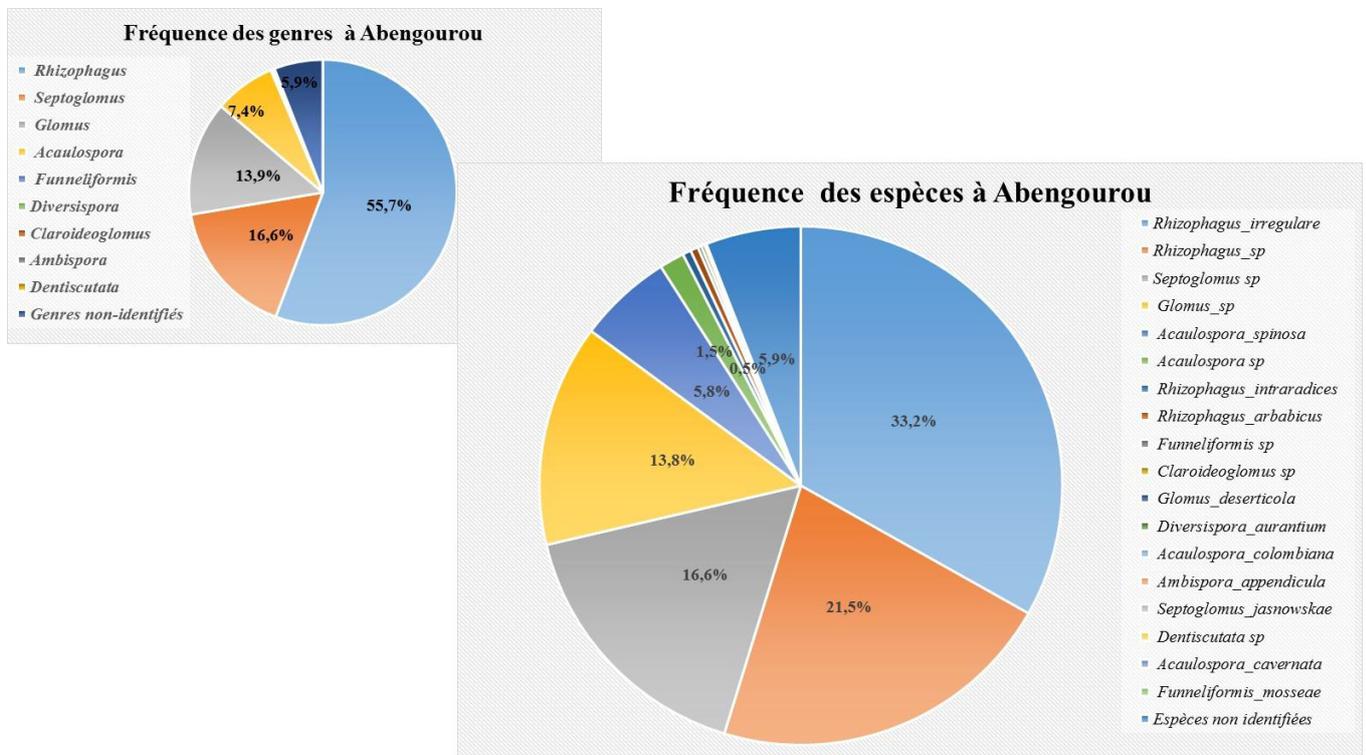


Figure 20. Répartition des genres et espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules dans la rhizosphère du manioc à Abengourou.

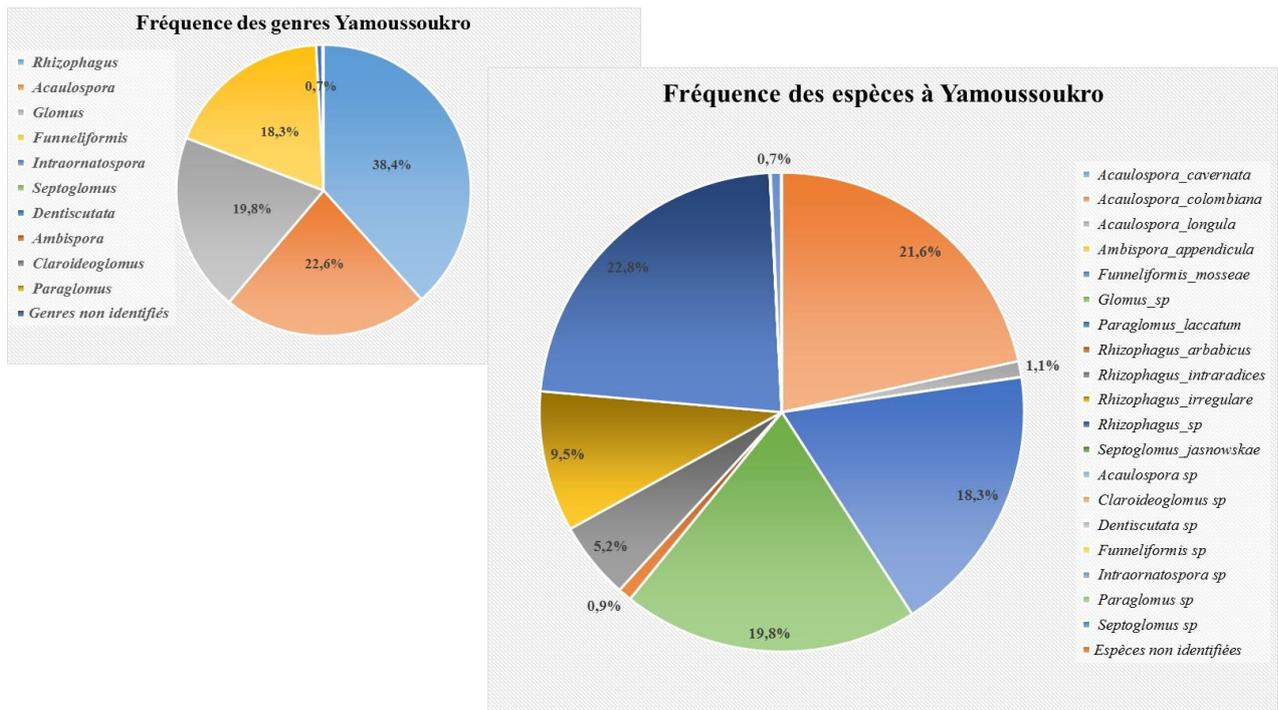


Figure 21. Répartition des genres et espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules dans la rhizosphère du manioc à Yamoussoukro

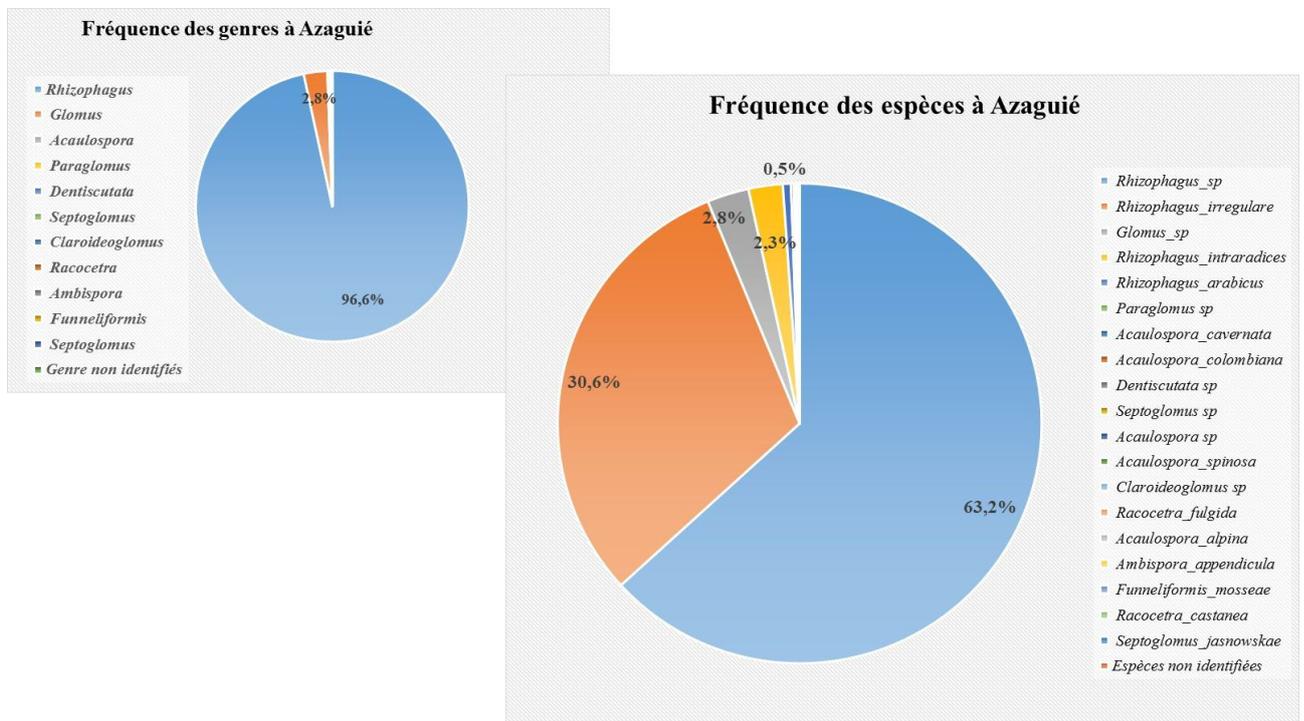


Figure 22. Répartition des genres et des espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules dans la rhizosphère du manioc à Azaguié

9.1.6. Distribution des espèces dans les trois zones agroécologiques

Au total 25 espèces de CMA (Tableau 16) sont associées à la rhizosphère du manioc, cependant certaines de ces espèces ne sont pas présentes simultanément dans toutes les 3 zones agroécologiques soit une ou deux zones pour certaines espèces (Tableau 16). Les espèces ubiquitaires présentes dans la rhizosphère du manioc sont les suivantes : *Acaulospora* sp, *Acaulospora cavernata*, *Acaulospora colombiana*, *Ambispora appendicula*, *Claroideoglossum* sp, *Dentiscutata* sp, *Funneliformis mosseae*, *Glomus* sp, *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus* sp et *Septoglossum* sp. Ces espèces diffèrent aussi en abondance, certaines sont abondantes ; et d'autres très abondantes voir dominantes. Les espèces présentes dans les 3 zones et abondantes sont *Acaulospora* sp, *Rhizophagus intraradices*, *Acaulospora colombiana*, *Funneliformis mosseae* et *Septoglossum* sp. Quant aux espèces présentes dans les trois zones et très abondantes voir dominantes nous pouvons citer *Glomus* sp, *Rhizophagus irregulare* et *Rhizophagus* sp.

Tableau 16. Distribution des espèces dans les trois zones agroécologiques

Espèces	Abengourou	Yamoussoukro	Azaguié
<i>Acaulospora sp</i>	++	+	+
<i>Acaulospora alpina</i>	-	-	+
<i>Acaulospora cavernata</i>	+	+	+
<i>Acaulospora colombiana</i>	+	+++	+
<i>Acaulospora longula</i>	-	++	-
<i>Acaulospora spinosa</i>	++	-	+
<i>Ambispora appendicula</i>	+	+	+
<i>Claroideoglomus sp</i>	+	+	+
<i>Dentiscutata sp</i>	+	+	+
<i>Diversispora aurantium</i>	+	-	-
<i>Funneliformis sp</i>	+	+	-
<i>Funneliformis mosseae</i>	+	+++	+
<i>Glomus deserticola</i>	+	-	-
Glomus sp	+++	+++	++
<i>Intraornatospora sp</i>	-	+	-
<i>Paraglomus laccatum</i>	-	+	-
<i>Paraglomus sp</i>	-	+	+
<i>Racocetra castanea</i>	-	-	+
<i>Racocetra fulgida</i>	-	-	+
<i>Rhizophagus arabicus</i>	+	+	+
<i>Rhizophagus intraradices</i>	+	++	++
<i>Rhizophagus irregulare</i>	+++	++	+++
<i>Septoglomus jasnowskiae</i>	+	+	-
<i>Rhizophagus sp</i>	+++	+++	++++
<i>Septoglomus sp</i>	++	+	+
<i>Espèces non identifiées</i>	++	+	+

Les espèces en gras sont ubiquitaires et abondantes.

- : Absent 0%
- + : Présent <1%
- ++ : Abondant [1-10% [
- +++ : Très abondant [20-30% [
- ++++: Dominant [40-60% [
- +++++: Très dominant [70-100%]

9.1.7. Indices de diversité

9.1.7.1. Diversité alpha

Plusieurs indices dit indices de dominance ont été calculés (Tableau 17) afin d'évaluer la diversité des communautés de CMA dans les zones agroécologiques. Les indices de Chao1, d'équitabilité, de Shannon et la réciproque de Simpson ont été calculés.

L'indice de Chao 1 prend en compte le nombre d'espèces rares dans un échantillon. Il a été choisi car il donne une estimation de la richesse spécifique. La zone d'Azaguié a l'indice de Chao1 le plus élevé 235,7, suivi de Yamoussoukro 157,4 et Abengourou 121,2. Cette zone comporte plus d'OTUs ou d'espèces rares c'est à dire présentes en faible abondance, suivi de Yamoussoukro et Abengourou. L'estimation de la richesse spécifique est plus importante à Azaguié où le nombre de phylotypes rares est le plus important. Les autres indices accordent plus d'importance aux espèces les plus fréquentes qu'à la richesse spécifique totale. Ils sont donc plus sensibles aux espèces les plus fréquentes qu'à la richesse spécifique totale.

Les indices de Shannon et de Simpson permettent de calculer le niveau de diversité d'espèces dans un milieu donné. La réciproque de Simpson permet de faire varier l'indice dans le même sens que la diversité : plus la diversité spécifique est élevée plus l'indice est fort. La zone d'Azaguié a le plus grand indice de simpson 6,54 significativement différent des zones de Yamoussoukro (4,74) et Abengourou (4,65). Cela traduit un nombre important d'OTU différents donc d'espèces différentes et abondantes même si ces espèces appartiennent en général à deux grands genres. La zone de Yamoussoukro suit avec une diversité et une abondance importante. Des trois zones, la zone d'Abengourou est celle qui compte le moins d'espèces.

Tout comme l'indice de Simpson, l'indice de Shannon-Wiener exprime la diversité d'une communauté en tenant compte de l'abondance et de la richesse en espèces. A la différence de l'indice de Simpson, celui de Shannon donne un « poids » à l'abondance. Une communauté présentant une espèce dominante aura un indice H plus petit qu'une communauté dans laquelle les espèces ont une abondance proche. L'indice varie entre 0 quand l'échantillon est constitué d'une seule espèce et tend vers $\ln S$ lorsque toutes les espèces ont la même abondance. Des trois zones, la zone d'Abengourou semble présentée une espèce dominante avec un indice de 2,26 suivi de la zone d'Azaguié (2,75) et enfin Yamoussoukro (2,9). Dans la zone de Yamoussoukro, on note une répartition équitable des abondances entre les espèces, la zone n'est pas dominée par une espèce. L'indice de diversité de Shannon H est souvent

accompagné de l'indice d'équitabilité J de Pielou. L'indice d'équitabilité de Pielou est de 0,43 pour Yamoussoukro, il est assez faible même s'il demeure supérieur à ceux de la zone d'Abengourou (0,36) et d'Azaguié (0,36). Dans cette zone la tendance est à une équirepartition des abondances entre les espèces contrairement aux zones d'Abengourou et d'Azaguié où certaines espèces semblent prendre le dessus sur les autres. En résumé, la zone d'Azaguié a la plus grande diversité, un grand nombre d'espèces rares et une ou deux espèces semblent dominantes. Ensuite concernant la zone d'Abengourou, elle a une faible diversité, moins d'espèces rares et une espèce semble dominante. Pour terminer la zone de Yamoussoukro a relativement beaucoup d'OTUs rare, une diversité moyennement importante et une équirepartition des abondances entre les espèces.

9.1.7.2. Diversité Beta

Les indices de dissimilarité de Bray-Curtis ont été calculés (Tableau 18). Ces indices montrent une différence dans la diversité des communautés de CMA entre la zone d'Abengourou et celle d'Azaguié (0,62); entre la zone d'Abengourou et celle de Yamoussoukro (0,83) et enfin entre la zone d'Azaguié et la zone de Yamoussoukro (0,84)

Tableau 17. Répartition de la diversité α au sein de chaque zone agroécologique

Zones	Chao 1	Équitabilité	Shannon	Reciproque de Simpson
Abengourou	121,2 ^b ±19,5	0,36 ^b ±0,01	2,26 ^c ±0,02	4,65 ^c ±0,02
Azaguié	235,74 ^a ±50,45	0,36 ^b ±0,02	2,75 ^b ±0,03	6,54 ^a ±0,03
Yamoussoukro	157,4 ^b ±24,6	0,43 ^a ±0,01	2,9 ^a ±0,03	4,74 ^b ±0,00
F	9,8379	17,062	379,28	7784,8
P	0,003	0,00031	0,000	0,00

Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

Tableau 18. Indice de dissimilarité de Bray-Curtis

Zone agroécologique	Abengourou	Azaguié	Yamoussoukro
Abengourou	0	0,626	0,832
Azaguié	0,626	0	0,840
Yamoussoukro	0,832	0,840	0
Liste des zones agroécologiques similaires (Seuil de dissimilarité = 0,95)			
Abengourou*Azaguié	0,62		
Abengourou*Yamoussoukro	0,83		
Azaguié*Yamoussoukro	0,84		

9.1.8. Relations entre les paramètres physico-chimiques et les communautés de CMA

9.1.8.1. Etudes des caractéristiques physico-chimiques des sols des trois zones agroécologiques

Les caractéristiques physico-chimiques des sols pour les 3 zones agroécologiques sont présentées dans le Tableau 19.

Les sols d’Azaguié se distinguent statistiquement des sols de Yamoussoukro et d’Abengourou. Les sols d’Azaguié sont des sols très acides (pH eau : 4,92) d’après le référentiel pédagogique de l’INRA (INRA, 1995) et statistiquement différents des sols de Yamoussoukro (pH eau : 6,25) et d’Abengourou (pH eau : 6,01) qui sont acides. Les sols d’Azaguié se distinguent des sols de Yamoussoukro et d’Abengourou avec des teneurs en sable fin élevées (34,7 %) avec un taux de saturation en base (13,03 %), une teneur en potassium (0,5 ppm) faible et statistiquement différent. La teneur en phosphore assimilable est faible. Le taux de saturation du sol qui constitue le taux de remplissage du complexe absorbant du sol en cations échangeables est faible. Le rapport C/N (7,35) est faible et traduit une activité biologique réduite du sol. Le sol est pauvre en matière organique M.O (2). Le sol est donc peu fertile, hyper désaturé, retient donc difficilement les cations et nécessitera de ce fait d’important apport d’intrants.

Les sols d’Abengourou sont riches en matière organique M.O (4,64), en azote (0,28 %), en limon fin (36,3 %), en phosphore total (412,2 ppm), riches en phosphore assimilable (32,97

ppm), en Ca^{2+} (1,52 cmol.kg⁻¹), en Mg^{2+} (1,52 cmol.kg⁻¹), en K^+ (0,17 cmol.kg⁻¹), en Na^+ (0,28 cmol.kg⁻¹), en CEC (20,21 cmol.kg⁻¹) et désaturés en base V (23,74%) par rapport à Azaguié et Yamoussoukro. Le rapport C/N (9,35) est normal et traduit une bonne activité biologique du sol et une bonne décomposition de la matière organique. Ces sols sont statistiquement différents des deux autres régions sur ces paramètres physicochimiques. Les sols de la région d'Abengourou sont assez fertiles.

En ce qui concerne les sols de Yamoussoukro, le pH eau (6,25) est acide, moyennement riche en matière organique M.O (2,11), moyennement riche en azote (0,14 %), pauvre en phosphore total (223,67 ppm) et en phosphore assimilable (20,06 ppm), néanmoins les teneurs en Ca^{2+} , K^+ , la teneur en sable grossier et le taux de saturation en base sont élevés (29,48 %). Le rapport C/N (8,65) est normal cela traduit une bonne activité biologique et une bonne décomposition de la matière organique. Les caractéristiques pédologiques des sols de Yamoussoukro sont intermédiaires des deux autres zones agroécologiques. Le pH eau, la teneur en M.O, la teneur en bases et en phosphore assimilable sont des paramètres physicochimiques qui discriminent les zones de ces trois zones agroécologiques de production du manioc.

Tableau 19. Caractéristiques physico-chimiques moyennes des sols des champs des trois zones agroécologiques

Zone	pH eau	C%	N%	C/N	Argile (%)	Limons fin (%)	Limons grossier (%)	Sable grossier (%)	Sable fin (%)
Abengourou	6,01 ^a ± 0,5	2,69 ^a ±0,64	0,28 ^a ±0,05	9,35 ^a ±1,3	6,68 ^a ± 7,9	36,3 ^a ±11,3	12,4 ^b ± 8,7	22,19 ^b ±6,9	22,4 ^c ± 4,4
Azaguié	4,92 ^b ±0,34	1,17 ^b ±0,22	0,17 ^b ±0,05	7,36 ^b ±2,4	5,48 ^a ± 3,9	19,66 ^b ±5,6	20,57 ^a ± 5,9	19,56 ^b ±5,9	34,7 ^a ± 7,5
Yamoussoukro	6,25 ^a ±0,58	1,22 ^b ±0,36	0,14 ^b ±0,03	8,65 ^{ab} ±1,93	5,21 ^a ±5,07	22,73 ^b ±6,8	13,66 ^{ab} ±10,7	29,26 ^a ±9,5	29,13 ^b ±5,6

Zone	M.O	P. total (ppm)	P. ass. (ppm)	Ca ²⁺ (cmol.kg-1)	Mg ²⁺ (cmol.kg-1)	K ⁺ (cmol.kg-1)	Na ⁺ (cmol.kg-1)	CEC (cmol.kg-1)	V%
Abengourou	4,64 ^a ±1,11	412,2 ^a ± 85,2	32,97 ^a ±16,1	2,7 ^a ±0,45	1,52 ^a ±0,36	0,17 ^a ±0,06	0,28 ^a ± 0,14	20,21 ^a ± 2,9	23,74 ^a ± 4,34
Azaguié	2,0 ^b ±0,4	214,75 ^b ±65,74	26,12 ^{ab} ± 7,6	0,5 ^c ±0,17	0,31 ^b ±0,16	0,06 ^b ±0,04	0,206 ^a ±0,12	10,77 ^b ± 5,6	13,03 ^b ± 6,9
Yamoussoukro	2,11 ^b ±0,63	223,67 ^b ±77,96	20,06 ^b ±7,35	1,65 ^b ±0,9	0,52 ^b ±0,25	0,17 ^a ±0,12	0,17 ^a ±0,09	9,7 ^b ± 3,74	29,48 ^a ± 13,2

Note: N, nitrate; P, phosphore; P. ass, phosphore assimilable; C, carbone; CEC, capacité d'échange cationique ; V%, taux de saturation en base. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

9.1.8.2. Corrélations entre la richesse spécifique des CMA et les paramètres physico-chimiques des zones agroécologiques de culture du manioc

La projection des variables (Figure 23-A) , des observations (Figure 23-B) ou des deux (Figure 23-C) dans le plan factoriel F1 et F2 a permis de représenter 36,21 % de l'information sur l'interaction entre les paramètres de diversité et les caractéristiques du sol des trois zones agroécologiques (Figure 23-C).

L'examen de ces plans factoriels a permis de visualiser l'existence de relations entre les genres de CMA et les paramètres physico-chimiques. Quatre axes F1, F2, F3 et F4 (Figure 23-D) représentant 53,7 % de l'information sont choisis et commentés. Sur la figure 23-A, sur la base des données de contributions les variables (Annexe 1) C, N, M.O, P. total, CEC, Ca²⁺, Mg²⁺ et le limon contribuent le plus à l'axe F1. Tandis que les variables *Rhizophagus*, *Funneliformis*, *Racocetra*, pH, P.ass, Ca²⁺, K⁺, V et la richesse spécifique contribuent à l'axe F2. Sur la Figure 23-B, sur la base des données de contributions les observations (Annexe 2) de la région d'Abengourou en général (Ab11, Ab12, Ab13, Ab21, Ab23, Ab41, Ab42, Ab43) contribue le plus à l'axe F1. Tandis que les observations d'Azaguié (Az22, Az23, Az31) et Yamoussoukro (Ya11, Ya23, Ya 41) contribuent plus à l'axe F2. Les variables (*Rhizophagus*, *Glomus*, *Intraorspora*, Na⁺, Argile, Sable) et les observations (Ya21, Ya31, Ya43, Az33, Az21) contribuent plus à l'axe F3. Pour terminer les variables (*Ambispora*, *Glomus*, pH, V, Argile) et les observations (Ab13, Ab32, Ya11, Ya31) contribuent plus à l'axe F4.

L'axe F1 oppose donc les sols de la zone d'Abengourou riche en C, N, M.O, P.total, CEC, Ca²⁺, Mg²⁺ et en limon aux sols des zones d'Azaguié et de Yamoussoukro. L'axe F2 caractérise les zones d'Azaguié et de Yamoussoukro avec une abondance des espèces du genre *Rhizophagus*, *Racocetra*, une richesse spécifique élevée et des teneurs en phosphore assimilable faibles. L'axe F3 caractérise des sols de Yamoussoukro et Azaguié riches en espèces de genre *Glomus* et *Rhizophagus* pour des teneurs du sol en sable élevées et pauvre en argile. L'axe F4 caractérise des sols d'Abengourou et de Yamoussoukro avec des teneurs en *Glomus* élevées pour des pH élevés. Les résultats de l'Analyse en Composantes Principales soutiennent donc l'existence de relation entre les caractéristiques du sol et les communautés mycorhiziennes.

Ces relations ont été confirmées par le calcul de la matrice de corrélation de Pearson (Tableau 19) entre la diversité et les paramètres physico-chimiques. Dans le plan factoriel F1*F2, des corrélations significatives au seuil de 5 % existent entre les espèces appartenant au genre

Rhizophagus et la teneur en Phosphore assimilable ($r = 0,387$) mais aussi avec la teneur en calcium ($r = -0,39$). Des corrélations significatives ont successivement été trouvées entre les espèces appartenant au genre *Septogloimus* et la matière organique ($r = 0,368$), le phosphore total ($r = 0,437$) ; entre les espèces de *Funneliformis* et le taux de saturation en base V(%) ($r = 0,54$) ; entre les espèces de *Claroideogloimus* et la teneur en argile ($r = 0,477$) ; en général une corrélation négative a été observée entre la richesse spécifique et la teneur en calcium ($r = -0,3$)

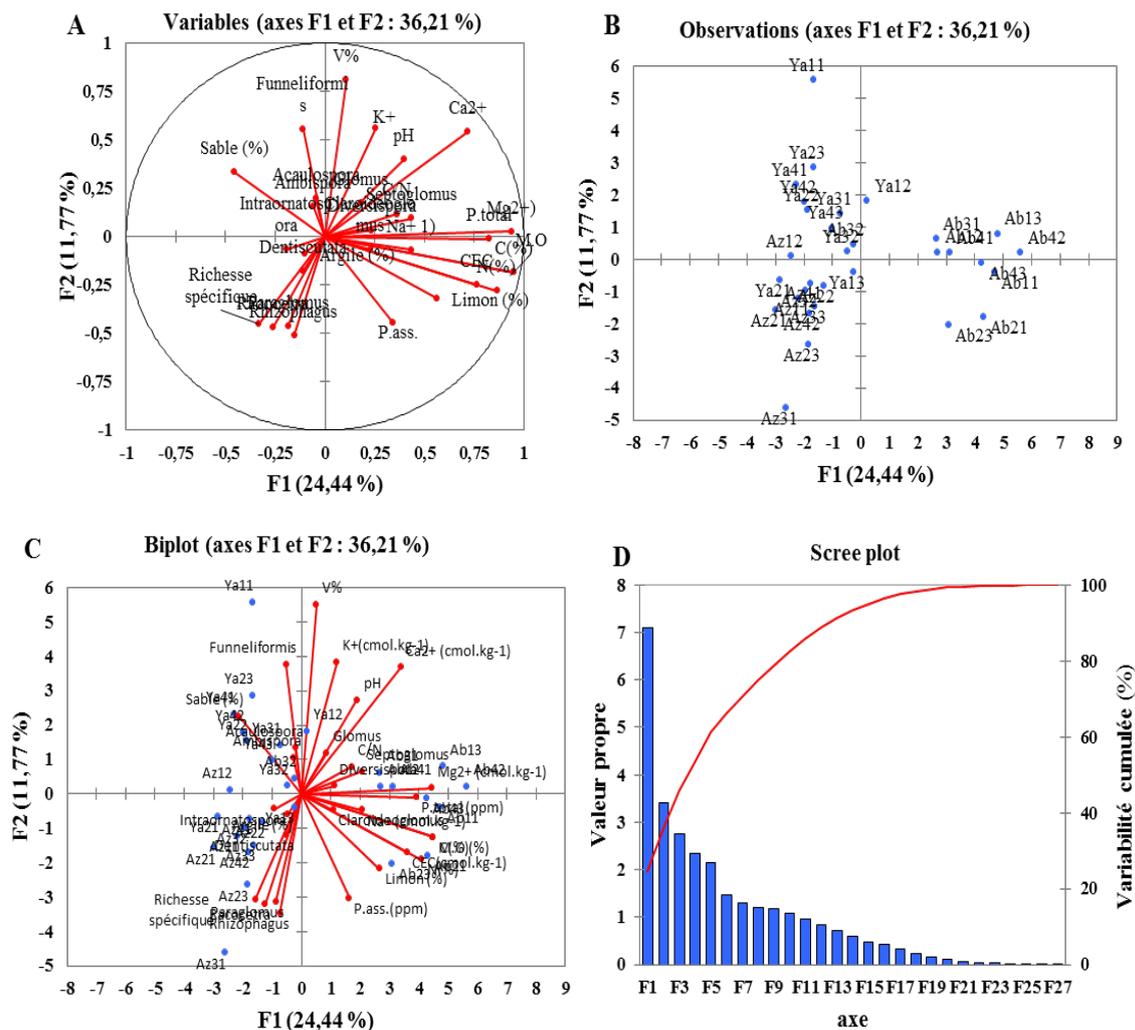


Figure 23. Analyse en composante principale de la répartition de la diversité et des caractéristiques physico-chimiques des trois zones agroécologiques

Tableau 20. Matrice de corrélation (Pearson (n)) entre la diversité et les paramètres physico-chimiques du sol

Paramètres physico-chimiques	<i>Rhizophagus</i>	<i>Septoglomus</i>	<i>Funneliformis</i>	<i>Claroideoglomus</i>	Richesse spécifique
pH	-0,338	0,001	-0,186	0,022	-0,177
C(%)	-0,064	0,368	-0,144	0,181	-0,249
M.O (%)	-0,064	0,368	-0,144	0,181	-0,249
P.total (ppm)	0,001	0,437	-0,017	0,109	-0,300
P. ass. (ppm)	0,387	-0,033	-0,231	0,233	0,246
Ca ²⁺ (cmol.kg ⁻¹)	-0,390	0,302	0,342	0,158	-0,356
V%	-0,349	0,063	0,540	-0,077	-0,199
Argile (%)	-0,048	0,000	-0,091	0,477	0,238

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05

9.1.9. Impact des propriétés physico-chimiques sur la structuration des genres et des espèces de CMA de la rhizosphère du manioc

Parmi les paramètres discriminant des sols des zones agroécologiques, nous avons testé l'effet de classes de pH eau, de teneur en M.O et de la teneur en phosphore assimilable précédemment définies sur la distribution des genres et des espèces de CMA identifiés dans la rhizosphère du manioc.

9.1.9.1. Impact du pH eau du sol sur la structuration des genres et des espèces de CMA de la rhizosphère du manioc

La répartition des genres et des espèces de CMA associés à la rhizosphère du manioc en fonction des classes de pH eau (Figure 24) définit précédemment a révélé une diversité plus importante des genres et des espèces lorsque le pH tend vers la neutralité (6,5-7,5). Les espèces de CMA appartenant au genre *Rhizophagus* et *Glomus* se développent aussi bien dans les sols très acides (pH eau 3,5-5) que dans les sols acides (5-6,5) et neutres. La répartition des espèces entre les différentes classes de pH eau est similaire à ceux des genres. Plus le pH tend vers la neutralité plus la diversité est importante. Comparativement au genre *Glomus* avec les espèces *Glomus sp*, les CMA du genre *Rhizophagus* se développent mieux avec les espèces *Rhizophagus sp*, *Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus intraradices*. Les espèces appartenant au genre *Acaulospora* (*Acaulospora colombiana*, *Acaulospora sp*) ; *septoglomus* (*Septoglomus sp*) ; *Funneliformis* (*Funneliformis mosseae*) se développent quant à eux plus dans les sols acides (5-6,5) et neutres (6,5-7,5). Les pH eau du sol a un impact sur la structuration des communautés de CMA associés à la rhizosphère du manioc.

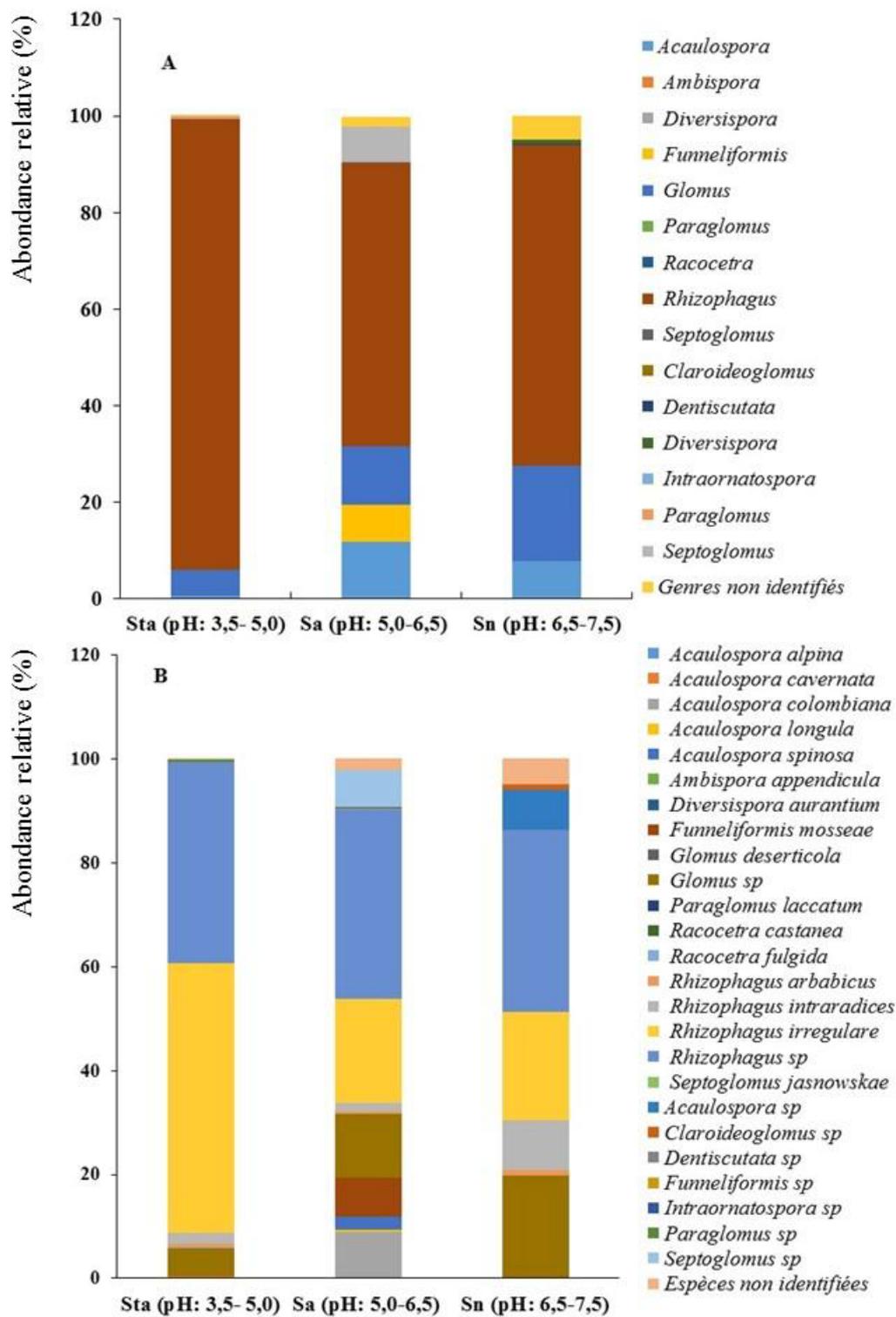


Figure 24. Répartition des genres (A) et espèces (B) dans la rhizosphère du manioc en fonction du pH eau

9.1.9.2. Impact de la teneur en phosphore assimilable du sol sur la structuration des genres et des espèces de CMA de la rhizosphère du manioc

A l'image du pH, des teneurs élevées du sol en phosphore assimilable impactent la structuration des communautés aussi bien au niveau du genre que des espèces (Figure 25). Des teneurs du sol élevées (50-100 ppm) en phosphore réduisent la diversité avec la dominance d'un genre *Rhizophagus* (*Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus intraradices* et *Rhizophagus* sp). Les genres et espèces associées *Glomus* (*glomus* sp), *Acaulospora* (*Acaulospora colombiana*, *Acaulospora spinosa*, *Funneliformis* (*funneliformis mosseae*), *Septoglomus* (*septoglomus* sp) sont plus présents dans les sols pauvres (30-50 ppm) et très pauvres (inférieur à 30 ppm). L'espèce *Acaulospora colombiana* s'est développée majoritairement dans les sols très pauvres (inférieur à 30 ppm) en phosphore assimilable.

9.1.9.3. Impact de la teneur en matière organique sur la structuration des genres et des espèces de CMA de la rhizosphère du manioc

Cette tendance se poursuit avec la teneur en M.O du sol (Figure 26), même si cela est moins marqué que dans le cas du pH et de la teneur en phosphore assimilable. Plus la teneur en matière organique est élevée (supérieur à 4) plus la diversité est importante. On assiste aussi à une équirépartition des abondances entre les espèces. Les genres et espèces associés *Rhizophagus* (*Rhizophagus* sp, *Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus intraradices*) ; *Funneliformis* (*Funneliformis mosseae*) ; *Acaulospora* (*Acaulospora colombiana*) prennent le dessus dans les sols pauvres en M.O par rapport aux autres genres de CMA. Les paramètres physico-chimiques ont certainement un impact sur la diversité des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules associés à la rhizosphère du manioc. Les environnements agroécologiques étant différents comme décrit par les caractéristiques physicochimiques du sol.

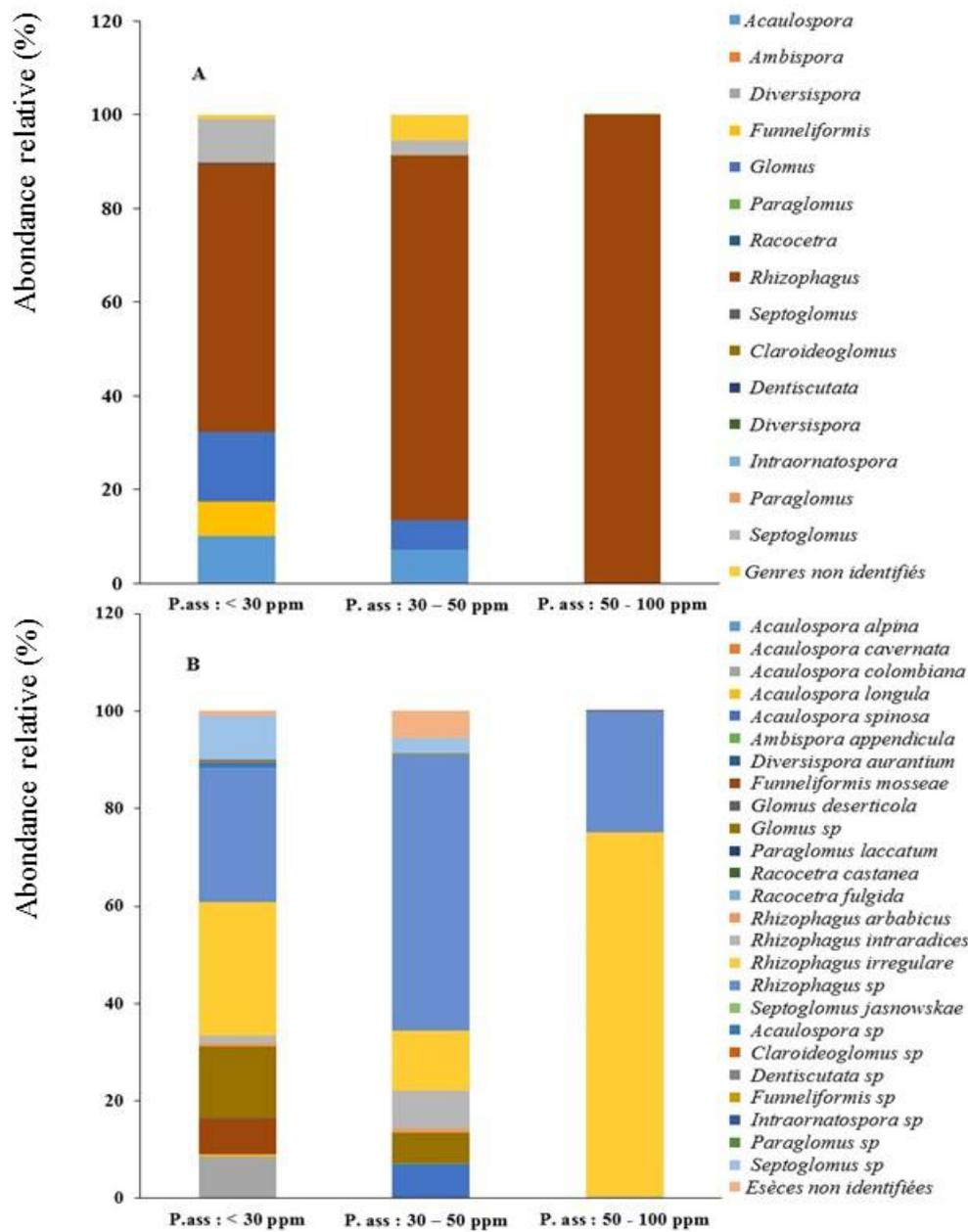


Figure 25. Répartition des genres (A) et des espèces (B) chez le manioc en fonction des classes de teneur en phosphore assimilable

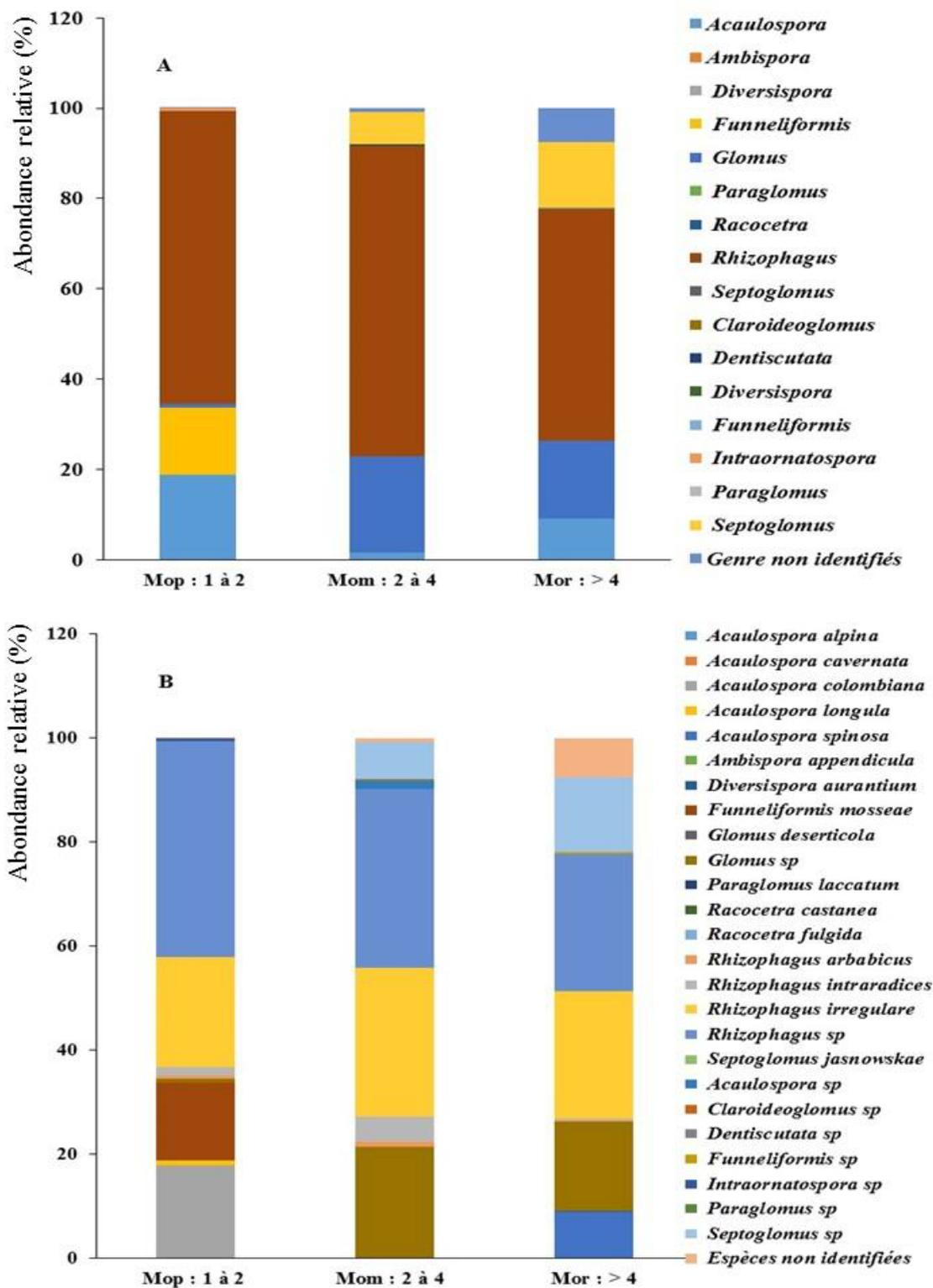


Figure 26. Répartition des genres (A) et des espèces (B) en fonction de la teneur en matière organique.

9.2. Sélection, identification et production d'inoculum mycorhiziens de souches de CMA locales performantes

9.2.1. Sélection et identification morphologique des espèces de CMA potentiellement utiles pour l'inoculation du manioc

En utilisant les caractéristiques morphologiques des spores, 18 espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules ont été identifiées (Tableau 21) dans les sites agricoles des trois zones agroécologiques de cultures du manioc en Côte d'Ivoire. En comparaison, les espèces *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora colombiana*, *Ambispora Appendicula*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Glomus glomerulatum* et une espèce non identifiée *Glomus Sp2* ont été trouvées être abondantes à différents niveaux sur les trois sites agricoles (Tableau 21). Toutefois, lorsque le cultivar manioc YAVO a été utilisé comme plante piège et les sols prélevés sur le terrain comme inoculants en serre dans un substrat stérile, seules les présences d'*Acaulospora colombiana* majoritaire initialement dans les sols très pauvres (inférieur à 30 ppm) en phosphore assimilable et d'*Ambispora appendicula* ont été confirmées dans tous les sols de piégeage avec une fréquence d'apparition de 100%, mais en abondance inférieure pour la deuxième espèce (Tableau 21 ; Figure 27).

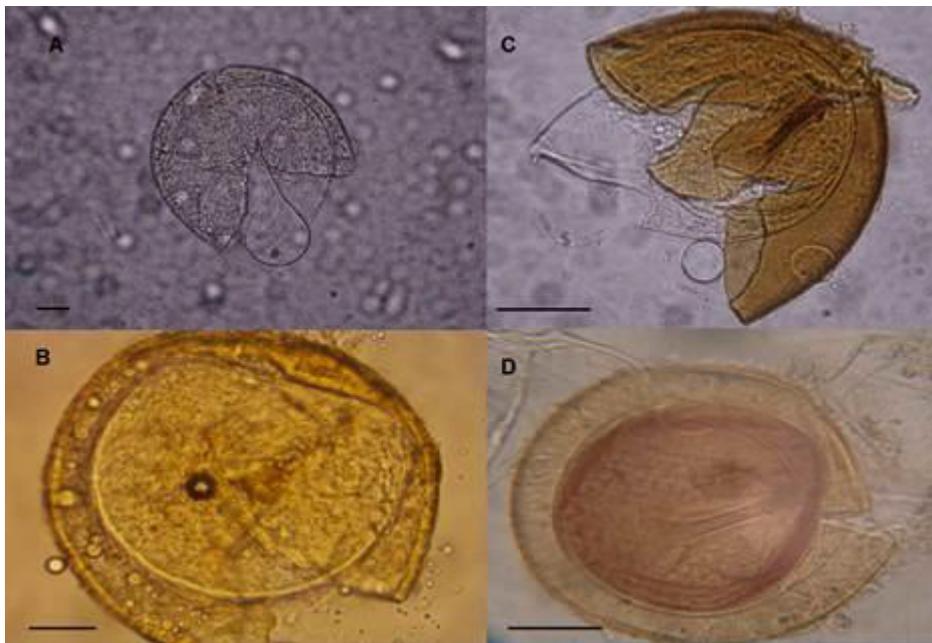


Figure 27. Spores de champignons mycorhiziens à arbuscules utilisées dans cette étude, identification morphologique à partir de chaque morphotype.

A-*Acaulospora colombiana* et C-*Ambispora appendicula* coloré au polyvinyl lactoglycol. B-*Acaulospora colombiana* et D -*Ambispora appendicula* coloré avec le réactif de Melzer. Echelle= 1/25µm

Tableau 21. Processus de sélection morphologique des souches efficaces de champignons mycorhiziens à arbuscules

Les espèces natives de CMA découvertes dans les sols des champs de manioc													
Espèces de CMA	AB1	AB2	AB3	AB4	AZ1	AZ2	AZ3	AZ4	YA1	YA2	YA3	YA4	Fréquence (%)
<i>Acaulospora excavata</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	++	+	+	+	67
<i>Acaulosporascrobiculata</i>	++	+++	+++	++	++	+	++	+	++	++	++	++	100
<i>Acaulospora colombiana</i>	+	+	++	++	+++	++	+	++	++	+	++	++	100
<i>Ambispora appendicula</i>	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	++	100
<i>Claroideoglomerum etunicatum</i>	++	++	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++	100
<i>Glomus aureum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	58
<i>Glomus glomerulatum</i>	++	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	100
<i>Glomus clavisorum</i>	-	+	+	-	-	++	++	-	-	-	-	++	42
<i>Glomus sp.1</i>	++	+	++	+	-	-	-	-	+	++	++	++	67
<i>Glomus sp.2</i>	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	100
<i>Funneliformis mossae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	17
<i>Rhizophagus intraradices</i>	++	++	++	+++	-	-	-	-	+	+	+	+	67
<i>Rhizophagus manhiotis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	17
<i>Sclerocystis sinuosum</i>	+	-	-	++	+	+	++	-	+	-	+	+	67
<i>Septoglomerum constrictum</i>	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	+	-	33
<i>Gigasporasp.1</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	8
<i>Racocetra africana</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	67
<i>Scutelospora sp.</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	83
Les espèces de CMA obtenues après piégeage avec la variété de manioc Yavo pendant quatre mois à partir des sols des champs													
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	++	+	+++	-	-	-	+	+++	+	-	+++	-	58
<i>Acaulospora colombiana</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	100
<i>Acaulosporasp.1</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	33
<i>Ambispora appendicula</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Glomus clavisorum</i>	++	++	-	-	-	+++	++	++	+	-	-	+	58
<i>Rhizophagus intraradices</i>	++	++	++	+++	-	-	-	-	+	+	+	+	67
<i>Gigaspora sp.1</i>	++	++	+	+	++	+	-	+	-	-	-	-	58

AB: Abengourou; AZ: azaguié; YA: yamoussoukro ; Numéro des champs: 1-2-3-4 ; -, absent (0 spore/g); +, présent (1-2 spores/g); ++, abondant (3-5 spores/g);

+++ , Très abondant (6-8 spores/g). Les CMA en gras désignent les espèces ubiquitaires et abondantes aussi bien dans les sols des champs que dans le piégeage.

9.2.2. Identification moléculaire des espèces de CMA d'intérêts pour l'inoculation du manioc.

Ces deux morphotypes (LBVM01 et LBVM02) qui ne sont pas seulement présents dans tous les sols, mais aussi abondants dans les communautés piégées ont été considérés comme de bons candidats pour l'inoculation du manioc. Ils ont d'abord été identifiés sur la base de critères morphologiques comme précédemment décrit en utilisant le PVLG et le réactif de Melzer comme *Acaulospora sp.* et *Ambispora sp.* (Figure 27).

Afin de confirmer cette identification morphologique, l'amplification PCR a été réalisée en utilisant des amorces LR1-LSUmAr / LR1-LSUmBr. Un fragment de 700 pb attendu a été amplifié par séquençage. Après le séquençage, le BLAST et l'analyse phylogénétique ont permis d'identifier formellement le morphotype LBVM01 comme *Acaulospora colombiana* (numéro d'accèsion NCBI Genbank KX168435) et l'autre LBVM02 comme *Ambispora appendicula* (numéro d'accèsion NCBI Genbank KX168436) (Tableau 22; Figure 28.).

Tableau 22. Identification finale des morphoespèces indigènes à partir des critères morphologiques et moléculaires des spores

Séquence homologues (NCBI)	Séquences d'ADN de souches locales issues de l'identification moléculaire
<i>Acaulospora colombiana</i>	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACTAACAAGGATCCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGTGGGAAGAGTTCAAATTTAAATCCCGGGGTTCCCCGGTGAATTTGATTTGAAGAAAGTGTGACATTCGGTTAACTAAATCCTTTGGGATAAGGTATCACAGAGGGTGAGAATCCCGTTCGTGATTAGGCATCGAGTGTCAATTCACCTTTCTAAGAGTTCGAGTTGTTGGGATTGCAGCTCAAAATGGGTGGTAAATTCACCTAAGGCTAAATATCAGCAAGAGACCAATAGCGAACAAAGTACCGTGAGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTTAAATAGTACGTGAAATGTTGAAAGGGAACGATGGAAGTCAGTCA TGCTGGTGAGGAATCAACATGAGGGTTCGCTTTCGTGTGCACTTCTTCGCTTGGCAGGTTAGCATCAATTTGGTCTGCATAAAATATCGGGGTAAGGTGGCTCCCTCGGGGAGTGTATAGACCTTGGTAGATGTGATGACCGGGATTGAGGATTGCAGCGAATGCTACTTGGCTAGTCACCTGGATTCTGTGATCACC TCGCCGTGATAGCTTTGCTAACCTCGGTGGGATCTGATTAAGTAACTAGAGATTAGACTAATCGTAANTTCGCTAAGGATGCTGACGTAATGGCTTTAAACGAC CCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATATGTGCCAGTGTTA
<i>Ambispora appendicula</i>	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACTAACAAGGATCCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGTGGGAATGGCTCAAATTTAAATCTGACCGGTTCTGGTTCGAATTTGATTTAAAGAAGCGTTTTCCGCTCCAGCTCGAGTATAGTCCCTTGGAAATAGGCATCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGTGACACGAGTT TGGAGGTGATATGATACGCTTTCGACGAGTTCGAGTTGTTGGGATTGCAGCTCAAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAGGCTAAATAATGGCAAGAGACCG ACAGCGAACAAAGTACCGTGAGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATGTTGAAAGGGAACGATTGAAGCCAGTCTG TGCTGGCGGAAATCAGCTTTCGGGATTACTGGAAGTGCATTTCTCGCAAGGCAGGTTAGCATCAATTCGCACGTTGAAAAGTCCGTCGGAATGTGAC TCCTTTCGGAGTGTATAGCCAGCGGTCAATGCGACGCGTGGGATTGAGGATTGCAGCGGTTGCCTTTTAGGCTAAGTGCCTGGCCCTTGTCTGTGATCGTCT TGGCAACAGCGTGTGGTGTGAGAACGATTCTGGCCATGGGTGTAGCGTACGGTAAACTCGCTAAGGATGCTGACGTA

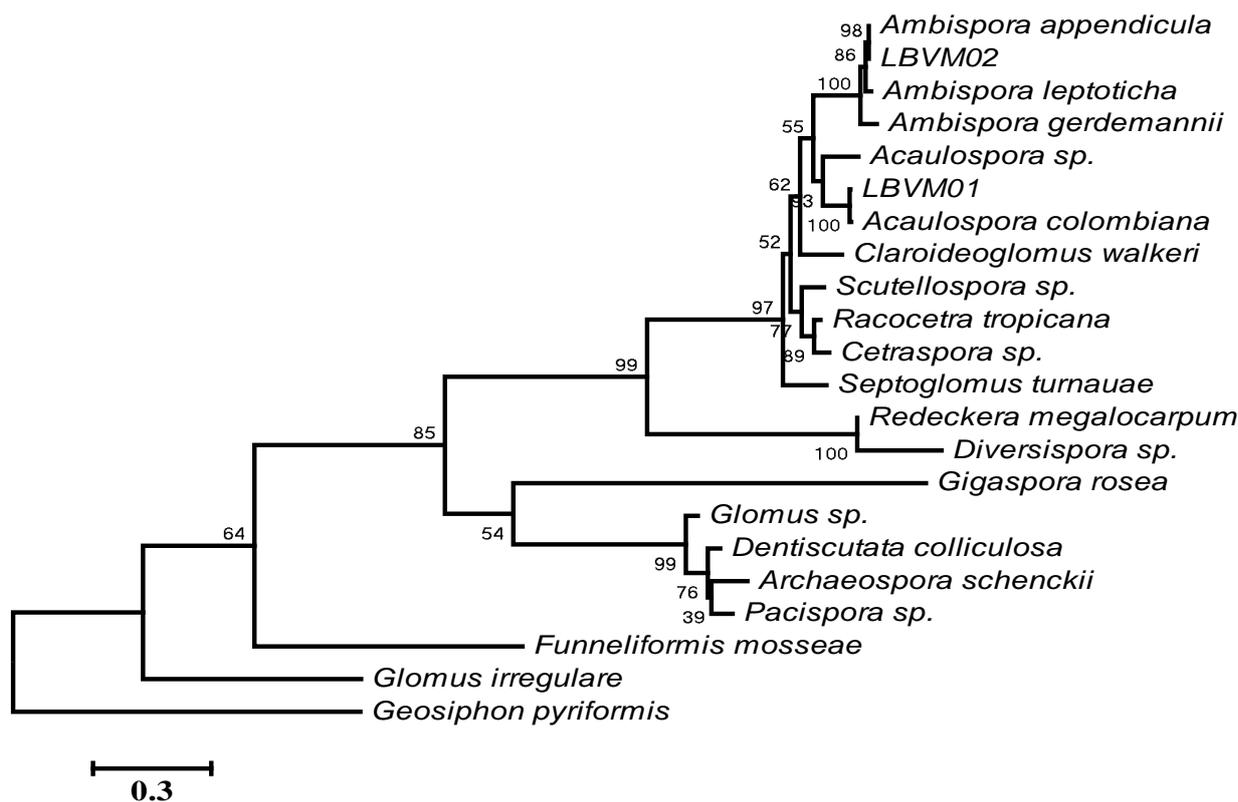


Figure 28. Identification phylogénétique avec MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) et les séquences des gènes de référence SSU-ITS-LSU. Les souches de CMA identifiées sont LBVM01 et LBVM02.

Les séquences des espèces *Ambispora appendicula* (FN547527), *Ambispora leptoticha* (KC166277), *Ambispora gerdemannii* (KC166282), *Acaulospora sp.* (HF56794), *Acaulospora colombiana* (FR750063), *Scutellospora sp.* (AF396818), *Racocetra tropicana* (GU385898), *Cetraspora sp.* (HM565946), *Septoglosum turnauae* (KF060327), *Redeckera megalocarpum* (NR121478), *Diversispora sp.* (KJ850185), *Gigaspora rosea* (U60451), *Glomus sp.* (AB326023), *Dentiscutata colliculosa* (GQ376067), *Archaeospora schenckii* (KP144303), *Claroideoglosum walkeri* (KP191492); *Pacispora sp.* (JQ182768), *Funneliformis mosseae* (KM360085), *Glomus irregulare* (GU585513) et *Geosiphon pyriformis* (JX535577) sont utilisées pour la comparaison.

9.2.3. Production d'inocula à partir des souches identifiées

La production d'inocula locaux en serre des souches natives *Acaulospora colombiana*, *Ambispora appendicula* et du complexe *Acaulospora colombiana*-*Ambispora appendicula* dans un substrat stéril en présence du manioc Yavo a été faite. Le taux de mycorhization (Figure 29, Figure 30) des inocula est assez rapide pour *Acaulospora colombiana* et le complexe de souches *Acaulospora colombiana*-*Ambispora appendicula* (supérieur à 45 % au bout de 3 mois) et un peu plus lent pour *Ambispora appendicula* (23 % après 3 mois). Néanmoins, au bout de quatre mois les taux de mycorhization sont sensiblement les mêmes environ 40 % pour tous les inocula ($P > 5\%$; non significatif : NS). Des deux souches locales,

l'espèce *Acaulospora colombiana* a eu le plus haut taux de mycorhization (50 %). La densité moyenne de spores pour les inocula locaux après comptage est de 10 ± 3 spores/g d'inoculum. L'inoculum final obtenu est sous forme de substrat sol contenant des spores, des hyphes et des racines de manioc mycorhizées. Ils ont été maintenus en serre jusqu'à leur utilisation pour les essais en serre et au champ.

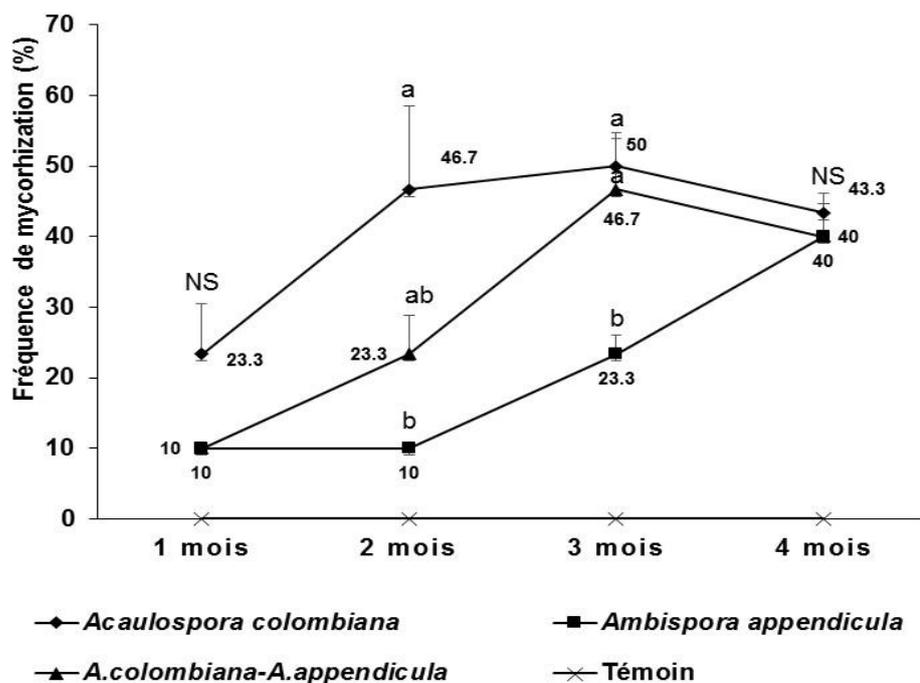


Figure 29. Evolution de la mycorhization des souches indigènes en serre pour chaque inoculum.

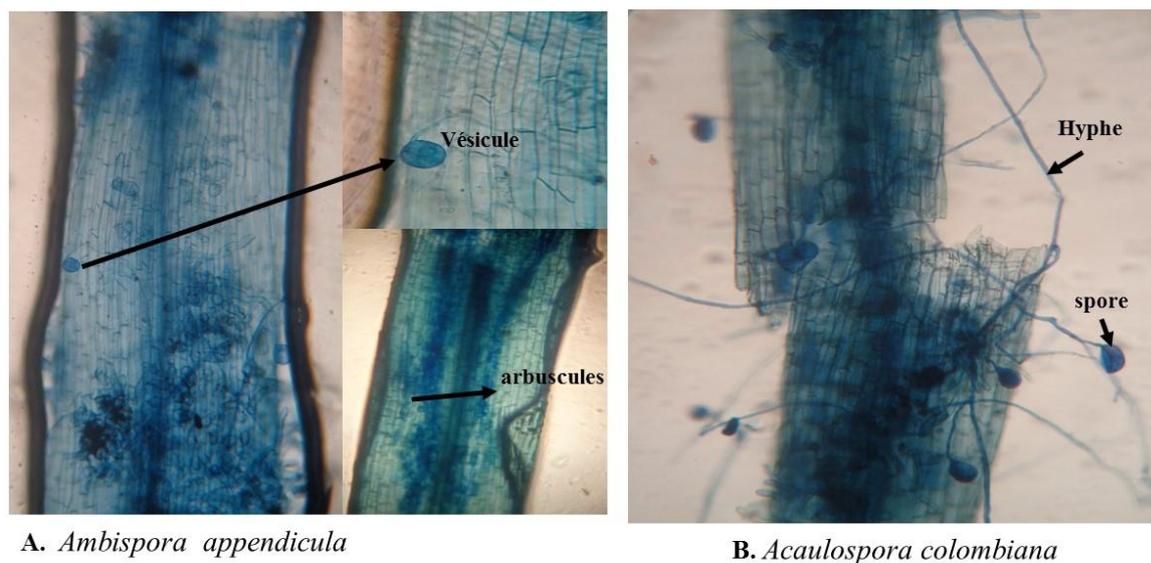


Figure 30. Structures mycorhiziennes dans les racines de manioc **A.** *A. appendicula* et **B.** *A. colombiana*

9.3. Evaluation en serre de l'efficacité des CMA natifs sur la croissance, la nutrition minérale, les *Meloidogynes* et le stress hydrique du manioc.

9.3.1. Efficacité de *A. colombiana* et de *A. appendicula* en inoculation simple ou double sur la croissance du manioc et la nutrition minérale .

Après quatre mois de culture en serre, toutes les plantes de manioc inoculées avec *A. colombiana* et *A. appendicula* ou le complexe étaient tous mycorhizées. Les fréquences et intensités de mycorhization, soit dans l'inoculation simple ou double ne sont pas statistiquement différents (Tableau 23). Néanmoins, la fréquence de mycorhization est grande respectivement pour *Acaulospora colombiana* (48,3 %), le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* (46,7 %) et *Ambispora appendicula* avec 26,7 %; tandis que la plus haute intensité de mycorhization (38,7 %) est obtenue avec le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* suivie d'*Acaulospora colombiana* (25,4 %) et *Ambispora appendicula* avec 14,55 %. *Acaulospora colombiana* colonise plus abondamment le manioc qu'*Ambispora appendicula*. Aucunes structures mycorhiziennes n'ont été observées dans les plantes témoins non mycorhizées.

Le contenu des feuilles en phosphore (P) des plants de manioc inoculés avec *A. colombiana* était significativement amélioré de 1,3 fois par rapport à un contrôle alors que l'inoculum *A. appendicula* n'a eu aucun impact. La teneur en P foliaire de plantes inoculées avec le complexe a été significativement ($p= 0.002$) améliorée 1,5 fois par rapport au témoin. Le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* a amélioré la nutrition minérale du manioc en N (2,86 % ms); P (0,26 % ms); Ca^{2+} (1,177 % ms) et Mg^{2+} (0,475 % ms) comparé au témoin. On note aussi que les feuilles des plants inoculés avec *Acaulospora colombiana* ont de grandes teneurs en potassium, calcium et magnésium pendant qu'*Ambispora appendicula* améliore la nutrition minérale des plants en potassium et en magnésium. La mycorhization avec le complexe a favorisé une meilleure nutrition minérale des plants de manioc.

Les paramètres de croissance tels que la hauteur de la plante, la surface foliaire, les matières fraîches et sèches totales des plantes de manioc inoculées avec *A. colombiana* ont été significativement améliorés après quatre mois de serre (respectivement $p=0.040$; $p=0.008$; $p= 0.000$; $p= 0.001$). L'inoculum *A. appendicula* n'a eu un impact significatif que sur la biomasse fraîche totale concernant les paramètres de croissance. Cependant, la double inoculation a amélioré de manière significative tous les paramètres agronomiques en serre.

9.3.2. Tolérance des plantes de manioc inoculées avec *A. colombiana* et *A. appendicula* aux nématodes à galles du genre *Meloidogyne* spp.

Quatre mois après l'inoculation simple ou double avec *A.colombiana* ou *Ambispora appendicula*, toutes les plantes de manioc traitées en présence des nématodes du genre *Meloidogyne* spp étaient mycorhizées (Tableau 24). Cependant, les fréquences et les intensités de mycorhization ont considérablement diminué dans les racines des plantes de manioc qui ont été co-inoculées avec les nématodes du genre *Meloidogyne* spp (respectivement $p=0.002$; $p=0.002$). Dans ces conditions, la présence de *A.colombiana* et de *A. appendicula* comme inoculants simple ou complexe dans les racines des plantes de manioc n'a pas affecté de façon significative le développement de la population de nématodes du genre *Meloidogyne* spp en termes d'œufs et de densités de populations. De plus il n'y avait pas d'impact significatif sur la teneur en phosphore des feuilles ou sur les biomasses totales fraîches et sèches. Pendant ce temps, il a été observé qu'après quatre mois, les niveaux de mycorhization sont demeurés élevés lorsque l'inoculation des nématodes a été faite un mois après l'inoculation simple ou double des CMA. Dans ce cas, l'inoculation unique avec *A.colombiana* a eu un effet significatif négatif sur les densités des œufs et des nématodes dans les racines de manioc ($p=0.006$). La même tendance a été observée pour le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula*. La présence du complexe a augmenté de manière significative à la fois le contenu des feuilles en phosphore et les paramètres de croissance des plantes de manioc. L'inoculation unique avec *A. appendicula* n'a affecté aucun paramètre. Le contenu en phénol des racines de manioc pré-inoculées avec les CMA avant infestation était significativement plus élevé que le témoin par rapport aux plantes co-inoculées avec à la fois les nématodes et les CMA.

9.3.3. Développement des plantes après inoculation simple et double de *A. colombiana* et *A. appendicula* lors de stress hydrique

Pendant les deux premiers mois, lorsque les plantes de manioc ont été bien arrosées (100 %) de la capacité au champ, la colonisation mycorhizienne a augmenté de manière significative passant de 23 % à 46,7 % avec *A. colombiana* et avec le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* de 10 % à 23,7 %, sauf avec *A. appendicula* où il est constant (10 %) (Figure 31). Un mois après l'application du stress hydrique (10 % de la capacité au champ), la colonisation mycorhizienne a été affectée de façon significative et a chuté dans les racines de manioc pour tous les traitements mycorhiziens (Figure 31). Dans le deuxième mois de stress hydrique, la même tendance a été observée pour tous les traitements mycorhiziens.

Cependant, la mycorhization avec *A. colombiana* des racines de manioc est restée stable à 26,7 % au quatrième mois et significativement différente des autres traitements. Dans cet état, il a été montré que la présence de *A. colombiana* a eu un impact positif significatif ($p= 0.049$) sur les paramètres de croissance tels que la matière sèche totale, matière fraîche et les surfaces foliaires. Comparativement, l'inoculation utilisant *A. appendicula* et la double inoculation avec le complexe n'ont pas eu un impact positif sur ces paramètres de croissance. En outre, dans une grave sécheresse, les plantes de manioc inoculées avec *A. colombiana* pourraient voire leurs paramètres fonctionnels maintenus voire améliorés, y compris la teneur en chlorophylle a (0,209 mg / g MF) et la teneur en sucres totaux (496 μ mol / mg MF) par rapport à des plantes non inoculées (Tableau 25).

Tableau 23. Impact de l'inoculation de *A. colombiana* et de *A. appendicula* sur la nutrition minérale et la croissance du manioc après 4 mois.

Traitement	Fréquence de mycorhization (%)	Intensité de mycorhization (%)	Hauteur des plantes (cm)	Surface foliaire (cm ²)	Matière fraîche totale (g)	Matière sèche totale (g)	P (% ms)	K (% ms)	N (% ms)	Ca (% ms)	Mg (% ms)
Témoin (S0)	0±0	0±0	34,1 ^c ±0,9	898,3 ^c ±38,96	47,4 ^c ±2,5	15,9 ^c ±0,2	0,17 ^c ±0,01	0,87 ^c ±0,0	2,38 ^b ±0,1	0,47 ^c ±0,0	0,37 ^b ±0,0
<i>A. colombiana</i> (S1)	48,3 ^a ±11,8	25,4 ^a ±7,5	41,5 ^{ab} ±0,7	1375,6 ^{ab} ±162,3	56,9 ^{ab} ±3,2	18,3 ^b ±0,7	0,22 ^b ±0,0	1,17 ^a ±0,0	2,7 ^{ab} ±0,0	0,67 ^b ±0,04	0,4 ^a ±0,01
<i>A. appendicula</i> (S2)	26,7 ^a ±4,5	14,5 ^a ±3	36,7 ^{bc} ±2,1	1219,1 ^{bc} ±80,4	55 ^b ±1	17,4 ^{ab} ±0,6	0,19 ^{bc} ±0,0	1,1 ^{ab} ±0,0	2,52 ^b ±0,0	0,55 ^c ±0,0	0,47 ^a ±0,0
<i>A. colombiana-A. appendicula</i> (S1S2)	46,7 ^a ±15,6	38,7 ^a ±12,8	44,33 ^a ±2,6	1711,6 ^a ±54,01	60,7 ^a ±2,9	20,3 ^a ±2,2	0,26 ^a ±0,016	0,99 ^{bc} ±0,0	2,86 ^a ±0,0	1,17 ^a ±0,0	0,47 ^a ±0,0
Valeur P & F											
	<i>p</i> =0,018	<i>p</i> =0,024	<i>p</i> =0,040	<i>p</i> =0,008	<i>p</i> =0,000	<i>p</i> =0,001	<i>p</i> =0,002	<i>p</i> =0,005	<i>p</i> =0,042	<i>p</i> =0,001	<i>p</i> =0,01
	F=4,19	F=3,91	F=4,454	F=8,1851	F=14,58	F=7,93	F=12,267	F=9,414	F=4,383	F=111,4	F=7,356

ms : matière sèche. Toutes les valeurs sont les moyennes de trois répétitions (n = 3).

Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

Tableau 24. Impact de *A. colombiana* et de *A. appendicula* sur la population de nématodes et la croissance du manioc.

Traitement	Fréquence de Mycorhization (%)	Intensité de Mycorhization (%)	Densité des oeufs dans les racines/g	Densité des nématodes dans les racines/g	Teneur en phosphore	Biomasse (g)		Phénols
					P (%dm)	Matière fraîche totale (g)	Matière fraîche totale (g)	Concentration en phénols (mg EAG/l)
Co-inoculation CMA et nématodes (I2)								
Témoin (S0)	0±0	0±0	3,7 ^c ±0,47	7 ^b ±4,24	0,21 ^{ab} ±0,03	46 ^{bc} ±1,5	14,1 ^{ab} ±0,6	95 ^{de} ±4,7
<i>Acaulospora colombiana</i> (S1)	6,7 ^b ±4,7	0,07 ^b ±0,04	2 ^{ab} ±0,0	2 ^a ±0,8	0,21 ^{ab} ±0,01	53,7 ^{abc} ±2,4	15,3 ^{ab} ±0,2	116,7 ^{cd} ±12
<i>Ambispora appendicula</i> (S2)	13,3 ^b ±9,4	5,5 ^b ±3,67	2 ^{ab} ±0,81	2,33 ^a ±1,24	0,22 ^{abc} ±0,00	51,5 ^a ±5,9	17,3 ^a ±4,4	98,3 ^{de} ±3,6
<i>A. colombiana</i> - <i>A. appendicula</i> (S1S2)	3,3 ^b ±4,7	0,03 ^b ±0,04	1,7 ^a ±0,94	2 ^a ±0,82	0,237 ^{ab} ±0,0	56,3 ^a ±7,2	15,6 ^a ±2,26	115,7 ^{cd} ±4,5
Inoculation avec nématodes un mois après les CMA (I4)								
Témoin (S0)	0±0	0±0	3,3 ^{bc} ±1,24	5,17 ^{ab} ±1,65	0,203 ^b ±0,01	45,1 ^c ±3,25	11,7 ^b ±0,22	88,5 ^c ±4
<i>Acaulospora colombiana</i> (S1)	30 ^a ±8,16	15,07 ^a ±3,2	1,7 ^a ±0,47	2,17 ^a ±0,13	0,255 ^a ±0,00	53,5 ^{abc} ±1,55	15,36 ^{ab} ±0,05	169,5 ^a ±4
<i>Ambispora appendicula</i> (S2)	20 ^a ±8,16	15,07 ^a ±6,3	2 ^{ab} ±0	2,67 ^a ±0,47	0,213 ^{ab} ±0,00	54,34 ^{ab} ±4,94	14,85 ^{ab} ±1	126 ^{bc} ±13,8
<i>A. colombiana</i> - <i>A. appendicula</i> (S1S2)	36,7 ^a ±9,4	21,4 ^a ±6,08	2 ^{ab} ±0	2,17 ^a ±0,13	0,227 ^{ab} ±0,01	55,5 ^a ±3,75	17,9 ^a ±1,13	150,17 ^{ab} ±4,24
Valeur p & F								
CMA	<i>p</i> =0,002 F= 7,729	<i>p</i> =0,002 F= 7,8	<i>p</i> =0,006 F=5,89	<i>p</i> =0,012 F=5,044	<i>p</i> =0,47 F= 0,887	<i>p</i> =0,02 F=4,35	<i>p</i> =0,045 F=3,364	<i>p</i> =0,000 F=12,52
Nématodes	<i>p</i> =0,000 F= 22,5625	<i>p</i> =0,000 F= 41,77	<i>p</i> =0,806 F=0,0625	<i>p</i> =0,741 F=0,113	<i>p</i> =0,97 F=0,001	<i>p</i> =0,91 F=0,013	<i>p</i> =0,5 F=0,47	<i>p</i> =0,000 F=17,72
CMA x Nématodes	<i>p</i> =0,010 F= 5,23	<i>p</i> =0,004 F= 6,483	<i>p</i> =0,874 F=0,223	<i>p</i> =0,785 F=0,357	<i>p</i> =0,234 F= 1,573	<i>p</i> =0,92 F=0,17	<i>p</i> =0,24 F=1,53	<i>p</i> =0,033 F=3,7

ms : matière sèche, EAG: Equivalent Acide Gallique. Toutes les valeurs sont les moyennes de trois répétitions (n = 3).

Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

Tableau 25. Impact de *Acaulospra colombiana* et *Ambispora appendicula* sur la croissance et les paramètres physiologiques

du manioc deux mois après un stress hydrique.

CMA	Surface foliaire (cm ²)		Matière fraîche totale		Matière sèche totale		Chlorophylle a (mg/g MF)		Sucres totaux (µmol/mg MF)	
	Arrosage (100%)	Stress (10%)	Arrosage (100%)	Stress (10%)	Arrosage (100%)	Stress (10%)	Arrosage (100%)	Stress (10%)	Arrosage (100%)	Stress (10%)
Témoin (S0)	4362,67 ^b ±496	39,4 ^c ±50,9	218,9 ^b ±4,2	139 ^d ±4,6	106,74 ^c ±6,7	88,7 ^d ±3,6	0,178 ^{bc} ±0,0	0,123 ^{cd} ±0,0	518 ^a ±43,7	362,5 ^b ±7
<i>A. colombiana</i> (S1)	6179,9 ^a ±608,3	145,5 ^c ±23,2	243,53 ^a ±14,5	180 ^c ±8,9	149,3 ^a ±8,32	109,07 ^c ±9,97	0,164 ^{abc} ±0,0	0,209 ^a ±0,0	523,4 ^a ±23,5	496 ^a ±32,4
<i>A.appendicula</i> (S2)	4872,3 ^b ±589,3	13,3 ^c ±17,17	231,35 ^{ab} ±2,56	156 ^d ±6,1	130,97 ^b ±4,96	78,37 ^d ±4,6	0,17 ^{bc} ±0,01	0,078 ^d ±0,0	480,4 ^{ac} ±10,7	435,6 ^{abc} ±26
<i>A.colombiana-A.appendicula</i> (S1S2)	4617,3 ^b ±419,4	52,3 ^c ±49,5	217,03 ^b ±12,4	153 ^d ±11,8	109,7 ^c ±3,3	87,87 ^d ±8,7	0,18 ^{bc} ±0,01	0,15 ^{bc} ±0,01	446,5 ^{abc} ±29,8	351,5 ^{bc} ±25
Valeur p et F										
CMA	<i>p</i> =0,002 F=5,7652		<i>p</i> =0,000 F=9,970		<i>p</i> =0,000 F=19,240		<i>p</i> =0,017 F=4,7855		<i>p</i> =0,032 F=3,769	
Régime hydrique	<i>p</i> =0,000 F=763,3963		<i>p</i> =0,000 F=238,107		<i>p</i> =0,000 F=97,697		<i>p</i> =0,010 F=8,7654		<i>p</i> =0,009 F=8,748	
CMA Régime ^x	<i>p</i> =0,008 F=4,4874		<i>p</i> =0,492 F=0,838		<i>p</i> =0,007 F=5,815		<i>p</i> =0,009 F=5,6544		<i>p</i> =0,449 F=0,928	

ms : matière sèche, EAG: Equivalent Acide Gallique. Toutes les valeurs sont les moyennes de trois répétitions (n = 3).

Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %.

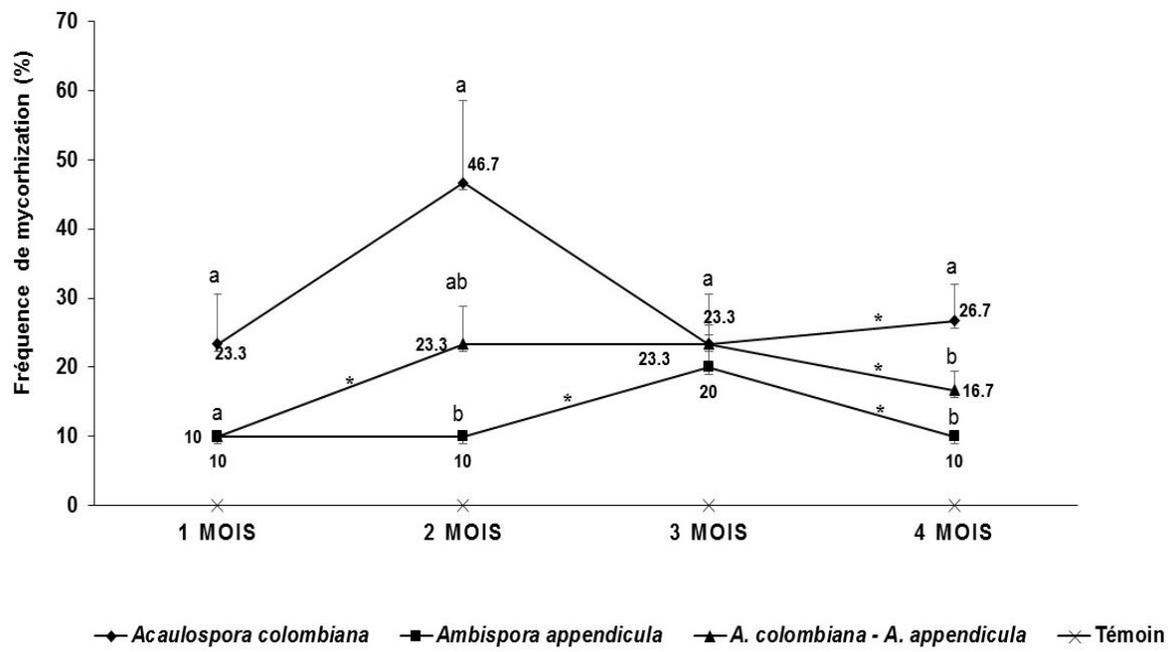


Figure 31. Evolution de la fréquence de mycorhization de 100 % du régime hydrique (1 à 2 mois) à (10 %) pendant le stress hydrique (2 à 4 months). Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

9.4. Evaluation en champ de l'efficacité de souches locales *Acaulospora colombiana* et *Ambispora appendicula* et industrielle *Rhizophagus intraradices* sur les performances agronomiques du manioc.

9.4.1. Caractéristiques physico-chimiques des sols des parcelles expérimentales de Yamoussoukro et Duokro

Les caractéristiques physico-chimiques des parcelles expérimentales de manioc situées à Yamoussoukro (INP-HB) et Duokro sont présentées dans le Tableau 26. Le pH des solutions de sols est significativement différent et est respectivement de 6,43 pour Yamoussoukro et 6,64 pour Duokro. Le sol de la parcelle de Yamoussoukro est acide tandis le sol de Duokro est neutre. Le sol de Duokro est riche en matière organique (M.O (%)) par rapport au rapport au sol de la parcelle de Yamoussoukro. Les rapports C/N des sols à Duokro et Yamoussoukro sont respectivement 11,2 et 9,67 ; ces rapports sont normaux et traduisent une bonne décomposition de la matière organique. Les capacités d'échange cationique (CEC) déterminées sur les parcelles sont élevées (CEC supérieure à 20). Cela traduit une bonne capacité de ces sols à stocker les éléments nutritifs apportés. Les teneurs en phosphore assimilable des parcelles expérimentales de manioc varient de 21 ppm à 33 ppm, le sol est significativement très pauvre en phosphore assimilable à Yamoussoukro et pauvre pour la parcelle de Duokro. Les taux de saturation en base des sols des parcelles de manioc est plus important à Duokro (15,96 %) qu'à Yamoussoukro (6,4 %). Le stock de cations échangeables est plus important à Duokro qu'à Yamoussoukro.

Tableau 26. Caractéristiques physico-chimiques des sols des parcelles

Parcelles	Duokro	Yamoussoukro	F	P
pH eau	6,64 ^a ±0,082	6,43 ^b ±0,008	13,1	0,022
C	1,87 ^a ±0,03	0,77 ^b ±0,01	2106,94	0,00
Nt	0,17 ^a ±0,024	0,08 ^b ±0,008	24,3	0,0078
M.O	3,22 ^a ±0,06	1,32 ^b ±0,02	2106,94	0,000
P. ass (ppm)	33 ^a ±1,63	21 ^b ±0,8	86,4	0,00
C/Nt	11,2 ^a ±1,44	9,67 ^a ±0,9	1,618	0,27
CEC (cmol.kg-1)	33 ^a ±1,63	21 ^b ±0,8	86,4	0,0007
Ca ²⁺ (cmol.kg-1)	3,65 ^a ±0,042	0,748 ^b ±0,006	9486,76	0,00
Mg ²⁺ (cmol.kg-1)	1,26 ^a ±0,008	0,48 ^b ±0,000	18210,56	0,00
K ⁺ (cmol.kg-1)	0,29 ^a ±0,001	0,08 ^b ±0,000	28514,4	0,00
Na ⁺ (cmol.kg-1)	0,05 ^a ±0,000	0,034 ^b ±0,000	253,5	0,00
V ⁺ (cmol.kg-1)	15,96 ^a ±0,6	6,4 ^b ±0,2	413,635	0,00

Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

9.4.2. Diversité des champignons mycorrhiziens présents dans les sols des parcelles expérimentales de Yamoussoukro et de Duokro

9.4.2.1. Communautés de CMA sur la parcelle de Duokro

Les sols des différentes parcelles d'expérimentation ne sont pas exemptes de CMA, l'analyse moléculaire a révélé l'existence de communautés importantes de CMA regroupées dans quatre genres respectivement (*Acaulospora*, *Rhizophagus*, *Glomus*, *Septoglomus*) et six espèces (tableau 27) dont la plus importante des espèces est *Acaulospora colombiana*.

9.4.2.2. Communauté de CMA sur la parcelle de la ferme de l'INP-HB

Dans la même logique que les sols du site de Duokro, les sols du site d'expérimentation de la ferme contiennent des CMA, l'analyse moléculaire révèle des communautés importantes de CMA regroupées dans cinq genres respectivement (*Acaulospora*, *Rhizophagus*, *Claroideoglomus*, *Glomus*, *Septoglomus*) et neuf espèces (tableau 28) dont les plus importantes des espèces sont *Acaulospora* sp, *Acaulospora alpina* et *Rhizophagus irregulare*.

Tableau 27. Communauté de champignons mycorhiziens à arbuscules sur la parcelle de Duokro

Genres	Fréquence (%)
<i>Acaulospora</i>	32,56
<i>Rhizophagus</i>	37,21
<i>Glomus</i>	16,28
<i>Septoglomus</i>	13,95
Espèces	Fréquence (%)
<i>Acaulospora colombiana</i>	32,56
<i>Glomus</i> sp	16,28
<i>Rhizophagus intraradices</i>	11,62
<i>Rhizophagus irregulare</i>	18,6
<i>Rhizophagus</i> sp	6,97
<i>Septoglomus</i> sp	13,95

Tableau 28. Communauté de champignons mycorhiziens à arbuscules sur la parcelle de la ferme

Genres	Fréquence (%)
<i>Acaulospora</i>	77,27
<i>Rhizophagus</i>	16,67
<i>Claroideoglomus</i>	3,78
<i>Glomus</i>	1,51
<i>Septoglomus</i>	0,75
Espèces	Fréquence (%)
<i>Acaulospora</i> sp	40,15
<i>Acaulospora alpina</i>	33,33
<i>Rhizophagus irregulare</i>	12,12
<i>Claroideoglomus</i> sp	3,78
<i>Acaulospora colombiana</i>	3,78
<i>Rhizophagus intraradices</i>	2,27
<i>Rhizophagus</i> sp	2,27
<i>Glomus</i> sp	1,51
<i>Septoglomus jasnowskae</i>	0,75

9.4.2.3. Indices de diversité

La répartition des espèces à Duokro est équitable (Tableau 29), aucune espèce ne semblent dominer malgré la fréquence importante d'*Acaulospora colombiana* sur la parcelle de Duokro. Sur le site de Yamoussoukro (INP-HB), la tendance est à la dominance d'une ou de deux espèces (*Acaulospora* sp et *Acaulospora alpina*) et une répartition moins équitable des individus entre les espèces.

Tableau 29. Indices de diversité alpha

Zones	Shannon	Equitabilité (Piélu)
DUOKRO	4,22	0,94
YAMO USSOUKRO (INP-HB)	3,2	0,6

9.5. Effets des traitements et des sites sur l'ensemble des paramètres agronomiques du manioc sur les parcelles (Yamoussoukro et de Duokro)

La MANOVA utilisée pour effectuer les tests multivariés, a montré que les traitements appliqués ont un effet sur les paramètres agronomiques du manioc ($p=0,003$) dans leur ensemble (Tableau 30). Les performances agronomiques du manioc sont fonctions des caractéristiques des sites ($p=0,000$) (Duokro et Yamoussoukro). Néanmoins la MANOVA a révélé que l'efficacité des traitements n'est pas fonction des sites ($p=0,115$).

Tableau 30. Effets des traitements et des sites sur les performances agronomiques du manioc.

Tests Multivariés de Significativité Paramétrisation sigma-restreinte						
Décomposition efficace de l'hypothèse						
	Test	Valeur	F	Effet	Erreur	p
ord. origine	Wilk	0,053056	86,69027	7	34,0000	0,000
Traitements	Wilk	0,087807	1,69438	63	197,5981	0,003
site	Wilk	0,052313	87,99081	7	34,0000	0,000
Traitements*site	Wilk	0,148532	1,26390	63	197,5981	0,115

9.5.1. Mycorhization et croissance du manioc à Yamoussoukro et Duokro

9.5.1.1. Colonisation mycorhizienne et croissance du manioc à Yamoussoukro : cas de l'inoculation des CMA sans fertilisant NPK

L'intensité de mycorhization (Figure 32-A) durant les trois premiers mois de culture est comprise entre 21,5 % et 48,2 %. Elle a évolué progressivement au deuxième trimestre pour atteindre entre 46,3 % et 68,5 %. Le complexe de spores *A. colombiana*-*A. appendicula* a l'intensité de mycorhization la plus élevée après trois mois et est statistiquement différente des autres traitements. Au deuxième trimestre cette tendance s'est maintenue avec une intensité de 68,5 %. Elle a été rejointe par les traitements *A. colombiana* (56,8 %) et Mykepro P501 (51,2 %). Cependant l'intensité de mycorhization avec l'inoculum complexe *A. colombiana*-*A. appendicula* demeure statistiquement différente au seuil de 5 % du témoin non inoculé mycorhizé naturellement à l'aide de souches natives présentes dans le sol par rapport aux autres traitements.

Trois mois après la mise en culture des plants de manioc, la fréquence de mycorhization est élevée pour *A. colombiana*-*A. appendicula* (65 %), *A. colombiana* (68,5 %), *A. appendicula* (61,67 %), Mykepro P501 (76,6 %) et statistiquement différente des parcelles témoins (32,3 %) et celles fertilisées avec l'engrais NPK (25 %). Même si après 6 mois de culture elle a progressé pour atteindre entre 86,6 % et 93,3 %, contrairement à l'intensité de mycorhization elle s'est uniformisée. A six mois de culture donc pour tous les traitements aucune différence significative au seuil de 5 % n'a été observée.

La hauteur des plantes de manioc durant le premier trimestre oscille entre 77,5 cm et 104 cm. Les plantes mycorhizées avec les souches locales *A. colombiana*-*A. appendicula*, *A. colombiana*, *A. appendicula* et fertilisé avec l'engrais NPK croissent plus vite que les plantes témoins non inoculées. Six mois plus tard par contre, seules les plantes mycorhizées avec *A. colombiana*-*A. appendicula* (263,4 cm) et NPK (280,2 cm) ont maintenu la croissance en hauteur par rapport aux témoins non inoculés. Elles ont été rejointes par les plantes inoculées par l'inoculum Mykepro P501 (269,69 cm). Il ressort de ces analyses qu'en général, la colonisation mycorhizienne au cours des 6 mois de la phase de croissance du manioc a été améliorée par l'inoculation avec le complexe de souches locales *A. colombiana*-*A. appendicula* et Mykepro P501. Au niveau des paramètres de croissance du manioc sur la parcelle de Yamoussoukro, ils ont été améliorés dans leur ensemble par l'inoculation avec le complexe et l'engrais NPK et à un degré moindre, par l'inoculum Mykepro P501.

9.5.1.2. Colonisation mycorhizienne et croissance du manioc à Duokro : cas de l'inoculation des CMA sans fertilisant NPK

La fréquence de mycorhization (Figure 32-B) après trois mois de culture du manioc sur la parcelle de Duokro est comprise entre 32,5 % et 76,7 %. Les plantes inoculées avec le complexe *A. colombiana-A.appendicula* (65 %), *A. colombiana* (68,3 %), *A. appendicula* (61,7 %) et Mykepro P501 (76,7 %) ont les fréquences de mycorhization les plus élevées. Elles sont statistiquement différentes de celles fertilisées avec l'engrais NPK (25 %) et les témoins (32,5 %) non inoculés. Au deuxième trimestre, on assiste à une nette évolution de celles-ci de 63,3 % à 83,3 % ; toutefois, seul l'inoculum complexe et l'inoculum Mykepro P501 ont les fréquences de mycorhization, les plus élevées et statistiquement différentes au seuil de 5% des témoins fertilisés et non inoculés. S'agissant de l'intensité de mycorhization au premier trimestre comparativement à la fréquence de mycorhization aucune différence significative notée par rapport aux traitements témoins. Au deuxième trimestre la tendance générale est à la hausse entre 28 % et 60,57 %. Une amélioration de l'intensité par rapports aux parcelles témoins est constatée pour les traitements *A. colombiana-A. appendicula* (60,57 %), *A. colombiana* (50,1 %) et Mykepro P501 (59,2 %). L'inoculation des plantes de manioc sur la parcelle de Duokro avec *A. colombiana-A. appendicula*, *A. colombiana* et le NPK a eu une incidence sur la hauteur des plants après trois mois de cultures. Cette dynamique est maintenue six mois après plantation. Avec une hauteur de 225 cm, 258,3 cm et 224 cm respectivement pour *A. colombiana-A. appendicula*, *A. colombiana* et le NPK contre 162,5 cm pour les témoins non inoculés.

Pour résumer, après 6 mois de culture du manioc, seul l'inoculum complexe et l'inoculum Mykepro P501 ont amélioré la colonisation mycorhizienne. Pour l'ensemble des paramètres agronomiques, l'inoculum complexe et l'engrais NPK ont été les plus efficaces et à un degré variable, Mykepro P501 et la souche locale *A. colombiana*.

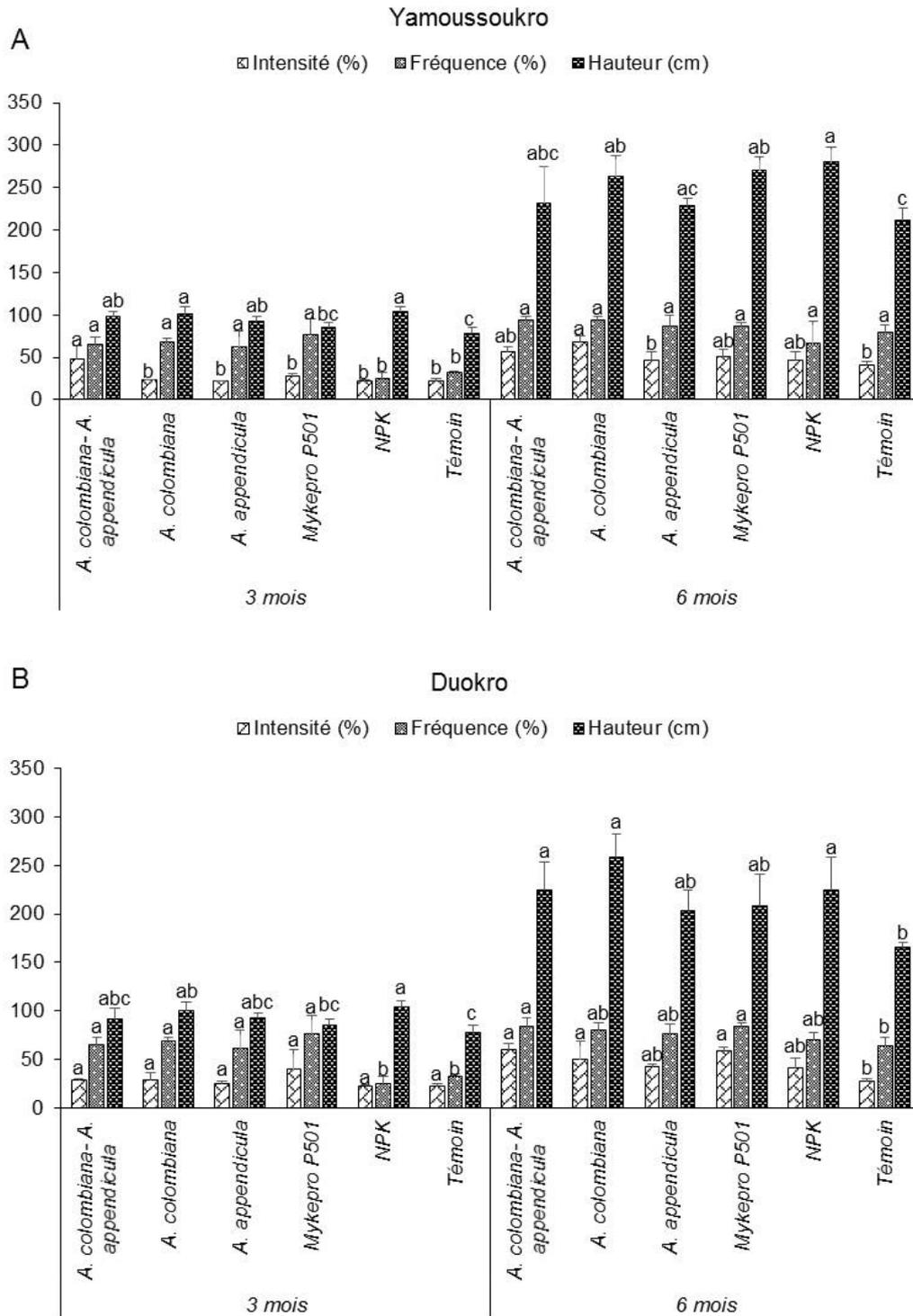


Figure 32. Colonisation mycorhizienne et croissance du manioc à Yamoussoukro et Duokro. Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %.

9.5.1.3. Colonisation mycorhizienne et croissance du manioc à Yamoussoukro en présence de NPK : cas de l'inoculation simultanée CMA + engrais NPK

L'intensité de mycorhization (Figure 33-A) au premier trimestre est comprise entre (22,8 % et 30,8 %), elles sont inférieures en général à celles observées en absence de NPK. Les

traitements *A. colombiana* - *A.appendicula* + NPK (30,8 %); *A. appendicula* + NPK (33,4 %) et Mykepro P501 + NPK2 (29 %) ont les taux les plus élevés et significativement différent du témoin NPK (22,8 %). Au deuxième semestre cependant, on assiste à une homogénéisation des intensités de mycorhization. En effet, il n'existe pas de différence significative entre les traitements.

La fréquence de mycorhization au premier trimestre est beaucoup plus élevée et différent statistiquement du traitement témoin. La co-inoculation CMA + NPK a amélioré la fréquence de mycorhization cependant, cet effet semble se dissiper à partir du sixième mois. Car aucune différence n'est constatée entre les traitements durant cette période. Au niveau de l'évolution de la hauteur des plants de manioc durant cette période, on n'a constaté aucune amélioration de la croissance dans le cadre d'une inoculation simultanée CMA et engrais NPK aussi bien au premier et au deuxième trimestre par rapport aux plantes ayant reçu uniquement les fertilisants chimiques NPK. En général, sur la parcelle de Yamoussoukro, l'inoculation des champignons mycorhiziens suivi un mois plus tard de l'apport d'engrais NPK n'engendre pas des effets sur les paramètres agronomiques. Les premiers effets observés en début de cycle de 3 mois notamment avec *A. colombiana* - *A. appendicula* + NPK s'estompent après six mois.

9.5.1.4. Colonisation mycorhizienne et croissance du manioc à Duokro en présence de NPK : cas de l'inoculation simultanée CMA + engrais NPK

Après trois mois de culture, l'intensité de mycorhization (Figure 33-B) est élevée et statistiquement significative pour le complexe *A. colombiana*- *A. appendicula* + NPK (33,4 %) par rapport aux parcelles témoins traitées avec du NPK (22,8 %). Au second trimestre par contre aucune différence entre les intensités n'a été notée au niveau de tous les traitements. Concernant la fréquence de mycorhization après trois mois, on note une augmentation des paramètres de mycorhization en co-inoculation CMA + NPK : *A.colombiana*- *A.appendicula* + NPK, *A. colombiana* + NPK, *A. appendicula* + NPK, Mykepro P501 + NPK (63,3 % à 88,3 %) que lors de la fertilisation NPK uniquement toutefois, l'effet disparaît au sixième mois. Car on ne note aucune différence significative entre les traitements à cette période en comparaison avec le témoin NPK. Aucune différence n'a été constatée entre les traitements CMA + NPK et les témoins fertilisés uniquement avec du NPK concernant la croissance en hauteur.

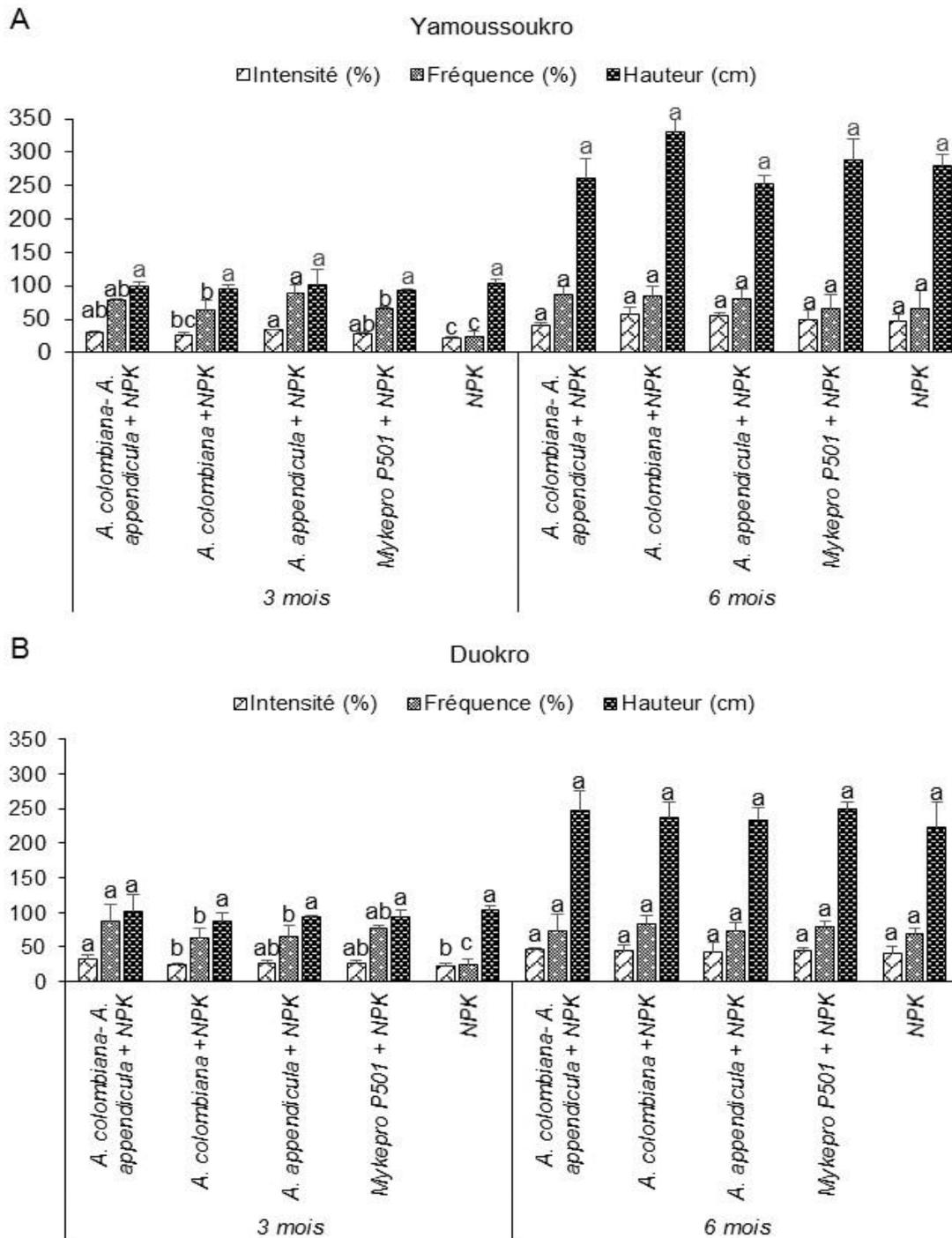


Figure 33. Colonisation mycorhizienne et croissance du manioc à Yamoussoukro et Duokro en présence du NPK.

Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

9.5.2. Biomasse totale fraîche et sèche du manioc à Yamoussoukro et Duokro

9.5.2.1. Biomasse totale fraîche et sèche du manioc à Yamoussoukro : cas de l'inoculation des CMA sans fertilisant NPK

L'évaluation de l'effet des inocula fongiques et de l'engrais NPK sur la biomasse fraîche et sèche totale a été faite sur la parcelle de Yamoussoukro. Dans un premier temps (Figure 34-A), nous avons évalué uniquement l'effet des champignons mycorhiziens sans engrais NPK sur la production globale de biomasse. A ce niveau, le traitement avec l'engrais chimique a amélioré significativement la biomasse fraîche et sèche totale par rapport au témoin non inoculé aussi bien au premier trimestre qu'au deuxième trimestre. Hormis l'engrais NPK, l'inoculum complexe *A.colombiana-A.appendicula* a eu un effet positif significatif sur la biomasse fraîche totale (1806 g) durant les trois premiers mois par rapport aux plantes témoins non inoculées (1056 g). Néanmoins six mois plus tard l'effet s'est estompé par rapport au témoin. Au niveau de la biomasse sèche totale on note une amélioration significative au seuil de 5 % par rapport aux plantes non inoculées. Les souches *Acaulospora colombiana*, *Ambispora appendicula* et Mykepro P501 n'ont pas eu un effet sur la biomasse totale sèche et fraîche.

9.5.2.2. Biomasse totale fraîche et sèche du manioc à Duokro : cas de l'inoculation des CMA sans fertilisant NPK

Sur la parcelle de Duokro (Figure 34-B), la biomasse fraîche totale mesurée a révélé l'efficacité du complexe *A.colombiana - A.appendicula* et la fertilisation chimique avec NPK par rapport au témoin non inoculé quelle que soit la période de mesure. Pour les souches *A.colombiana* et Mykepro P501, leur effet bénéfique sur la matière fraîche ne s'est fait ressentir qu'à partir du deuxième trimestre. En ce qui concerne la biomasse sèche totale, aucune différence n'a été observée le premier trimestre entre tous les traitements. Cependant, après six mois le complexe de spores et la fertilisation chimique classique ont amélioré celle-ci en comparaison aux parcelles témoins.

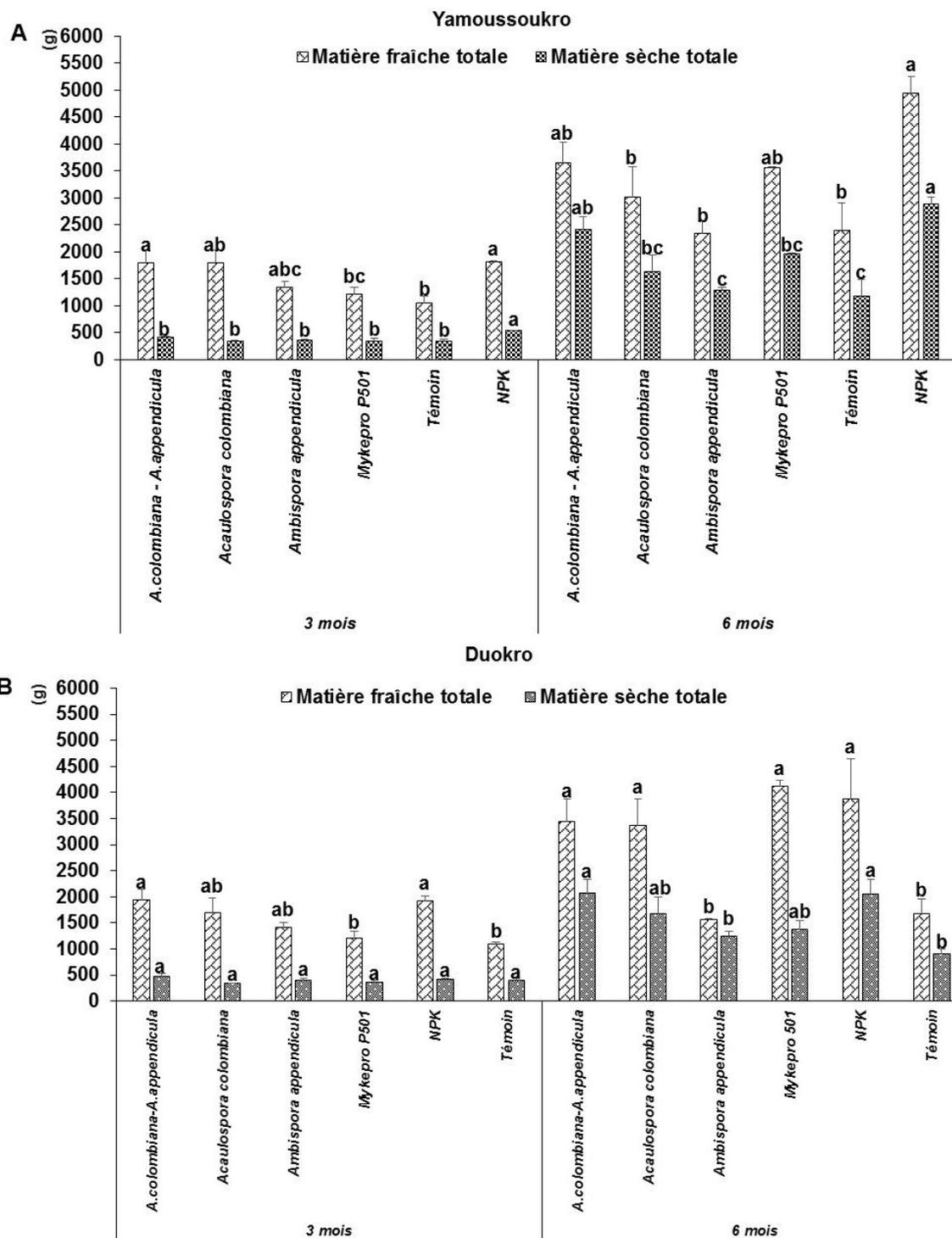


Figure 34. Biomasse fraîche et sèche à Yamoussoukro (A) et à Duokro (B) pour une inoculation de champignons mycorhiziens à arbuscules sans NPK.

Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

9.5.2.3. Biomasse totale fraîche et sèche du manioc à Yamoussoukro : cas de l'inoculation simultanée CMA + engrais NPK

Dans un second temps, l'évaluation de l'inoculation simultanée CMA suivi un mois plus tard d'engrais chimique NPK (Figure 35-A) a montré l'efficacité de la co-inoculation *A. colombian-A. appendicula* + NPK mais seulement durant le premier trimestre. Pour toutes les autres co-inoculations, aucune amélioration significative n'a pu être observée comparée à une fertilisation classique avec l'engrais NPK sur la parcelle de Yamoussoukro.

9.5.2.4. Biomasse totale fraîche et sèche du manioc à Duokro : cas de l'inoculation simultanée CMA + engrais NPK

La co-inoculation des CMA avec un mois plus tard l'engrais NPK (Figure 35-B) n'a eu aucun effet sur les biomasses fraîches et sèches totales en comparaison avec la fertilisation classique NPK. Cela quelle que soit la période de prise de mesures. L'apport de CMA en plus de l'engrais chimique n'a entraîné aucune augmentation des biomasses totales.

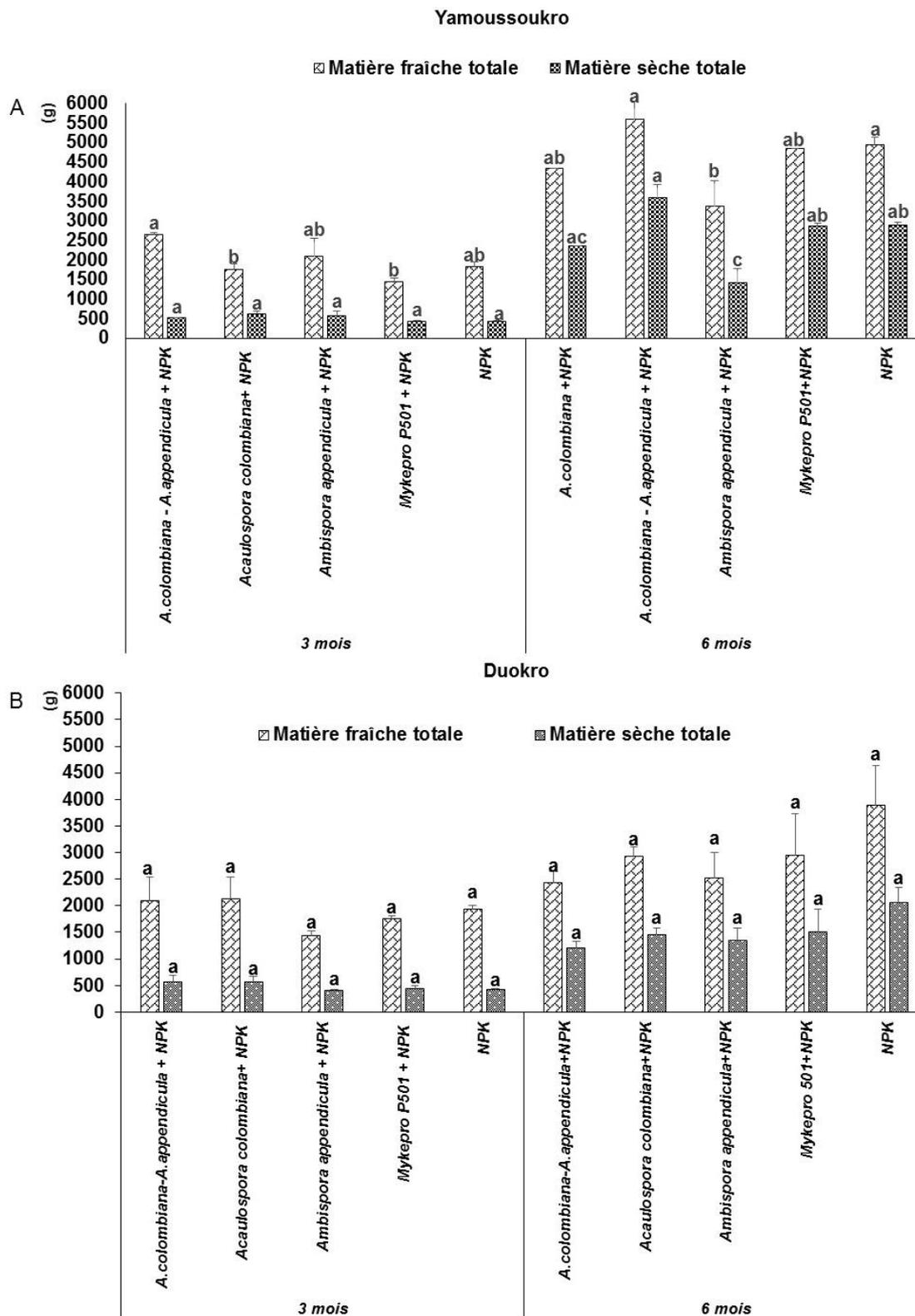


Figure 35. Biomasse fraîche et sèche à Yamoussoukro (A) et à Duokro (B) pour une inoculation simultanée engrais + champignons mycorhiziens à arbuscules.

Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

9.5.3. Nutrition minérale du manioc à Yamoussoukro et Duokro

9.5.3.1. Nutrition minérale du manioc à Yamoussoukro

Sur la parcelle expérimentale de Yamoussoukro, la teneur en éléments minéraux des feuilles de manioc en fin de cycle a été déterminée (Tableau 31). D'une part chez les plants ayant reçues uniquement les inocula de CMA et d'autre part chez les plantes ayant reçues des inoculas mycorhiziens suivis un mois plus tard d'un apport d'engrais NPK (Tableau 30). Dans les plantes inoculées avec les champignons mycorhiziens uniquement, la teneur des feuilles en azote a été améliorée pour les traitements Mykepro P501 (4,41 % ms) et *A. appendicula* (4,382 % ms), la teneur en phosphore par le complexe *A. colombiana*-*A. appendicula* (0,145 % ms) et Mykepro P501 (0,145 % ms) et le calcium par la souche *A.appendicula* (1,47 % ms). Pour les teneurs en potassium et en magnésium des feuilles, aucune différence significative n'a été observée entre les traitements mycorhiziens et le témoin non inoculé. En ce qui concerne la double inoculation CMA+ engrais NPK, les teneurs des feuilles de manioc en azote, en phosphore, calcium et en magnésium sont les mêmes aussi bien chez les plantes inoculées avec les CMA et l'engrais NPK par rapport aux plants ayant reçues la fertilisation classique avec le NPK uniquement. Cela suggère que ces éléments n'ont pas été impactés par la double inoculation. Cependant la combinaison du complexe *A. colombiana*-*A. appendicula* et de l'engrais NPK semble avoir amélioré l'absorption du potassium par rapport à la fertilisation avec le NPK.

Tableau 31. Nutrition minérale du manioc à Yamoussoukro

Inoculation CMA uniquement					
Traitement	N (%ms)	P (%ms)	K (%ms)	Ca (%ms)	Mg (%ms)
<i>A. colombiana</i>	3,96 ^b ±0,08	0,135 ^b ±0,004	0,739 ^a ±0,082	1,16 ^b ±0,019	0,23 ^a ±0,016
<i>A.appendicula</i>	4,382 ^a ±0,034	0,135 ^b ±0,004	0,74 ^a ±0,056	1,47 ^a ±0,156	0,23 ^a ±0,014
<i>A.colombiana</i> - <i>A.appendicula</i>	3,43 ^c ±0,05	0,145 ^a ±0,004	0,86 ^a ±0,052	1,146 ^b ±0,04	0,22 ^a ±0,001
Mykepro P501	4,41 ^a ±0,17	0,145 ^a ±0,004	0,804 ^a ±0,058	1,175 ^b ±0,122	0,25 ^a ±0,014
Témoin	3,52 ^c ±0,13	0,133 ^b ±0,004	0,835 ^a ±0,098	1,015 ^b ±0,02	0,24 ^a ±0,008
Inoculation CMA + engrais NPK					
Traitement	N (%ms)	P (%ms)	K (%ms)	Ca (%ms)	Mg (%ms)
<i>A.colombiana</i> + NPK	3,6 ^a ±0,53	0,135 ^a ±0,02	0,846 ^{ab} ±0,0975	1,152 ^b ±0,023	0,235 ^a ±0,00
<i>A.appendicula</i> + NPK	3,76 ^a ±0,1	0,14 ^a ±0,008	0,696 ^c ±0,056	1,156 ^b ±0,015	0,236 ^a ±0,00
<i>A. colombiana</i> - <i>A. appendicula</i> + NPK	3,78 ^a ±0,16	0,155 ^a ±0,012	0,87 ^a ±0,026	1,315 ^a ±0,036	0,258 ^a ±0,02
Mykepro P501 + NPK	3,598 ^a ±0,08	0,15 ^a ±0,0	0,814 ^{abc} ±0,013	1,1995 ^b ±0,058	0,232 ^a ±0,00
NPK	3,5 ^a ±0	0,16 ^a ±0,024	0,735 ^{bc} ±0,022	1,347 ^a ±0,024	0,24 ^a ±0,015

Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %.

9.5.3.2. Nutrition minérale du manioc à Duokro

Le dosage des éléments minéraux en fin de cycle dans les feuilles de manioc sur la parcelle de Duokro (Tableau 32) a été également effectué. Les résultats des analyses montrent que dans le cas d'une inoculation de CMA uniquement, les teneurs en phosphore (0,348 % ms), calcium (1,68 % ms) et en magnésium (0,505 % ms) sont améliorées par l'inoculation avec le complexe *A. appendicula* - *A. colombiana*. Pour tous les autres traitements, les teneurs des feuilles en azote, en phosphore, en potassium, en calcium et en magnésium aucunes différences significatives n'existent par rapport aux plantes témoins non inoculées. En ce qui concerne la double inoculation CMA+ engrais NPK, les teneurs des feuilles de manioc en azote et en calcium sont les mêmes aussi bien chez les plantes inoculées avec les CMA et l'engrais NPK par rapport aux plantes ayant reçues la fertilisation classique avec le NPK. Cela suggère que ces éléments n'ont pas été impactés par la double inoculation. Cependant la teneur en phosphore, en potassium, en magnésium a été amélioré grâce l'apport des CMA *A. colombiana*, *A. appendicula* et le complexe *A. colombiana*-*A. appendicula* en plus de l'engrais NPK.

Tableau 32. Nutrition minérale du manioc à Duokro

Inoculation CMA uniquement					
Traitement	N (%ms)	P (%ms)	K (%ms)	Ca (%ms)	Mg (%ms)
<i>A.colombiana</i>	5,46 ^a ±0,16	0,256 ^{ab} ±0,05	1,29 ^{ab} ±0,32	1,58 ^{ab} ±0,016	0,437 ^a ±0,07
<i>A.appendicula</i>	5,74 ^a ±0,45	0,253 ^{ab} ±0,02	1,514 ^{ab} ±0,23	1,51 ^{abc} ±0,1	0,317 ^b ±0,00
<i>A.appendicula</i> - <i>A.colombiana</i>	5,74 ^a ±0,34	0,348 ^a ±0,07	1,813 ^a ±0,28	1,68 ^a ±0,01	0,505 ^a ±0,026
Mykepro P501	5,712 ^a ±0,59	0,244 ^b ±0,04	1,25 ^b ±0,24	1,37 ^c ±0,17	0,281 ^b ±0,046
Témoin	5,586 ^a ±0,057	0,26 ^b ±0,016	1,54 ^{ab} ±0,02	1,39 ^{bc} ±0,05	0,312 ^b ±0,00
Inoculation CMA + engrais NPK					
Traitement	N (%ms)	P (%ms)	K (%ms)	Ca (%ms)	Mg (%ms)
<i>A.colombiana</i> + NPK	5,42 ^a ±0,19	0,235 ^a ±0,017	1,46 ^a ±0,13	1,38 ^a ±0,08	0,281 ^c ±0,00
<i>A.appendicula</i> + NPK	5,71 ^a ±0,43	0,236 ^a ±0,052±	1,43 ^a ±0,17	1,39 ^a ±0,08	0,332 ^c ±0,016
<i>A.colombiana</i> – <i>A.appendicula</i> + NPK	5,74 ^a ±0,11	0,247 ^a ±0,014	1,53 ^a ±0,03	1,37 ^a ±0,087	0,308 ^b ±0,003
Mykepro P501 + NPK	5,74 ^a ±0,11	0,232 ^a ±0,031	1,508 ^a ±0,1	1,25 ^a ±0,02	0,275 ^a ±0,006
NPK	5,25 ^a ±0,57	0,153 ^b ±0,00	1,115 ^b ±0,08	1,283 ^a ±0,012	0,222 ^d ±0,004

Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %.

9.5.4. Rendement et gain en performance du manioc à Yamoussoukro et Duokro

9.5.4.1. Rendement et gain en performance du manioc à Yamoussoukro : cas de l'inoculation des CMA sans fertilisant NPK

En fin de cycle, l'impact des CMA sur les rendements du manioc a été évalué dans les deux cas d'études. Pour le premier cas à savoir l'impact des inocula de CMA uniquement sur le rendement (Figure 36-A), les traitements avec Mykepro P501 et le complexe *A. colombiana*-*A. appendicula* ont amélioré le rendement (respectivement 9,5 t/ha et 9,4 t/ha) comparé au témoin non-inoculé (8,02 t/ha). Il en est de même pour l'apport d'engrais chimique NPK (10,9 t/ha). Les gains en rendement pour ces différents inocula de CMA sont de +17,8 % pour l'inoculum complexe *A. colombiana* - *A.appendicula*, +18 % pour l'inoculum commercial Mykepro P501. Cependant, il faut toutefois préciser que le gain en rendement le plus élevé est obtenu avec l'engrais NPK, avec une augmentation de +36,2 %.

9.5.4.2. Rendement et gain en performance du manioc à Duokro : cas de l'inoculation des CMA sans fertilisant NPK

En fin de cycle, l'impact des CMA sur les rendements du manioc sur la parcelle de Duokro a également été évalué dans les deux cas d'études. Pour le premier cas (Figure 36-B) à savoir l'impact des inocula CMA uniquement sur le rendement, les traitements avec *Acaulospora colombiana* et le complexe *A. colombiana*-*A. appendicula* ont amélioré le rendement (respectivement 9,58 t/ha et 9,81 t/ha) comparé au témoin non-inoculé (8,21 t/ha). Il en est de même pour l'apport d'engrais chimique NPK (11,38 t/ha). Les gains en rendement pour ces différents inocula de CMA sont de +19,4 % pour l'inoculum complexe *A. colombiana* - *A.appendicula*, + 16,6 % pour l'inoculum *Acaulospora colombiana*. Cependant il faut préciser que le gain en rendement le plus élevé est obtenu avec l'engrais NPK avec une augmentation de +38,5 %. Contrairement à la parcelle de Yamoussoukro, l'inoculum commercial Mykepro P501 n'a pas impacté significativement le rendement en racines tubéreuses frais de manioc sur la parcelle de Duokro par rapport au témoin non inoculé.

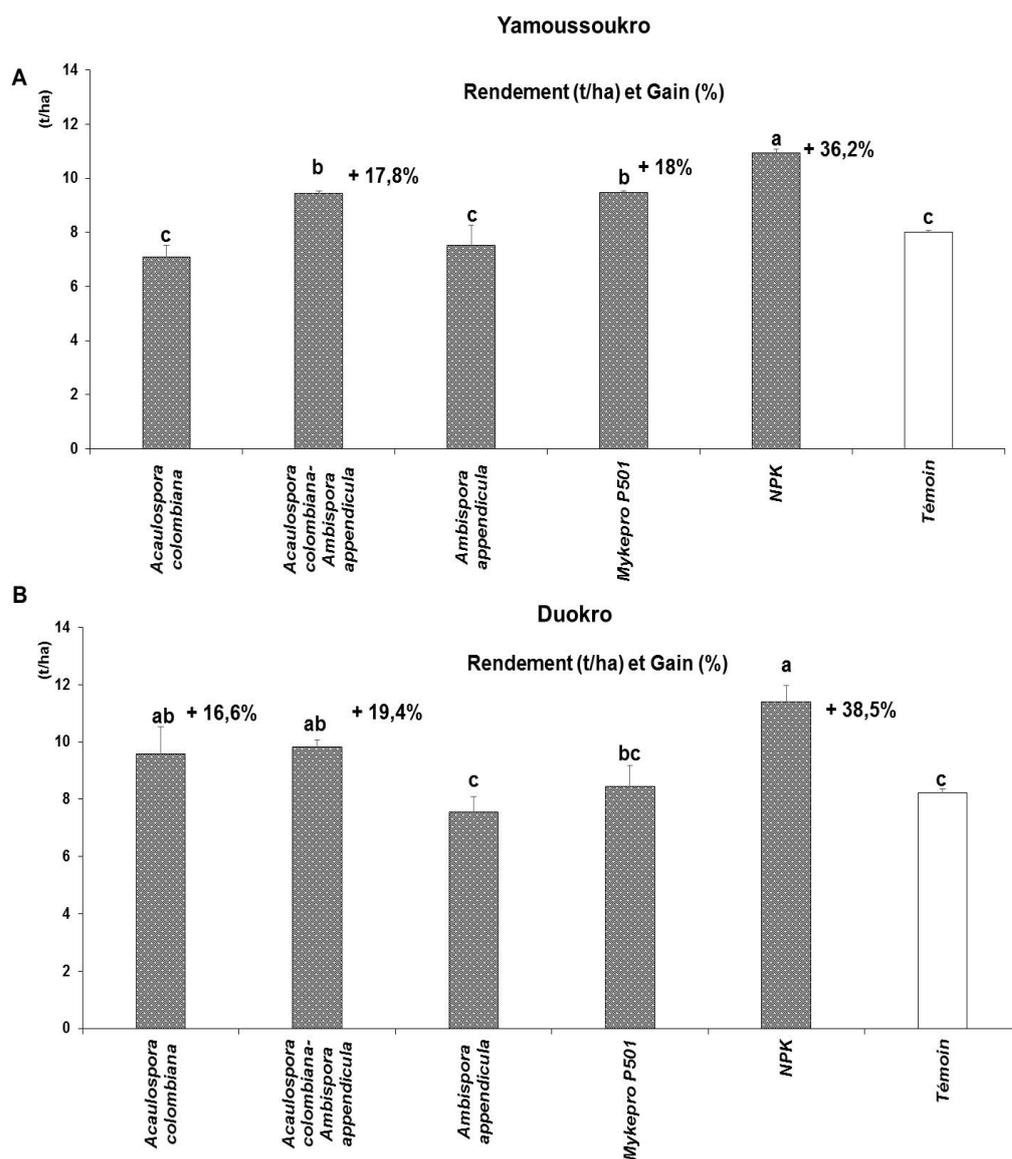


Figure 36. Rendement et gain en racines tubéreuses fraîches de manioc à Yamoussoukro (A) et Duokro (B) pour une inoculation de champignons mycorhiziens à arbuscules uniquement.

Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %.

9.5.4.3. Rendement et gain en performance du manioc à Yamoussoukro : cas de l'inoculation simultanée CMA + engrais NPK

Pour le deuxième cas, à savoir l'impact de l'effet combiné des inocula CMA + l'engrais NPK sur le rendement, aucune différence significative au niveau du rendement n'a été noté par rapport à la fertilisation classique avec l'engrais NPK uniquement. Les rendements obtenus varient de 9,53 t/ha à 12,16 t/ha (Figure 37-A).

9.5.4.4. Rendement et gain en performance du manioc à Duokro : cas de l'inoculation simultanée CMA + engrais NPK

Pour le deuxième cas, à savoir l'impact de l'effet combiné des inocula CMA + l'engrais NPK sur le rendement, aucune différence significative au niveau du rendement n'a été noté par rapport à la fertilisation classique avec l'engrais NPK uniquement. Les rendements obtenus varient de 9,45 t/ha à 11,45 t/ha (Figure 37-B).

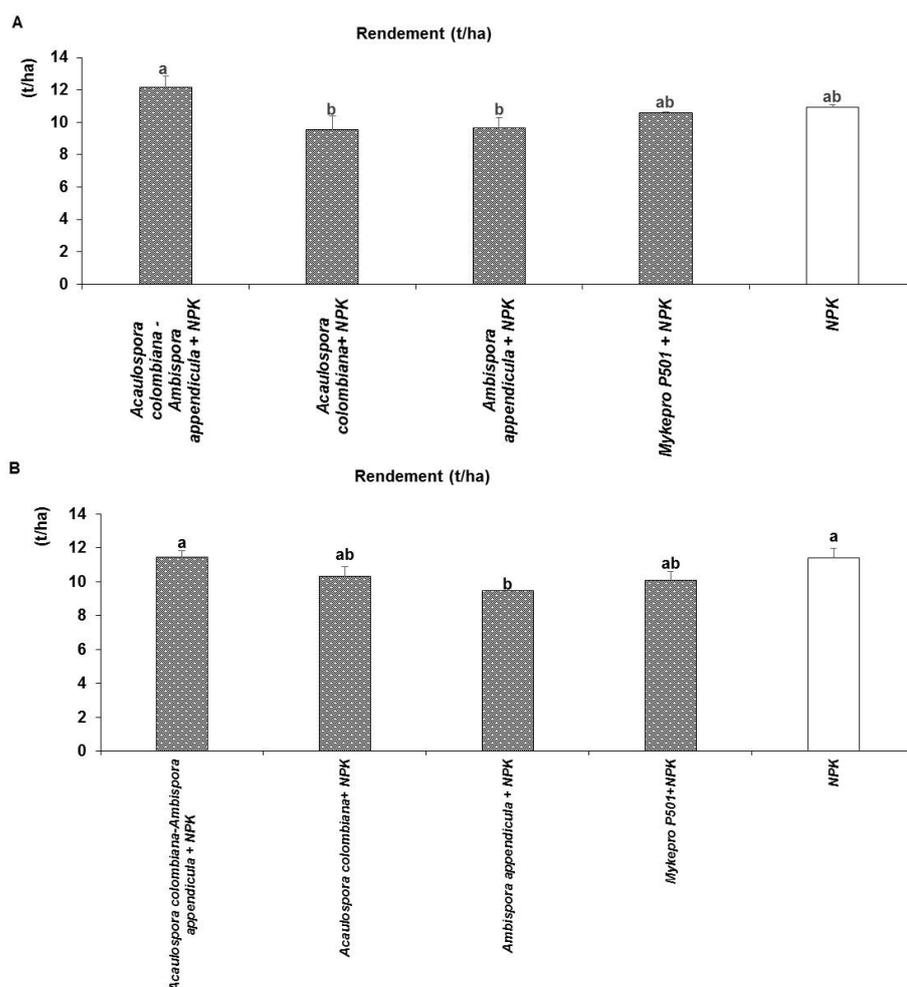


Figure 37. Rendement en racines tubéreuses fraîches de manioc à Yamoussoukro (A) et Duokro (B) pour une inoculation champignons mycorhiziens à arbuscules + engrais NPK.

Les colonnes avec des lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5%.

9.5.5. Impacts généraux des traitements sur les paramètres agronomiques du manioc

9.5.5.1. Site de Yamoussoukro

Un dendrogramme (Figure 38-A) a permis de ranger les différents traitements appliqués sur la parcelle de Yamoussoukro en trois grandes classes qui se rejoignent à une distance d'agrégation en fonction de leur efficacité sur l'ensemble des paramètres agronomiques. La première grande classe comporte essentiellement les traitements : *Acaulospora colombiana*, *Ambispora appendicula* et le traitement témoin. Cette première classe inclue le traitement témoin, elle peut être qualifiée de classe des traitements mycorhiziens non efficaces sur l'ensemble du paramètre de production du manioc. La deuxième grande classe est constituée des traitements *Ambispora appendicula* + NPK, *Acaulospora colombiana* + NPK, le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula*, Mykepro P501, Mykepro P501 + NPK. Cette classe peut être considérée comme la classe des traitements potentiellement efficaces car elle contient la fertilisation chimique NPK. Enfin la troisième classe qui contient uniquement le traitement *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* + NPK peut être considéré comme la classe des traitements efficaces. La première grande classe rejoint la deuxième classe à une distance d'agrégation de 2700 et les deux classes rejoignent la troisième à une distance d'agrégation de 4500.

9.5.5.2. Site de Duokro

Un dendrogramme (Figure 38-B) a permis également de ranger les traitements du champ de la parcelle de Duokro en trois grandes classes qui se rejoignent à une distance d'agrégation en fonction de leur efficacité sur l'ensemble des paramètres agronomiques. La première grande classe comporte essentiellement les traitements : Mykepro P501, *Ambispora appendicula* et le traitement témoin. Cette première classe inclue le traitement témoin, elle peut être qualifiée comme dans le premier cas de classe des inoculum mycorhiziens non efficaces sur l'ensemble du paramètre de production du manioc sur la parcelle de Duokro. La deuxième grande classe est constituée des traitements *Ambispora appendicula* + NPK, *Acaulospora colombiana* + NPK, le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula*, Mykepro P501+ NPK et *Acaulospora colombiana*. Cette classe peut être considérée comme la classe des traitements potentiellement efficaces car elle prend en compte l'apport de fertilisant NPK. Enfin la troisième classe qui contient le traitement *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* + NPK et le fertilisant NPK peut être considérée comme la classe des traitements efficaces. La deuxième classe rejoint la troisième classe à une distance d'agrégation de 1400 et les deux classes rejoignent la première classe à une distance d'agrégation de 1500.

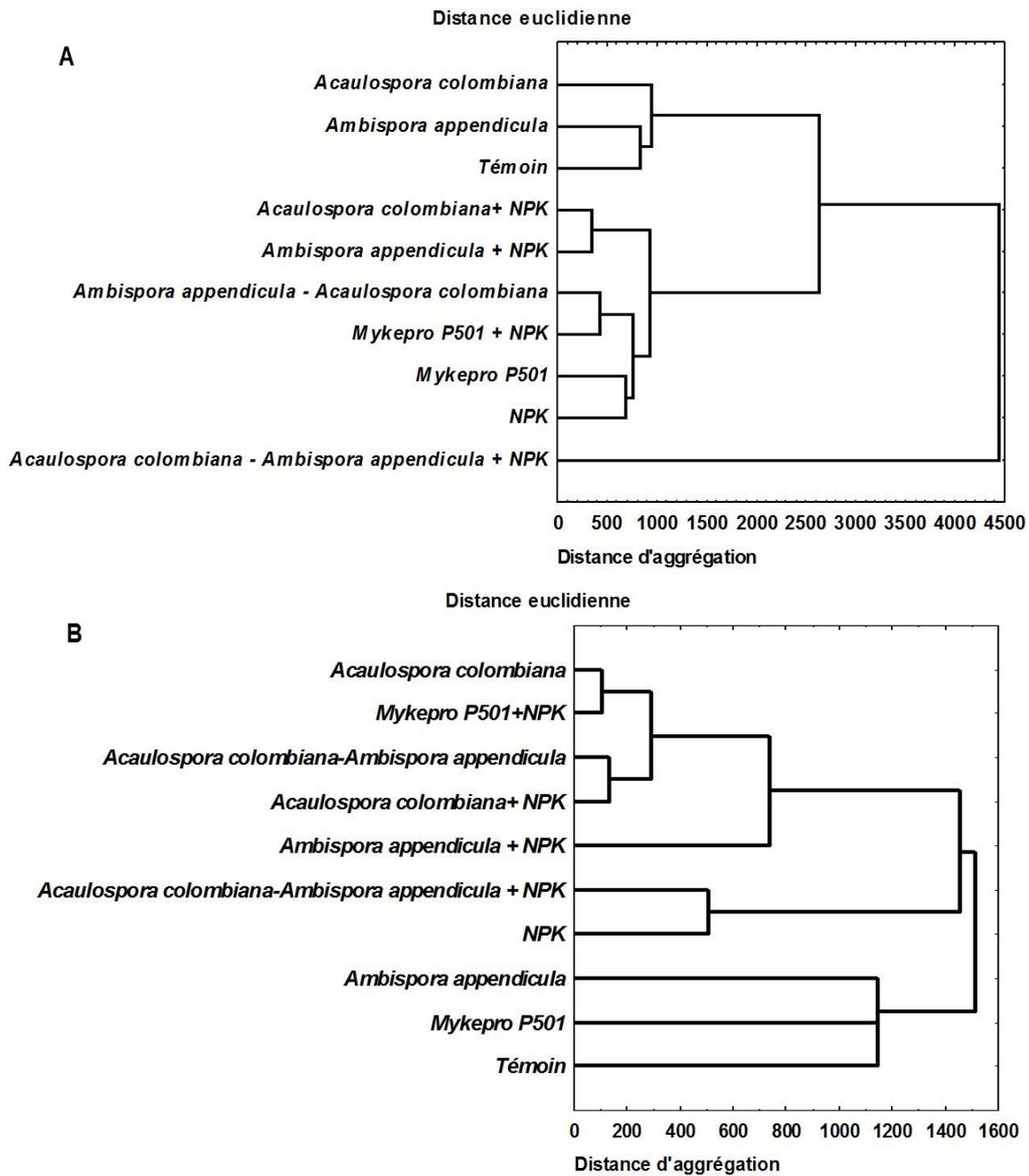


Figure 38. Classification des traitements selon leurs efficacités sur les paramètres agronomiques du manioc à Yamoussoukro (A) et à Duokro

CHAPITRE 10 : DISCUSSION

10.1. Etude moléculaire de la diversité des communautés de CMA associés au manioc dans trois zones agroécologiques en Côte d'Ivoire et impact des propriétés phyco-chimiques des sols sur leur structuration.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence l'écologie (la diversité et la structuration) des communautés de CMA endogènes en culture du manioc. Cette diversité est ensuite mise en relation avec les caractéristiques physicochimiques des sols de chacune des zones agroécologiques d'Abengourou, d'Azaguié et de Yamoussoukro. Les courbes de raréfaction des OTUs des trois zones ont atteint les asymptotes dans tous les cas, démontrant que l'effort de séquençage et d'échantillonnage dans le cadre de cette étude est suffisant pour couvrir toute la diversité des champignons mycorhiziens présents dans chaque région agroécologique. Au total 1409 OTUs sont associés à la rhizosphère du manioc, cela traduit une diversité importante de CMA associés au manioc.

L'étude de diversité effectuée à partir de l'assignation des OTUs a mis en évidence 25 espèces réparties au sein de 12 genres et 8 familles de CMA dans l'ensemble des trois zones agroécologiques. Cette diversité est importante comparativement à l'échelle générale proposée par Sieverding (1991) de 6-9 espèces dans les sols à fort apport d'engrais cas de l'agriculture intensive, 10-15 espèces dans les sols à faible apport d'engrais et de 16-21 espèces dans les écosystèmes naturels. En effet, en Côte d'Ivoire, la culture traditionnelle du manioc et sans fertilisants explique en partie cela. Les sols agricoles abritent des communautés diverses de CMA (Smith and Read, 2008 ; El-Sharkawy, 2006). Quarante-cinq espèces de CMA ont été isolées en Côte d'Ivoire par Wilson *et al.*, (1992) dans des plantations de *Terminalia*. Le manioc est fortement tributaire de cette association symbiotique (Larson *et al.*, 2014).

Les communautés de CMA des trois zones agroécologiques ont été analysées. 97,54 % des OTUs majoritaires rencontrés dans la rhizosphère du manioc pour les trois zones agroécologiques appartiennent à 5 genres comme précédemment décrit, le genre majoritaire est le genre *Rhizophagus* avec 65,27 % suivi de *glomus* 11,7 %, *Acaulospora* 9,52 %, *Funneliformis* 5,75 % et *Septoglomus* 5,44 %. Les genres qui contiennent le plus grand nombre d'OTUs sont *Rhizophagus*, *glomus* et *Acaulospora*. A cela s'ajoute 2,33 % qui sont

des genres minoritaires avec 7 représentants. La prédominance des genres *Rhizophagus*, *Glomus* et *Acaulospora* a été déjà rapporté par des études réalisées sur terres cultivées en zone tropicale (Mason et Wilson, 1994 ; Jefwa *et al.*, 2012). Il a été plusieurs fois démontré que le genre *Glomus* est le plus abondant dans les champs de manioc (Sieverding, 1989 a, b). La prédominance des genres, *Rhizophagus*, *Glomus*, *Acaulospora* en zone tropicale serait due à une adaptation de ces genres de CMA aux conditions tropicales, mais également au fait que leurs cycles de développement ne seraient pas aussi affectés par les répétitions des cultures sur les terres que ceux des genres minoritaires (Sieverding, 1989a ; Jansa *et al.*, 2002 ; Oehl *et al.*, 2003).

Les espèces de la famille des Glomeraceae (*Funneliformis*, *Rhizophagus*, *glomus*, *Septoglomus*) possèdent des hyphes intraradiculaires qui se différencient en des structures globulaires riches en lipides appelées vésicules (Smith et Read, 2008), qui leur permet de survivre à une interruption de l'approvisionnement en assimilât issus de la symbiose. Le genre *Acaulospora* et *Funneliformis* sont dominant dans les systèmes tropicaux comme observé au Brazil par Stürmer (2006). Cela s'explique par leur aptitude à produire beaucoup de spores de petites tailles sur une courte période (Bever *et al.*, 1996). Néanmoins, la présence de nombreuses espèces de la famille des glomeraceae dans le sol indique qu'ils peuvent mycorhizer le manioc à tous les stades de développement. Les genres *Rhizophagus*, *Glomus* et *Acaulospora* seraient les mieux indiqués pour la réalisation d'inocula dans les conditions de culture du manioc en Côte d'Ivoire. Vingt cinq espèces de CMA ont été trouvées associées à la rhizosphère du manioc, parmi celles-ci 8 espèces jugées majoritaires représentent 96 % de la diversité et 17 espèces minoritaire 4 % de la diversité. Ce sont *Rhizophagus* sp, *Rhizophagus irregulare*, *Glomus* sp, *Acaulospora colombiana*, *Funneliformis mosseae*, *Septoglomus* sp, *Rhizophagus intraradices* et *Acaulospora spinosa*. En effet, les espèces de glomeraceae et du genre *Acaulospora* se propageraient beaucoup plus par les spores qui sont des formes de résistance des CMA aux conditions difficiles tandis que les espèces mineures se propageraient plus avec d'autres types de propagules tels les hyphes, les fragments mycéliens extraracinaires (Brito *et al.*, 2012). La famille des glomeraceae (*Rhizophagus*, *Glomus*, *Funneliformis*, *Septoglomus*) grâce à sa large plasticité écologique est en général le genre ayant le plus grand nombre d'espèces sur les terres cultivées (Oehl *et al.*, 2003). La dominance de ces espèces sur les sols agricoles a été largement rapportée (Jansa *et al.*, 2002 ; Oehl *et al.*, 2003; Wang et Vestberg, 2008). Les Glomeraceae ont un mycélium extra-radical

fortement infectif qui peut coloniser rapidement les racines des plantes contrairement aux autres familles (Hart et Reader, 2002).

On distingue deux groupes d'espèces : les espèces spécifiques à chaque zone agroécologique et les espèces ubiquitaires. Les espèces spécifiques à chaque zone présentent dans la rhizosphère du manioc sont les suivantes : *Acaulospora alpina*, *Acaulospora longula*, *Acaulospora spinosa*, *Diversspora aurantium*, *Funneliformis* sp, *Diversipora aurantium*, *Funneliformis* sp, *Glomus deserticola*, *Intaornatospora* sp, *Paraglomus lacatum*, *Paraglomus* sp, *Racocetra castanea*, *Racocetra fulgida*, *Rhizophagus arabicus* et *Septoglomus jasnowskiae*. Conformément aux indices de dissimilarités de Bray-Curtis, les communautés de CMA des zones d'Azaguié, de Yamoussoukro et d'Abengourou sont différentes. Les caractéristiques physico-chimiques des sols structurent les espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules (Katsunori *et al.*, 2008). Certaines espèces se développent dans des sols ayant des caractéristiques bien définies.

Les espèces ubiquitaires présentent dans la rhizosphère du manioc quelle que soit la zone de culture sont les suivantes : *Acaulospora* sp, *Acaulospora cavernata*, *Acaulospora colombiana*, *Ambispora appendicula*, *Claroideoglomus* sp, *Dentiscutata* sp, *Funneliformis mosseae*, *Glomus* sp, *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus* sp, *Septoglomus* sp, *Acaulospora* sp, *Rhizophagus intraradices*, *Acaulospora colombiana*, *Funneliformis mosseae*, *Septoglomus* sp, *Glomus* sp, *Rhizophagus irregulare* et *Rhizophagus* sp. Ces espèces sont ubiquitaires, car elles ont une large gamme géographique avec un manque de spécialisation pour un environnement particulier comme *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irregularis* (Rosendahl *et al.*, 2009). Les espèces du genre *Rhizophagus*, mais également avec des *Glomus* inconnus sont des espèces généralistes peu importe la zone, elles sont associées à un grand nombre de plantes dont le manioc (Davison *et al.*, 2011). Des espèces appartenant au genre *Acaulospora* ont été trouvées associées au manioc dans les sols du Brésil (De Souza *et al.*, 1999).

L'étude des relations entre les analyses physicochimiques des sols et l'écologie des champignons a été faite. La répartition des genres et des espèces de CMA associés à la rhizosphère du manioc en fonction des classes de pH eau définit précédemment a révélé une diversité plus importante des genres et des espèces lorsque le pH tend vers la neutralité (6,5-7,5). Les espèces de CMA appartenant au genre *Rhizophagus* et *Glomus* se développent aussi bien dans les sols très acides (pH eau 3,5-5) que dans les sols acides (5-6,5) et neutres. La

répartition des espèces entre les différentes classes de pH eau est similaire à ceux des genres. Plus le pH tend vers la neutralité plus la diversité est importante. Comparativement au genre *Glomus* avec les espèces *Glomus* sp, les CMA du genre *Rhizophagus* se développent mieux avec les espèces *Rhizophagus* sp, *Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus* sp. Les espèces appartenant au genre *Acaulospora* (*Acaulospora colombiana*, *Acaulospora* sp) ; *septoglomus* (*Septoglomus* sp) ; *Funneliformis* (*Funneliformis mosseae*) se développent quant à eux plus dans les sols acides (5-6,5) et neutres (6,5-7,5). Le pH du sol a un impact sur la structuration des communautés de CMA associés à la rhizosphère du manioc.

Les communautés de CMA sont affectées par les conditions du sol, les espèces végétales et les communautés, ce qui entraîne différents niveaux de colonisation des racines des plantes hôtes et à différents niveaux de bénéfice de l'association CMA pour ces plantes. Les communautés de CMA sont affectées par les conditions du sol comme révélé par les Analyses en Composantes Principales et les coefficients de corrélations de Pearson. Parmi les différentes variables édaphiques, le pH et la disponibilité du phosphore sont des déterminants majeurs de la mycorhization arbusculaire (Entry *et al.*, 2002). Généralement, les champignons mycorhiziens sont sensibles à l'acidité et les racines des plantes sont habituellement plus colonisées par les CMA à un pH presque neutre. Cela justifie l'importante diversité constatée quand le pH oscille entre 6,5 et 7,5. Cependant, certains genres de CMA tels que *Acaulospora* et certaines espèces telles que *Rhizophagus* sp sont bien adaptées à un faible pH (Gai et Liu, 2003). Les caractéristiques physico-chimiques des sols d'Abengourou et Yamoussoukro justifient l'abondance du genre *Acaulospora* car certaines espèces sporulent plus dans les sols acides et neutres (Gai et Liu, 2003 ; Katsunori *et al.*, 2008). Aussi, dans les sols à pH alcalin, des communautés de champignons CMA tolérants à un pH élevé peuvent coloniser les racines des plantes (Oliveira *et al.*, 2006). L'association des CMA avec le manioc a été étudiée principalement dans les sols tropicaux à forte acidité et faible teneur en phosphore (Ceballos *et al.*, 2013). Dans ces conditions de sol, des espèces de CMA telles que *Rhizophagus manihotis*, *Acaulospora colombiana* (Howeler et Sieverding, 1983), *Rhizophagus irregularis* (Ceballos *et al.*, 2013) et *Paraglomus occultum* (Dodd *et al.*, 1990) sont des symbiotes importants du manioc et mobilisent efficacement le phosphore pour la plante par le réseau d'hyphe. Il a été montré que les sols acides sont favorables au développement des spores de certaines espèces de CMA (Kelkar et Bhalerao, 2013).

A l'image du pH, des teneurs élevées du sol en phosphore assimilable impactent la structuration des communautés aussi bien au niveau du genre et des espèces. Des teneurs du

sol élevées (50-100 ppm) en phosphore réduisent la diversité avec la dominance d'un genre *Rhizophagus* (*Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus intraradices* et *Rhizophagus* sp). Les genres et espèces associées *Glomus* (*glomus* sp), *Acaulospora* (*Acaulospora colombiana*, *Acaulospora spinosa*, *Funneliformis* (*funneliformis mossae*), *Septoglomus* (*septoglomus* sp) sont plus présents dans les sols pauvres (30-50 ppm) et très pauvres (inférieur à 30 ppm). L'espèce *Acaulospora colombiana* s'est développée majoritairement dans les sols très pauvres (inférieur à 30 ppm) en phosphore assimilable. Cette espèce pourrait être un sérieux candidat pour la production d'inoculum de souches compétitives. La colonisation mycorhizienne des racines est plus probable dans les sols avec une faible disponibilité du phosphore (moins de 15 ppm). La forte disponibilité en phosphore entraîne la réduction de la colonisation par les CMA (Smith et Read, 1997) et l'absorption de phosphore peut varier grandement entre les champignons mycorhiziens à arbuscules (Smith *et al.*, 2000) ainsi ces sols sélectionnent uniquement les souches (genres et espèces) tolérantes aux fortes teneurs en phosphore. Conformément aux travaux de Sharda et Rodrigues (2009), il existe une corrélation négative entre la densité des spores et la teneur en phosphore du sol. Dans les sols à forte disponibilité en phosphore (plus de 30 ppm), on constate généralement que les communautés de CMA sont réduites (Gosling *et al.*, 2013) et que l'association symbiotique est inhibée ou moins efficace (Howeler et Sieverding, 1983).

Cependant, ce modèle n'est pas cohérent pour toutes les espèces végétales. Apparemment, la colonisation des racines de maïs par les CMA n'est pas affectée par une disponibilité très élevée en phosphore (plus de 140 ppm) (Gosling *et al.*, 2013). Les communautés fongiques sont également affectées par la composition des espèces végétales donc des variétés de manioc sur les parcelles. Ces résultats suggèrent que la structuration des communautés de CMA change avec les facteurs édaphiques et les systèmes de cultures. En plus du pH eau et de la teneur en phosphore assimilable, la teneur en matière organique (M.O) discrimine les sols de ces trois zones agroécologiques. La tendance se poursuit avec la teneur en M.O du sol, même si cela est moins marqué que dans le cas du pH et de la teneur en phosphore assimilable. Plus la teneur en matière organique est élevée (supérieur à 4) plus la diversité est importante. On assiste aussi à une équirépartition des abondances entre les espèces. Les genres et espèces associées *Rhizophagus* (*Rhizophagus* sp, *Rhizophagus irregulare*, *Rhizophagus intraradices*); *Funneliformis* (*Funneliformis mosseae*); *Acaulospora* (*Acaulospora colombiana*) prennent le dessus dans les sols pauvres en M.O par rapport aux autres genres de CMA. Le nombre élevé d'espèces trouve sa réponse dans les travaux de

Collins Johnson *et al.* (1991). Plusieurs de ses investigations sur le terrain ont établi des corrélations positives entre l'augmentation de la matière organique (carbone, azote) et la diversité des glomales. Les réponses variables des CMA aux niveaux de pH et à la disponibilité du phosphore dans les sols et les espèces végétales indiquent que les CMA s'adaptent aux conditions du sol et qu'une certaine coadaptation entre les CMA et les plantes cultivées dans des conditions édaphiques particulières peut être attendue. Comprendre comment les conditions environnementales, écologiques favorisent la mycorhization et la sélection de souches adaptées en fonction des cultures particulières fournit des indices pour une agriculture plus durable incluant la mycorhization qui pourrait assurer une alimentation de base des populations vivant dans les tropiques.

En conclusion, notre étude a contribué à enrichir la base de données des glomeromycètes trouvés en Côte d'Ivoire et dans les sols africains. Des efforts ont été déployés dans le monde pour améliorer les avantages que l'association mycorhizienne arbusculaire peut apporter à l'agriculture (Ceballos *et al.*, 2013). L'un des objectifs est de réduire l'utilisation d'engrais chimiques (et la pollution environnementale associée) en raison d'une association mycorhizienne arbusculaire plus efficace entre les cultures et les champignons mycorhiziens à arbuscules. Cela passe nécessairement par la sélection de souches de champignons mycorhiziens à arbuscules adaptées. L'espèce *Acaulospora colombiana* ubiquitaire et majoritaire dans les sols pauvres en phosphore apparaît comme un candidat potentiel. Dans le cas particulier du manioc cultivé dans des systèmes agricoles traditionnels à faibles utilisations d'engrais, cela peut-être une démarche importante.

10.2. Sélection, identification et production d'inoculum mycorhizien de souches locales performantes de CMA.

Dans la suite logique de la caractérisation moléculaire des communautés de CMA présentes dans la rhizosphère du manioc, l'étude actuelle est le rapport de la première stratégie d'ingénierie écologique qui montre comment gérer les potentialités des communautés de CMA associées à des champs de manioc afin d'améliorer la productivité de cette importante culture alimentaire en Côte d'Ivoire. Cette gestion des communautés passe par la sélection de souches compétitives pour l'inoculation en agriculture. Bien sûr, les avantages potentiels de l'inoculation des cultures de manioc avec des champignons mycorhiziens à arbuscules ont été récemment démontrés (Ceballos *et al.*, 2013). Les souches utilisées dans ces études étaient soit des souches de *Rhizophagus irregularis* bien connues (Ceballos *et al.*, 2013) ou des espèces locales de CMA isolées sans aucune stratégie de sélection initiale (Oyetunji et Osunubi, 2007). Si nous devons utiliser efficacement l'inoculation des champignons mycorhiziens à arbuscules dans l'agriculture durable, il serait d'une importance de proposer une stratégie de gestion appropriée des communautés endogènes comme discuté plus tôt (Rodriguez et Sanders, 2015). Les résultats actuels indiquent une stratégie d'ingénierie écologique qui peut être transférée à d'autres plantes cultivées comme un processus solide pour sélectionner les espèces de CMA efficaces pour l'inoculation. En effet, dans ce processus, les espèces de CMA prédominants au sein des communautés associées aux champs de manioc dans les trois domaines étudiés ont été tout d'abord prises en compte. Les espèces *A. scrobiculata*, *A. colombiana*, *A. appendicula*, *C. etunicatum*, *G. glomerulatum* et une espèce non identifiée G. Sp2 étaient présentes dans tous les champs de manioc dans les trois régions comme déjà indiqué par Voko (2014). Bien sûr, afin d'être largement et efficacement utilisée dans la technologie de l'inoculation, une espèce de CMA doit être prédominante dans la plupart des écosystèmes comme dans le cas des membres de Glomeraceae largement distribués dans les milieux naturels (Opik *et al.*, 2010), notamment la bien connue et commercialement utilisée espèce *Rhizophagus irregularis* (Manaut *et al.*, 2015). Dans cette étude, il était important de confirmer si oui ou non ces espèces *A. scrobiculata*, *A. colombiana*, *A. appendicula*, *C. etunicatum*, *G. glomerulatum* et les espèces non identifiées G. Sp2 dominant dans les sols de terrain ont également été prédominante lorsque le manioc a été utilisé pour le piégeage en serre. Car les spores des CMA isolées directement des champs peuvent représenter uniquement les CMA qui ont une activité de colonisation mycorhizienne suffisante et une biomasse conséquente pour enclencher la sporulation. Dans les sols

difficiles on trouve peu ou pas de sporulation mais les racines des plantes sont mycorhizées (Morton *et al.*, 1993). Un autre argument est que les spores rencontrées dans la rhizosphère du manioc peuvent être rattachées à des plantes adventices. Aussi, les spores qui sporulent beaucoup dans le sol ne sont pas forcément celles qui colonisent les racines de la plante (Sanders, 2004). Le piégeage avec la plante cible crée les conditions pour la colonisation mycorhizienne et la sporulation de toutes les espèces indigènes présentes dans le milieu. Il a été montré que seule *A. colombiana* et *A. appendicula* colonisent non seulement le manioc mais étaient dominants et également présents dans toutes les communautés piégées, quel que soit l'origine des sols utilisés comme inoculants aussi bien après l'étude moléculaire que morphologique de la diversité des communautés de CMA associés au manioc. Bien que *A. appendicula* était présent dans toutes les communautés piégées, il était moins abondant que *A. colombiana* comme l'a confirmé précédemment l'étude moléculaire. Etant donné que ces deux espèces remplissaient l'ensemble des critères de sélection, elles ont été utilisées comme des candidats potentiels pour l'inoculation. Avant le traitement, il est intéressant de remarquer que dans la présente étude, l'identification morphologique pour décrire la composition et l'abondance des espèces a été utilisée, qui peuvent ne pas être l'approche appropriée. Cependant, l'identification de ces deux espèces a été confirmée par une approche moléculaire. Toutefois, les deux méthodes : la méthode morphologique d'identification et la méthode moléculaire peuvent parfois être comparables comme décrit dans des travaux sur l'étude des communautés fongiques (Manaut *et al.*, 2015). Néanmoins, à ce stade l'abondance des espèces est plus liée à des densités de spores. Une question clé est d'être sûr de l'abondance des espèces, leur présence et être sûr de l'identité de l'espèce. L'approche de cette étude qui a combiné l'identification à la fois morphologique et moléculaire a permis une gestion simple et à faible coût des potentialités des communautés de CMA endogènes pour améliorer la productivité alimentaire, en particulier en Afrique. Fait intéressant, l'utilisation des caractéristiques de spores pour décrire la composition des espèces a aussi été largement utilisée en Afrique (Nandjui *et al.*, 2013 ; Voko *et al.*, 2013 b, Ouahmane *et al.*, 2012).

10.3. Evaluation en serre de l'efficacité des CMA natifs sur la croissance, la nutrition minérale, les *Meloidogynes* et le stress hydrique du manioc.

Pour une utilisation durable des champignons mycorhiziens à arbuscules dans l'agriculture, il serait d'un grand avantage de développer des inocula de CMA qui peuvent être en même temps des promoteurs de croissance, des suppresseurs de maladies et comme une alternative contre le stress hydrique. Une raison pour laquelle dans cette étude, l'efficacité de ces espèces de CMA indigènes isolées et identifiées a été évaluée sur leur capacité à la fois (i) de promouvoir la croissance des plantes de manioc (ii) de contrôle des populations de nématodes dans les racines et (iii) d'améliorer la tolérance des plantes de manioc au stress hydrique. A cet effet, l'inoculation en utilisant *A. colombiana* ou *A. appendicula* ou la double inoculation des deux espèces ont été réalisées.

Il a été montré que l'inoculation seule de *A. colombiana* a considérablement favorisé la croissance des plants de manioc et améliorer leur tolérance à la fois à l'infestation des racines par des nématodes du genre *Meloidogyne* spp et le stress hydrique. Il a été remarqué que l'inoculum utilisant *A. appendicula* n'a eu aucun effet sur l'absorption du phosphore et les paramètres de croissance du manioc. En fait, d'autres études ont rapporté des effets variables entre les espèces endogènes utilisées comme inoculum pour d'autres plantes (Ortas et Üstüner, 2014).

Dans cette étude, au cours du processus de sélection, il a été remarqué que, bien qu'*A. Appendicula* fût présent et abondant dans les sols sur le terrain, son abondance dans les communautés piégées et dans les sols des champs n'était pas assez forte par rapport à *A. colombiana*. Cela pourrait probablement être une raison possible pour laquelle l'inoculation unique en utilisant *A. appendicula* n'a eu aucune incidence sur la promotion de la croissance du manioc. Cependant, il est intéressant de noter que la double inoculation des deux espèces a également une incidence positive sur l'absorption du P et les paramètres de croissance du manioc comme l'a fait l'inoculum contenant *A. colombiana*. L'impact positif de la double inoculation a également été observé sur la croissance des agrumes (Ortas et Üstüner, 2014). Afin d'estimer l'effet bioprotecteur des CMA contre les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* spp., des plantes de manioc ont été inoculées avec soit *A. colombiana* ou *A. appendicula* ou avec les deux espèces et co-inoculé ou post-inoculé après le développement des mycorhizes avec des nématodes du genre *Meloidogyne* spp. Encore une fois, il a été montré que l'inoculation unique en utilisant *A. colombiana* a contribué à une absorption significative du P et par conséquent une biomasse plus élevée des plantes de manioc

uniquement lorsque les nématodes ont été inoculés après mycorhization comme déjà démontré pour d'autres plantes (Elsen *et al.*, 2003 ; Hao *et al.*, 2012). L'inoculation unique en utilisant *A. Appendicula* n'a pas été efficace pour protéger les plantes de manioc contre les nématodes du genre *Meloidogyne* spp soit co-inoculées ou post inoculées. Pourtant, le mécanisme de la bioprotection conférée aux plantes de manioc par *A. colombiana* contre les nématodes du genre *Meloidogyne* spp doit être compris. Cependant, on a observé que non seulement les œufs de nématodes et les densités de population ont été considérablement réduits dans les racines de manioc quand les nématodes ont été inoculées après l'établissement de la mycorhization, mais aussi une accumulation de composés phénoliques dans les racines mycorhizées ont été confirmées comme précédemment (Banuelos, 2014). Les plantes de manioc pré-mycorhizées avant infestation par les nématodes avait une meilleure chance d'augmenter la teneur en phénol des racines. Plusieurs études ont conclu que les champignons mycorhiziens sont impliqués dans les mécanismes de défense des plantes en augmentant la teneur en composés phénoliques et en antioxydants (Xu *et al.*, 2008). Singh *et al.*, (1990) ont conclu que les plantes pré-inoculées couplées à des changements biochimiques sont responsables de la résistance aux nématodes. L'efficacité de la souche *A. colombiana* pour conférer une tolérance au stress hydrique des plantes de manioc a également été démontrée dans cette étude. Il a été montré que les fréquences de mycorhization diminuent progressivement au cours de la période de sécheresse pour tous les traitements par rapport au régime hydrique de 100 %.

Cependant, les fréquences de mycorhization par *A. colombiana* sont restées plus élevées et stables. Cela pourrait être le résultat d'un réglage spécifique de *A.colombiana* pendant la période de sécheresse, à savoir une augmentation du volume de racines fines comme il est suggéré dans les travaux d'Augé (2001). Ceci pourrait être expliqué par une meilleure activité photosynthétique en raison des niveaux élevés de chlorophylle (a) et de sucres totaux dans les plants de manioc inoculées avec *A. colombiana* par rapport aux plantes non-mycorhizées comme suggéré plus tôt (Mathur *et al.*, 1995). En conclusion, cette étude montre clairement la nécessité de gérer les communautés autochtones de CMA associées aux champs de manioc en termes de stratégie d'ingénierie écologique si nous voulons développer un inoculum efficace. La stratégie utilisée était l'abondance des espèces de CMA dans les champs ainsi que dans les communautés piégées et leur présence dans tous les milieux étudiés. Ce fut le cas de *A. colombiana* et *A. appendicula*. Cependant, lorsque l'efficacité de ces espèces ont été testées, il a été montré que *A. colombiana* et le complexe *Acaulospora colombian-Ambispora appendicula* étaient les meilleurs inocula. Nous pensons qu'il est très important d'utiliser une

espèce native de CMA comme inoculum si les critères de sélection (ubiquité et l'abondance dans les sols sur le terrain et les communautés piégées) sont pleinement atteints. En effet, il y avait une différence entre *A. colombiana* et *A. appendicula* en termes d'abondance dans les communautés piégées dans un sens que *A. colombiana* était très abondante. Cette ingénierie écologique permet de sélectionner un inoculum qui favorise la croissance des plantes de manioc, d'atténuer la tolérance aux nématodes et la sécheresse dans le même temps. Cette étude ouvre la possibilité d'utiliser cet inoculum et aussi le complexe *A. colombiana*- *A. appendicula* dans le domaine de l'inoculation en Côte d'Ivoire. Cette stratégie d'ingénierie écologique dans son ensemble peut être appliquée à d'autres cultures vivrières pour la sélection d'inoculum efficace dans l'agriculture durable, spécialement dans les pays en développement. Ces inocula doivent cependant être éprouvés en champ en condition réelle pour une vulgarisation générale.

10.4. Evaluation en champ de l'efficacité de souches locales *Acaulospora colombiana* et *Ambispora appendicula* et industrielle *Rhizophagus intraradices* sur les performances agronomiques du manioc.

Dans cette étude l'efficacité des inocula de souches natives sélectionnées a été éprouvée. L'efficacité des souches indigènes (*Acaulospora colombiana*, *Ambispora appendicula*) et non indigènes (*Rhizophagus intraradices*) a été évaluée sur le manioc dans les conditions de champs. L'effet de ces endophytes en condition locale sur les paramètres de croissance, la nutrition minérale et le rendement du manioc sur deux sites expérimentaux a été analysé. Cela permet d'apprécier l'adaptabilité des souches indigènes et non indigènes aux conditions environnementales et leur compétitivité vis-à-vis des communautés natives de CMA présents dans les sols des champs. Nous avons aussi évalué leur efficacité en combinaison ou non avec les engrais chimiques NPK en vue d'apprécier l'impact potentiel de la fertilisation minérale et de la composition physico-chimiques des sols des différents sites sur l'efficacité des souches de CMA sélectionnées en champs.

A cet effet pour chaque parcelle expérimentale, un échantillonnage de sols a été effectué afin de déterminer leurs caractéristiques physico-chimiques. Dans la parcelle de Yamoussoukro, malgré une bonne décomposition de la matière organique suivie d'une bonne capacité de stockage des éléments minéraux ; les sols selon les normes d'interprétation sont acides, très pauvre en phosphore et pauvre en matière organique. Le stock de cations échangeable est moins important que celle de Duokro. Pour le site de Duokro, les sols sont neutres, riches en matière organique, avec également une bonne décomposition de la matière organique et une bonne capacité de stockage des éléments minéraux. De surcroit, on note que par rapport au site de Yamoussoukro, bien que les sols de Duokro soient pauvres en phosphore leur teneur est plus importante statistiquement que celle de Yamoussoukro. Des deux sites expérimentaux, le site de Duokro présente les meilleures caractéristiques physicochimiques. Malgré les qualités physicochimiques médiocres des sols des différents sites expérimentaux ils ont permis la culture du manioc confirmant la capacité d'adaptation du manioc à divers sols (Raffaillac et Second, 1998).

A l'exception du déficit en phosphore, ces conditions physicochimiques sont favorables aux conditions écologiques de culture du manioc pour une production moyenne (Yaninek et Schulthess, 1993 ; Akanza, 2011). Ces analyses confirment donc l'hypothèse selon laquelle, les sols tropicaux sont carencés en phosphore biodisponible (Schwartz, 1994). Car moins de 1 % du phosphore total est assimilable par les plantes (Bolan *et al.*, 1991). Cette faible

disponibilité du phosphore dans la solution du sol constitue une contrainte pour la nutrition phosphatée des plantes et partant la productivité agricole entre autres celle du manioc (Schwartz, 1994). L'utilisation de l'engrais NPK selon la littérature donne des résultats variables (Pellet et El-Sharkawy, 1993 a, b). L'efficacité de l'engrais NPK est tributaire de la variété de manioc utilisée et des conditions pédoclimatiques. Cependant, selon Howeler (2002) la présence d'endomycorhizes sur les racines, aiderait à la nutrition phosphatée et à maintenir des rendements acceptables dans des conditions difficiles. Celles-ci ont été décelées sur le manioc en Côte d'Ivoire quel que soit le système de culture (Voko, 2013). Toutefois, les rendements de manioc sont très variables suivant, l'origine, les espèces et la performance des CMA utilisées (Cardoso et Kuyper, 2006 ; Ceballos *et al.*, 2013).

Dans cette logique d'utilisation efficiente des endomycorhizes, l'évaluation de l'ingénierie écologique endomycorhizienne sur la croissance, la nutrition et le rendement du manioc en combinaison ou non avec la fumure minérale NPK a été faite. Les traitements appliqués ont des effets sur les paramètres agronomiques du manioc dans leur ensemble. Il ressort des analyses sur la hauteur, la biomasse racinaire et aérienne qu'en général, le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* a été l'inoculum le plus efficace sur les deux sites par rapport aux inocula locaux à base de *Acaulospora colombiana* et l'inoculum commercial MykeproP501 dont l'efficacité n'est pas constante d'une parcelle à l'autre. Ces résultats confirment les conclusions de van der Heijden et collaborateurs (1998b), selon lesquels certaines populations de CMA peuvent être efficaces pour les cultures en certains sites, mais pas sur d'autres, ou seulement quelques-unes des espèces constituant les CMA peuvent être efficaces. L'inoculum local à base de *Ambispora appendicula* a été le moins efficace de tous. L'engrais NPK a été néanmoins le plus efficace de tous les traitements sur les deux parcelles. Cette efficacité des inocula complexes et de l'engrais chimique NPK prend en compte la biomasse fraîche et sèche totale. L'effet positif dû à l'inoculation pourrait s'expliquer entre autre par la compétitivité des souches en présence des souches indigènes (Lambert *et al.*, 1980). Cette compétitivité se matérialise par des intensités et des fréquences de mycorhization élevées et significativement différents des autres traitements avec aussi bien les souches locales qu'industrielles. Selon la littérature les inocula à base de complexe de spores sont plus efficaces que les inoculas monospécifiques (Schreiner et Bethlenfalvai, 1994). Pour la souche industrielle *Rhizophagus intraradices*, le manque de compétitivité en présence des souches (*Acaulospora* sp et *Acaulospora alpina*) dominantes sur la parcelle (ferme) de Yamoussoukro et les conditions pédoclimatiques pourraient expliquer cette

irrégularité dans les résultats selon les sites. Les quantités de propagules pour les souches locales prises individuellement seraient-elles faibles par rapport à la grande diversité de population indigène de CMA en présence dans les différents sols d'expérimentation ? Le nombre élevé d'espèces constaté sur les sites d'expérimentation à la suite de nos travaux viennent corroborer les travaux de Voko et collaborateurs (2013). Plusieurs de ses investigations sur le terrain ont établi aussi la présence d'une importante diversité de champignons mycorhiziens à arbuscules dans la zone agroécologique de Yamoussoukro (Voko, 2013). Des deux souches locales de CMA *Acaulospora colombiana* et *Ambispora appendicula* isolées des champs de manioc, la première se comporte mieux que la seconde. En effet, les espèces des genres *Glomus* et *Acaulospora* se propageraient beaucoup plus par les spores qui sont des formes de résistance des CMA aux conditions difficiles. La prédominance du genre *Acaulospora* en zone tropicale serait due à une adaptation de ces espèces aux conditions tropicales. (Sieverding, 1989a ; Jansa *et al.*, 2002; Oehl *et al.*, 2003). L'association des souches *Acaulospora colombiana*, *Ambispora appendicula* et *Rhizophagus intraradices* avec du NPK du fait de la pauvreté des sols aurait-il permis d'améliorer la croissance ?

Non, car en effet la double inoculation inocula mycorhizien suivi un mois plus tard de la fumure minérale NPK n'a pas eu plus d'impact sur les paramètres agronomiques qu'une fertilisation minérale classique avec le NPK uniquement. Les premiers effets positifs observés en début de cycle de 3 mois notamment avec *A. colombiana* - *A. appendicula* + NPK s'estompent après six mois. Cette disparition progressive de l'impact peut être dû à l'apport de l'engrais minérale NPK, leur apport réduirait la colonisation mycorhizienne du fait de la disponibilité en abondance de nutriments notamment le phosphore pour la plante. Cela réduirait l'efficacité des CMA pour des doses élevées de phosphore dans la rhizosphère du manioc. Car le développement des CMA se fait mieux avec des niveaux bas en phosphore (Wu, 2006 ; Katsunori, 2008). L'augmentation de la concentration de phosphore dans le sol réduit la colonisation mycorhizienne, la production de spores et la formation des hyphes externes (Lu *et al.*, 1994 ; Valentine *et al.*, 2001).

Hormis l'impact positif des inocula sur les paramètres de croissance du manioc, une amélioration de la nutrition minérale a été constatée. A ce niveau de tous les inocula utilisés le complexe *A. colombiana*-*A. appendicula* a eu le plus d'impact sur les deux sites en ce qui concerne surtout la nutrition minérale en phosphore suivi de l'inoculum industriel Mykepro P501. Les résultats des analyses montrent que dans le cas d'une inoculation de CMA

uniquement, les teneurs en phosphore (0,348 % ms), calcium (1,68 % ms) et en magnésium (0,505 % ms) sont améliorées par l'inoculation avec le complexe *A. appendicula* - *A. colombiana* et à un degré moindre par la souche *Rhizophagus intraradices* de Mykepro P501, *A. appendicula* et *A. colombiana*. De nombreux travaux ont montré l'effet positif sur la nutrition minérale des plantes par les CMA (Egli et Brunner, 2002 ; Douds *et al.*, 2000). Il a été montré que les hyphes extraradiculaires du champignon sont capables de prélever et de transporter ces éléments jusqu'aux racines, en particulier le phosphore (Cui et Caldwell, 1996). L'efficacité dans l'extraction du calcium selon Njoku et Enwesor (1991) pourrait justifier aussi la tolérance de certaines variétés de manioc à l'acidité du sol. En ce qui concerne la double inoculation des CMA suivi un mois plus tard de l'engrais NPK, les réponses sont variables en fonction des sites ; exception faite pour la combinaison du complexe *A. colombiana*-*A. appendicula* + NPK qui semble avoir amélioré l'absorption du potassium par rapport à la fertilisation avec le NPK. Il faut toutefois préciser que les rendements de la co-inoculation sont supérieurs au témoin non mycorhizé et non fertilisé. Cette amélioration du prélèvement des éléments minéraux limitants est souvent associée à une augmentation de la biomasse et de la production des plantes mycorhizées comme constatée plus haut, néanmoins l'efficacité de cet effet est variable selon les conditions de sol (teneur en P, Carbone organique, pH, CEC, texture etc) mais aussi selon l'association plante-champignon (Monzon et Azcón, 1996). L'amélioration des composantes de la croissance dans ce cas peut être due entre à l'amélioration de la nutrition minérale et hydrique (Amaya-Carpio *et al.*, 2009).

L'effet positif de l'inoculation mycorhizienne sur la croissance et la nutrition minérale du manioc a également un impact sur le rendement du manioc. Le complexe *A. colombiana*-*A. appendicula* a amélioré le rendement à Yamoussoukro et à Duokro (17,8 % à 19,4 %), l'inoculum Mykepro P501 a amélioré le rendement sur le site de Yamoussoukro (18%) et l'inoculum *A. colombiana* (16,6 %) sur le site de Duokro. Il faut aussi mentionner l'efficacité de l'engrais NPK sur les deux sites (36,2 % à 38,5%) pour améliorer les rendements comme cela fut démontré dans de nombreux travaux (Howeler et Cadavid, 1990; Howeler, 1991b). Pour l'impact de l'effet combiné des inocula CMA + l'engrais NPK sur le rendement, aucune différence significative au niveau du rendement n'a été noté par rapport à la fertilisation classique avec l'engrais NPK uniquement. Ainsi, dans ces sols l'application des CMA peut considérablement augmenter la production alimentaire et peut accroître la sécurité alimentaire en assurant des rendements stables en cas de hausse ou de fluctuation des prix des engrais

et/ou de leur disponibilité. Ces travaux confirment les travaux antérieurs faits par Sieverding (1991) et Ceballos (2013) sur l'impact positif des CMA sur le rendement du manioc en champs. Ces résultats confirment aussi la bonne adaptabilité des souches locales aux conditions locales contrairement à la souche non indigène comme *Rhizophagus intraradices*. D'où l'intérêt d'utiliser les souches locales *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* pour la mycorhization du manioc en Côte d'Ivoire. L'un des principaux problèmes avec l'utilisation des inocula de CMA commerciaux dans l'agriculture est lié à leur performance dans des conditions locales spécifiques. Les espèces natives sont souvent considérés comme plus mutualistes que les non-natives (Oliveira *et al.*, 2005 ; Querejeta *et al.*, 2006). Rowe et collaborateurs (2007) ont comparé des souches locales recueillies au champ et des inocula commerciaux étrangères, ils ont trouvé une grande variabilité au niveau des performances des souches étrangères. Ces résultats négatifs peuvent être causés par une faible adaptation des souches exotiques aux conditions édaphiques locales telles que les concentrations en éléments nutritifs du sol et d'autres facteurs abiotiques (Schreiner, 2007).

A partir du dendrogramme, nous pouvons conclure que l'inoculum le moins efficace sur les paramètres agronomiques du manioc indépendamment de la parcelle est l'inoculum *Ambispora appendicula*. Les traitements efficaces sont constitués des traitements *Ambispora appendicula* + NPK, *Acaulospora colombiana* + NPK, le complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula*, Mykepro P501+ NPK et enfin le traitement le plus efficace est *colombiana-Ambispora appendicula* + NPK. Ce résultat est particulièrement intéressant car il montre que dans ces sols, il est possible de réduire et de s'abstenir des applications d'engrais NPK afin d'augmenter simultanément la production alimentaire. Ceci est particulièrement important car cela signifie que plus de nourriture peut être produite de manière plus sécurisée pour l'agriculteur qui comptera moins sur la fluctuation et la disponibilité des prix des engrais. L'utilisation de CMA indigènes et de dose d'engrais NPK adéquate n'ayant pas d'effet sur les CMA pourrait permettre d'optimiser le rendement du manioc dans le contexte d'une agriculture intégrée durable.

CHAPITRE 11 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

11.1. Conclusion

Cette thèse fournit le premier rapport sur la caractérisation moléculaire des communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules associés à la rhizosphère du manioc dans trois zones agroécologiques (Azaguié, Abengourou et Yamoussoukro) en Côte d'Ivoire.

Les communautés de champignons mycorhiziens à arbuscules associées au manioc sont dominées par 5 genres que sont *Rhizophagus* avec 65,27 % suivi de *Glomus* 11,7 %, *Acaulospora* 9,52 %, *Funneliformis* 5,75 % et *Septoglomus* 5,44 %. Au total 25 espèces de CMA sont associées à la rhizosphère du manioc, parmi celles-ci 8 espèces jugées majoritaires représentent 96 % de la diversité et 17 espèces minoritaires 4 % de la diversité. Ce sont *Rhizophagus* sp, *Rhizophagus irregulare*, *Glomus* sp, *Acaulospora colombiana*, *Funneliformis mosseae*, *Septoglomus* sp, *Rhizophagus intraradices* et *Acaulospora spinosa*. Nous concluons que les approches écologiques à l'échelle de la communauté et de la population, rendues possibles par les outils de métagénomique et de génomique des populations, ouvrent la voie à une utilisation agronomique mieux adaptée des CMA. Cette importante diversité de CMA est fortement tributaire des paramètres physico-chimiques des sols tels que le pH, le phosphore assimilable et la teneur en matière organique.

Les conditions agroécologiques et environnementales modulent donc les communautés de CMA associées au manioc. La diversité de la zone d'Azaguié est différente de celle de Yamoussoukro et Abengourou. Cette grande diversité mycorhizienne conforte la nature mycotrophe du manioc fortement dépendant des CMA pour sa croissance et sa production. Deux souches ont pu être isolées au cours de notre étude, sur la base de critères tels que l'ubiquité et l'abondance suivant une procédure d'ingénierie écologique solide. Ces critères s'avèrent pertinents dans le processus de sélection des souches, la souche *Acaulospora colombiana* et le complexe de souches *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* ont montré leur efficacité sur la croissance, la tolérance aux nématodes, au stress hydrique et le rendement du manioc au champ.

Nous concluons que l'application d'*Acaulospora colombiana* et du complexe *Acaulospora colombiana-Ambispora appendicula* peut aider à la culture du manioc en augmentant de façon significative les rendements du manioc d'une manière qui peut être facilement rentable pour les agriculteurs dans les pays en développement. Nous prévoyons également que son

application pourrait conduire à une production alimentaire économiquement plus sûre. Ce qui rend l'agriculteur beaucoup moins dépendant de la disponibilité ou du prix des engrais P. Car l'effet de l'inoculation observé peut s'inscrire dans le long terme. Notre étude montre que l'ingénierie écologique endomycorhizienne est une technologie potentiellement efficace à prendre en compte pour une agriculture durable.

11.2. Perspectives

Comme nous le soulignons, les techniques moléculaires modernes sont déjà disponibles pour les études de diversité et il est de la responsabilité des écologistes et des agronomes microbiens de relever ces défis. Bien que les souches sélectionnées fussent efficaces sur deux sites, des tests complémentaires en champs dans d'autres zones agroécologiques (Azaguié et Abengourou entre autres) doivent être menés afin de confirmer les premiers résultats obtenus. Des méthodes de productions *in vitro* des souches *Acaulospora colombiana* et *Ambispora appendicula* doivent être envisagées pour une production en quantité et en qualité d'inoculum mycorhiziens diffusable à grande échelle. Cette production *in vitro* des souches viables, en grande quantité réduirait les quantités énormes appliquées et faciliterait l'application par les paysans. Enfin, il faudra initier des enquêtes socioéconomiques afin de proposer aux paysans des inocula sous une forme facilement utilisable et peu coûteuse.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES ET
ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adesemoye, O., & Kloepper J.W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1-12.
- Adriano-Anaya, M., Salvador-Figueroa, M., Ocampo, J.A., & Garcia-Romera, I. (2006). Hydrolytic enzyme activities in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) roots inoculated with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* 38, 879-86.
- Agritech.tnau. (2014). http://agritech.tnau.ac.in/org_farm/orgfarm_biofertilizer_technology.html. Consulté le 14 mars 2017.
- Akanza P. K., & Yao-Kouame, A. (2011). Fertilisation organo-minérale du manioc (*Manihot esculenta* CRANTZ) et diagnostic des carences du sol. *J. Appl. Biosci.* 46, 3163-3172.
- Akhtar, S. M., & Siddiqui, Z.A. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi as potential bioprotectants against plant pathogens. In: Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (eds) *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*. Springer, Dordrecht, pp 61-97.
- Akköprü, A., & Demir, S. (2005). Biological control of *Fusarium* wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporium* F. *oxysporum* f. sp *lycopersici* by *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *J. Phytopathol.* 153, 544-550.
- Alexandre, L. (2009). Etudes écologiques et microbiologiques des espèces du genre *Costularia* (Cyperaceae), pionnières des sols ultramafiques en Nouvelle-Calédonie: perspectives d'application à la restauration écologique. Thèse de doctorat. Universitaire de la Nouvelle-Calédonie. 243 p.
- Al-Karaki, N.G., & Al-Raddad, A. (1997). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress on growth and mineral uptake of two wheat genotype differing on drought resistance. *Mycorrhiza*. 7, 83-88.
- Altieri, M. A. (2002). Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agric. Ecosyst. Environ.* 93, 1-24.
- Altieri, M.A., Gurr, G.M., & Wratten, S.D. (2005). Genetic engineering and ecological engineering: a clash of paradigms or scope for synergy? in *Ecological Engineering for Pest Management: Advances in Habitat Manipulation for Arthropods*, CSIRO, Melbourne.

- Amani, G., Nindjin, N., N'zue, N., Tschannen, A., & Aka, D. (2007). Actes de l'Atelier "Potentialités à la transformation du manioc en Afrique de l'Ouest" - Abidjan, 4-7 Juin 2007, 358 p.
- Amaya-Carpio, L., Davies, F.T., Fox, T. & C, He. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer influence photosynthesis, root phosphatase activity, nutrition, and growth of *Ipomoea carnea* ssp. *fistulosa*. *Photosynthetica*. 47,1-10.
- Anderson, J.M., & Ingram, J.S.I. (1993). Tropical Soil Biology and Fertility. A Handbook of Methods. CAB International, 221 p.
- Appoloni, S., Lekberg, Y., Tercek, M.T., Zabinski, C.A., & Redecker, D. (2008). Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in Yellowstone National Park (USA). *Microbial. Ecology*. 56, 649-659. DOI: 10.1007/s00248-008-9384-9.
- *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408, 796–815.
- Arnon D.L. (1949). A copper enzyme is isolated chloroplast polyphenol oxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiol*. 24, 1-15.
- Augé, R.M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11, 3-42.
- Bâ, A.M., Plenchette, C., Danthu, P., Duponnois, R., & Guissou, T. (2000). Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit trees in Senegal. *Agroforest. Syst.* 50, 95-105.
- Baar, J. (2008). From production to application of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural systems: requirements and needs. *In: Varma A (ed) Mycorrhiza*. Springer, Heidelberg, pp 361-372.
- Bago, B., Pfeffer, P.E., & Shachar-hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant physiol*. 124, 949-958.
- Bago, B., Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Brouillette, J., Becard, G., & shachar-hill, Y. (1999). Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol*. 121, 263-272.
- Baize, D. (2000). Guide des analyses en pédologie. INRA France, Imprimé par Jouve, 257p.

- Balestrini, R., & Lanfranco, L. (2006). Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*.16, 509-524.
- Banuelos, J., Alarcón, A., Larsen, J., Cruz-Sánchez & Trejo, D. (2014). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Meloidogyne incognita* in the ornamental plant *Impatiens balsamina*. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 14, 63-74.
- Bécard, G., Kosuta, S., Tamasloukht, M., Sejalon-Delmas, N., & Roux, C. (2004). Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can. J. Bot.* 82, 1186-1197.
- Bennett, A.E., & Bever, J.D. (2007). Mycorrhizal species differentially alter plant growth and response to herbivory. *Ecol.* 88, 210-218.
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., & Bianciotto, V. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. *Front. Microbiol.* 6, 1559. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01559.
- Bever, J.D., Morton, J.B., Antonovics, J., & Schultz, P.A. (1996). Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Mown grassland. *J. Ecol.* 84, 71-82.
- Bever, J.D., Schultz, P.A., Pringle, A., & Morton, J.B. (2001). Arbuscular mycorrhizal fungi: More diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *Bioscience.* 51, 923–931.
- Blaszkowski. (2013). <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/>.
- Bloom, S.A. (1981). Similarity indices in community studies: Potential Pitfalls. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 5, 125-128.
- Bolan, N.S. (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants, *Plant Soil*.134, 189-207.
- Bonfante, P., & Anca, I. (2009). Plants, mycorrhizal fungi and bacteria: a network of interaction. *Ann. Rev. Microbiol.* 63,363-383.
- Boonlue, S., Surapat, W., Pukahuta, C., Suwanarit, P., Suwanatit, A., & Morinaga, T. (2012). Diversity and efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from organic chili (*Capsicum frutescens*) farms. *Mycoscience.* 53, 10–16
- Borges, A.J.D.S., Trindade, A.V., de Matos, A.P., & Peixoto, M.D.D. (2007). Reduction of *fusarium* wilt of "banana-maca" by inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesq. Agropec. Bras.* 42, 35-41.

- Borowicz, V.A. (2006). When enemies attack do plants get by with a little help from their friends? *New Phytol.* 169, 644-646.
- Borowicz, V.A. (2001). Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations? *Ecol.* 82, 3057-3068.
- Bradbury, J.E., Duputié, A., Delêtre, M., Roullier, C., Narváez-Trujillo, A., Manu-Aduening, J.A., Emshwiller, E., & Mckey, D. (2013). Geographic Differences In Patterns Of Genetic Differentiation Among Bitter And Sweet Manioc (*Manihot Esculenta* Subsp. *Esculenta*; Euphorbiaceae). *Am. J. Bot.* 100 (5), 857-866.
- Bremner, J.M. (1960). Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *J. Agric. Sci.* 55, 1-33.
- Brito, I., Goss, M.J., Carvalho, M., van Tuinen, Y., & Antunes, P.M. (2008). Agronomic management of indigenous mycorrhizas. In: Varma A (ed) *Mycorrhiza*. Springer, Heidelberg, pp 375–402.
- Brito, I., Goss, M.J., de Carvalho, M., Chatagnier, O., & van Tuinen, D. (2012). Impact of tillage system on arbuscular mycorrhiza fungal communities in the soil under Mediterranean conditions. *Soil Tillage Res.* 121, 63–67.
- Burns, A., Gleadow, R., Cliff, J., Zacarias, A., & Cavagnaro, T. (2010). Cassava: The drought, war and famine crop in a changing world. *Sustain.* 2, 3572-3607.
- Cadavid, L.F., El-sharkawy, M.A., & Aosta, A. (1998). Long-term effects of mulch, fertilization and tillage on cassava grown in sandy soils in northern Columbia. *Field Crops Res.* 57, 45.
- Calvet, G., & Villemin, P. (1986). *Interprétation des analyses de terre*. France, SCPA. 24p.
- Camille, C. (1984). Les cultures vivrières en République de Côte-d'Ivoire In: *Annales de Géographie*. t. 93, n°518, 432-453.
- Cardoso, E.J.B.N., Cardoso, I.M., Nogueira, M.A., Baretta, C.R.D.M., & Paula, A.M. (2010). Micorrizas arbusculares na aquisicao de nutrientes pelas plantas. In: *Siqueira JO, de Souza FA, Cardoso EJB, Tsai SM (eds) Micorrizas: 30 anos de experiencia no Brasil*. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, pp 153–214.
- Cardoso, I. M., & Kuyper, T. W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116, 72-84.
- Carlsen, S.C.K., Understrup, A., Fomsgaard, I.S., Mortensen, A.G. & Ravnskov, S. (2008). Flavonoids in roots of white clover: interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and a pathogenic fungus. *Plant and Soil.* 302, 33-43.

- Carretero C.L., Cantos, M., Garcia, J.L., Azcon, R., & Troncoso, A. (2009). Growth response of micropropagated cassava clones as affected by *Glomus intraradices* colonization. *J. Plant Nutr.* 32, 261-273.
- Castillo, P., Nico, A.I., Azcón-Aguilar, C., Del, Río, Rincón, C., Calvet, C., & Jiménez-Díaz, R.M. (2006). Protection of olive planting stocks against parasitism of root-knot nematodes by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Pathol.* 55, 705-713.
- Ceballos, I., Ruiz, M., Fernandez, C., Pena, R., Rodriguez, A., Sanders, I. R. (2013). The in vitro mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop Cassava. *PLoS ONE.* 8, e70633.
- Chaleard, J. L. (1988). Le manioc, la ville et le paysan Approvisionnement urbain et mutations rurales dans la région de Bouaké (Côte d'Ivoire). *Cah. Sci. Humaines.* 24 (3), 333-348.
- Clark. (1997). Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. *Plant and Soil* 192, 15-22.
- Cock, J.H., & El-sharkawy, A.M. (1988). *The physiological response of cassava to stress (La reponse physiologique du manioc au stress)*. VII^e Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Gosier (Guadeloupe), 1-6 July 1985, Ed. INRA, Paris.
- Collins, Johnson., Pflieger, N., F.L., Kent, Crookston., Simmons, R., S.R., & Copeland, P.J. (1991). Vesicular-arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. *New Phytol.* 117, 657-663. DOI:10.1111/j.1469-8137. 1991. tb00970.x.
- Colombani, J., Lamagat, J. P., & Thiebaut, J. (1973). Mesure de la perméabilité des sols en place: un nouvel appareil pour la méthode Muntz, une extension de la méthode Porchet aux sols hétérogènes. *Bull. Sci. Hydrologiques* 18, 197-235.
- Connor, D.J., Cock, J.H. & Parra, G.E. (1981). The response of cassava to water shortage. *Growth and Yield Crop Res.* 4, 181-200.
- Cook & Weller. (2004). In defense of monoculture. In "New directions for a diverse planet". Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia.

- Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*. 19, 292-305.
- Cornejo, P., Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., & Ferrol, N. (2004). Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Letters*. 241, 265-270. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.10.030.
- Coyne, D.L. (1994). Nematodes pests of cassava. *Afr. Crop Sci. J.* 2(4), 355-359.
- Coyne, D.L., Nicol, J.M. & Claudius-cole, B. (2010). Les nématodes des plantes: Un guide pratique des techniques de terrain et de laboratoire. Secrétariat SP-IPM, Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA), Cotonou, Benin, 93p.
- Croll, D., & Sanders, I.R. (2009). Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus - art. 13. *BMC Evol. Biol.* 9: 15.
- Cui, M., & Ca, Idwell, M.M. (1996). Facilitation of plant phosphate acquisition by arbuscular mycorrhizas from enriched soil patches. II – Hyphae exploiting root-free soil. *New Phytol.* 133,461-467.
- Dalpé, Y., & Monreal, M. (2004). Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping systems. *In plant Management Network*. Crop Management.
- Davison, J., Öpik, M., Daniell, T.J., Moora, M., & Zobel, M. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 103-115.
- Daykin, R. S., & Hussey. (1985). *Staining and histopathological techniques in nematology*, eds. R. Barker, C.C. Carter and J.N. Sasser, pp39-48.
- De Foresta, H., & Schwartz, D. (1991). *Chromolaena odorata* and disturbance of natural succession after cultivation: an example from Mayombe, Congo, Central Africa. In: Muniappan R. and Ferrar P. (Eds), Ecology and management of *Chromolaena odorata*. *Biotropica*. 44, 23-41.
- De La Providencia, I.E., De Souza, F.A., Fernandez, F., Sejalón-Delmas, N., & Declerck, S. (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytol.* 165(1), 261-271. *early Devonian. Mycologia.* 87, 560-573.

- De Souza, F.A., & Declerck, S. (2003). Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia*. 95, 1004-1012.
- De Souza, F.A., Trufem, S.F.B., De Almeida, D.L., Da Silva, E.M.R., & Guerra, J.M.G. (1999). Effect of pre-crops on the inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi and cassava yield. *Pesq. Agropec. Bras.* 34, 1913-1923.
- Declerck, S., Plenchette, C., & Strullu, D.G. (1995). Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata*, AAA group) cultivar. *Plant and Soil*. 176, 183-187.
- Delange, F., & Ahluwalia, R. (1982). La toxicité du manioc et la thyroïde : recherches et questions de santé publiques. Compte rendu d'un colloque tenu à Ottawa, Canada du 31 mai au 2 juin 1982.
- Demeure, Y. (1980). Biology of plant parasitic nematode *scutellonema cavenessi* Sher, 1964: anhydrobiosis. *Revue nematol.* 3, 283-289.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Lelievre, M.C., Jolivet, Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., Bispo, A., Lemanceau, P., & Ranjard, L. (2011). Biogeographical Patterns of Soil Molecular Microbial Biomass as Influenced by Soil Characteristics and Management. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 20, 641-652.
- Diedhiou, P.M., Hallmann, J., Oerke, E.C. & Dehne, H.W. (2003). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. *Mycorrhiza*.13, 199-204.
- Dje, K.B. (2007). Impacts des phénomènes ENSO sur la pluviométrie et leurs incidences sur la production cacaoyère en Côte d'Ivoire. Conférence Internationale pour la Réduction de la Vulnérabilité des Systèmes Naturels Economiques et Sociaux en Afrique de l'Ouest face aux changements climatiques, Ouagadougou du 24 au 27 janvier 2007. <http://www.wmo.int/pages/prog/wcp/agm/meetings/iwacc08/documents/Definition-Regional-Adaptation-Agriculture-Ouest-Africaine-aux-Changeements-Climatiques.pdf>
- Djian-Caporalino, C., Bourdy, G., & Cayrol, J.C., (2008) (nouvelle édition). Plantes nématicides et plantes résistantes aux nématodes, p. 125-185. Dans: *Biopesticides d'origine végétale : potentialités phytosanitaires*. C. Regnault-Roger Editions Tec & doc, Lavoisier, Paris, 546 p.

- Dodd, J.C., Arias, I., Kooman, I., & Hayman, D.S. (1990). The management of populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a savanna ecosystem II. The effects of pre-crops on the spore populations of native and introduced VAM fungi. *Plant Soil*. 122, 241–248.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, P.A., Robeg, A & Smith, F. (1956)."Colometric method for determination of sugars and related substances. *Anal chem*. 28, 350-356.
- Duchaufour, P.H. (1977). Pédogenèse et classification pédologique (II).Masson Paris, 477p.
- EBIC (European Biostimulants Industry Consortium) (2012). Extraits de conférence.
- Edwards, S.G., A.H. Fitter., and Young, J.P.W. (1997). Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae* within plant root by competitive polymerase chain reaction. *Mycol. Res*. 101, 1440-1444.
- Egli, S., & Brunner. (2002). Les mycorhizes: *une fascinante biocénose en forêt*.WSL Birmensdorf, 8p.
- Elsen A., Beeterens, R., Swennen, R., & De Waele D. (2003a). Effects of an arbuscular mycorrhizal fungus and two plant-parasitic nematodes on *Musa* genotypes differing in root morphology. *Biol. Fertil. Soils* 38, 367–376. DOI: 10.1007/s00374-003-0669-3
- El-Sharkawy, M.A. (2006). International research on cassava photosynthesis, productivity, eco-physiology, and responses to environmental stresses in the tropics. *Photosynthetica* 44, 481-512.
- Entry, J.A., Rygiewicz, P.T., Watrud, L.S., & Donnelly, P.K. (2002). Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. *Adv. Environ. Res*. 7, 123-138.
- FAO, 2013. *Save and Grow: Cassava A guide to sustainable production intensification*. FAO livre broche, 24p.
- FAO. (2014). Faostat Agricultural database-Agricultural Production. Consulté le 23 septembre 2014, sur <http://www.fao.org>.
- FAO. 2013. Faostat Agricultural database-Agricultural Production. Consulté le 28 janvier 2013, sur <http://www.fao.org>.
- FAO. 2014. Faostat Agricultural database-Agricultural Production. Consulté le 23 septembre 2014, sur <http://www.fao.org>.

- Farmer, M.A., Li, X., Feng, G., Zhao, B., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., & van Tuinen, D. (2007). Molecular monitoring of field-inoculated AMF to evaluate persistence in sweet potato crops in China. *Appl. Soil Ecol.* 35, 599-609.
- Fernandez, F. (2003). Avances en la producción de inoculantes micorrizicos arbusculares. In Rivera, R. et Fernandez, K., *El Manejo eficiente de la simbiosis micorrizica, una via hacia l'agricultura sostenible. Estudio de caso : El Caribe.* (chap. 3 p.97-110). La Habana, édition INCA.
- Fortin, J.A., Plenchette, C., & Piché, Y. (2008). Les mycorhizes : la nouvelle révolution verte. Québec, Editions MultiMondes, 138p.
- Gadkar, V., & Rillig, M.C. (2006). The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalinalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiol. Letters.* 263, 93-101.
- Gagnard, J., Huguet, C., & Ryser, J.P. (1988). L'analyse du sol et du végétal dans la conduite de la fertilisation, le contrôle de la qualité des fruits. Secrétariat générale OILB/SROP, Edition - Diffusion ACTA. 87p.
- Gagné, S., & Le Quéré, D. (2014). Discussion au sujet de l'inoculation des cultures au Myke Pro au Canada et au Québec. Communication orale. Entrevue menée par Laurence
- Gai, J.P., & Liu, R.J. (2003). Effect of soil factors on AMF in the rhizosphere of wild plants. *Chin J. Appl. Ecol.* 14, 470-472.
- Gandolfi, A., Sanders, I.R., Rossi, V., & Menozzi, P. (2003). Evidence of recombination in putative ancient asexuals. *Mol. Biol. Evol.* 20, 754-761.
- Gerdemann, J.W., & Nicolson, T.H. (1963). Spores of endogone species from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235 - 244.
- Gilbert, N. (2009). The disappearing nutrient. *Nature.* 461(8), 716-718.
- Giovannetti, M., Azzolini, D., & Citernesi, A.S. (1999). Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Env. Microbiol.* 65, 5571-5575.
- Giovannetti, M., Fortuna, P., Citernesi, A.S., Morini S. & Nuti, M.P. (2001). The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytol.* 151, 717-724.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Strani, P., Agnolucci, M., Rinaudo, V., & AVIO, L. (2003). Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic

areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Appl. Env. Microbiol.* 69, 616-624.

- Gollotte, A., van Tuinen, D., & Atkinson, D. (2004). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*.14, 111-7.
- Gosling, P., Mead, A., Proctor, M., Hammond, J.P., & Bending, G.D. (2013). Contrasting arbuscular mycorrhizal communities colonizing different host plants show a similar Response to a Soil Phosphorus Concentration Gradient. *New Phytol.* 198, 546-556.
- Guillaumet, J.-L., & Adjanohoun, E. (1971). *La végétation de la Côte d'Ivoire*. In : Avenard J.M., Eldin E., Girard G., Sircoulon J., Touchebeuf P., Guillaumet J.-L., Adjanohoun E., Perraud A. (eds). *Le milieu naturel de la Côte d'Ivoire*. O.R.S.T.O.M., Paris, pp 157-266.
- Gurr, G.M., Wratten, S.D., & Altieri, M.A. (2004). *Ecological engineering for pest management*. CSIRO Publishing.
- Haeringer, P. (1972). Une planche d'atlas sur les cultures vivrières en Côte d'Ivoire. Cahier O.R.S.T.O.M., série. Sciences Humaines, 10, 2,197-208.
- Hamel, D., & Plenchette, C. (2007). *Mycorrhizae in Crop production*. Street, Binghamton, NY, Haworth Food and Agricultural Products Press, New York, 326p.
- Hao, Z., Fayolle, L., Van Tuinen, D., Chatagnier, O., Li X., & Gianinazzi, S. (2012). Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defence gene responses in grapevine. *J. Exp. Bot.* 63, 3657–3672. DOI: 10.1093/jxb/ers046
- Harrison, M.J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 19-42.
- Hart, M.M., & Reader, R.J. (2002). Host plant benefit from association with arbuscular mycorrhizal fungi: variation due to differences in size of mycelium. *Biol. Fertil. Soils.* 36, 357-366.
- Hassan, S.E.D., Boon, E., St-Arnaud, M., & Hijri, M. (2011). Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metalpolluted soils. *Mol. Ecol.* 20, 3469-3483. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x.

- Helgason, T., Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A. H., & Young, J.P.W. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*. 394, 431. DOI: 10.1038/28764.
- Hol, G.W.H., & Cook, R. (2005). An overview of arbuscular mycorrhizal fungi–nematode interactions. *Basic Appl. Ecol.*, 6, 489-503.
- Hooker, J.E., Gianinazzi, S.V., esberg, M., Barea, J.M., & Atkinson, D. (1994). The application of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagation systems: an opportunity to reduce chemical inputs. *Agric. Sci. Finland*.3, 227-232.
- Hosny, M., Hijri, M., Passerieux, E., & Dulieu, H. (1999). rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (glomales, zygomycetes). *Gene*, 226 (1), 61-71.
- Howeler, R.H. (1991b). Long-term effect of cassava cultivation on soil productivity. *Field Crops Res.* 26, 1-18.
- Howeler, R.H. (2002). Cassava mineral nutrition and fertilization In: Hillocks, R.J., Thresh, J.M., & Bellotti, A.C. (eds). *Cassava: Biology, Production and Utilization*. CAB international, pp 115–147.
- Howeler, R.H., & Cadavid, L.F. (1990). Short and long-term fertility trials in Colombia to determine the nutrient requirements of cassava. *Fertil. Res.* 26, 61-80.
- Howeler, R.H., & Sieverding, E. (1983). Potentials and limitations of mycorrhizal inoculation illustrated by experiments with field-grown cassava. *Plant Soil*.75, 245-261.
- Huang, J., Pray, C., & Rozelle, S. (2002). Enhancing the crops to feed the poor. *Nature*. 418, 678-684.
- Huang, S.P., & Cares, J.E. (2004). Nematodes. In Anonyme. Echantillonnage (Méthodes), Restitution du séminaire d’Embu 23 au 27 février 2004, Kenya, Doc. 4/CSM-BGBD CI, 7 p.
- Hutchison, C.A. (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res.* 35, 6227–6237.
- Igué, A.M. (2000). *The use of a soil and terrain database for land evaluation procedures Case study of Central Benin*. Thèse de Doctorat, University of Hohenheim, Germany, 235 p.
- Ijdo, M., Cranenbrouck, S., & Declerck, S. (2011). Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza*. 21, 1-16.

- Ingham, R. E. (1988). Interactions between nematodes and vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Agric. Ecosyst. Environ.* 24, 169-182.
- INRA. (1995). Référentiel pédologique. Association Française d'étude des sols. INRA France, 332p.
- INVAM, 2009 International culture collection of VA Mycorrhizal fungi; Téléchargé en 2009. <http://www.invam.caf.wvu.edu>.
- INVAM, 2013 International culture collection of VA Mycorrhizal fungi; Téléchargé en 2013. <http://www.invam.caf.wvu.edu>.
- INVAM, 2016 International culture collection of VA Mycorrhizal fungi; Téléchargé en 2016. <http://www.invam.caf.wvu.edu>.
- Jakobsen, I., Smith, S.E., & Smith, F.A. (2002). *Function and diversity of arbuscular mycorrhizae in carbon and mineral nutrition*. In: van der Heijden MGA, Sanders IR, eds. pp 75-92. Mycorrhizal ecology. Heidelberg, Germany: Springer Verlag.
- Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I.R., & Frossard, E. (2002). Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12, 225-234.
- Jatala, P., & J. Bridge. (1990). *Nematode parasites of root and tuber crops*. Pp. 137–180 in M. Luc, R. A. Sikora, and J. Bridge, eds. Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, UK: CAB International.
- Jefwaa, J.M., Okothb, S., Wachirab, P., Karanjab, N., Kahindid, J., Njuguinie, S., Ichamia, S., Mungatu, C., Okoth, J.P. & Huisinga, J. (2012). Impact of land use types and farming practices on occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) Taita-Taveta district in Kenya. *Agric. Ecosyst. Environ.* 157, 32-39.
- Karagiannidis, N., & Hadjisavva-Zinoviadi. (1998). The mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* enhances growth, yield and chemical composition of a durum wheat variety in 10 different soils. *Nutr. Cycling Agroecosyst.* 52, 1-7.
- Katsunori, I., Hanae, S., Takashi, M., & Ryuichi, I. (2008). Distribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Upland Field Soil of Japan². Spore Density of ArbuscularMycorrhizal Fungi and Infection Ratio in Soybean and Maize Fields. *Plant Prod. Sci.* 11 (2), 171-177.

- Kelkar, T.S., Bhalerao, S.A. (2013). Incidences of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) in Urban Farming of Mumbai and Suburbs, India. *Inter. Research J. Environ. Sci.* 2 (1), 12-18.
- Köhl, L., Oehl, F., & van der Heijden, M. G. A. (2014). Using tillage practices to regulate plant growth responses by altering the soil microbial community. *Ecol. Appl.* 24(7), 1842–1853. <http://dx.doi.org/10.1890/13-1821.1>.
- Koide, R.T., Kabir, Z. (2000). Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytol.* 148, 511-517.
- Komi, E. (1994). *Etude de la variabilité des composantes du rendement du manioc (Manihot esculenta CRANTZ, var. 312-524) en fonction de la fertilité du sol.* 122 p
- Kouadio, K.K.H., Dao, D., Tschannen, A., & Girardin, O., (2010). Rentabilité comparative des systèmes de culture à base de manioc à l’Est de la Côte d’Ivoire. *J. Anim. Plant Sci.* 9 (1), 1094-1103.
- Kouadio, K.K.H., Doudou, D.T., Tschannen, A., Dao, D., & Girardin, O. (2011). Techniques agroforestières à base de *Gliricidia sepium* à l’Est de la Côte d’Ivoire : impacts et perspectives. *J. Anim. Plant Sci.* 11(1), 1374-1379.
- Kouakou, N.I. (1990). *Le manioc, programme de vulgarisation de nouvelles variétés. Compagnie ivoirienne pour le développement des cultures vivrières* (Edition), Côte d’Ivoire. 135 p.
- Kouassi, A.M., Ahoussi K.E., Yao K.A., Ourega W.E.J.A., Yao K.S.B., & Biemi J. (2012). Analyse de la productivité des aquifères fissurés de la région du N’zi-Comoé (Centre-Est de la Côte d’Ivoire). *Larhyss J.* 10, 57-74.
- Kremer, R.J., & Means, N.E. (2009). Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *Eur. J. Agron.* 31, 153-161.
- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., & Schüßler, Arthur. (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol.* 193 (4), 970-984.
- Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C., & Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 183, 212-223.

- Lambert, D. H., Cole, Jr. H., & Baker, D. E. (1980). Adaptation of vesicular arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. *New Phytol.* 85, 513-520.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., & FitzHugh, W. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409, 860–921.
- Larson, G., Piperno, D.R., Allaby, R.G., Purugganan, M.D., Andersson, L., Arroyo-Kalin, M., Barton, L., Vigueira, C.C., Denham, T., Dobney, K., Doust, A.N., Gepts, P., Gilbert, M.T.P., Gremillion, K.J., Lucas, L., Lukens, L., Marshall, F.B., Olsen, K.M., Pires, J.C., Richerson, P.J., Casas, R.R.d., Sanjurjo, O.I., Thomas, M.G., & Fuller, D.Q. (2014). Current perspectives and the future of domestication studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 6139-6146.
- Lekberg, Y., Koide, R.T., Rohr, J.R., Aldrich-Wolfe, L., & Morton, J.B. (2007). Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J. Ecol.* 95, 95-105. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2006.01193.x.
- Lerü, B., & Calatayud, P.A. (1994). Interaction between cassava and arthropod pest. *Afr. Crop Sci. J.* 2 (4), 385-390.
- Leyval, C. (2005). Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on heavy metal and radionuclide transfer to plants. In: *PM Huang & GR Gobran (Eds) Biogeochemistry of trace elements in the rhizosphere.* Elsevier, Amsterdam, pp 419-429.
- Li, H-Y., Yang, G-D., Shu, H-R., Yang, Y-T., Ye, B-X., Nishida, I., & Zheng, C-C. (2006). Colonization by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus versiforme* induces a Defense Response against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* in the Grapevine (*Vitis murensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene *VCH3*. *Olant and Cell Physiol.* 47, 154-163.
- Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Souchere, V., Alberola, C., & Menassieu, J. (2009). Agronomy for sustainable agriculture: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 29, 1-6.
- Liu, A., Plenchette, C., & Hamel, C. (2007). Soil nutrient and water providers: how arbuscular mycorrhizal mycelia support plant performance in a resource limited world. In: Hamel C, Plenchette C (eds) *Mycorrhizae in crop production.* Haworth, Binghampton, pp 37-66.

- Lu, S., Braunberger, P.G., & Miller, M.H. (1994). Response of vesicular-arbuscular mycorrhizae of maize to various rates of P addition to different rooting zones. *Plant Soil*.158, 119-128.
- Manaut, N., Sanguin, H., Ouahmane, L., Bressan, M., Thioulouse, J., Baudoin, E., Galiana, A., Hadi, M., Prin, Y., & Duponnois, R., (2015). Potentialities of ecological engineering strategy based on native arbuscular mycorrhizal community for improving afforestation programs with carob trees in degraded environments. *Ecol. Eng.* 79, 113-119.
- Manga, A., Diop, T.A., Tuinen, D.V., & Neyra, M. (2007). Variabilité génétique des champignons mycorrhiziens associés à *Acacia seyal* en zone semi-aride du Sénégal. *Secheresse*, 18 (2), 129-133.
- Manguran, A.E. (2004). *Measuring Biological diversity*.In Blackwell publishing. 261 p.
- Martin-Laurent, F., Lee, S.K., Tham, F.Y., He, J., Diem, H.G., & Durand, P. (1997) .A new approach to enhance growth and nodulation of *Acacia mangium* through aeroponic culture. *Biol Fertil Soils*. 5, 7-12.
- Mason, P.A., & Wilson, J. (1994). *harnessing symbiotic associations: vesicular-arbuscular mycorrhizas*. In: Leakey RRB, Newton AC (eds) tropical trees: the potential for domestication and the rebuilding of forest resources. London, HMSO, 165-175.
- Mathur, N., & Vyas, A. (1995). Influence of VA mycorrhizae on net photosynthesis and transpiration of *Ziziphus mauritiana*. *J. Plant Physiol*. 147, 328-330
- Mazoyer, M., (2002). *Larousse agricole*.4^e édition, Paris, Larousse, 767 p.
- McMahan, J .M, Whitew, .L.B., & Sayre R.T. (1995). Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* CRANTZ). *J. Exp. Bot.* 46 (73), 1-741.
- Melifonwu, A., James, B., Aïhou, K., Weise, S., Awah, E. & Gbaguidi, B., (2000). Lutte contre les adventices dans les champs de manioc. International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Cotonou, République du Bénin. 16 p.
- Memento de l'agronome. (2002). CIRAD –GRET, MAE. Editions Quae, Paris/France, 1691 p.
- Merryweather, J., & A.H. Fitter. (1998).The arbuscular mycorrhizal fungi of Hyacinthoides non-scripta: I. Diversity of fungal taxa. *New Phytologist*.138, 117-129.

- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31-46.
- Miller R.M., & Jastrow, J.D. (1990). Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biol. Biochem.* 22, 579-584.
- Mohammad, A., & Flowers, T.H. (2004). Evaluation of Kjeldahl digestion method. *J. Res. (Sci.)*. 15 (2), 159-179.
- Mollard, E. (1993). Le manioc dans les unités de production en basse cote d'ivoire. Rendements, pratiques et fonctions d'une culture vivrière. Thèse de Doctorat de l'institut national agronomique paris-grignon. 215 p.
- Monzon, A., & Azcón, R. (1996). Relevance of mycorrhizal fungal origin and host plant genotype to inducing growth and nutrient uptake in *Medicago* species. *Agr, Ecosyst. Env.* 60, 9-15.
- Morton, J. B., Bentivenga, S. P., & Wheeler, W. W. (1993). Germ plasma in the International Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon.* 48, 491-528.
- Morton, J.B., & G.L., Benny. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order Glomales and Gigasporineae and two new families *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae* with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon.* 37, 471-491.
- Morton, J.B., & Msiska, Z. (2010 b). Phylogenies from genetic and morphological characters do not support a revision of Gigasporaceae (Glomeromycota) into four families and five genera. *Mycorrhiza.* 20, 483-496.
- Morton, J.B., & Redecker, D. (2001). Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia.* 93, 181-195
- Morton, J.B., Bentivenga, S.P., & Wheeler, W.W. (1993). Germ plasma in the International Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon.* 48, 491-528.

- N'Guessan, E. K. (1990). *Étude de l'évolution de la végétation du «V Baoulé» (contact forêt/savane en Côte d'Ivoire) par télédétection*. Télédétection et sécheresse. Éd. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp 181-196.
- N'guetta, R., & Bernard G. (1986). *Besoin en eau et production du manioc*. Seminar of A.N.A.M., 25 p.
- N'zué, Boni., Zohouri, Goli, Pierre., & Yapi-Gnaoré, Valentine. (2005). Bien cultiver le manioc. CNRA, aout 2005, Côte d'Ivoire.
- Nandjui, J., Voko, B. R. D. R., Aka, N. M. S. K., Beaulys, F., Yao, T. & Zézé A. (2013). Assessment of the occurrence and abundance of mycorrhizal fungal communities in soils from yam (*Dioscorea* spp.) cropping fields in Dabakala, North Cote d'Ivoire. *Afr. J. Agric.* 8(44), 5572-5584 DOI: 10.5897/AJAR2013.7842
- Ndabalishye, I. (1995). *Agriculture vivrière ouest-africaine à travers le cas de la Côte d'Ivoire*. IDESSA (Edition), Côte d'Ivoire. 382 p.
- Neeraj, A. Shanker., Mathew, J., & Varma, A. (1990). Occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizae with Amaranthaceae in soils of the Indian semi-arid region. *Biol. Fertil. Soils*, 11, 140-144.
- Nilsson, R. H., Veldre, V., Hartmann, M., Unterseher, M., Amend, A., & Bergsten, J. (2010). An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecol.* 3, 284-287.
- Njoku, B.O., & Enwesor. (1991). Differential reponse of 4 cassava cultivars (*Manihot esculenta*) to liming of two acids soils in pots and fields experiments. *Fields crops res.* 28, 163-172.
- Nyiira, Z.M. (1972). *Report of investigation on cassava mite Mononychellus tanajoa Bondar*. Kwanda Research Station, Kampala, Uganda, 14 p.
- Odum, H.T. (1962). Ecological Tool and Their Use: Man and the Ecosystem.pp.57-75.
- Oehl, F., Jansa, J., Ineichen, K., Mäder, P., & van der Heijden, M. (2011a). Champignons mycorrhiziens arbusculaires, bioindicateurs dans les sols agricoles suisses. *Rech. Agron. Suisse.* 2 (7–8), 304-311.

- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mader, P., Boller, T., Wiemken, A. (2003). Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Appl. Environ. Microb.* 69, 2816-2824.
- Oehl, F., Wiemken, A., & Sieverding, E. (2003). *Glomus aureum*, a new sporocarpic arbuscular mycorrhizal fungal species from European grasslands. *J. Appl. Bot.* 77, 111-115.
- Oliveira, R. S., Vosatka, M., Dodd, J. C., & Castro, P. M. L. (2005). Studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two native isolates in a highly alkaline anthropogenic sediment. *Mycorrhiza*. 16, 23-31.
- Oliveira, R.S., Castro, P.M.L., Dodd, J.C., & Vosátka, M. (2006). Different native arbuscular mycorrhizal fungi influence the coexistence of two plant species in a highly alkaline anthropogenic sediment. *Plant and Soil*. 287, 209-221
- Opik, M., Metsis, M., Daniell, T.J., Zobel, M., & Moora, M. (2009). Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytol.* 184, 424-437.
- Öpik, M., Moora, M., Liira, J., & Zobel, M. (2006). Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *J. Ecol.* 94, 778-790.
- Opik, M., Saks, U., Kennedy, J., & Daniell, T. (2008). Global diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi—community composition and links with functionality. In: Varma A (ed) *Mycorrhiza*. Springer, Heidelberg, pp 89-111.
- Opik, M., Vanatoa, A., Vanatoa, E., Moora, M., Davison, J., Kalwij, J. M., Reier, U., & Zobel, M. (2010). The online database Maarjam reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol.* 188, 223-241
- Ortas, O., & Ustuner. (2014). The effects of single species, dual species and indigenous mycorrhiza inoculation on citrus growth and nutrient uptake, *Eur. J. Soil Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2014.05.007>
- Ortiz, R. (1998). Critical role of plant biotechnology for the genetic improvement of food crops: perspectives for the next millennium. *J. Biotechnol.* 1, 1-8.

- Osonubi, O., Atayese, M.O. & Mulongoy, K. (1995). The effect of vesicular–arbuscular mycorrhizal inoculation on nutrient uptake and yield of alley cropped cassava in a degraded alfisol of south western Nigeria. *Biol. Fert. Soils*. 20, 70-76.
- Ouahmane, L., Ndoye, I., Morino, A., Ferradous, A., Sfairi, Y., Al Faddy, M., & Abourouh, M. (2012). Inoculation of *Ceratonia siliqua* L. with native arbuscular mycorrhizal fungi mixture improves seedling establishment under greenhouse conditions. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 16422-16426.
- Oyetunji, O. J., & Osonubi, O. (2007). Assessment of influence of alley cropping system and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on cassava productivity in derived savanna zone of Nigeria. *World J. Agric. Sci.* 3 (4), 489-495.
- Oyetunji, O.J., Osonubi, O., & Ekanayakei, J. (2003). Contributions of an alley cropping system and arbuscular mycorrhizal fungi to maize productivity under cassava intercrop in the derived savannah zone. *J. Agr. Sci.* 140, 311-316.
- Pansu, M., & Gautheyrou, J. (2003). L'analyse du sol minéralogique, organique et minérale. Montpellier, France: Springer-Verlag, 993 p.
- Pellet, D., & El-Sharkawy, M.A. (1993a). Cassava varietal response to phosphorus fertilization. I. Yield, biomass and gas exchange. *Field Crops Res.* 35, 1-11.
- Pellet, D., & El-Sharkawy, M.A. (1993b). Cassava varietal response to phosphorus fertilization. II. Phosphorus uptake and use efficiency. *Field Crops Res.* 35, 13-20.
- Pilling, E.D., & Jepson, P.C., (2006). Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*), *Pest. Sci.* 39 (4), 293-297.
- Plassart, P., Terrat, S., Griffiths, R., Thomson, B., Dequiedt, S., Lelievre, M., Regnier, T., Nowak, V., Bailey, M., Lemanceau, P., Bispo, A., Chabbi, A., Maron, P-A., Mougel, C., & Ranjard, L. (2012). Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA Extraction Procedure for Assessing Soil Microbial Abundance and Community Structure. *PLoS One*, 7(9), e44279. DOI: 10.1371/journal.pone.0044279.
- Plenchette, C., Clermont-Dauphin, C., Meynard J.M. & Forn, J.A. (2005). Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Cano J. Plant Sci.* 85, 31-40.
- Prot., J.C. (1984). A naturally occurring resistance breaking biotype of *Meloidogyne arenia*. on tomato. Reproduction and pathogenicity on tomato cultivars Roma and Rossol. *Rev. néo.* 13, 217-220.

- Querejeta, J. I., Allen, M. F., Caravaca, F., & Roldan, A., 2006. Differential modulation of host plant $\delta^{13}C$ and $\delta^{18}O$ by native and non-native arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid environment. *New Phytol.* 169,379-387.
- Raffaillac, J. P. (1987). Le manioc et les autres plantes tropicales à tubercules. Cours de 3ième année à l'ORSTOM, Le Havre, 53 p.
- Raffaillac, J.P., & Second, G. (1998). Plate-forme : Espèces tropicales et méditerranéennes. http://www.brg.prd.fr/brg/ecrans/rgvPi_manioc.htm.
- Ranjard, L., Lejon, D. P. H., Mougel, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D., Chaussod, R. (2003). Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Env. Microbiol.* 5, 1111-1120.
- Read, D.J., & Perez-Moreno, J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytol.* 157, 475-492.
- Redecker, D., & P, Raab. (2006). Phylogeny of the Glomeromycota (*arbuscular mycorrhizal fungi*): recent developments and new gene markers. *Mycologia.* 98, 885-895.
- Redecker, D., Kodner, R., & Graham L.E. (2000). Glomalean Fungi from the Ordovician. *Sciences* 289, 1920-1921.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H, Stürmer, S.L., Morton, J.B., & Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza.* 23 (7), 515-531.
- Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C., & Werner, D. (1997). Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *Appl. Env. Microbiol.* 63, 1756-1761.
- Rillig, M.C., & Steinberg, P.D. (2002). Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1371-1374.
- Rodriguez, A., & Sanders, I. R. (2015). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *ISME J.* 9, 1053-1061. DOI: 10.1038/ismej.2014.207
- Rodriguez, A., Clapp, J.P., and Dodd, J.C. (2004). Ribosomal RNA gene sequence diversity in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *J. Ecol.* 92, 986-989.

- Rogers, D.J., & Appan, S.G. (1973). *Manihot - Manihotoïdes (Euphorbiaceae)*. Flora Neotropica, Monograph 13, Hafner Press, New-York, 272 p.
- Rosendahl, S., McGee, P., & Morton, J.B. (2009). Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Mol. Ecol.* 18, 4316-4329.
- Rowe, H. I., Brown, C. S., & Claassen, V. P. (2007). Comparison of mycorrhizal responsiveness with field soil and commercial inoculum for six native montane species and *Bromus tectorum*. *Restor. Ecol.* 15, 44-52.
- Ruiz-lozano J.M. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza.* 13, 309-317.
- Ruiz-lozano, J.M., Azcon, R., & Gomez M. (1995). Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Appl. Env. Microbiol.* 61, 456-460.
- Saeki, Y., & Shiro, S. (2014). Comparison of Soybean-Nodulating Bradyrhizobia Community Structures along North Latitude Between Japan and USA. In: Ohshima T, editor. *Adv Biol Ecol Nitrogen Fixat.* Rijeka (Croatia): *INTECH Open Science*; p. 195-223.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sanchez, P. A. (2002). Soil fertility and hunger in Africa. *Science.* 295, 2019-2020.
- Sanchez-Castro, I., Ferrol, N., Cornejo, P., & Barea, J-M. (2012). Temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of representative shrub species in a semi-arid Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza.* 22, 449-460. DOI: 10.1007/s00572-011-0421-z.
- Sanders, I.R. (2004). Plant and arbuscular mycorrhizal fungal diversity - are we looking at the relevant levels of diversity and are we using the right techniques? *New Phytol.* 164, 415-418.
- Sanders, I.R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T., & Wiemken, A. (1995). Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol.* 130, 419-427.

- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulsen, A.R. (1977). *DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 pp. 5463–5467.
- Schenck, N. C., & Perez, Y. (1990). *Manual for the identification of VA mycorrhizal Fungi*. Synergistic Publ., Gainesville Florida, 286. ISBN 0-9625980-3-8.
- Schreiner, R. P. (2007). Effects of native and non-native arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of ‘Pinot noir’ (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. *Appl. Soil Ecol.* 36, 205-215.
- Schreiner, R.P., & Bethlenfalvay, G.J. (1994). Plant and soil response to single and mixed species of arbuscular mycorrhizal fungi under fungicide stress. *Appl. Soil Ecol.* 7, 93-102.
- Schreiner, R.P., & Bethlenfalvay, G.J. (1995). Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Crit Rev Biotechnol.* 15, 271-285.
- Schüßler, A. H., Gehrig, D., Schwarzott, C, & Walker. (2001a). Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycol. Res.* 105, 5-15.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Resource's.* 105, 1413-1421.
- Schwartz, A. (1994). Pratiques paysannes et gestion de la fertilité des terres sur les exploitations cotonnières dans l’ouest du Burkina Faso. *Cah. Sci. Hum.* 32, 153-175.
- Schwarzott, D., Walker, C., & Schüßler, A. (2001). *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Mol. Phylo. Evol.* 21, 190-197.
- Selosse, M.A., & Le Tacon F. (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership. *Trends in Ecol. Evol.* 13, 15-20.
- Sharda, W. K., & Rodrigues, B.F. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with varieties of *carica papaya* l. in tropical agro-based ecosystem of goa, India. *Tropical and Subtropical Agroecosyst.* 10, 369 - 381.
- Shaul, O., Galili, S., Volpin, H., Ginzberg, I., Elad, Y., Chet, I., & Kapulnik, Y (1999). Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Mol Plant Microbe Interact.* 12, 1000-1007.

- Shukla, A., Kumar, A., Jha, A., Chaturvedi, O.P., Prasad, R., & Gupta, A. (2009). Effects of shade on arbuscularmycorrhizal colonization and growth of crops and tree seedlings in Central India. *Agroforest. Syst.* 76, 95-109.
- Sidney, Williams. (1984). Methods of soil analysis 11th edition A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytic Chemist, 14th Edition, AOAC, Ed. Sidney Williams, Arlington., Virginia, USA. 8–37.
- Sieverding, E. (1991). Inoculum production. Vesicular–arbuscular mycorrhiza management in tropical agroecosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, Bremer, Germany, pp 223–246.
- Sieverding, E. (1989). Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agr. Ecosyst. Env.* 29, 369-390.
- Sieverding, E. (1989a). Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agr. Ecosyst. Environment.* 29, 369-390.
- Sieverding, E. (1989b). Should VAM inocula contain single or several fungal species? *Agriculture, Ecosystems, and Environment.* 29, 391-396.
- Sieverding, E. (1991). *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems.* Eschborn, Germany: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ). 371 p.
- Sieverding, E., & Toro, S.T. (1989). Effect of mixing VAM inoculum with fertilizers on cassava nutrition and VAM fungal association. *Agr. Ecosyst. Env.* 29,397401.
- Silvestre, P., & Arraudeau, M. (1983). *Le manioc.* Maisonneuse et Larose éd., A.C.C.T., techniques agricoles et productions tropicales, Paris, 262 p.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C., & M, Lalonde., (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature.* 363, 67- 69.
- Simon, L., Lalonde, M., & Bruns, T.D., (1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 291-295.
- Singh, Y. P., Singh, R. S., & Sitaramalah. (1990). Mechanism of resistance of mycorrhizal tomato against rootknot nematodes.in Trends in *Mycorrhizal Research.* Proceedings of the national conference on mycorrhiza edited by B L jalali and H Chand (Haryana agriculture University, India) 1990, 96.

- Singleton, V. L., Ortofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Ed. Packer, L. *Methods in Enzymology*. Orlando. *Academic Press*. 152-178.
- Sittibusaya, C. (1993). Progress report of soil research on fertilization of field crops. Annual Cassava Program Review 1992. 19-20 Jan. 1993. Rayong, Thailand, (Thai language) CIAT, 1982.
- Slezack, S., Negrel, J., Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., & Gianinazzi, S. (2001). Purification and partial amino acid sequencing of a mycorrhiza-related chitinase isoform from *Glomus mosseae*-inoculated roots of *Pisum sativum* L. *Planta* 213, 781-787.
- Smith, F.A., Jakobsen, I., & Smith, S.E. (2000). Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 147, 357-366.
- Smith, S.E. & Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Third Edition, London, UK, Academic press.
- Smith, S.E., & Read, D.J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.p. 605.
- Smith, S.E., & Smith, F.A. (2011). Roles of Arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 227–250.
- Soltner, D. (1992). *Les bases de la production végétale*. Tome 1: le sol. Collection Sciences et Techniques Agricoles, 19^e édition, Sainte Gemmes sur Loire.
- Srivastava, K., & Sharma, A.K. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi in challenging environment - a prospective. In: Fulton SM (ed) *Mycorrhizal fungi: soil, agriculture, and environmental implications*. Nova, New York, pp 1-35.
- Srivastava, K., & Sharma, A.K. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi in challenging environment - a prospective. In: Fulton SM (ed) *Mycorrhizal fungi: soil, agriculture, and environmental implications*. Nova, New York, pp 1-35
- Stockinger, H., Kruger, M., & Schüssler, A. (2010). DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 187, 461-474.
- Stockinger, H., Walker, C., & Schüßler, A. (2009). ‘*Glomus intraradices* DAOM197198’, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus*

intraradices. *New Phytol.* *New Phytol.* 183, 1176-1187. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02874.x

- Straker, C.J., Hilditch, A.J., & Rey, M.E.C. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with cassava (*Manihot esculenta* CRANTZ) in South Africa. *South-African J. Bot.* 76, 102-111.
- Stürmer, S.L., Filho, O.K., de Queiroz, M.H., & de Mendonça, M.M. (2006). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in soils of early stages of a secondary succession of Atlantic forest in South Brazil. *Acta Bot. Bras.* 20, 513-521.
- Sylvia, D.M., L.C. Hammond, J.M. Bennett, J.H. Haas., & S.B. Linda., (1993). Field response of maize to a VAM fungus and water management. *Agron.J.* 85,193- 198.
- Tamura, K., Strecher, G., Peterson, D., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 22725-2729.
- Tanu, Prakash, A., & Adholeya, A. (2006). Potential of arbuscular mycorrhizae in organic farming system. In: *Rai MK (ed) Handbook of microbial biofertilizers*. Food Products Press, New York, pp 223-239.
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Nowak, V., Bachar, D., Plassart, P., Wincker., Jolivet,C., Bispo, A., Lemanceau, P., Maron, PA., Mougel, C., & Ranjard, L (2012). Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microbial Biot.* 5, 135-141.
- The national health museum, copyright. (2009). <http://www.accessexcellence.org/AB/CG/plasmid.html>. Consulté le 13 mars 2017.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature.* 418, 671- 677.
- Tisdall, J.M. (1991). Fungal hyphae and structural stability of soil. *Aust. J. Biol. Sci.* 29, 729-743.
- Tongglum, A., Vichukit, V., Jantawat, S., Sittibusaya, C., Tiraporn, C., Sinthuprama S. & Howeler, R.H. (1992). Recent progress in cassava agronomy research in Thailand. In R.H. Howeler, ed. *Cassava breeding, agronomy and utilization research in Asia*. Proc. Third regional workshop, held in Malang, Indonesia. 199-223 pp.

- Torres-Barragán, A., Zavaleta-Mejía, E., González-Chávez, C., & Ferrera-Cerrato, R. (1996). The use of arbuscular mycorrhizae to control onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) under field conditions. *Mycorrhiza*. 6, 253-257.
- Trouvelot, A., Kough, J.L. & Gianinazzi-Pearson V. (1986). Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. In Aspects physiologiques et génétiques des mycorrhizes. INERA (éd.), Dijon, France. 217 - 221.
- Trouvelot, S., van Tuinen, D., Hijri, M., & Gianinazzi-Pearson, V. (1999). Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomerular fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza*. 8, 203-6.
- Ugwu, B.O., & Ukpai, U.J. (2002). Potential of Cassava Flour Processing to Sustain Increasing Cassava Production in Nigeria. *Outlook on Nigeria Agr.* 31, 2, 129-133.
- Umemura, Y. & Kawano, K. (1983). Field assessment and inheritance of resistance to cassava bacterial blight. *Crop Sci.*, 23, 6, 1127-1132.
- Valentine, A.J., Osborne B.A., & D.T. Mitchell. (2001). Interactions between phosphorus supply and total nutrient availability on mycorrhizal colonization, growth and photosynthesis of cucumber. *Sci. Hort.* 88, 177-189.
- Van der Heijden, M. G. A., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I.R. (1998a). Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecol.* 79, 2082-2091.
- Van der Heijden, M.G.A., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I.R. (1998). Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecol.* 79, 2082-2091.
- Van der Heijden, M.G.A., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I.R. (1998b). Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecol.* 79, 2082-2091.
- Van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I.R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. 396, 69-72.
- Van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., & Streitwolf-Engel, R. (1998a). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. 396, 69-72.

- Van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollote, A., & Gianinazzi-Pearson, V. (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol Ecol.* 7, 879-887.
- Van Tuinen, D., Zhao, B., & Gianinazzi-Pearson, V. (1998). PCR in studies of AM fungi: from primers to application. In: Varma, A.K. (eds), *Mycorrhiza Manual*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 387-399.
- Vazquez-Hernandez, M.V., Arevalo-Galarza, L., Jaen-Contreras, D., Escamilla-Garcia, J.D, Mora-Aguilera, A., Hernandez-Castro, E., Cibrian-Tovar, J., & Teliz-Ortiz, D. (2011). Effect of *Glomus mosseae* and *Entrophospora colombiana* on plant growth, production, and fruit quality of Maradol papaya (*Carica papaya* L.). *Sci Hortic.* 128, 255-260.
- Viera, A., & Glenn, M.G. (1990). DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycologia.* 82, 263-267.
- Vigo, C., Norman, J.R. & Hooker, J.E. (2000). Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on interaction loci. *Plant Pathol.* 49, 509-514.
- Vogelsang, K.M., Reynolds, H.L., & Bever, J.D. (2006). Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytol.* 172, 554–562.
- Voko, B. D. R. R., (2014) Agroécologie des communautés de champignons endomycorhiziens de trois zones de culture du manioc (*manihot esculenta*, CRANTZ), en Côte d’Ivoire. Thèse de Doctorat. [Côte d’Ivoire]: Université Félix Houphouët-Boigny
- Voko, B. D. R. R., Nandjui, J., Séry, D. J-M., Fotso, B., Niamke, S., & Zézé, A. (2013) .Abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities associated with cassava (*Manihot esculenta* CRANTZ) rhizosphere in Abengourou, East Côte d’Ivoire. *JENE.* 5 (11), 360-370.
- Voko, B.D.R.R., Nandjui, J., Séry, D.J-M., Fotso, B., Niamke, S., & Zézé, A. (2013b). Abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities associated with cassava (*Manihot esculenta* CRANTZ) rhizosphere in Abengourou, East Côte d’Ivoire. *JENE.* 5 (11), 360-370.

- Walker, C., & J.M. Trappe. (1993). Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycol. Res.* 97, 339-344.
- Wang, Y.Y., Vestberg, M., Walker, C., Hurme, T., Zhang, X., & Lindström, K. (2008). Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of main land China. *Mycorrhiza*. 18, 59-68.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., van der Putten, W.H. & Wall, D.H. (2004). Ecological linkages between above ground and belowground biota. *Science*. 304, 1629-1633.
- Watanarojanaporn, N., Boonkerd, N., Tittabutr, P., Longtonglang, A., Young, J.P.W., & Teaumroong, N. (2013). Effect of rice cultivation systems on indigenous arbuscular mycorrhizal fungal community structure. *Microbes and Environ.* 28, 316-324.
- Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecol Monogr.* 30 (3), 279-338.
- Wilson, J., Ingleby, K., Mason, P.A., Ibrahim, K., & Lawson, G.J. (1992). *Long-term changes in vesicular – arbuscular mycorrhizal spore population in Terminalia plantations in Côte d'Ivoire*. In: Read, D.J., Lewis, D.H., Fitter, A.H., Alexander, I.J. (Eds.), *Mycorrhizas in ecosystems*. C.A.B International, Oxon, UK, 268 - 275.
- Wilson, W.M. (2003). Cassava (*Manihot esculenta*, Cranz), cyanogenic potential, and predation in northwestern Amazonia: The Tukanoan Perspective. *Hum. Ecol.* 31, 403-415.
- Wright S.F., & Upadhyaya a. (1998). A survey of soils for aggregates stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil.* 198, 97-107.
- Wu, Q., Xia, R. & Zou, Y. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungal growth on citrus roots and its correlations with soil available phosphorus content and phosphatase activity. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 17 (4), 685-9.
- Xu, X., Qin, G., & Tian, S. (2008). Effect of microbial biocontrol agents on alleviating oxidative damage of peach fruit subjected to fungal pathogen. *Int. J. Food Microbiol.* 126 (12), 153-158.
- Yaninek, J.S., & Schulthess, F., (1993). Developing an environmentally sound plant protection for cassava in Africa. *Agr. Ecosyst. Env.* 46, 305-324.

- Yano-melo, A.M., Saggin, J., Lima-filho, J.M., Melo, N.F., & Maia, L.C. (1999). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. *Mycorrhiza*. 9, 119-123.
- Yoro, G., Konan, A., Koffi, N., Yao, T., & Yeboua, K. (1995). *Caractérisation de la région d'Abengourou dans le cadre de la deuxième phase du projet IBSRAM. Rapport technique*. IBSRAM-IDEFOR-DCC. 33 p.
- Zézé, A., Sulistyowati, E., Ophelkeler, K., Barker, S., & Smith, S. (1996). Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primers PCR. *Appl. Env. Microbiol.* 63, 676-678.
- Zhipeng, H., Christie, P., Ling, Q., Chanxian, W., & Xiaolin, L. (2005). Control of *Fusarium* Wilt of Cucumber seedlings by inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus. *J. Plant Nutr.* 28, 1961-1974.

ANNEXES

Annexe 1. Contributions des variables aux axes factoriels basées sur les corrélations entre la diversité et les paramètres physico-chimiques des sols

Variables	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
<i>Paraglomus</i>	0,47	6,22	0,62	0,47	24,06	6,28	0,56	2,06	0,74	0,75
<i>Rhizophagus</i>	0,34	7,57	0,00	2,07	14,34	0,29	5,93	0,28	0,88	0,04
<i>Septoglomus</i>	2,69	0,27	0,00	0,43	0,24	17,73	3,83	11,54	10,44	0,04
<i>Acaulospora</i>	0,03	1,13	0,55	0,83	1,67	4,73	30,61	0,04	0,00	24,00
<i>Ambispora</i>	0,05	0,70	0,33	31,10	0,48	0,35	0,10	0,76	7,40	3,36
<i>Diversispora</i>	0,79	0,03	0,83	0,03	1,10	7,74	0,36	1,91	41,74	5,55
<i>Funneliformis</i>	0,17	8,92	0,22	3,95	0,34	7,86	3,42	0,08	1,32	4,22
<i>Racocetra</i>	0,97	6,48	0,26	0,76	26,44	2,52	0,07	0,65	0,25	2,77
<i>Claroideoglomus</i>	0,74	0,13	8,26	2,30	2,92	16,80	10,14	0,13	1,97	0,00
<i>Dentiscutata</i>	0,17	0,91	1,15	0,06	5,35	0,29	1,05	0,71	0,00	1,53
<i>Glomus</i>	0,47	0,89	4,03	24,98	1,87	0,66	0,91	0,51	1,28	2,23
<i>Intraornatospora</i>	0,53	0,12	6,37	0,02	1,37	4,46	8,79	17,70	0,92	0,40
pH	2,27	4,71	0,50	4,09	0,68	10,76	0,41	4,96	1,39	14,13
C(%)	12,80	0,99	0,13	0,04	0,00	0,22	1,06	0,13	0,25	0,93
N(%)	10,58	2,30	1,65	0,43	0,04	1,01	1,68	0,08	2,29	0,36
C/N	1,85	0,40	2,98	2,76	0,11	6,45	25,31	0,00	2,36	14,03
M.O (%)	12,80	0,99	0,13	0,04	0,00	0,22	1,06	0,13	0,25	0,93
P.total (ppm)	9,67	0,01	1,35	1,94	1,11	0,01	0,10	1,21	2,16	0,00
P.ass. (ppm)	1,67	5,80	3,26	0,28	7,00	0,02	0,00	11,44	2,10	2,55
CEC (cmol.kg-1)	8,27	1,85	1,49	1,30	0,09	1,21	0,29	2,37	0,33	1,38
Ca²⁺ (cmol.kg-1)	7,28	8,58	1,48	2,53	1,13	0,18	0,05	1,29	0,19	1,07
Mg²⁺ (cmol.kg-1)	12,51	0,02	0,39	0,25	0,18	0,74	0,48	0,00	0,14	1,22
K⁺(cmol.kg-1)	0,93	9,26	1,09	3,27	0,14	0,08	0,01	8,45	5,89	2,00
Na⁺ (cmol.kg-1)	2,69	0,14	18,78	1,03	0,08	0,09	0,07	0,54	4,00	3,11
V%	0,16	19,20	2,65	6,19	0,73	0,11	0,94	0,41	0,00	0,00
Argile (%)	0,14	0,22	19,79	5,33	0,28	0,45	1,74	3,37	2,15	1,94
Limon (%)	4,49	2,98	3,75	2,71	3,99	4,97	0,05	7,07	2,62	3,38
Sable (%)	2,93	3,23	16,37	0,08	2,33	2,76	0,79	2,09	0,49	5,65
Richesse S	1,55	5,94	1,60	0,74	1,94	1,02	0,15	20,11	6,43	2,43

Annexe 2. Contributions des observations aux axes factoriels basées sur les corrélations entre la diversité et les paramètres physico-chimiques des sols

Observations	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
Ab11	10,09	0,14	1,88	0,50	0,00	1,04	0,43	0,12	0,08	0,01
Ab12	3,32	0,05	1,77	0,00	2,12	15,11	0,56	2,97	40,58	6,27
Ab13	10,55	0,60	1,02	3,70	0,17	13,89	0,22	2,11	12,90	0,21
Ab21	8,47	3,06	0,09	0,68	5,97	0,22	6,77	10,02	1,79	3,95
Ab23	4,33	3,92	2,33	0,02	1,72	4,03	0,84	3,46	0,30	0,53
Ab31	3,20	0,37	0,27	0,02	0,01	15,15	3,98	9,88	4,52	0,27
Ab32	0,03	0,20	19,10	11,30	0,18	0,88	7,22	11,22	0,14	2,90
Ab41	4,43	0,04	1,95	2,43	0,12	1,96	0,18	4,39	4,73	2,63
Ab42	14,38	0,04	0,70	0,22	1,64	3,43	0,40	0,00	11,29	0,20
Ab43	8,23	0,01	1,32	1,25	1,46	2,44	3,41	2,83	4,55	1,68
Az11	2,18	1,42	1,72	0,58	9,27	0,00	0,38	1,25	1,02	0,00
Az12	2,71	0,01	0,95	0,41	2,67	2,13	8,21	2,49	0,05	8,97
Az21	4,08	2,36	12,92	0,09	0,13	0,62	0,79	0,47	0,61	2,30
Az22	0,78	0,63	3,02	1,39	1,79	0,19	0,27	7,62	0,20	3,55
Az23	1,55	6,64	0,39	0,86	0,00	0,36	0,00	1,34	0,55	1,74
Az31	3,14	20,20	1,64	1,05	49,64	8,96	0,72	2,38	0,87	0,77
Az32	1,70	0,91	0,39	0,29	2,46	1,63	2,48	2,92	0,01	0,28
Az33	1,19	2,07	3,97	0,00	0,70	0,03	0,71	0,00	0,07	3,67
Az41	1,42	0,51	0,64	0,10	0,17	0,33	0,57	0,38	0,19	3,28
Az42	1,50	2,74	1,81	0,20	6,27	0,00	0,04	0,15	0,29	0,37
Ya11	1,24	29,37	0,57	9,05	0,70	10,83	4,37	0,10	1,58	4,47
Ya12	0,02	3,13	0,03	0,05	1,11	0,47	3,44	0,10	0,67	1,55
Ya13	0,03	0,15	1,70	0,00	4,40	1,26	3,96	2,02	1,12	12,31
Ya21	3,67	0,41	16,97	0,04	2,83	6,28	11,13	20,53	1,04	0,42
Ya22	1,59	2,24	0,00	1,20	0,03	0,02	0,11	1,22	0,00	0,55
Ya23	1,24	7,78	0,01	0,87	0,26	0,01	0,84	6,74	0,94	0,14
Ya31	0,23	1,92	9,62	58,13	1,75	1,45	0,82	0,35	8,67	1,36
Ya32	0,10	0,05	1,16	1,18	0,11	0,30	0,37	0,19	0,38	3,77
Ya41	2,37	5,09	0,06	2,29	0,07	2,09	0,37	1,57	0,05	0,75
Ya42	1,78	3,03	2,03	0,85	2,06	4,37	36,37	0,02	0,02	26,09
Ya43	0,46	0,90	9,96	1,25	0,20	0,52	0,05	1,16	0,79	5,01

PUBLICATION



Selecting Native Arbuscular Mycorrhizal Fungi to Promote Cassava Growth and Increase Yield under Field Conditions

D. Jean-Marc Séry¹, Z. G. Claude Kouadio², B. R. Rodrigue Voko³ and Adolphe Zézé^{1*}

¹ Laboratoire de Biotechnologies Végétale et Microbienne, Unité Mixte de Recherche et d'Innovation en Sciences Agronomiques et Génie Rural, Institut National Polytechnique Felix Houphouët-Boigny, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire,

² Laboratoire Central de Biotechnologies, Centre National de la Recherche Agronomique, Abidjan, Côte d'Ivoire, ³ Unité de Formation et de Recherche en Agroforesterie, Université Jean Lorougnon Guédé, Daloa, Côte d'Ivoire

OPEN ACCESS

Edited by:

Mohamed Hijri,
Université de Montréal, Canada

Reviewed by:

Erik Limpens,
Wageningen University and Research
Centre, Netherlands
Raffaella Balestrini,
National Research Council, Italy

*Correspondence:

Zézé Adolphe
youhe.deba@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Biotic Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 29 July 2016

Accepted: 07 December 2016

Published: 22 December 2016

Citation:

Séry DJ-M, Kouadio ZGC, Voko BRR
and Zézé A (2016) Selecting Native
Arbuscular Mycorrhizal Fungi to
Promote Cassava Growth and
Increase Yield under Field Conditions.
Front. Microbiol. 7:2063.
doi: 10.3389/fmicb.2016.02063

The use of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) inoculation in sustainable agriculture is now widespread worldwide. Although the use of inoculants consisting of native AMF is highly recommended as an alternative to commercial ones, there is no strategy to allow the selection of efficient fungal species from natural communities. The objective of this study was (i) to select efficient native AMF species (ii) evaluate their impact on nematode and water stresses, and (iii) evaluate their impact on cassava yield, an important food security crop in tropical and subtropical regions. Firstly, native AMF communities associated with cassava rhizospheres in fields were collected from different areas and 7 AMF species were selected, based upon their ubiquity and abundance. Using these criteria, two morphotypes (LBVM01 and LBVM02) out of the seven AMF species selected were persistently dominant when cassava was used as a trap plant. LBVM01 and LBVM02 were identified as *Acaulospora colombiana* (most abundant) and *Ambispora appendicula*, respectively, after phylogenetic analyses of LSU-ITS-SSU PCR amplified products. Secondly, the potential of these two native AMF species to promote growth and enhance tolerance to root-knot nematode and water stresses of cassava (Yavo variety) was evaluated using single and dual inoculation in greenhouse conditions. Of the two AMF species, it was shown that *A. colombiana* significantly improved the growth of the cassava and enhanced tolerance to water stress. However, both *A. colombiana* and *A. appendicula* conferred bioprotective effects to cassava plants against the nematode *Meloidogyne* spp., ranging from resistance (suppression or reduction of the nematode reproduction) or tolerance (low or no suppression in cassava growth). Thirdly, the potential of these selected native AMF to improve cassava growth and yield was evaluated under field conditions, compared to a commercial inoculant. In these conditions, the *A. colombiana* single inoculation and the dual inoculation significantly improved cassava yield compared to the commercial inoculant. This is the first report on native AMF species exhibiting multiple benefits for cassava crop productivity, namely improved plant growth and yield, water stress tolerance and nematode resistance.

Keywords: AMF, ecological engineering, cassava yield, tolerance, *Meloidogyne*, drought

INTRODUCTION

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a Central and South American native plant with tuberous roots rich in starch. It is a staple food for over 800 million people living in developing countries (Burns et al., 2010). In Côte d'Ivoire, it is the second most important food crop with an estimated annual production in 2013 of 2.5 million tons (FAO, 2014). This crop plays an important role in food security and income generation for many smallholder families. Despite its importance, cassava productivity is low in Côte d'Ivoire where yields are around 6 to 8t/ha compared to a global average level of 13t/ha (FAO, 2014). This low yield appears to be due to several factors. Firstly cassava cropping systems in Côte d'Ivoire are intensive and result in a rapid loss of soil fertility usually requiring long fallow periods (up to 7 years) to restore phosphorus and nitrogen levels. Secondly, cassava productivity is affected by pests, with root-knot nematodes being of major importance (Caveness, 1982; McSorley et al., 1983; Jatala and Bridge, 1990). Cassava yield losses due to nematode damage can be up to 87% (Caveness, 1982; IITA, 1990). Root-knot nematode damage can now be considered as a threat to the production of this major crop plant in Côte d'Ivoire where producers are mainly small farmers who cannot afford to buy nematicides. A third problem is the effect of climate change on crop productivity; notably the impact of drought, as unreliability of rainfall is a factor limiting cassava cultivation in tropical and subtropical areas (N'Guetia and Bernard, 1986). Consequently, although known for its ability to withstand drought, the net biomass production of cassava is reduced in times of water stress, irrespective of variety (Connor et al., 1981). Therefore, in order to sustain cassava productivity for farmers in tropical regions, it is important to develop a technology that can confer simultaneously on this plant (i) better growth and yield, (ii) a better tolerance to nematodes and (iii) a better tolerance to water deficit. Compounding the effects of disease and water stress is the increased vulnerability of rural families and smallholder cassava producers who often do not have access to appropriate technologies, services and markets. In developed countries, farmers rely extensively on industrial fertilizers to maximize crop productivity. Unfortunately, because of their financial and environmental costs, industrial fertilizers are not a solution for underdeveloped countries (Sanchez, 2002).

Cassava farmers could benefit from the multiple services offered by soil microorganisms such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Indeed, AMF belonging to the phylum Glomeromycota (Schüßler et al., 2001), constitute a multifunctional partner in the mutualistic interaction they develop with most land plants. The major function of AMF is to provide the mycorrhizal plant with water and essential nutrients such as phosphorus and nitrogen (He et al., 2003; Smith and Read, 2008). In addition to this nutritional function they provide, AMF can enhance plant tolerance to both biotic and abiotic stresses (Augé, 2001, 2004; Ortas et al., 2001; Plenchette et al., 2005; Al-karaki, 2006; Pozo and Azcón-Aguilar, 2007; Porcel et al., 2011; Augé et al., 2015). This multifunctional ability of the partner fungi has led to the development of mycorrhizal inoculants as biofertilizers in

agriculture. Mycorrhizal inoculation has been applied for decades to promote better plant growth for various crop plants (Osonubi et al., 1995; Carretero et al., 2009). Cassava is highly mycorrhizal (Sieverding, 1989; Oyetunji and Osonubi, 2007) and there is evidence that AMF play an important role in increasing the productivity of cassava (Sieverding, 1989; Cardoso and Kuyper, 2006; Ceballos et al., 2013). Despite this positive impact of AMF inoculation on cassava productivity, and the known positive impact of mycorrhizal inoculation on root-knot nematode infection in crops such as yam and grapevine (St-Arnaud and Vujanovic, 2007; Tchabi, 2008; Hao et al., 2012; Veresoglou and Rillig, 2012), studies of AMF effects on root-knot nematode and water deficit in cassava remain scarce. In other studies, the impact of AMF on water stress has been documented for several crop plants, including cassava (Augé, 2001; Oyetunji et al., 2007). Although these studies point out the importance of AMF, there is no report of an AMF species that can (i) promote cassava growth and yield (ii) alleviate root-knot nematode damage and (iii) alleviate water stress. Therefore, the identification of AMF exhibiting these three traits could be a step forward to sustain cassava productivity in tropical regions.

The objective of this work was to recover native AMF species from smallholder farms and evaluate their potential to promote cassava growth and enhance resistance to root-knot nematode and water stress. Criteria such as ubiquity and relative abundance in field soils and baited soils were used to select native AMF species that were subsequently further evaluated for plant growth promotion in greenhouse and field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The improved cassava variety TME 7 "Yavo" provided by the National Agency for Rural Development Support (ANADER) in Yamoussoukro was used for the experiment. This variety has an 8-month cycle and is known to be resistant to the African cassava mosaic virus. In general, cassava leaves and roots are well developed after 4 months. At this stage, biotic and abiotic stresses can affect cassava growth parameters (Connor et al., 1981). Therefore all the experiments in greenhouse were run on 4-month-old cassava plants.

Methods

Selecting Potential Arbuscular Mycorrhizal Fungi for Inoculum Development

Recovery of AMF species from field soils

Soil samples were collected from cassava fields during the dry period in December 2012 in three agro-ecological zones (Azaguié, Yamoussoukro and Abengourou), which are considered important cassava production areas in Côte d'Ivoire (Chaleard, 1988; Kouadio et al., 2010). Twelve soil samples (1 kg each) were collected at a depth of 0–20 cm from cassava plant rhizospheres, using the sampling method of Huang and Cares (2004), from four fields in each agro-ecological zone (Table 1). AMF were extracted from 50 g of field soils by wet sieving (Gerdemann and Nicolson, 1963) using 4 sieves (45, 90, 125, and 500 μm). AMF species were identified as described

TABLE 1 | Geographic coordinates of fields.

Zone	Field	Area (ha)	Point	Geographic coordinates		
				North	West	Altitude (m)
ABENGOUROU	Aniansué 1 (AB1)	1–2	Ab 1/1	06°40'20.10"	003°38'57.72"	166
			Ab 1/2	06°40'20.64"	003°38'56.34"	164
			Ab 1/3	06°40'20.28"	003°38'58.56"	164
	Aniansué 2 (AB2)	2–3	Ab 2/1	06°39'51.96"	003°41'07.80"	170
			Ab 2/2	06°39'53.82"	003°41'06.66"	167
			Ab 2/3	06°39'50.76"	003°41'06.06"	164
	Dramanekro 1 (AB3)	1–2	Ab 3/1	06°42'38.40"	003°37'03.36"	176
			Ab 3/2	06°42'37.44"	003°37'04.80"	176
			Ab 3/3	06°42'37.32"	003°37'05.34"	177
	Dramanekro 2 (AB4)	1–2	Ab 4/1	06°41'48.96"	003°38'19.08"	151
			Ab 4/2	06°41'50.82"	003°38'17.94"	154
			Ab 4/3	06°41'51.60"	003°38'16.50"	152
AZAGUIE	Ahoua 1 (AZ1)	1–2	Az 1/1	05°40'21.06"	004°02'33.42"	51
			Az 1/2	05°40'22.38"	004°02'32.64"	50
			Az 1/3	05°40'22.86"	004°02'31.38"	50
	Ahoua 2 (AZ2)	1–2	Az 2/1	05°38'36.30"	004°03'24.54"	48
			Az 2/2	05°38'34.32"	004°03'18.36"	47
			Az 2/3	05°38'35.88"	004°03'21.36"	46
	M'Bromé 1 (AZ3)	2–3	Az 3/1	05°39'38.28"	004°09'00.00"	53
			Az 3/2	05°39'37.14"	004°08'57.60"	49
			Az 3/3	05°39'35.94"	004°08'57.54"	47
	M'Bromé 2 (AZ4)	2–3	Az 4/1	05°40'04.98"	004°08'43.44"	46
			Az 4/2	05°40'01.56"	004°08'43.32"	47
			Az 4/3	05°39'58.74"	004°08'43.32"	52
YAMOOUSSOUKRO	Logbakro 1 (YA1)	1–2	Ya 1/1	06°44'13.50"	005°12'24.60"	223
			Ya 1/2	06°44'14.28"	005°12'24.60"	225
			Ya 1/3	06°44'15.42"	005°12'23.10"	225
	Logbakro 2 (YA2)	1–2	Ya 2/1	06°44'01.68"	005°11'44.22"	207
			Ya 2/2	06°44'02.64"	005°11'45.60"	210
			Ya 2/3	06°44'02.34"	005°11'46.86"	210
	Céman (YA3)	1–2	Ya 3/1	06°53'14.46"	005°17'54.96"	237
			Ya 3/2	06°53'15.06"	005°17'54.90"	233
			Ya 3/3	06°53'15.42"	005°17'54.00"	235
	Zambakro (YA4)	2–3	Ya 4/1	06°43'30.12"	005°24'15.48"	162
			Ya 4/2	06°43'30.36"	005°24'14.52"	159
			Ya 4/3	06°43'28.68"	005°24'14.16"	159

below, and selected according to abundance, occurrence and ubiquity. Species occurrence was determined as the number of fields in which a particular species was found divided by the total number of fields. Each morphotype was maintained in monoculture using variety “Yavo” as a host, in 2-L pots containing soil + sand (3:1 v/v) sterilized by autoclaving.

Isolation of abundant AMF species by trapping

Field soils were used to trap AMF species using the cassava variety “Yavo.” The collected soils were mixed with a substrate composed of a mixture of soil and sand (3:1,v/v) sterilized at 120°C and

2 bars for 1 h on two successive days (Bâ et al., 2000) in a 1:1 ratio (v/v). Soils were placed in 10-L pots. The pots were watered every other day with 400 ml of water without fertilizer. After 4 months, cassava plants showed good physiological development. Soils were carefully recovered using a spatula after 4 months of cultivation. 50 g of soils were used to identify abundant and ubiquitous AMF morphotypes.

Morphological Identification of Selected AMF Spores

Spores were extracted by wet sieving and mounted between slide and coverslip in polyvinyl-lacto-glycerol and Melzer's solution

(Morton et al., 1993). They were observed under a microscope and morphologically identified based on their color, shape, and composition of their walls (Schenck and Perez, 1990; see <http://invam.wvu.edu/>, <http://www.zor.zut.edu.pl/> collection websites). Spores were photographed using a Motic BA310 Trinocular compound microscope.

Molecular Identification of Selected AMF

Morphotypes

In order to confirm the morphological identification of the selected AMF species, PCR amplification was performed using primers LR1-LSUmAr/LR1-LSUmBr. For each selected species, 10 spores were collected in a 1.5 ml microfuge tube for DNA extraction using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). A first PCR amplification using primers LR1 and LSUMAr (van Tuinen et al., 1998; Stockinger et al., 2009) and a nested PCR using LR1 and LSUMBr primers (Krüger et al., 2009; Stockinger et al., 2010) were performed in 30 cycles (95°C 5 min; 94°C 1 min; 58°C 30 s; 72°C 45 s; 72°C 5 min; 25°C 1 s). The size of PCR products were checked on 1% agarose gels. For sequencing, the amplified PCR products were purified using a commercial kit (Nucleospin Extract II) and cloned using the TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Three positive clones were selected for sequencing by GATC Biotech (Konstanz, Germany) using the directional Sanger method. Sequence analyses were done by Blast with NCBI and MAARJAM databases and phylogenetic analyses were performed using the software MEGA 6.06 and the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987).

Mycorrhizal Inoculum Production

To produce inoculum, the selected strains were grown individually in the greenhouse in a sterile substrate containing cassava plants. For single inoculation, the inoculum (S1: *A. colombiana* or S2: *A. appendicula*) was in the form of 50 g of sterile substrate (soil + sand; 3:1, v/v) containing pieces of mycorrhizal roots, hyphae and about 350 AMF spores. The soil characteristics were (pH = 7.1; organic matter = 2.81%; total nitrogen = 0.15%; available phosphorus = 55 mg/kg) and for the sand (pH = 6.7; organic matter = 0.17%; total nitrogen = 0.01%; available phosphorus = 2 mg/kg). For dual inoculation, the two inocula (25 g each) were mixed to make 50 g.

Evaluation of the Impact of Selected AMF on Cassava Growth and Phosphorus Status in Greenhouse

Experimental design and culture condition

The greenhouse experiment was conducted comparing three AMF combinations (S1, S2, and S1S2) plus the control S0, and 6 replicates (completely randomized blocks) over 4 months. Pots were filled with 8 kg of substrate (soil + sand; 3:1, v/v). Each pot contained one cassava plant that was watered every other day with 400 ml of water without fertilizer.

Assessment of mycorrhizal development

For assessment of root colonization by AMF, fine cassava roots were sampled 4 months after planting, with three replicates per treatment. Each treatment contained three plants. Roots were

rinsed and cut into 1–2 cm fragments. These roots fragments were cleared by boiling in 10% (w/v) KOH and stained with 0.05% (v/v) trypan blue in lactoglycerol according to the method of Phillips and Haymann (1970). Ten pieces of roots per plant were placed in glycerol (50%) between slide and coverslip (Kormanik and McGraw, 1982) and observed under an optical microscope. The colonized roots were observed and evaluated according to Trouvelot et al. (1986).

Assessment of the Mycorrhizal Inoculation on Cassava Growth and Phosphorus Levels in Greenhouse

Plant growth was assessed by measuring plant height and foliar surface area using Connor's et al. methods (Connor et al., 1981), and total fresh and dry matter. Plant total fresh matter was determined using an OHAUS balance and the dry matter after oven drying at 80°C for 48 h. Eight young cassava leaves were analyzed for P content after 4 months by the mineralization and calcination method using a Tecator model 40 instrument (Sidney, 1984). All measurements were done in triplicate.

Evaluation of the Impact of Selected AMF Species on Cassava Tolerance and Resistance to Root-Knot Nematode *Meloidogyne* spp. in Greenhouse

Preparation of nematode inoculum

The nematode inoculum was made using a population of *Meloidogyne* spp., isolated from tomato galls grown in a greenhouse. The inoculum was prepared by finely cutting infected tomato roots that were soaked in a jar containing NaClO (0.25%) and shaken for 2 min (Hussey and Barker, 1973). Nematode eggs and juveniles were collected on a 25 µm sieve, rinsed in sterile water and counted under a 40x binocular magnifier. A suspension of 1000 nematodes (juveniles + eggs) was added to each cassava plant (each pot).

Experimental design and culture condition

A 4 × 2 factorial experiment with three replicates and completely randomized design was carried out in the greenhouse over a 4-month period. One factor was the AMF treatment: each selected AMF strain was used either in single inoculation (S1, S2) or dual inoculation (S1S2) and a non-inoculated control (S0). The other factor was inoculation with root knot nematodes, either at the same time as the AMF inoculation (I2), or 1 month after AMF inoculation (I4). Inoculation with nematodes was achieved by loading aliquots of 1000 freshly hatched juveniles and eggs suspended in distilled water into 5-cm-deep holes equidistant around each plant. Pots were filled with 8 kg of substrate (soil + sand; 3:1, v/v). Each pot contained one cassava plant that was watered every other day with 400 ml of water without fertilizer.

Assessment of the mycorrhizal inoculation impact on nematode population

At the end of the experiment, nematodes and eggs were counted according to Daykin and Hussey (1985). The total content of phenols, which are an indicator of plant defense compounds against nematode attack, in roots was estimated using a colorimetric method (Singleton et al., 1999). Total

phenol content was measured after 2 h at room temperature incubation by absorbance at 765 nm, measured in a Jenway 7315 Spectrophotometer. The quantification was done using a gallic acid calibration curve. Biomass (total fresh matter, total dry matter) and phosphorus in cassava leaves were also determined as described above.

Impact of the Selected AMF Inoculation on Cassava Resistance to Water Stress in Greenhouse

Experimental design and culture condition

Before the main experiment, a pot containing 8 kg of soil was filled with water until saturation. Excess water was then allowed to drain over 2 days and field capacity (FC) was measured according to Colombani et al. (1973). A 4 × 2 factorial experiment with three replicates and a completely randomized design was carried out in a greenhouse over a 4-month period. One factor was the AMF treatment: each selected AMF strain applied either in single inoculation (S1, S2) or dual inoculation (S1S2), and a non-inoculated control (S0). The other factor was water regime. All plants were watered to 100% of FC for 2 months after planting. They were then divided in two groups for the remaining 2 months. One group was regularly watered to 100% FC while the other was watered to 10% of FC. That watering regime corresponded to 400 mm of water/year, which can be considered a severe water stress to cassava (FAO, 2013). The total number of plants for the experiment was 48. Mycorrhizal abundance was estimated on roots harvested monthly using the Trouvelot et al. (1986) method. Foliar surface areas were measured on the 3rd and 4th month, and biomass was determined after 4 months, as described previously. The chlorophyll a content of young plant leaves was determined using the method of Arnon (1949). Soluble sugar content (TS) of young leaves, a measure of osmoprotection during water stress, was determined according to Dubois et al. (1956) using the Jenway 7315 spectrophotometer.

Cassava Plant Inoculation under Field Conditions

Study area

An experimental area of about 2500 m² was set up in Duokro, 15 km from Yamoussoukro in Côte d'Ivoire, to test the effect of local and commercial strains of mycorrhizae on colonization, and cassava yield during the 2015–2016 season. The average temperature in this region over the season was 32 ± 2°C, average total annual rainfall is 1495 mm and average annual humidity is 79 ± 12%.

Experimental design

The field experiment was established using a randomized complete block design with five inoculation treatments: *Ambispora appendicula* (T1), *Acaulospora colombiana* (T2), the dual inoculant *A. colombiana*–*A. appendicula* (T3), a commercial inoculum Mykepro P501 produced by PremierTech biotechnologies (T4), and a non-inoculated control (T5). The commercial inoculant is composed of a single species *Rhizophagus intraradices*. Mineral fertilizer (30 kg N/ha, 20 kg P/ha and 50 kg K/ha) was applied to the non-inoculated control plots. For each treatment, there were three replicates, resulting in a total of 18 plots. Cassava was planted in ridges 80 cm wide

and 20 cm high, separated by 20-cm wide furrows, following the contour. The blocks were arranged perpendicular to the slope. Each plot contained 40 plants, including 16 inoculated plants and 2 lines of 24 plants curbs to limit edge effects. The planting density was 10,000 plants/ha. 25-cm long cassava cuttings, 1.5–2.5 cm thick, with 5–6 nodes were planted in 20-cm deep holes. Cuttings were inserted diagonally in order to promote sprouting. No irrigation water or pesticides were applied. Cassava plant inoculation was done on farm. For the native inoculum, each plant was inoculated with 100 g of inoculums containing 1000 spores + mycorrhizal roots. For the commercial inoculum 6 g containing 3000 spores + mycorrhizal roots was added to each plant, corresponding to triple the dose applied in temperate zones.

Assessment of cassava tuber yield

Tubers were harvested on March 10, 2016. Fresh tubers were weighed and the yield converted to t/ha. When a significant difference was observed in yield compared to plots without AMF, the gain (G) in yield was calculated according to the formula:

$$G(\%) = 100 * \left(\frac{\text{Yield with AMF} - \text{Yield without AMF (control)}}{\text{Yield without AMF (control)}} \right)$$

Statistical Analyses

All experimental data in greenhouse were subjected to statistical analyses by performing either one or two-way analysis of variance (ANOVA) using Statistica 7.1. The significance of the treatment effects was determined using LSD Fisher test with $P = 0.05$.

All field experiment data were analyzed by ANOVA. Fisher's LSD test was also used to determine whether or not treatments were different from each other at $P < 0.05$.

RESULTS

Selection and Identification of Potential Useful AMF Species for Cassava Crop Inoculation

Using spore characteristics, several AMF species were identified (Table 2) in the three agricultural zones. The species *Acaulospora scrobiculata*, *A. colombiana*, *A. appendicula*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Glomus glomerulatum* and an unidentified species *Glomus Sp2* were abundant at various levels in all three zones. However, when the cassava cultivar Yavo was inoculated with field soils in greenhouse, only *A. colombiana*, *A. appendicula* were confirmed in all soils, with *A. appendicula* having low abundance (Table 2). These two morphotypes (LBVM01 and LBVM02), which were present in all soils and also abundant in trapped communities, were considered as good candidates for cassava inoculation. They were initially identified based on morphological criteria using PVLG and Melzer's reagent as *Acaulospora* sp. and *Ambispora* sp. (Figure 1). An expected 700 bp fragment was amplified from each morphotype. Both BLAST and phylogenetic analyses allowed the identification of the morphotype LBVM01 as *A. colombiana* (Genbank accession number KX168435) and the other LBVM02 as *A. appendicula* (Genbank accession number KX168436) (Table 3; Figure 2).

TABLE 2 | Abundance of efficient arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) species.

AMF species	AB1	AB2	AB3	AB4	AZ1	AZ2	AZ3	AZ4	YA1	YA2	YA3	YA4	Occurrence (%)
NATIVE AMF SPECIES RECOVERED FROM CASSAVA FIELD SOILS													
<i>Acaulospora excavata</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	++	+	+	+	67
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	++	+++	+++	++	++	+	++	+	++	++	++	++	100
<i>Acaulospora colombiana</i>	+	+	++	++	+++	++	+	++	++	+	++	++	100
<i>Ambispora appendicula</i>	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	++	100
<i>Claroideoglossum etunicatum</i>	++	++	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++	100
<i>Glomus aureum</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	58
<i>Glomus glomerulatum</i>	++	+	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	100
<i>Glomus clavisporum</i>	-	+	+	-	-	++	++	-	-	-	-	++	42
<i>Glomus</i> sp.1	++	+	++	+	-	-	-	-	+	++	++	++	67
<i>Glomus</i> sp.2	++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	100
<i>Funnelliformis mossae</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	17
<i>Rhizophagus intraradices</i>	++	++	++	+++	-	-	-	-	+	+	+	+	67
<i>Rhizophagus manihotis</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	17
<i>Sclerocystis sinuosum</i>	+	-	-	++	+	+	++	-	+	-	+	+	67
<i>Septoglossum constrictum</i>	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	+	-	33
<i>Gigasporasp.1</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	8
<i>Racocetra africana</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	67
<i>Scutelospora</i> sp.	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	83
AMF SPECIES TRAPPED AFTER 4 MONTHS FROM FIELD SOILS USING THE CASSAVA CULTIVAR YAVO													
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	++	+	+++	-	-	-	+	+++	+	-	+++	-	58
<i>Acaulospora colombiana</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	100
<i>Acaulosporasp.1</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	33
<i>Ambispora appendicula</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Glomus clavisporum</i>	++	++	-	-	-	+++	++	++	+	-	-	+	58
<i>Rhizophagus intraradices</i>	++	++	++	+++	-	-	-	-	+	+	+	+	67
<i>Gigaspora</i> sp.1	++	++	+	+	++	+	-	+	-	-	-	-	58

AB, Abengourou; AZ, Azaguié; YA, Yamoussoukro; Field number, 1–2–3–4. -, absent (0 spore/g); +, present (1–2 spores/g); ++, abundant (3–5 spores/g); + + +, highly abundant (6–8 spores/g). bold indicates abundant and ubiquitous AMF species in both field soils and trapped culture.

Effect of *A. colombiana* and *A. appendicula* Single and Dual Inoculation on Cassava Growth and P Uptake

After 4 months of culture in greenhouse conditions (Table 4), all cassava plants inoculated (singly or dually) with *A. colombiana* and *A. appendicula* were mycorrhizal. Frequencies and intensities of mycorrhization did not differ significantly between single and dual inoculation (frequency of 26.7 and 48.3%, and intensity of 14.5 and 38.7%, respectively). No mycorrhizal structures were observed in cassava control plants. The foliar P content of cassava plants inoculated with *A. colombiana* was significantly ($p = 0.002$) improved (1.3-fold) compared to the non-inoculated control, whereas the *A. appendicula* single inoculation had no impact. The foliar P content of dual inoculated plants was significantly improved (1.5-fold) compared to the control. The growth parameters (plant height, foliar surface area, total dry and total fresh matter) of *A. colombiana* singly inoculated cassava plants were significantly improved ($p = 0.040$; $p = 0.008$; $p = 0.000$; $p = 0.001$, respectively) after 4 months in the greenhouse. The *A. appendicula* single inoculation had significant impact only on total fresh

matter. However, dual inoculation significantly improved all parameters.

Susceptibility of *A. colombiana* and *A. appendicula* Inoculated Cassava Plants to Root-Knot Nematode *Meloidogyne* Spp

Four months after single or dual inoculation with *A. colombiana* or *A. appendicula*, in the presence of the nematode *Meloidogyne* spp., all treated cassava plants were mycorrhizal (Table 5). However, the frequencies and intensities of mycorrhization were significantly lower ($p = 0.002$ for both) in the roots of cassava plants that were co-inoculated with the nematode *Meloidogyne* spp. In this condition, the presence of *A. colombiana* and *A. appendicula* as single or dual inoculant significantly reduced nematode egg and population densities. In this experiment, none of the three mycorrhizal inoculation methods significantly affected foliar P contents. However, the single inoculation using *A. appendicula* and the dual inoculation significantly increased cassava total fresh biomass. When the nematodes were added 1 month after AMF inoculation, mycorrhizal root colonization levels were still high after 4 months (frequency 20 and 36.7%,

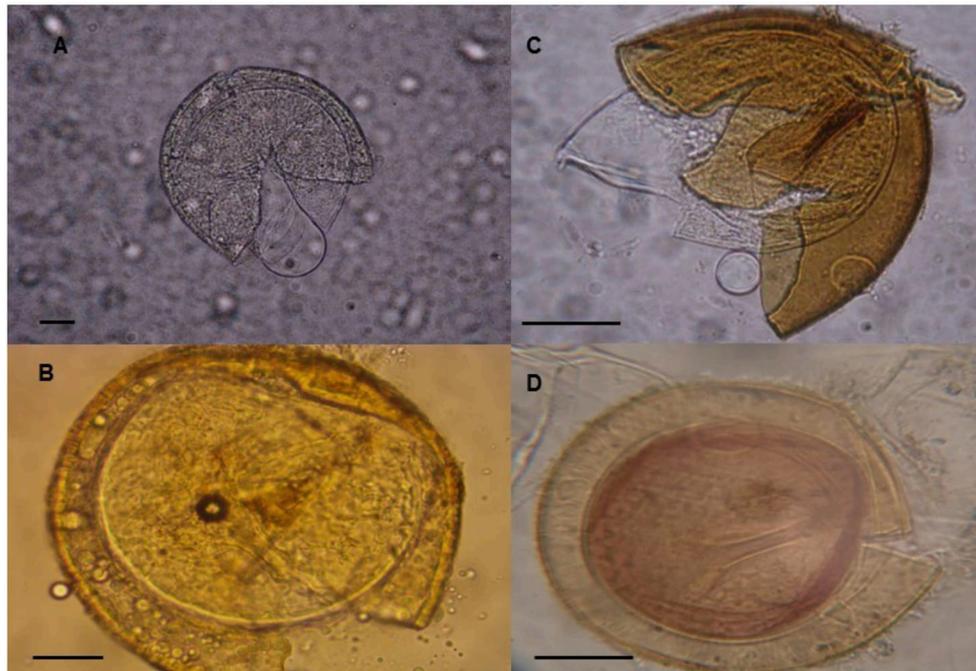


FIGURE 1 | Spores of arbuscular mycorrhizal fungi used in this study. (A) *Acaulospora colombiana* and (C) *Ambispora appendicula* stained with lactoglycerol polyvinyl. (B) *Acaulospora colombiana* and (D) *Ambispora appendicula* stained with Melzer's reagent. Scale bar = 1/25 μm .

TABLE 3 | Consensus identification of the two native species of arbuscular mycorrhizal fungi.

Morpho-species	Morphological identification	Molecular identification	Consensus species	Species accession number in databases
S1	<i>Acaulospora</i> sp.	<i>A. colombiana</i>	<i>A. colombiana</i>	KX168435
S2	<i>Ambispora</i> sp.	<i>A. appendicula</i>	<i>A. appendicula</i>	KX168436

and intensity 15 and 21.5% for single and dual inoculation, respectively). In this case, only the single inoculation with *A. colombiana* significantly ($p = 0.006$) reduced the number of nematode eggs in the cassava roots. Also, only *A. colombiana* as a sole inoculants significantly increased the foliar P content. However, only the dual inoculation increased cassava plant fresh and dry biomass. Phenol contents of AMF pre-inoculated cassava roots were significantly higher than the controls (not inoculated with AMF).

Development of Single and Dual *A. colombiana* and *A. appendicula* Inoculated Plants during Water Stress

When cassava plants were well watered (100% FC), mycorrhizal colonization significantly increased during the first 2 months when inoculated with *A. colombiana* (from 23 to 46.7%) and with the dual inoculation (10 to 23.7%), but not with *A. appendicula* (constant at 10%) (Table 6). One month after water

stress was initiated (10% FC), mycorrhizal colonization declined significantly in the cassava roots for all mycorrhizal treatments (Table 6). After 2 months of water stress the same trend was observed for all mycorrhizal treatments. However, *A. colombiana* colonization of cassava roots remained stable at 26.7% in the fourth month and this was significantly higher ($p = 0.049$) than *A. appendicula*. Under water stress, the presence of *A. colombiana* had a significant positive impact on the growth parameters (total dry matter, fresh matter and foliar surface area) (Table 7). In comparison, neither the single inoculation with *A. appendicula* nor the dual inoculation positively impacted these growth parameters. Moreover, under this severe water stress, the cassava plants inoculated with *A. colombiana* significantly improved all functional traits measured, including chlorophyll a (0.209 mg/g FM) and total sugar content (496 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ FM), compared to non-inoculated plants (Table 7).

Impact of Mycorrhizal Inoculation on Cassava Yield under Field Conditions

The impact on cassava yields of the native AMF in single and dual inoculation was assessed in comparison to the commercial inoculant MykePro and the standard chemical fertilizer application (Figure 3). The results showed that the chemical fertilizer NPK significantly improved cassava yield (11.38 t/ha) compared to non-inoculated control (8.21 t/ha). This represents a yield gain of 38.5%. Of the AMF treatments, only *A. colombiana* single inoculation and the dual inoculation significantly ($p = 0.003$) improved cassava yield (9.58 and 9.81 t/ha, respectively) compared to non-inoculated control

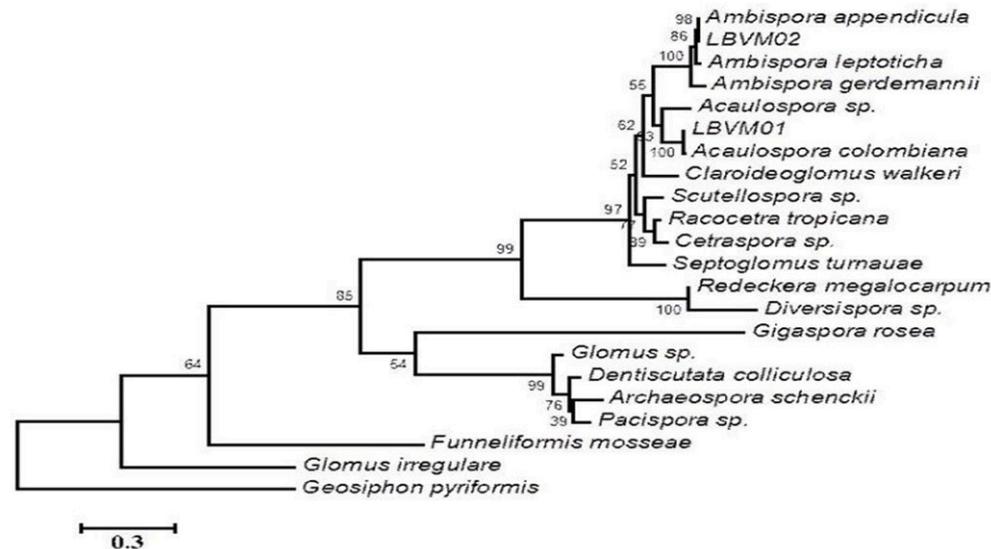


FIGURE 2 | Phylogenetic identification of LBVOI and LBVM02 isolated from field soils. SSU-ITS-LSU gene sequences from AMFs species *Ambispora appendicula* (FN547527), *Ambispora leptoticha* (KC166277), *Ambispora gerdemannii* (KC166282), *Acaulospora* sp. (HF56794), *Acaulospora colombiana* (FR750063), *Scutellospora* sp. (AF396818), *Racocetra tropicana* (GU385898), *Cetraspora* sp. (HM565946), *Septogloium tumauae* (KF060327), *Redeckera megalocarpum* (NR121478), *Diversispora* sp. (KJ850185), *Gigaspora rosea* (U60451), *Glomus* sp. (AB326023), *Dentiscutata colliculosa* (GQ376067), *Archaeospora schenckii* (KP144303), *Claroideoglomus walkeri* (KP191492); *Pacispora* sp. (JQ182768), *Funneliformis mosseae* (KM360085), *Glomus irregulare* (GU585513) and *Geosiphon pyriformis* (JX535577) were used for comparison. The tree was constructed by the neighbor-joining method using Mega version 6.

TABLE 4 | Impact of *A. colombiana* and *A. appendicula* single and dual inoculation on phosphorus nutrition and cassava growth after 4 months.

Treatment	Frequency of mycorrhization (%)	Intensity of mycorrhization (%)	Plant height (cm)	Foliar surface area (cm ²)	Total fresh matter (g)	Total dry matter (g)	P (%dm)
Control (S0)	0 ± 0	0 ± 0	34.1 ^c ± 0.9	898.3 ^c ± 38.96	47.4 ^c ± 2.5	15.9 ^c ± 0.2	0.17 ^c ± 0.008
<i>A. colombiana</i> (S1)	48.3 ^a ± 11.8	25.4 ^a ± 7.5	41.5 ^{ab} ± 0.7	1375.6 ^{ab} ± 162.3	56.9 ^{ab} ± 3.2	18.3 ^b ± 0.7	0.22 ^b ± 0.0
<i>A. appendicula</i> (S2)	26.7 ^a ± 4.5	14.5 ^a ± 3	36.7 ^{bc} ± 2.1	1219.1 ^{bc} ± 80.36	55 ^b ± 1	17.4 ^{bc} ± 0.6	0.19 ^{bc} ± 0.0
<i>A. colombiana</i> - <i>A. appendicula</i> (S1S2)	46.7 ^a ± 15.6	38.7 ^a ± 12.8	44.33 ^a ± 2.6	1711.6 ^a ± 54.01	60.7 ^a ± 2.9	20.3 ^a ± 2.2	0.26 ^a ± 0.016
P and F-VALUE							
	$p = 0.018$	$p = 0.024$	$p = 0.040$	$p = 0.008$	$p = 0.000$	$p = 0.001$	$p = 0.002$
	$F = 4.19$	$F = 3.91$	$F = 4.454$	$F = 8.1851$	$F = 14.58$	$F = 7.93$	$F = 12.267$

dm, dry matter. All the values are means of the three replications (n = 3). Means with different letters were significantly different at 5% level.

(8.21 t/ha). This represents a yield gain of 19.4% for the dual inoculation and 16.6% for *A. colombiana*. *A. appendicula* and the commercial inoculant had no significant impact on cassava yield compared to the non-inoculated control.

DISCUSSION

This work aimed to select an abundant native AMF capable of improving cassava crop productivity via several mechanisms, namely improved plant growth, water stress tolerance and nematode resistance. This is an improvement on previous studies, which tended to focus on one aspect affecting cassava yield, without studying the possible interactions with nematodes and drought.

During this study, there was a difference in the way the two native AMF species impacted cassava plant growth in greenhouse conditions. It was shown that only *A. colombiana* significantly increased the plant growth parameters, such as foliar surface area, plant height and biomass (Table 3). It has been reported that several factors, such as environmental conditions and functional diversity, can affect nutrient exchange between the fungi and plant partners (Walder and van der Heijden, 2015). The experimental conditions used in this work might have been favorable to *A. colombiana*, which significantly improved P uptake compared to *A. appendicula*. Variable effects among endogenous single species due to the use of different culture media were also observed in other studies (Williams et al., 2012; Ortas and Ustuner, 2014). Also, the two native AMF species may differ in terms of regulation of genes involved

TABLE 5 | Impact of *A. colombiana* and *A. appendicula* single and dual inoculation on nematode communities and cassava plant growth.

Treatment	Frequency of mycorrhization (%)	Intensity of mycorrhization (%)	Egg density in the roots/g	Density of nematodes in the roots/g	Foliar P content	Biomass (g)		Phenols
					P (%dm.)	Total fresh matter (g)	Total dry matter (g)	Phenol concentration (mg EGA/l)
CO-INOCULATION WITH AMF AND NEMATODES (I2)								
Control (S0)	0 ± 0	0 ± 0	3.7 ^c ± 0.47	7 ^b ± 4.24	0.21 ^{ab} ± 0.03	46 ^{bc} ± 1.5	14.1 ^{ab} ± 0.6	95 ^{de} ± 4.7
<i>Acaulospora colombiana</i> (S1)	6.7 ^b ± 4.7	0.07 ^b ± 0.04	2 ^{ab} ± 0.0	2 ^a ± 0.8	0.21 ^{ab} ± 0.01	53.7 ^{abc} ± 2.4	15.3 ^{ab} ± 0.2	116.7 ^{cd} ± 12
<i>Ambispora appendicula</i> (S2)	13.3 ^b ± 9.4	5.5 ^b ± 3.67	2 ^{ab} ± 0.81	2.33 ^a ± 1.24	0.22 ^{abc} ± 0.00	51.5 ^a ± 5.9	17.3 ^a ± 4.4	98.3 ^{de} ± 3.6
<i>A. colombiana</i> — <i>A. appendicula</i> (S1S2)	3.3 ^b ± 4.7	0.03 ^b ± 0.04	1.7 ^a ± 0.94	2 ^a ± 0.82	0.237 ^{ab} ± 0.0	56.3 ^a ± 7.2	15.6 ^a ± 2.26	115.7 ^{cde} ± 4.5
INOCULATION WITH NEMATODES 1 MONTH AFTER AMF (I4)								
Control (S0)	0 ± 0	0 ± 0	3.3 ^{bc} ± 1.24	5.17 ^{ab} ± 1.65	0.203 ^b ± 0.01	45.1 ^c ± 3.25	11.7 ^b ± 0.22	88.5 ^e ± 4
<i>Acaulospora colombiana</i> (S1)	30 ^a ± 8.16	15.07 ^a ± 3.2	1.7 ^a ± 0.47	2.17 ^a ± 0.13	0.255 ^a ± 0.00	53.5 ^{abc} ± 1.55	15.36 ^{ab} ± 0.05	169.5 ^a ± 4
<i>Ambispora appendicula</i> (S2)	20 ^a ± 8.16	15.07 ^a ± 6.3	2 ^{ab} ± 0	2.67 ^a ± 0.47	0.213 ^{ab} ± 0.00	54.34 ^{ab} ± 4.94	14.85 ^{ab} ± 1	126 ^{bc} ± 13.8
<i>A. colombiana</i> — <i>A. appendicula</i> (S1S2)	36.7 ^a ± 9.4	21.4 ^a ± 6.08	2 ^{ab} ± 0	2.17 ^a ± 0.13	0.227 ^{ab} ± 0.01	55.5 ^a ± 3.75	17.9 ^a ± 1.13	150.17 ^{ab} ± 4.24
P and F-VALUE								
AMF	<i>p</i> = 0.002 <i>F</i> = 7.729	<i>p</i> = 0.002 <i>F</i> = 7.8	<i>p</i> = 0.006 <i>F</i> = 5.89	<i>p</i> = 0.012 <i>F</i> = 5.044	<i>p</i> = 0.47 <i>F</i> = 0.887	<i>p</i> = 0.02 <i>F</i> = 4.35	<i>p</i> = 0.045 <i>F</i> = 3.364	<i>p</i> = 0.000 <i>F</i> = 12.52
Nematodes	<i>p</i> = 0.000 <i>F</i> = 22.5625	<i>p</i> = 0.000 <i>F</i> = 41.77	<i>p</i> = 0.806 <i>F</i> = 0.0625	<i>p</i> = 0.741 <i>F</i> = 0.113	<i>p</i> = 0.97 <i>F</i> = 0.001	<i>p</i> = 0.91 <i>F</i> = 0.013	<i>p</i> = 0.5 <i>F</i> = 0.47	<i>p</i> = 0.000 <i>F</i> = 17.72
AMF × Nematodes	<i>p</i> = 0.010 <i>F</i> = 5.23	<i>p</i> = 0.004 <i>F</i> = 6.483	<i>p</i> = 0.874 <i>F</i> = 0.223	<i>p</i> = 0.785 <i>F</i> = 0.357	<i>p</i> = 0.234 <i>F</i> = 1.573	<i>p</i> = 0.92 <i>F</i> = 0.17	<i>p</i> = 0.24 <i>F</i> = 1.53	<i>p</i> = 0.033 <i>F</i> = 3.7

dm, dry matter, EGA, Equivalent Gallic Acid. All the values are means of the three replications (*n* = 3). Means with different letters were significantly different at 5% level.

TABLE 6 | Mycorrhizal frequency evolution from well-watered regime (100% of field capacity) at 1 to 2 months, to drought (10% of field capacity) at 2–4 months.

AMF frequency	1 month	2 months	3 months	4 months
<i>Acaulospora colombiana</i>	23.3 ^a ± 7.2	46.7 ^a ± 11.86	23.3 ^a ± 4.714	26.7 ^a ± 4.7
<i>Ambispora appendicula</i>	10 ^a ± 0	10 ^b ± 0	20 ^a ± 2.72	10 ^b ± 4.7
<i>A. colombiana</i> - <i>A. appendicula</i>	10 ^a ± 0	23.3 ^{ab} ± 5.44	23.3 ^a ± 7.2	16.7 ^b ± 1.3
Control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
P- and F-VALUE				
	<i>p</i> = 0.035 <i>F</i> = 4.714	<i>p</i> = 0.016 <i>F</i> = 6.377	<i>p</i> = 0.048 <i>F</i> = 4.121	<i>p</i> = 0.006 <i>F</i> = 9.067

Means with different letters were significantly different at *p* < 0.05.

in P uptake. Such observations were made when maize plants were individually inoculated with different AMF species (Tian et al., 2013). In our study, single inoculation with *A. appendicula* had no effect. Meanwhile dual inoculation with both species positively improved P uptake and cassava plant growth. Similar observations were made when citrus was treated with different AMF species using a dual inoculation approach (Ortas and Ustuner, 2014). It could mean that when used together as dual inoculants, the two native AMF species induce phosphate

transporters in cassava plants, as reported for different AMF species used to inoculate maize plants (Tian et al., 2013).

The study on the interaction between the two native AMF and *Meloidogyne* spp. in greenhouse revealed that negative effects of the AMF against the nematode (reduction of egg and nematode densities) were clearly observed, whether or not AMF and nematodes were co- or post-inoculated (1 month later). Interestingly, the presence of the nematode exerted a negative effect on the AMF, by reducing mycorrhizal intensities and frequencies in the case of simultaneous inoculation. Both types of interactions between nematode and AMF have already been reported. These mutual negative effects occur when fungi and nematodes are competing for space and nutrients (Schouteden et al., 2015). For example, the fungus *Scutellospora heterogama* exerted a biocontrol effect on the sedentary endoparasitic nematode *Meloidogyne incognita* (reproduction was reduced) only when it was pre-inoculated whereas co-inoculation had no effect (Dos Anjos et al., 2010). Such observations have also been made for migratory endoparasitic nematodes. For example, it was shown that *Radopholus similis* and *Pratylenus coffeae* affected the frequency of *Funneliformis mosseae* colonization in banana, but not the intensity (Elsen et al., 2003a,b). In contrast, root colonization by *R. irregularis in vitro* banana plantlets was not affected either by *R. similis* (Koffi et al.,

TABLE 7 | Impact of *A. colombiana* and *A. appendiculata* single and dual inoculation on cassava plant growth and physiological traits 2 months after initiation of water stress.

AMF	Foliar surface area (cm ²)		Total fresh matter		Total dry matter		Chlorophyll a (mg/g FM)		Total sugar content (μmol/mg FM)	
	Well-watered	Drought	Well-watered	Drought	Well-watered	Drought	Well-watered	Drought	Well-watered	Drought
Control (S0)	4362.67 ^b ± 496	39.4 ^c ± 50.9	218.9 ^b ± 4.2	139 ^d ± 4.6	106.74 ^c ± 6.7	88.7 ^d ± 3.6	0.17 ^{bc} ± 0.0	0.123 ^{cd} ± 0.0	518 ^a ± 43.7	562.5 ^b ± 7
<i>A. colombiana</i> (S1)	6179.9 ^a ± 608.3	145.5 ^c ± 23.2	243.53 ^a ± 14.5	180 ^c ± 8.9	149.3 ^a ± 8.32	109.07 ^c ± 9.97	0.164 ^{abc} ± 0.0	0.209 ^a ± 0.0	523.4 ^a ± 23.5	496 ^a ± 32.4
<i>A. appendiculata</i> (S2)	4872.3 ^b ± 589.3	13.3 ^c ± 17.17	231.35 ^{ab} ± 2.56	156 ^d ± 6.1	130.97 ^b ± 4.96	78.37 ^d ± 4.6	0.17 ^{bc} ± 0.01	0.078 ^d ± 0.0	480.4 ^{ac} ± 10.7	435.6 ^{abc} ± 26
<i>A. colombiana</i> — <i>A. appendiculata</i> (S1S2)	4617.3 ^b ± 419.4	52.3 ^c ± 49.5	217.03 ^b ± 12.4	153 ^d ± 11.8	109.7 ^c ± 3.3	87.87 ^d ± 8.7	0.18 ^{bc} ± 0.01	0.15 ^{bc} ± 0.01	446.5 ^{abc} ± 29.8	351.5 ^{bc} ± 25
P and F-VALUE										
AMF	<i>p</i> = 0.002		<i>p</i> = 0.000		<i>p</i> = 0.000		<i>p</i> = 0.017		<i>p</i> = 0.032	
	<i>F</i> = 5.7652		<i>F</i> = 9.970		<i>F</i> = 19.240		<i>F</i> = 4.7855		<i>F</i> = 3.769	
Water regime	<i>p</i> = 0.000		<i>p</i> = 0.000		<i>p</i> = 0.000		<i>p</i> = 0.010		<i>p</i> = 0.009	
	<i>F</i> = 763.3963		<i>F</i> = 238.107		<i>F</i> = 97.697		<i>F</i> = 8.7654		<i>F</i> = 8.748	
Strain x Water regime	<i>p</i> = 0.008		<i>p</i> = 0.492		<i>p</i> = 0.007		<i>p</i> = 0.009		<i>p</i> = 0.449	
	<i>F</i> = 4.4874		<i>F</i> = 0.838		<i>F</i> = 5.815		<i>F</i> = 5.6544		<i>F</i> = 0.928	

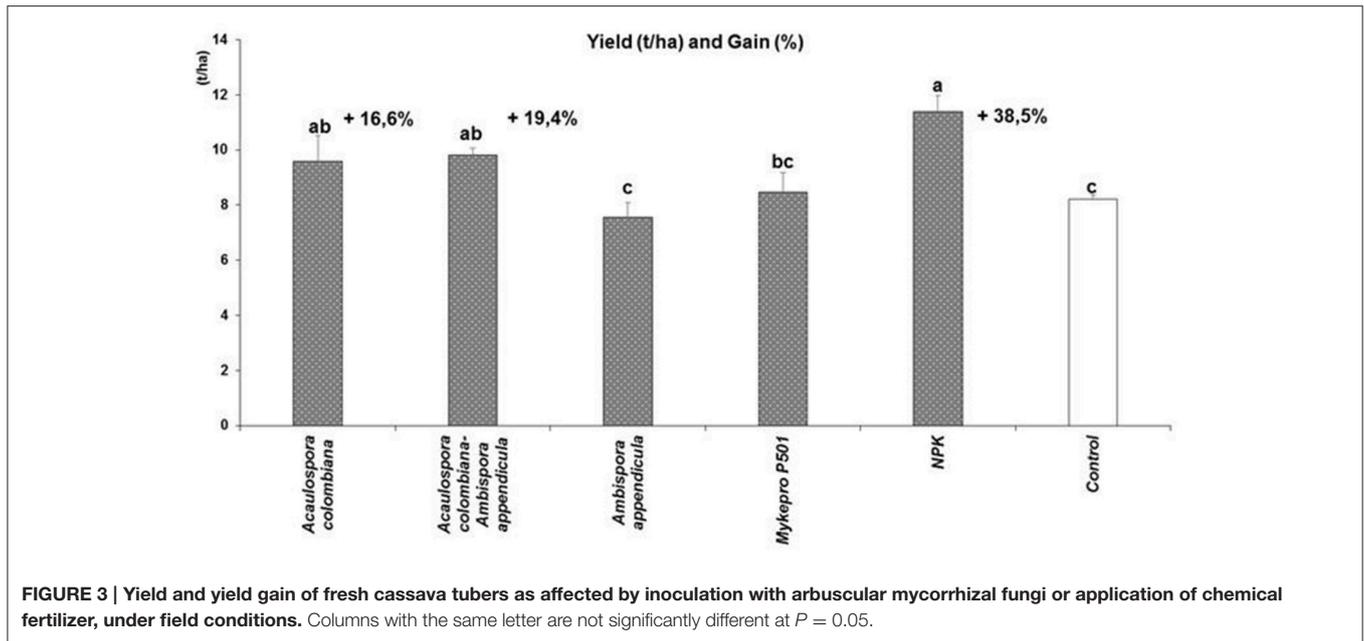
FM, Fresh matter. All the values are means of the three replications (*n* = 3). Means with different letters were significantly different at 5% level.

2013) or by *P. coffeae* in transformed carrot roots (Elsen et al., 2003c).

Overall, in the presence of these native AMF, cassava plants continued to grow even though nematodes were present. It appears that the mycorrhizal cassava plants were either resistant (e.g., suppression or reduction of the nematode reproduction) or tolerant (low or no suppression in cassava plant growth) to nematodes, as reported in other studies (Hussey and Roncadori, 1982; Affokpon et al., 2011). However, the mechanism of the bioprotection conferred to cassava plants by the native AMF against the root-knot nematode *Meloidogyne* spp. is not yet understood. It may be due to the production of phytochemical inhibitors of nematodes, as was observed elsewhere. Indeed, in this work it was observed that phenolic compounds were significantly increased in cassava plant roots when nematodes were post-inoculated. Previous work has shown production of phenolic compounds to be a plant defense mechanism against nematode attacks (Zhu and Yao, 2004; Xu et al., 2008). Elsewhere, accumulation of phenolic compounds has been observed in mycorrhizal *Impatiens balsamina*, an ornamental plant, in presence of *M. incognita* (Banuelos et al., 2014). Singh et al. (1990) concluded that the pre-inoculation of plants, coupled with biochemical changes are responsible for resistance to nematodes. In contrast, when the cassava plants were co-inoculated with the AMF and the nematodes, there was no significant increase in phenolic compounds. Obviously there may be another mechanism involved in the inhibition of *Meloidogyne* spp. activity. For example, there was an up regulation of mycorrhiza-induced plant defense genes against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* in grapevine plants pre-inoculated with *R. intraradices* (Hao et al., 2012).

Besides its capacity to promote cassava growth and enhance resistance and tolerance to the root-knot nematode, *A. colombiana* also conferred water stress tolerance to cassava plants under severe drought condition. This AMF species significantly improved cassava plant growth under water stress. It was observed that mycorrhizal frequencies decreased gradually during the period of drought for all treatments, compared to the 100% FC water regime. However, despite severe water stress, the mycorrhizal colonization frequencies of *A. colombiana* remained higher than the control and stable over time. This water stress tolerance could be the result of *A. colombiana* promoting specific plant stress resistance response during the drought period, as suggested by others (Augé, 2001). For example the presence of this AMF may enhance photosynthetic activity due to the high levels of chlorophyll a and total sugars in *A. colombiana* colonized cassava plants compared to non-mycorrhizal plants (Mathur and Vyas, 1995).

Overall, this study clearly showed the multiple functions of the native AMF species *A. colombiana*. Importantly, *A. colombiana* was dominant in all three study areas and was persistently found and easily produced in trap culture. Abundance and persistence of AMF species are very important for efficient AMF species selection to ensure potential inocula are not lost during trap culture propagation (Trejo-Aguilar et al., 2013). This is essential, as the most widespread method for inoculum propagation is the use of trap plants (Berruti et al., 2016).



Under field conditions, *A. colombiana* showed a good potential for improving cassava productivity. The dual inoculation using the two native AMF species also increased cassava yield under field conditions. This opens up the possibility of using single and dual inoculation of these two native AMF species to improve cassava productivity in the field. During this study the native inoculants performed better than the commercial inoculant. Indeed, the origin and the composition of AMF are very important factors to take into account for inoculum development (Berruti et al., 2016). It has been shown that native AMF have higher efficiency in terms of plant protection against nematode (Affokpon et al., 2011) and stress tolerance (Ruiz-Lozano and Azcón, 2000) than commercial inoculants generally used in the field. Commercial inoculants are generally comprised of AMF species that can be considered as exotic species in tropical and subtropical regions (Oliveira et al., 2005; Schreiner, 2007). One main drawback in the use of commercial inoculants is the fact that the species used might not survive the competition with local AMF communities. Rodriguez and Sanders (2015), who discussed this issue, recommended research to understand local communities through metagenomics and genetic studies. The use of native inoculants comprised of native AMF like *A. colombiana* is highly recommended as an alternative to exotic species (Oliveira et al., 2005). As a persistent and abundant generalist, *A. colombiana* may have been a good competitor under field conditions, as in the greenhouse. Moreover, since commercial inoculants can be either ineffective (Faye et al., 2013) or badly formulated (Corkidi et al., 2004), the use of *A. colombiana* is more likely to be affordable and effective for cassava farmers in tropical and subtropical regions.

In conclusion, this study clearly points out the potential of *A. colombiana* as a native AM fungus suitable for inoculating

cassava. The process developed in this study to select the multipurpose (plant growth improvement, water stress tolerance and nematode resistance) AMF species *A. colombiana* for cassava could be applied to efficiently select effective AMF inocula for other crops.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

This work is done in the scope of a project in the Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Microbienne under the supervision of ZA. SJ designed and run all the experiments as a Ph.D. student. KC helped in designing the PCR amplification protocols and sequence analyses. VR was a cosupervisor of this work as a collaborator on this project. ZA is the coordinator of the project and SJ supervisor.

FUNDING

We are grateful to the West African Agricultural Productivity Program (WAAPP) for funding the Project IVO-RHIZE (Projects 047/PPAAO/2012 and 028/CS/PPAAO/2015), within which this study was conducted. We are also grateful to this program for funding SJ scholarship and the Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) for awarding him a biotechnology mobility program.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Diederik van Tuinen for hosting SJ at the Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté 17 rue Sully BP 86510 21065 Dijon Cedex, France.

REFERENCES

- Affokpon, A., Coyne, D. L., Lawouin, L., Tossou, C., Agbèdè, R. D., and Coosemans, J. (2011). Effectiveness of native West African arbuscular mycorrhizal fungi in protecting vegetable crops against root-knot nematodes. *Biol. Fertil. Soils* 47, 207–217. doi: 10.1007/s00374-010-0525-1
- Al-karak, G. N. (2006). Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Sci. Horticult.* 109, 1–7. doi: 10.1016/j.scienta.2006.02.019
- Arnon, D. L. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant. Physiol.* 24, 1–15.
- Augé, R. M. (2001). Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3–42. doi: 10.1007/s005720100097
- Augé, R. M. (2004). Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Can. J. Soil Sci.* 84, 373–381. doi: 10.4141/S04-002
- Augé, R. M., Toler, H. D., and Saxton, A. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25, 13–24. doi: 10.1007/s00572-014-0585-4
- Bà, A. M., Plenchette, C., Danthu, P., Duponnois, R., and Guissou, T. (2000). Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit trees in Senegal. *Agroforestry Syst.* 50, 95–105. doi: 10.1023/A:1006482904452
- Banuelos, J., Alarcón, A., Larsen, J., Cruz-Sánchez, S., and Trejo, D. (2014). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Meloidogyne incognita* in the ornamental plant *Impatiens balsamina*. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 14, 63–74. doi: 10.4067/S0718-95162014005000005
- Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R., and Bianciotto, V. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. *Front. Microbiol.* 6:1559. doi: 10.3389/fmicb.2015.01559
- Burns, A., Gleadow, R., Cliff, J., Zacarias, A., and Cavagnaro, T. (2010). Cassava: the drought, war and famine crop in a changing world. *Sustainability* 2, 3572–3607. doi: 10.3390/su2113572
- Cardoso, I. M., and Kuyper, T. W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116, 72–84. doi: 10.1016/j.agee.2006.03.011
- Carretero, C. L., Cantos, M., Garcia, J. L., Azcon, R., and Troncoso, A. (2009). Growth response of micropropagated cassava clones as affected by *Glomus intraradices* colonization. *J. Plant Nutr.* 32, 261–273. doi: 10.1080/01904160802608601
- Caveness, F. E. (1982). *Root-Knot Nematodes as Parasites of Cassava*. International Institute of Tropical Agriculture, Research Briefs, Vol. 3. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture.
- Ceballos, I., Ruiz, M., Fernandez, C., Pena, R., Rodriguez, A., and Sanders, I. R. (2013). The *in vitro* mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop Cassava. *PLoS ONE* 8:e70633. doi: 10.1371/journal.pone.0070633
- Chaleard, J. L. (1988). Le manioc, la ville et le paysan Approvisionnement urbain et mutations rurales dans la région de Bouaké (Côte d'Ivoire). *Cahier Sci. Hum.* 24, 333–348.
- Colombani, J., Lamagat, J. P., and Thiebaut, J. (1973). Mesure de la perméabilité des sols en place: un nouvel appareil pour la méthode Muntz, une extension de la méthode Porchet aux sols hétérogènes. *Bull. Sci. Hydrologiques* 18, 197–235.
- Connor, D. J., Cock, J. H., and Parra, G. E. (1981). The response of cassava to water shortage, growth and yield. *Field Crop Res.* 4, 181–200.
- Corkidi, L., Allen, E. B., Merhaut, D., Allen, M. F., Downer, J., Bohn, J., et al. (2004). Assessing the infectivity of commercial mycorrhizal inoculants in plant nursery conditions. *J. Environ. Horticult.* 22, 149–154.
- Daykin, M. E., and Hussey, R. S. (1985). "Staining and histo-pathological techniques in nematology," in *An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol. II*, eds K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser (Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics), 39–48.
- Dos Anjos, É. C. T., Cavalcante, U. M. T., Gonçalves, D. M. C., Pedrosa, E. M. R., dos Santos, V. F., and Maia, L. C. (2010). Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus (*Scutellospora heterogama*) and the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on sweet passion fruit (*Passiflora alata*). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 801–809. doi: 10.1590/S1516-89132010000400008
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, P. A., Robeg, A., and Smith, F. (1956). Colometric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Elsen, A., Baimey, H., Swennen, R., and De Waele, D. (2003b). Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza-nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.) differing in nematode susceptibility. *Plant Soil* 256, 303–313. doi: 10.1023/A:1026150917522
- Elsen, A., Beeterens, R., Swennen, R., and De Waele, D. (2003a). Effects of an arbuscular mycorrhizal fungus and two plant-parasitic nematodes on *Musa* genotypes differing in root morphology. *Biol. Fertil. Soils* 38, 367–376. doi: 10.1007/s00374-003-0669-3
- Elsen, A., Declerck, S., and De Waele, D. (2003c). Use of root organ cultures to investigate the interaction between *Glomus intraradices* and *Pratylenchus coffeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4308–4311. doi: 10.1128/AEM.69.7.4308-4311.2003
- FAO (2014). *Faostat Agricultural Database-Agricultural Production*. Available online at: <http://www.fao.org>
- FAO (2013). *Save and Grow: Cassava A Guide to Sustainable Production Intensification*. Roma: FAO.
- Faye, A., Dalpé, Y., Ndong'u-Magiroy, K., Jefwa, J., Ndoye, I., Diouf, M., et al. (2013). Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inoculants. *Can. J. Plant Sci.* 93, 1201–1208. doi: 10.4141/cjps2013-326
- Gerdemann, J. W., and Nicolson, T. H. (1963). Spores of endogone species from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235–244.
- Hao, Z., Fayolle, L., van Tuinen, D., Chatagnier, O., Li, X., Gianinazzi, S., et al. (2012). Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema* index involves priming of defence gene responses in grapevine. *J. Exp. Bot.* 63, 3657–3672. doi: 10.1093/jxb/ers046
- He, X. H., Critchley, C., and Bledsoe, C. (2003). Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 531–567. doi: 10.1080/713608315
- Huang, S. P., and Cares, J. E. (2004). "Nematodes," in *Anonyme*, Echantillonnage (Méthodes), Restitution du séminaire de Embu 23 au 27 février 2004, Nairobi. Doc. 4/CSM-BGBD CI, 7.
- Hussey, R. S., and Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Dis. Rep.* 57, 1025–1028.
- Hussey, R. S., and Roncadori, R. W. (1982). Vesicular arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant Dis.* 66, 9–14.
- IITA (1990). *Le Manioc en Afrique Tropicale*. Ibadan: Un manuel de référence.
- Jatala, P. J., and Bridge (1990). "Nematode parasites of root and tuber crops," in *Nematode Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, eds M. R. Luc, A. Sikora, and J. Bridge (Wallingford: CAB International), 137–180.
- Koffi, M. C., Vos, C., Draye, X., and Declerck, S. (2013). Effects of *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 on the reproduction of *Radopholus similis* in banana plantlets grown under *in vitro* culture conditions. *Mycorrhiza* 23, 279–288. doi: 10.1007/s00572-012-0467-6
- Kormanik, P. P., and McGraw, A. C. (1982). "Quantification of vesicular arbuscular mycorrhizae in plants roots," in *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, ed N. C. Schenck (Minnesota, MN: American Phytopathological Society), 37–45.
- Kouadio, K. K. H., Dao, D., Tschannen, A., and et Girardin, O. (2010). Rentabilité comparative des systèmes de culture à base de manioc à l'Est de la Côte d'Ivoire. *J. Anim. Plant Sci.* 9, 1094–1103.
- Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C., and Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 183, 212–223. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x
- Mathur, N., and Vyas, A. (1995). Influence of VA mycorrhizae on net photosynthesis and transpiration of *Ziziphus mauritiana*. *J. Plant Physiol.* 147, 328–330. doi: 10.1016/S0176-1617(11)82161-9
- McSorley, S. K., O'Hair, J. L., and Parrado, J. L. (1983). Nematodes of cassava, *Manihot esculenta* Crantz. *Nematropica* 13, 261–287.
- Morton, J. B., Bentivenga, S. P., and Wheeler, W. W. (1993). Germ plasma in the International collection of arbuscular and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48, 491–528.
- N'Guettia, R., and Bernard, G. (1986). "Besoin en eau et production du manioc," in *Seminar of A.N.A.M.*, 25. Bouaké (CIV).
- Oliveira, R. S., Vosatka, M., Dodd, J. C., and Castro, P. M. (2005). Studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two

- native isolates in a highly alkaline anthropogenic sediment. *Mycorrhiza* 16, 23–31. doi: 10.1007/s00572-005-0010-0
- Ortas, I., Kaya, Z., and Çakmak, I. (2001). “Influence of VA-mycorrhiza inoculation on growth of maize and green pepper plants in phosphorus and zinc deficient soils,” in *Plant Nutrition - Food Security and Sustainability of Agro-Ecosystems*, eds W. J. Horst, M. K. Schenk, A. Burkert, N. Claassen, H. Flessa, W. B. Frommer, H. E. Goldbach, H. W. Olf, V. Romheld, B. Sattelmacher, U. Schmidhalter, S. Schubert, N. von Wiren, and L. Wittenmayer (Dordrecht: Kluwer Academic Publication), 632–633.
- Ortas, O., and Ustuner, O. (2014). The effects of single species, dual species and indigenous mycorrhiza inoculation on citrus growth and nutrient uptake. *Eur. J. Soil Biol.* 63, 64–69. doi: 10.1016/j.ejsobi.2014.05.007
- Osonubi, O., Atayese, M. O., and Mulongoy, K. (1995). The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation on nutrient uptake and yield of alley cropped cassava in a degraded alfisol of south western Nigeria. *Biol. Fert. Soils.* 20, 70–76.
- Oyetunji, O. J., Ekanayake, I. J., and Osonubi, O. (2007). Chlorophyll fluorescence analysis for assessing water deficit and Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) inoculation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Adv. Biol. Res.* 1, 108–117.
- Oyetunji, O. J., and Osonubi, O. (2007). Assessment of influence of alley cropping system and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on cassava productivity in derived savanna zone of Nigeria. *World J. Agric. Sci.* 3, 489–495.
- Phillips, J. M., and Haymann, D. S. (1970). Improved proceeding for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *T. Brit. Mycol. Soc.* 69, 275–280.
- Plenchette, C., Clermont-dauphin, C., Meynard, J. M., and Fortin, J. A. (2005). Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Can. J. Plant Sci.* 85, 31–40.
- Porcel, R., Aroca, R., and Ruiz-Lozano, J. M. (2011). Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32, 181–200. doi: 10.1007/s13593-011-0029-x
- Pozo, M. J., and Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 393–398. doi: 10.1016/j.pbi.2007.05.00
- Rodriguez, A., and Sanders, I. R. (2015). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *ISME J.* 9, 1053–1061. doi: 10.1038/ismej.2014.207
- Ruiz-Lozano, J. M., and Azcón, R. (2000). Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza* 10, 137–143. doi: 10.1007/s005720000075
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sanchez, P. A. (2002). Soil fertility and hunger in Africa. *Science* 295, 2019–2020.
- Schenck, N. C., and Perez, Y. (1990). *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi*. Gainesville: Synergistic Publications.
- Schouteden, N., De Waele, D., Panis, B., and Vos, C. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms involved. *Front. Microbiol.* 6:1280. doi: 10.3389/fmicb.2015.01280
- Schreiner, R. P. (2007). Effects of native and non-native arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of ‘Pinot noir’ (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. *Appl. Soil Ecol.* 36, 205–215. doi: 10.1016/j.apsoil.2007.03.002
- Schüßler, A. H., Gehrig, H., Schwarzott, D., and Walker, C. (2001). Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycol. Res.* 105, 5–15. doi: 10.1017/S0953756200003725
- Sidney, W. (1984). “Methods of soil analysis,” in *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14th Edn., ed S. W. Arlington. (Virginia: AOAC), 8–37.
- Sieverding, E. (1989). Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agricult. Ecosys. Environ.* 29, 369–390.
- Singh, Y. P., Singh, R. S., and Sitaramalah, K. (1990). “Mechanism of resistance of mycorrhizal tomato against root-knot nematodes in Trends in Mycorrhizal Research,” in *Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza*, eds B. L. Jalali and H. Chand (Karnal: Haryana Agriculture University), 96.
- Singleton, V. L., Ortofer, R., and Lamuela-Raventos, R. M. (1999). “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent,” in *Methods in Enzymology*, ed L. Packer (Orlando: Academic Press), 152–178.
- Smith, S. E., and Read, D. J. (2008). “Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants,” in *Mycorrhizal Symbiosis, 3rd Edn.*, eds S. E. Smith and D. J. Read (London: Academic Press), 145–148.
- St-Arnaud, M., and Vujanovic, V. (2007). “Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests,” in *Mycorrhizae in Crop Production: Applying Knowledge*, eds C. Hamel and C. Plenchette (Binghamton, NY: Haworth), 188.
- Stockinger, H., Krüger, M., and Schüssler, A. (2010). DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 187, 461–474. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x
- Stockinger, H., Walker, C., and Schüßler, A. (2009). ‘*Glomus intraradices* DAOM197198’, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 183, 1176–1187. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02874.x
- Tchabi, A. (2008). *Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Sub-Saharan Savannas of Benin and their Association with Yam (Dioscorea spp.): Potential of Yam Growth Promotion and Deduction of Nematode Infestation*. Thèse de doctorat. Université de Basel.
- Tian, H., Drijber, R. A., Li, X., Miller, D. N., and Wienhold, B. J. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi differ in their ability to regulate the expression of phosphate transporters in maize (*Zeamays* L.). *Mycorrhiza* 23, 507–514. doi: 10.1007/s00572-013-0491-1
- Trejo-Aguilar, D., Lara-Capistrán, L., Maldonado-Mendoza, I. E., Zulueta-Rodríguez, R., Sangabrie-Conde, W., Mancera-López, M. E., et al. (2013). Loss of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in trap cultures during long-term subculturing. *IMA Fungus* 4, 161–167. doi: 10.5598/imafungus.2013.04.02.01
- Trouvelot, A., Kough, J. L., and Gianinazzi-Pearson, V. (1986). “Mesure du taux de mycorrhization VA d’un système racinaire. Recherche de méthodes d’estimation ayant une signification fonctionnelle,” in *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, eds V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (France: INRA Paris), 217–221.
- van Tuinen, D., Zhao, B., and Gianinazzi-Pearson, V. (1998). “PCR in studies of AM fungi: from primers to application,” in *Mycorrhiza Manual*, eds A. K. Varma (Heidelberg: Springer-Verlag), 387–399.
- Veresoglou, S. D., and Rillig, M. C. (2012). Suppression of fungal and nematode plant pathogens through arbuscular mycorrhizal fungi. *Biol. Lett.* 8, 214–216. doi: 10.1098/rsbl.2011.0874
- Walder, F., and van der Heijden, M. G. A. (2015). Regulation of resource exchange in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nat. Plants* 1, 15159. doi: 10.1038/nplants.2015.159
- Williams, A., Ridgway, H., and Norton, D. (2012). Different arbuscular mycorrhizae and competition with an exotic grass affect the growth of *Podocarpus cunninghamii* Colenso cuttings. *New For.* 44, 183–195. doi: 10.1007/s11056-012-9309-9
- Xu, X., Qin, G., and Tian, S. (2008). Effect of microbial biocontrol agents on alleviating oxidative damage of peach fruit subjected to fungal pathogen. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 153–158. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.019
- Zhu, H. H., and Yao, Q. (2004). Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. *J. Phytopat.* 152, 537–542. doi: 10.1111/j.1439-0434.2004.00892.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Séry, Kouadjo, Voko and Zézé. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.