

Essaie de caractérisation des souches des endomycorhizes symbiotes des bananiers et bananiers plantains (*Musa* sp.) de la région de Kisangani (RDC)

[Test for characterization of symbionts endomycorrhizas strains of banana and plantain (*Musa* sp.) in the Kisangani region (DRC)]

Crispin B. Lebisabo¹, Joseph G. Adheka², Didy O. Onautshu², G. Hassert³, and Benoît D. Dhed'a²

¹Centre de Surveillance de la Biodiversité, Université de Kisangani, B.P. 2012, RD Congo

²Faculté des Sciences, Université de Kisangani, B.P. 2012, RD Congo

³Faculty of Bioscience engineering, Ghent University, RD Congo

Copyright © 2019 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The production of bananas and plantains is practiced on a large scale now as a result of the strong demand on the market, a consequence of the strong demographic pressure in the big cities.

A great deal of research is being conducted in the use of symbiotic systems associating plant species with mycorrhizal fungi. Mycorrhizae give host plants the ability to grow in soils that are low in minerals.

As mycorrhizae are little known in our environment and few studies have been done on their biodiversity, their counting and their macroscopic and microscopic characterizations, this study seeks to identify and characterize these mycorrhizal strains in symbiosis with banana and plantain from the Kisangani University simi- simi experimental site. The staining technique of the roots made it possible to detect the mycorrhizas under banana and plantain.

The results of this study revealed that the overall degree of mycorrhization ranged from 20 to 80% and classified the spores to 4 families and 5 identified genera.

KEYWORDS: Banana tree, mycorrhizal fungus, spores.

RÉSUMÉ: La production des bananes et bananes plantains est pratiquée en grande échelle actuellement suite à la forte demande sur le marché, conséquence de la forte pression démographique dans les grandes villes.

Nombreuses recherches sont actuellement menées dans le cadre de l'utilisation de systèmes symbiotiques associant des espèces végétales aux champignons mycorrhiziens. Les mycorhizes confèrent aux plantes hôtes l'aptitude à se développer dans des sols pauvres en éléments minéraux.

Comme les mycorhizes sont peu connus dans nos milieux et peu d'études ont été faites sur leurs biodiversités, leurs dénombrements et leurs caractérisations macroscopiques et microscopiques, cette étude cherche à identifier et à caractériser ces souches mycorrhiziennes en symbiose avec les bananiers et les bananiers plantains du site expérimental de Simi-simi de l'Université de Kisangani. La technique de coloration des racines a permis de détecter les mycorhizes sous bananiers et bananiers plantains.

Les résultats de cette étude ont révélé que le degré global de mycorrhization a varié de 20 à 80% et la caractérisation phénotypique a classé les spores en 4 familles et 5 genres.

MOTS-CLEFS: Bananier, champignon mycorrhizien, spores.

1 INTRODUCTION

La production des bananes et bananes plantains est une activité agricole de longue date.

De ce fait, elle est aujourd'hui pratiquée à grande échelle suite à la forte demande sur le marché, conséquence de la forte pression démographique dans les villes et les prix qui ne font qu'augmenter.

Depuis quelques décennies, les systèmes agricoles en Afrique en général et en République Démocratique du Congo en particulier sont soumis à d'énormes perturbations climatiques [3].

Sur le plan climatique, il s'en suit une diminution significative des précipitations et un prolongement des saisons sèches. Ainsi, les agriculteurs sont confrontés à une sécheresse persistante qui se caractérise soit par une diminution de la durée de la saison pluvieuse, soit par l'intervention de périodes sèches plus ou moins longues au cours d'une saison pluvieuse [8].

Les conséquences sur le plan agricole sont la baisse des rendements des cultures et de la fertilité des sols. Cette baisse de la fertilité s'explique, en partie, par une faible restitution au sol de la matière organique d'origine animale ou végétale et par les effets néfastes du déficit pluviométrique sur la microflore et la microfaune de la rhizosphère.

Pour remédier à cette situation, des recherches sont menées dans le cadre de l'utilisation de systèmes symbiotiques associant des espèces végétales aux champignons mycorhiziens. Les champignons mycorhiziens appartenant à la classe des Zygomycètes et à l'ordre des Glomales sont des micro-organismes du sol présents chez la plupart de taxa végétaux et dans 67 % des familles végétales [8]. Leur importance réside dans le fait qu'ils confèrent aux plantes hôtes l'aptitude à se développer dans des sols pauvres en éléments minéraux.

Les champignons mycorhiziens à vésicule et arbuscules sont des micro-organismes qui forment à l'état naturel une association symbiotique avec les racines de nombreux végétaux [12]. Cette symbiose se traduit par l'apparition d'organes mixtes mycélium-racine appelés mycorhizes [8] dont le rôle majeur est de prélever et de transporter vers la plante des éléments nutritifs très peu mobiles dans le sol, principalement le phosphore [11] pour gagner un peu de carbone de la plante. De nombreuses études ont démontré que les associations mycorhiziennes pouvaient jouer un rôle significatif dans :

- La décomposition et la minéralisation des matières organiques végétales et la mobilisation des nutriments au bénéfice de la plante hôte [7] qui se traduisent par des gains de biomasse souvent importants [5] ainsi que le transfert plante-plante de l'azote de la fixation symbiotique [9] ;
- L'amélioration de la nutrition hydrique des plantes via les hyphes mycorhiziens [1]
- La pression sélective exercée sur les microorganismes saprophytes du sol tant au niveau de leur diversité génétique que de leur diversité fonctionnelle afin de constituer un complexe trophique associant le symbiote, la microflore mycorhizosphérique et la plante [2] ;
- La protection de la plante en agissant directement sur les facteurs d'agression (pathogènes et herbivores surtout) ou en stimulant les défenses végétales [15].

Ces symbioses protectrices déterminent le succès écologique des plantes ; elles modifient les communautés végétales et les réseaux trophiques [14]. Il a été démontré récemment que les exsudats des racines des bananiers mycorhizés conféraient une résistance à la plante face aux attaques de *Radopholus similis* [18]. Mentionnons en outre que les champignons produisent des vésicules de stockage dans les racines et des spores asexuées sont différenciées dans le sol et parfois dans les racines ; elles servent d'organes de propagation et de survie [2].

Il est intéressant de noter à ce propos que la présence des spores de mycorhizes dans un sol donné est un indicateur de la fertilité potentielle ainsi que de la santé de ce sol. Voyons à présent un autre indicateur de notre outil, « la productivité », qui est déterminante au regard de l'analyse de la durabilité des systèmes de culture à base de plantains.

Les mycorhizes demeurent encore peu connus dans nos milieux et peu d'études ont été faites sur leur biodiversité, leurs dénombrements, leurs caractérisations macroscopiques et microscopiques, la performance de leurs souches pour les cultures envisagées et sur leurs productions en masse. Nous essayerons de générer des meilleures connaissances sur la détection et le dénombrement des souches mycorhiziennes associées aux bananiers et bananiers plantains du site expérimental de Simi-simi de l'Université de Kisangani.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le prélèvement du sol s'effectue à une profondeur de 25 cm et à des points entre à 10 cm de la tige des bananiers et bananiers plantains visés.

Pour l'étude des mycorhizes, les fines racines des bananiers et bananiers plantains sont collectées pour la coloration au bleu trypan.

Les échantillons de sol et des racines prélevées sont transportés dans des sachets stériles et étiquetés et acheminés au laboratoire dans le but de travailler sur sol frais ou de les conserver dans le réfrigérateur (4°C). Le séchage des échantillons tue une partie de la microflore et rend impossible la détermination de la biomasse microbienne. Un stress hydrique peut aussi perturber les mesures biologiques [4].

La détection des mycorhizes est effectuée selon la technique de coloration des racines décrite par [16]. Les racines sont lavées avec de l'eau. Les plus fines sont découpées en des fragments d'environ 1 cm et chauffées dans le bain mari pendant 30 minutes avec une solution de potasse (KOH) de 10%.

Après un rinçage à l'eau distillée, les racines devenues claires sont acidifiées avec du HCl à 1% pendant 10 minutes. Ils sont de nouveau rincés à l'eau distillée, puis colorés avec la solution de bleu trypan et enfin rincées de nouveau avec de l'eau distillée. Le bleu trypan colore les structures des mycorhizes qui ont colonisé les racines et les racines non mycorhizées ne sont pas colorées.

Les fragments des racines sont placés entre lames et lamelles, en présence de glycérol pour les observations microscopiques.

Pour chaque échantillon, 10 fragments sont montés entre lames et lamelles pour les observations à l'objectif 40X.

2.1 OBSERVATION DES SPORES

La technique consiste à prélever le sol à une profondeur de 15 à 20 cm au pied de la plante.

Au laboratoire, le principe consiste à peser 100g de sol dans un bécher, ajouter de l'eau de robinet et agiter vigoureusement puis laisser reposer pendant 20 secondes, filtrer dans un tamis de 1 mm et rejeter les déchets. Agiter le mélange de nouveau, laisser reposer pendant 20 minutes et filtrer par un tamis de 45µm. Récupérer les débris avec le jet d'eau dans un bécher de 100 ml et le répartir dans un tube. Centrifuger les tubes pendant 2 minutes à 2000 tr/mn (4°C). Le surnageant est rejeté et les tubes sont remplis de la solution de sucre et centrifuger de nouveau pendant 20 secondes à 2000 tr/minute. Le surnageant est filtré par un tamis de 45 µm et à l'aide d'un jet d'eau, récupérer le débris dans une boîte de Pétri pour observation au microscope [21]. Les spores plus petites sont perdues, mais elles sont souvent très peu nombreuses [19].

2.2 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES SPORES

Pour cette étude, la description morphologique nous a permis de classer les mycorhizes suivant les caractéristiques ci-après :

- L'arrangement des spores : isolées ou en sporocarpes dans le sol ;
- La forme de la spore : ovoïde, allongée ou sans une forme précise ;
- La taille de la spore : grosse ou petite ;
- La couleur de la spore : rougeâtre, jaunâtre, noirâtre ou pourpre ;
- La paroi sporale : les spores peuvent avoir aussi une ou plusieurs couches sporales qui varient par leur épaisseur, leur structure et leur apparence.
- Le contenu de la spore : les spores contiennent des lipides et autres composés
- La germination de la spore : ce mécanisme peut être utilisé pour distinguer les spores.
- La détermination des familles et genres des spores s'est effectuée à l'aide d'une clé d'identification qui les classe suivant la germination des spores [6].

3 RESULTAT ET DISCUSSION

INFECTION DES RACINES PAR LES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS

Tous les champignons mycorhiziens ont pu coloniser de jeunes racines des bananiers et bananiers plantains. La pénétration du partenaire fongique dans la racine de la plante hôte commence toujours par la formation d'un appressorium (lieu de rencontre entre la racine et le champignon). Elle se poursuit par la pénétration des hyphes à l'intérieur de la racine et peut présenter parfois des connexions en H qui pénètrent d'une cellule à l'autre mais empruntent aussi les méats intercellulaires. Ces hyphes forment de fois dans les cellules corticales les plus internes des arbuscules endocellulaires ramifiées dichotomiquement ou des spores intra-racinaires (Figure 1.1). Le mycélium du champignon colonise également la rhizosphère de la plante hôte pour donner naissance à des spores extra-racinaires (Figure 1.2). Des vésicules (Figure 1.3.) intra et extracellulaires en position intercalaire sur l'hyphes sont observées dans les assises superficielles de cortex des racines infectées.

- L'intensité globale de mycorhization observé varie de 20 à 80 %

Le degré de la colonisation des racines des bananiers et bananiers plantains par les champignons mycorhiziens est présenté par la figure ci-dessous.

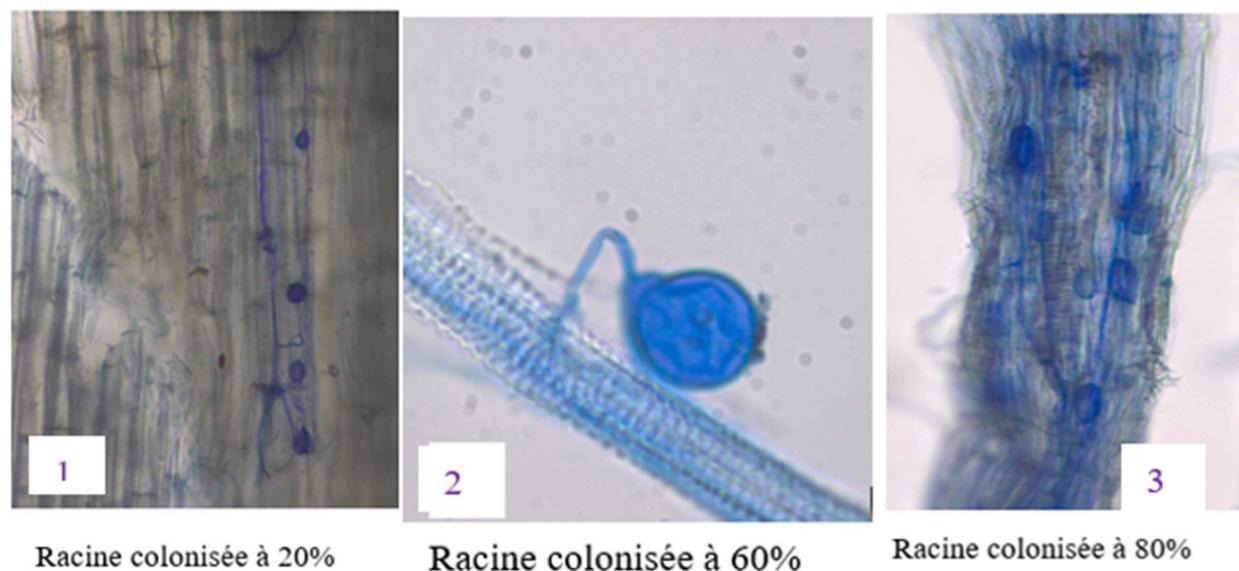


Fig. 1. Racines colorées et présente la mycorhization allant de 20% à 80%

Notons que pendant notre recherche, parmi les échantillons récoltés, certaines racines n'étaient pas mycorhizées. [10] a trouvé l'intensité globale de mycorhization calculée de 28.8 % avec 29% de ses échantillons non mycorhizés. Par contre, les autres échantillons plus mycorhizés ont été ceux des échelles de 5 (17%), 1 (16%), 3 (15%), 2 (12.5%) et 4 (10.5%) ce qui est inférieur au résultat de cette étude.

LES FAMILLES ET GENRES DES SPORES MYCORHIZIENNES IDENTIFIÉS

Cette étude a permis de distinguer 4 familles et 5 genres. Les familles répertoriées sont : Glomeraceae, Acaulosporaceae, Scutellosporaceae et Gigasporaceae. En ce qui concerne les genres, nous avons *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora a*, *Scutellospora b* et *Gigaspora*.

Ces familles et genres sont décrits dans les paragraphes qui suivent.

1. Famille des Glomeraceae (Genre *Glomus*)

C'est le type de spores le plus abondant qui a une grande diversification et une large répartition dans beaucoup d'habitats dans la nature. Leurs couleurs varient du jaune au rouge foncé.

Elles ont l'hyphe d'attachement qui est soit droit, courbé ou bifurqué, caractéristique spécifique.

Les spores sont souvent réunies autour d'un plexus hyphal stérile pour former des grappes ou sporocarpes non compactes. La germination des spores se fait par l'émergence d'un nouvel hyphe au travers de la lumière de l'hyphe suspenseur.

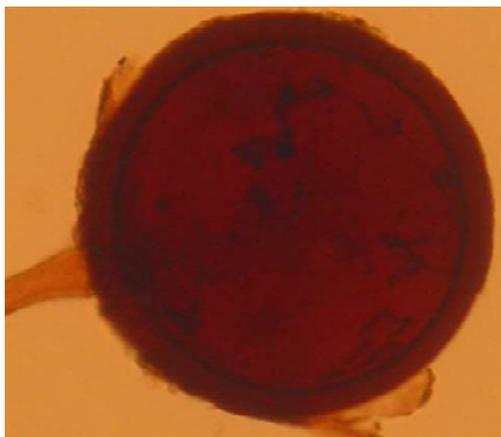


Fig. 2. Spores du genre *Glomus*

2. Famille Acaulosporaceae (Genre *Acaulospora*)

Elles sont sessiles dès leur formation d'où le nom d'*Acaulospora* (Acaulo : sans queue, et spora : spore).

Très rare, ce genre de spores est formé individuellement dans le sol et présente une grande taille avec une forme globuleuse ou sub-globuleuse.

Les spores présentent une grande consistance interne faisant apparaître une paroi épaisse.

Elles ne présentent pas d'hyphe d'attachement. Les spores sont sphériques à ovoïdes, hyalines à jaune. Elles ont un aspect luisant du fait de la présence de corps globulaires hyalins et sont reliées latéralement à des saccules sporifères en position terminale (Figure 3).

La paroi sporale comporte deux couches : une couche interne hyaline et mince et une couche laminée jaune pâle.



Fig. 3. Spore du genre *Acaulospora*

3. Famille Scutellosporaceae (Genre *Scutellospora*)

Ce genre, distingué de celui de *Gigaspora* par [19], a été observé sous le bananier. Les spores sont solitaires, blanc crème à jaune pâle. Elles possèdent deux parois: une paroi sporale externe avec deux couches jointives et une paroi interne hyaline avec deux couches membranaires. La couche pariétale externe est ornementée de verrues. La couche laminée de la paroi externe est brunâtre. Sur les spores provenant d'une extraction directe, les couches flexibles de la paroi sporale sont fortement accolées et donc difficiles à distinguer. Le bouclier de germination ovoïde et hyalin montre des marges dentelées et des circonvolutions renflées aux extrémités. L'hyphe suspenseur bulbeux est large. Les spores sont formées individuellement (pas de sporocarpes) avec une forme globuleuse, de couleur jaune pâle à jaune marron et une grande taille, avec un contenu très riche en réserves lipidiques sous forme de gouttelettes.

L'hyphe d'attachement est élargi à la sortie de la spore et effilé par la suite.



Fig. 4. Spore du genre *Scutellospora*

4. Famille Gigasporaceae (Genre *Gigaspora*)

Les spores sont solitaires, sphériques à ovoïdes, jaunes à orange clair. Une seule spore se forme en position terminale sur le bulbe suspenseur. La paroi unique de la spore comporte trois couches : une couche interne lisse, une couche intermédiaire laminée et une couche plissée totalisant. La couche externe est jaunâtre à brunâtre. Il est caractérisé par des spores ont de parois internes non flexibles. Les tubes de germination proviennent d'une couche verruqueuse en contact avec le cytoplasme de la spore. Ce genre a été rencontré à Simi-simi et peu représenté.

Une des spores de ce genre illustrée par la figure 5 ci-dessous.

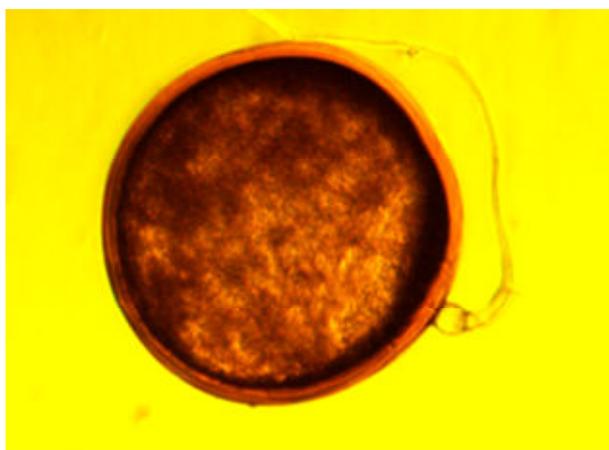


Fig. 5. Spore du genre *Gigaspora*

4 CONCLUSION

L'exploration de la biodiversité mycorhizienne de la région de Kisangani par les caractères morphologiques de leurs spores a abouti à l'identification de quatre genres des souches natives de la région. Les échantillons de spores collectées sont morphologiquement comparables aux genres décrits dans la littérature. Certaines différences morphologiques sont cependant observées dans les mêmes genres quant aux formes, aux grandeurs et aux couleurs.

La reconnaissance et l'interprétation des structures subcellulaires des spores ne sont pas toujours aisées à cause du caractère polyphylétique de ce genre.

La description des spores provenant d'échantillons de sol recueillis aux pieds des bananiers plantains était rendu possible à travers l'extraction par tamisage humide par sucrose.

Il est impérieux de connaître les caractéristiques des spores de nos milieux et établir une diagnose appropriée et fiable, puis procéder à une étude comparative entre les spores collectées au champ et les spores obtenues après piégeage sur les plantes hôtes.

La description morphologique comparée à la description d'origine des espèces répertoriées ne nous a pas permis de classer certaines spores. D'où une étude approfondie sur le plan moléculaire s'avère nécessaire.

Partant des résultats obtenus il apparaît intéressant d'identifier les champignons mycorhiziens afin de les impliquer dans divers domaines à savoir l'agriculture grâce à la bio-fertilisation des sols pauvres en éléments nutritifs. Ces associations mycorhiziennes interviennent dans la protection des cultures contre les pathogènes tels que les Nématodes.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Dr. Ir. Geert HAESART, professeur à l'université de Gent en Belgique pour avoir disponibilisé son laboratoire pour notre formation. Nous remercions aussi le Professeur Rony SWENNEN, de l'Université Lovanium de Belgique pour ses conseils combien louables pour notre formation. Nous exprimons notre reconnaissance à la coopération Flamande, VLIRU-OS pour leurs soutiens financiers.

REFERENCES

- [1] Augé, R.M., 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11, 3-42.
- [2] Duponnois, R., Bâ, A.M., Prim, Y., Baudouin, E., Galiana, A., Dreyfus, B., 2010. Les champignons mycorhiziens : une composante majeure dans les processus biologiques régissant la stabilité et la productivité des écosystèmes forestiers tropicaux : le projet majeur africain de la Grande Muraille verte, 421-440.
- [3] FAO, 2008. Rapport de la 33^{ème} session annuelle du comité de la sécurité alimentaire mondiale, 13-15 juin, Rome, 125 p.
- [4] Fardoux, J, Fernades P, Niane-Badiane A, Chotte JL, 2000. Effet du Séchage d'échantillons d'un sol ferrugineux tropical sur la détermination de la biomasse microbienne. Comparaison de deux méthodes biocidales de référence. *Étude et gestion des sols* 7 (4), numéro spécial : 385- 394.
- [5] Fogain, R., 2001. Nematodes and weevil of bananas and plantains in Cameroon: occurrence, importance and host susceptibility. *International Journal of Pest Management* 47(3): 201-205.
- [6] Gerdemann, J.W.; Trappe, J.M. 1974. The Endogonaceae in the Pacific North West. *Mycologia Memoirs*. 5:1-76
- [7] Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W., 2003. *Le sol vivant*, Ed. Lausanne ISB, 568p.
- [8] Issa M. S., 2012. Changements climatiques et agrosystèmes au Bénin central : Impacts et stratégies d'adaptation. Thèse de doctorat unique de Géographie, université d'Abomey-Calavi, Laboratoire Pierre PAGNEY Climat, Eau, Ecosystèmes et Développement (LACEEDE), 273 p.
- [9] Jalonen, R., Nygren, P., Sierra, J. 2009. Transfer of nitrogen from a tropical legume tree to an associated fodder grass via root exudation and common mycelial networks. *Plant, Cell and Environment* 32:1366-1376.
- [10] Kasaka L. (2017) : Importance et diversité des mycorhizes sous culture de bananier plantain dans les systèmes de culture avec brulis et sans brulis en région forestière de Kisangani (Province de la Tshopo, R.D. Congo), Mémoire de *Master (D.E.S, D.E.A)*, F.S, Unkis78 p.
- [11] Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L., 2008. *Plant physiological ecology*. 2nd ed. Springer, Berlin.
- [12] Mosse, B., 1956. Fructifications of an Endogone species causing endotrophic mycorrhiza in fruit plants. *Ann Bot* 20:349-362.
- [13] Morton J.B., 1993. Problems and solutions for the integration of Glomalean taxonomy, systematic, biology and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza*, 2: pp. 97-109.
- [14] Selosse, M.A, Baudoin, E, Vandenkoornhuysse, P, 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants C. R. *Biologies* 327 (2004) 639-648.
- [15] Selosse, M.-A., Gilbert, A., 2011. Des champignons qui dopent les plantes. *La Recherche* 457: 72-75.
- [16] Phillips, J.M. and Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- [17] Schenck, N.C. and Perez, Y. 1987. *Manual for Identification of VAM Fungi*. Synergistic Pub., Gainesville.
- [18] Vos, C., Van Den Broucke, D., Mbongo Lombi, F., De Waele, D., Elsen, A., 2012. Mycorrhiza-induced resistance in banana acts on nematode host location and penetration. *Soil Biology and Biochemistry* 47, 60-66.
- [19] Walker, C.; Sanders, F.E. 1986. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon*. 27:169-182
- [20] Walker C., Vestberg M. and Schüßler A. 2007a. Nomenclatural clarifications in Glomeromycota. *Mycol. Res.* 111: 253-255.
- [21] Zézé A., Ouattare B., Brou C.Y., Van tuinen D., Diallo Ottah H., & Sangare A., 2007. Distribution et Abondance de spores de Champignons endomycorhizogènes à Arbuscules dans différents types des forêts de la tanne à Côte d'Ivoire ; Centre National de la Recherche Agronomique, 9p.