

Université de La Réunion
Faculté des Sciences

Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique
pour le Développement
Département des Cultures Annuelles
CIRAD - CA

Diplôme de Maîtrise
Spécialité : Chimie et Biologie Végétales

**Etude des effets allélopathiques du kikuyu
(*Pennisetum clandestinum* Hochst.) sur la tomate
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) et deux plantes
adventices : *Cyperus rotundus* L. et *Bidens pilosa* L.**

Travaux dirigés par Roger MICHELLON
du 26 mai au 30 juillet 1993

Laurence HUMEAU

Mémoire soutenu le 6 Août 1993
devant la commission d'examen :

M. F. CADET
M. J. FIGIER
M^{me} J. SMADJA
M. B. VIDAL

Université de La Réunion
Faculté des Sciences

Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique
pour le Développement
Département des Cultures Annuelles
CIRAD - CA

Diplôme de Maîtrise
Spécialité : Chimie et Biologie Végétales

Etude des effets allélopathiques du kikuyu
(*Pennisetum clandestinum* Hochst.) sur la tomate
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) et deux plantes
adventices : *Cyperus rotundus* L. et *Bidens pilosa* L.

Travaux dirigés par Roger MICHELLON
du 26 mai au 30 juillet 1993

Laurence HUMEAU

Mémoire soutenu le 6 Août 1993
devant la commission d'examen :

M. F. CADET
M. J. FIGIER
M^{me} J. SMADJA
M. B. VIDAL

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué au sein du centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) des Colimaçons, La Chaloupe Saint-Leu, dans le cadre du programme d'étude sur l'utilisation des couvertures végétales du sol dans les systèmes de culture.

A la station CIRAD-CA des Colimaçons,

je tiens à remercier mon maître de stage, Monsieur Roger MICHELLON, de m'avoir accueillie dans son équipe en réunissant les meilleures conditions pour que s'effectue mon travail. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a accordé en me laissant la liberté qui a rendu ce travail plaisant à chaque instant.

Je remercie Ludovic, David, Florence et Sylvie pour leur sympathie et leur aide et aussi l'ensemble du personnel de la station.

Je remercie également,

Monsieur Frédéric DEMARNE (CIRAD La Bretagne) et Madame Claude ROUCH (Université de La Réunion) de m'avoir accordé un peu de leur temps pour me faire bénéficier de leur expérience, de leurs conseils, et sans qui l'analyse chromatographique n'aurait pas eu lieu. Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur Sylvain PERRET (CIRAD La Bretagne) pour ses précieuses remarques et pour avoir consacré un temps à la mise en place de la sonde thermique dans la serre, sans oublier Monsieur Grégoire VINCENT pour sa sympathie et l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

Toute ma reconnaissance est également adressée à l'ensemble des professeurs et enseignants qui, durant ce cycle universitaire, m'ont permis d'acquérir les connaissances nécessaires à la mise en œuvre de ce stage.

Je remercie mes parents, mon frère, ma famille et toutes les personnes qui m'entourent pour leur présence et leur soutien.

Je tiens à remercier tout particulièrement Thierry, qui a été sans cesse présent, malgré son travail personnel et m'a grandement soutenu dans le mien.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION 1

Première partie - MISE EN ÉVIDENCE DU PHÉNOMÈNE D'ALLÉLOPATHIE CHEZ LE KIKUYU

I - LE PHÉNOMÈNE D'ALLÉLOPATHIE 2

- 1) Définition
- 2) Les substances allélopathiques

II - CHOIX DES PLANTES ÉTUDIÉES 4

- 1) plante de couverture
- 2) culture maraîchère
- 3) adventices

III - MÉTHODES D'ÉTUDES 5

1) Effets allélopathiques du kikuyu
sur la germination des plantes 6

1. 1. Protocole
1. 2. Plantes étudiées et mesures effectuées
1. 3. Résultats

2) Effets allélopathiques du kikuyu
sur la croissance des plantes 11

2. 1. EFFETS ALLÉLOPATHIQUES
PAR SES EXSUDATS RACINAIRES 11

2. 1. 1. Protocole
2. 1. 2. Plantes étudiées et mesures effectuées
2. 1. 3. Résultats

2. 2. EFFETS ALLÉLOPATHIQUES PAR LESSIVAGE
DE PARTIES AÉRIENNES 16

2. 2. 1. Protocole
2. 2. 2. Plantes étudiées et mesures effectuées
2. 2. 3. Résultats

3) Conclusion 19

**Deuxième partie - ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DE JUS DE
MACÉRATION DE DIFFÉRENTES PARTIES DU KIKUYU.**

I - <u>MÉTHODES D'OBTENTION DES JUS</u>	20
II - <u>PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS</u>	20
III - <u>MÉTHODE D'ANALYSE DES CONSTITUANTS HYDROSOLUBLES DU KIKUYU PAR DOSAGE EN HPLC</u>	20
1) Préparation de la solution de référence	
2) Préparation des solutions échantillons	
3) Appareillage et conditions chromatographiques	
IV - <u>RÉSULTATS</u>	21
CONCLUSION	24
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

INTRODUCTION

Grâce au plan d'aménagement des Hauts de l'île de la Réunion, l'agriculture des Hauts de l'Ouest se diversifie et s'oriente vers la polyculture élevage. Depuis 1984, un programme de recherche-développement a été mis en place par le CIRAD des Colimaçons pour surmonter la crise grave subie par les exploitations de géranium. Cette crise est consécutive à la monoculture et ses effets néfastes, mais également conjuguée à un problème économique de baisse du prix de l'huile essentielle. Un des aspects du programme s'applique aux cultures avec couvertures végétales permanentes du sol. Plusieurs types de couvertures peuvent être utilisés, légumineuses ou graminées dont le kikuyu, objet de notre étude.

Des observations sur le terrain ont montré que dans une couverture de kikuyu, la présence d'adventices est sensiblement diminuée. Afin de mettre en évidence ce pouvoir "herbicide" (inhibition totale ou partielle de la croissance des plantes voisines), FONTAR et THOMAS (1992) ont étudié ces interactions *in situ* et en cultures "hors sol" sur plusieurs plantes cultivées et mauvaises herbes, révélant les effets inhibiteurs du kikuyu.

Dans une première partie, profitant de données bibliographiques, nous tenterons de définir succinctement le phénomène d'allélopathie, avant d'envisager une étude expérimentale qui complétera et confirmera les travaux de FONTAR et THOMAS (1992) relatifs aux interactions entre le kikuyu et d'autres plantes.

Une seconde partie sera consacrée à une analyse chromatographique de jus de macération de kikuyu, en référence aux études de CHOU *et al.* (1989), permettant de déceler certains composés allélopathiques.

MISE EN ÉVIDENCE DU PHÉNOMÈNE D'ALLÉLOPATHIE CHEZ LE KIKUYU

Le suivi de divers systèmes de culture conduits dans les Hauts de l'Ouest de La Réunion montre que des interactions négatives se produisant entre plantes ne sont pas attribuables à des effets de concurrence. Notre travail a consisté à mettre en évidence ce pouvoir phytotoxique en l'isolant au mieux des effets de compétition entre les plantes pour les ressources du milieu.

I - LE PHÉNOMÈNE D'ALLÉLOPATHIE

1) Définition

Au sein d'un écosystème, les interactions entre les organismes sont nombreuses et de nature différente. Outre le partage des ressources du milieu pouvant favoriser ou inhiber la présence de certaines espèces, des régulations interspécifiques semblent se comprendre par la production et la libération de substances chimiques attractives, stimulantes ou inhibitrices. L'ensemble de ces phénomènes est connu sous le nom "d'écologie chimique" (PUTNAM et TANG, 1986).

L'observation de telles interactions date de plus de 2000 ans quand THEOPHRASTUS (300 ans avant J. C.) remarque que le pois chiche (*Cicer arietinum*) détruit les adventices (RICE, 1984). D'autres observations ont suivi, mais ce n'est qu'en 1937 que MOLISCH propose le terme d'allélopathie, en faisant référence aux interactions biochimiques nocives ou bénéfiques entre tous types de végétaux, y compris les micro-organismes (PUTNAM et DUKE, 1978).

CAUSSANEL (1975) propose une définition des plus complètes, bien que ne s'appliquant qu'aux végétaux supérieurs : l'allélopathie est "l'ensemble des phénomènes qui sont dus à l'émission ou à la libération de substances organiques par divers organes végétaux vivants ou morts et qui s'expriment par l'inhibition ou la stimulation de la croissance des plantes se développant au voisinage de ces espèces ou leur succédant sur le même terrain".

Cependant, cette définition n'indique pas si les substances mises en jeu agissent directement ou non sur les organismes récepteurs. En effet, leurs actions pourraient n'avoir lieu qu'après transformation chimique ou biologique au niveau du sol. Dans ces cas, nous pourrions parler "d'allélopathie indirecte".

2) Les substances allélopathiques

Les différents composés chimiques impliqués dans les phénomènes d'allélopathie ont été classés en fonction de leur origine et des êtres vivants affectés par leur action (PUTNAM et TANG, 1986). Le tableau 1 nous indique les quatre principaux groupes de substances et les organismes concernés.

nom	donneur	receveur	origine du nom
CHOLINES	plantes supérieures	plantes supérieures	Grummer (1955)
PHYTOINHIBITINES	" "	" "	Fuerst et Putnam (1983)
MARASMINES	plantes supérieures	micro-organismes	Gauman et Grummer (1955)
PHYTONCIDES	micro-organismes	plantes supérieures	Waksman et Grummer (1955)
SAPROINHIBITINES	"	" "	Fuerst et Putnam (1983)
ANTIBIOTIQUES	micro-organismes	micro-organismes	Grummer (1955)

Tableau 1 : Nomenclature des composés allélopathiques (d'après PUTNAM et TANG, 1986)

Notre étude portant sur les interactions entre plantes supérieures, nous nous intéresserons principalement aux cholines ou phytoinhibitines, que nous pouvons définir comme étant des métabolites secondaires produits par des plantes supérieures et agissant généralement sur les plantes supérieures. Ces composés sont théoriquement présents dans tous types d'organes (feuilles, fleurs, fruits, racines, rhizomes, graines...) et sont stockés dans la vacuole des cellules végétales.

Quelques exemples de cholines :

Beaucoup de produits du métabolisme secondaire à action allélopathique ont une structure aromatique. Ces composés appartiennent à plusieurs familles chimiques et n'ont pas tous une action allélopathique démontrée.

Nous pouvons citer comme exemples caractéristiques, les *coumarines*, composés naturels végétaux les plus phytotoxiques et parmi les plus étudiés. La coumarine est un inhibiteur de la germination plus puissant que tous les autres acides aromatiques, en agissant sur la mitose (THOMPSON, 1985). Les *quinones* sont représentées par la juglone (produite par *Juglans nigra*, noyer), molécule allélopathique très efficace pouvant inhiber la croissance d'autres végétaux à des concentrations inférieures à 1 μ M (RICE, 1984).

Bien d'autres molécules phytotoxiques existent. Ce sont par exemple des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, des acides gras, des lactones ou bien des composés aliphatiques (RICE, 1984).

II - CHOIX DES PLANTES ÉTUDIÉES

Une des couvertures végétales permanentes du sol étudiée dans les Hauts de l'Ouest (kikuyu : *Pennisetum clandestinum*) semble avoir des effets allélopathiques phytotoxiques sur certaines adventices ; "piquant" (*Bidens pilosa*) et "oumine" (*Cyperus rotundus*) voient leur croissance réduite dans un champ de kikuyu. Afin de compléter les travaux de FONTAR et THOMAS (1992) (annexe I), nous avons également décidé d'étudier le phénomène sur une plante maraîchère communément cultivée dans les Hauts de l'île : la tomate (*Lycopersicon esculentum*).

1) Plante de couverture

***Pennisetum clandestinum* Hochst. : "kikuyu"**

Cette GRAMINÉE pérenne est originaire du Kenya, province du Kikuyu dont elle tient son nom. Son port est rampant, à stolons superficiels atteignant 5 m de long en sols riches. Le kikuyu forme un épais gazon quand il reçoit au moins 750 mm d'eau par an.

Introduite il y a plus de 20 ans, cette graminée tient une place importante dans les prairies des Hauts de l'île. Utilisée en couverture permanente du sol, ses avantages sont nombreux (MONIMEAU, 1991), notamment pour la lutte contre l'érosion, la conservation de l'eau, le maintien structural du sol, l'apport en matière organique, la réduction de mauvaises herbes...

2) Culture maraîchère

***Lycopersicon esculentum* Mill. : "tomate"**

Cette SOLANACÉE maraîchère est une herbacée rampante cultivée pour ses fruits, très variés dans leur forme ou leur couleur suivant les variétés. La variété Roma choisie est un cultivar industriel à fruits allongés présentant une plus forte teneur en matière sèche que les tomates rondes (MESSIAEN, 1975).

3) Adventices

***Cyperus rotundus* L.: "oumine", "zoumine"**

Plante pérenne de la famille des CYPÉRACÉES, cette adventice forme une rosette dont les feuilles linéaires se rejoignent à la base pour former une sorte de tige. L'espèce se multiplie préférentiellement par rhizome, la germination des semences étant exceptionnelle.

C. rotundus est de loin l'espèce végétale la plus nuisible dans le monde bien que ses exigences thermiques l'amènent à se limiter aux régions chaudes, tropicales et méditerranéennes (MERLIER et MONTEGUT, 1982). Utilisées indépendamment, les techniques de lutte les plus diverses ne peuvent en venir à bout (MONTEGUT, 1983). Diverses expérimentations de lutte intégrée et conjuguée sont actuellement testées dans de nombreux pays permettant de la maintenir à un taux de présence supportable.

***Bidens pilosa* L.: "piquant", "sornette"**

Plante cosmopolite dont la présence est signalée dans le monde entier, cette COMPOSÉE est parfaitement adaptée à l'ensemble des différentes zones cultivées de la Réunion y compris en altitude jusqu'à 1000 m. Le piquant peut atteindre 1,5 m de hauteur, son port est dressé, bien ramifié. Les tiges striées sont plus ou moins quadrangulaires, les feuilles composées et imparipennées ont des folioles à marge dentée (MERLIER et MONTEGUT, 1982).

III - MÉTHODES D'ÉTUDE

L'émission de substances allélopathiques par la plante dans l'environnement peut se faire par quatre voies différentes.

- Les exsudats racinaires

De nombreux composés chimiques sont excrétés par les racines. Plusieurs dispositifs expérimentaux permettent la mise en évidence de l'exsudation de cholines par l'appareil racinaire vivant (PUTNAM et TANG, 1986).

- Le lessivage des parties aériennes

Des substances inhibitrices ou stimulatrices provenant des feuilles peuvent être lessivées par la pluie ou la rosée et entraînées dans le sol où elles exerceraient leur action sur les végétaux environnants.

- La volatilisation

Des composés allélopathiques de nature non acide, tel l'éthylène ou certains terpènes, sont libérés par les parties vivantes des végétaux. Après fixation sur les colloïdes du sol, ces composés peuvent agir sur la germination (PINCHARD, 1989).

- La décomposition des débris

Les parties aériennes mortes des plantes forment une litière à la surface du sol qui, lors de sa dégradation, peut libérer des cholines.

Chacun de ces quatre modes d'émission peut et devrait être étudié par différents tests. En effet, l'utilisation simultanée de différents essais pour l'étude de l'allélopathie est importante, au moins pour confirmer les résultats avant de tirer les conclusions.

D'autre part, les substances "allélochimiques" peuvent avoir une action sur l'ensemble du cycle de vie des plantes sensibles, aussi bien sur la germination que sur la croissance et le développement. Nous avons donc décidé d'étudier ces deux aspects en utilisant les deux premières voies d'émission des substances (exsudats racinaires et lessivage des parties aériennes).

1) Effets allélopathiques du kikuyu sur la germination des semences

Les tests les plus utilisés pour l'étude de l'allélopathie sont ceux concernant la germination. En effet, les graines et les plantules sont plus sensibles que les plantes adultes. D'autre part, *in situ*, la plantule est un stade critique du cycle de développement des végétaux cultivés.

Le but de la manipulation est de mettre en contact la graine de la plante étudiée avec les éventuelles substances allélopathiques émises par le végétal (ici, le kikuyu) et de comparer la germination à celle d'un témoin conduit dans les mêmes conditions.

Il n'existe pas de méthodes standardisées dans l'étude de l'allélopathie exprimant un protocole précis. Les essais de germination peuvent être conduits en boîte de pétri, sur ou entre des feuilles de papier filtre, ou en barquette sur substrat sableux. Le matériel et la méthode utilisés sont établis en respectant les normes ISTA (DRAPER, 1985).

1. 1. Protocole :

Les graines de *Bidens pilosa*, récoltées en champ, sont préalablement désinfectées à l'alcool (70 %) pendant 15 mn et à l'hypochlorite de sodium (eau de Javel à 6 %) pendant 5 mn, pour éviter tout développement fongique.

Afin de couvrir plusieurs modes de libération des substances allélopathiques du kikuyu, des tests de germination sont réalisés avec les jus suivants (mode de préparation en annexe II) :

- exsudats racinaires
- jus de macération de parties aériennes fraîches de kikuyu (5 ml d'eau/g de végétal)
- jus de macération de parties aériennes séchées de kikuyu à 1, 2, 3 et 4 %.
- eau distillée (témoin)

Les graines sont posées sur du papier filtre DURIEUX spécial germination dans des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre. Le papier est préalablement imbibé et saturé de jus ou eau à raison de 3 ml/boîte. Conformément aux règles ISTA (DRAPER, 1985), 8 répétitions (1 boîte = 1 répétition) sont mises en place à raison de 50 graines par boîte.

Certains tests sont également menés sur sable (lavé et stérilisé pendant 1 h 30 à 100°C) dans des boîtes en plastique transparent de 12x12x2 cm. Ces essais nous permettent de comparer les résultats à ceux obtenus sur papier car le sable évite les effets d'une trop forte pression osmotique. Il évite également la séparation chromatographique des constituants allélopathiques, observable avec des tests menés sur papier en ne respectant pas une application uniforme des solutions, ce qui modifierait les résultats (PUTNAM et TANG, 1986).

Des solutions de parties aériennes séchées à 2, 4, 6 et 8 % sont utilisées, ainsi qu'un témoin. Les graines sont déposées à la surface d'une couche de 1 cm de sable non tassé préalablement imbibé de 10 ml de solution ou d'eau distillée.

Conditions de l'expérience :

Les facteurs influençant la germination doivent être parfaitement contrôlés :

- l'ensemble des boîtes est placé dans une pièce aérée (Thermopériode jour/nuit : 23/18°C).

Ces conditions satisfont aux règles ISTA concernant les gammes thermiques de germination des plantes testées.

- la **photopériode** est naturelle et l'**humidité** est contrôlée tous les jours et éventuellement corrigée par addition d'une même quantité d'eau distillée dans toutes les répétitions d'une série, pour ne pas faire diverger les concentrations en substances chimiques dans l'ensemble des répétitions.

De plus, les graines s'imbibant rapidement, la concentration en substances dans le milieu croît proportionnellement. Il est donc indispensable de maintenir une certaine humidité pour ne pas atteindre des concentrations excessives (risque d'inhibition de germination due à une trop forte pression osmotique). Nous avons réparti le plus uniformément possible les apports d'eau distillée afin de diminuer les risques de séparation chromatographique des composés chimiques.

1. 2. Plantes étudiées et mesures effectuées :

Les plantes étudiées sont uniquement *L. esculentum* et *B. pilosa*, *C. rotundus* se multipliant essentiellement par stolon, il n'est pas intéressant de tester les effets du kikuyu sur sa germination. Selon les règles ISTA, l'échantillonnage des graines doit présenter une homogénéité maximale.

Tous les jours, les graines germées sont comptées ; la germination est définie quand la radicule mesure 2 mm de long (DRAPER, 1985 ; PUTNAM et TANG, 1986). Les résultats sont exprimés en pourcentages.

Le nombre de plantules anormales est également déterminé par l'étude morphologique des plantules selon les règles ISTA (DRAPER, 1985), basées sur l'observation de l'état général, des radicules, cotylédons, hypocotyles et bourgeons terminaux.

1. 3. Résultats :

Une analyse de variance comprenant un test de comparaison de moyennes est effectuée : test de NEWMAN et KEULS. Ce test appliqué à des pourcentages nécessite la transformation des résultats en $y = 2 \arcsin (x)^{0,5}$ avec x compris entre 0 et 1, à condition que l'effectif n de chaque répétition soit constant (ici, $n = 50$ graines/boîte). Il y a lieu d'apporter également une correction dans les cas extrêmes : $x = 0$ ou $x = 1$, en remplaçant ces valeurs respectivement par $(1/4n)$ et $(1-1/4n)$ (DAGNELIE, 1980). Les résultats des tests statistiques sont en annexe III.

● Tomate :

La figure I indique que les jus de macération de parties aériennes fraîches (F) et séchées à 1 % (S1) ont un effet stimulateur sur la germination de la tomate le premier jour après semis. Les jours suivants, les différences avec le témoin ne sont plus significatives (annexe III a). Il est donc

difficile de conclure à un effet allélopathique. d'autant plus que certains facteurs du milieu (humidité, pH...) auraient pu favoriser légèrement la germination des semences dans ces solutions.

Les exsudats racinaires (Ex) et les jus de macération à 2 et 3 % de parties aériennes séchées (S2 et S3) ne semblent avoir aucune action notable tout au long du test.

Par contre, le jus de macération à 4 % de parties aériennes séchées (S4) inhibe de près de 40 % la germination à partir du troisième jour après semis et jusqu'à la fin du test. Ce résultat concorde avec celui obtenu par FONTAR et THOMAS (1992). Cependant, nous ne pouvons assurer que, dans ces conditions, il s'agisse uniquement d'un effet allélopathique. Des inhibitions dues à une trop forte pression osmotique peuvent intervenir ; une solution à 4 % présente généralement une pression osmotique de 150 milliosmoles, inhibant la germination (PUTNAM et TANG, 1986).

Afin de préciser ces résultats, il serait indispensable de pouvoir contrôler la pression osmotique de chaque solution et ceci durant toute la période de germination. De plus, un apport de mannitol (molécule neutre pour les semences) permettrait de s'affranchir des différences de concentration donc de pression osmotique en l'homogénéisant pour l'ensemble des boîtes. Enfin, un contrôle et, si nécessaire, une rectification du pH uniformiseraient les différentes séries du test.

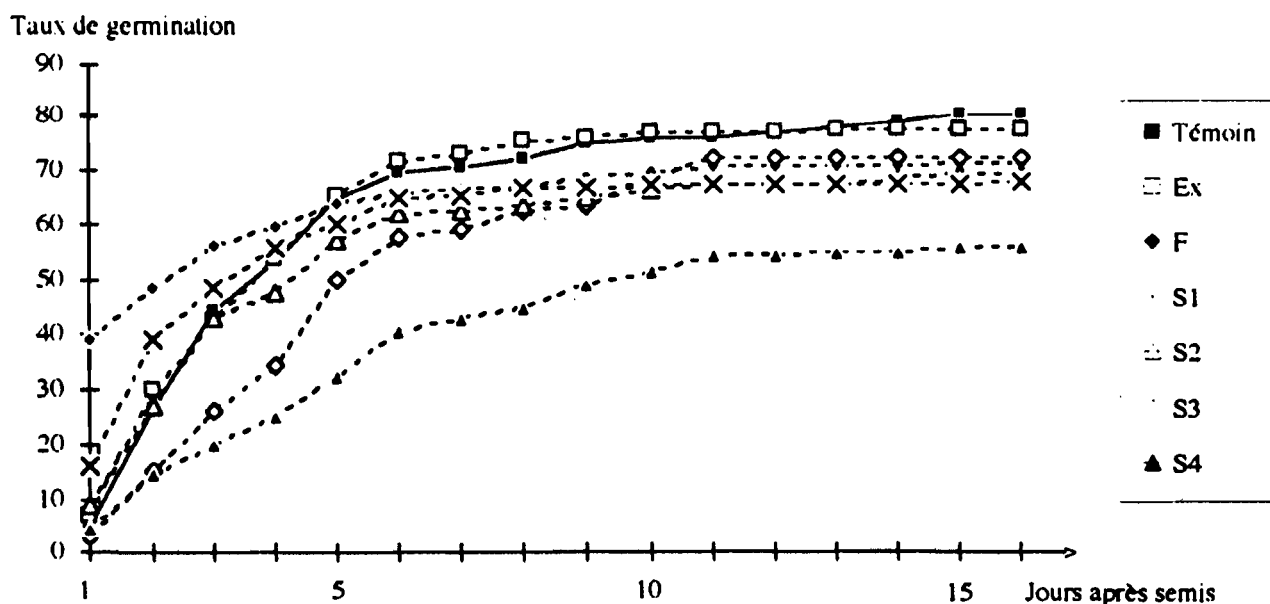
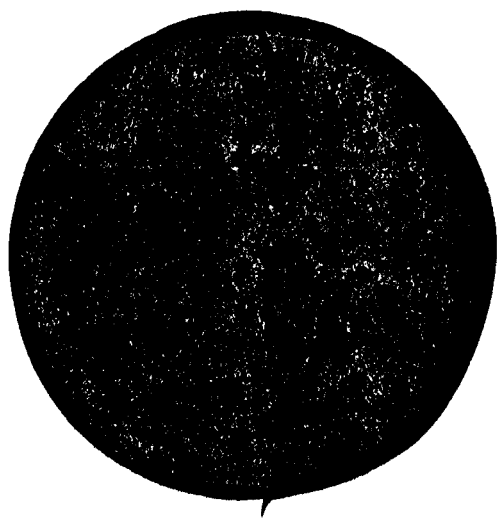


Figure 1 : Taux de germination de la tomate sur papier en fonction du traitement à différents jours après semis (d'après les résultats en annexe III).

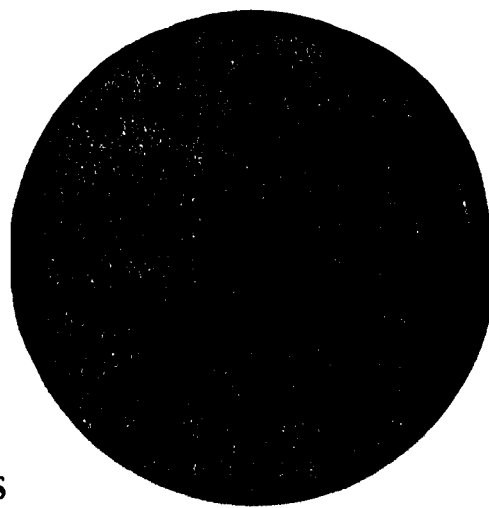
(légendes : Ex : exsudats racinaires
 F : jus de macération de parties aériennes fraîches, 5 ml/g
 Sx : jus de macération de parties aériennes séchées, à x %)

La figure 2 montre que les jus de macération à 3 et 4 % de parties aériennes séchées (S3 et S4) provoquent un taux élevé de plantules anormales. Seules ces deux solutions sont significativement différentes du témoin (annexe III a).



Témoin

7JAS



S4

Photo 1 : Germination de la tomate sur papier, 7 jours après semis.
Les radicules sur S4 (jus de macération à 4 % de parties aériennes séchées) sont nécrosées.

Les symptômes les plus fréquents, moins de 10 %, pour l'ensemble des traitements concernent surtout les radicules ou les cotylédons déformés ou non développés. Dans les solutions S3 et S4, les radicules semblent en plus nécrosées par noircissement de leur extrémité (photo 1). Quelques racines secondaires prennent le relais mais se nécrosent rapidement. Deux raisons peuvent être évoquées pour expliquer ce phénomène :

- la présence de substances toxiques dans ces deux solutions bien concentrées, gênant le développement des méristèmes racinaires,
- la pression osmotique trop élevée ne permettant pas à la partie absorbante de la radicule de fonctionner convenablement (jus à 4 % notamment).

Toutefois, la présence de ces symptômes pour la solution à 3 % jouerait en la faveur d'effets de substances toxiques, car à cette concentration, il n'existe théoriquement pas de problème de pression osmotique (PUTNAM et TANG, 1986).

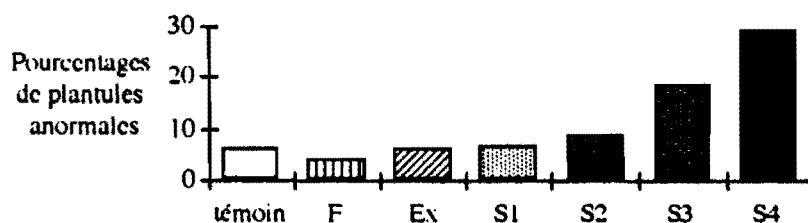


Figure 2 : Effets de différents traitements sur le pourcentage de plantules anormales de tomate (germination sur papier)
(les légendes sont les mêmes que pour la figure 1)

Une pression osmotique trop forte peut être évitée en utilisant un substrat sableux, sur lequel le seuil de nuisibilité se situe au delà d'une solution à 4 % (PUTNAM et TANG, 1986). La courbe de germination sur sable (figure 3) montre que les jus de macération à 2 et 4 % de parties aériennes séchées (S2 et S4) retardent significativement la germination les deux premiers jours après semis mais ne l'inhibent pas au delà (annexe III b), contrairement à la solution S4 sur papier. Le nombre de répétitions et les mêmes conditions de température et d'humidité pour l'ensemble des boîtes permettent d'écarter les risques éventuels de mauvaises conditions dans ces séries.

Ainsi, sur papier, l'inhibition de la germination avec S4 pourrait bien être due à une trop forte pression osmotique. Nous pouvons donc penser que le kikuyu présente un léger effet retardant la germination de la tomate. Cette hypothèse doit être vérifiée en contrôlant tous les autres facteurs (pression osmotique, pH...).

Par ailleurs, les jus de macération à 6 et 8 % de parties aériennes séchées (S6 et S8) retardent et inhibent très fortement la germination de la tomate (figure 3 et annexe III b). Ceci peut être dû à une trop forte concentration en substances. Avec ces deux solutions, le substrat est beaucoup plus compact qu'avec S2 et S4. Nous ne pouvons donc pas conclure à un seul effet allélopathique des jus de kikuyu à ces concentrations.

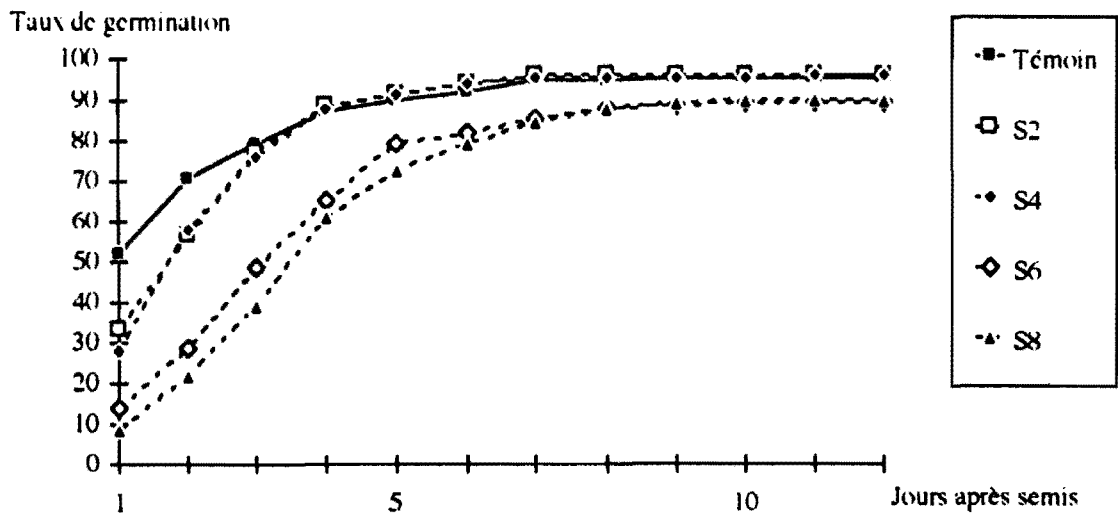


Figure 3 : Pourcentages de germination de la tomate en fonction de différents traitements sur sable et à différents jours après semis (d'après les résultats en annexe III).

Les différences entre les concentrations des solutions sur substrat sableux se retrouvent dans le nombre et les symptômes des plantules anormales (figure 4 et annexe III b).

Pour les solutions à 2 et 4 % de parties aériennes séchées, même si les tests statistiques n'indiquent aucune différence entre le nombre de plantules anormales et celui du témoin, certaines racines sont noircies à leur extrémité, comme nous l'observons sur papier. Ces défauts pourraient être provoqués par la présence de composés toxiques.

Dans les solutions de macération à 6 et 8 % de parties aériennes séchées, en plus des racines noircies, certaines sont filiformes, incapables de pénétrer dans le sable et se nécrosent rapidement en provoquant la mort de la plantule. Ces symptômes pourraient être dus à une concentration trop élevée en substances, compactant le substrat et imposant une trop forte pression osmotique.

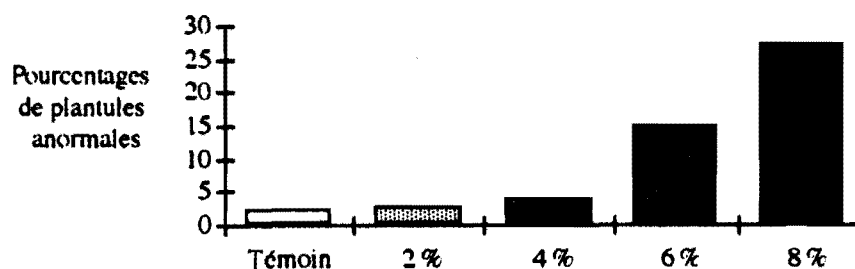


Figure 4 : Effets de jus de macération de parties aériennes séchées à différentes concentrations sur le taux de plantules anormales de la tomate (germination sur sable).

Il semble donc que certaines solutions de parties aériennes de kikuyu retardent la germination de la tomate et provoquent l'apparition de plantules anormales. En écartant les effets d'une trop forte pression osmotique (jus à 2 %), nous pouvons émettre l'hypothèse que le kikuyu présente des effets allélopathiques sur la germination de la tomate.

● Piquant :

Les pourcentages de germination obtenus pour cette adventice, dans ces conditions, sont relativement faibles. Le témoin ne dépasse pas 3 % de germination après 10 jours de traitement (annexe III c). Nous avons supposé que la température de la pièce n'était pas adaptée à une germination optimale de cette espèce. Un essai a été lancé en serre, où la température pendant la journée est beaucoup plus élevée (annexe IV). Les résultats de ce second essai sont comparables au premier. *Bidens pilosa* nécessiterait donc une température minimale supérieure à 18°C pour germer dans des proportions acceptables. C'est une espèce thermophile pour sa germination (CHAUSSAT et LE DEUNFF, 1975).

Par ailleurs, des études sur l'évolution de l'envahissement des adventices indiquent que dans plusieurs types de cultures, *B. pilosa* n'est pratiquement jamais présent au cours des mois de mai, juin, juillet, septembre et octobre (CIRAD, 1985). Il semblerait que les conditions climatiques et/ou un phénomène de dormance inhibent considérablement la germination de cette mauvaise herbe pendant la période hivernale.

Les résultats ne peuvent donc pas être exploités correctement. Les tests statistiques indiquent une différence significative entre le témoin et les jus de macération à 3 et 4 % de parties aériennes séchées (annexe III), mais nous ne pouvons suggérer un effet allélopathique, du fait des trop faibles taux de germination. Ces essais de germination seraient intéressants à reproduire pendant la période de prolifération de l'espèce, notamment de novembre à janvier.

2) Effets allélopathiques du kikuyu sur la croissance des plantes

Les expérimentations se font en serre. Ainsi, les conditions de développement des plantes sont optimales (les variations thermiques sont données en annexe IV, l'humidité et l'évaporation maîtrisées par arrosage).

2. 1. Effets allélopathiques par ses exsudats racinaires **(TEST EN CIRCUIT FERME)**

Les plantes cultivées en hydroponie sont associées au kikuyu dans un circuit fermé comme dans le dispositif de FONTAR et THOMAS (1992).

L'objectif est de déterminer l'effet des exsudats racinaires de kikuyu sur la croissance et le développement des plantes testées et vice versa. Les solutions contenant les exsudats sont recyclées après chaque arrosage, ce qui permet de les concentrer progressivement et donc d'augmenter leur action, si elle existe.

Les différences éventuelles observées entre le test et le témoin ont une très forte probabilité d'être dues à des effets allélopathiques des exsudats racinaires entraînés par le flux de solution circulant dans le dispositif. En effet, l'avantage de ce montage est qu'il permet d'éliminer pratiquement tous les facteurs de concurrence entre le kikuyu et les plantes puisqu'ils sont dans des pots indépendants.



Photo 2 : Test de croissance en circuit fermé, association kikuyu-piquant.



Photo 3 : Test de croissance en circuit fermé, vue d'ensemble.

2. 1. 1. Protocole :

Le dispositif fonctionne en circuit fermé, chaque plante reçoit les filtrats de l'ensemble du dispositif (cf. schéma ci-dessous). Dans chaque gouttière de 4 m, 12 pots en plastique noir chimiquement inerte de 15 cm de diamètre sont disposés à intervalles réguliers. Le dispositif test est constitué de 2 gouttières contenant chacune 6 pots de la plante à tester et 6 pots de kikuyu, disposés en alternance (photo 2). Les témoins (kikuyu et plante) sont une répétition du même dispositif avec pour l'un uniquement 12 pots de la plante (1 gouttière) et pour l'autre uniquement le kikuyu (12 pots dans une gouttière). Le témoin de kikuyu a pour but de contrôler l'existence ou l'absence d'effets allélopathiques de la plante testée sur le kikuyu.

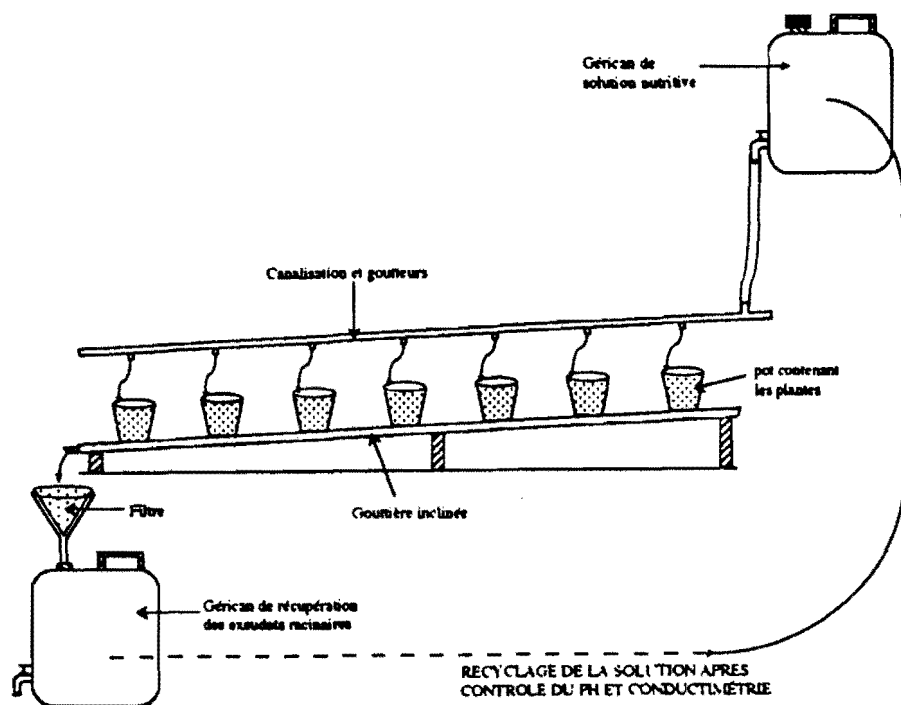


Schéma du dispositif en circuit fermé

Pour chaque dispositif, la solution nutritive (mode de préparation en annexe V), stockée au dessus de la gouttière, descend par gravité dans l'ensemble des pots arrosés au goutte-à-goutte. L'excès de solution qui percole des pots entraîne toutes sortes de substances excrétées par les racines, il est récupéré dans un bac situé en contrebas après filtration (élimination de particules de sable ou autres risquant de boucher les goutteurs) (photo 3).

Les arrosages ont lieu tous les deux ou trois jours (de manière à créer un très léger stress pour favoriser à la fois la sécrétion d'éventuels inhibiteurs chez le kikuyu et la sensibilité des plantes à ces toxines) à raison d'environ 700 ml par pot. La concentration totale en éléments

minéraux de la solution ainsi que le pH sont contrôlés après chaque arrosage, à l'aide d'un conductimètre (Bioblock Scientific 93303) et d'un pH-mètre (Digi-Sense, Cole Parmer) réglés avant chaque série de mesures. La solution est réajustée à son volume initial (8,5 l), le pH est maintenu entre 5 et 6 par addition d'acide phosphorique et la conductivité entre 1,5 et 2,4 mS/cm par addition de la solution mère. Les différences d'alimentation entre le test et les témoins sont éliminées en tolérant un écart maximum de 0,4 unités de pH ou de conductimétrie entre le test et les témoins (analyse d'eau et de solution nutritive en annexe VI).

2. 1. 2. Plantes étudiées et mesures effectuées :

Le **kikuyu** a été prélevé dans une parcelle de kikuyu pur âgé de un an et bien développé et a été repiqué dans les pots deux semaines avant la mise en route du système. Chaque plant est pesé.

L'**oumine** a été prélevé dans une parcelle non cultivée et a été repiqué à raison de une tige par pot, une semaine avant le début de l'expérience. Chaque plant est préalablement pesé.

La **tomate** et **piquant** ont été semés le 27 mai à raison de 4 graines par pot. L'expérimentation est lancée à partir de plantules de 3-5 cm, un seul plant par pot est conservé.

Pour toutes les plantes de l'expérimentation, après 7 semaines de traitement, les mesures suivantes seront effectuées :

- hauteur des parties aériennes et nombre de feuilles, tiges et inflorescences (pour tomate et piquant uniquement),
- quantité de matière sèche (étuve à 85°C pendant 48 h) de racines et parties aériennes (balance Mettler, type K7T, précision 0,05 g).

2. 1. 3. Résultats

Une analyse de variance comprenant un test de comparaison des moyennes est effectuée (test de NEWMAN et KEULS) à l'aide du logiciel STATITCF. Les résultats des tests sont donnés en annexe VII.

● Tomate :

La figure 5 n'indique aucune différence significative entre le témoin et les tomates recevant les exsudats racinaires du kikuyu. A ces concentrations naturelles, les racines de kikuyu ne semblent pas sécréter de substances à effet allélopathique sur cette culture maraîchère.

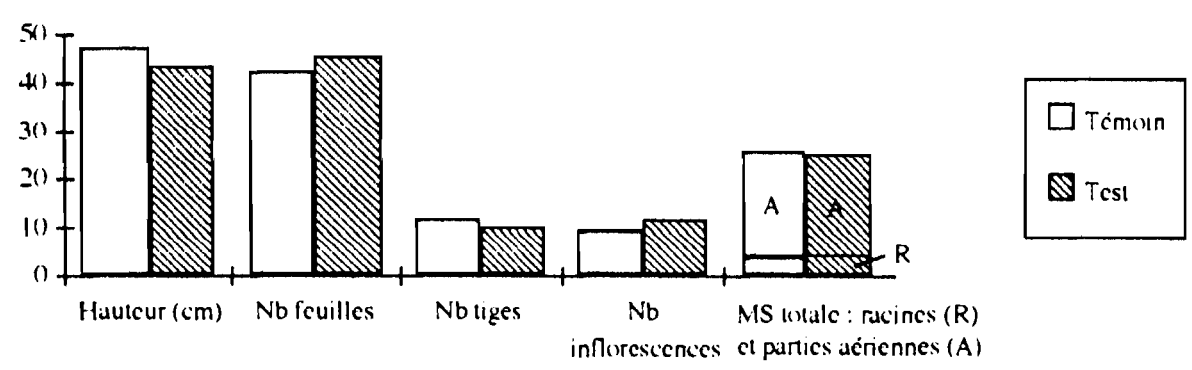


Figure 5 : Effet des exsudats racinaires de *Pennisetum clandestinum* sur la croissance et le développement de la tomate
 (d'après les différentes mesures consignées en annexe VII a).
 (MS : matière sèche exprimée en grammes, Nb : nombre moyen d'organes)

● Piquant :

Pour cette adventice, les exsudats racinaires de kikuyu diminuent considérablement la quantité de matière sèche des racines et des parties aériennes ainsi que le nombre de tiges (figure 6 et annexe VII). Par contre, la hauteur des plants, le nombre de feuilles et d'inflorescences ne sont pas différents entre le témoin et le test. En supposant que les facteurs du milieu soient strictement les mêmes pour l'ensemble des plantes (température, arrosage à la même heure et en quantité égale pour tous), nous pouvons penser que les exsudats racinaires du kikuyu ont une action allélopathique sur la quantité de matière sèche. En effet, les feuilles et inflorescences ont une taille plus réduite chez les plantes en association avec le kikuyu.

Ainsi, la diminution du taux de cette adventice *in situ* serait due non seulement à des effets de concurrence avec le kikuyu, mais également à des phénomènes allélopathiques de substances excrétées par les racines de la couverture végétale.

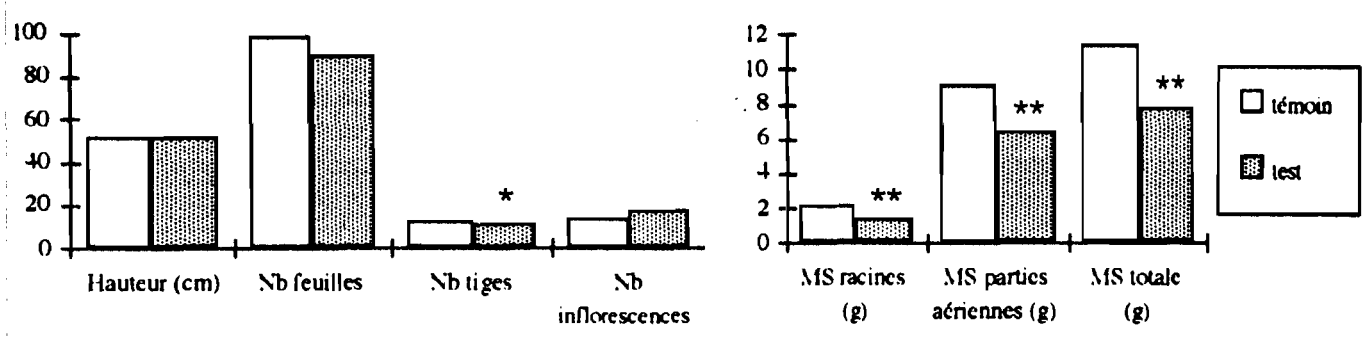


Figure 6 : Effet des exsudats racinaires de *Pennisetum clandestinum* sur la croissance et le développement de *Bidens pilosa* (d'après les différentes mesures consignées en annexe VII a).
 (* : test significativement différent du témoin (test de NEWMAN et KEULS au seuil de risque $\alpha = 0,05$)
 (** : test significativement différent du témoin (test de NEWMAN et KEULS au seuil de risque $\alpha = 0,01$)
 (MS : matière sèche exprimée en grammes, Nb : nombre moyen d'organes)

● Oumine :

Les différents graphiques de la figure 7 ne montrent aucune différence entre le témoin et les plants en association avec le kikuyu. Dans ces conditions de culture, les racines de kikuyu ne semblent donc pas sécréter de substances à action allélopathique sur la croissance et le développement de cette adventice.

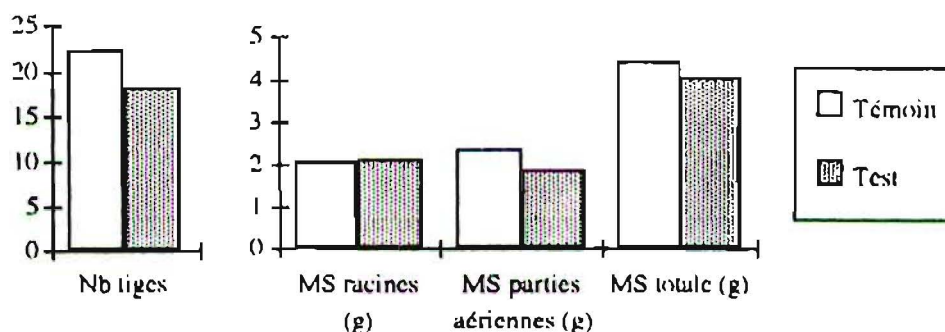


Figure 7 : Effet des exsudats racinaires de *Pennisetum clandestinum* sur la croissance et le développement de *Cyperus rotundus* (d'après les différentes mesures consignées en annexe VII a).

(MS : matière sèche exprimée en grammes, Nb : nombre moyen d'organes)

● Kikuyu :

En figure 8, nous pouvons remarquer que le kikuyu ne voit pas sa croissance et son développement inhibé ou stimulé lorsqu'il est en association avec ces différents végétaux. Quelques effets allélopathiques ont été supposés concernant *C. rotundus* et *B. pilosa* (RICE, 1984), mais ils ne semblent pas se révéler sur le kikuyu, dans ces conditions.

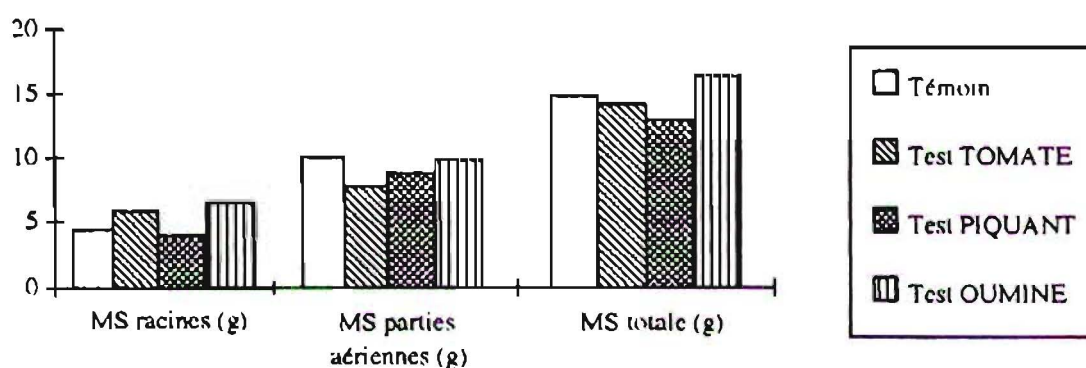


Figure 8 : Effet des exsudats racinaires de *L. esculentum*, *B. pilosa* et *C. rotundus* sur la croissance et le développement de *Pennisetum clandestinum* (d'après les différentes mesures consignées en annexe VII a).

(MS : matière sèche exprimée en grammes, Nb : nombre moyen d'organes)



Photo 4 : Test de croissance avec apport de jus de macération de parties aériennes de kikuyu.

2. 2. Effets allélopathiques par lessivage de parties aériennes

Cette méthode permet de mettre en évidence la présence de substances chimiques libérées par les feuilles et tiges de kikuyu, susceptibles d'avoir un effet allélopathique sur les plantes testées.

Le but de la manipulation est de comparer la croissance d'une plante arrosée avec un jus de macération à un témoin arrosé avec de l'eau. Les nutriments sont apportés en même quantité à toutes les plantes grâce à une solution nutritive.

2. 2. 1. Protocole (photo 4) :

Nous avons travaillé à partir de matériel végétal frais entier et sec broyé. Les jus sont obtenus de la même manière que pour les tests de germination (annexe II) ;

- **jus de macération des parties aériennes fraîches** (5 ml d'eau/g de feuilles),
- **jus de macération de parties aériennes séchées** : 4 %.

Les pots en plastique sont remplis avec le même substrat sableux basaltique que celui employé dans le circuit fermé. Pour chaque plante testée,

- 10 pots témoins sont arrosés avec de l'eau et une solution nutritive (50-50),
- 10 pots tests arrosés avec jus de macération de parties aériennes fraîches et solution nutritive (50-50),
- 10 pots tests arrosés avec jus de macération de parties aériennes sèches et solution nutritive (50-50).

La solution nutritive est la même que celle utilisée dans le test en circuit fermé. Tous les pots sont arrosés en même temps, tous les deux ou trois jours et reçoivent la même quantité de liquide (environ 150 ml par pot).

2. 2. 2. Plantes étudiées et mesures effectuées :

L. esculentum et *B. pilosa* sont semés le 4 juin. *C. rotundus* est pesé puis repiqué le 4 juin également. Ces trois plantes sont d'abord arrosées à l'eau et solution nutritive jusqu'au stade 3-4 cm des semis (5 jours), alors débute l'utilisation des jus.

Pour chaque plante est déterminée, au bout de 7 semaines d'arrosage, la matière sèche des racines et parties aériennes (ainsi que le nombre de feuilles, tiges et inflorescences pour tomate et piquant).

2. 2. 3. Résultats :

Le test statistique appliqué à cette expérimentation est le même que celui du test en circuit fermé (test de NEWMAN et KEULS). Les résultats sont consignés en annexe VII b.

● Tomate :

La figure 9 nous permet de remarquer qu'aucune différence significative n'existe entre les témoins et les plants arrosés avec du jus de macération de parties aériennes fraîches (F) ou séchées (S). Nous pouvons donc penser que les éventuelles substances libérées par les parties aériennes du kikuyu n'ont pas d'action notable sur la croissance et le développement de la tomate. Même si une très légère différence existe entre les témoins et les plants testés (figure 9), en conditions naturelles, la teneur en composés est certainement très inférieure à celle de nos solutions à 4 % de matière sèche. Par ailleurs, cette différence peut être attribuable à d'autres facteurs que l'allélopathie. Aussi, le kikuyu ne semble pas avoir d'effets allélopathiques dus au lessivage des parties aériennes sur la tomate. Ces résultats confirment ceux de FONTAR et THOMAS (1992) obtenus avec une solution à 4 % de feuilles et tiges séchées. Par contre, ces auteurs ont annoncé un effet stimulateur avec la solution de parties aériennes fraîches probablement dû à un stress hydrique plus important chez le témoin. Nos résultats permettent de confirmer cette hypothèse. Le kikuyu n'aurait donc aucune action sur la tomate.

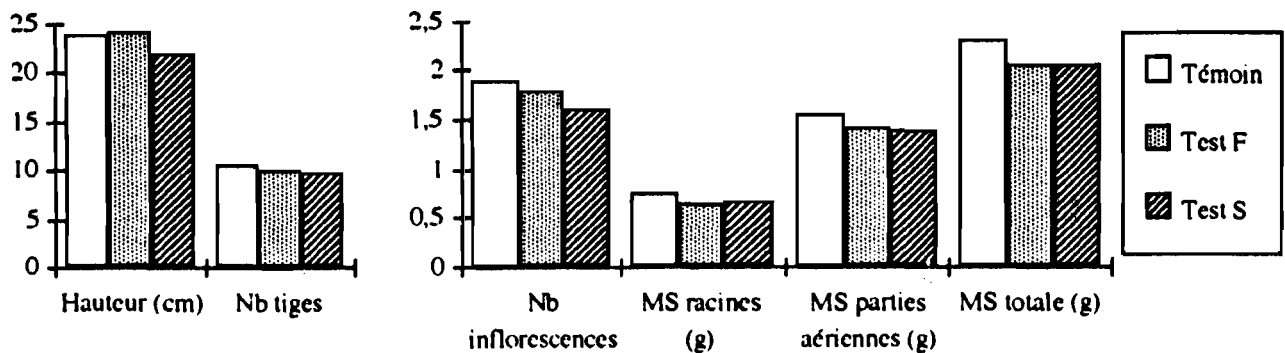


Figure 9 : Effets de jus de macération de parties aériennes fraîches (test F) ou séchées (test S) de *P. clandestinum* sur la croissance et le développement de *L. esculentum*
(MS : matière sèche exprimée en grammes, Nb : nombre d'organes)

● Piquant :

Toutes les mesures effectuées sur cette adventice sont significativement différentes entre le témoin et les plants arrosés avec les deux types de solutions (figure 10). L'ensemble des plants étant dans les mêmes conditions, nous pouvons supposer que les parties aériennes du kikuyu contiennent des substances à effet allélopathique négatif sur la croissance et le développement de *Bidens pilosa*. Les résultats obtenus avec la solution de feuilles et tiges fraîches confirment ceux de FONTAR et THOMAS (1992) et sont en accord avec les observations de CHOU *et al.* (1987) qui remarquent que *B. pilosa* est rare dans une couverture de kikuyu.

En conditions naturelles, la concentration en composés est certainement inférieure à celle de nos solutions. Il serait donc nécessaire de renouveler l'expérimentation avec des solutions à moins de 4 %.

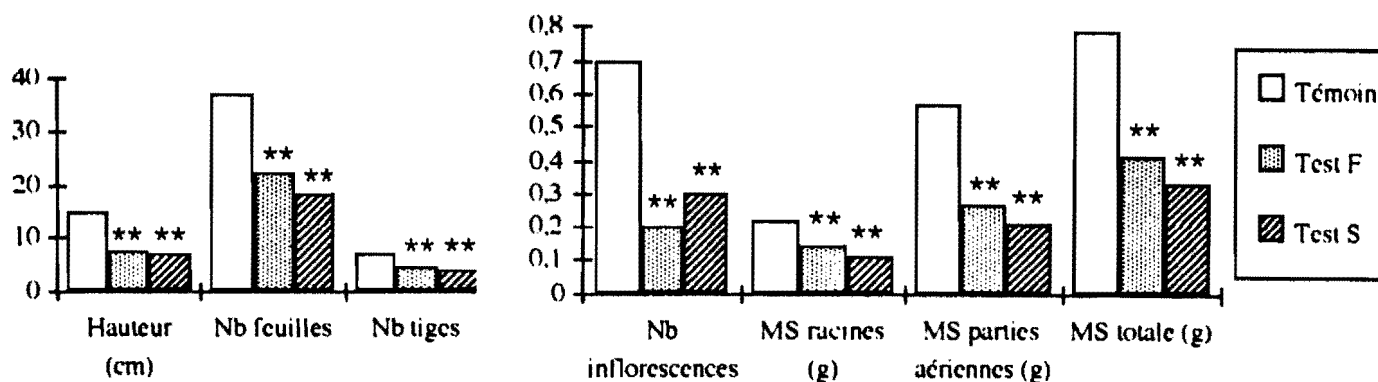


Figure 10 : Effets de jus de macération de parties aériennes fraîches (test F) ou séchées (test S) de *P. clandestinum* sur la croissance et le développement de *Bidens pilosa*.

(MS : matière sèche exprimée en grammes, Nb : nombre d'organes)

(* : test différent du témoin au seuil de risque $\alpha = 0,05$)

(** : test différent du témoin au seuil de risque $\alpha = 0,01$)

● Qumine :

La figure 11 nous montre que les solutions de macération de parties aériennes diminuent le nombre de tiges de *Cyperus rotundus* et plus fortement encore la quantité de matière sèche. Un effet allélopathique de substances contenues dans les feuilles et tiges de kikuyu peut expliquer ces phénomènes. Nos résultats sont en accord avec ceux de FONTAR et THOMAS (1992) en ce qui concerne la solution de végétal sec. Par contre, aucune différence n'avait été observée avec une solution de végétal frais. Nous ne pouvons donc pas certifier l'existence d'un effet allélopathique dû à la solution de macération de parties aériennes fraîches. Une répétition de cette expérience permettrait de confirmer l'un ou l'autre des résultats.

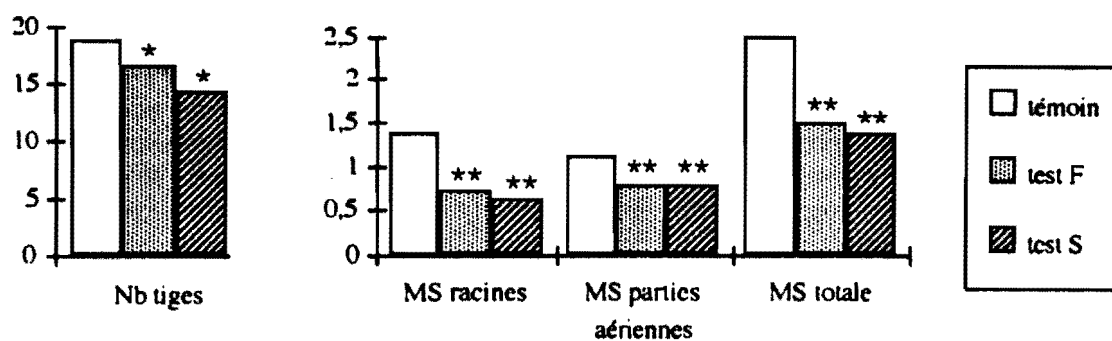


Figure 11 : Effets de jus de macération de parties aériennes fraîches (test F) ou séchées (test S) de *P. clandestinum* sur la croissance et le développement de *Cyperus rotundus*.

(MS : matière sèche exprimée en grammes, Nb : nombre d'organes)

(* : test différent du témoin au seuil de risque $\alpha = 0,05$)

(** : test différent du témoin au seuil de risque $\alpha = 0,01$)

3) Conclusion

Les résultats obtenus suite à nos expérimentations, permettent de confirmer quelques techniques de culture.

▲ Le kikuyu présenterait des effets allélopathiques uniquement sur la germination de la tomate et non pas sur sa croissance et son développement. De ces résultats, nous pouvons en déduire que cette culture maraîchère doit être implantée dans une couverture de kikuyu, sous forme de plants, mais pas en semis direct. Cette technique permet de s'affranchir des interactions de type allélopathique entre la plante de couverture du sol et la tomate cultivée, en diminuant les temps de travaux relatifs à la protection et au renouvellement des semis sensibles.

▲ Le kikuyu semble interférer sur la croissance des deux adventices étudiées, par ses exsudats racinaires (*Bidens pilosa* uniquement) et par lessivage de parties aériennes fraîches (couverture vivante) et séchées (débris de couverture). En combinant cet effet allélopathique aux phénomènes de concurrence pour les ressources du milieu, le kikuyu réduit de façon notable la présence de *B. pilosa* et *Cyperus rotundus*, ce qui est confirmé par les observations *in situ*.

Cependant, la présence de ces adventices n'est pas totalement inhibée par la couverture végétale. Le kikuyu est-il capable de les maintenir à un taux de présence tolérable ou l'utilisation d'un herbicide est-elle nécessaire ?

▲ Les exsudats racinaires des plantes testées (tomate, piquant, oumine) ne réduisent pas la croissance et le développement du kikuyu. *In situ*, les interactions entre ces végétaux n'iraient donc que dans le sens kikuyu-adventices.

Pour les expérimentations, il serait nécessaire d'envisager des protocoles simples mais précis et rapides à mettre en place, afin de vérifier l'existence d'effet allélopathique entre plantes cultivées, adventices et les différents végétaux utilisés comme couverture du sol.

Les tests de germination sont rapidement révélateurs des éventuelles interactions, mais nécessitent un contrôle précis des facteurs du milieu (température, humidité, pH, pression osmotique) pour ne pas conclure à tort à un effet allélopathique. Il est également indispensable de connaître la période de germination des semences. Cependant, ces tests sont simples et rapides à mettre en place.

Le test en circuit fermé permet d'isoler au mieux les éventuels effets allélopathiques des phénomènes de concurrence, mais nécessite un suivi régulier des cultures (arrosage tous les deux jours, contrôle du pH et de la conductimétrie des solutions nutritives). Ce test est pourtant le plus révélateur des effets d'exsudats racinaires, même si d'autres protocoles existent ; croissance de la plante dans le même pot que le végétal de couverture, et comparaison à un témoin seul dans un autre pot, ce test n'écarte pas les effets de concurrence entre les plantes cultivées ensemble.

Le test en pot est rapide, efficace et pratique. Il serait cependant nécessaire de s'assurer, dans le cas d'effet stimulateur des solutions de macération, qu'il n'y a pas d'apport supplémentaire de nutriments par ces solutions, ce qui pourrait favoriser la croissance des plantes par rapport au témoin et fausserait les résultats.

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DE JUS DE MACÉRATION DE KIKUYU

Connaître la nature des substances chimiques est indispensable pour comprendre non seulement l'allélopathie mais également d'autres phénomènes (microbiologie, nutrition végétale, pathologie...).

CHOU *et al.* (1974 et 1989) se sont intéressés à l'identification de certains composés allélopathiques hydrosolubles du kikuyu par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Nous avons suivi leur protocole afin de retrouver et de doser les mêmes molécules dans le kikuyu local, mais cette fois, en séparant les parties aériennes des racines.

I - MÉTHODE D'OBTENTION DES JUS DE MACÉRATION

Des parties aériennes (feuilles et tiges) et des racines sont prélevées dans une parcelle de kikuyu bien développée. Les racines sont soigneusement nettoyées en évitant l'eau afin de ne pas éliminer certains composés libérés. Les différentes parties végétales sont séchées à l'air libre pendant une semaine avant d'être broyées finement.

Deux échantillons de 12,5 g de parties aériennes, ainsi que deux échantillons de 12,5 g de racines sont mis à macérer dans 250 ml d'eau distillée chacun pendant 2 heures en agitant. Les solutions à 5 % sont ensuite filtrées (sur entonnoir et papier filtre) après légère décantation.

II - PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Chaque solution est extraite une première fois avec 150 ml dans une ampoule à décanter de 500 ml en agitant pendant 5 mn et en prenant soin de dégazer régulièrement.

La phase aqueuse est récupérée dans un erlenmeyer et la phase étherée est filtrée sur filtre (type MN 640 m) directement dans un ballon rodé. La phase aqueuse est ensuite reprise avec 150 ml d'éther selon le même protocole que précédemment.

Les 300 ml d'éther sont évaporés au ROTAVAPOR (bain-marie à 35°C, sous vide) pour obtenir un résidu qui est dissous dans 5 ml de méthanol absolu.

III - MÉTHODE D'ANALYSE DES CONSTITUANTS HYDROSOLUBLES DU KIKUYU PAR DOSAGE HPLC

Six constituants aromatiques hydrosolubles ont été quantitativement déterminés par CHOU *et al.* (1989) dans le jus de kikuyu entier. Ce sont les acides gallique, m-coumarique, p-coumarique, vanillique, protocatéchique et p-hydroxybenzoïque. Nous avons effectué une

analyse quantitative comparative entre une solution de référence contenant ces composés à des concentrations connues et les extraits.

1) Préparation de la solution de référence

Les concentrations des molécules sont calculées en référence aux teneurs obtenues par CHOU *et al.* (1989) (tableau 2). La solution de référence est constituée de :

- 2 ml de solution d'acide gallique à 100 mg/l,
- 2 ml de solution d'acide m-coumarique à 100 mg/l,
- 2 ml de solution d'acide p-coumarique à 100 mg/l,
- 2 ml de solution d'acide vanillique à 50 mg/l,
- 2 ml de solution d'acide protocatéchique à 50 mg/l,
- 2 ml de solution d'acide p-hydroxybenzoïque à 25 mg/l,
- 8 ml d'eau distillée.

2) Préparation des solutions échantillons

Les extraits méthanoliques de 5 ml sont mélangés chacun à 5 ml d'eau distillée.

3) Appareillage et conditions chromatographiques :

L'ensemble du chromatographe est de marque Waters :

- Colonne Brownlee Labs RP 18 (Reverse Phase, C18 aliphatique) Spheri 5, 4,6 mm x 250 mm.
- Injecteur à boucle Rhéodyne de 500 µl avec système de fuite.
- Pompe à débit constant (1 ml/mn), pression : 3000 Psi (= 138 Ba)
- Phase mobile : Acétonitrile pur 20 %
Acide acétique 0,01 M, 80 %
- Détecteur U.V. à 254 nm Lambda Max Model 480, sensibilité 0,05 à température ambiante
- Enregistreur intégrateur SP4270 Spectraphysics.

Chaque injection représente 500 µl de solution de référence ou de solutions échantillon.

IV - RÉSULTATS

Les pics correspondant aux six composés de la solution de référence (annexe IX) sont préalablement identifiés en comparaison des chromatogrammes de chaque composé injecté seul. Les temps de rétention des composés de la solution de référence nous ont alors permis d'identifier dans les extraits cinq des six composés choisis. Seul l'acide vanillique, pourtant décelé par CHOU *et al.* (1989), n'a pas été révélé dans nos extraits.

Les teneurs de chaque constituant, exprimées dans le tableau 2, sont calculées par le rapport entre les aires des extraits et celles de la solution de référence, connaissant la concentration de chacun des composés de référence (annexe VIII).

composés	Résultats obtenus par CHOU <i>et al.</i> (1989)		Extrait de parties aériennes de kikuyu		Extrait de racines de kikuyu	
	10 ⁻⁶ mole/g	%	10 ⁻⁶ mole/g	%	10 ⁻⁶ mole/g	%
a. gallique	0,24	15	0,013	17	0,008	5
a. protocatéchique	0,13	8	0,012	16	0,005	3
a. p-hydroxybenzoïque	0,07	5	0,005	7	0,029	19
a. vanillique	0,15	10	-	0	-	0
a. m-coumarique	0,71	46	0,036	48	0,088	58
a. p-coumarique	0,25	16	0,009	12	0,022	15
TOTAL	1,55	100	0,075	100	0,152	100

Tableau 2 : concentrations en mg/g de kikuyu, entier (CHOU *et al.*) ou parties aériennes et racines obtenues par dosage en HPLC.

Les teneurs en ces 5 composés sont très inférieures à celles obtenues par CHOU *et al.* (1989). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences :

- Le protocole d'extraction était le même dans son ensemble, mais nous ne possédions pas les détails du matériel utilisé par les chercheurs de Taiwan. Aussi, les filtres, le volume de solvant d'extraction et le nombre de répétitions ont été choisis de manière à sélectionner au mieux les composés avec les moyens mis à notre disposition mais peuvent provoquer de telles différences dans les résultats si le rendement n'est pas excellent. Des pertes à plusieurs niveaux de l'extraction, ainsi qu'au moment de la reprise des substances au méthanol ont pu se produire. Des réglages imparfaits de l'appareil chromatographique ou de l'intégrateur peuvent également modifier les résultats.

- Au niveau de la plante elle-même, il peut exister des variations importantes dans la production de composés secondaires, en fonction du cultivar (génétique, âge, état de santé...) et des conditions environnementales (température, humidité, nutriments...). Le kikuyu se développe beaucoup plus facilement en été qu'en hiver, donc pourrait synthétiser beaucoup plus de composés secondaires pendant la saison chaude.

Néanmoins, les proportions entre les différents composés décelés au cours des deux analyses sont relativement proches, bien que l'acide vanillique n'ait été identifié, ni dans les parties aériennes, ni dans les racines. Le constituant majoritaire semble être l'acide m-coumarique, aussi bien dans les feuilles que dans les racines. Sa présence, ou du moins celle de composés de sa famille, était préalablement supposée par une odeur de foin très prononcée dans

les extraits. La coumarine et ses dérivés sont reconnus comme substances allélopathiques par leur action négative sur la germination et la photosynthèse (RICE, 1984).

Pour ces 5 composés, les racines semblent plus riches en composés que les parties aériennes (respectivement 0,152 $\mu\text{mole/g}$ et 0,075 $\mu\text{mole/g}$). Les proportions en acides gallique, protocatéchique et p-hydroxybenzoïque sont inversées selon les organes ; les racines sont plus riches en acide p-hydroxybenzoïque alors que les parties aériennes le sont davantage en acides gallique et protocatéchique.

L'effet allélopathique du kikuyu peut être non seulement dû à ces substances contenues dans les racines et pouvant être libérées, mais également à ces mêmes substances dans les feuilles et les tiges, libérées et entraînées par la pluie ou la rosée puisqu'hydrosolubles.

Il reste à savoir si ces concentrations sont suffisamment élevées pour provoquer un effet allélopathique notable et si elles sont constantes au cours des saisons et dans différents plants. Des dosages pendant la période de développement optimum du kikuyu (saison chaude) seraient souhaitables.

Par ailleurs, rien ne prouve que ces acides aromatiques sont naturellement libérés par les organes vivants, et non par les organes séchés puis broyés comme nous l'avons fait. La mise en place d'un dispositif de récupération des exsudats racinaires serait nécessaire. Une colonne contenant une résine, type Amberlite X4D, permettrait de fixer certaines molécules qui seraient ensuite éluées à l'aide d'un solvant organique avant d'être analysées par HPLC (PUTNAM et TANG, 1986).

Il faut noter également que seuls les composés hydrosolubles miscibles dans l'éther ont été dosés. Nous ne pouvons donc pas conclure que ce sont les seules molécules susceptibles d'avoir une action allélopathique chez le kikuyu. D'autres substances existent probablement.

CONCLUSION

Durant ces deux mois de stage, le travail effectué fut très enrichissant malgré sa courte durée. Il a permis de prendre conscience des difficultés de la démarche expérimentale dans la recherche sur l'allélopathie et des problèmes du monde agricole des Hauts de l'Ouest de La Réunion.

Au terme de cette étude, nous avons complété et confirmé certains travaux relatifs aux effets allélopathiques du kikuyu sur la germination de la tomate et sur la croissance et le développement de deux adventices : "piquant" et "oumine". Ces effets se sont manifestés dans les conditions de nos protocoles. Cependant, l'étude des facteurs influençant la quantité et l'efficacité des cholines produites par le kikuyu compléterait ces travaux : effet de l'environnement (lumière, eau, température, conditions édaphiques...), action synergique ou antagoniste de certaines substances, par exemple.

Enfin, nous avons confirmé l'existence de quelques composés allélopathiques présents dans le kikuyu. Cette analyse chromatographique était sommaire mais elle nous a sensibilisés à la complexité du métabolisme secondaire du règne végétal. Il serait nécessaire de la compléter par la mise en place de dispositifs de récupération de substances excrétées par le végétal, suivie par diverses extractions. En combinant plusieurs analyses chromatographiques dans différentes conditions, il serait possible d'identifier une plus large gamme de composés.

Cette étude préliminaire de l'allélopathie entre différents végétaux permet donc d'envisager une expérimentation plus approfondie de ce phénomène. Les perspectives liées à cette étude seraient de comprendre les interactions entre les plantes afin de mieux gérer les méthodes de culture et d'élaborer des systèmes d'exploitation agricole préservateurs de l'écologie. L'utilisation optimale des ressources naturelles permettrait la mise en place d'une agriculture stable et durable.

Par ailleurs, isoler et synthétiser des substances produites par la nature est un des aspects de la recherche pour la création de nouveaux herbicides.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CAUSSANEL J. P., 1975. *Phénomène de concurrence par allélopathie entre adventices et plantes cultivées*. Versailles, Columa-EWRC, Cycle international de perfectionnement en malherbologie, 7p.
- CHAUSSAT R., LE DEUNFF Y., 1985. *La germination des semences*. Paris, Bordas, 232 p.
- CHOU C. H., CHANG S. J., CHENG C. M., WANG Y. C., HSU F. H., DEN W. H., 1989. *The selective allelopathic interaction of a pasture-forest intercropping in Taïwan : interaction between kikuyu grass and three hardwood plants*. Plant of Soil 116, p. 207-215.
- CHOU C. H., HWANG S. Y., PENG C. I., WANG Y. C., HSU F. H., CHUNG N. J., 1987. *The selective allelopathic interaction of a pasture-forest intercropping in Taïwan*. Plant of Soil 98, p. 31-41.
- CHOU C. H., YOUNG C. C., 1974. *Phytotoxic substances in twelve subtropical grasses*. J. Chem. Ecol., Vol. 1, No. 2, p. 183-193.
- CENTRE DE COOPÉRATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT, 1985. *Bilan de la Recherche Système dans les Hauts de l'Ouest de La Réunion*. CIRAD, Journée du 25 au 27 novembre 1985, Agence de La Réunion, 365 p.
- DAGNELIE P., 1980. *Théories et méthodes statistiques*. Vol 2, Presses agronomiques de Gembloux, 463 p.
- DRAPER S. R., 1985. *Seed sciences and technology : Proceedings of the International Seed Testing Association (ISTA)*. Vol 13, number 2, Zürich, 520 p.
- FONTAR X., THOMAS L., 1992. *Etude des effets allélopathiques d'une couverture de kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) sur géranium, cultures vivrières et certaines plantes adventices*. Mémoire de fin d'étude ESA Angers, 153 p.
- LEHMAN R. H., RICE E. L., 1972. *Effect of deficiencies of nitrogen, potassium and sulfure on chlorogenic acids and scopolin in sunflower*. Am. Mild. Nat., p. 71-80.

- LOCHE J., CHOUTEAU J., 1963.** *Incidences des carences en Bo, Mg ou P sur l'accumulation des polyphénols de la feuille de tabac.* C. R. Hebd. Sciences Acad. Agric., p. 1017-1026.
- MERLIER H., MONTEGUT J., 1982.** *Adventices tropicales.* ORSTOM-GERDAT-ENSH, Ministère des Relations Extérieures, Imprimerie Nationale, 490 p.
- MESSIAEN C.-M., 1975.** *Le potager tropical 2 : cultures spéciales.* Agence de coopération culturelle et technique, Paris, Presses universitaires de France, p. 198-204.
- MONIMEAU A., 1991.** *Travail minimum avec couverture permanente du sol dans les systèmes de culture à base de géranium dans les Hauts de l'Ouest de La Réunion.* CNEARC, Mémoire pour le diplôme d'Agronomie Tropicale, Montpellier, 95 p.
- MONTEGUT J., 1983.** *Pérennes et vivaces nuisibles en agriculture.* SECN, Aubervilliers, 479p.
- PINCHARD V., 1989.** *Etude d'exsudats racinaires pour la recherche de nouveaux modèles d'herbicides.* Mémoire de DEA, ENSAT-CIRAD, Montpellier, 21 p.
- PUTNAM A. R., DUKE W. B., 1978.** *Allelopathy in agroecosystems.* Am. Rev. Phytopathol., p. 431-451.
- PUTNAM A. R., TANG C.-S., 1986.** *The science of allelopathy.* USA, Wiley-Interscience, 317 p.
- RICE E. L., 1984.** *Allelopathy, Physiological ecology.* Academic Press, Inc, 413 p.
- THOMPSON A. C., 1985.** *The chemistry of Allelopathy : Biochemical interactions among plants.* ASC Symposium 268, ed. American Chemical Society, 470 p.

ANNEXES

I - Différents travaux sur les effets allélopathiques du kikuyu : effets des exsudats racinaires et des jus de macération sur la croissance des plantes développées ou leur germination.

II - Test de germination : préparation des solutions.

III - Tableaux des résultats et tests statistiques des germinations.

III a. Résultats des tests de germination de la tomate sur papier

III b. Résultats des tests de germination de la tomate sur sable

III c. Résultats des tests de germination de piquant sur papier

IV - Tests de croissance : courbe thermique dans la serre.

V - Test de croissance en circuit fermé : préparation de la solution nutritive.

VI - Analyse de sable lavé, d'eau d'irrigation et des solutions du test de croissance en circuit fermé.

VII - Tableaux des résultats et tests statistiques des tests de croissance.

VII a. Résultats des tests en circuit fermé

VII b. Résultats des tests en pot

VIII - Analyse chromatographique : principe de calcul.

IX - Analyse chromatographique :

IX a. Chromatogramme de la solution de référence

IX b. Chromatogramme de jus de macération des parties aériennes de kikuyu

IX c. Chromatogramme de jus de macération des racines de kikuyu

**DIFFÉRENTS TRAVAUX SUR LES EFFETS ALLÉLOPATHIQUES
DU KIKUYU**
**Effets des exsudats racinaires ou des jus de macération sur la
croissance de plantes développées ou leur germination**

FAMILLES	ESPECES	EXSUDATS RACINAIRES	JUS DE MACERATION DE PARTIES AERIENNES	
			fraîches	séchées
Bétulacées	<i>Alnus formosana</i> (2)			--
Composées	<i>Ageratum conyzoides</i> (3)		0	--
	<i>Bidens pilosa</i> (3)		--	
	<i>Lactuca sativa</i> (2)			[--]
Crucifères	<i>Brassica chinensis</i> (3)			[--]
	<i>B. oleracea capitata</i> (3)	[0]	[-]	[-]
Cypéracées	<i>Cyperus rotundus</i> (3)		0	--
Géraniacées	<i>Pelargonium X asperum</i> (3)	0	+	0
Graminées	<i>Brachiaria mutica</i> (1)			[0]
	<i>Festuca arundinacea</i> (2)			[--]
	<i>Lolium perensis</i> (3)	0[0]	[0]	--[--]
	<i>Miscanthus floridulus</i> (2)			--
	<i>Oryza sativa</i> (1)			[-]
	<i>Phalaris arundinacea</i> (3)		0	
	<i>Zea mays</i> (3)	--	+	0
Lauracées	<i>Cinnamomum camphora</i> (2)			++
Oxalidacées	<i>Oxalis latifolia</i> (3)	--	0	
Papilionacées	<i>Phaseolus vulgaris</i> (3)	0	0	
Solanacées	<i>Lycopersicon esculentum</i> (3)	[-]	+ [-]	0 [--]

NOTATIONS : (1) = tests effectués par CHOU et al. (1987)
 (2) = tests effectués par CHOU et al. (1989)
 (3) = tests effectués par FONTAR et THOMAS (1992)
 0 = pas d'effet significatif
 + ou - = stimule ou inhibe modérément (de moins de 25 %)
 ++ ou -- = stimule ou inhibe très sensiblement (de plus de 25 %)
 entre crochets sont indiqués les tests de germination

TEST DE GERMINATION

Préparation des solutions

- **Exsudats racinaires** : la solution est obtenue à partir d'un pot de kikuyu développé dans du sable, non arrosé pendant 6 jours puis arrosé à l'eau distillée pour obtenir 0.5 l de solution filtrée sur papier filtre.

- **Jus de macération** : l'extraction des composés chimiques peut se faire par macération dans l'eau froide, dans l'eau bouillante, à l'autoclave ou à l'aide de solvants, sur du matériel végétal séché ou vivant, entier ou broyé.

L'extraction à l'eau froide est celle qui se rapproche le plus des conditions naturelles. Par contre, l'extraction à l'eau bouillante, à l'autoclave ou à l'aide de solvants augmente la diffusion des substances chimiques dans la phase liquide et permet l'extraction d'un grand nombre de molécules chimiques qui ne seraient pas libérées naturellement, d'où un risque d'amplification des phénomènes (PUTNAM et DUKE, 1978). Par ailleurs, l'eau froide préserve les composés thermosensibles.

Nous avons choisi de travailler sur du matériel végétal frais entier (effet de la plante vivante, installée) et sec broyé (effet des pailles et résidus séchés au champ après une éventuelle destruction de la couverture). L'utilisation de végétal broyé, bien que moins proche des conditions naturelles de libération de substances par les plantes, a l'avantage d'offrir un meilleur contact entre le végétal et l'eau, donc une meilleure libération des composés chimiques.

Jus de macération de parties aériennes fraîches :

Des feuilles et tiges de kikuyu sont prélevées dans une parcelle bien développée, coupées en fragments de 10-15 cm et immergées dans l'eau froide pendant 24 h à 25°C à raison de 5 ml d'eau/g de végétal (Sachant que le kikuyu contient environ 70 % d'eau, cette concentration correspond à un jus à 4 % en masse sèche). Le jus est ensuite filtré sur papier.

Jus de macération de parties aériennes séchées :

La poudre utilisée est celle préparée par FONTAR et THOMAS (1992) selon la méthode décrite ci-dessous, le temps de récolte et de séchage étant trop important pour être reconduit durant le stage. Les parties aériennes fraîches de kikuyu sont coupées en fragments de 10-15 cm et séchées à l'étuve à 50°C pendant une semaine. Cette température peu élevée est nécessaire afin de ne pas dénaturer les éventuelles molécules chimiques thermosensibles impliquées dans l'allélopathie. Les fragments sont ensuite broyés.

La poudre est immergée dans de l'eau froide pendant 24 h à 25°C à raison de 4 g/100 ml d'eau, soit un jus à 4 % [cette concentration correspond à la pression osmotique minimale inhibant la germination : 150 milliosmoles (PUTNAM et TANG, 1986)]. Le jus est alors filtré sur papier filtre.

Des solutions à 1, 2, 3 % sont préparées par dilution de la solution à 4 %.

Les jus sont préparés la veille et conservés à 4°C.

RESULTATS DES TESTS DE GERMINATION DE LA TOMATE SUR PAPIER

Test de NEWMAN et KEL.L. au seuil de risque 0,01

22/6			23/6			24/6			25/6		
trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes
F	39	A	F	48,75	A	F	56,5	A	Ex	65,25	A
S1	16	B	S1	39,25	A B	S1	48,5	A	T	64,75	A
S2	8,75	C	Ex	29,75	B	T	44,5	A	F	64	A
Ex	7	C	T	26,5	B C	S2	42,75	A	S1	60,25	A
T	5,25	C	S2	27,25	B C	Ex	42,5	A	S2	57,25	A
S4	3,25	C	S3	15	C	S3	26,25	B	S3	50	A
S3	4,5	C	S4	14,5	C	S4	20	B	S4	32,25	B

26/6			27/6			28/6			29/6		
trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes
Ex	65,25	A	Ex	71,75	A	Ex	73	A	Ex	75,5	A
T	64,75	A	T	69,5	A	T	70,5	A	T	72,25	A
F	64	A	F	66	A	F	66,75	A	F	67	A
S1	60,25	A	S1	65	A	S1	65,5	A	S1	67	A
S2	57,25	A	S2	62,25	A	S2	62,5	A	S2	63,25	A
S3	50	A	S3	57,5	A	S3	59,25	A	S3	62,5	A
S4	32,25	B	S4	40,25	B	S4	42,75	B	S4	45	B

30/6			L7			27			37		
trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes
Ex	76	A	Ex	77	A	Ex	77	A	T	77	A
T	75	A	T	75,75	A	T	76	A	Ex	77	A
F	68,75	A	F	69,5	A	S3	72	A	S3	72	A
S1	67	A	S3	68,5	A	F	70,5	A	F	70,5	A
S2	64,75	A	S1	67,25	A	S1	67,25	A	S2	67,5	A
S3	63,25	A	S2	66,5	A	S2	67,25	A	S1	67,5	A
S4	49,25	B	S4	51,5	B	S4	54,5	B	S4	54,5	B

47			57			67			77		
trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes
T	78	A	T	79	A	T	80	A	T	80,25	A
Ex	77,25	A	Ex	77,25	A	Ex	77,5	A	Ex	77,5	A
S3	72	A	S3	72	A	S3	72	A	S3	72	A
F	70,75	A	F	70,75	A	F	71	A	F	71,25	A
S2	67,5	A	S2	68,25	A	S2	69	A	S2	69	A
S1	67,5	A	S1	67,5	A	S1	67,75	A	S1	67,75	A
S4	55	B	S4	55	B	S4	55,75	B	S4	55,75	B

trait.	% de P. A.	groupes homogènes
F	4,51	A
T	6,17	A
Ex	6,27	A
S1	7,11	A
S2	9,14	A
S3	18,56	B
S4	29,55	C

Notations: T = témoin (eau distillée)

Ex = exsudats racinaires de kikuyu

F = jus de macération de parties aériennes fraîches de kikuyu

S1 = jus de macération à 1 % de parties aériennes séchées de kikuyu

S2 = jus de macération à 2 % de parties aériennes séchées de kikuyu

S3 = jus de macération à 3 % de parties aériennes séchées de kikuyu

S4 = jus de macération à 4 % de parties aériennes séchées de kikuyu

trait. = différents traitements

% de germi. = pourcentages moyens de germination pour 8 répétitions

% de P. A. = pourcentages moyens de plantules anormales pour 8 répétitions

RESULTATS DES TESTS DE GERMINATION DE LA TOMATE SUR SABLE

Test de NEWMAN et KEUL au seuil de risque 0,01

3JAS			4JAS			5JAS			6JAS		
trait.	% de germi.	groupes homogènes	trait.	% de germi.	groupes homogènes	trait.	% de germi.	groupes homogènes	trait.	% de germi.	groupes homogènes
T	51,63	A	T	70,63	A	T	79,00	A	S2	88,50	A
S2	33,00	B	S4	58,00	B	S2	77,50	A	S4	88,00	A
S4	27,75	B	S2	56,75	B	S4	76,25	A	T	87,30	A
S6	14,00	C	S6	28,25	C	S6	48,25	B	S6	65,00	B
S8	8,75	C	S8	21,75	C	S8	39,50	B	S8	61,50	B

7JAS			8JAS			9JAS			10JAS		
trait.	% de germi.	groupes homogènes	trait.	% de germi.	groupes homogènes	trait.	% de germi.	groupes homogènes	trait.	% de germi.	groupes homogènes
S2	91,25	A	S4	94,00	A	S2	96,00	A	S2	96,00	A
S4	91,25	A	S2	93,75	A	S4	95,50	A	S4	95,50	A
T	90,13	A	T	92,25	A	T	94,50	A	T	94,50	A
S6	79,25	B	S6	82,25	B	S6	85,50	B	S8	88,25	B
S8	72,75	C	S8	79,00	B	S8	84,50	B	S6	87,75	B

11JAS			12JAS			13JAS			14JAS		
trait.	% de germi.	groupes homogènes	trait.	% de germi.	groupes homogènes	trait.	% de germi.	groupes homogènes	trait.	% de germi.	groupes homogènes
S2	96,00	A	S2	96,00	A	S2	96,00	A	S2	96,25	A
S4	95,50	A	T	95,50	A	T	95,50	A	S4	96,00	A
T	95,00	A	S4	95,00	A	S4	95,75	A	T	95,50	A
S8	88,50	B	S6	89,25	B	S6			S6		
S6	89,25	B	S8	89,75	B	S8			S8		

trait.	% de P. A.	groupes homogènes
T	2,47	A
S2	2,79	A
S4	3,87	A
S6		
S8		

Notations :

JAS = jour après semis

trait. = différents traitements

T = témoin (eau distillée)

S2 = jus de macération à 2 % de parties aériennes séchées

S4 = jus de macération à 4 % de parties aériennes séchées

S6 = jus de macération à 6 % de parties aériennes séchées

S8 = jus de macération à 8 % de parties aériennes séchées

% de germi. = pourcentages moyens de germination pour 8 répétitions

% de P. A. = pourcentages moyens de plantules anormales pour 8 répétitions

RESULTATS DES TESTS DE GERMINATION DE PIQUANT SUR PAPIER

Test de NEWMAN et KEUL au seuil de risque 0,01

18/6			19/6			20/6			21/6		
trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes
T	1,5	A	T	1,75	A	T	2	A	T	2	A
Ex	1,5	A	F	1,75	A	F	1,75	A	F	2	A
F	1,5	A	Ex	1,5	A	Ex	1,5	A	Ex	1,5	A
S1	0,75	A	S1	0,75	A	S1	0,75	A	S1	1	A
S2	0,25	A	S2	0,75	A	S2	0,75	A	S2	0,75	A
S3	0,25	A	S3	0,5	A	S3	0,5	A	S3	0,5	A
S4	0	A	S4	0,25	A	S4	0,5	A	S4	0,5	A

22/6			23/6			24/6			25/6		
trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes
F	2,25	A	F	2,5	A	T	3	A	T	3	A
T	2	A	Ex	2,5	A	Ex	2,5	A	Ex	2,5	A
Ex	1,75	A	T	2,25	A	F	2,5	A	F	2,5	A
S1	1	A	S2	1,5	A	S2	1,5	A B	S2	1,75	A B
S2	1	A	S1	1,25	A	S1	1,25	A B	S1	1,25	A B
S3	0,75	A	S3	0,75	A	S3	0,75	B	S3	0,75	B
S4	0,5	A	S4	0,5	A	S4	0,5	B	S4	0,5	B

26/6			27/6		
trait.	% de germ.	groupes homogènes	trait.	% de germ.	groupes homogènes
T	3	A	T	3	A
Ex	2,5	A	Ex	2,5	A
F	2,5	A	F	2,5	A
S2	1,75	A B	S2	1,75	A B
S1	1,25	A B	S1	1,25	A B
S3	0,75	B	S3	0,75	B
S4	0,5	B	S4	0,5	B

Notations : T = témoin (eau distillée)

Ex = exsudats racinaires de kikuyu

F = jus de macération de parties aériennes fraîches de kikuyu (5 ml/g)

S1 = jus de macération à 1 % de parties aériennes séchées de kikuyu

S2 = jus de macération à 2 % de parties aériennes séchées de kikuyu

S3 = jus de macération à 3 % de parties aériennes séchées de kikuyu

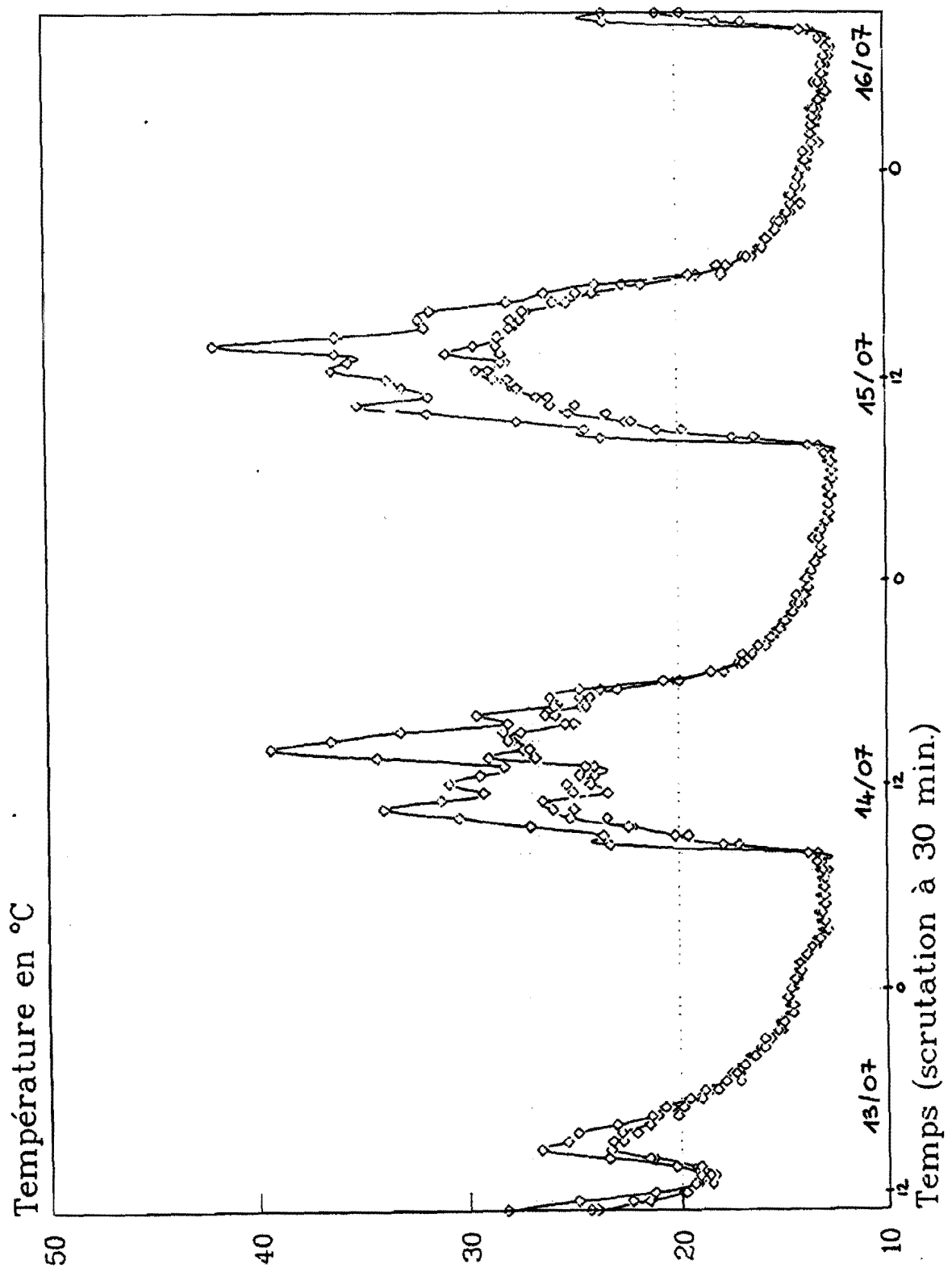
S4 = jus de macération à 4 % de parties aériennes séchées de kikuyu

trait. = différents traitements

% de germi. = pourcentages moyens de germination pour 8 répétitions

COURBE THERMIQUE EN SERRE
*obtenue à partir de thermocouples type K (chrome-aluminium)
connecté sur un central d'acquisition CAMPBELL 21 X*

Période du 13/7 au 16/7



TEST DE CROISSANCE EN CIRCUIT FERMÉ

Préparation de la solution nutritive

Le rôle de la solution nutritive est d'apporter l'eau, les éléments minéraux et les oligo-éléments nécessaires aux plantes se développant sur un substrat inerte isolé du sol. Il existe plusieurs types de solutions nutritives pour culture hors sol basées sur la mise à la disposition des plantes d'une solution équilibrée ioniquement et calculée d'après des études physiologiques et la composition des végétaux (méthode COIC-LESAIN, INRA).

Sur les conseils de M. B. LEROY (Société Sandhy, Saint-Leu), l'équilibre obtenu est :

N : 16 meq	P : 0,85 meq	K : 5,11 meq
Ca : 6,6 meq	Mg : 1,5 meq	

La formulation est déterminée à partir de trois paramètres :

- une concentration choisie en azote,
- un équilibre N, P, K,
- un rapport $(K/Ca+Mg) = 0,63$.

Les engrais utilisés sont tous parfaitement hydrosolubles :

- Hakaphos plus (N : 14 %, P : 6 %, K : 24 %, Mg : 3 %) à raison de 1 kg/m^3 d'eau,
- Nitrate de chaux (15,5 % d'N), 541 g/m^3 d'eau,
- Fetrilon combi (mélange d'oligo-éléments), 7 g/m^3 d'eau.

Il n'est pas nécessaire de séparer le calcium et le phosphore en deux solutions car les concentrations sont suffisamment faibles pour éviter une quelconque précipitation. Par contre, il faut dissoudre Hakaphos (contenant du phosphore) et le nitrate de chaux (calcium) dans une grande quantité d'eau lors de la préparation.

La solution obtenue possède une conductivité de 1,98 à 2,20 mS (milli-Sièmes), le pH est ajusté à 5,8 par addition d'acide phosphorique.

Cette solution peut se conserver 2 mois à température ambiante en prenant soin de bien la mélanger avant chaque utilisation.

RESULTATS DES TESTS DE CROISSANCE*Exsudats racinaires : test en circuit fermé*

Test de NEWMAN et KEULS aux seuils de risque 0,05 et 0,01

TOMATE

Mesures	Témoin	Test
Hauteur (cm)	47,4	43,3
Nb feuilles	42,3	45,7
Nb tiges	12,1	10,2 *
Nb inflorescences	9,8	11,8
MS racines (g)	4,2	4,7
MS parties aériennes (g)	22,1	21,4
MS totale (g)	26,3	26,1

PIQUANT

Mesures	Témoin	Test
Hauteur (cm)	51,3	52,2
Nb feuilles	97,8	90
Nb tiges	13	11,7 *
Nb inflorescences	13,3	17,3
MS racines (g)	2,2	1,4 **
MS parties aériennes (g)	9,2	6,4 **
MS totale (g)	11,4	7,8 **

OUMINE

Mesures	Témoin	Test
Nb tiges	22,3	18,3
MS racines (g)	2,1	2,16
MS parties aériennes (g)	2,36	1,88
MS totale (g)	4,45	4,04

Association KIKUYU-TOMATE

Mesures	Témoin	Test
MS racines (g)	4,8	6
MS parties aériennes (g)	10,2	8
MS totale (g)	15	14

Association KIKUYU-PIQUANT

Mesures	Témoin	Test
MS racines (g)	4,8	4
MS parties aériennes (g)	10,2	9
MS totale (g)	15	13

KIKUYU-OUMINE

Mesures	Témoin	Test
MS racines (g)	4,8	6,7
MS parties aériennes (g)	10,2	10
MS totale (g)	15	16,7

Notations : toutes les mesures sont des moyennes déterminées à partir de 10 plants par traitement

Hauteur : hauteur moyenne d'un plant, exprimée en centimètres

Nb feuilles : nombre moyen de feuilles par plant

Nb tiges : nombre moyen de tiges par plant

Nb inflorescences : nombre moyen d'inflorescences par plant

MS racines : matière sèche moyenne, exprimée en grammes, des racines par plant

MS parties aériennes : matière sèche moyenne, exprimée en grammes, des parties aériennes par plant

MS totale : matière sèche moyenne totale par plant, exprimée en grammes

Témoin : mesures pour des plants cultivés seuls

Test : mesures pour des plants cultivés en association avec un autre végétal

* : résultat différent du témoin au seuil de risque 0,05 (test de NEWMAN et KEULS)

** : résultat différent du témoin au seuil de risque 0,01 (test de NEWMAN et KEULS)

Lessivage de parties aériennes : test en pots

Test de NEWMAN et KEULS aux seuils de risque 0,05 et 0,01

TOMATE

Mesures	Témoin	Test F	Test S
Hauteur (cm)	23,8	24,2	22
Nb feuilles	10,6	10,2	9,7
Nb inflorescences	1,9	1,8	1,6
MS racines (g)	0,75	0,65	0,67
MS parties aériennes (g)	1,55	1,41	1,4
MS totale (g)	2,3	2,06	2,07

PIQUANT

Mesures	Témoin	Test F	Test S
Hauteur (cm)	14,6	7,9 **	7 **
Nb feuilles	36,9	22,2 **	18,4 **
Nb tiges	7,4	4,8 **	4,4 **
Nb inflorescences	0,7	0,2 **	0,3 **
MS racines (g)	0,22	0,14 **	0,11 **
MS parties aériennes (g)	0,57	0,27 **	0,21 **
MS totale (g)	0,79	0,41 **	0,33 **

OUMINE

Mesures	Témoin	Test F	Test S
Nb tiges	18,9	16,9 *	14,4 **
MS racines (g)	1,39	0,72 **	0,62 **
MS parties aériennes (g)	1,1	0,79 **	0,77 **
MS totale (g)	2,49	1,51 **	1,39 **

Notations : toutes les mesures sont des moyennes déterminées à partir de 10 plants par traitement

Hauteur : hauteur moyenne d'un plant, exprimée en centimètres

Nb feuilles : nombre moyen de feuilles par plant

Nb tiges : nombre moyen de tiges par plant

Nb inflorescences : nombre moyen d'inflorescences par plant

MS racines : matière sèche moyenne, exprimée en grammes, des racines par plant

MS parties aériennes : matière sèche moyenne, exprimée en grammes, des parties aériennes par plant

MS totale : matière sèche moyenne totale par plant, exprimée en grammes

Témoin : mesures pour des plants arrosés avec eau et solution nutritive

Test F : mesures pour des plants arrosés avec jus de macération de parties aériennes fraîches (5ml/g) et solution nutritive

Test S : mesures pour des plants arrosés avec jus de macération de parties aériennes séchées (4 %) et solution nutritive

* : résultat différent du témoin au seuil de risque 0,05 (test de NEWMAN et KEULS)

** : résultat différent du témoin au seuil de risque 0,01 (test de NEWMAN et KEULS)

MÉTHODE D'ANALYSE DES CONSTITUANTS HYDROSOLUBLES DU KIKUYU PAR DOSAGE HPLC

Principe de calcul

Bien que la méthode de l'étalon interne soit applicable dans ce dosage, l'utilisation de l'acide acétylsalicylique (étalon interne) s'est révélée compromettante du fait de son temps de rétention proche de l'acide p-coumarique, modifiant considérablement l'aire recherchée. Nous avons donc décidé de travailler sans l'étalon interne car nous ne recherchons pas une grande précision dans nos résultats.

La quantité m d'un constituant dans un volume défini (500 μ l) de solution est proportionnelle à l'aire A obtenue sur le chromatogramme :

$$m \text{ (g)} = k * A \quad \text{ou} \quad c \text{ (g/l)} * V \text{ (l)} = k * A$$

k étant un facteur de proportionnalité constant pour un même constituant injecté dans un appareil défini.

Dans la solution de référence, pour un composé, nous avons : $c_r * V_r = k * A_r$

Dans l'extrait : $c * V = k * A$

$$\text{d'où} \quad \frac{c_r * V_r}{A_r} = \frac{c * V}{A} \quad \text{et} \quad c = \frac{c_r * V_r * A}{A_r * V}$$

Or $V_r = V$, puisque le même volume de solution de référence et d'extrait est injecté, donc :

$$c = \frac{c_r * A}{A_r}$$

Nous pouvons donc calculer la concentration de chaque composé dans les échantillons injectés. Plusieurs injections de chaque extrait ont donné des chromatogrammes présentant des surfaces de pics sensiblement égales pour un même composé. Pour chaque substance, nous avons utilisé la moyenne des surfaces de toutes les répétitions d'injection d'un extrait.

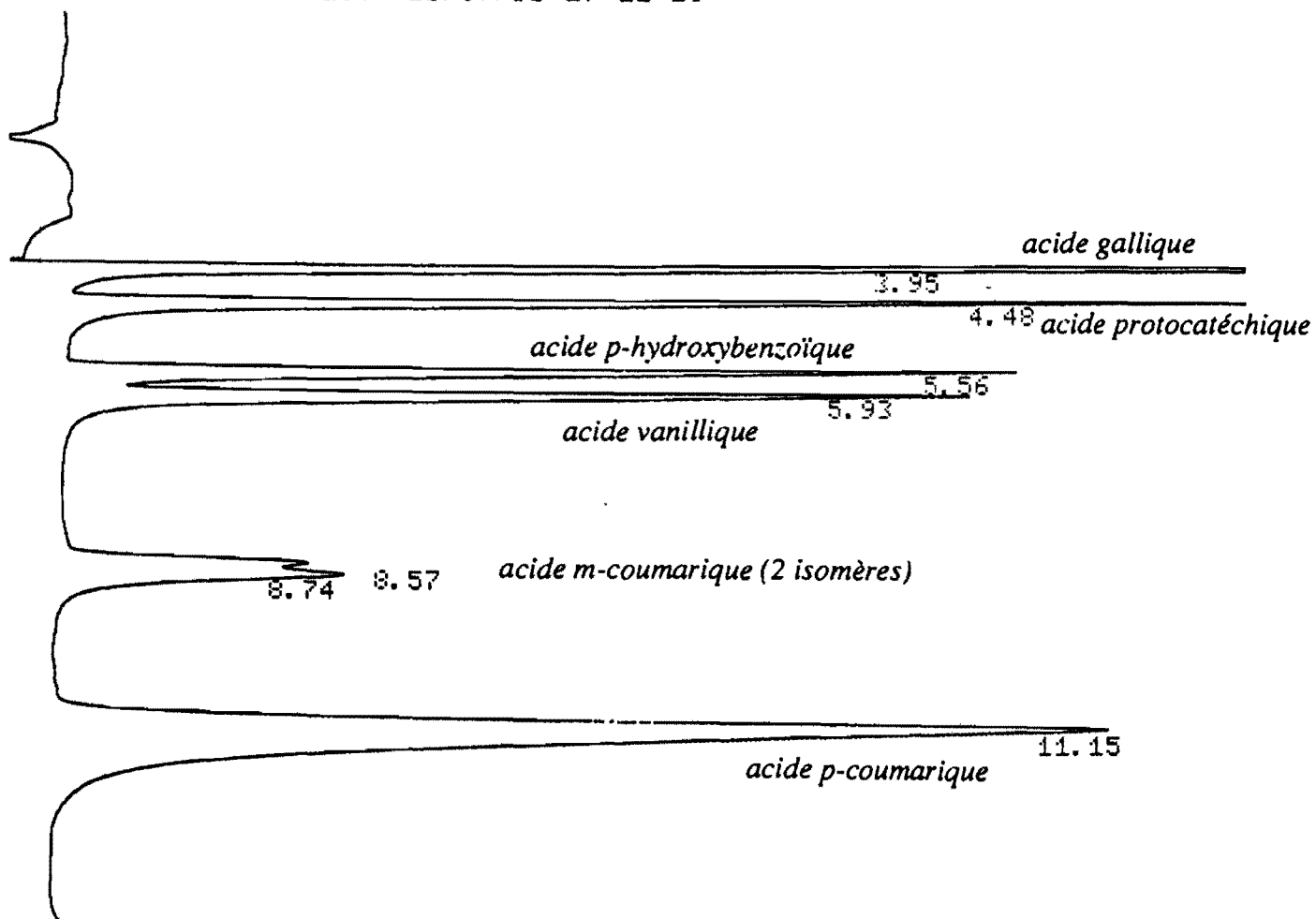
composés	temps de rétention (mn)	surface sol. de référence	c_r (mg/l)	masse molaire (g/mole)	surfaces moyennes des extraits de parties aériennes	surfaces moyennes des extraits de racines
a. gallique	3,84 à 4,01	1750540	10	170,1	478162	279569
a. protocatéchique	4,32 à 4,76	1757894	5	154,1	784934	351897
a. p-hydroxybenzoïque	5,36 à 5,62	1666588	2,5	138,1	543213	3318235
a. vanillique	5,93 à 6,04	1594488	5	168,1	-	-
a. m-coumarique	8,17 à 9,21	1040387	10	164,2	781708	1889001
a. p-coumarique	10,17 à 11,71	4037013	10	164,2	721238	1848300

L'extrait est dilué une fois avec de l'eau distillée, les teneurs en composés sont donc deux fois plus faibles. Nous exprimons les résultats en μ mole/g de kikuyu, sachant que 12,5 g sont contenus dans 5 ml.

CHROMATOGRAMME DE LA SOLUTION DE RÉFÉRENCE

CHANNEL A

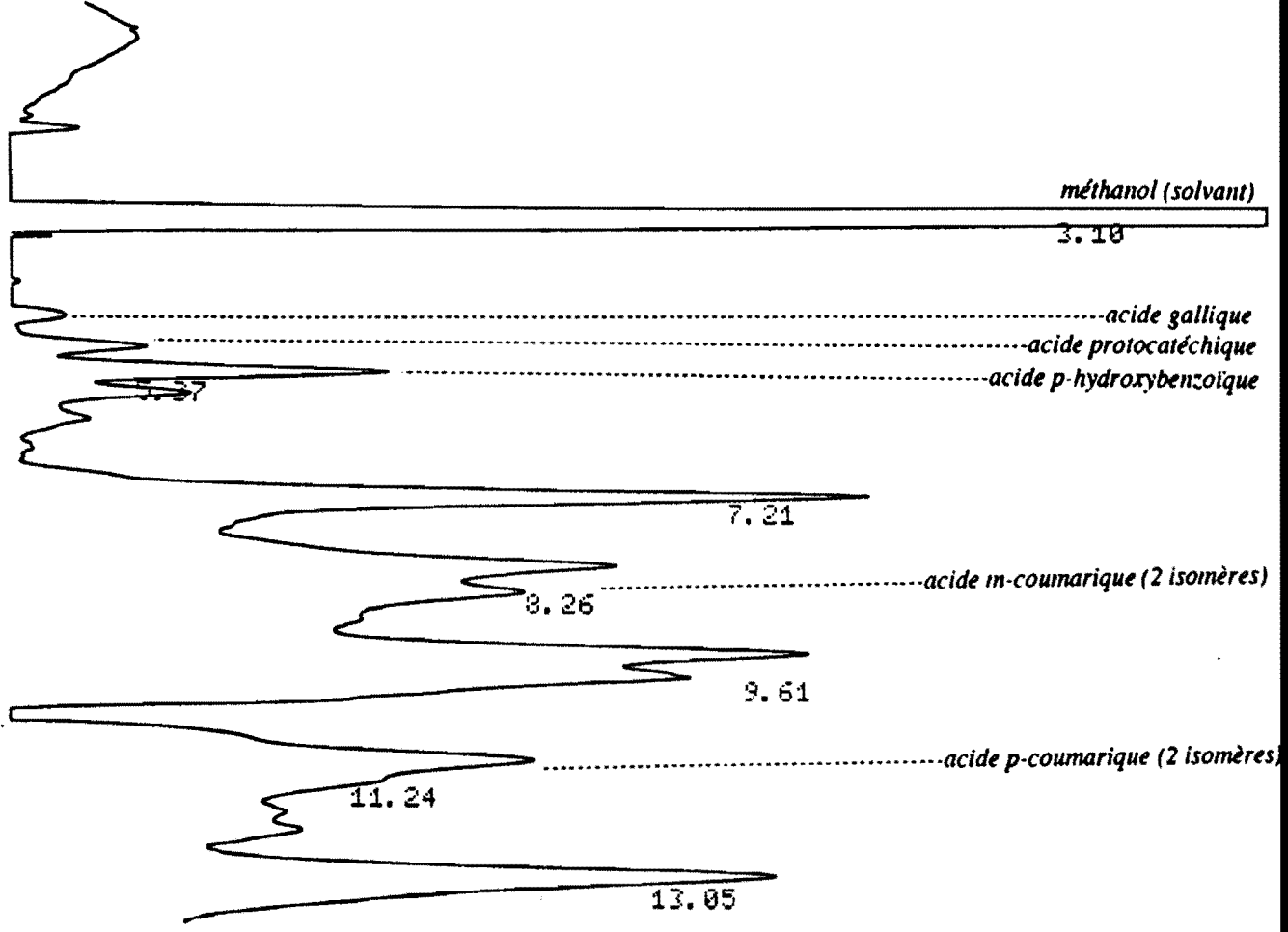
INJECT 13/07/93 17:12:15

**Conditions expérimentales pour l'ensemble des injections :**

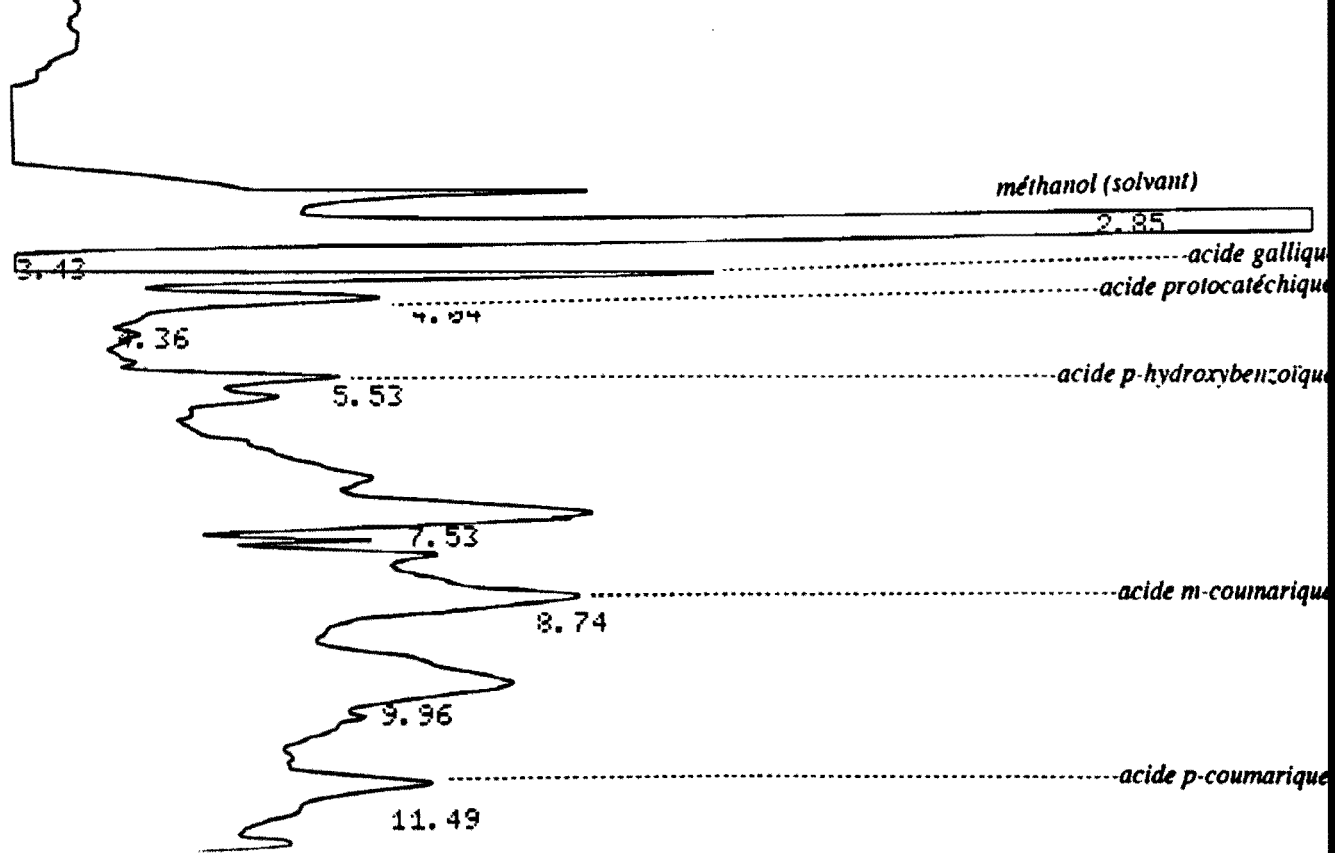
- Colonne RP 18
- Phase mobile : acétonitrile (20 %)
acide acétique 10^{-2} M (80 %)
- Débit : 1 ml/mn
- Détection : 254 nm
- Injection : boucle 500 μ l

CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE JUS DE MACÉRATION DES PARTIES AÉRIENNES DE KIKUYU

CHANNEL A INJECT 13/07/93 18:37:55

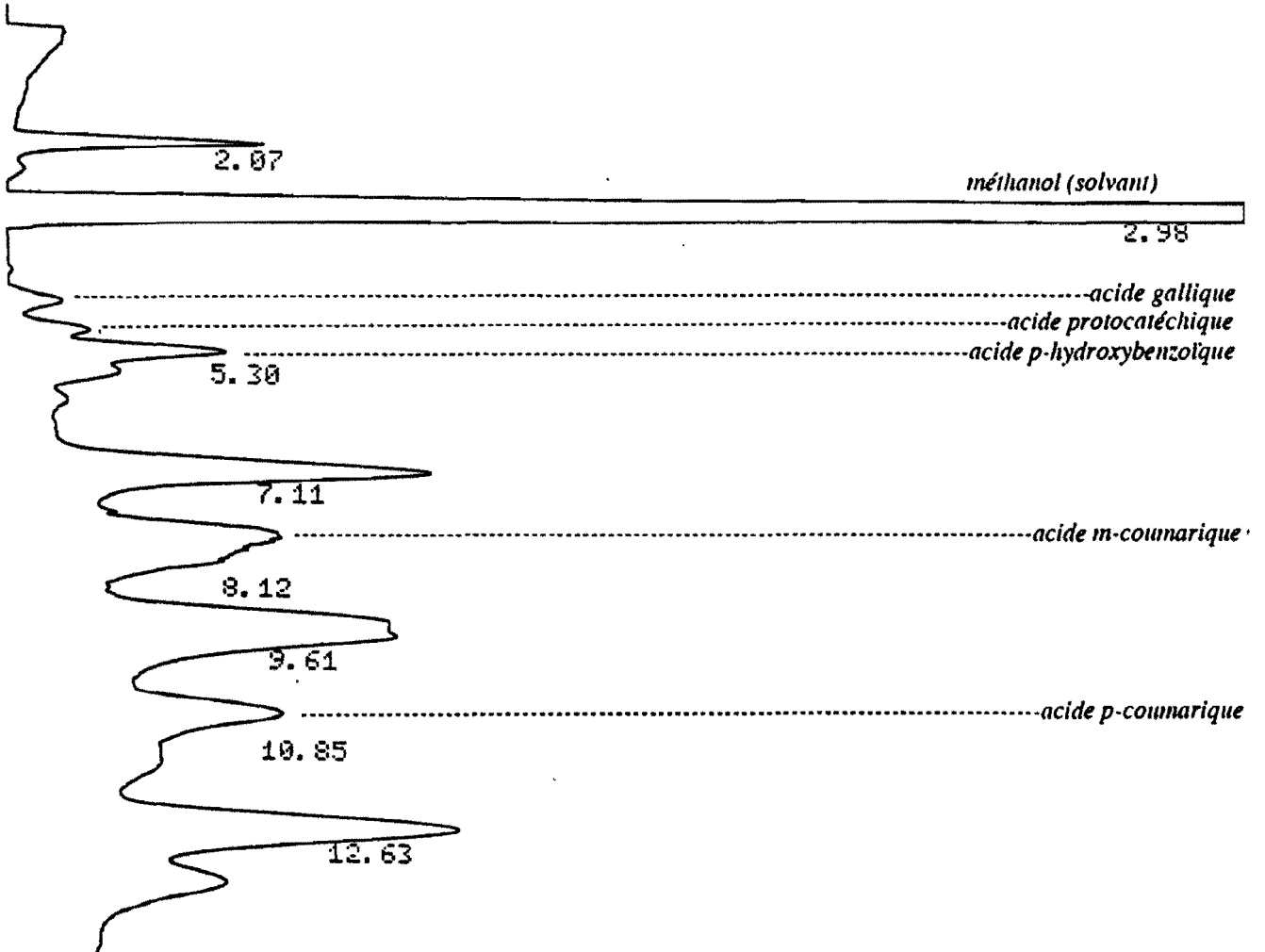


CHANNEL A INJECT 13/07/93 19:22:10



CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS DE JUS DE MACÉRATION
DES RACINES DE KIKUYU

CHANNEL A INJECT 13/07/93 16:54:48



CHANNEL A INJECT 13/07/93 15:26:46

