

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

ORSTOM - Dakar
Microbiologie du sol

INRA - Nancy
Microbiologie forestière

THESE

présentée
à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le titre de :

Docteur de l'USTL
en Physiologie et Biologie des Organismes et des Populations

par

Amadou Moustapha BA

**Contribution à l'étude de la symbiose ectomycorhizienne chez deux essences
forestières d'Afrique intertropicale :**
Afzelia africana Sm. et *Uapaca guineensis* Müll.Arg.

Soutenue publiquement le 30 Janvier 1990
devant la Commission d'examen :

MM. J.d'AUZAC	Professeur à l'USTL de Montpellier II, Président
J.DEXHEIMER	Professeur à l'Université de Nancy I, Examineur
J.J.MACHEIX	Professeur à l'USTL de Montpellier II, Examineur
H.G.DIEM	Directeur de Recherches au C.N.R.S., Nogent sur Marne, Rapporteur
B.L.DREYFUS	Directeur de Recherches à l'O.R.S.T.O.M., Dakar, Rapporteur
J.GARBAYE	Directeur de Recherches à l'I.N.R.A., Nancy, Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de Microbiologie du sol de l'O.R.S.T.O.M.-Dakar, de Microbiologie forestière de l'I.N.R.A.- Nancy et de Biologie des ligneux de l'Université de Nancy I. J'exprime ici toute ma reconnaissance et mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce travail et en particulier :

A Monsieur B.L.DREYFUS responsable du laboratoire de Microbiologie du sol de l'O.R.S.T.O.M - Dakar qui m'a donné les moyens de débiter et de poursuivre une activité de recherche. Sans sa grandeur d'esprit ce travail n'aurait pas vu le jour. Je suis honoré qu'il ait accepté de juger cette thèse.

A Monsieur J.GARBAYE qui m'a dirigé pour la réalisation de ce travail lors de mon séjour à Nancy en me faisant bénéficier de ses grandes compétences et de sa disponibilité.

A Monsieur J.d'AUZAC qui a dirigé mes tous premiers pas dans la recherche, qui m'a aidé à être en contact avec l'administration de l'USTL et qui m'a fait l'honneur d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

A Monsieur F.LE TACON Directeur de recherches et responsable du laboratoire de Microbiologie forestière de l'I.N.R.A - Nancy qui a bien voulu m'accueillir avec sympathie.

A Monsieur J.DEXHEIMER responsable du laboratoire de Biologie des ligneux qui a bien voulu m'accueillir avec sympathie et me faire bénéficier de ses grandes connaissances. Je suis honoré de sa présence dans ce jury de thèse.

A Monsieur H.G.DIEM, rapporteur, qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

A Monsieur J.J.MACHEIX qui m'a fait l'honneur de participer dans ce jury de thèse.

A Monsieur D.THOEN Directeur de recherches à la F.U.L (Fondation Universitaire Luxembourgeoise) qui aurait pu être le septième membre de ce jury et avec qui j'ai eu grand plaisir à travailler.

A Monsieur F.F.LAPEYRIE Chargé de recherches à l'I.N.R.A - Nancy pour sa disponibilité, ses précieux conseils et pour ses critiques du texte.

A Monsieur F.MARTIN Directeur de recherches à l'I.N.R.A - Nancy pour son aide et son sens critique.

Mes remerciements vont également à Monsieur DALMEYRAC (Directeur du centre O.R.S.T.O.M.-Dakar) et à mes collègues à l'O.R.S.T.O.M , Ibrahima, Jean Marc, Simon, Philippe, Jean Paul, Tominke, Bassirou et Didier

J'exprime également ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont fait bénéficier de leur aide technique et plus particulièrement à :

S.Ndiaye, J.L.Churin, D.Vairelles, M.Niang, S.Dedhiou, M.Sagna, C.Delaruelle, A.Konté, C.Bréchet, N.Catania, Y.Corbery, J.Gerard, C.Morel, D.Perrin et D.Bouchard.

J'aurais une pensée particulière pour Mr.Duponnois qui a contribué à la mise en forme de ce mémoire.

Je ne saurais oublier de remercier tous mes amis et collègues de Nancy : Robin, Alain, Laurent, Wei, Jean-Luc, Cathy, Béné, Christine, Amar, Violaine, Ding Hong, Valerie, Yamina, Eric, Emmanuelle, Jean-Louis, Mohamed et Guy.

A mon très cher père pour son soutien constant.

A ma très chère mère pour son affection.

A mes très chers frères et soeurs pour leur aide et leur patience.

Abréviations

A.h: *Acacia holosericea*

_____ la barre représente 1 μm

b : bactéries

c : cytoplasme

cc : cylindre central

Cc : cellule corticale

cf : coiffe

ci : ciment

cm : cordon mycélien

cmt : cellule morte

cp : composés phénoliques

ct : cellule à tanins

d : dolipore

dp : digitations pariétales

E.c : *Eucalyptus camaldulensis*

h : hyphe

hd : hyphe dégénérée

m : manteau

ma : méristème apical

mp : matériel pariétal

ml : médula

mt : mitochondrie

p : paroi

pa : poil absorbant

pp : polyphosphate

pl : planche

PI : papilles

PNBC : Parc National de Basse Casamance

P.t : *Pisolithus tinctorius*

rH : réseau de Hartig

s : spinule

S.d : *Scleroderma dictyosporum*

sl : sclérotés

t : tanin

TCH : thiocarbohydrazide

v : vacuole

Sommaire

	page
1ère Partie	
Introduction générale	1
1- Considérations générales sur la symbiose mycorhizienne.....	2
2- Quelques indications sur la mycorhization contrôlée des essences introduites en zone tropicale.....	3
3- Statut mycorhizien des forêts tropicales naturelles.....	3
2ème Partie	
Chapitre 1	10
1- Introduction.....	11
2- Présentation du matériel végétal.....	11
2.1- <i>Afzelia africana</i> Sm.....	11
2.2- <i>Uapaca guineensis</i> Müll.Arg.....	12
3- Description des sites.....	13
4- Identification et isolement des souches indigènes issues des carpophores.....	13
4.1- Identification.....	13
4.2- Isolement.....	13
4.3- Résultats et Discussion.....	14
5- Isolement et identification des isolats issus des mycorhizes.....	18
5.1- Isolement.....	18
5.2- Identification.....	18
5.3- Résultats et Discussion.....	19
6- Isolement et identification des isolats issus des sclérotés.....	26
6.1- Isolement.....	26
6.2- Identification.....	27
6.3- Résultats et Discussion.....	27

Chapitre 2	43
1- Introduction.....	44
2- Matériel et Méthodes.....	45
2.1- Germination et obtention de plants stériles.....	45
2.1.1- Description de la graine.....	45
2.1.2- Origine et provenance des graines.....	45
2.1.3- Paramètres caractérisant la germination.....	45
2.1.4- Désinfection des graines.....	45
2.2- Matériel fongique.....	46
2.3- Détermination de l'âge d'apparition des racines latérales.....	46
2.4- Synthèse axénique.....	46
2.4.1- Synthèse en tube.....	49
2.4.1.1- Inoculation par des implants mycéliens.....	49
2.4.1.2- Inoculation par une suspension mycélienne.....	49
2.4.2- Synthèse en boîte de Petri.....	50
2.5- Synthèse non axénique.....	50
2.5.1- Synthèse en minirhizotron.....	50
2.5.2- Synthèse en sachet plastique.....	50
2.6- Observation de la structure et de l'ultrastructure des mycorhizes.....	51
2.6.1- Fixation.....	51
2.6.2- Déshydratation et inclusion.....	51
2.6.3- Coupes.....	51
2.6.4- Cytochimie.....	52
2.6.4.1- Test PATAg.....	52
3- Résultats et Discussion.....	52
 Chapitre 3	 70
1- Introduction.....	71
2- Matériel et Méthodes.....	73

2.1- Piégeage des souches fongiques indigènes.....	73
2.1.1- Conditions de culture.....	73
2.1.2- Quantification de l'infection ectomycorhizienne.....	74
3.1.3- Observation et caractérisation des mycorhizes.....	74
2.2- Détermination des sucres solubles des racines latérales des plants d' <i>A.africana</i> agés de 1 à 4 mois.....	74
2.3- Etude du potentiel infectieux du sol.....	75
2.3.1- Dénombrement des propagules.....	75
2.3.2- Vérification de l'aptitude mycorhizogène des propagules.....	75
2.3.3- Quantification de l'infection par les propagules.....	76
2.4- Etude de l'influence des cotylédons.....	76
2.4.1- Influence des cotylédons dans les expériences du piégeage.....	76
2.4.2- Influence des cotylédons sur la croissance et la mycorhization d' <i>Afzelia</i>	76
2.4.3- Observation des mycorhizes de synthèse.....	77
2.4.4- Influence des cotylédons sur la teneur en sucres des racines latérales d' <i>Afzelia</i>	77
2.4.4.1- Préparation des échantillons.....	77
2.4.4.2- Obtention de l'extrait végétal.....	78
2.4.4.3- Dosage du glucose.....	78
2.4.4.3.1- Principe.....	78
2.4.4.3.2- Mode opératoire.....	78
2.4.4.4- Dosage du saccharose.....	79
2.4.4.4.1- Principe.....	79
2.4.4.4.2- Mode opératoire.....	79
2.4.4.5- Dosage des hexoses réducteurs.....	79
2.4.4.5.1- Principe.....	79
2.4.4.5.2- Mode opératoire.....	79
3- Résultats et Discussion.....	80
Chapitre 4	122
1- Introduction.....	123

1.1- Quelques indications sur la spécificité et la reconnaissance dans les interactions plantes-microorganismes symbiotiques ou pathogènes.....	123
1.2- Spécificité et reconnaissance chez les ectomycorhizes.....	124
2- Matériel et Méthodes.....	126
2.1- Matériel végétal.....	126
2.2- Matériel fongique.....	127
2.3- Synthèse axénique.....	127
2.3- Techniques de microscopie électronique.....	128
2.3.1- Test PATAg.....	128
2.3.2- Réaction de SWIFT.....	128
2.3.4- Activités phosphatasiques acides.....	128
3- Résultats et Discussion.....	129
Chapitre 5	148
1- Introduction.....	149
2- Matériel et Méthodes.....	149
2.1- Le substrat.....	149
2.2- Dosage du phosphore assimilable du sol de Bezange (OLSEN <i>et al.</i> , 1954).....	150
2.2.1- Principe.....	150
2.2.2- Mode opératoire.....	150
2.2.3- Dosage.....	150
2.3- Matériel végétal.....	150
2.4- Préparation de l'inoculum solide.....	151
2.5- Fertilisation phosphatée.....	151
2.6- Dispositif et conditions de culture.....	151
2.7- Paramètres étudiés.....	152
2.8- Dosage du phosphore foliaire.....	153
3- Résultats et Discussion.....	153

3ème Partie

Conclusions générales..... 160

1- Elargissement des connaissances..... 160

2- Critiques méthodologiques et perspectives de travail..... 164

4ème Partie

Bibliographie..... 166

Annexes..... 188

Résumé..... 192

Summary..... 193

Introduction générale

1- Considérations générales sur la symbiose mycorhizienne

Le terme “mycorhize” désigne un organe mixte résultant de l’association symbiotique entre le mycélium d’un champignon et la racine d’une plante supérieure. MEYEN (1829) puis HARTIG et UNGER (1840) (cités par BOULLARD, 1968) ont observé pour la première fois des racines déformées qui ont été ensuite décrites comme des mycorhizes par FRANK (1885).

A l’exception de certaines familles comme les Crucifères, Chénopodiacées, Polygonacées, Cypéracées et Joncacées, la majorité des plantes présentent deux grands groupes de mycorhizes : les endomycorhizes et les ectomycorhizes. Dans le premier groupe, on peut distinguer les endomycorhizes à vésicules et à arbuscules (V.A.M) et les endomycorhizes à pelotons des Orchidacées, Gentianacées et Ericales (comprenant les familles des Arbutacées, Epacridacées, Pyrolacées, Monotropacées et Ericacées). Les V.A.M sont de loin les plus répandues et sont présentes dans 95% des espèces agricoles et forestières. Les champignons impliqués dans ce type d’association sont des Phycomycètes de la famille des Endogonacées. Ils se répartissent en quatre grands genres : *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, et *Sclerocystis* (GERDEMAN et TRAPPE, 1974). Les spores de 10 à 400 μm sont les organes les plus différenciés de ces champignons primitifs qui ne présentent pas de spécificité. Ils sont strictement symbiotiques car ne pouvant pas être cultivés en l’absence de la plante hôte. Chez ce type de mycorhize, non visible à l’oeil nu, le mycélium ne forme pas de manchon fongique autour de la racine. Les hyphes externes pénètrent dans la racine soit par les poils absorbants (BOULLARD, 1968), soit directement dans les cellules corticales à partir des appresoria (SCANNERINI et BONFANTE-FASOLO, 1982) ou plus rarement entre les cellules corticales (JACQUELINET-JEANMOUGIN, 1986). De cette infection résulte la formation des vésicules (rôle de stockage) dans les assises superficielles du cortex et des arbuscules (lieu des échanges entre les partenaires) dans les cellules du cortex les plus internes.

Certaines plantes ligneuses de la région tempérée et en particulier beaucoup d’arbres forestiers d’importance économique (Fagacées, Bétulacées, Salicacées, Tiliacées et Pinacées), vivent en symbiose avec des Basidiomycètes et des Ascomycètes dont le mycélium peut être mis en culture (Truffes, Bolets, Amanites, Sclérodermes, etc...). Il en résulte des ectomycorhizes qui constituent un type beaucoup plus différencié, varié et dont le champignon associé présente plusieurs niveaux de spécificité. Elles sont parfaitement visibles à l’oeil nu car le champignon forme un manchon autour des racines latérales. De ce manchon fongique partent des hyphes extramatricielles, qui augmentent le volume de sol exploré, et des hyphes qui s’insinuent entre les cellules du cortex pour former le réseau de Hartig. La pénétration qui s’effectue uniquement par voie intercellulaire, peut se limiter à la première assise superficielle

du cortex comme c'est le cas chez les eucalyptus (CHILVERS *et al.*, 1988) ou s'étendre à plusieurs couches du cortex jusqu'à l'endoderme chez les résineux (VOIRY, 1981). C'est au niveau du réseau de Hartig qu'ont lieu les échanges bidirectionnels entre les partenaires.

2- Quelques indications sur la mycorhization contrôlée des essences introduites en zone tropicale

L'introduction des pins tropicaux en Afrique intertropicale a été un échec jusqu'à ce que l'on se rende compte de la nécessité d'apporter simultanément le symbiote fongique d'abord accidentellement, puis sous forme d'humus des plantations précédentes ou de spores avant d'utiliser des cultures pures de champignons sélectionnés (VOZZO et HACKSKAYLO, 1971 ; MIKOLA, 1973 ; DELWAULLE *et al.*, 1982). De nombreux résultats ont montré l'effet bénéfique de la mycorhization contrôlée en pépinière ou dans les plantations de pins (EKWEBELAM, 1980 ; MARX, 1980 ; MOMOH et GBADEGESIN, 1980 ; DELWAULLE *et al.*, 1982 ; KABRE, 1982). Pour optimiser l'efficacité de la symbiose dans des écosystèmes à niveau de fertilité très faible, le choix des souches fongiques à la fois efficaces et capables de se maintenir après transplantation sur le terrain reste primordiale lors de l'introduction d'une essence d'un continent à un autre (GARBAYE *et al.*, 1988). Nous savons que, lorsqu'ils sont introduits en dehors de leur aire géographique, les eucalyptus sont généralement associés à des Gastéromycètes (*Pisolithus tinctorius* et *Scleroderma verrucosum*) (SINGH et KHUMAR, 1966 ; THAPAR *et al.*, 1967). Dans certains cas les souches fongiques introduites, en dépit du gain de productivité apporté à la plante hôte en pépinière, ne se maintiennent pas sur le terrain car elles sont supplantées par des souches locales (GARBAYE *et al.*, 1988). Le choix des souches fongiques, adaptées à l'essence (spécificité) et au climat, est importante lors de l'introduction d'une essence forestière (MALACJZUK *et al.*, 1989).

3- Statut mycorhizien des forêts tropicales naturelles

Alors qu'en zone tempérée la symbiose ectomycorhizienne affecte l'essentiel des arbres forestiers, au contraire la proportion d'arbres autochtones à ectomycorhizes actuellement connue est faible dans les forêts tropicales naturelles. Les inventaires forestiers indiquent de manière générale le peu d'espèces à ectomycorhizes et une prédominance des endomycorhizes à V.A. en milieu tropical. JANSE (1896) indique que sur 75 espèces examinées, 69 incluant toutes les dicotylédones ligneuses sont pourvues de V.A.M. JOHNSTON (1949) retrouve la même représentativité des V.A.M en Trinidad et Nigéria, REDHEAD (1968a) signale que sur 51 espèces végétales 3 seulement sont à ectomycorhizes. RAMBELLI (1971) puis REISS et RAMBELLI (1980) observent également la faible fréquence des espèces à ectomycorhizes. En Tanzanie, HÖGBERG et NYLUND (1981) puis HÖGBERG (1982) notent que sur 47 espèces

indigènes recensées 40 sont à V.A.M, 1 à ectendomycorhize et 6 à ectomycorhize. Au Cameroun, NEWBERY *et al.*, (1988) indiquent que sur 55 espèces végétales examinées, 32 sont à V.A.M et 23 à ectomycorhizes. Au Sénégal, THOEN, BA et DUCOUSSO (en préparation) montrent que sur une centaine d'essences forestières (exotiques ou indigènes) examinées, 2 essences indigènes sont à ectomycorhizes. Dans d'autres régions tropicales les résultats d'inventaire soulignent également une prédominance des V.A.M (THAPAR et KHAN, 1973 ; THOMAZINI, 1974 ; TUPAS et SAJISE, 1976 ; de ALWIS et ABEYNAYAKE, 1980). Des auteurs suggèrent que les V.A.M seraient répandues dans les forêts riches en espèces et sur des sols de fertilité moyenne alors que les ectomycorhizes se rencontrent dans des forêts où la diversité en espèces est pauvre dans des sols à niveau de fertilité très faible (MALLOCH *et al.*, 1980 ; JANOS, 1983)

Le tableau (1) fait le point de l'état actuel des connaissances sur les espèces indigènes à ectomycorhizes en Afrique intertropicale. Les Légumineuses, en particulier la sous famille des Cesalpinioideae, représentées surtout par des arbres importants sur le plan commercial, comporte l'essentiel des essences forestières à ectomycorhizes. NEWBERY *et al.*(1988) ont montré que, dans cette sous famille, 73% des espèces sont à ectomycorhizes et seulement 33% à V.A.M. Une prédominance des espèces à ectomycorhizes chez les Cesalpinioideae a été également observée en Thaïlande (CHALEMPONGSE, 1984). Chez les Papilionioideae, où les arbres et arbustes sont rares par rapport au nombre de plantes herbacées, une seule espèce à ectomycorhizes a été signalée (HÖGBERG et PIEARCE, 1986). Chez les Diptérocarpacées et les Euphorbiacées, moins représentées que les Cesalpinioideae, les essences forestières à ectomycorhizes sont confinées dans les genres *Marquesia*, *Monotes* et *Uapaca*.

Tableau 1 : Etat actuel des connaissances sur les essences forestières indigènes à ectomycorhizes en Afrique intertropicale.

Espèces	Pays	Auteurs
CESALPINIOIDEAE		
<i>Azelia africana</i> Sm.	Ghana	Jenik et Mensah, 1967
<i>Azelia africana</i> Sm.	Nigéria	Redhead, 1968a
<i>Azelia africana</i> Sm.	Sénégal	Thoen et Ba, 1989
<i>Azelia bella</i> Harms var.bella	Zaïre	Fassi et Fontana, 1962
<i>Azelia bella</i> Harms var.bella	Nigéria	Redhead, 1968a
<i>Azelia bipendensis</i> Harms	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988

<i>Afzelia bracteata</i>	Guinée	Thoen et Ducouso (non publiés)
<i>Afzelia pachyloba</i> Harms	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
<i>Afzelia quanzensis</i> Welw.	Tanzanie	Högberg et Nylund, 1981
<i>Anthonota cladantha</i> Harms	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
<i>Anthonota crassifolia</i>	Guinée	Thoen et Ducouso, (non publiés)
 <i>Anthonota fragans</i> (Bak.f.) Exell &		
Hillcoat	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
<i>Anthonota lamprophylla</i> (Harms) J.Leo- nard.	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
<i>Anthonota macrophylla</i> P.Beauv.	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
<i>Aphanocalyx margininervatus</i> J.Leonard	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
<i>Berlinia bracteosa</i> Benth.	Cameroun	" "
<i>Berlinia crabiana</i> Bak. f. B.sp.	"	" "
<i>Brachystegia allenii</i>	Zambie	Högberg et Pearce, 1986
<i>Brachystegia bohemi</i> Taub.	Tanzanie	Högberg, 1982
" <i>bussei</i> Harms.	Tanzanie	Högberg, 1982
" <i>eurycoma</i> Harms.	Nigéria	Redhead, 1968a
" <i>floribunda</i> Benth.	Zambie	Alexander et Högberg, 1986
" <i>glaberrima</i>	"	"
" <i>laurentii</i> (De Wild.)Louis & Hoyle	Zaire	Fassi et Fontana, 1962
" <i>manga</i>	Zambie	Högberg et Pearce, 1986
" <i>longifolia</i> Benth.	Zambie	Alexander et Högberg, 1986
" "	Tanzanie	Högberg, 1982
" <i>microphylla</i> Harms	Tanzanie	" "
" <i>nigeria</i>	Nigéria	Redhead, 1968a
" <i>spiciformis</i>	Zambie	Alexander et Högberg, 1986
" "	Tanzanie	Högberg et Nylund, 1981
" <i>utilitis</i>	Zambie	Högberg et Pearce, 1986
" <i>wangermeeana</i>	"	"

<i>Didelotia africana</i> Baill.	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
<i>Gilbertiodendron brachystegiodes</i>	"	" "
<i>Gilbertiodendron ? demontrans</i> (Baill.) J.Leonard	"	" "
<i>Gilbertiodendron dewewrei</i> (De Wild.)	Zaïre	Peyronnel et Fassi, 1957
"	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
" <i>ogoonense</i> (Pell.)	"	" "
" sp.	"	" "
<i>Isoberlinia angolensis</i> (Benth.Hogle et Brenan)	Zambie	"
<i>Julbernardia globiflora</i> (Benth.) Troupin	Tanzanie	Högberg, 1982
" <i>paniculata</i> (Benth.) Troupin	Zambie	Alexander et Högberg, 1986
" <i>seritii</i> (De Wild.) Troupin	Zaïre	Fassi et Fontana, 1966
"	"	Peyronel et Fassi, 1960
"	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
<i>Microberlinia bisulcata</i> A.Chev.	"	" "
<i>Monopetalanthus microphyllus</i> Harms	"	" "
" sp.	Zaïre	Peyronel et Fassi, 1960
"	"	Fassi et Fontana, 1962
" sp. Nov.	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
<i>Paramacrolobium caeruleum</i> (Taub.) J.Leonard	Zaïre	Peyronel et Fassi, 1960
"	"	Fassi et Fontana, 1962
" <i>flagrans</i> (Bak.) Out.	"	"
<i>Tetraberlinia bifoliolata</i> (Harms.) Hauman	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
" <i>moreliana</i> Aubr.	"	"
PAPILIONIOIDEAE		
<i>Pericopsis angolensis</i> (Bak.) Van Meeuwen	Zambie	Högberg et Pearce, 1986
PROTEACEES		
<i>Faurea saligna</i> Harv.	Zambie	Högberg et Pearce, 1986
DIPTEROCARPACES		
<i>Marquesia macroua</i> Gilg.	Zambie	Alexander et Högberg, 1986
" <i>acuminata</i>	Zambie	Högberg et Pearce, 1986
<i>Monotes africana</i> (Welw.) Adc.	"	Alexander et Högberg,

		1986
.. <i>elegans</i> Gilg
EUPHORBIACEES		
<i>Uapaca benguelensis</i>	Zambie	Högberg et Pearce, 1986
<i>Uapaca guineensis</i> Müll.Arg	Sénégal	Thoen et Ba, 1989
.. <i>kirkinia</i> Müll.Arg	Tanzanie	Alexander et Högberg, 1986
..	Zambie	Högberg, 1982
.. <i>nitida</i> Müll.Arg	..	Alexander et Högberg, 1986
.. <i>pilosa</i>	Zambie	Högberg et Pearce, 1986
.. <i>robynsia</i>
.. <i>sansibarica</i> Pax.	..	Alexander et Högberg, (1986)
.. <i>staudtii</i> Pax.	Cameroun	Newbery <i>et al.</i> , 1988
.. <i>togoensis</i> Pax.	Nigéria	Redhead, 1974

Les figures (1 et 2) indiquent l'aire phytogéographique où les genres à ectomycorhizes ont été signalés en Afrique intertropicale. Il apparaît que les espèces à ectomycorhizes sont localisées en région guinéenne et soudano-zambezienne (au sens de LEBRUN, 1947). La région guinéenne comporte des forêts denses humides et des savanes avec galeries forestières qui présentent plusieurs formes différentes par leur degré d'hygrophilie, la fertilité du sol et par leurs espèces caractéristiques. L'un des caractères fondamentaux des forêts denses humides est leur richesse en Légumineuses arborescentes. Les Cesalpinioideae y constituent des groupements floristiques quasi-uniformes notamment dans les forêts ombrophiles sempervirentes du massif camerouno-congolais (SCHNELL, 1976). Deux groupements floristiques importants y ont été mentionnés : les forêts à *Gilbertiodendron dewevrei* à la périphérie de la cuvette congolaise, qui constituent, avec l'espèce *Julbernardia seretii* 96% de la strate supérieure, et les forêts à *Brachystegia laurentii* qui constitue l'essentiel de la strate supérieure au centre de la cuvette (SCHNELL, 1976).

Dans la zone soudano-zambézienne, les forêts claires se répartissent tant au Nord qu'au Sud de la forêt guinéenne (SCHNELL, 1976) (figures 2 et 3). Elles couvrent environ 12% du continent africain (MALAISSE, 1973). Au Nord de l'équateur, il s'agit essentiellement de

forêts à *Isoberlinia*, *Monotes* et *Uapaca* (SCHNELL, 1976). Au Sud de l'équateur, elles ont été désignées sous le vocable de miombo à dominance de *Brachystegia*, *Julbernardia* et *Isoberlinia* (MALAISSE, 1973). Ces forêts claires sèches existent également en Asie du Sud-Est où elles sont riches en Diptérocarpacées qui y montrent un gréganisme comparable à celui des Légumineuses d'Afrique (SCHNELL, 1976). De ALWIS et ABEYNAYAKE (1980) indiquent que les ectomycorhizes prédominent dans les forêts à Diptérocarpacées dans le Sud-Est Asiatique.

HÖGBERG (1986) suggère que la prédominance de ces essences forestières à ectomycorhizes dans le miombo pourrait être liée à la pauvreté des sols en phosphore. L'importance du manteau fongique pourrait également leur conférer une grande aptitude à stocker des nutriments sous climat saisonnier et assurer une protection des racines pendant la saison sèche (HARLEY et SMITH, 1983 ; ALEXANDER et HÖGBERG, 1986). En tout état de cause, dans les écosystèmes tropicaux où les conditions édaphiques et climatiques sont souvent difficiles (sol fragiles et pauvres en éléments nutritifs, turn-over rapide des éléments minéraux, longue période de sécheresse) les ectomycorhizes pourraient contribuer à préserver les forêts naturelles et à maintenir leur capacité de production.

Plusieurs facteurs ont certainement limités l'étude de la mycorhization des essences forestières autochtones d'Afrique : l'absence de données sur la sylviculture des espèces naturelles à ectomycorhizes des forêts tropicales et le peu d'informations sur l'identité des champignons indigènes associés. Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés à deux essences forestières d'Afrique intertropicale (*Afzelia africana* et *Uapaca guineensis*). L'espèce *Afzelia africana* Sm. a retenu notre attention en raison de son importance économique comme source de bois d'œuvre et de service dans l'Ouest africain (GIFFARD, 1974). C'est en plus l'une des essences indigènes les plus utilisées dans le reboisement des régions à vocation forestière du Sud du Sénégal.

Nous avons ainsi entrepris une étude sur la mycorhization d'*Afzelia africana* avec comme objectifs :

- L'identification et l'isolement des champignons associés puis la vérification de leur aptitude à la mycorhization vis à vis d'*Afzelia africana* (chapitres 1 et 2).
- L'étude du déterminisme de la dynamique d'infection d'*Afzelia africana* par des champignons mycorrhiziens (chapitre 3).
- L'étude de la spécificité des interactions de reconnaissance entre champignons mycorrhiziens indigènes ou exotiques et essences forestières introduites (*Acacia holosericea*,

Casuarina spp., *Melaleuca leucadendron* et *Pinus caribaea*) ou indigènes (*Azelia quanzensis* et *Brachystegia specifformis*) (chapitre 4).

- L'étude de l'effet de la mycorhization et de la nutrition phosphatée sur la croissance d'*Azelia africana*. (chapitre 5).

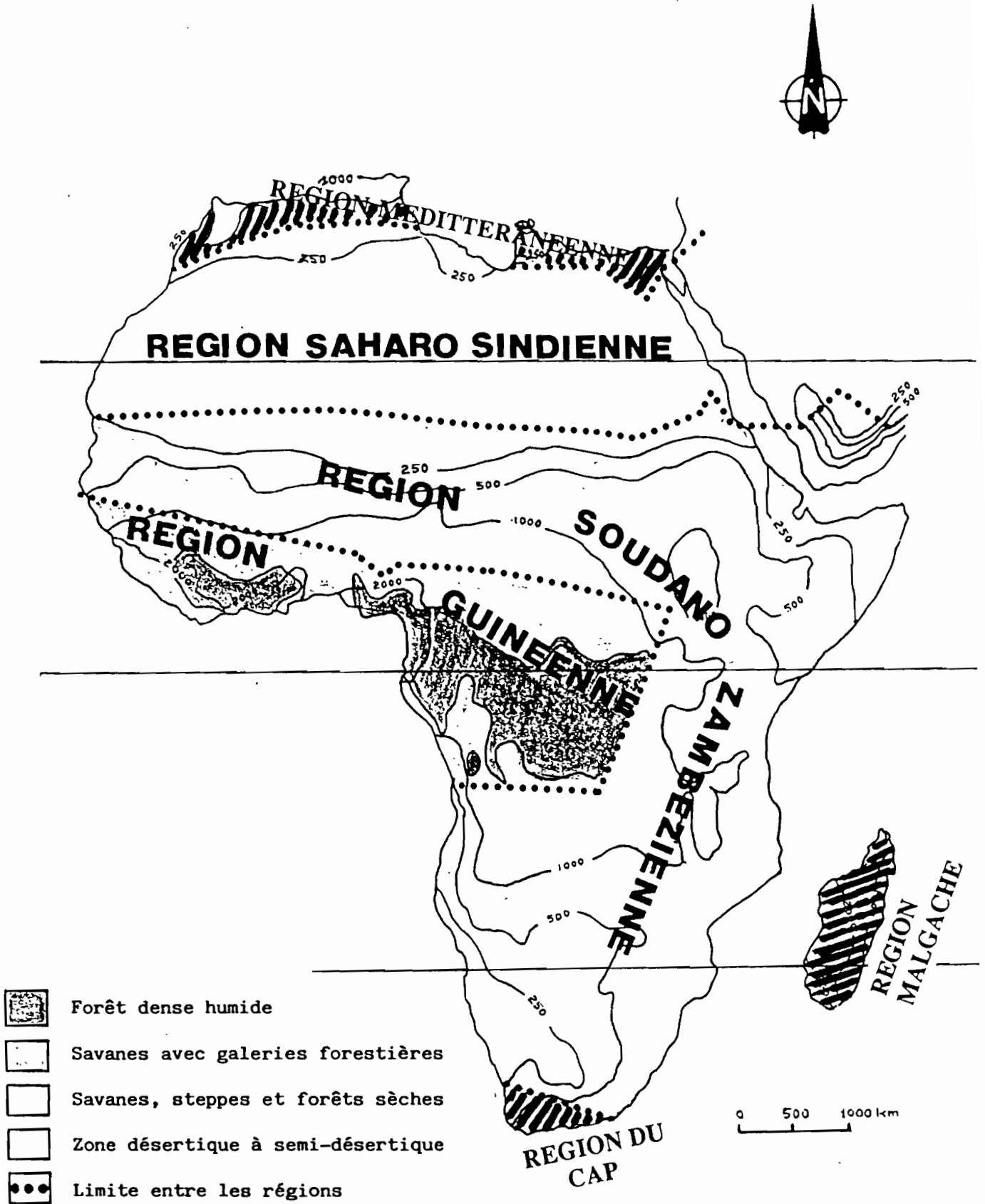


Figure 1 : Subdivisions phytogéographiques de l'Afrique (la pluviométrie est exprimée en mm) (LEBRUN, 1947)

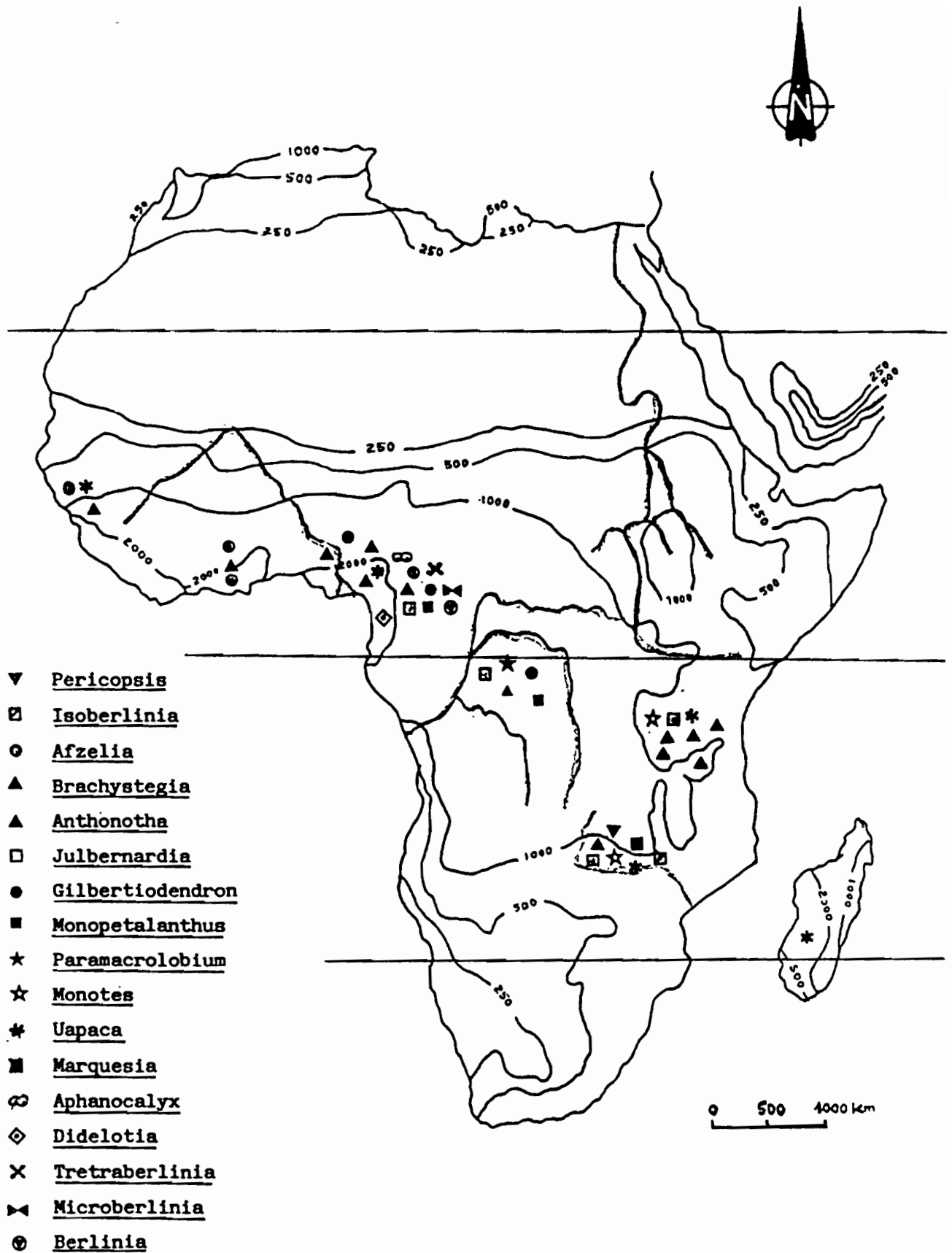


Figure 2 : Répartition des genres à ectomycorhizes actuellement connus en Afrique intertropicale (la pluviométrie est exprimée en mm)

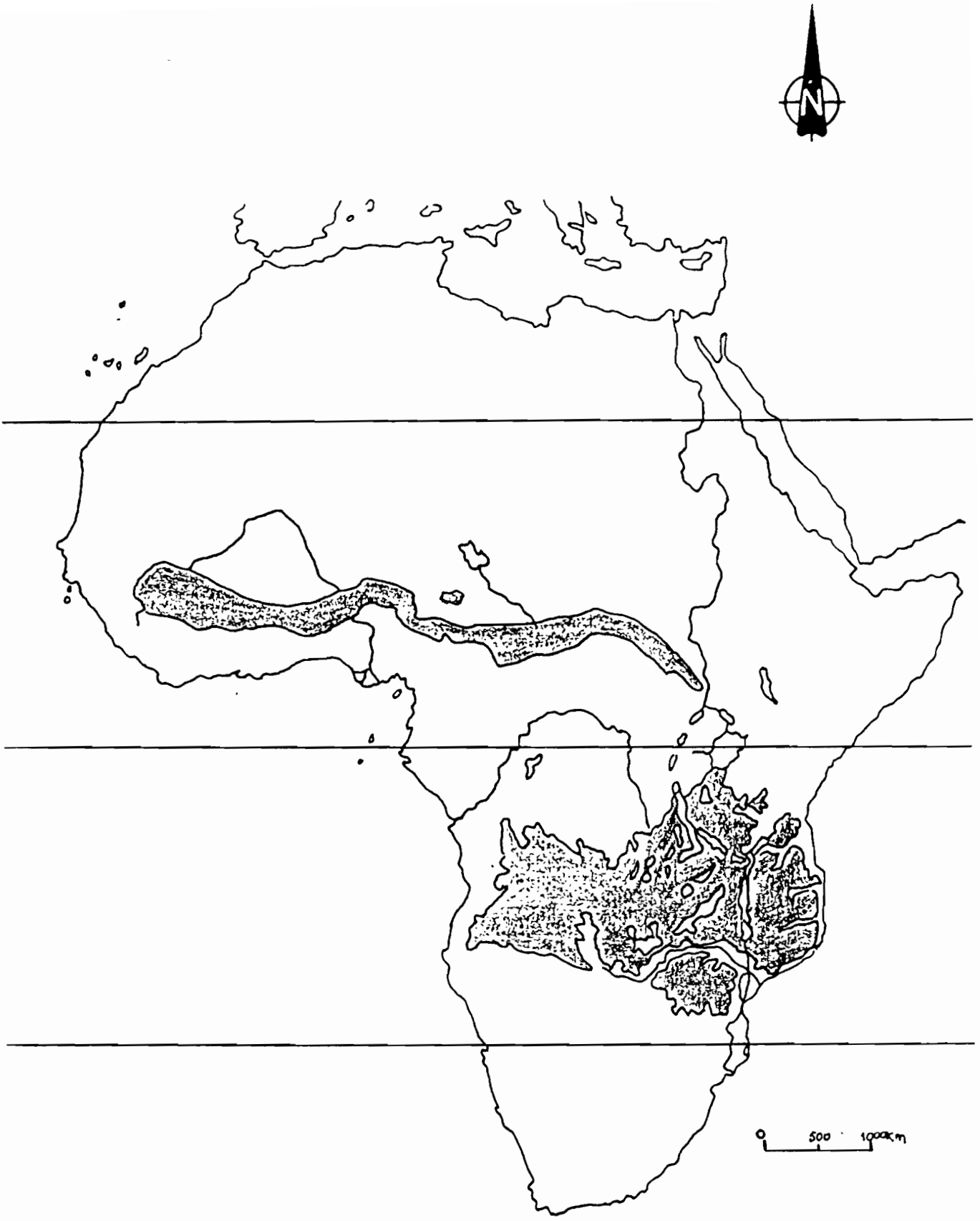


Figure 3 : Territoires où la forêt claire est le type principal de végétation (A.E.T.F.A.T. vegetation map, 1959)

Chapitre 1

Constitution d'une collection de souches indigènes de champignons ectomycorhiziens et identification des isolats issus de mycorhizes ou de sclérotés.

1- Introduction

Alors que les inventaires les plus récents signalent de nouvelles essences forestières tropicales à ectomycorhizes (LEE SU SEE, 1988 ; NEWBERY *et al.*, 1988 ; THOEN et BA, 1989), il existe très peu de données sur les champignons associés. ROBYNS (1935 et 1966), cité par MIKOLA (1970), a signalé des Bolets et des Lactaires sous *Gilbertiodendron* sp. dans les forêts au Congo. REDHEAD (1968b) a signalé que le mycélium à la base du stipe d'un *Inocybe* sp. est identique à celui des mycorhizes de jeunes plants d' *Afzelia bella* sans toutefois le confirmer expérimentalement. Par ailleurs des essais d'isolement à partir des mycorhizes d'*Afzelia* spp. ou de *Brachystegia eurycoma* ont été effectués sans succès (REDHEAD 1974 et 1982). Chez les Diptérocarpacées du Sud Est asiatique, les données les plus récentes signalent des souches fongiques infectieuses dont l'identité reste à élucider (de ALWIS et ABEYNAYAKE, 1988 ; LEE SU SEE, 1988). L'identification et l'isolement des souches indigènes apparaît ainsi comme une condition nécessaire à l'étude approfondie de la mycorhization des essences autochtones de la zone tropicale. Pour cela, nous avons adopté trois approches complémentaires :

(1) Identification des carpophores récoltés sous *A. africana* et *U. guineensis* dans 9 stations, isolement à partir de ceux-ci et constitution d'une banque de souches indigènes de référence.

(2) Isolement à partir des mycorhizes obtenues en serre en cultivant des jeunes plants d'*A. africana* sur des sols de stations où cette espèce est représentée et comparaison des isolats avec les souches obtenues en (1).

(3) Isolement à partir de sclérotés obtenus en (2) et comparaison des isolats avec les souches obtenues en (1) et en (2).

2- Présentation du matériel végétal

2.1- *Afzelia africana* Sm (pl.1).

Position systématique : Famille des Légumineuses
sous Famille des Cesalpinioideae
Tribu des Detareae
Genre *Afzelia*
espèce *africana*

- noms vernaculaires : Linké (Mandingue)
Bulén (Diola)

Hol (Woloff)

En Afrique, l'aire géographique du Genre *Azelia* va de la portion australe de la région soudano-zambienne, en passant par la région guinéenne, jusqu'à la limite nord de la région soudanienne. Il est considéré comme une essence forestière principale dans tous les écosystèmes où il a été signalé. *Azelia africana* est par ailleurs une essence de transition entre la forêt dense humide et la forêt claire sèche (GIFFARD, 1974). Outre *A. africana*, d'autres espèces ont été signalées en Afrique (e.g. NEWBERY *et al.*, 1988), en Asie (CHALEMPONGSE, 1984), en Amérique du Sud (de FARIA *et al.*, 1989) et en Australie (WARCUP, 1980).

Description botanique (BERHAULT, 1967 ; GIFFARD, 1974)

- arbre de 10 à 35 m
- feuilles paripennées alternes, rachis long de 15 à 25 cm portant 4 à 5 paires de folioles opposées. Pétioles long de 2 à 4 cm avant la première paire de foliole et à base épaissie et ridée sur 10 mm.
- fleurs blanches disposées en petites grappes terminales longues de 10 à 15 cm
- fruit sous forme de gousse aplatie et ligneuse à 2 valves de 7 à 10 loges contenant des graines coiffées d'une arille rouge contrastant avec le noir lisse de la graine.
- Excellent bois d'oeuvre et d'industries (ébénisterie, construction navale, ustensiles de ménage etc...). Ce bois est inattaquable par les termites et le feuillage est très apprécié des bovins. Cependant il est difficile à scier en raison de sa dureté.

2.2- *Uapaca guineensis* Müll.Arg (pl.7).

Position systématique : Famille des Euphorbiacées

Genre *Uapaca*

espèce *guineensis*

Noms vernaculaires : Yalagéy (Mandingue)

Bu begel (Diola)

Bu pal (Mandjaque)

C'est une essence forestière typique de la région guinéenne. Les groupements à *Uapaca* seraient caractéristiques de milieux édaphiques particuliers : sols marécageux, bord de rivières, bas-fonds souvent inondables, etc...*Uapaca guineensis* présente des racines-échasses et a été signalée au Sénégal dans les galeries forestières du P.N.B.C (Parc National de Basse

Casamance). MANGENOT (1954 et 1955) cité par SCHNELL (1976) aurait signalé de véritables forêts à *Uapaca paludosa* en Côte d'Ivoire.

Description botanique (BERHAULT, 1967)

- arbres de 10 à 20m
- feuilles alternes et condensées vers le sommet des rameaux
- pétiole long de 3 à 8cm
- fleur à l'aisselle des feuilles vers le sommet des rameaux : fleurs mâles sont nombreuses, fleurs femelles sont solitaires
- bois : charbon de forge et de repassage

3- Description des sites

Les forêts (stations I à IX) que nous avons prospecté, sont localisées dans la région de Casamance (figure 4). La différenciation du couvert végétal résulte de pratiques anthropiques : coupes abusives, pâturage extensif par le bétail et passage des feux courants. Dans les stations (fig.4, stations I, II, III, IV, V, VI, VII et IX), *Azelia africana* est représentée par des peuplements en mélange avec *Erythrophleum guineensis*, *Daniella oliveri*, *Pterocarpus erineaceus* etc... Cependant dans la forêt de Thiara (station VIII) (pl.1, 3), qui rappelle le miombo par sa structure, *Azelia africana* existe en peuplement presque pure avec *Cordyla pinnata*, *Prosopis africana*, *Combretum* spp.etc...(THOEN et BA, 1989). Le P.N.B.C conserve une relique de forêt guinéenne où *Uapaca guineensis* est bien représentée.

4- Identification et isolement des souches indigènes issues des carpophores

4.1- Identification

L'absence de données sur la microflore fongique associée à *A. africana* et *U. guineensis* nous a conduit à récolter systématiquement tous les champignons supérieurs réputés mycorhiziens et fructifiant au voisinage de ces espèces. Le matériel fongique est soigneusement récolté et décrit. Une partie est séchée et mise en herbier pour détermination, l'autre partie est destinée à l'isolement.

4.2- Isolement

Les isollements sont effectués sur des carpophores fermes et à l'état jeune. Les individus imbibés d'eau comme c'est souvent le cas en saison des pluies (juillet à septembre) sont

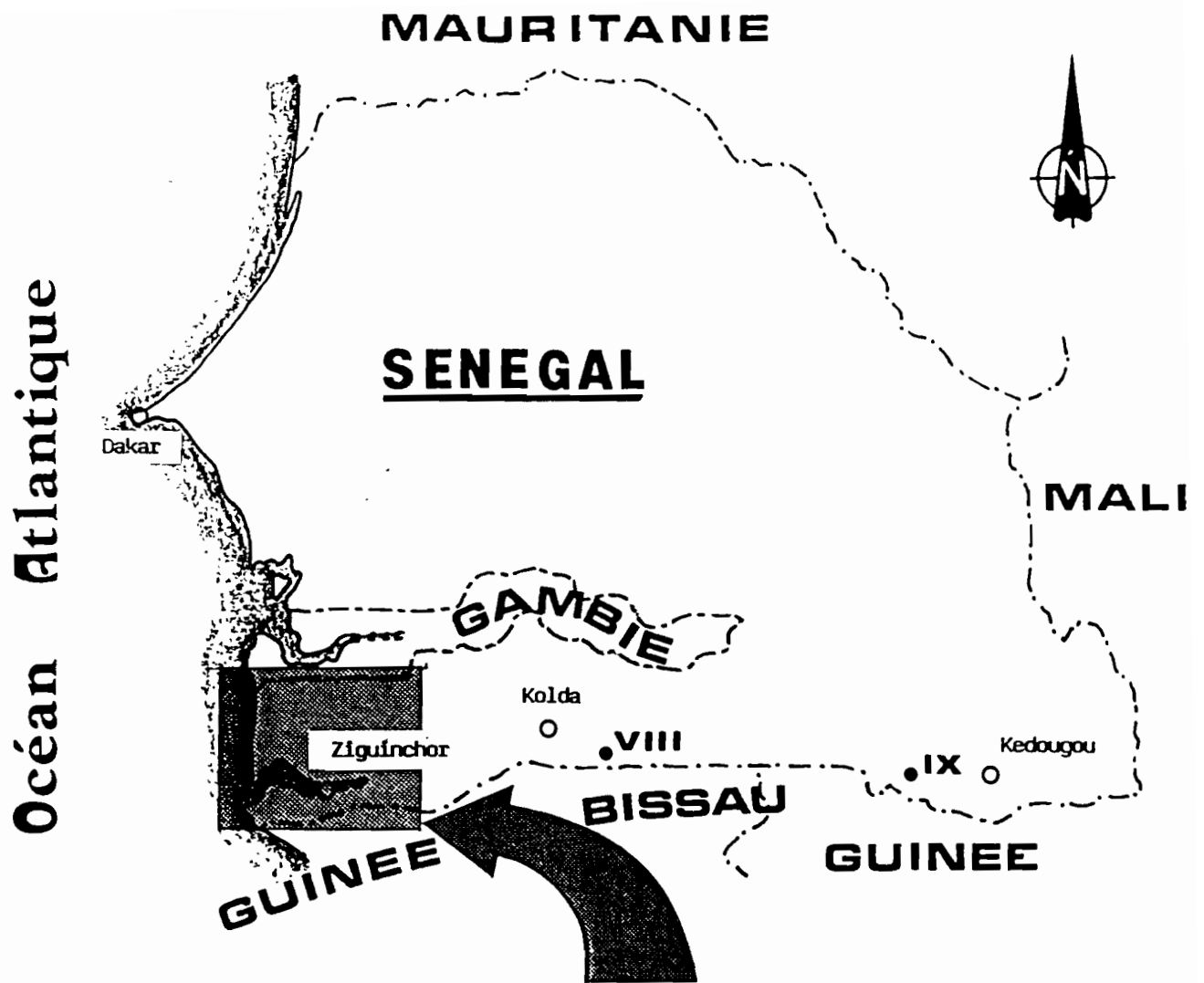
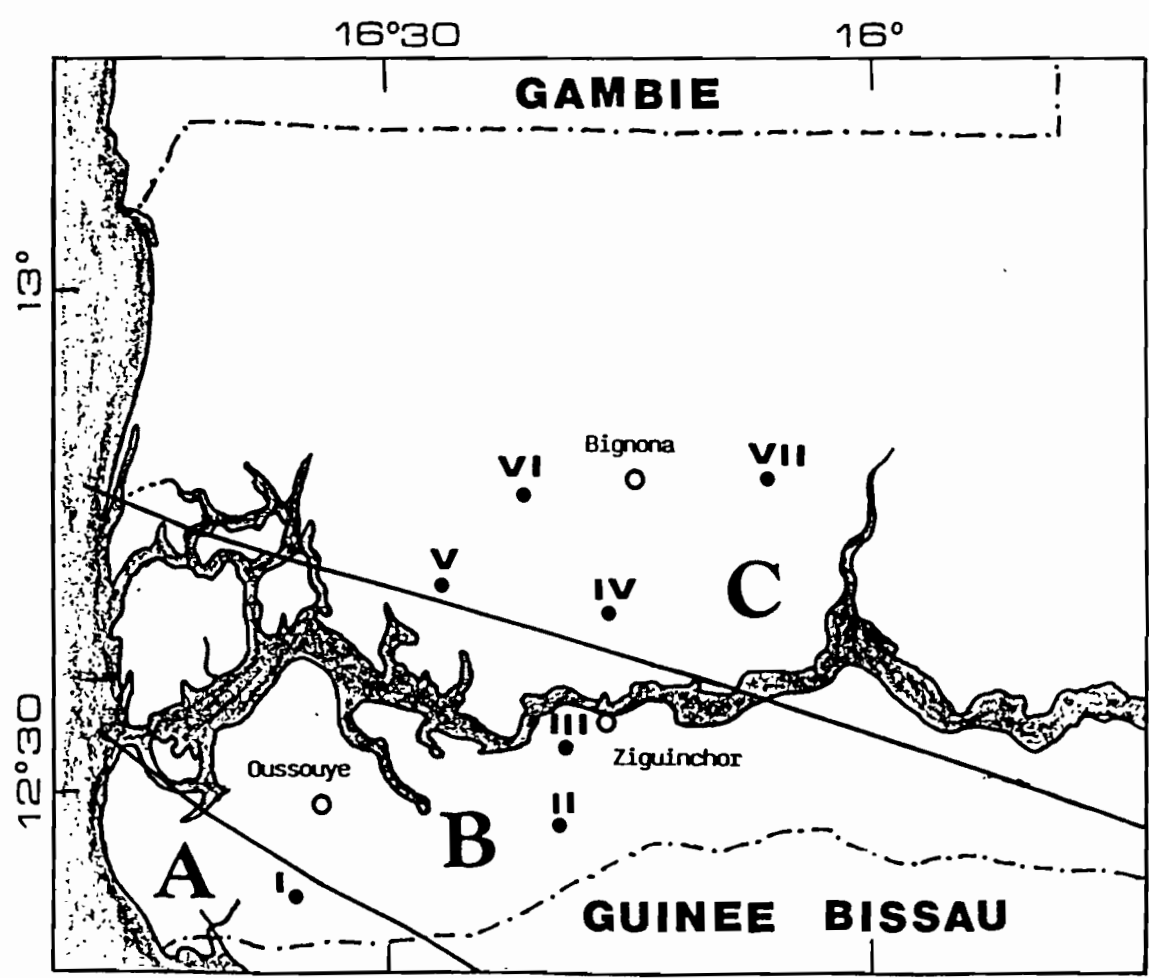


Figure 4 : Localisation des stations à *Afzelia africana* Sm. et à *Uapaca guineensis* Müll. Arg.



éliminés. Sur les lieux de récolte, les carpophores sont soigneusement débarrassés du sol adhérent et le chapeau est fractionné en deux à proximité du bec Bunsen dans une enceinte portative. A l'aide d'un scalpel flambé nous avons prélevé des morceaux de chair que nous avons déposés sur les milieux nutritifs gélosés MMN (1969) ou PACHLEWSKI (1974) (voir composition en annexe, tableau 3). Au laboratoire les boîtes de Petri sont incubées à 25°C. Les souches sont ensuite repiquées tous les mois.

4.3- Résultats et Discussion

Le tableau (2) dresse la liste des champignons récoltés sous *A. africana* ou *U. guineensis* en saison des pluies dans 9 stations localisées dans le Sud du Sénégal (figure 4). La plus part d'entre eux ont été récoltés dans la station de Thiara (figure 4, station VIII) où *A. africana* existe en peuplement naturel presque pur (pl.1, 3). Les planches (2, 3, 4, 5, 6 et 7) illustrent quelques champignons récoltés sous *A. africana* ou *U. guineensis*. Les fructifications de ces champignons se rencontrent exclusivement sous ces deux essences forestières. La plus part des champignons appartiennent à des genres réputés mycorhiziens en zone tempérée (TRAPPE, 1962), ce qui suggère fortement leur caractère mycorhizien. Nous avons ainsi constitué une collection de souches indigènes de référence comprenant 8 Ordres (Agaricales, Bolétales, Russulales, Cantharéllales, Aphylophorales, Gautiérales, Hyménogastrales, et Sclérodermatales), 15 genres et au moins 49 espèces. Les espèces les plus représentées appartiennent aux Russules (16 espèces), aux Bolets (12 espèces) et aux Agarics (7 espèces). Plusieurs de ces champignons présentent une large répartition en Afrique (HEIM 1937, 1955 et 1970 ; DRING, 1964 ; REDHEAD, 1968 b), et certains ont été signalés en Amérique du Sud (SINGER et ARAUJO, 1979). D'autres, en particulier les hypogés, restent encore non décrits et seraient probablement de nouvelles espèces (TRAPPE, BA et THOEN en préparation). Le tableau (3) indique que certains champignons associés à *A. africana* ou *U. guineensis* sont communs à d'autres Cesalpinioideae arborescentes notamment aux genres *Macrolobium*, *Brachystegia* et *Anthonota*. THOEN et BA (1989) ont d'autre part signalé des champignons mycorhiziens communs à *Afzelia africana* et à *Uapaca guineensis* (tableau 2). L'ensemble de ces données suggèrent le peu de spécificité de ces espèces fongiques indigènes et sont en accord avec celles obtenues en zone tempérée (HARLEY et SMITH, 1983).

La plus part des champignons ont pu être isolés à l'exception des Russules, des Chanterelles et des Inocybes réputés difficiles à mettre en culture (CHU CHOU et GRACE, 1982). Nous avons également isolé une souche de *Pisolithus* sp.(X003) (pl.6, 3) récoltée dans une plantation d'*Eucalyptus camaldulensis* (figure 4 station III). Ce *Pisolithus* diffère du *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch par l'ornementation sporale et le bagage pigmentaire (THOEN, 1985)

Tableau 2 : Champignons mycorhiziens récoltés sous Azelia africana et Uapaca guineensis.

Ordres & espèces	Plantes hôtes		N° Herbler
	<u>U.g</u>	<u>A.a</u>	
BOLETALES			
<u>Boletellus</u> sp.	+	+	7518, 7569, 7596
<u>Gyrodon cupreus</u> Heinem.	-	+	7460, 7570
<u>Gyrodon intermedius</u> (Pat.) Sing.	-	+	7579, 7729
<u>Gyroporus microsporus</u> (Sing. & Grinl.) Heinem. & Rammeloo var. <u>congolensis</u> (Heinem.) Heinem & Rammeloo	-	+	7613, 7639
<u>Porphyrellus niger</u> Heinem. & Goos.	-	+	7875
<u>Pulveroboletus</u> aff. <u>tritinensis</u> Heinem.	+	-	7461, 7716
<u>Strobilomyces costatispora</u> (Beeli) Gilb.	-	+	7506
<u>Tubosaeta brunneosetosa</u> (Sing.) Horak	+	-	7462, 7467, 7573, 7714
<u>Xerocomus</u> aff. <u>hypoxanthus</u> Singer	+	-	7491, 7603, 7645
<u>Xerocomus spinulosus</u> Heinem. & Goos.	-	+	7514
<u>Xerocomus subspinulosus</u> Heinem.	+	+	7489, 7493, 7540
AGARICALES			
<u>Amanita</u> cf. <u>crassiconus</u> Bas	-	+(a)	7664, 7882
<u>Amanita hemibapha</u> (Berk. & Br.) Sacc.	-	+(a)	7658, 7734
<u>Amanita</u> aff. <u>rubescens</u> (Pers. : Fr.) S. F. Gray	+	+	7487, 7566, 7571
<u>Amanita</u> sp.1 (jaune)	+	-	7644
<u>Amanita</u> sp.2 (gris brun)	+	-	7648
<u>Amanita</u> sp.3 (blanc à lamelles bleutées)	-	+(a)	7672
<u>Amanita</u> sp.4 (blanc)	-	+(a)	7674
<u>Inocybe</u> sp.1 (leiosporé)	-	+(a)	7657
<u>Inocybe</u> sp.2 (gibbosporé)	-	+	7561, 7624, 7626
RUSSULALES			
<u>Elasmomyces</u> sp. (hypogé)	+	-	7652
<u>Lactarius gymnocarpus</u> Heim	+	+	7605, 7646, 7881
<u>Lactarius zenkeri</u> (P. Henn.) Sing.	-	+	7702, 7885
<u>Lactarius</u> sp.1 (brun jaune)	+	+	7618, 7643
<u>Lactarius</u> sp.2 (brun foncé)	-	+(a)	7662
<u>Russula annulata</u> Heim	+	-	7606, 7647, 7878
<u>Russula discopus</u> Heim	+	-	7609, 7649, 7872
<u>Russula</u> aff. <u>foentens</u> Pers. ex Fr	-	+	7617

<u>Russula</u> aff. <u>pectinata</u> Fr.	-	+(a)	7669, 7886
<u>Russula</u> sp.1	+	-	7519
<u>Russula</u> sp.2	-	+	7581, 7594, 7632
<u>Russula</u> sp.3	-	+	7633
<u>Russula</u> sp.4	-	+	7509
<u>Russula</u> sp.5	-	+	7507
<u>Russula</u> sp.6	-	+	7580
<u>Russula</u> sp.7	-	+(a)	7670
CANTHARELLALES			
<u>Cantharellus</u> <u>congolensis</u> Beeli	+	-	7879
<u>Cantharellus</u> <u>pseudofriesi</u> Heinem.	-	+(a)	7654
APHYLLOPHORALLES			
<u>Coltricia</u> <u>cinnamomea</u> (Pers.) Murr.	+	-	7859, 7883
GAUTIERIALES			
<u>Austrogautiera</u> sp. (hypogé)	+	-	7700, 7873
HYMENOGASTRALES			
<u>Sclerogaster</u> sp. (hypogé)	-	+	7660, 7701, 7861
SCLERODERMATALES			
<u>Scleroderma</u> <u>dictyosporum</u> Pat.	+	+	7510, 7526, 7559
<u>Scleroderma</u> <u>verrucosum</u> Pers.	-	+	7508, 7522, 7560
Nombre d'espèces (Total = 43)	18	31	

U.g : Uapaca guineensis

A.a : Afzelia africana

(a) : Carpophores récoltés uniquement à Thiara (station VIII)

Tableau 3 : Distribution écologique et plantes hôtes présumées de quelques champignons mycorhiziens récoltés sous *Azelia africana* et *Uapaca guineensis*.

Espèces	Distribution écologique et hôtes présumés (*)	Pays(*)
<i>Cantharellus congolensis</i>	Forêt humide, <i>Macrolobium</i>	Zaïre
<i>Cantharellus pseudofriesii</i>	Forêt humide, <i>Macrolobium</i>	Zaïre
<i>Lactarius zenkeri</i>	Forêt humide, ?	Cameroun
<i>Porphyrellus niger</i>	Forêt humide, <i>Macrolobium</i> Forêt sèche et sempervirente (mu- hulu)	Zaïre
<i>Scleroderma dictyosporum</i>	Forêt claire et sèche, ?	Afrique de l'Ouest
<i>Scleroderma verrucosum</i>	Forêt claire et sèche, ?	Afrique de l'Ouest
<i>Strobilomyces costatispora</i>	Forêt humide, <i>Macrolobium</i>	Zaïre
<i>Xerocomus spinulosus</i>	Forêt humide, <i>Macrolobium</i>	Zaïre
<i>Gyroporus microsporus</i>	Forêt humide, <i>Macrolobium</i> Forêt claire, <i>Brachystegia</i>	Burundi, Zaïre et Zambie
<i>Coltricia cinnamomea</i>	Forêt décidue, ?	Burundi, Kenya, Sierra-leone, Afrique du sud, Zambie
<i>Gyrodon cupreus</i>	Forêt claire, ?	Ethiopie, Kenya, Malawi et Ouganda
<i>Lactarius gymnocarpus</i>	Forêt claire et sèche, ?	Cameroun, Côte d'Ivoire, Guinée, Tanzanie et Zaïre
<i>Russula annulata</i>	Forêt claire **, ?	Tanzanie et Zaïre
<i>Xerocomus subspinulosus</i>	Forêt claire, ?	Tanzanie et Zaïre

(*) D'après DRING, 1974 ; HEIM, 1970 ; HEINEMANN 1954, 1959 et 1966; HEINEMANN et RAMMELOO, 1983; PEGLER 1977 et 1983; RYVARDEN et JOHANSEN, 1980.

(**) Communication personnelle, THOEN, 1972.

(?) Hôtes présumés non spécifiés.

Bien que nos observations n'aient pas établi de lien entre la base du stipe des champignons et les types de mycorhizes correspondants, comme cela a été le cas chez *U. guineensis* (pl.7, 2 et 4) (THOEN et BA, 1989), il y a néanmoins de fortes présomptions que ces champignons soient associés à *A. africana*.

5- Isolement et identification des isolats issus des mycorhizes

5.1- Isolement

Les isolements ont été effectués sur 6 types de mycorhizes obtenus dans les conditions de piégeage décrites dans le chapitre (4) (paragraphe 2.1). Les isolements sont réalisés selon les procédés de ZAK et BRYAN (1963) et ZAK et MARX (1964). Nous avons comparé l'efficacité de 4 agents désinfectants (chlorure mercurique, acide osmique, eau oxygénée et hypochlorite de calcium) à des concentrations et à des temps d'application différents.

Le système racinaire est soigneusement débarrassé de sa motte de terre et rincé à l'eau du robinet. Sous la loupe binoculaire (Gr.x20), nous avons découpé des fragments de racines de 3 à 5cm de long ne portant que le type de mycorhize dont nous cherchons à isoler le mycélium. Les fragments racinaires sont placés dans une boule à thé et lavés abondamment pendant 3 h à l'eau courante. Les fragments sont ensuite trempés dans une solution de Tween 80 à 2,5% (le Tween est un agent mouillant qui permet une meilleure adhésion de l'agent désinfectant) pendant 15mn. Ils sont ensuite traités selon les modalités suivantes : acide osmique aux concentrations de 0,01%, 0,05%, 0,1% ou 0,5%, hypochlorite de calcium à 7%, eau oxygénée à 30% ou chlorure mercurique à 0,1% ou 0,5%. Les traitements sont soumis aux temps d'application de 15, 30, 60 ou 90 secondes. Les mycorhizes sont immédiatement rincées à l'eau distillée stérile. Elles sont découpées en portions de 2 à 5 mm de long, égouttées sur du papier filtre stérile et déposées sur les milieux identiques à ceux du paragraphe (2.2.2). Pour chaque traitement, nous avons au moins ensemencé 100 portions de mycorhizes sur chacun des milieux nutritifs. Nous avons noté tous les jours les isolements réussis et les mycorhizes contaminées. Les taux de réussite des isolements et celui des mycorhizes non désinfectées sont déterminés en pourcentage du nombre de mycorhizes ensemencées.

5.2- Identification

Dans le but d'identifier les isolats issus des mycorhizes, nous les avons comparés avec le mycélium des souches de référence obtenues au paragraphe (2.1). Parmi les critères d'identification (ZAK, 1973), nous avons retenu : (1) Couleur et aspect du mycélium sur des

milieux nutritifs classiques (2) Structure et texture des hyphes (3) Réactions macrochimiques sur les carpophores frais ou secs, sur les mycorhizes et sur le mycélium en culture pure (4) Aptitude des isolats à former des mycorhizes *in vitro* avec *A. africana*. Le point (4) est abordé dans le chapitre (2).

5.3- Résultats et Discussion

Parmi les 6 types de mycorhizes prélevés, nous avons isolé le mycélium de 4 d'entre eux. Les figures (5, 6, 7 et 8) montrent l'influence de la concentration et de la durée d'application de 4 agents désinfectants sur l'isolement à partir de 4 types de mycorhizes. Le taux de réussite des isolements à partir de mycorhizes varie de 2 à 14% et peut-être considéré satisfaisant en regard des pourcentages de réussite cités dans la littérature (LAMB et RICHARDS, 1970 ; EKWEBELAM, 1977 ; CHU-CHOU, 1979 ; MOLINA et PALMER, 1982). Il est au contraire faible quand on le compare aux résultats obtenus par GENUA *et al.*, (1985). Il apparaît clairement, pour les 4 types de mycorhizes, que l'acide osmique est plus efficace que les autres agents désinfectants. Il pénètre peu et semble mieux préserver les hyphes du réseau de Hartig. L'efficacité de cet agent désinfectant a été montré chez l'Actinomycète *Frankia* particulièrement difficile à isoler (LALONDE *et al.*, 1981 ; DIEM et DOMMERGUES, 1983).

Dans le cas du type "jaune" (fig.8) (pl.8), aux concentrations de 0,01 et 0,05% d'acide osmique, le pourcentage de réussite des isolements est meilleur avec un temps de traitement de 30 sec. Les hyphes émergent dès le 5ème jour et pendant 15 jours après ensemencement. Pour le type "blanc à sclérotés" (fig.6) (pl.9), à la concentration de 0,5%, le taux de réussite des isolements est inférieur à 5% avec des temps de traitement de 15, 30, 60 et 90 sec. Pour le type "blanc" (fig.7) (pl.10), à la concentration de 0,05%, le pourcentage de réussite avoisine 12% après 30 sec. Enfin pour le type "brun foncé" (fig.5) (pl.11), à la concentration de 0,05%, le taux de réussite est voisin de 10% après 60 sec. Dans les deux derniers cas les hyphes émergent des mycorhizes dès la 3ème semaine et jusqu'à 5 semaines après ensemencement. Il apparaît que les résultats sont variables selon les souches fongiques.

Aux concentrations et aux temps d'application utilisés, le chlorure mercurique, l'eau oxygénée et l'hypochlorite de calcium se sont avérés inefficaces. Nos résultats (figures 5, 6, 7 et 8) permettent également de distinguer des agents à "faible pouvoir désinfectant" (hypochlorite de calcium et eau oxygénée) et à "fort pouvoir désinfectant" (chlorure mercurique et acide osmique).

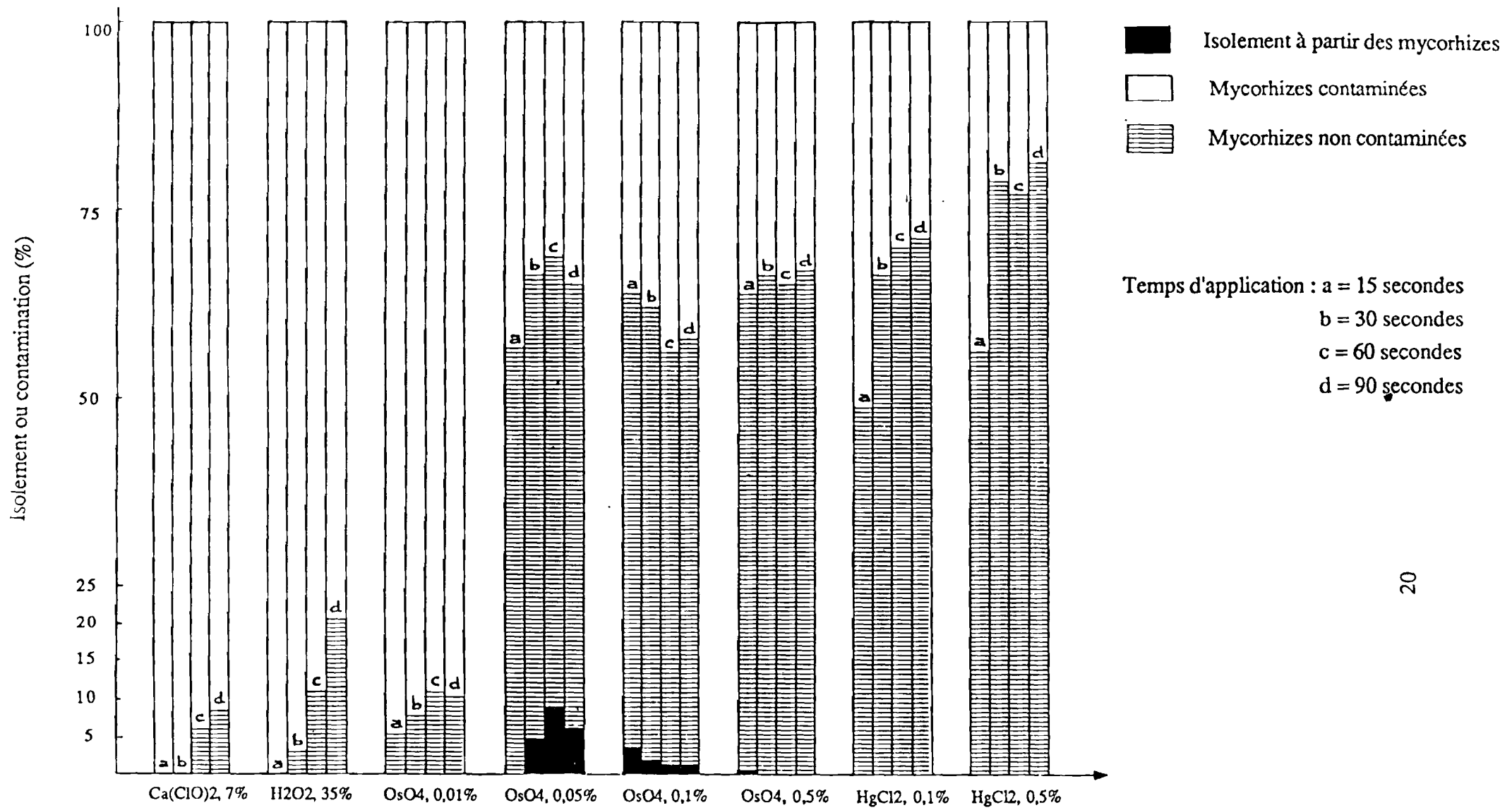


Figure 5 : Influence de la concentration et du temps d'application de 4 agents désinfectants (hypochlorite de calcium, eau oxygénée, acide osmique et chlorure mercurique) sur l'isolement et la désinfection superficielle des mycorhizes du type "brun foncé" d'*Afzelia africana*. Conditions d'isolement : Température 26°C, Obscurité et milieu MNM.

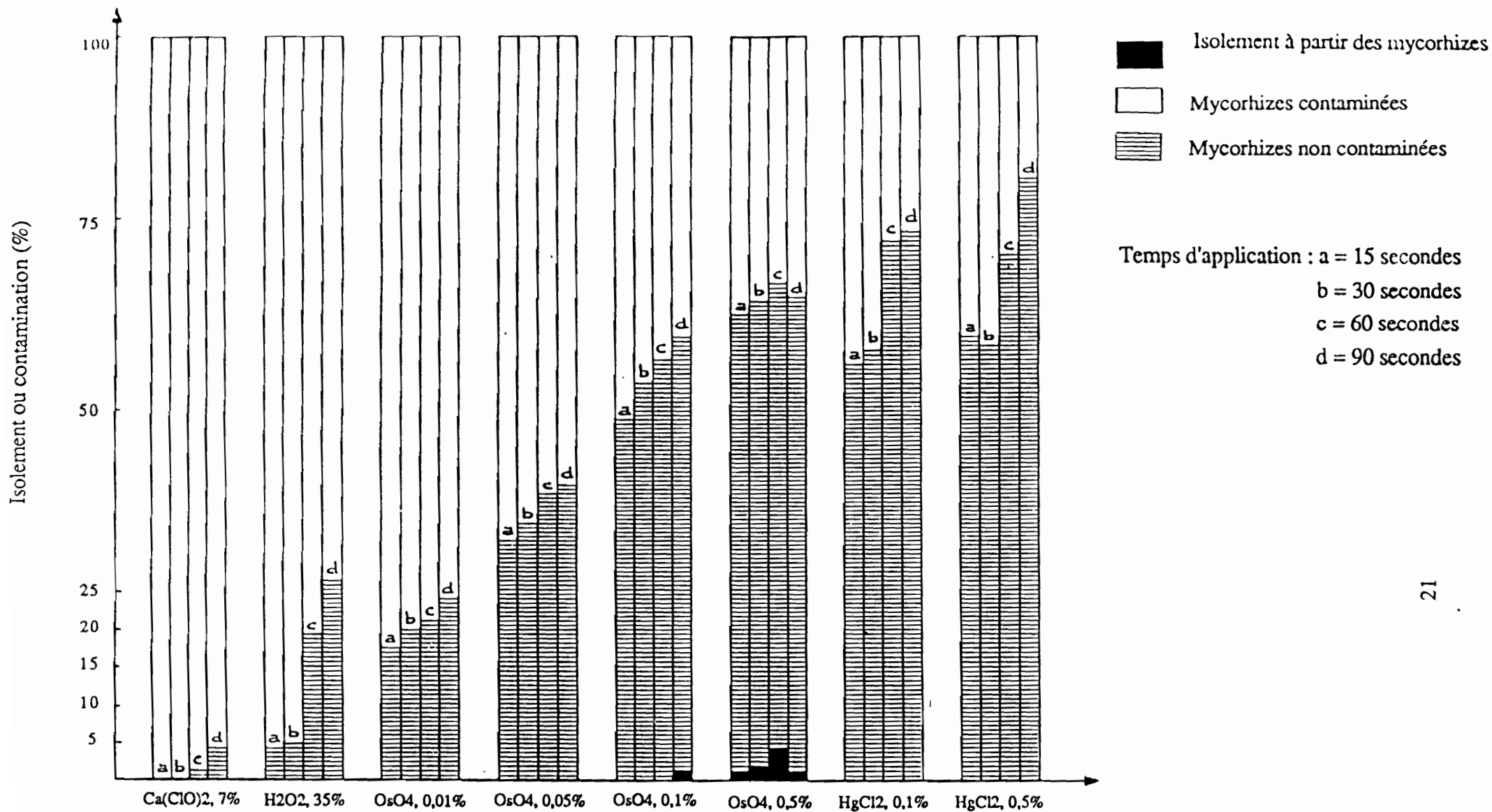


Figure 6 : Influence de la concentration et du temps d'application de 4 agents désinfectants (hypochlorite de calcium, eau oxygénée, acide osmique et chlorure mercurique) sur l'isolement et la désinfection superficielle des mycorhizes du type "blanc à sclérotés" d'*Azelia africana*. Conditions d'isolement : Température 26°C, Obscurité et milieu MNM.

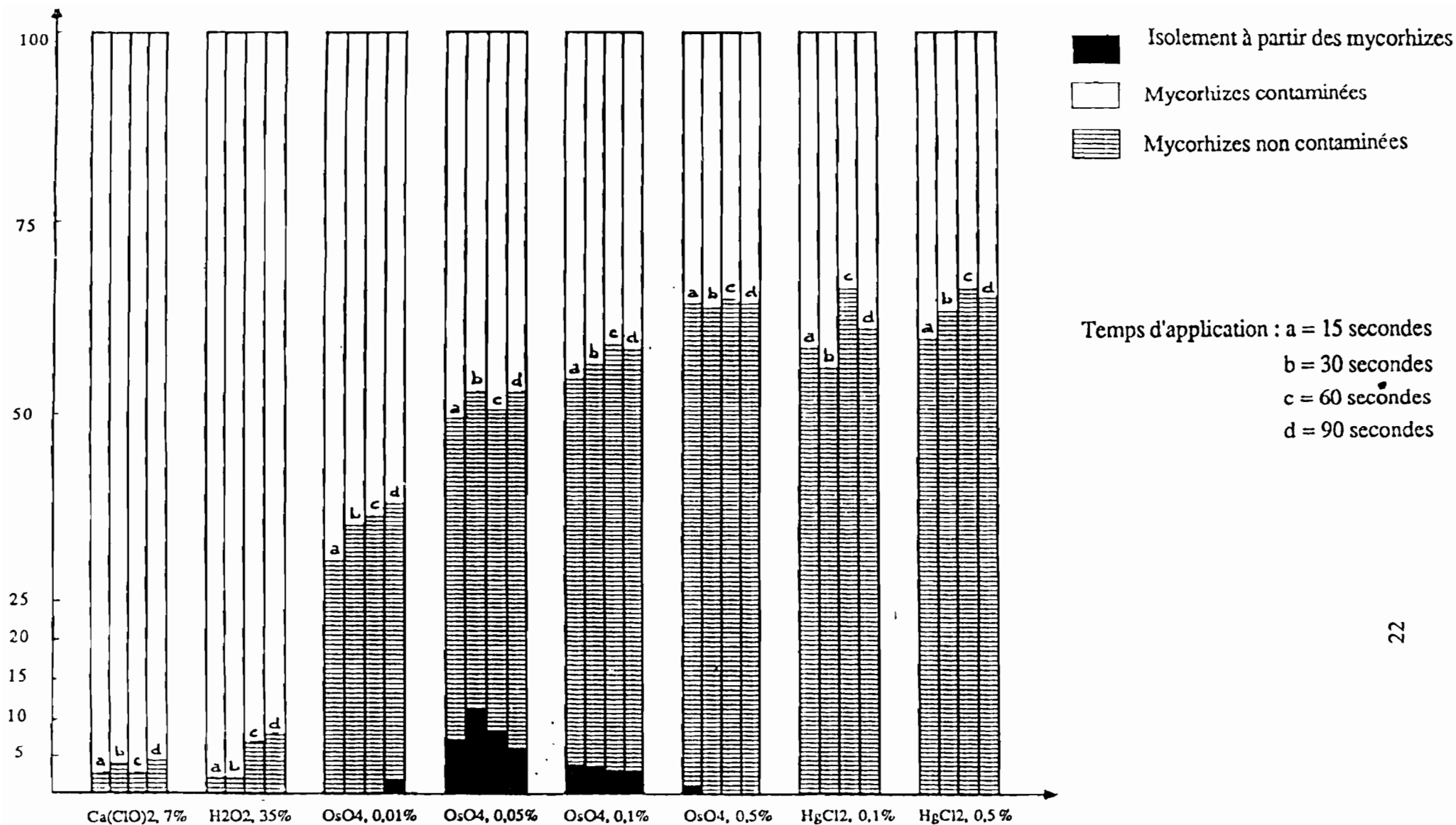


Figure 7 : Influence de la concentration et du temps d'application de 4 agents désinfectants (hypochlorite de calcium, eau oxygénée, acide osmique et chlorure mercurique) sur l'isolement et la désinfection superficielle des mycorhizes du type "blanc" d'*Azelia africana*. Conditions d'isolement : Température 26°C, Obscurité et milieu MNM.

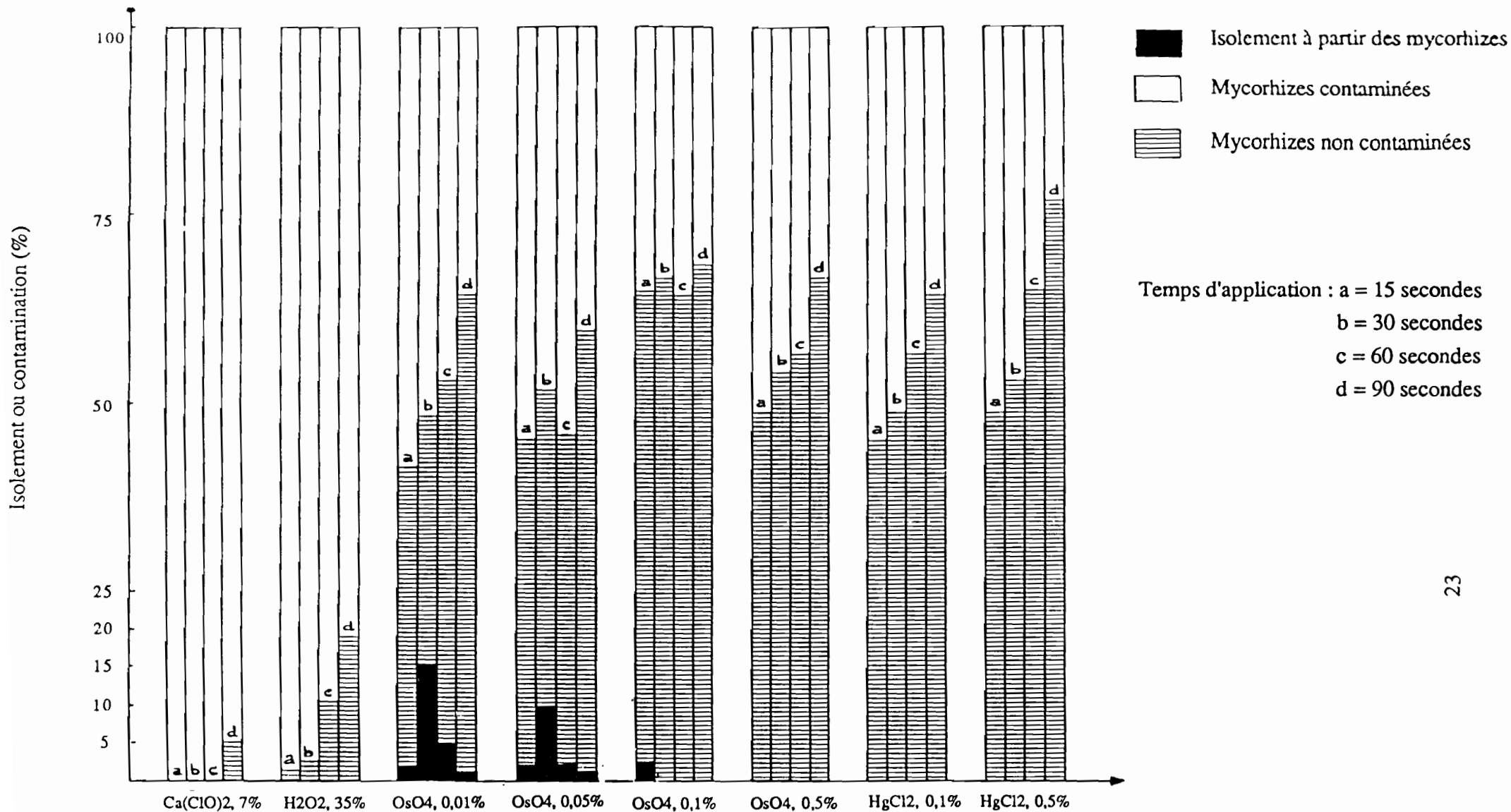


Figure 8 : Influence de la concentration et du temps d'application de 4 agents désinfectants (hypochlorite de calcium, eau oxygénée, acide osmique et chlorure mercurique) sur l'isolement et la désinfection superficielle des mycorhizes du type "jaune" d'*Azelia africana*. Conditions d'isolement : Température 26°C, Obscurité et milieu MNM.

Tableau 4 : Quelques caractères distinctifs du mycélium en culture pure (sur milieu nutritif MNM) issu des carpophores, des mycorhizes ou des sclérotés.

N° Isolats	Mycélium		Cordons mycéliens	Hyphe		
	Couleur	Aspect		Structure	Texture	Diamètre (µm)
ORS.7732 (<i>S.v.</i>)						
ORS.XM001	blanc	duveteux	+	Renflement à proximité des septa sans boucle	lisse avec cristaux	2,2-2,8
ORS.XS001						
ORS.7731 (<i>S.d.</i>)						
	jaune	duveteux	+	Septa sans boucle	verruqueux	3,1-3,4
ORS.XM003						
ORS.XM002	brun foncé	non duveteux	+	Septa avec boucles	lisse	3,2-3,8
ORS.XM004	blanc	duveteux	+	Septa sans boucle	lisse	2,5-2,8

S.v : *Scleroderma verrucosum*

S.d : *Scleroderma dictyosporum*

Tableau 5 : Réactions macrochimiques sur les carpophores (frais et secs), les mycorhizes (naturelles ou piégées), les sclérotés (piégés) et le mycélium en culture pure de 7 isolats.

Réactifs chimiques	Carpophores		Mycorhizes, Sclérotés et Mycélium				
	<i>S.v.</i> (7732)	<i>S.d.</i> (7731)	XM001	XM002	XM003	XM004	XS001
KOH 10%	-	-	-	-	-	-	-
Phénol 1%	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ OH concentré	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ SO ₄ 95%	rouge	bleu	rouge	-	bleu	-	rouge
Gaïacol	-	-	-	-	-	-	-
Melzer	-	-	-	-	-	-	-
FeSO ₄ 10%	-	-	-	-	-	-	-
Formol neutre 37%	-	-	-	-	-	-	-
Pyro-gallol	-	-	-	-	-	-	-
Sulfo-formol 37%	-	bleu	-	-	bleu	-	-
Aniline 1%	-	-	-	-	-	-	-
HCl N/10	-	-	-	-	-	-	-
CH ₃ COOH 10%	-	-	-	-	-	-	-
NaOH N	-	brun clair	-	-	brun clair	-	-
Acide lactique pur	-	-	-	-	-	-	-

S.v.: *Scleroderma verrucosum*

S.d.: *Scleroderma dictyosporum*

Pour être efficace, les agents à "faible pouvoir désinfectant" doivent être utilisés avec des temps d'application plus longs que ceux que l'on a choisis alors que dans le cas du chlorure mercurique, nous serions tentés de réduire les concentrations utilisées. Pour l'acide osmique, les concentrations et les temps d'application efficaces varient selon les types de mycorhizes. Par exemple le taux de réussite d'isolement des types "blanc" et "brun foncé" est satisfaisant dans une plus large gamme de concentrations que celui du type "blanc à sclérotés" qui paraît exiger la concentration de 0,5%.

Pour identifier les isolats issus des mycorhizes, nous les avons comparés aux souches de référence et avons ainsi différencié 4 isolats (pls.8, 9, 10 et 11 ; tableau 4) dont deux sont identifiés à *Scleroderma verrucosum* Pers.(7732) et *Scleroderma dictyosporum* Pat.(7731) (pl.6, 1 et 2). Les réactifs macrochimiques (SINGER, 1962 ; ZAK, 1964), en particulier l'acide sulfurique à 95% et le sulfo-formol à 37% confirment ces observations et constituent dans le même temps des excellents outils de terrain pour caractériser les carpophores et les mycorhizes correspondantes (tableau 5). Au contraire les isolats issus des types de mycorhizes "brun foncé" (isolé sous le nom de XM002) et "blanc" (isolé sous le nom de XM004) ne sont comparables à aucune des souches de référence.

6- Isolement et identification des isolats issus des sclérotés

6 1- Isolement

Nous avons mis en évidence des sclérotés liés aux mycorhizes du type "blanc à sclérotés" chez des plants d'*A. africana* âgés de 2 mois (pl.12, 1). Des isolements ont été réalisés à partir de ces sclérotés (pl.12, 2). Dans le but d'optimiser les conditions d'isolement nous avons comparé, comme dans le cas des mycorhizes, l'efficacité de 4 agents désinfectants et l'effet de la fragmentation sur le temps de germination des sclérotés. La méthode d'isolement qui s'inspire de celle décrite par TRAPPE (1969), est la suivante :

- Récolte des sclérotés liés aux mycorhizes du type "blanc à sclérotés" sous la loupe binoculaire (Gr.x 20).

- Lavage et sélection des sclérotés par agitation dans de l'eau distillée pendant 30 mn. Ceux qui vont au fond du contenant sont immédiatement traités, les autres sont laissés à imbiber 24 h à 4°C. Nous avons distingué des sclérotés, dits "flottants" (sénescents) et "non flottants" (vivants), qui sont soumis au même traitement.

- Traitements des sclérotés à l'eau oxygénée 35%, à l'acide osmique 0,5%, au chlorure mercurique 0,5% ou à l'hypochlorite de calcium 7% avec des temps de désinfection de 1, 2, 3 ou 4 mn.

- Rinçage des sclérotés à l'eau distillée stérile, une partie d'entre eux est sectionnée en deux à l'aide d'un scalpel stérile.
- Etalement des sclérotés et des fragments de sclérotés sur milieu gélosé MNM(1969) ou PACHLEWSKI (1974).
- Incubation à l'obscurité et à 25°C.

Pour chaque traitement, nous avons mis en culture 25 sclérotés entiers et 50 fragments de sclérotés (correspondant à 25 sclérotés entiers). Le pourcentage de réussite des isoléments et la durée de germination sont déterminés dans les mêmes conditions que dans le paragraphe (5.1).

6.2- Identification

Comme dans le paragraphe (5.2), l'isolat issu du sclérote a été comparé aux souches de référence ainsi qu'aux isolats issus de mycorhizes.

6.3- Résultats et Discussion

Les sclérotés sont des amas d'hyphes plus ou moins différenciées et sont considérés chez de nombreux champignons comme des organes de résistance lorsque les conditions sont défavorables (COLEY-SMITH et COOKER, 1971). C'est en plus une voie privilégiée pour l'isolement de souches fongiques mycorhiziennes (TRAPPE, 1969 ; LAIHO, 1970) et une source d'inoculum (GODBOUT et FORTIN 1983, 1985 ; GRENVILLE *et al.*, 1985 a,b,c). Le tableau (6) montre l'influence de 4 agents désinfectants sur le taux de germination des sclérotés entiers et des fragments de sclérotés. La technique utilisée nous a permis de distinguer empiriquement des sclérotés "flottants" et "non flottants". Ces derniers présentent en microscopie photonique ou électronique (techniques décrites dans le chapitre 2) des hyphes externes à volume cytoplasmique important (cortex) et des hyphes internes apparaissant plus vacuolisées (médulla) (pl.12, 5 ; pl 13, 1 et 2). Chez les sclérotés dits "flottants" les hyphes externes sont vides de tout contenu cellulaire et les hyphes internes présentent un cytoplasme sénescant (pl.12, 6 ; pl.13, 3 et 4).

Le traitement à l'hypochlorite de calcium à 7% s'avère le moins efficace avec un taux de réussite inférieur à 50% dans tous les cas de figure (tableau 6). Cependant le taux de réussite est satisfaisant pour les "non flottants" si l'on considère les autres traitements. Les faibles pourcentages de réussite chez les sclérotés "flottants" sont en accord avec leur état de sénescence plus ou moins avancé. Ces résultats sont en accord avec ceux de TRAPPE (1969) obtenus sur les sclérotés de *Cenococum graniforme*. Cependant il apparaît que des sclérotés

“flottants”, en dépit de leur état sénescence en général, restent viables ce qui n’est apparemment pas le cas chez les sclérotés de *C. graniforme* (TRAPPE, 1969).

Si l’on considère la durée de germination, elle est de 4 à 7 jours pour les fragments de sclérotés (“flottants” et “non flottants”) et de 7 à 15 jours pour les sclérotés entiers (“flottants” et “non flottants”). Il apparaît plus intéressant d’effectuer des isolements à partir de fragments de sclérotés qu’avec des sclérotés entiers. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par DENNIS (1980) sur les sclérotés de *Pisolithus tinctorius*. La section du sclérote met la médulla en contact avec le milieu nutritif et les hyphes peuvent alors entrer en croissance plus rapidement.

		Agents désinfectants															
		H2O2 (35%)				HgCl2 (0,5%)				Ca(ClO)2 (7%)				OsO4 (0,5%)			
		1mn	2mn	3mn	4mn	1mn	2mn	3 mn	4mn	1mn	2mn	3mn	4mn	1mn	2mn	3mn	4mn
Sclérotés	"non flottants"																
	entiers	30	52	54	53	26	53	52	60	12	16	17	22	24	53	50	60
	découpés	27	56	60	65	26	57	60	65	13	15	18	20	20	58	60	65
	"flottants"																
	entiers	12	18	19	19	10	16	17	15	8	7	10	11	10	7	9	10
	découpés	10	22	16	18	12	17	17	18	5	12	11	13	10	8	11	14

Tableau 6 : Influence du temps d'application de 4 agents désinfectants (hypochlorite de calcium, eau oxygénée, acide osmique et chlorure mercurique) sur l'isolement des sclérotés (entiers ou non) liés aux mycorhizes du type "blanc à sclérotés". Chaque valeur représente le pourcentage moyen d'isolement effectué sur 25 sclérotés.
Conditions d'isolement : Température 26°C ; Obscurité et milieu MMN.

Planche 1

Figure 1 : Peuplement d'*Azelia africana* en mélange dans la forêt des Kalounayes (station VII).

Figure 2 : *Azelia africana* (2 ans) en pépinière dans la station du C.N.R.F.de Ziguinchor.
Noter la présence de carpophores de *Scleroderma dictyosporum* et de *S. verrucosum*.

Figure 3 : Peuplement d'*Azelia africana* presque pure dans la forêt de Thiara (station VIII).

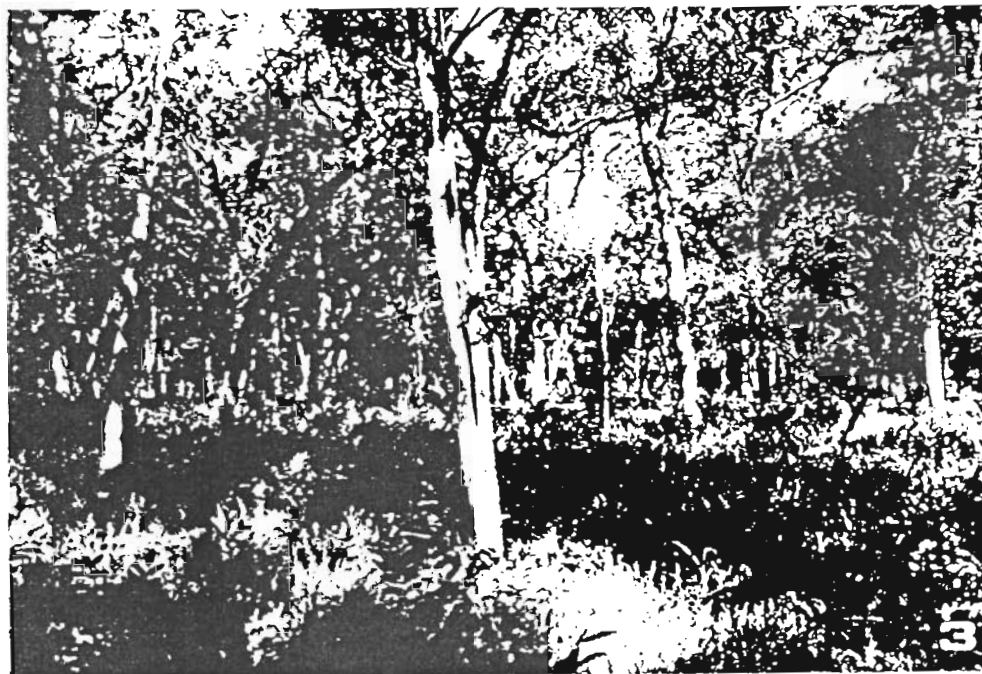


Planche 2

Bolétales associés avec *A.africana*.

Figure 1 : *Xerocomus subspinulosus* Heinem.ORS.7489.

Figure 2 : *Xerocomus spinulosus* Heinem & Goos.ORS.7514.

Figure 3 : *Boletellus* sp.ORS.7569.

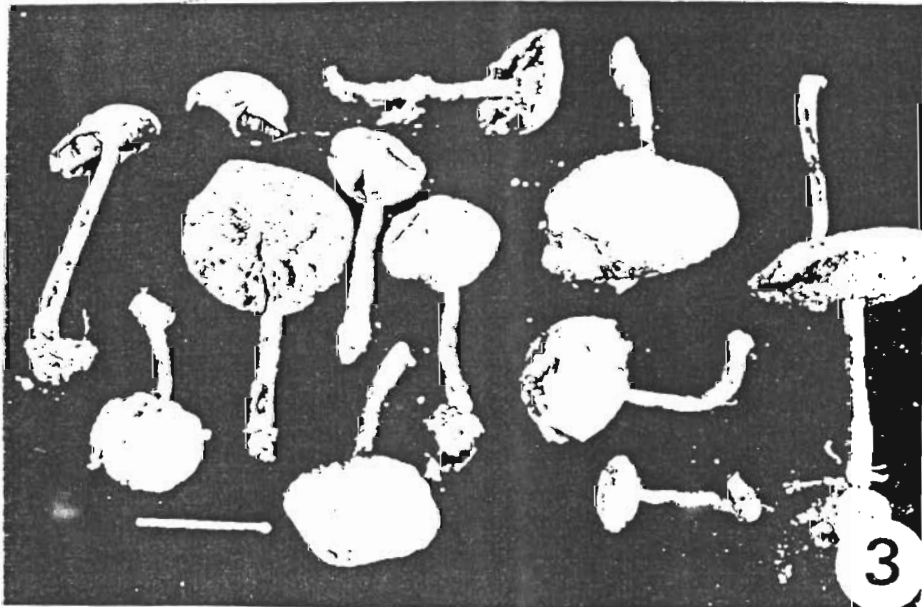
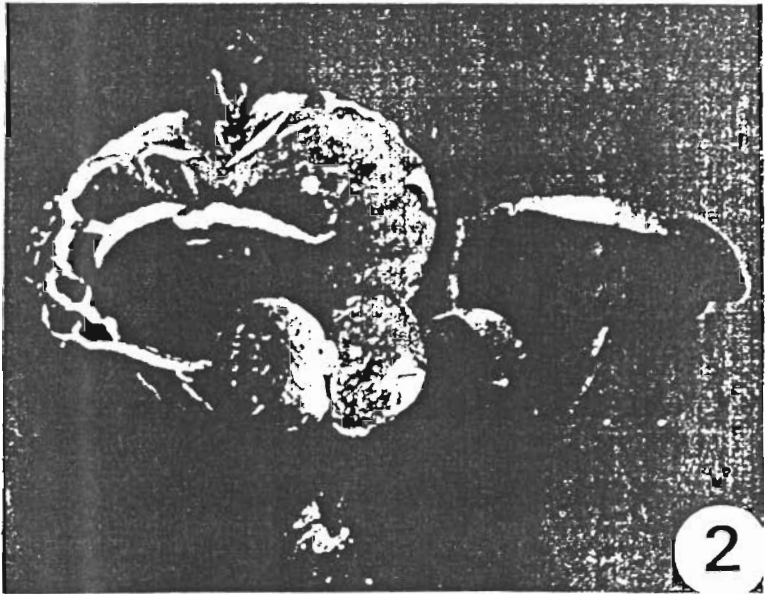
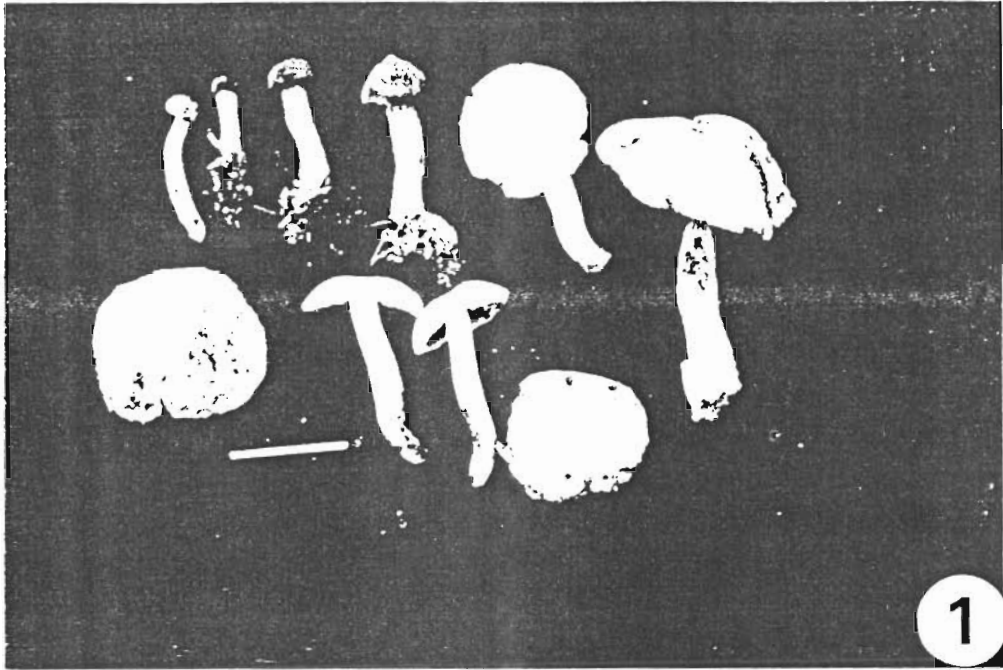


Planche 3

Bolétales et Cantharéllales associés avec *A.africana*.

Figure 1 : *Gyrodon intermedius* (Pat.) Sing.ORS.7729.

Figure 2 : *Gyrodon cupreus* Heinem.ORS.7460.

Figure 3 : *Cantharellus pseudofriesii* Heinem.ORS.7654.



Planche 4

Agaricales associés avec *A.africana*.

Figure 1 : *Amanita* aff.*rubescens* (Pers.: Fr.) S.F.Gray ORS.7566.

Figure 2 : *Amanita hemibapha* (Berk.& Br.) Sacc.ORS.7734.

Figure 3 : *Inocybe* sp 1 ORS.7569.

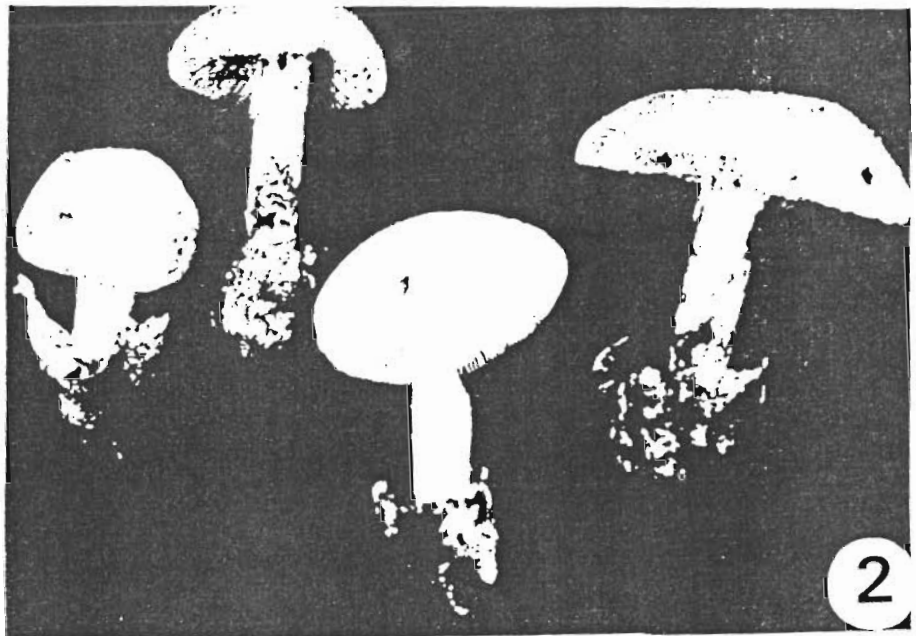
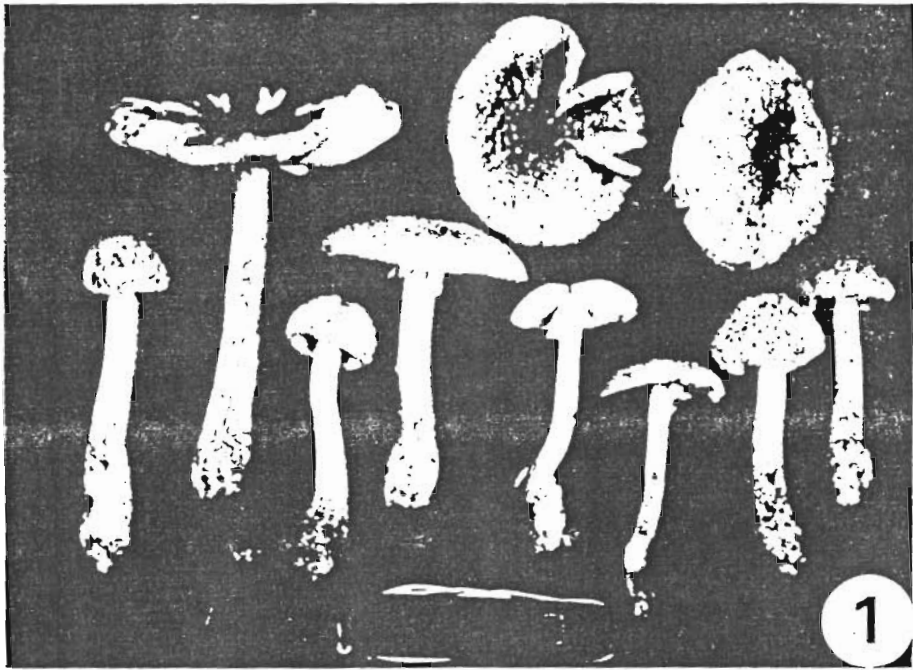


Planche 5

Russulales associés avec *A.africana*.

Figure 1 : *Russula* sp.2 ORS.7581.

Figure 2 : *Russula* aff.*pectinata* Fr.ORS.7669.

Figure 3 : *Lactarius* *gymnocarpus* Heim ORS.7881.

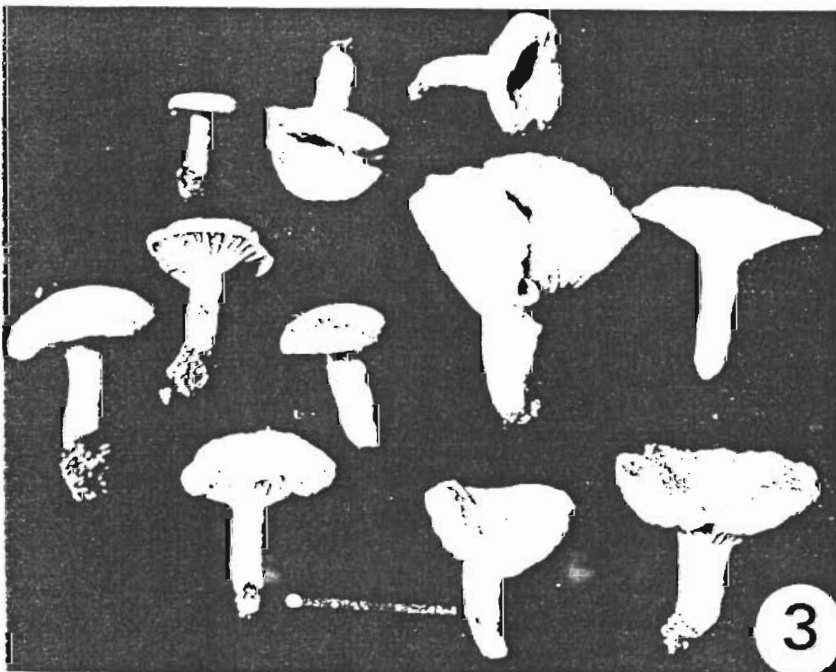
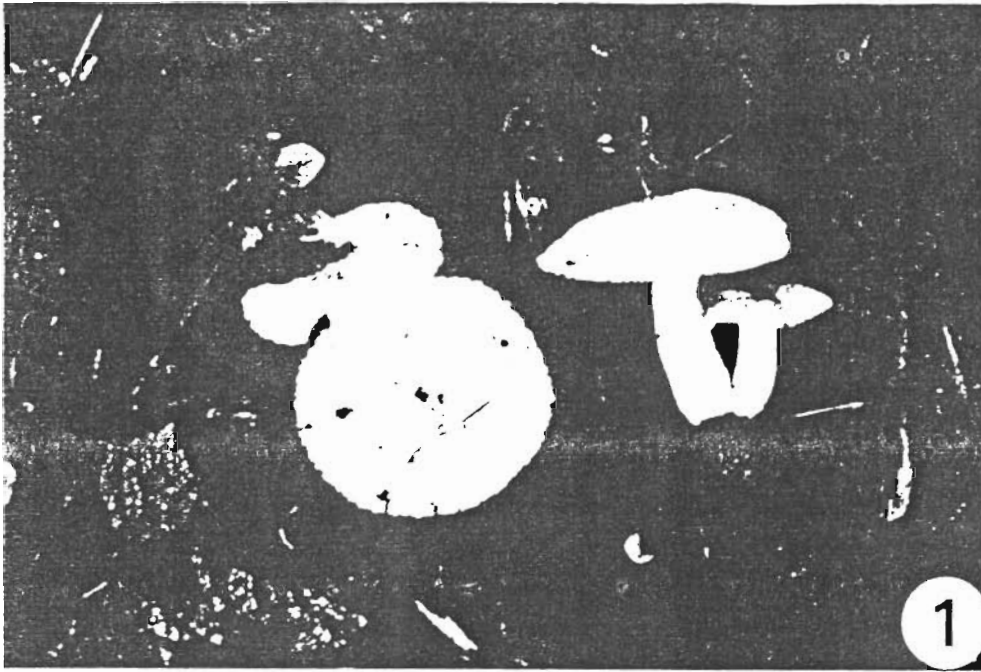


Planche 6

Sclérodermatales associés avec *A.africana* ou avec *E.camaldulensis*

Figure 1 : *Scleroderma dictyosporum* Pat.ORS.7731 (sous A.a)

Figure 2 : *Scleroderma verrucosum* Pers.ORS.7732 (sous A.a)

Figure 3 : *Pisolithus* sp.ORS.X003 (sous E.c)

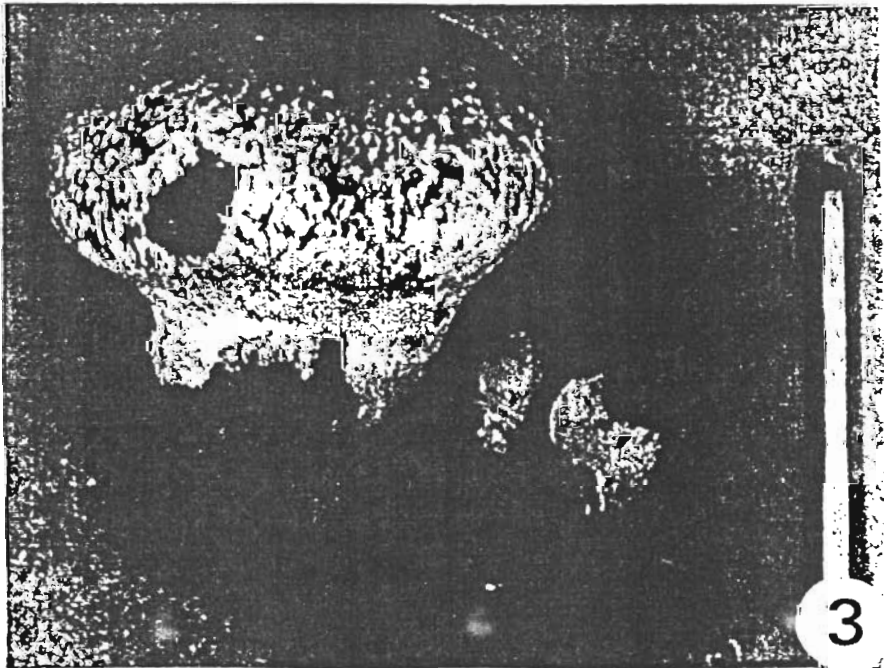
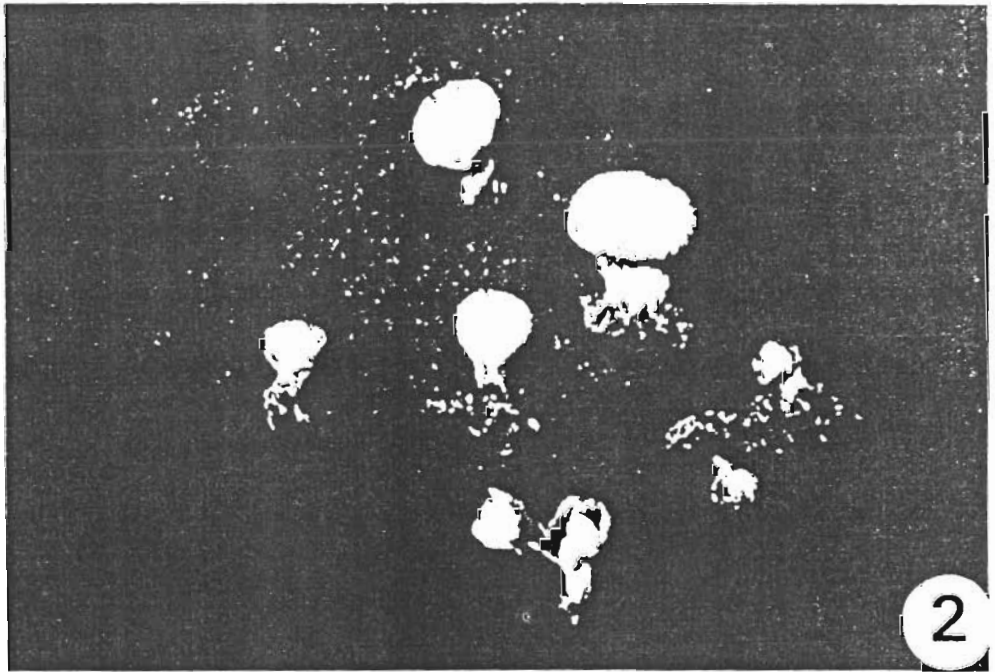
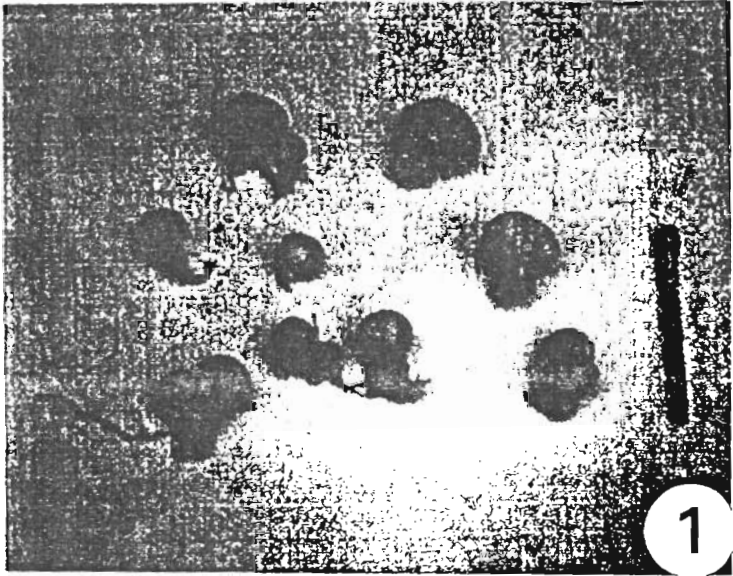


Planche 7

Bolétales et Gautiérales associés avec *U.guineensis*.

Figure 1 : *Tubosaeta brunneosetosa* (Sing.) Horak

Figure 2 : *Austrogautiera* sp.(hypogé) et les mycorhizes du type “jaune vive” de *U.g.*

Figure 3 : *Xerocomus subspinulosus* Heinem.ORS.7540

Figure 4 : *Xerocomus* aff.*hypoxanthus* Singer ORS.7603 et les mycorhizes du type “jaune pâle” de *U.g.*

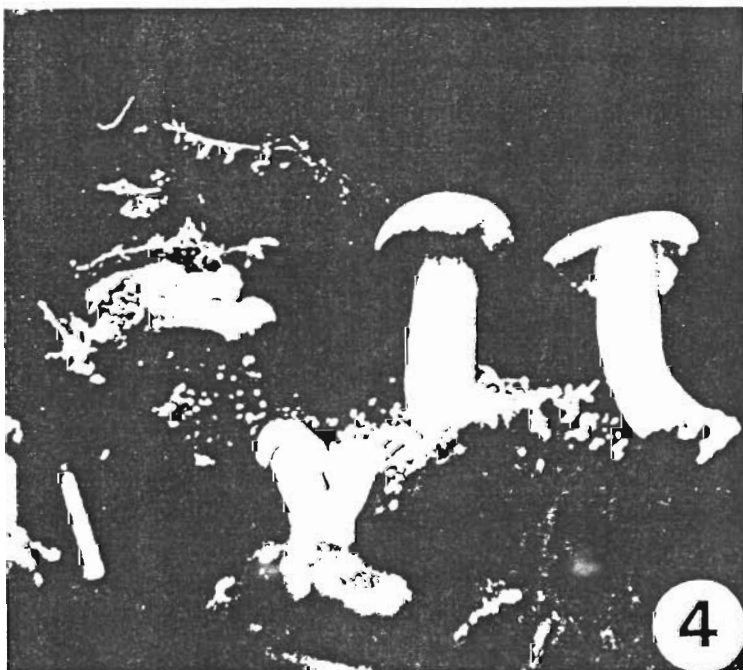
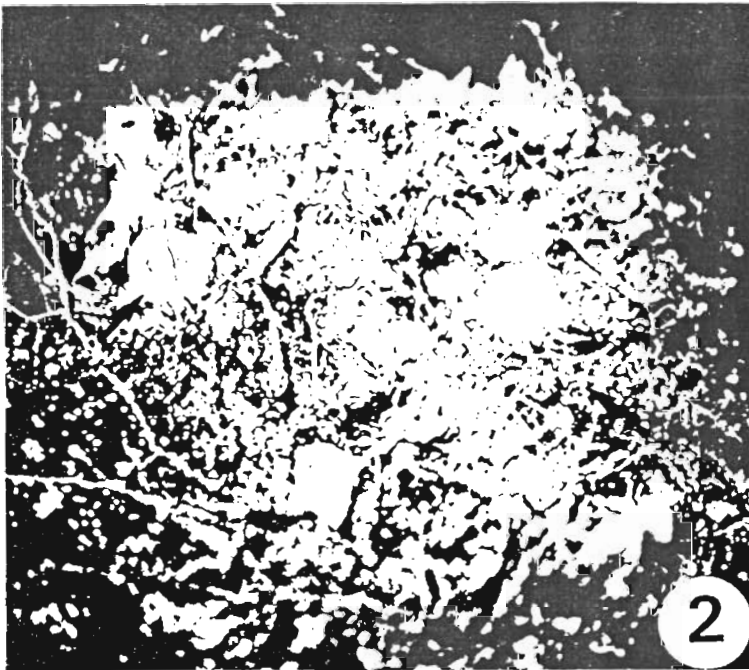
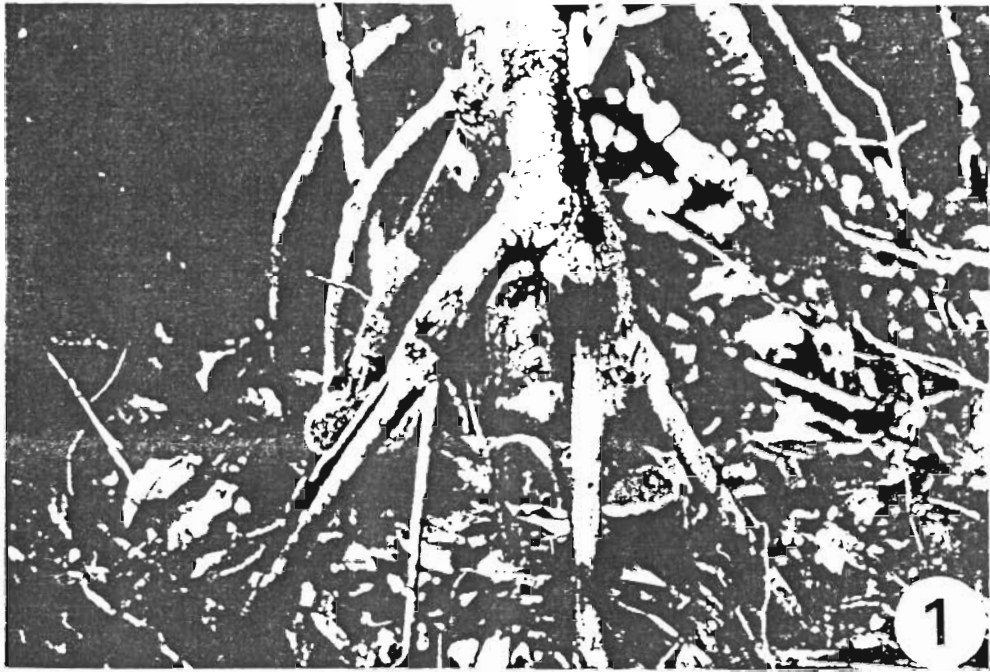


Planche 8

Mycélium de l'isolat XM003 (identifié à *S.dictyosporum*) issu des mycorhizes du type "jaune"

Figure 1 : Les hyphes émergent de la mycorhize après désinfection avec l'osmium.

Figure 2 : Mycélium en culture sur milieu nutritif MNM.

Figures 3 et 4 : Des verrues sont présentes à la surface des hyphes. Grs.x 110 (fig 3) et x 253 (fig 4).

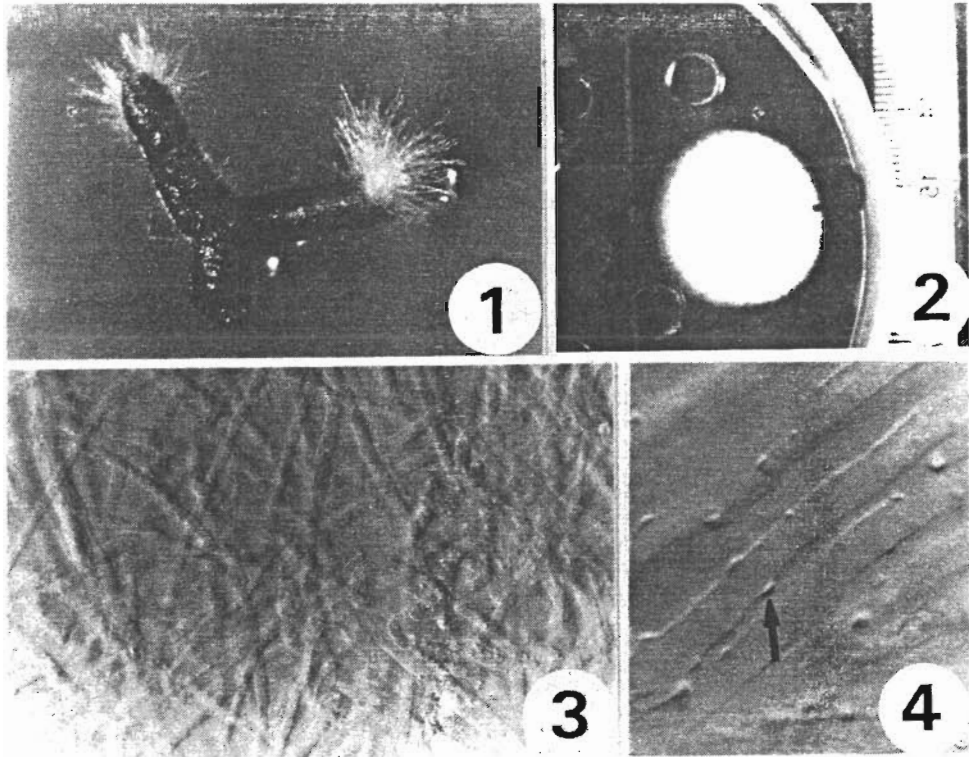


Planche 9

Mycélium de l'isolat XM001 (identifié à *S.verrucosum*) issu des mycorhizes du type "blanc à sclérotés".

Figure 1 : Les hyphes émergent de la mycorhize après désinfection avec l'osmium.

Figure 2 : Mycélium en culture pure sur milieu nutritif MNM.

Figures 3 et 4 : Renflement au niveau des septa des hyphes et présence de cristaux. Grs.x 245 (fig 3) et x 98 (fig 4).

Figure 5 : Les hyphes du cordon mycélien présentent également des renflements. Gr.x 118.

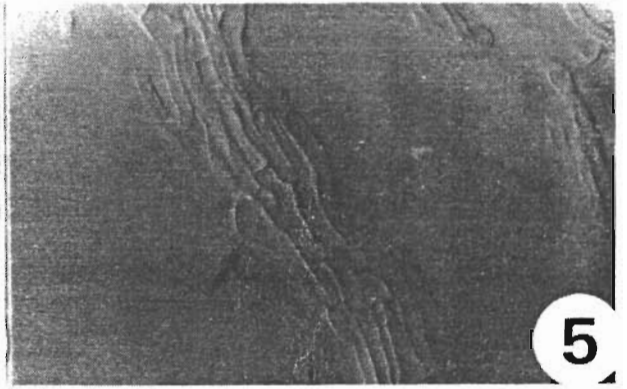
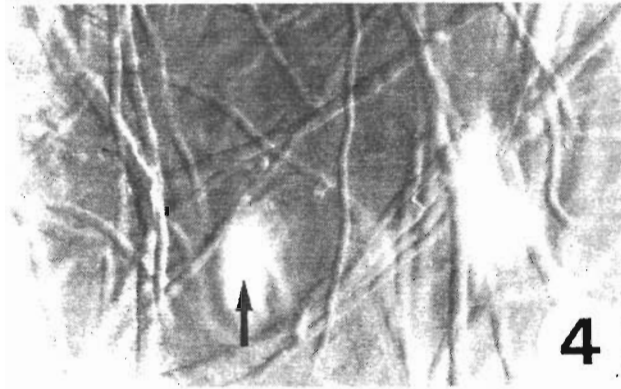
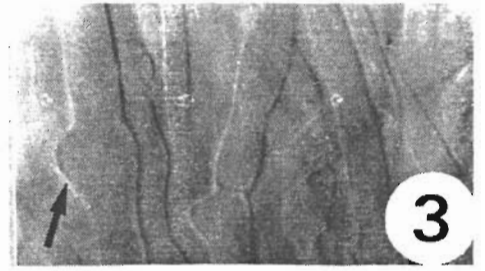
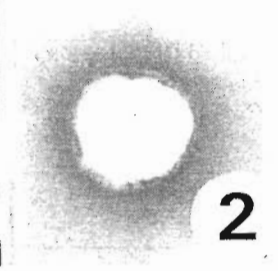
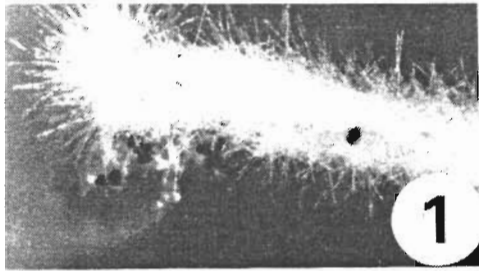


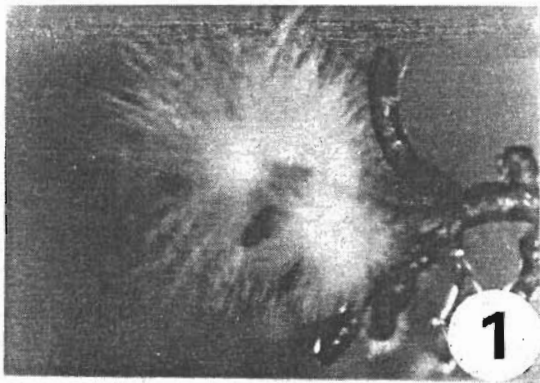
Planche 10

**Mycélium de l'isolat XM004 (non identifié) issu des mycorhizes du type
"blanc"**

Figure 1 : Les hyphes émergent de la mycorhize après désinfection avec l'osmium.

Figure 2 : Mycélium en culture pure sur milieu nutritif MNM.

Figures 3 et 4 : Les hyphes présentent une texture lisse. Gr.x 110. Des cordons mycéliens sont observés. Gr.x 115.



2

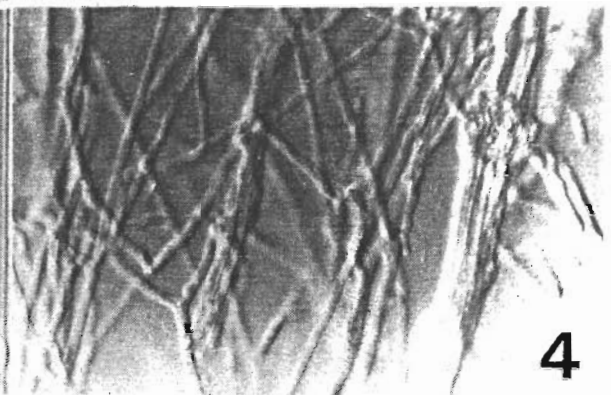
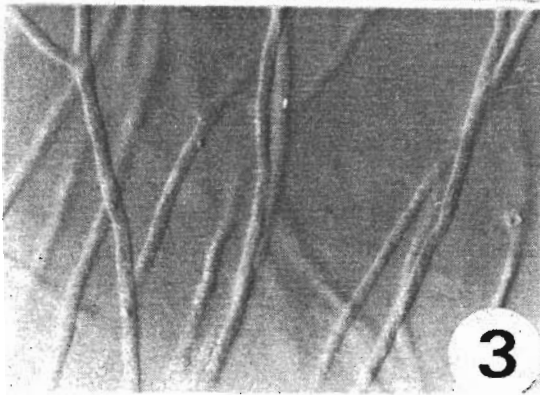


Planche 11

Mycélium de l'isolat XM002 (non identifié) issu des mycorhizes du type "brun foncé"

Figure 1 : Les hyphes émergent de la mycorhize après désinfection avec l'osmium.

Figure 2 : Mycélium en culture pure sur milieu nutritif MNM.

Figures 3 et 4 : Les hyphes présentent des boucles caractéristiques des Basidiomycètes. Gr.x 123. Les boucles sont également présentes sur les hyphes des cordons mycéliens. Gr.x 180.

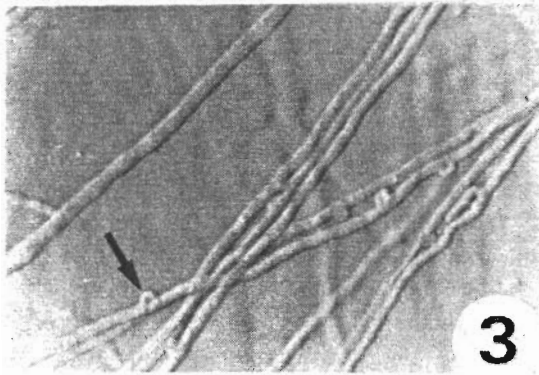
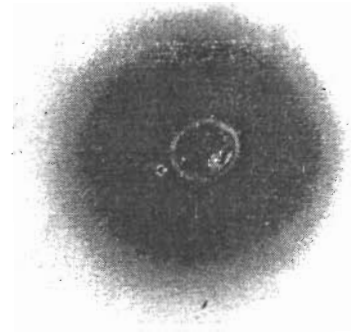
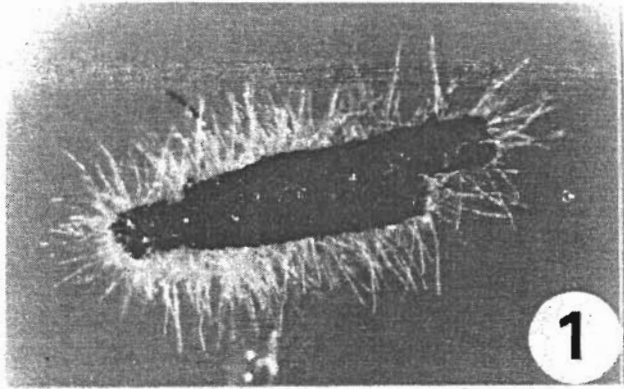


Planche 12

Les sclérotés liés aux mycorhizes du type "blanc à sclérotés"

Figure 1 : Sclérotés liés aux mycorhizes par des cordons mycéliens.

Figure 2 : Germination d'un sclérote sur milieu nutritif.

Figures 3 et 4 : Différents stades (1, 2 et 3) de la sclérogenèse. Les sclérotés se différencient à partir des cordons mycéliens présents sur les mycorhizes.

Figure 5 : Structure d'un sclérote "non flottant" avec un cortex et une médula. Gr.x 248

Figure 6 : Structure indistincte d'un sclérote "flottant". Gr.x 273

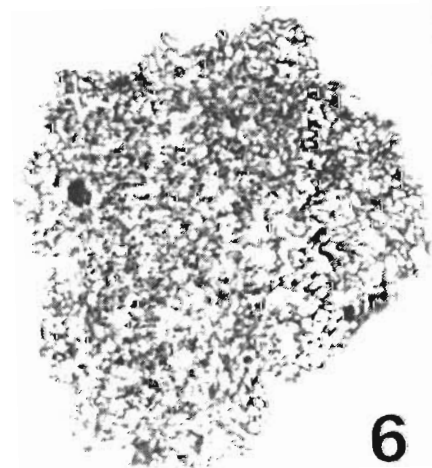
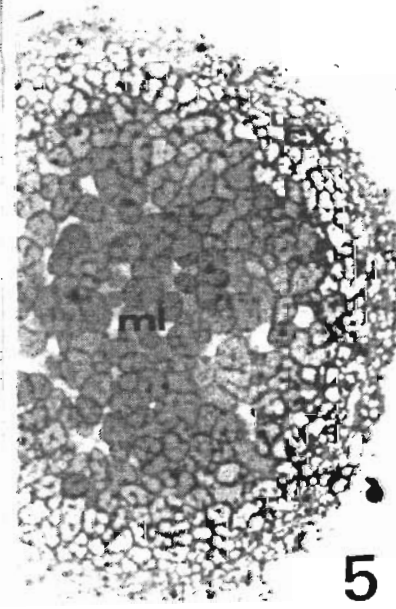
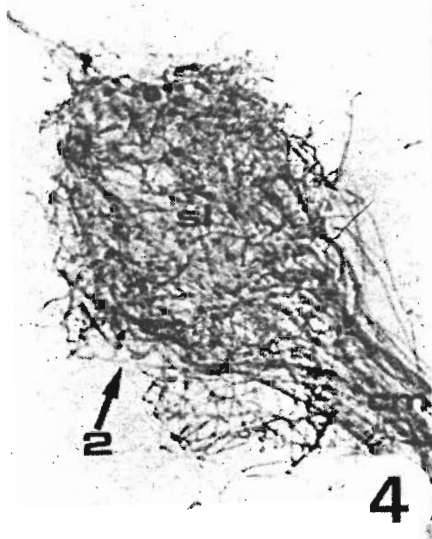
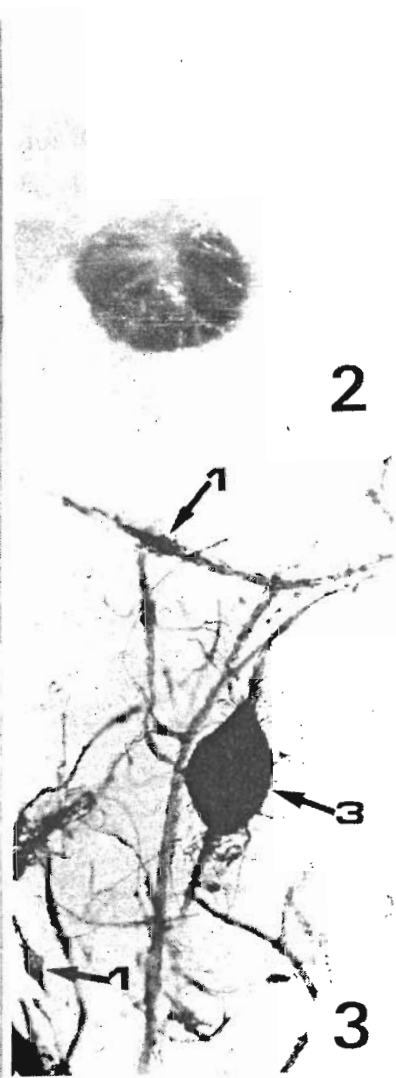


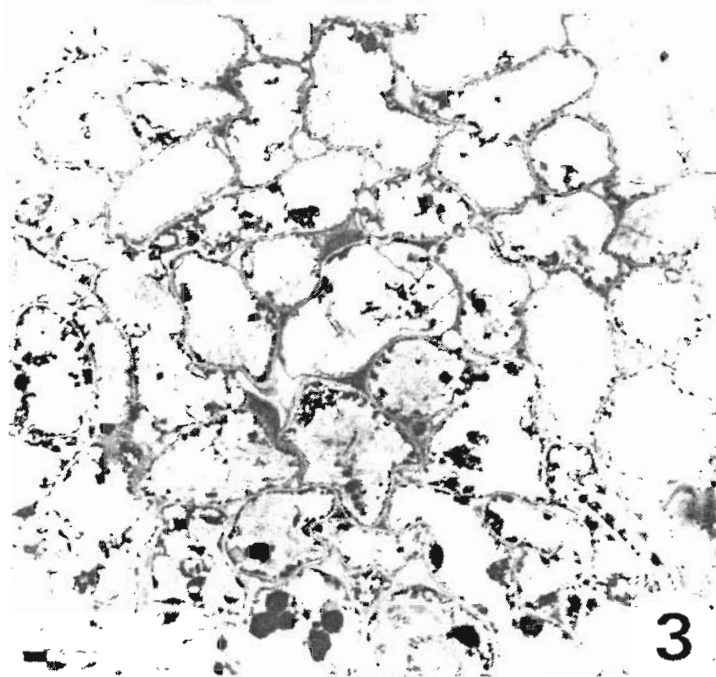
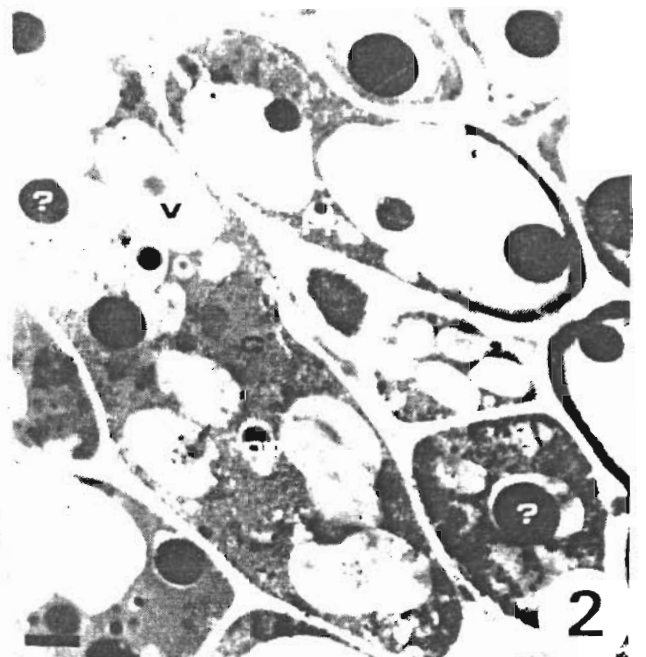
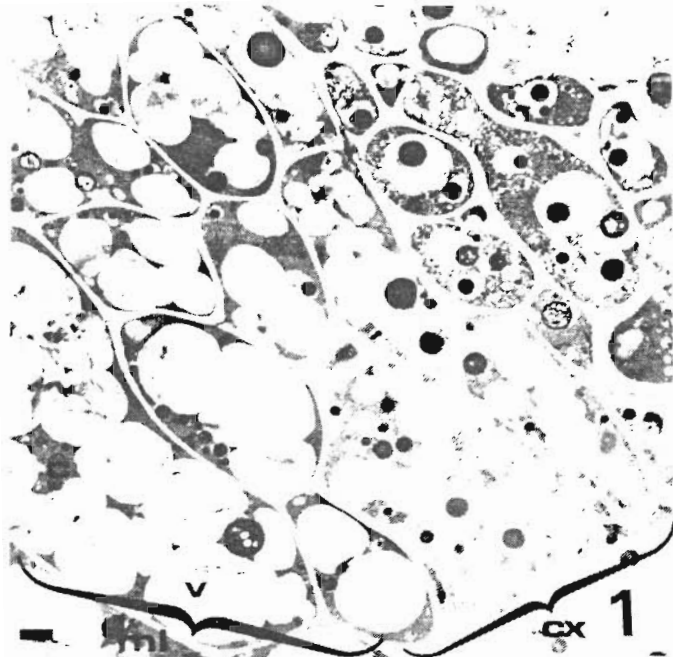
Planche 13

**Ultrastructure des sclérotés "non flottants" ou "flottants" liés aux mycorhizes
du type "blanc à sclérotés".**

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figures 1 et 2 : Détails du cortex et de la médula d'un sclérote "non flottant". Les hyphes du cortex présentent un volume cytoplasmique plus important alors que les hyphes de la médula sont plus vacuolisées Gr.x 3400 (fig.1). Détails des hyphes du cortex où les vacuoles renferment parfois des granules de polyphosphate. Gr.x 7666 (fig.2).

Figures 3 et 4 : Détails du cortex et de la médula d'un sclérote "flottant". Gr.x 3600 (fig.3). Le contenu cellulaire des hyphes est dans ce cas sénescant. Gr.x 8096 (fig.4).



Chapitre 2

Les mycorhizes de synthèse d'*Azelia africana* Sm.

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons isolé des souches fongiques à partir de carpophores, de mycorhizes ou de sclérotés. Le but de la présente étude est de vérifier expérimentalement le statut mycorhizien de ces souches fongiques vis à vis d'*Afzelia africana*. Chez cette espèce, la taille des graines et la rigidité du système racinaire sont les facteurs qui conditionnent la mise au point d'un dispositif de synthèse (BA et THOEN, 1989).

La mise au point des premières techniques de synthèse a consisté à rechercher un substrat adéquat à l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne. Chez les résineux, MELIN (1921) a mis au point un dispositif de synthèse en erlenmeyer contenant du sable stérile. HACSKAYLO (1953) a remplacé le sable par de la vermiculite pour améliorer l'aération et la capacité de rétention du substrat. MARX et ZAK (1965) ont montré que le mélange de tourbe et de vermiculite dans des proportions bien définies permet de stabiliser le pH du substrat. Les techniques de synthèse les plus récentes ont réduit les délais d'infection en inoculant au moment de l'apparition des racines courtes de manière à suivre l'établissement de la symbiose et à obtenir des mycorhizes d'état physiologique comparable (FORTIN *et al.*, 1982 ; CHILVERS *et al.*, 1986 ; KOTTKE *et al.*, 1987). En outre, le choix du dispositif de synthèse doit tenir compte de la taille et de la facilité de désinfection des graines et permettre un bon développement du système racinaire.

Dans la littérature il n'existe pas de donnée sur la germination des graines d'*Afzelia africana* Sm. Dès lors, il nous a paru nécessaire de rechercher les conditions optimales de germination des semences (au laboratoire et en serre) et d'obtention de plants stériles. Nous avons ainsi comparé cinq agents désinfectants : l'eau oxygénée à 35%, le chlorure mercurique à 0,1%, l'hypochlorite de calcium à 7% ou l'acide sulfurique à 95%. Avec ce dernier, nous avons comparé différents temps de stérilisation et de trempage à l'eau distillée.

Nous avons recherché des méthodes de synthèse compatibles avec la taille des jeunes plants d'*Afzelia* et dont la mise en oeuvre permet l'obtention rapide de mycorhizes. Nous avons par ailleurs déterminé l'âge le plus favorable à l'apparition des racines courtes réceptives à l'infection mycorhizienne (LAPEYRIE, 1983). La compatibilité de 50 champignons mycorhiziens parmi lesquels, des souches fongiques à large spectre d'hôtes (*Pisolithus tinctorius*, *Cenococcum graniforme*, *Paxillus involutus* etc ...) et des souches indigènes associées à une autre essence forestière tropicale (*Uapaca guineensis* Müll.Arg) a été vérifiée vis à vis d'*Afzelia africana*.

2. Matériel et Méthodes

2.1- Germination et obtention de plants stériles

2.1.1- Description de la graine

Les graines d'*Azelia africana* sont de grande taille (20-29,7 x 9,3-15,5 mm), ellipsoïdales à ellipsoïdales aplaties. La base de la graine est enveloppée d'une arille de couleur rouge orangée. Elles présentent un épais tégument de couleur noire (épaisseur = 1mm).

2.1.2- Origine et provenance des graines.

Les lots de graines âgés de 1 an que nous avons utilisés nous ont été gracieusement fournis par le CNRF-ISRA de Dakar. Ces graines proviennent de la forêt classée des Bayottes (région de Ziguinchor) où elles ont été récoltées en saison sèche (période de la fructification d'*Azelia* s'étend de janvier à mars) et conservées en chambre froide à 4°C.

2.1.3- Paramètres caractérisant la germination

COMES (1962) caractérise la germination des graines par différents paramètres:

- le pouvoir germinatif exprimé par le pourcentage de semences aptes à germer dans les conditions les plus favorables.

- la capacité de germination ou pourcentage de graines capable de germer dans des conditions bien définies.

- l'énergie de germination exprimée par la formule suivante:

$$E = \frac{a_1 b_1 + a_2 b_2 + \dots + a_n b_n}{a_1 + a_2 + \dots + a_n}$$

E: temps moyen de germination des graines.

a₁: nombre de graines germant au temps b₁

a_n: nombre de graines germant aux temps b_n

2.1.4- Désinfection des graines

Les graines sont débarassées de l'arille et immergées 2h selon les mêmes modalités pour les 4 agents désinfectants. Nous avons aussi comparé dans les mêmes conditions différents temps de stérilisation à l'acide sulfurique (1h à 5h 30 avec 30 mn d'intervalle entre les traitements). Après chaque traitement, les graines sont rincées abondamment à l'eau distillée stérile, égouttées sur papier filtre stérile puis déposées sur de l'eau gélosée à 0,9%. Les graines

sont mises à germer à l'obscurité (la température est de 28°C ; l'hygrométrie est de 90% de saturation). A l'extérieur, les graines sont mises à germer dans des bacs de sable dunaire (autoclavé à 120°C pendant 60 mn) abrités par un filet plastique dans les conditions de Dakar. Les relevés de germination sont effectués tous les jours en considérant qu'une graine a germé dès que la radicule perce le tégument.

2.2- Matériel fongique

Le tableau (7) dresse la liste des champignons mycorhiziens dont nous avons vérifié la compatibilité *in vitro* avec *Afzelia africana*. Les souches fongiques indigènes proviennent du Sénégal (chapitre 1) alors que les souches exotiques nous ont été gracieusement fournies par les laboratoires de l'I.N.R.A - Nancy (France) et du C.R.B.F - Laval (Canada).

2.3 - Détermination de l'âge d'apparition des racines latérales

Il est souvent utile de déterminer l'âge le plus favorable à l'infection mycorhizienne. Il correspond au début de l'apparition des racines latérales qu'il est souvent important de faire coïncider avec l'inoculation. L'expérimentation a été réalisée en tube (cf.paragraphe 2.4.1) ou en sac de polyéthylène. En tube, les plants sont cultivés sur un mélange de tourbe et de vermiculite (1:4 ; v/v) imprégné d'eau distillée stérile puis élevés en chambre de culture (l'intensité lumineuse est de $107 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$; la photopériode est de 16h ; l'hygrométrie est de 90% de saturation le jour et 70% la nuit ; la température est de 28°C jour et 18°C nuit). En sac de polyéthylène, les plants sont cultivés sur sable dunaire et placés à l'extérieur sous un filet de plastique dans les conditions de Dakar.

Nous avons prélevé 3 plants tous les 5 jours pendant 25 jours. A chaque prélèvement, nous avons compté le nombre de racines latérales d'ordre 1, 2 et 3 de chaque plant.

2.4 - Synthèse axénique

Les souches exotiques (tableau 7) ont été testées uniquement avec la technique en tube en apportant l'inoculum sous forme d'implant mycélien. Les souches indigènes ainsi que les souches à large spectre d'hôtes (isolats de *Pisolithus tinctorius*, *Paxillus involutus* et *Cenococcum graniforme*) ont été testées en tube (inoculum apporté sous forme d'implant mycélien ou de suspension mycélienne) et en boîte de Petri.

Tableau 7: Champignons mycorhiziens testés sur *Azelia africana* en conditions axéniques ou non axéniques.

N° Souches	Espèces fongiques	Provenance
Isolats issus de carpophores		
ORS.7734	<i>Amanita hemibapha</i>	Sénégal
K.13/21/6	<i>Amanita muscaria</i>	France
ORS.7566	<i>Amanita aff.rubescens</i>	Sénégal
ORS.7571
K.18/7	<i>Amanita rubescens</i>	France
ORS.7672	<i>Amanita</i> sp 1	Sénégal
ORS.7735	<i>Amanita</i> sp 2	Sénégal
ORS.7644	<i>Amanita</i> sp 3	Sénégal
ORS.7873	<i>Austrogautiera</i> sp.	Sénégal
S.166	<i>Astreus hygrometrica</i>	Belgique
Cg/2	<i>Cenococcum graniforme</i>	France
CRBF.0339	<i>Coltricia perennis</i>	Canada
ORS.7579	<i>Gyrodon intermedius</i>	Sénégal
CRBF.0038	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	Canada
D3.25/9	France
L2.9/3	<i>Laccaria bicolor</i>	France
Naud.	<i>Paxillus involutus</i>	France
ORS.7589	<i>Phlebopus sudanicus</i>	Sénégal
S.382	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Nicaragua
S.125	<i>Pisolithus tinctorius</i>	Belgique
PR.92	Australie
PR.94
PR.100A
S. Marx	USA
F.9	France
F.11	France
ORS.X003	<i>Pisolithus</i> sp.	Sénégal
ORS.7561	<i>Pulveroboletus tritinensis</i>	Sénégal
OXF.S.534	<i>Rhizopogon nigrescens</i>	France

CRBF.0113	<i>Rhizopogon rubescens</i>	Canada
ORS.7730	<i>Scleroderma capense</i>	Sénégal
ORS.7731	<i>Scleroderma dictyosporum</i>	Sénégal
OXF.S.517	" "	France
OXF.S.105	<i>Scleroderma texense</i>	France
ORS.7732	<i>Scleroderma verrucosum</i>	Sénégal
ORS.7660	<i>Sclerogaster</i> sp.	Sénégal
J2.5/4	<i>Suillus bellinii</i>	France
J2.15/4	<i>Suillus bovinus</i>	France
G.2	<i>Suillus collinitus</i>	France
J.7/5	<i>Suillus granulatus</i>	France
CRBF.002	<i>Suillus grevillei</i>	Canada
T20/1	<i>Telephora terrestris</i>	France
ORS.7573	<i>Tubosaeta brunneosetosa</i>	Sénégal
J2.5/8	<i>Xerocomus badius</i>	France
J2.5/5	<i>Xerocomus bellinii</i>	France
CH.	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	France
ORS.7514	<i>Xerocomus spinulosus</i>	Sénégal
ORS.7489	<i>Xerocomus subspinulosus</i>	Sénégal
ORS.7603	<i>Xerocomus</i> aff. <i>hypoxanthus</i>	Sénégal
Isolats issus de mycorrhizes		
ORS.XM001	Mycorrhize "blanche"(<i>S.verrucosum</i>)	Sénégal
ORS.XM003	Mycorrhize "jaune"(<i>S.dictyosporum</i>)	Sénégal
ORS.XM002	Mycorrhize "brun foncée"(non identifiée)	Sénégal
ORS.XM004	Mycorrhize "blanche"(non identifiée)	Sénégal
Isolats issus de sclérotés		
ORS.XS001	Mycorrhize "blanche"(<i>S.verrucosum</i>)	Sénégal

2.4.1- Synthèse en tube

Les synthèses sont réalisées en tube de verre (25 x 250 mm) dans un mélange de vermiculite et de tourbe (4:1 ; v/v) (pl.14, 1). Les tubes sont obturés avec un carré de papier aluminium maintenu contre la paroi par un ruban adhésif puis stérilisés à sec deux fois à 120°C pendant 20 mn à 24 h d'intervalle. Deux types d'inoculum sont préparés, l'un sous forme d'implants mycéliens et l'autre sous forme d'une suspension mycélienne.

2.4.1.1 - Inoculation par des implants mycéliens

L'inoculation a lieu au moment du repiquage des semis. Deux implants mycéliens préalablement régénérés sont déposés à la surface du substrat et chaque tube reçoit 30 ml de solution nutritive MNM (1969) dont la composition est en annexe (tableau 3). Les tubes sont à nouveau obturés avec des carrés de papier aluminium stérile. Une perforation du diamètre de la radicule permet d'introduire les semis stériles jusqu'au collet dont on enduit le pourtour avec de la vaseline stérile. Pour permettre une bonne levée, les semis sont recouverts de trois couches de papier filtre humidifié et sont maintenus en atmosphère saturée en humidité pendant une semaine dans les conditions de culture décrites au paragraphe (2.3). Les semis sont ensuite débarrassés du papier filtre et arrosés une fois par semaine à l'eau distillée stérile injectée à l'aide d'une seringue stérile.

2.4.1.2 - Inoculation par une suspension mycélienne

L'inoculation a lieu sur des plants âgés de 15 à 20 jours, élevés en tube comme dans le paragraphe précédent et arrosés avec de l'eau distillée stérile. L'inoculum est obtenu à partir d'une pré-culture mycélienne, sur milieu MMN gélosé, découpée en carré (1mm de côté) et ensemencée dans des fioles de 250ml contenant 100ml de milieu MNM liquide. Les fioles sont déposées sur table d'agitation à la température de 25°C et à l'obscurité. Au bout de 7 à 15 jours selon la souche, les colonies mycéliennes forment des boulettes. Elles sont rincées avec de l'eau distillée stérile puis fragmentées à l'aide d'un broyeur ULTRATURAX (type TP 18/10) de 2 à 5 secondes dans 20 ml de MNM liquide. Cinq ml d'une suspension mycélienne sont injectés dans les tubes à une profondeur de 4 à 8 cm. Les tubes sont maintenus dans les conditions définies au paragraphe (2.3).

2.4.2 - Synthèse en boîte de Petri

Nous avons utilisé la méthode de synthèse "paper sandwich" décrite par CHILVERS *et al.* (1986) (pl 14, 2). Compte tenu de la taille des graines d'*Afzelia*, nous avons repiqué les semis dans des boîtes de Petri en verre de grande dimension (18,5 x 2,5cm) sur milieu solide SHEMAKANOVA modifié (composition en annexe, tableau 3). Les champignons sont repiqués sur papier carton absorbant (papier bisulfite fourni par la société "Cellulose de Strasbourg") puis placés sur milieu PACHLEWSKI pendant 15 jours à 25°C. Lorsque le champignon recouvre le carton, l'inoculum ainsi préparé est déposé contre le système racinaire d'*Afzelia* âgé de 10 à 15 jours. Les conditions de culture sont identiques à celles décrites dans le paragraphe (2.3).

2.5 - Synthèse non axénique

Les souches fongiques indigènes et les souches à large spectre d'hôtes ont été testées dans ces conditions.

2.5.1 - Synthèse en minirhizotron

Cette méthode de synthèse combine quelques aspects des techniques décrites dans la littérature (RIEDAKER, 1974 ; LITCKE *et al.*, 1980 ; CHILVERS *et al.*, 1986) (pl.14, 4). Les semis d'*Afzelia* sont repiqués dans des conteneurs transparents et en polystyrène (20 x 8 x 2,5 cm) ouvrables sur une face et contenant un mélange de vermiculite et de tourbe (4:1; v/v) arrosé avec de l'eau courante. Au bout de 15 à 20 jours, nous avons appliqué sur la partie du système racinaire ayant colonisé la face ouvrable du conteneur, un inoculum préparé comme dans le paragraphe (2.4.2). L'inoculum est maintenu en contact seulement 2 jours puis retiré délicatement pour limiter tout développement de contaminants. Les conditions de culture sont identiques à celles décrites dans le paragraphe (2.3).

2.5.2 - Synthèse en sachet plastique

Nous avons utilisé la méthode de synthèse décrite par FORTIN *et al.*, (1982) (pl.14, 3). Les semis d'*Afzelia* sont élevés sur sable dunaire stérilisé à la vapeur et arrosé à l'eau courante pendant 15 jours. Après un rinçage soigneux à l'eau courante, le système racinaire est égoutté à l'aide d'un papier filtre et les plants sont mis en sachet. L'inoculum est apporté sous forme d'implants mycéliens régénérés qui sont appliqués contre les racines latérales d'ordre 2. Les conditions de culture sont identiques à celles décrites dans le paragraphe (2.3).

2.6 - Observation de la structure et de l'ultrastructure des mycorhizes

Le système racinaire est soigneusement rincé à l'eau distillée et les racines enrobées de mycélium sont traitées de deux façons. Pour des observations courantes en microscopie photonique (lumière artificielle ou en contraste de phase interférencielle) des coupes transversales ou longitudinales sont effectuées à main levée, éclaircies à l'hypochlorite de sodium à 20% pendant 2 à 3 mn et rincées à l'acide acétique à 1% avant d'être colorées au rouge Congo glycérimé 0,5%. Pour des observations plus détaillées les mycorhizes sont traitées selon les techniques de la microscopie électronique.

2.6.1- Fixation

Les mycorhizes sont découpées en petits fragments dans une goutte de fixateur (glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon phosphate 0,1M à pH 7,2). Après plusieurs dégazages sous vide, les objets sont fixés pendant 8h à la température de la glace fondante. Ils sont ensuite rincés toute une nuit à froid dans le tampon phosphate avant d'être postfixés pendant 1h par le tétr oxyde d'osmium à 2% dans le même tampon.

2.6.2- Déshydratation et inclusion

Après la post-fixation, les objets sont rincés plusieurs fois au tampon phosphate puis à l'eau distillée avant d'être déshydratés par de l'acétone en concentrations croissantes (10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 95% et 2x100%), par étapes successives d'une durée de 20 mn. Les objets sont imprégnés pendant 24h dans les mélanges acétone et spurr (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 ou 1:3), puis dans du spurr à 100% pendant 6 jours (un renouvellement du spurr à 100% après 3 jours d'imprégnation) avant d'être inclus 2 jours à 70°C.

2.6.3- Coupes

Des coupes semi-minces sont réalisées à l'aide d'un couteau de diamant sur un ultramicrotome (LKB), recueillies sur une lame de verre et collées par un léger chauffage. Elles sont ensuite colorées avec le bleu de toluidine à 1% dans 2,5% de Na₂CO₃ (pH 11,6). Des coupes minces (600 à 800 Angström) sont également effectuées dans les mêmes conditions, recueillies sur des grilles en cuivre-rhodium (G300) sur la face rhodiée, puis contrastées 20 mn par l'acétate d'uranyle (VALENTINES, 1961) et 15 mn par le citrate de plomb (REYNOLDS, 1963). Les coupes sont observées à l'aide des microscopes électroniques SIEMENS EIMISKOP 102 ou ZEISS EM 9 S 2.

2.6.4- Cytochimie

2.6.4.1- Test PATAg

Ce test mis au point par THIERY (1967) est spécifique des polysaccharides en liaison α (1 à 4) ou β (1 à 4). Ce test comporte une oxydation ménagée par l'acide periodique qui ouvre spécifiquement le cycle osidique au niveau des glycols en faisant apparaître deux fonctions aldéhydes qui sont visualisées par le thiocarbohydrazide (TCH) et le proteinate d'argent (THIERY et RAMBOURG, 1974).

Ce test se pratique à la température ambiante sur des coupes recueillies sur des grilles en or qui sont traitées de la manière suivante :

- Oxydation par l'acide periodique à 1% pendant 30 mn
- Rinçage par l'eau distillée
- Bain par le thiocarbohydrazide à 0,2% dans l'acide acétique à 20% pendant 4 à 5 heures.
- Rinçage par l'acide acétique aux concentrations décroissantes (20%, 15%, 10% et 5%) à raison de deux bains de 5 mn pour chaque concentration.
- Rinçage à l'eau distillée
- Traitement pendant 30 à 45 mn à l'obscurité par une solution de proteinate d'argent à 1% dans de l'eau distillée
- Rinçage à l'eau distillée

Les témoins sont réalisés sur des coupes oxydées par de l'acide periodique à 1% pendant 4 à 5 h et soumis au traitement précédent sans le TCH.

3. Résultats et Discussion

Quel que soit le traitement effectué (tableaux 8, 9, 10 et 11), le pourcentage de germination des graines d'*Azelia africana* Sm. est toujours supérieur ou égal à 50%. Nous avons obtenu une amélioration du pourcentage de germination par rapport au témoin avec les quatre agents désinfectants sur de l'eau gélosée ou sur le sable dunaire. Le pourcentage des graines germées est dans le même ordre de grandeur pour les quatre agents désinfectants (tableau 8). Si nous considérons l'énergie de germination ou temps moyen de germination, l'acide sulfurique concentré appliqué dans une large gamme de temps (1h à 5h30) est plus satisfaisant que l'hypochlorite de calcium, l'eau oxygénée et le chlorure mercurique.

Tableau 8 : Germination des graines d'*Afzelia africana* (sur eau gélosée à 0,9%) traitées par différents agents désinfectants.

Traitements	Nombre de graines testées	% de graines contaminées	% de graines germées	Energie de germination (jours)
Témoin	50	100	53	14
H ₂ O ₂ (35%)	50	3	73	12,7
HgCl ₂ (0,1%)	50	2	80	13,1
CaClO (7%)	50	2	86	13,5
H ₂ SO ₄ (95%) et trempage dans l'eau distillée à 4°C pendant 24h	50	3	93	5,1
H ₂ SO ₄ (95%)	50	2	98	5,3

-Chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions

-Temps d'application des traitements : 2h

* Obscurité

Tableau 9 : Germination des graines d'*Afzelia africana* (sur sable dunaire stérile) traitées par différents agents désinfectants.

Traitements	Nombre de graines testées	Nombre de graines contaminées (%)	Nombre de graines germées (%)	Energie de germination (jours)
Témoin	50	nd	48	15
H ₂ O ₂ (35%)	50	nd	62	13
HgCl ₂ (0,1%)	50	nd	70	13,1
CaClO (7%)	50	nd	76	14
H ₂ SO ₄ (95%) et trempage dans l'eau distillée à 4°C pendant 24h	50	nd	95	5
H ₂ SO ₄ (95%)	50	nd	96	6

-Chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions

-Temps d'application des traitements : 2h

-Lumière et température du jour

Tableau 10 : Germination des graines d'*Afzelia africana* (sur eau gélosée à 0,9%) en fonction de différents temps de stérélisation à l'H₂SO₄ concentré (95%).

Traitements	Nombre de graines testées	Nombre de graines contaminées (%)	Nombre de graines germées (%)	Energie de germination (jours)
Témoin	50	100	55	13,1
1h	50	12	88	7,3
1h30	50	10	90	6,4
2h	50	1	100	5,8
2h30	50	1	99	5,2
3h	50	1	100	5,2
3h30	50	1	97	4,8
4h	50	4	95	5
4h30	50	7	92	4,7
5h	50	8	88	4,7
5h30	50	9	60	4,7

-Chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions

-Obscurité

Tableau 11 : Germination des graines d'*Afzelia africana* (sur sable dunaire stérile) en fonction de différents temps de stérélisation à l'H₂SO₄ concentré (95%).

Traitements	Nombre de graines testées	Nombre de graines contaminées (%)	Nombre de graines germées (%)	Energie de germination (jours)
Témoin	50	nd	47	14
1h	50	nd	90	8,5
1h30	50	nd	92	8
2h	50	nd	98	7,3
2h30	50	nd	98	7
3h	50	nd	97	7,1
3h30	50	nd	90	6,7
4h	50	nd	87	6,2
4h30	50	nd	71	6
5h	50	nd	65	5,9
5h30	50	nd	50	5,9

-Chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions

-Obscurité

Ces derniers donnent cependant des résultats équivalents à ceux obtenus avec l'acide sulfurique en ce qui concerne le critère de désinfection superficielle des graines. Par ailleurs il apparaît que les différents temps d'imprégnation à l'acide sulfurique n'ont pas d'influence sur le pourcentage et le temps moyen de germination. Un temps d'imprégnation trop court (1h à 1h30) ou trop long (5h à 5h30) occasionnent respectivement des contaminations fongiques ou des brûlures sur les cotylédons et sur l'embryon. Nos résultats indiquent par ailleurs que la durée de trempage à l'eau distillée (24h à 4°C) après traitement à l'acide sulfurique n'a pas d'influence sur le pourcentage de germination et sur le temps moyen de germination (tableaux 8 et 9). A l'extérieur comme au laboratoire, les valeurs obtenues pour les différents paramètres utilisés varient dans le même sens

Le traitement à l'acide sulfurique permet simultanément la scarification et la désinfection superficielle des graines d'*Afzelia africana*. La plus grande efficacité de l'acide sulfurique par rapport aux autres traitements tient essentiellement à son action scarificatrice pour lever la dormance probablement d'origine tégumentaire. Ces résultats nous ont conduit à adopter le traitement par l'acide sulfurique (95% pendant 2h) pour la germination des graines dans toutes nos expérimentations ultérieures.

Toutes les techniques de synthèse proposées permettent de vérifier le statut mycorhizien ou pseudomycorhizien (manteau seul) de 19 isolats fongiques vis à vis d'*Afzelia africana* (tableau 12). Cependant d'un point de vue pratique et compte tenu de la taille des graines d'*Afzelia*, il nous a paru nécessaire de faire un choix parmi ces dispositifs afin de proposer un test de routine permettant d'évaluer rapidement le caractère symbiotique d'une souche fongique. En conditions axéniques, il apparaît que la synthèse réalisée en tube convient le mieux à l'enracinement d'*Afzelia*. De plus l'inoculum apporté sous forme de suspension mycélienne permet une infection plus rapide que l'inoculum apporté sous forme d'implant mycélien gélosé car la dissémination de l'inoculum est meilleure. Cette technique permet également de faire coïncider l'inoculation avec l'apparition des racines latérales (figure 9), réduisant le délai d'infection de 15 à 4 jours et rendant moins aléatoire la reprise de l'inoculum. Cependant la durée totale du test, depuis la germination, reste identique (minimum deux semaines). Bien qu'il soit possible d'obtenir des mycorhizes en boîtes de Petri, la taille des plants d'*Afzelia* limite l'utilisation de cette technique.

En conditions non axéniques, la technique du minirhizotron beaucoup plus simple à mettre en oeuvre que la technique en tube, apparaît comme un bon outil de criblage des souches fongiques infectieuses.

Tableau 12 : Mycorhizes et pseudomycorhizes d'*Afzelia africana* obtenues avec différentes techniques de synthèse.

N° Souches	Conditions axéniques			Conditions non axéniques	
	Tube avec implant mycélien	Tube avec suspension mycélienne	Boîte de Petri	Minirhizotron	Sachet en plastique
ORS.7731	M	M	M	M	M
ORS.7732	M	nd	M	M	M
ORS.XM002	M	M	M	M	M
ORS.XM004	M	M	M	M	M
ORS.XM001	M	nd	M	M	M
ORS.XM003	M	M	M	M	M
ORS.XS001	M	nd	M	M	M
ORS.X003	PM	PM	PM	PM	PM
ORS.7735	PM	PM	PM	PM	PM
ORS.7572	PM	PM	PM	PM	PM
<i>P.i.</i>	PM	PM	PM	PM	PM
8 isolats <i>P.t.</i>	PM	PM	PM	PM	PM

M : Mycorhize

P.i. : *Paxillus involutus* (Naud.)

PM : Pseudomycorhize

P.t. : *Pisolithus tinctorius*

nd : Non déterminé

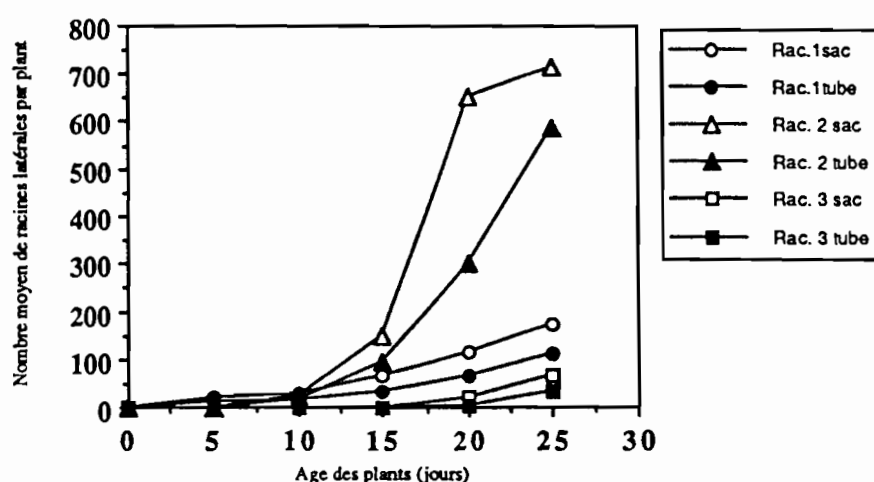


Figure 9 : Détermination de l'âge d'apparition des racines latérales d'ordre 1, 2 ou 3 d'*Afzelia africana* élevé en tube ou en sac de polyéthylène.

Le délai de réponse à l'infection (4 jours) est identique à celui observé en tube avec une suspension mycélienne. Au contraire, la technique en sachet plastique ne convient pas au développement du système racinaire et l'obtention des mycorhizes dans ces conditions est souvent aléatoire. Compte tenu de la facilité de mise en oeuvre de la technique du minirhizotron, nous l'avons utilisée pour nos expérimentations ultérieures.

Par ailleurs il est remarquable de souligner que chez *Afzelia* la réceptivité précoce des racines latérales à l'infection est comparable par exemple à celle des eucalyptus (CHILVERS *et al.*, 1988) alors que chez les Diptérocarpacées il semble qu'elle soit plus tardive (8 mois) (de ALWIS et ABEYNAYAKE, 1988 ; LEE LEE SU, 1988). Nos observations sur des régénérations naturelles au stade cotylédonnaire confirment cet état de fait (THOEN et BA, 1989). Dans les conditions de notre test, l'infection commence au stade cotylédonnaire avant l'étalement des premières feuilles. Ces observations suggèrent que les substrats carbonés fournis aux symbiontes fongiques proviennent des cotylédons, principale source de carbone pendant la phase initiale de croissance des jeunes plants d'*Afzelia*.

En général, il est considéré que les champignons ectomycorhiziens de la zone tempérée sont peu spécifiques (HARLEY et SMITH, 1983). Cependant, dans nos conditions expérimentales ces champignons mycorhiziens ne montrent pas une aptitude mycorhizogène vis à vis d'*Afzelia*. Ces souches qui se sont avérées non infectieuses, ont cependant parfaitement bien colonisé le substrat. Cela atteste au moins que, bien que présentes, ces souches fongiques sont inaptes à coloniser le système racinaire d'*Afzelia*. Ces résultats suggèrent une spécificité d'hôte d'un continent à un autre. Il apparaît également que les souches fongiques indigènes présumées associées à *Uapaca guineensis* ne sont pas mycorhizogènes vis à vis d'*Afzelia* bien que nous ayons récolté des champignons communs à ces deux essences forestières (THOEN et BA, 1989). Il pourrait exister chez ces champignons indigènes une variabilité intraspécifique.

Chez les souches fongiques indigènes les mycorhizes de synthèse sont tout à fait comparables à celles obtenues par piégeage (pl.15). Elles présentent une structure typique des mycorhizes de feuillus avec un manteau et un réseau de Hartig en coin qui ne pénètre pas au delà de la première assise de cellules corticales (pl.16). Il apparaît également que les mycorhizes de synthèse, entre *Afzelia* et les isolats issus des mycorhizes ou des sclérotés, réagissent aux mêmes réactifs macrochimiques (H₂SO₄ pure et sulfoformol à 37%) que celles obtenues avec les isolats provenant des carpophores correspondants (*S. verrucosum* et *S. dictyosporium*). Ces observations complémentaires confirment l'identification effectuée dans le chapitre (1). D'autre part, nous avons observé avec la souche XM002 un changement de couleur des mycorhizes de synthèse (brun clair à brun foncé) (pl.15, 1 et 2).

Le tableau (13) indique les principales caractéristiques des mycorhizes et des pseudomycorhizes de synthèse obtenues en conditions axéniques. Nous pouvons classer les souches fongiques en trois groupes selon le degré d'aptitude à la symbiose : souches fongiques mycorhizogènes (manteau et réseau de Hartig), peu mycorhizogènes (manteau) et non mycorhizogènes (absence de manteau et de réseau de Hartig).

Avec *Paxillus involutus*, *Amanita* spp. et des écotypes du *Pisolithus*, nous avons obtenu des pseudomycorhizes dans des conditions variées (tableau 12) avec un manteau d'épaisseur comparable à ce que nous avons observé chez les mycorhizes *sensu stricto* (pls.17 et 18).

Une étude ultrastructurale montre que l'interface de ces pseudomycorhizes obtenues en condition non axénique (minirhizotron) est différente selon la souche fongique considérée (pls.19, 20 et 21). Après 4 jours de contact entre *Afzelia* et *Pisolithus* sp.(X003), l'interface est caractérisée par la présence de matériel et de digitations pariétaux (pl.19) de nature polysaccharidique (pl.20). Avec *Paxillus involutus* Naud., l'interface présente également du matériel et des digitations pariétaux (pl.21, 3) de nature polysaccharidique (non indiqué dans le mémoire). Avec les souches indigènes *Amanita* spp.(7672 ou 7735) nous n'avons pas observé de matériel polysaccharidique sur la face interne de la paroi (pl.19, 5 et 6) comme dans le cas de *Pisolithus* sp (X003) ou de *Paxillus involutus* (Naud.).

La signification écologique et physiologique de ces pseudomycorhizes avec un manteau seul ou un réseau de Hartig seul commence à être connue. L'existence d'ectomycorhizes sans manteau mais avec un réseau de Hartig à fonctionnement biotrophique a été signalée chez *Pinus strobus* associé à *Endogone flammicorona* et chez *Helianthemum salicifolium* mycorhizé par *Terfezia leptoderma* (BONFANTE-FASOLO et SCANNERINI, 1977 ; DEXHEIMER *et al.*, 1985). Chez l'épicéa la présence du réseau de Hartig seul correspond au vieillissement de la mycorhize (AL ABRAS *et al.*, 1988). D'autres auteurs soulignent que les pseudomycorhizes *in situ* des eucalyptus avec les genres *Cortinarius* et *Hysterangium*, localisées respectivement dans la litière et à l'interface de celle-ci avec le sol, interviennent dans l'absorption des éléments nutritifs et dans la stimulation de croissance de ces eucalyptus (WARCUP, 1980 ; MALAJCZUK *et al.*, 1987). WARCUP (1980) suggère que ces pseudomycorhizes pourraient être considérées comme des mycorhizes au sens large. Cependant, les situations d'incompatibilité *in vitro* entre les eucalyptus et des champignons spécifiques des conifères (*Rhizopogon* sp. et *Suillus* sp.) se traduisent dans certains cas par la formation d'un manteau fongique, l'absence du réseau de Hartig, l'accumulation de composés phénoliques (tanins) dans les cellules corticales ou la lignification de la paroi de la cellule hôte en contact avec le

Tableau 13 : Principaux caractères des mycorhizes de synthèse axénique chez *Afzelia africana*.

Espèces fongiques	Mycorhizes et pseudomycorhizes					
	Diamètre (μm)	Epaisseur du manteau (μm)	Profondeur du réseau de Hartig(μm)	Boucle	Cordon mycélien	Sclérote
<i>Amanita</i> sp.1(7672)	190-200	12-15	-	-	+	-
<i>Amanita</i> sp.2(7735)	220-240	26-28	-	+	+	-
<i>Paxillus involutus</i>	192-205	5-8	-	+	+	+
<i>Pisolithus</i> sp.(X003)	200-210	28-30	-	+	+	-
<i>Pisolithus tinctorius</i>	210-220	50-56	-	+	+	-
<i>Scleroderma</i>						
<i>dictyosporum</i> (7731)	180-190	64-70	12-18	-	+	-
<i>Scleroderma</i>						
<i>verrucosum</i> (7732)	240-248	24-28	12-20	-	+	-
ORS.XM001(identi- fiée à <i>S.verrucosum</i>)	220-240	23-25	10-18	-	+	-
ORS.XS001(identi- fiée à <i>S.verrucosum</i>)	200-230	20-23	12-18	-	+	-
ORS.XM003(identi- fiée à <i>S.dictyosporum</i>)	200-240	56-69	16-20	-	+	-
ORS.XM002(non identifiée)	284-308	58-92	12-20	+	+	-
ORS.XM004(non identifiée)	200-220	56-58	10-26	-	+	-

+ : Présence

- : Absence

champignon (MALAJCZUK *et al.*, 1982 et 1984). Des observations similaires ont été faites chez le genre *Alnus* spp. vis à vis de *Paxillus involutus* (MOLINA, 1981) et entre *Pinus sylvestris* et *Suillus grevillei* champignon mycorhizien spécifique du mélèze (DUDDRIDGE, 1986 a,b). ASHORD et ALLAWAY (1982 et 1985) ont mis en évidence, chez les pseudomycorhizes de *Pisonia grandis*, des cellules épidermiques de transfert au contact des hyphes du manteau. La formation de digitations au niveau de la paroi de l'épiderme augmenterait la surface d'échanges entre les deux partenaires (ALLAWAY *et al.*, 1985). Au plan physiologique, FINLAY (1989) montre que la translocation du ^{14}C ou l'accumulation du ^{32}P dans le système racinaire mycorhizé est significativement plus importante chez les couples compatibles que chez les couples peu compatibles (manteau seul).

Dans les conditions de notre test (absence de milieu nutritif), la présence de matériel polysaccharidique sur la face interne de la paroi des cellules corticales en contact avec les hyphes de *Pisolithus* sp.(X003) ou de *Paxillus involutus* traduit des situations d'incompatibilité au sens de MOLINA et TRAPPE (1982b). Ce matériel polysaccharidique est absent chez les cellules corticales sous-jacentes qui ne sont en contact avec les hyphes (pl.20). Ces observations suggèrent que la présence du champignon induit un épaissement de la paroi des cellules corticales d'*Afzelia*. La pénétration des hyphes de *Pisolithus* sp.(X003) dans les cellules vivantes et la formation de papilles suggèrent également que le champignon mycorhizien *Pisolithus* sp.(X003) présente dans ce cas un comportement qui rappelle des relations de type parasitaire (pl.20 figs 4, 5 et 6). Cependant, avec la même souche de *Pisolithus* sp.(X003) nous avons obtenu des mycorhizes "jaune ocre" typiques avec *Afzelia* dans d'autres conditions expérimentales (piégeage sur sol de plantations d'*Eucalyptus camaldulensis* ou inoculation sur sol stérile par *Pisolithus* sp.X003) et dans des délais plus longs (minimum 6 mois) (pl.19 fig.4). Il semble que dans ce cas la formation de mycorhize soit liée au vieillissement de la plante (disponibilité plus importante en substrats carbonés) ou aux conditions expérimentales (nature du substrat ou de l'inoculum, intervention de microorganismes du sol favorisant l'infection). TONKIN *et al.*, (1989) ont montré que, sur des boutures d'*Eucalyptus marginata*, la réceptivité à l'infection par un isolat de *Pisolithus tinctorius* était liée à la présence sur les vitroplants de certains caractères d'arbres adultes. Par ailleurs l'absence de matériel polysaccharidique sur la face interne de la paroi des cellules corticales, en contact avec les deux souches d'Amanite (7672 ou 7735), suggère que ces champignons sont moins "agressifs" vis à vis d'*Afzelia*.

Quoiqu'il en soit, il apparaît clairement que très peu de souches fongiques indigènes sont capables de former des mycorhizes avec des jeunes plants d'*Afzelia* dans des conditions expérimentales pourtant variées alors que nous avons récolté et testé un grand nombre d'espèces fongiques appartenant à des genres réputés mycorhiziens (TRAPPE, 1962). Compte

tenu de nos résultats avec *Pisolithus* sp.(X003) et en accord avec de nombreux auteurs (LAMBS, 1979 ; BRADLEY, 1982 ; CHU-CHOU et GRACE, 1982), nous ne pouvons pas éliminer formellement les souches qui ne forment pas de mycorhizes dans nos conditions expérimentales bien qu'il soit connu que la spécificité des champignons mycorhiziens est plus large *in vitro* qu'elle ne l'est *in situ* (MALAJCZUK *et al.*, 1982 ; HARLEY, 1985). Les souches indigènes compatibles ont été isolées à partir de mycorhizes ou de sclérotés prélevés sur des plants d'*Azalia* âgés de 1 à 6 mois. Le choix des souches fongiques pour la pépinière s'oriente vers ces champignons mycorhizogènes et précoces (DIGHTON et MASON, 1985 ; GARBAYE *et al.*,1986).

Planche 14

Figure 1 : Dispositif de synthèse axénique en tube.

Figure 2 : Dispositif de synthèse axénique en boîte de Petri.

Figure 3 : Dispositif de synthèse non axénique en sachet plastique.

Figure 4 : Dispositif de synthèse non axénique en minirhizotron. Des mycorhizes sont formées 4 jours après inoculation.

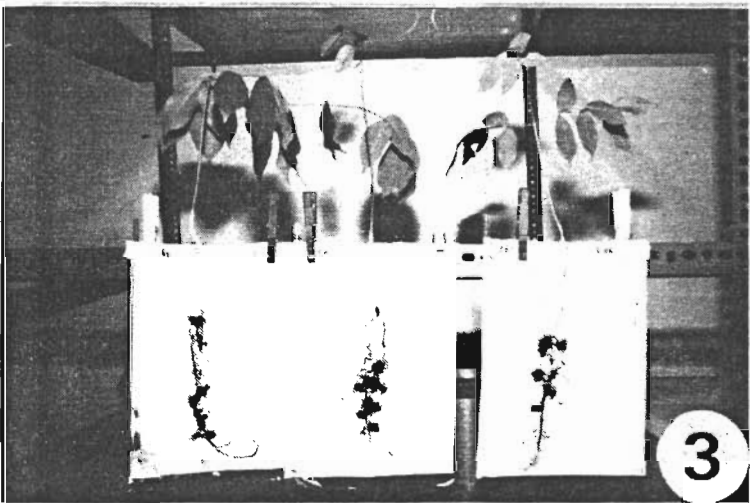
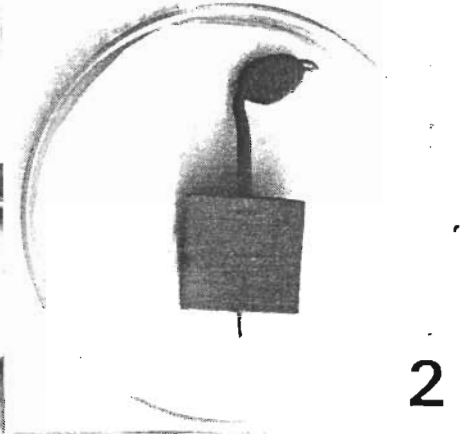
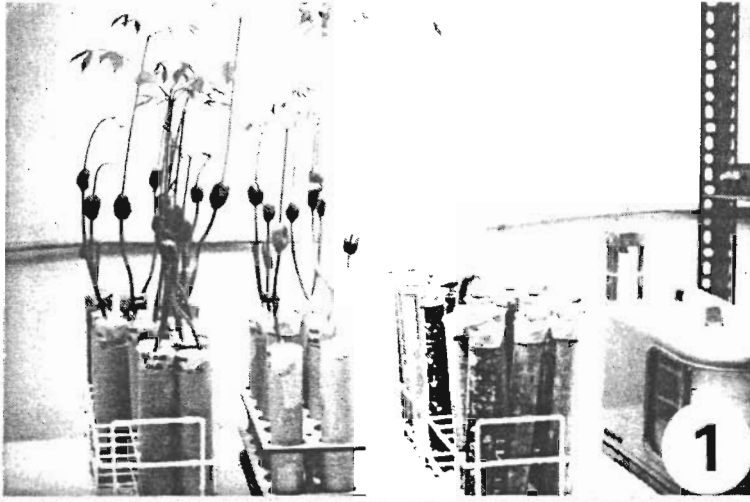


Planche 15

Macrographies des mycorhizes de synthèse d'*Afzelia africana* obtenues en conditions axéniques

Figures 1 et 2 : Mycorhizes de synthèse obtenues avec la souche XM002 (non identifiée). Au premier stade de l'infection (environ 7 jours) la racine courte mycorhizée est brun clair et s'assombrit (fig.1) pour devenir brun foncé (fig.2).

Figure 3 : Mycorhizes de synthèse obtenues avec la souche de *Scleroderma verrucosum* Pers.

Figure 4 : Mycorhizes de synthèse obtenues avec la souche de *Scleroderma dictyosporum* Pat.

Figure 5 : Mycorhizes de synthèse obtenues avec la souche XM004 (non identifiée).

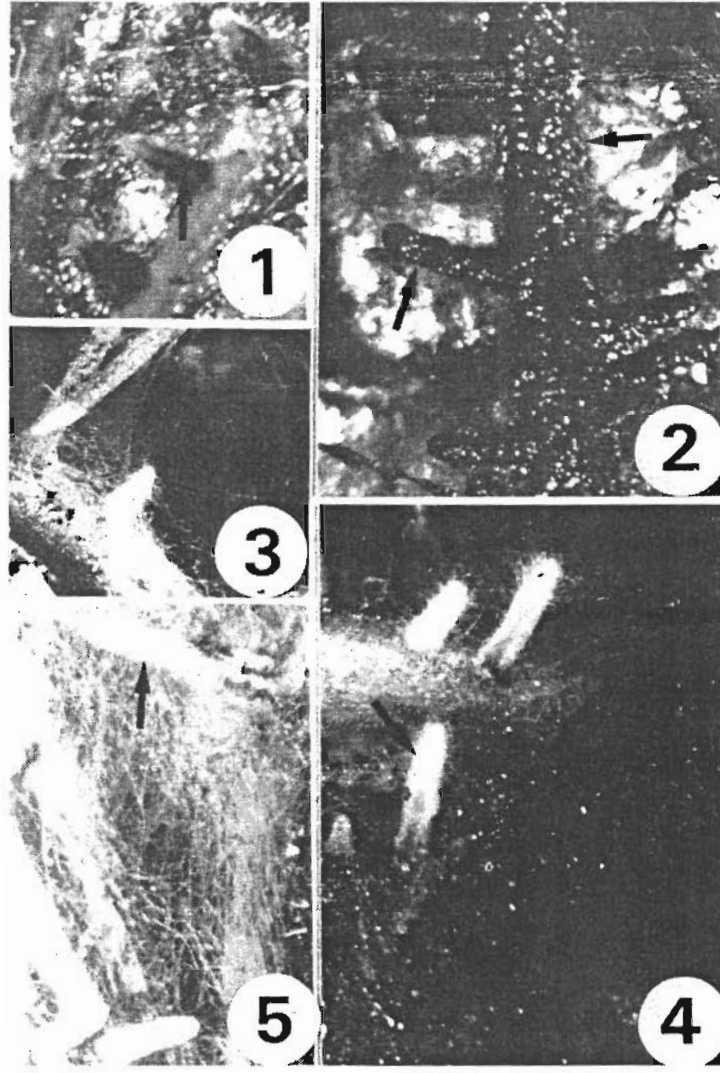


Planche 16

Figure 1 : Section transversale d'une mycorhize obtenue avec la souche fongique XM002. Gr.x 225.

Figure 2 : Section transversale d'une mycorhize obtenue avec la souche fongique 7732 (*S. verrucosum*). Gr.x 240.

Figure 3 : Section transversale d'une mycorhize obtenue avec la souche fongique XM004. Gr.x 625.

Figure 4 : Section transversale d'une mycorhize obtenue avec la souche fongique 7731 (*S. dictyosporum*). Gr.x 525.

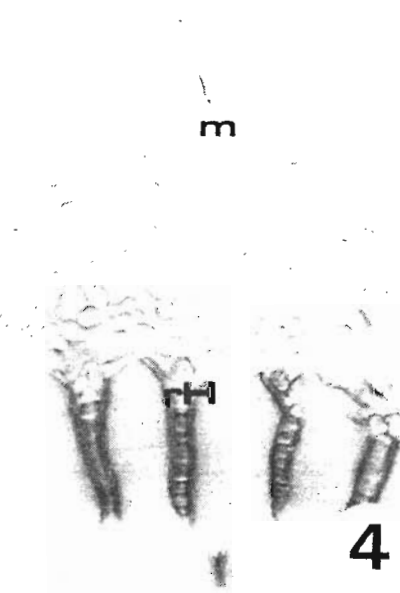
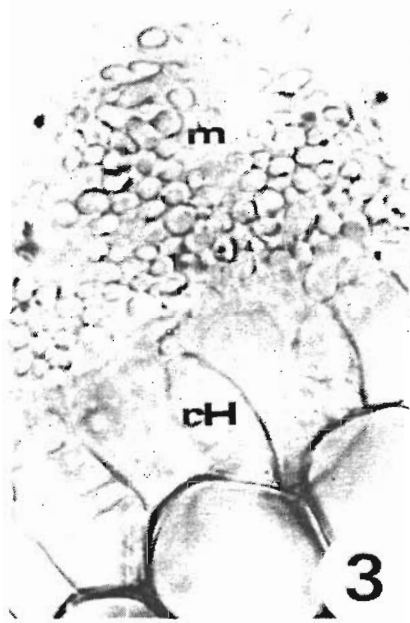
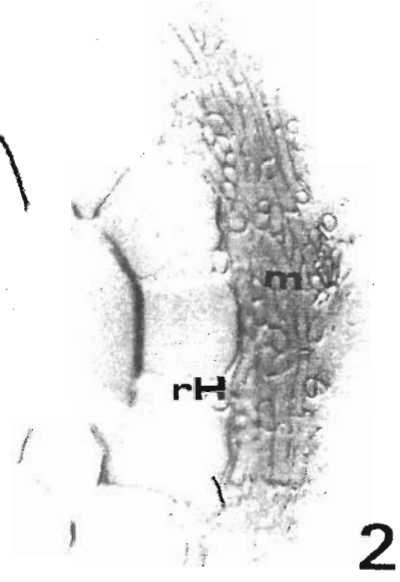
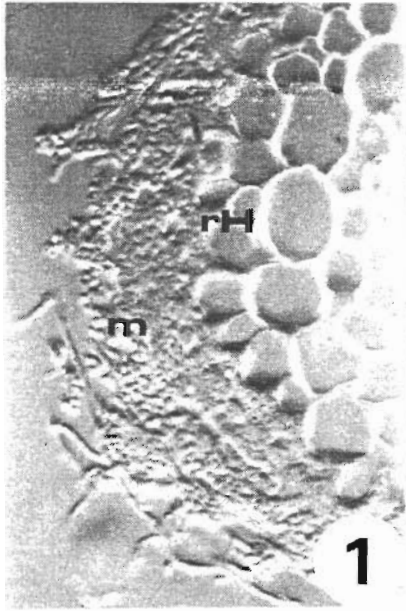


Planche 17

Macrographies des pseudomycorhizes d'*Afzelia africana* obtenues en conditions axéniques.

Figure 1 : Pseudomycorhizes de synthèse obtenues avec *Amanita* sp.(7735). Les racines latérales d'ordre 2 sont colonisées.

Figure 2 : Pseudomycorhizes de synthèse obtenues avec *Pisolithus tinctorius* (S.125). Les racines latérales d'ordre 1 et 2 sont colonisées.

Figure 3 : Pseudomycorhizes de synthèse obtenues avec *Pisolithus* sp.(X003). Les racines latérales d'ordre 1 et 2 sont colonisées.

Figure 4 : Pseudomycorhizes de synthèse obtenues avec *Paxillus involutus* Naud. Les racines latérales d'ordre 2 sont colonisées. Des sclérotés sont formés (*).

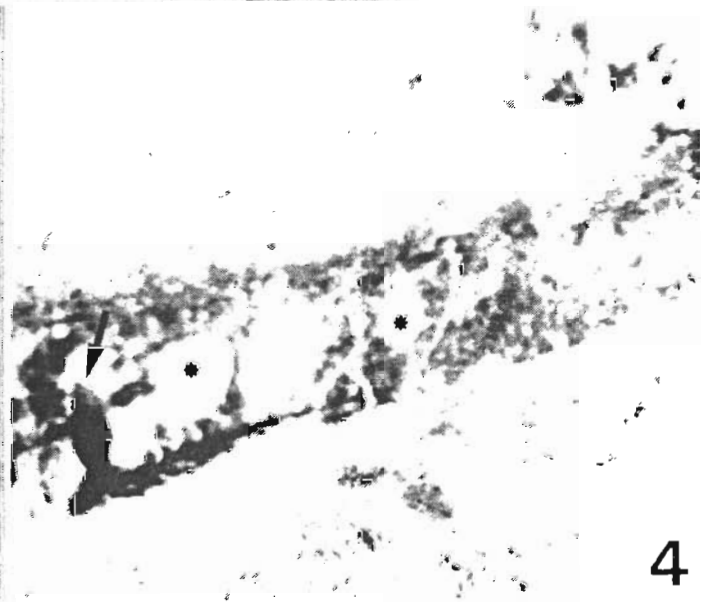
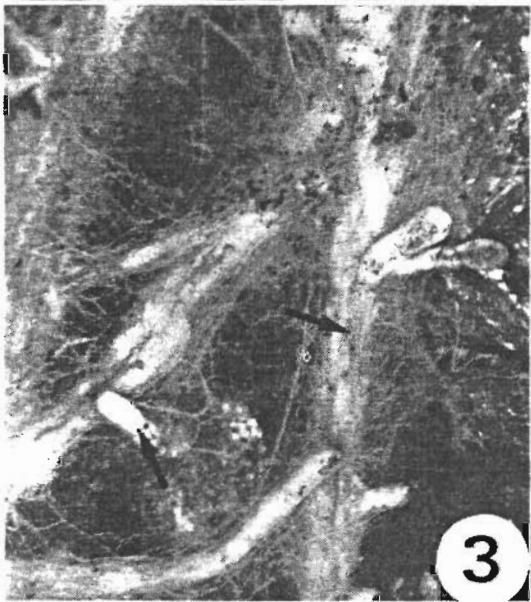
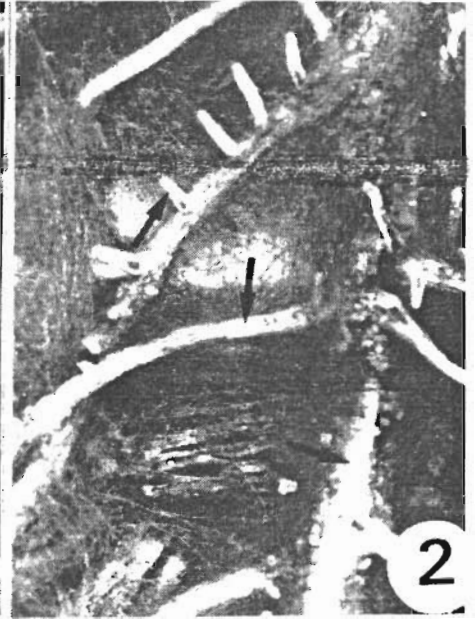
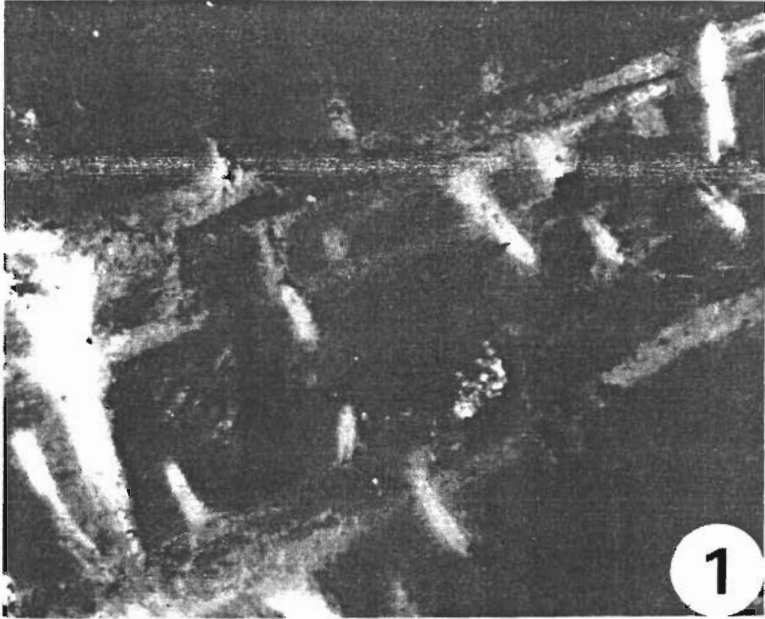


Planche 18

Les pseudomycorhizes et mycorhizes de synthèse d'*Afzelia africana*.

Coloration avec le bleu de toluidine 1% dans du Na₂CO₃ 2,5% pH 11,6

Figure 1 : Vue partielle d'une pseudomycorhize obtenue en minirhizotron avec la souche de *Pisolithus* sp.(X003) après 4 jours de contact. Elle présente un manteau compacte sans réseau de Hartig. La coloration avec le bleu de toluidine est plus intense sur la paroi de la cellule hôte en contact avec le champignon. Gr.x 687.

Figure 2 : Vue partielle d'une mycorhize obtenue en pépinière au moins 6 mois après l'inoculation sporale de *Pisolithus* sp.(X003). Elle présente un manteau fongique et un réseau de Hartig qui se met en place. Noter l'allongement des cellules corticales Gr.x 400.

Figure 3 : Vue partielle d'une pseudomycorhize obtenue en minirhizotron avec la souche de *Amanita* sp.(7672) 4 jours après inoculation. Elle présente un manteau fongique plus ou moins lâche sans réseau de Hartig. Gr.x 333.

Figure 4 : Vue partielle d'une pseudomycorhize obtenue en minirhizotron avec la souche de *Amanita* sp.(7735) 4 jours après inoculation. Elle présente un manteau fongique plus ou moins lâche sans réseau de Hartig. Gr.x 550.

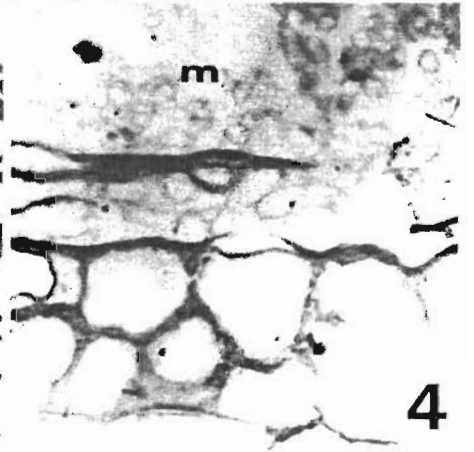
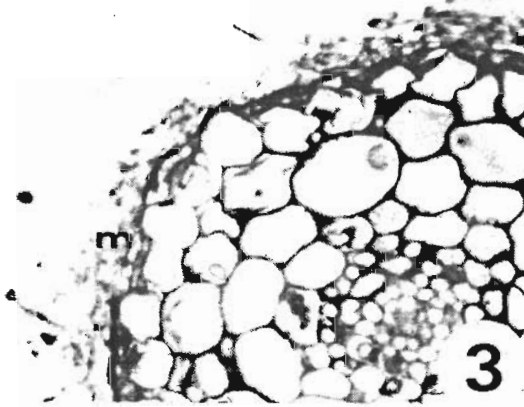
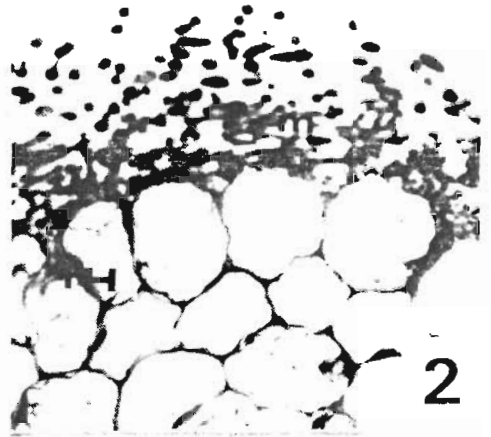
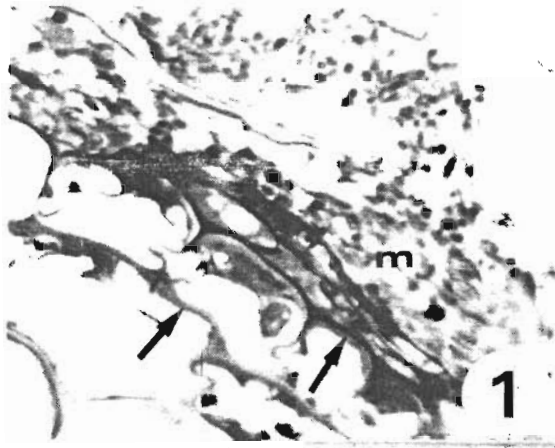


Planche 19

Ultrastructure des pseudomycorhizes et des mycorhizes d'*Afzelia africana*.

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Détails d'une interface *Afzelia-Pisolithus* sp.(X003) après 2 jours de contact. La paroi de la cellule hôte en contact avec les hyphes est modifiée. Elle présente des digitations et du matériel pariétale. La paroi des cellules sous-jacentes présente une structure normale. Gr.x 6344.

Figure 2 : Vue partielle d'une interface *Afzelia-Pisolithus* sp.(X003) après 4 jours de contact. Le champignon forme un manteau compacte sans réseau de Hartig. Gr.x 5750.

Figure 3 : Après 4 jours de contact la paroi des cellules en contact avec *Pisolithus* sp.présente un épaissement plus marqué avec peu ou pas de digitations. Gr.x 2400.

Figure 4 : Après 6 mois de contact *Pisolithus* sp.forme un manteau compacte avec un réseau de Hartig. La paroi de la cellule hôte présente dans ce cas une structure normale. Gr.x 3085.

Figure 5 : La paroi des cellules en contact avec les hyphes de la souche d'*Amanita* sp.(7672) présente une structure normale. Gr.x 4600.

Figure 6 : La paroi des cellules en contact avec les hyphes de la souche d'*Amanita* sp.(7735) présente une structure normale. Gr.x 12666.

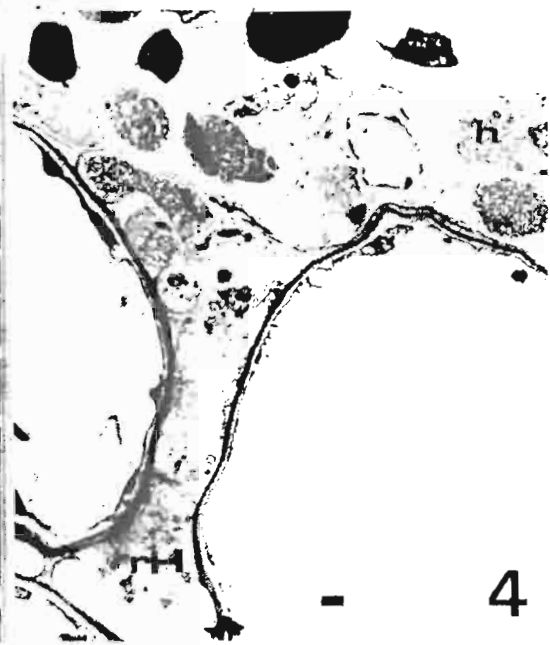
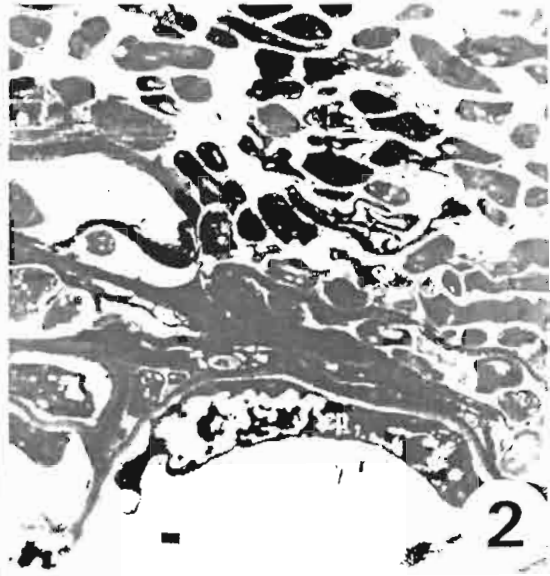


Planche 20

Ultrastructure d'une pseudomycorhize entre *A.africana* et *Pisolithus* sp.(X003)
après 4 jours de contact en minirhizotron

Test PATAg

Figure 1 : Vue partielle d'une interface plante-champignon. L'épaississement (nature polysaccharidique) de la paroi est observé uniquement dans les cellules en contact avec les hyphes. Gr.x 2800.

Figure 2 : Témoin non incubé avec le TCH à 0,2% dans l'acide acétique à 20%. Aucun marquage n'est décelé. Gr.x 2828.

Figure 3 : Dans le cytoplasme de la cellule hôte du réticulum endoplasmique (1) est présent le long du plasmalemme. Sur la face externe de la paroi de la cellule hôte des restes du ciment sont observés (2?). Gr.x 14928.

Figures 4, 5 et 6 : Des papilles sont présentes sur la face interne de la paroi (fig.4, Gr.x 7137 et fig.6, Gr.x 8638) et parfois des pénétrations intracellulaires sont observées (fig.5, Gr.x 7263).

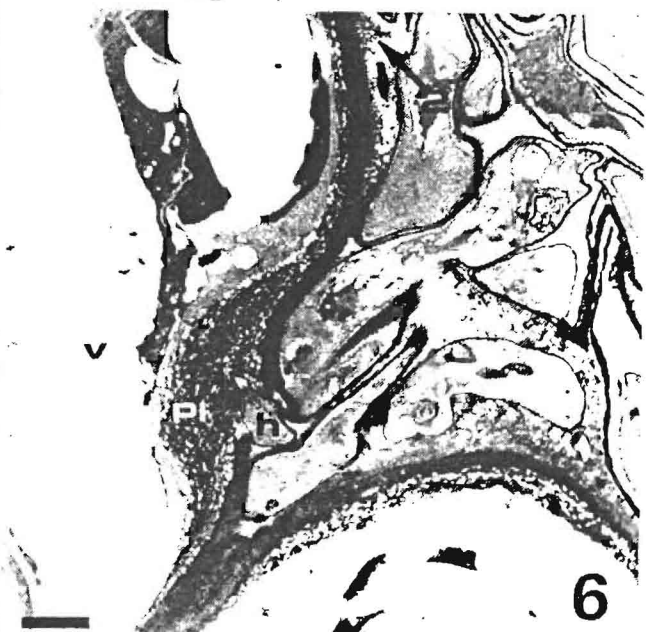
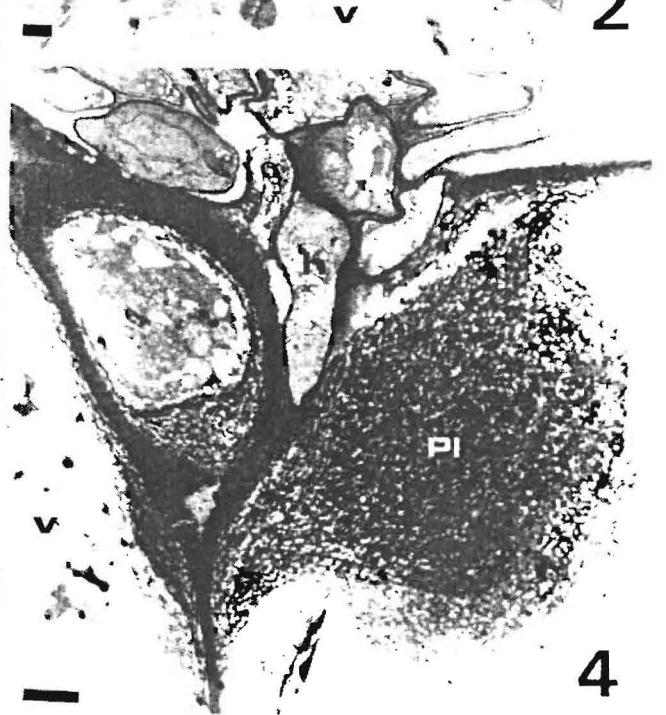
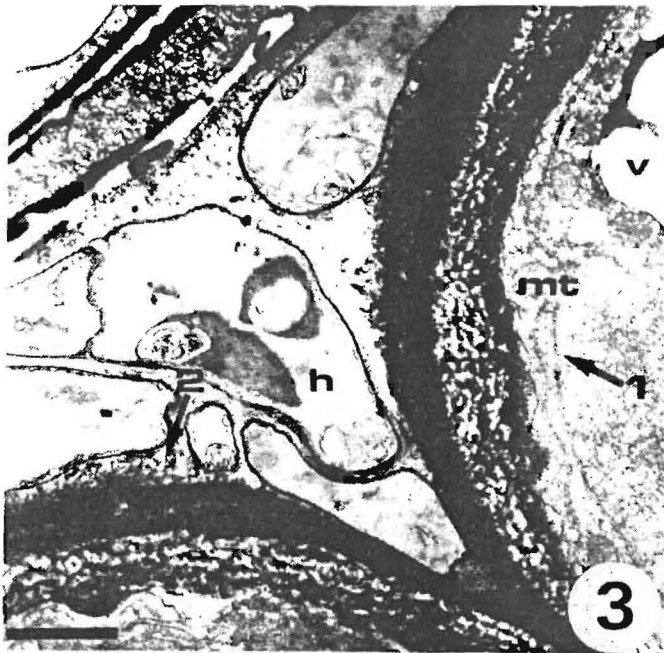
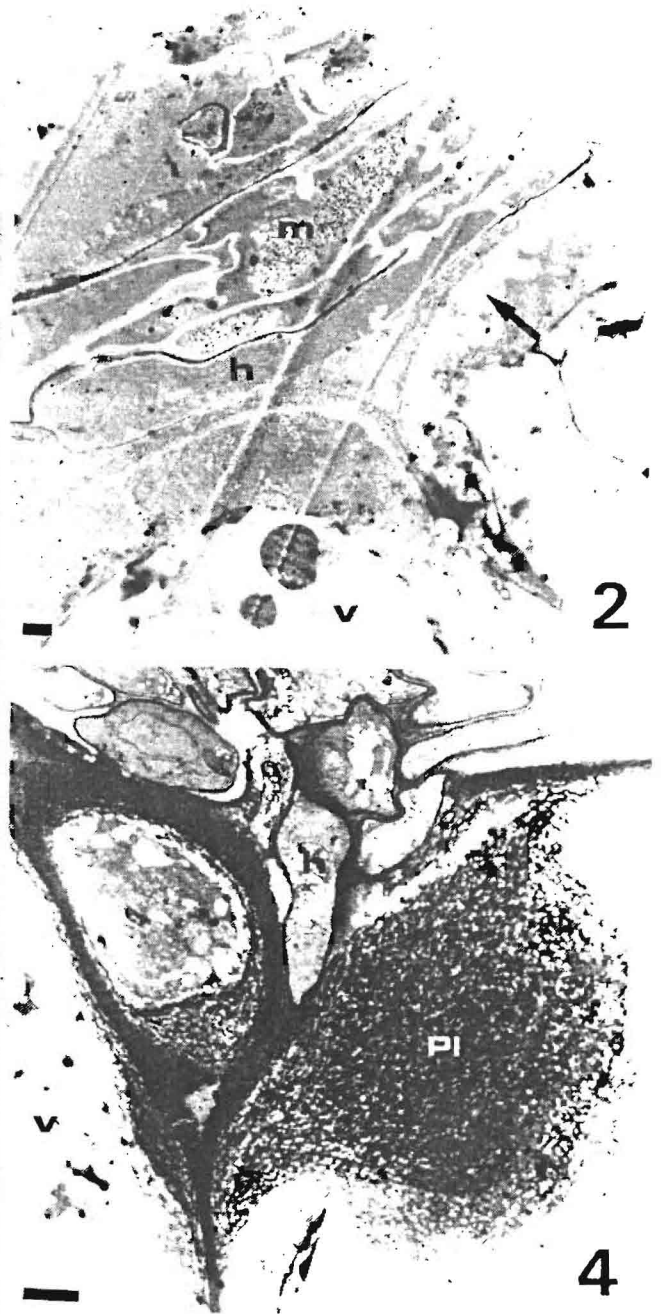
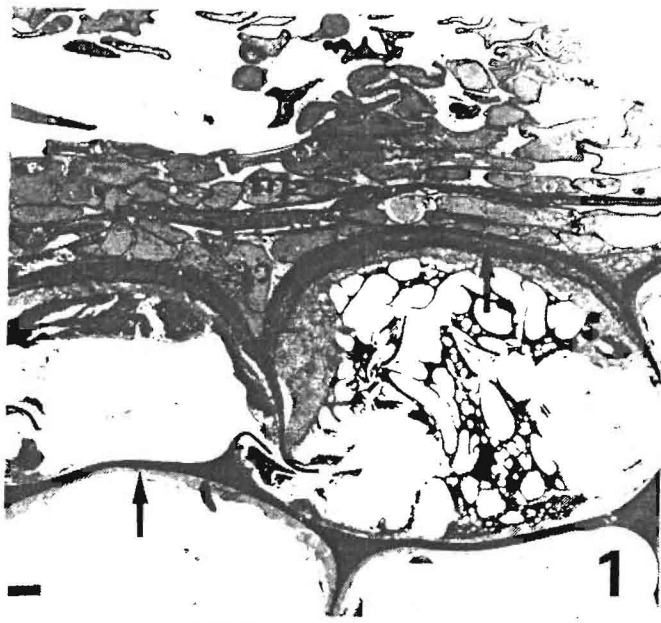


Planche 21

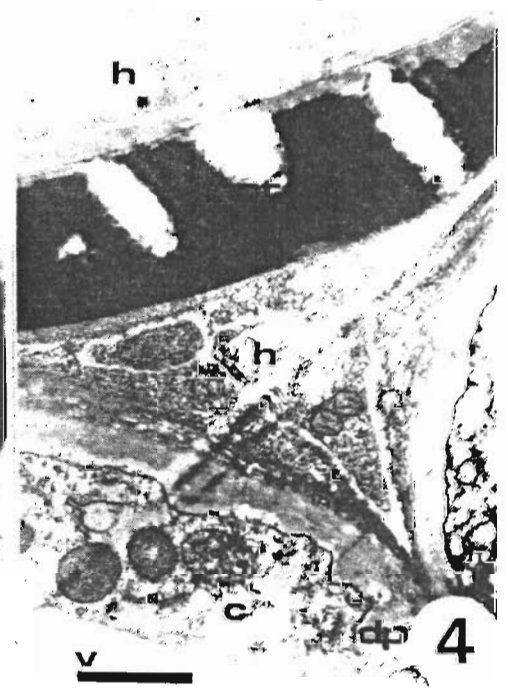
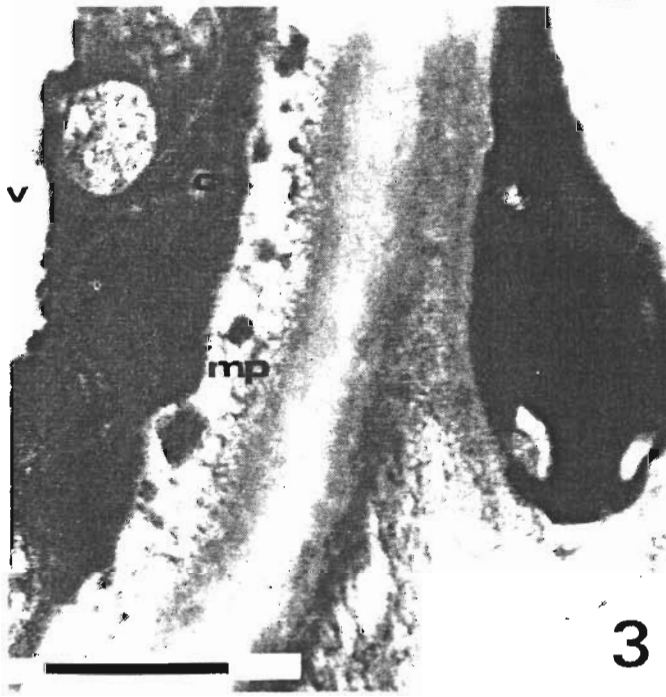
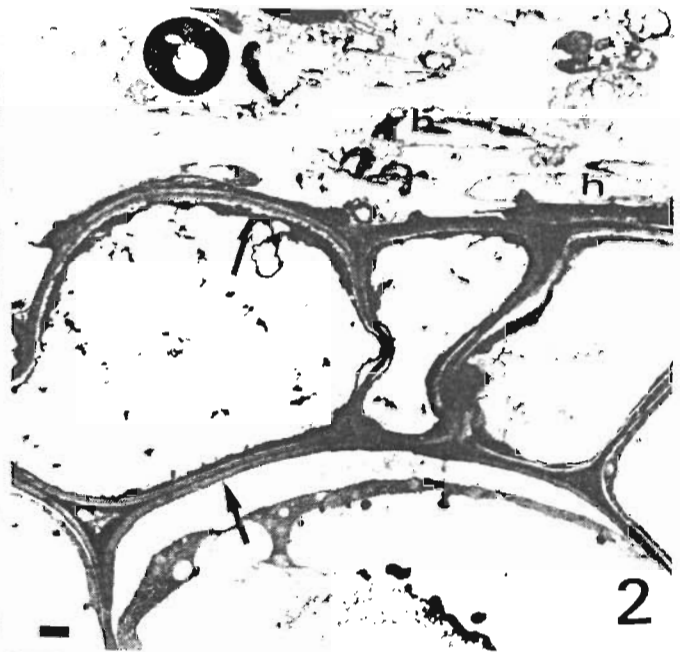
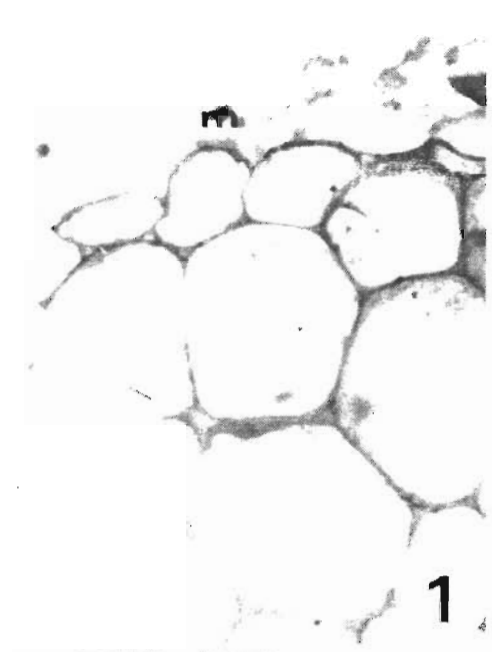
Ultrastructure d'une pseudomycorhize entre *Afzelia africana* et *Paxillus involutus* Naud. après 4 jours de contact en minirhizotron

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Vue partielle d'une interface plante-champignon (microscopie photonique et coloration avec le bleu de toluidine 1% dans du Na₂CO₃ 2,5% pH 11,6). Le champignon forme un manteau lâche sans réseau de Hartig. Gr.x 277.

Figure 2 : Vue partielle d'une interface plante-champignon. Du matériel pariétale est observé sur la face interne de la paroi de la cellule hôte en contact avec le champignon. Ce matériel pariétale est absent dans les cellules sous jacentes. Gr.x 3000.

Figures 3 et 4 : Détails d'une interface plante-champignon. Du matériel pariétale (fig.3, Gr.x 48000, la barre représente 0,5 µm) et des digitations sont observées sur la face interne de la paroi de la cellule hôte (fig.4, Gr.x 15346).



Chapitre 3

**Etude du déterminisme de la
dynamique de l'infection par les
champignons ectomycorhiziens sur les
racines d'*Azelia africana*.**

1. Introduction

En l'absence de la plante hôte ou dans des conditions de stress, un champignon mycorhizien est capable de survivre dans un sol sous forme de spores ou de sclérotés (MIKOLA, 1948 ; LEVISOHN, 1957 ; LAMB et RICHARDS, 1970). Plus rarement certains champignons mycorhiziens sont capables d'utiliser des composés carbonés complexes du sol (lignines, celluloses etc...) (WENT et STARK, 1968 ; LINDEBERG et LINDEBERG, 1980 ; RAMSTEDT et SÖDERHÄLL, 1983 ; TROJANOWSKI *et al.*, 1984 ; DAHM *et al.*, 1987). Cette "activité saprophytique" peut leur conférer en plus une aptitude à se maintenir sous forme mycelienne dans le sol. C'est sous cette forme que le champignon colonise la rhizosphère puis le système racinaire avant l'infection ectomycorhizienne proprement dite. L'infection ectomycorhizienne est le résultat de relations de compétitions des champignons entre eux et d'interactions avec d'autres microorganismes du sol (de OLIVIERA et GARBAYE, 1989). Nous pouvons supposer que lors de la phase de colonisation rhizosphérique, un champignon sera d'autant plus compétitif qu'il sera apte à se maintenir à l'état mycélien.

Les propriétés physico-chimiques du sol interviennent également en modifiant l'intensité de la mycorhization (HARLEY, 1948 ; MOLINA et TRAPPE, 1974 ; MARX *et al.*, 1977 ; MOSSE *et al.*, 1981).

Plusieurs travaux suggèrent que le statut mycorhizien d'une essence forestière résulte de la succession des mycorhizes au cours du temps (READ *et al.*, 1977 ; DIGHTON et MASON, 1985 ; CHILVERS *et al.*, 1987). Dans les plantations monospécifiques de Bouleaux, MASON *et al.*, (1983) ont observé dans le temps et dans l'espace une séquence dans la fructification des champignons associés. Ainsi les espèces du genre *Hebeloma*, *Laccaria* et *Thelephora* ("early-stage fungi") fructifient pendant les deux premières années de plantations, ensuite les *Inocybes* et les *Lactaires* ("mid-stage fungi") la quatrième année, et enfin les *Cortinaires* et les *Russules* ("late-stage fungi") à partir de la sixième année. A ces fructifications correspondent les types de mycorhizes qui suivent la même distribution dans le temps (DEACON *et al.*, 1983 ; FLEMING *et al.*, 1985). Des résultats semblables ont été également observés chez les conifères et les eucalyptus (TRAPPE et STRAND, 1969 ; CHU-CHOU, 1979 ; CHU-CHOU et GRACE 1981, 1982 et 1983 ; GARBAYE *et al.*, 1986). De ces observations résultent le concept de succession avec une diversité en espèces fongiques qui augmente au cours du temps. Cette séquence dans l'apparition des champignons mycorhiziens peut être modifiée par la nature du sol ou par les conditions climatiques (SOUTHWOOD, 1977 ; MASON *et al.*, 1982). Certains champignons comme *Laccaria laccata* sont présents aussi bien chez des jeunes plants de pépinière que sur les plants transplantés alors que d'autres comme *Thelephora terrestris* ne se maintiennent pas après transplantation sur le terrain (DIGHTON et MASON, 1985).

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la succession. Certains auteurs suggèrent que les photosynthétats disponibles (substrats carbonés) au niveau du système racinaire augmentent au cours du vieillissement de la plante, conditionnant ainsi l'ordre d'apparition des champignons mycorhiziens (VOGT *et al.*, 1983 ; DIGHTON et MASON, 1985). Les régénérations naturelles contractent des mycorhizes avec des champignons "late-stage" qui seraient approvisionnés en substrat carbonés par les arbres adultes *via* les cordons mycéliens. Au contraire, des semis élevés sur sol prélevé sous des arbres adultes forment des mycorhizes uniquement avec des champignons "early-stage" (FLEMING, 1983). Ces derniers auraient des besoins en sucres moins importants et s'installeraient ainsi en premier (DIGHTON et MASON, 1985). Cette disponibilité en sucre au niveau des racines est également conditionnée par la teneur en azote et en phosphore du sol (MARX *et al.*, 1977 ; FRANCE et REID, 1983 ; REID *et al.*, 1983). Des concentrations importantes en ces éléments diminuent la teneur en saccharose au niveau du système racinaire de *Pinus taeda* et donc le taux de mycorhization par *Pisolithus tinctorius* (MARX *et al.*, 1977).

Une autre hypothèse, prenant en compte la densité et la nature des propagules fongiques a été également émise pour expliquer les successions de symbiotes sur les arbres qui présentent simultanément une double symbiose ectomycorhizienne et endomycorhizienne à vésicules et à arbuscules (V.A.M). Chez les eucalyptus l'infection précoce de jeunes plants par des champignons à V.A. puis des plants plus âgés par des champignons ectomycorhiziens serait liée à la densité et à la taille des spores de l'endophyte dans le sol (CHILVERS *et al.*, 1987). La regression de l'infection endomycorhizienne résulte du blocage des sites d'infection par le champignon ectomycorhizien. Ce type de succession a été également observé chez *Helianthemum chamaecistus* et chez *Alnus glutinosa* (READ *et al.*, 1977 ; BEDDIARD, 1988). Les causes du processus de remplacement des endomycorhizes par des ectomycorhizes ne sont pas connues. Des tests *in vitro* montrent que le processus d'infection n'est cependant pas lié à une absence de réceptivité des plants jeunes ou âgés respectivement pour le champignon ectomycorhizien ou endomycorhizien (BOUDARGA, 1989).

En zone tropicale, l'utilisation de sol pourvu de propagules mycorhizogènes provenant de plantations a été une pratique courante d'inoculation en pépinière des essences exotiques (MIKOLA, 1973 ; DELWAULLE *et al.*, 1982 ; KABRE, 1982). Les risques d'introduction ou de recyclage de pathogènes constituent l'inconvénient majeur de cette technique (MARX, 1980). Cependant cet inoculum naturel présente un certain nombre d'avantages : (1) Il donne une image de la population microbienne d'une station donnée (READ *et al.*, 1977 ; LAST *et al.*, 1985 ; GARBAYE *et al.*, 1986 ; BEDDIARD, 1988 ; CHILVERS *et al.*, 1987) (2) il permet de piéger et de déterminer les champignons mycorhiziens précoces, ce qui a des conséquences

pratiques importantes pour le choix des souches fongiques destinées à l'inoculation artificielles des pépinières (FLEMING, 1983 ; GARBAYE *et al.*, 1986) (3) C'est un moyen de disposer d'un matériel frais pour caractériser des mycorhizes ou isoler des souches fongiques à partir de ces dernières (4) Il permet de déterminer l'âge le plus favorable à l'infection ectomycorhizienne (apparition des racines latérales).

Dans la présente étude, la technique de piégeage nous a permis de visualiser la séquence d'apparition des champignons associés à *A. africana* au cours du temps (6 mois) et d'en étudier le déterminisme. Ce piégeage a été complété par des expériences *in vitro*.

2. Matériel et Méthodes

2.1- Piégeage des souches fongiques indigènes.

2.1.1- Conditions de culture

Deux expériences successives ont été réalisées sur le sol de la station des Bayottes (cf.chapitre 1 ; figure 4, station II). Les prélèvements sont effectués sur les 30 premiers cm de profondeur sous un arbre adulte d'un peuplement d'*Afzelia africana* en mélange. Selon MAIGNIEN (1965) cité par KABRE (1982), le sol est faiblement ferrallitique modal sur grès sablo-argileux. C'est un sol sableux à texture argileuse vers 50-70 cm. La composition physico-chimique du sol est présentée en annexe (tableau 1)

Le sol a été tamisé (mailles de 2 mm), homogénéisé et distribué dans des sacs de polyéthylène (10 x 25cm) ayant un volume approximatif de 1,5 à 1,8 litres (pl.22, 1). Dans chaque sac nous avons repiqué une graine d'*Afzelia* traitée selon la méthode décrite dans le chapitre (2). Les sacs sont placés à l'extérieur et abrités par un filet plastique. La première expérience a été réalisée de Mai à Novembre (6mois) et la deuxième expérience de Février à Août (6 mois) à la température et à la lumière du jour dans les conditions de Dakar.

Les observations sont effectuées sur un échantillon (10 plants pour l'expérience 1 et 6 plants pour l'expérience 2) chaque semaine pendant le premier mois, puis une fois tous les mois pendant les 5 mois suivants.

2.1.2- Quantification de l'infection ectomycorhizienne

Le système racinaire a été soigneusement lavé à l'eau courante et l'infection ectomycorhizienne a été quantifiée à la binoculaire (Gr.x20). Nous avons déterminé le pourcentage relatif de mycorhization de la manière suivante : pour chaque observation, nous avons prélevé 10 (expérience 1) ou 6 (expérience 2) plants et observé pour chaque plant 20 racines latérales prélevées au hasard sur le pivot. Sur chacune de ces racines latérales d'ordre 1, portant elle même des racines latérales d'ordre 2, 3 etc..., nous avons compté les apex racinaires mycorhizés et non mycorhizés et déterminé un pourcentage relatif pour chaque type de mycorhize. Nous avons pris en compte tous les apex entourés d'un manchon mycélien. Pour les mycorhizes ramifiées (monopodiale ou pyramidale) ou à infection multiple, nous avons compté autant de fois qu'il y avait d'apex sur les racines infectées (pl.22, 3 et 4).

2.1.3- Observation et caractérisation des mycorhizes

Les mycorhizes sont soigneusement débarrassées des débris et des sections transversales ou longitudinales sont réalisées à main levée selon la méthode décrite dans le chapitre (2) (paragraphe 2.6). Les types de mycorhizes sont différenciés selon la clé d'identification et de caractérisation proposée par ZAK (1973) (cf.chapitre 1).

Après 3 semaines de piégeage les racines mycorhizées ou non sont également colorées selon la technique de mise en évidence des endomycorhizes à V.A (PHILIPPS et HAYMAN, 1970). Les racines sont déposées dans une solution de potasse à 10% et autoclavées pendant 15 mn à 120°C. Elles sont ensuite lavées plusieurs fois à l'eau courante puis dans de l'eau acidifiée par HCl avant d'être colorées au bleu trypan à 0,1% dans du lactophénol pendant 10 mn au bain-marie à 100°C. Les racines colorées sont rincées à l'eau puis montées dans une goutte d'eau pour l'observation au microscope photonique.

2.2- Etude des sucres solubles des racines latérales d'*A.africana* âgées de 1 à 4 mois

Pour compléter les expériences du piégeage effectuées à Dakar (paragraphe 2.1), nous avons évalué la quantité de sucres (glucose, saccharose et hexoses réducteurs) (paragraphe 2.4.4) sur des racines latérales de plants d'*Afzelia* (agés de 1 à 4 mois) élevés en serre à Nancy.

Des plants d'*Afzelia* ont été élevés en serre chauffée à Nancy pendant 4 mois (lumière du jour ; température maximale 25°C, température minimale 10°C) dans un mélange de vermiculite et de tourbe (4:1 ; v/v) imprégné avec une solution nutritive (voir composition en annexe,

tableau 4). Trois plants sont prélevés chaque mois. Le système racinaire est lavée à l'eau courante et les racines latérales sont séparées du pivot. Elles sont ensuite séchées et conditionnées comme dans le paragraphe (2.4.4.1).

2.3- Etude du potentiel infectieux du sol

2.3.1- Dénombrement des propagules

Vingt grammes de sol (conservé à l'état sec et à température ambiante pendant 7 mois soit la durée d'une saison sèche au sud du Sénégal) ayant servi au piégeage, ont été examinés à la binoculaire dans de l'eau gramme par gramme afin d'évaluer la densité de propagules présumées appartenir à des champignons ectomycorhiziens. Pour cela nous avons compté le nombre de sclérotés (présûmés appartenir à *S.verrucosum* 7732 ou à XM002), de fragments de cordons mycéliens (présûmés appartenir à XM002) et de fragments de mycorhizes (présûmés appartenir à XM002). Les fragments de mycorhizes et de cordons mycéliens non identifiés sont également dénombrés.

2.3.2- Germination et vérification de l'aptitude mycorhizogène des propagules

Nous avons déterminé le temps et le pourcentage de germination des propagules en présence ou en l'absence du système racinaire d'*Afzelia*. Nous avons également vérifié l'aptitude mycorhizogène et le temps de mycorhization de ces propagules en présence du système racinaire de la plante-hôte.

Pour cela des semis d'*Afzelia* sont élevés en minirhizotron dans un mélange de tourbe et de vermiculite (1:4 ; v/v) pendant 15 à 20 jours selon la technique (chapitre 2, paragraphe 2.5.1) et dans les conditions décrites au chapitre 2 (paragraphe 2.3). Cinq propagules sous forme de mycorhizes, de sclérotés ou de cordons mycéliens sont déposées sur les racines latérales d'ordre 2 d'*Afzelia* à intervalle d'environ 3 cm. Pour chaque type de propagules, l'inoculation est répétée sur 5 plants. Le pourcentage de germination est donc estimé sur un échantillon de 25 propagules par type de propagules. Une propagule est considérée comme ayant germé lorsque les hyphes émergent des sclérotés, des mycorhizes ou des cordons. La germination des propagules est déterminée à la binoculaire (sclérote) ou au microscope photonique (mycorhizes et cordons mycéliens). La même expérience est également réalisée dans les minirhizotrons en l'absence du système racinaire. La lecture des résultats (pourcentage de germination) est effectuée après 7 jours.

La densité des spores de *Scleroderma verrucosum* ou de *S. dictyosporum* n'a pas été déterminée dans le sol. Cependant nous avons déterminé leur aptitude à la mycorhization en présence du système racinaire de la plante hôte. Des carpophores des deux champignons récoltés au lieu de prélèvement du sol ont été désinfectés superficiellement à l'éthanol à 96°. Pour chacun d'entre eux, 10 mg de spores par plant sont saupoudrés sur le système racinaire d'*Afzelia* élevé en minirhizotron comme précédemment. La lecture des résultats (temps de mycorhization) à la binoculaire est réalisée sur 5 plants pour chaque carpophore. Elle a été effectuée à 7, 15, 21, 27 ou 34 jours après l'inoculation.

2.3.3- Quantification de l'infection par les propagules

Nous avons comparé l'efficacité de deux types de propagules (mycorhizes et sclérotés) présumés appartenir à *S.verrucosum* 7732 et à XM002 sur l'intensité de mycorhization dans les mêmes conditions que précédemment (paragraphe 2.3.2). L'efficacité de ces deux types de propagules est également comparée avec des cultures mycéliennes de *S.verrucosum* 7732, XM002, *S.dictyosporum* 7731 ou XM004 cultivées sur papier carton (cf.chapitre 2, paragraphe 2.4.2).

L'intensité de la mycorhization de chaque plant a été notée 1 mois après l'inoculation sur la partie du système racinaire au contact du conteneur. Pour déterminer un indice de mycorhization, nous avons utilisé une échelle à 4 classes correspondant à l'estimation visuelle du pourcentage de racines latérales mycorhizées par le champignon : 0, 0% ; 1, 0-25% ; 2, 25-50% ; 3, 50-75% ; 4, 75-100%.

2.4- Etude de l'influence des cotylédons

2.4.1- Influence des cotylédons dans les expériences du piégeage (paragraphe 2.1)

Dans la deuxième expérience réalisée à l'extérieur à Dakar un traitement ablation des cotylédons a été réalisé également afin de voir leurs effets sur la dynamique d'infection. Les cotylédons d'*Afzelia* sont détachés totalement ou partiellement de l'hypocotyle au moment de l'apparition de l'épicotyle, soit environ 3 semaines après le repiquage sur sol de piégeage. Les observations sont effectuées comme dans le paragraphe (2.1.2).

2.4.2- Influence des cotylédons sur la croissance et la mycorhization d'*Afzelia*.

Nous avons également examiné, par des tests *in vitro*, l'influence des cotylédons sur la croissance et la mycorhization d'*A.africana*. Pour cela des semis d'*Afzelia* sont repiqués en

minirhizotron et élevés pendant 7 à 10 jours en chambre de culture (cf.chapitre 2, paragraphe 2.3). L'ablation partielle ou totale des cotylédons est réalisée au moment de l'apparition de l'épicotyle.

Pour estimer la croissance d'*Afzelia*, nous avons étudié l'influence des cotylédons sur les paramètres suivants : nombre de racines latérales d'ordre 1, 2 ou 3, longueur du pivot , hauteur des plants et biomasse de la partie aérienne ou racinaire. Les observations sont effectuées après 4 jours sur un échantillon de 5 plants pour chacun des traitements “sans ablation”, ablation de 1 cotylédon” ou “ablation de 2 cotylédons”.

Nous avons également examiné l'influence de l'ablation des cotylédons sur l'infection mycorrhizienne d'*Afzelia* par 4 souches indigènes (XM002, *S.verrucosum* 7732, *S.dictyosporum* 7731 et XM004). L'inoculum est préparé selon la méthode décrite au chapitre 2 (paragraphe 2.4.2) puis appliqué contre le système racinaire au moment de l'ablation ou non des cotylédons. Les observations sont effectuées après 4 jours pour chacun des traitements “sans ablation”, ablation de 1 cotylédon” ou “ablation de 2 cotylédons”.

2.4.3- Observation des mycorhizes de synthèse (cf.chapitre 2, paragraphe 2.6)

2.4.4- Influence des cotylédons sur la teneur en sucres solubles des racines latérales d'*Afzelia*.

Nous avons étudié en chambre de culture l'influence de l'ablation partielle ou totale des cotylédons sur la quantité de sucres solubles (glucose, saccharose ou hexoses réducteurs) dans les racines latérales d'*Afzelia*.

2.4.4.1- Préparation des échantillons

Des plants d'*Afzelia* ont été élevés en chambre de culture pendant 7 à 10 jours (cf.chapitre 2, paragraphe 2.3) dans un mélange de vermiculite et de tourbe (4 : 1 ; v/v) imbibé avec de l'eau courante. Les plants sont soumis aux 3 traitements cotylédons (cf.paragraphe 2.4.2). Trois plants sont prélevés 4 jours après les traitements cotylédons. Les racines latérales de chacun des plants sont récoltées et séchées sous vide (afin d'éviter toute respiration) dans un dessiccateur pendant 3 jours à température ambiante. Elles sont ensuite conditionnées au congélateur à -20°C.

2.4.4.2- Obtention de l'extrait végétal.

Les racines sont découpées et broyées à l'aide d'un mortier dans 3 ml de tampon acétate de sodium 50 mM à pH 4,4 et à une température de 4°C. Une pincée de sable de fontainebleau est ajoutée afin de faciliter la dilacération des tissus. L'homogénat est centrifugé une première fois pendant 15mn à 15000g. Le culot est repris dans 3 ml de tampon d'extraction et la suspension est centrifugée. Les deux surnageants sont rassemblés et constituent la solution dans laquelle le glucose et les sucres réducteurs sont dosés.

2.4.4.3- Dosage du glucose

2.4.4.3.1- Principe

Le dosage du glucose fait intervenir deux réactions enzymatiques couplées. La première réaction est catalysée par l'hexokinase qui assure la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate en présence d'ATP. La deuxième réaction est catalysée par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase qui assure l'oxydation spécifique du glucose-6-phosphate en gluconate-6-phosphate en présence de NAD. La formation de NADH qui en résulte, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, est proportionnelle à la quantité de glucose.

2.4.4.3.2- Mode opératoire

Le dosage du glucose a été réalisée à l'aide d'un kit (SIGMA diagnostics, glucose (HK) 20) qui a pour composition :

- NAD	1,5 mmoles/l
- ATP	1,0 mmole/l
- Hexokinase (levure)	1000 unités/l
- G6P-DH (levure)	1000 unités/l
- Mg ⁺⁺	2,1 mmoles/l

Pour le dosage, 1ml de la solution enzymatique du kit SIGMA est additionné à 0,1ml de l'extrait végétal à doser. Le mélange est maintenu 5mn à température ambiante avant la lecture de la densité optique à 340nm. Les concentrations de glucose sont estimées par spectrophotométrie (BECKMAN DU-70) à partir d'une gamme-étalon (solution mère de glucose à 0,1 mg/ml de tampon d'extraction) (voir en annexe, figure 1). Les résultats sont exprimés en mg de glucose par g de matière sèche racinaire.

2.4.4.4- Dosage du saccharose

2.4.4.4.1- Principe

Le saccharose est hydrolysé par une β -fructosidase (invertase) en glucose et en fructose. La différence entre la teneur en glucose de l'extrait végétal avant (cf.paragraphe 2.4.4.3) et après inversion enzymatique permet le calcul de la teneur en saccharose.

2.4.4.4.2- Mode opératoire

Nous avons mélangé 0,5 ml d'une solution aqueuse d'invertase de levure (370 unités/mg) (3 mg de poudre enzymatique par ml de tampon d'extraction) avec 0,25 ml d'extrait végétal. L'hydrolyse enzymatique du saccharose se déroule 30°C pendant 1 heure. Le glucose libéré est quantifié à l'aide d'un kit-glucose comme dans le paragraphe (2.4.4.3).

Nous avons vérifié que l'extrait végétal ne contenait pas d'inhibiteur de l'activité de l'invertase. Pour cela, nous avons effectué un dosage par la méthode du kit-glucose (cf.paragraphe 2.4.4.3) et nous avons enregistré l'absorbance à 340 nm (2 répétitions) des solutions suivantes:

- saccharose : 0,0287, 0,0281
- extrait végétal : 0,2166, 0,2590
- saccharose + invertase : 0,1551, 0,1574
- extrait végétal + invertase : 0,2999, 0,2581
- saccharose + extrait végétal + invertase : 0,3440, 0,3066

2.4.4.5- Dosage des hexoses réducteurs

2.4.4.5.1- Principe

En présence des hexoses réducteurs, l'acide 3,5-dinitrosalicylique est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (MILLER, 1959). Ce dernier qui, se colore en jaune vif en milieu alcalin et absorbe à 575 nm, est dosé par colorimétrie.

2.4.4.5.2- Mode opératoire

Nous avons ajouté, à 1ml d'extrait végétal, 1ml de la solution de réaction qui a la composition suivante pour 100 ml de solution :

- 1g d'acide 3,5-dinitrosalicylique
- 1ml de sel de rochelle (tartrate de sodium et de potassium) à 40%
- 0,25ml de phénol à 80% (w/w)
- 0,065ml d'hydrogénosulfite de sodium à 37,5%
- 2,5ml d'hydroxyde de sodium à 30%

Pour développer la réaction on fait bouillir ce mélange ainsi que la gamme-étalon (solution mère de glucose à 0,5 mg/ml) pendant 15mn au bain-marie bouillant avant refroidissement à l'eau. Les concentrations sont estimées à partir de la gamme-étalon (voir en annexe, figure 2) par spectrophotométrie (BECKMAN DU-70). Les résultats sont exprimés en mg d'hexoses réducteurs par g de matière sèche racinaire.

3. Résultats et Discussion

Les figures (10 et 11) montrent la séquence d'apparition des différents types de mycorhizes au cours du temps dans les deux expériences de piégeage réalisées à Dakar. L'infection des plants débute 3 semaines après le repiquage des semis d'*Azalia*. Cette réceptivité précoce des plants d'*Azalia* vis à vis des symbiontes indigènes coïncide avec l'apparition des racines latérales d'ordre 1 et 2 (cf.chapitre 2, paragraphe 2.3). L'infection ectomycorhizienne a lieu au stade cotylédonnaire avant l'étalement des premières feuilles. Ces observations sont en accord avec nos résultats expérimentaux (cf.chapitre 2) ainsi que nos observations de terrain (THOEN et BA, 1989). Comme la plus part des *Cesalpinioideae* appartenant à la tribu des *Detareae*, le genre *Azalia* est généralement connu exempt d'infection par *Rhizobium* (de FARIA *et al.*, 1989) à l'exception d'*Azalia quanzensis* (HÖGBERG et NYLUND, 1981). Chez deux autres espèces *A. bella* et *A. pachyloba*, une double infection endo- et ectomycorhizienne a été également signalées (ALEXANDER, 1985 ; NEWBERY *et al.*, 1988). Dans les conditions de notre test, bien que nous ayons au stade de 3 semaines observé autour des racines d'*Azalia africana* des hyphes ressemblant à ceux du genre *Glomus*, nous n'avons pas observé de vésicules et d'arbuscules qui sont considérées comme typique des V.A.M.(pl.22, 2). Les autres espèces du genre *Azalia* qui ont été examinées jusqu'à présent sont exclusivement infectées par des champignons ectomycorhiziens (JENIK et MENSAH, 1967 ; REDHEAD, 1980 ; ALEXANDER, 1985 ; NEWBERY *et al.*, 1988 ; THOEN et BA, 1989).

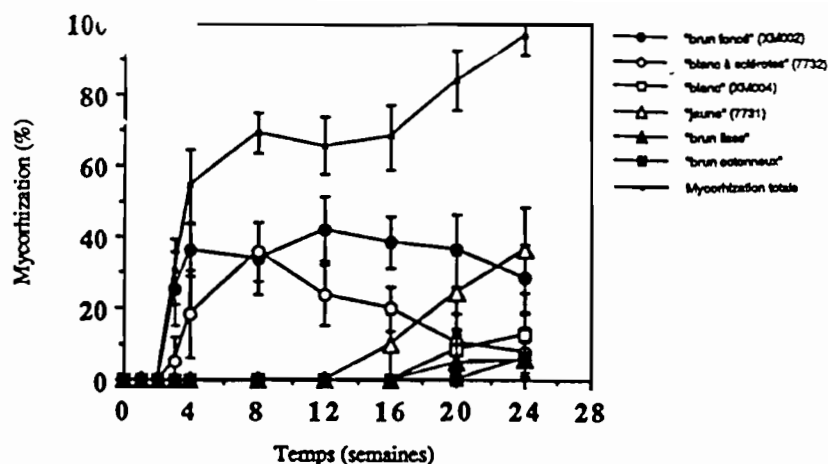


Figure 10 : Séquence d'apparition au cours du temps de 6 types dominants de mycorhizes d'*Afzelia* (expérience n° 1).

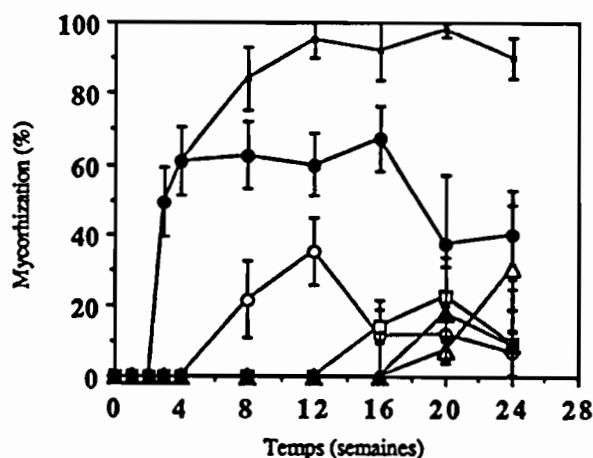


Figure 11 : Séquence d'apparition au cours du temps de 5 types dominants de mycorhizes d'*Afzelia* (expérience n° 2).

Tableau 12 : Caractères distinctifs des 6 types de mycorhizes d'*Afzelia africana* sur sol des Bayottes.

Types	Couleur	Forme	Mycorhizes		Manteau		réseau de Hartig		Hyphes	
			Diamètre (µm)	Texture	Structure	Epaisseur (µm)	Profondeur (µm)	Boucle	Diamètre (µm)	
1	brun	pyramidale monopodiale	351 - 363	cotonneux	pseudoparenchymateux interne plectenchymateux externe	55 - 62	11 - 14	+	2,7 - 3,2	
2	brun foncé	pyramidale monopodiale	210 - 250	soies raides	pseudoparenchymateux interne plectenchymateux externe	20 - 47	9 - 15	+	2,8 - 3,1	
3	blanc à sclérotas	pyramidale monopodiale	249 - 253	poils	plectenchymateux externe pseudoparenchymateux interne	34 - 40	23 - 25	-	1,8 - 2,7	
4	blanc	pyramidale monopodiale	232 - 250	poils	pseudoparenchymateux	25 - 37	16 - 27	-	2,0 - 2,5	
5	brun	pyramidale monopodiale	361 - 377	lisse	plectenchymateux externe pseudoparenchymateux interne	65 - 77	22 - 31	+	3,0 - 3,4	
6	jaune	pyramidale monopodiale	364 - 367	poils	plectenchymateux externe pseudoparenchymateux interne	46 - 69	18 - 36	-	2,7 - 3,2	

- Chaque valeur est la moyenne obtenue sur des sections transversales d'au moins 20 racines mycorhizées.

Dans nos conditions expérimentales (expériences 1 et 2), 6 types de mycorhizes dominent sur une période de 6 mois (figures 10 et 11). Le tableau (12) indique les principaux caractères distinctifs de ces mycorhizes en plus de ceux que nous avons décrits dans le chapitre (1).

La mycorhize du type "brun clair" à manteau peu développé (pl.23, 1, 2 et 3), devient "brun foncé" au cours du temps avec un manteau plus épais constitué d'hyphes à boucles et en forme de soies raides très caractéristiques (pl.24, 1 et 2). Ce changement de couleur a été également observé *in vitro* (cf.chapitre 2). La souche fongique impliquée n'a pas été identifiée mais a été isolée sous le nom de XM002 (cf.chapitre 1).

La mycorhize du type "blanc à sclérotés" est liée à des sclérotés par des cordons mycéliens (pl.25, 1 et 2). La souche fongique a été isolée sous le nom de XM001 et a été identifiée à *S. verrucosum* 7732 (cf.chapitre 1).

La mycorhize du type "blanc" présente, contrairement aux deux types précédents, un manteau strictement pseudoparenchymateux (pl.26, 1 et 2). La souche fongique de ce type de mycorhize n'a pas été identifiée mais a été isolée (cf.chapitre 1) sous le nom de XM004.

La souche fongique de la mycorhize du type "jaune" a été isolée sous le nom de XM003 et identifiée à *S. dictyosporum* (cf.chapitre 1) (pl.27, 1 et 2).

La mycorhize du type "brun lisse" à texture lisse présente un manteau relativement épais avec des hyphes à boucles (pl.28, 1 et 2). La souche fongique associée a été ni isolée ni identifiée.

La mycorhize du type "brun cotonneux" à texture cotonneuse a été observée uniquement dans l'expérience n° 1 et à un très faible pourcentage (pl.29, 1 et 2). La souche fongique associée a été ni isolée ni identifiée.

PEYRONEL et FASSI (1957) puis FASSI et FONTANA (1961) ont décrit les premières ectomycorhizes des essences tropicales chez les genres *Afzelia*, *Macrolobium*, *Brachystegia* et *Julbernardia*. JENIK et MENSAH (1967) ont décrit deux types de mycorhizes chez *Afzelia africana*. Les souches fongiques associées ont été ni isolées ni identifiées. Les données descriptives qui en résultent ne nous ont pas permis de les comparer avec nos résultats. En général la taxonomie de la plus part des champignons mycorhiziens connus est basée sur leur fructification (TRAPPE, 1962). Les mécanismes qui commande cette fructification sont très peu connus. Dans certains cas la présence de la plante hôte est nécessaire à la fructification du champignon associé (DEBAUD et GAY, 1981). Sans fructification, l'identification du

partenaire fongique est toujours difficile (MOLINA et TRAPPE, 1982). La caractérisation et la classification des ectomycorhizes peuvent conduire dans des cas particuliers à l'identification du partenaire fongique. Par exemple les ectomycorhizes de *Cenococum geophilum* Fr. et de *Piloderma croceum* Erikss.& Hjortst sont très caractéristiques quelque soit la plante hôte (TRAPPE, 1971 ; VOIRY, 1981). Dans certains cas des données morpho-structurales de l'ectomycorhize ont conforté l'identification basée sur le sporocarpie (LARSEN et ZAK, 1978). Dans d'autres cas les caractéristiques du manteau fongique ont permis l'identification du champignon responsable (FONTANA et CENTRELLA, 1967 ; PALENZONA, 1969 ; CHEVALIER, 1973). Quoiqu'il en soit, les systèmes de classification proposés jusqu'ici ne permettent pas souvent de donner l'identité du partenaire fongique de l'ectomycorhize (DOMINIK, 1959 ; VOIRY, 1981). Des résultats récents, obtenus en comparant des extraits d'ADN totaux digérés par des enzymes de restriction (RFLP), font apparaître que certains profils nucléotidiques sont caractéristiques d'écotypes de *Laccaria laccata* (ZAIYOU, 1989). Une comparaison de ces profils nucléotidiques avec ceux des mycorhizes devrait permettre l'identification du partenaire fongique.

Chronologiquement, 3 semaines après le repiquage sur sol des Bayottes, apparaît la mycorhize du type "brun clair" qui colonise environ 30% (expérience 1) ou 50% (expérience 2) du système racinaire (figures 10 et 11). Ce type de mycorhize change de couleur pour devenir "brun foncé" environ 4 semaines après le repiquage et se maintient pendant une période de 6 mois avec un taux d'infection de 30% ou 40%. La souche fongique impliquée présente à la fois une vitesse d'infection, une aptitude au maintien et une compétitivité bien plus importantes que les souches fongiques des autres types de mycorhizes.

Apparaît simultanément (expérience 1) ou ensuite (expérience 2) le type "blanc à sclérotés" environ 2 mois après le repiquage, avec un taux de mycorhization de 20% qui diminue pour atteindre 5% à 6 mois (figures 10 et 11). La souche fongique impliquée a une vitesse d'infection comparable à la première mais présente au contraire une aptitude au maintien et une compétitivité relativement faibles.

La mycorhize du type "blanc" apparaît 4 mois après le repiquage (expérience 1 et 2) avec un taux de mycorhization d'environ 20% qui diminue jusqu'à 10% à 6 mois. Cette souche fongique est tardive et peu compétitive.

Les mycorhizes du type "brun lisse" apparaissent à 5 mois dans les deux expériences avec un taux de mycorhization voisin de 10%. Cette souche fongique est également tardive et peu compétitive.

La mycorhize du type "jaune" apparaît à 4 mois dans l'expérience 1 et à 5 mois dans l'expérience 2. Elle présente à 6 mois un taux de mycorhization tout à fait comparable à celui du type "brun foncé". La souche fongique associée au type "jaune" peut être considérée comme compétitive aussi bien vis à vis des souches qui s'installent en premier que celles qui apparaissent en dernier.

Nos résultats montrent, dans le temps et dans l'espace (infection multiple sur la même racine latérale) (pl.22, 3 et 4), une séquence d'apparition des champignons associés à *Afzelia* avec une diversité en espèces fongiques qui augmentent.

Nous avons classé les souches fongiques en deux groupes selon leur stade d'apparition : les souches fongiques précoces (XM002 issue du type "brun foncé", XM001 issue du type "blanc à sclérotés" et identifiée à *S. verrucosum* 7732) et les souches fongiques tardives (XM004 issue du type "blanc", XM003 issue du type "jaune" et identifiée à *S. dictyosporum* 7731, les souches associées aux mycorhizes des types "brun lisse" et "brun cotonneux").

Il apparaît également que les souches précoces une fois installées, n'empêchent pas la mycorhization par les souches tardives. La présence de ces dernières semblent affecter par contre le taux de mycorhization des souches précoces. Il n'y a pas de remplacement des champignons précoces par les champignons tardifs mais un processus d'addition au cours du développement de la plante hôte. A 6 mois deux souches fongiques, l'une précoce (XM002) et l'autre tardive (*S. dictyosporum*) sont les plus représentées dans les deux expériences avec un taux de mycorhization totale d'environ 75%. Nous pouvons en déduire, dans nos conditions expérimentales, que ces deux souches fongiques apparaissent les plus compétitives pour les sites d'infection.

Nous avons recherché quel était le déterminisme de ce processus d'infection-addition au cours du temps. Pour cela, nous avons formulé deux hypothèses, l'une en relation avec la densité de propagules dans le sol, l'autre liée aux besoins nutritifs des souches fongiques précoces ou tardives.

Le tableau (13) indique quel était le nombre de propagules mycorhizogènes contenus dans 1gr d'un échantillon de sol sec. Seules sont représentées les propagules des souches fongiques précoces dans la mesure où nous n'avons pas identifié des propagules attribuées aux souches fongiques tardives. Les mycorhizes et cordons mycéliens non déterminés qui pourraient être attribués à ces dernières, bien qu'en nombre relativement important, restent tout de même non infectieux (tableau 13). Ces mycorhizes, d'aspect macroscopique non nécrosé, présentent cependant en microscopie électronique une structure bien distincte avec des hyphes sénescents

Tableau 13 : Dénombrement et germination des propagules végétatives en présence ou non du système racinaire d'*Afzelia*.

	XM002			7732	Mycorhizes indéterminées	Cordons mycéliens indéterminés
	mycorhizes	cordons mycéliens	sclérotés	sclérotés		
(1)	15,6 a	7,35 b	1,85 c	2,05 c	7,9 b	6,35 b
(2)	41,1	7,8	0	51	0	0
(3)	38,7	4	0	47,2	0	0

- (1) Nombre moyen de propagules par gramme de sol (20 gr de sol)
- (2) Pourcentage de germination des propagules en présence des racines d'*Afzelia* (25 propagules)
- (3) Pourcentage de germination des propagules en l'absence des racines d'*Afzelia* (" ")
- Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de FISHER.

Tableau 14 : Influence du système racinaire d'*Afzelia africana* sur le temps de germination et de mycorhization par des propagules végétatives ou sporales.

	XM002			7732		7731
	mycorhizes	cordons mycéliens	sclérotés	spores	sclérotés	spores
(1)	0-7	0-7	0	nd	0-7	nd
(2)	7-15	7-15	0	27-34	7-15	27-34
(1)	0-7	0	0	nd	0-7	nd

- Les valeurs sont exprimées en intervalles de jours.
- (+) Présence du système racinaire
- (-) Absence du système racinaire
- (1) Temps de germination
- (2) Temps de mycorhization
- nd : Non déterminé

dans le manteau et le réseau de Hartig (pl.30). Cela suggérerait que les souches tardives seraient absentes sous forme de propagules végétatives viables dans le sol.

Cependant les propagules des deux souches précoces qui ont été observées, s'avèrent parfaitement viables bien qu'ayant séjourné dans du sol sec pendant l'équivalent d'une durée de saison sèche au sud du Sénégal (7 mois) (pl.31 et pl.32).

Les propagules présumées appartenir à la souche XM002 ("brun foncé"), en particulier les fragments de racine d'aspect nécrosé, présentent cependant en microscopie électronique quelques hyphes vivantes localisées dans le manteau interne (pl.33). Ces hyphes présentent une paroi épaisse et un cytoplasme dense et bien différencié. Par contre les hyphes du manteau externe et ceux du réseau de Hartig sont vides de tout contenu cellulaire. Les cordons mycéliens de la souche XM002 présentent en section des hyphes à cytoplasme bien différencié. Ces hyphes présentent une paroi dont l'organisation ultrastructurale rappelle les ramifications intrahyphales des hyphes jeunes décrites chez les endomycorrhizes à V.A.(TOMMERUP et ABBOTT, 1981 ; LIM *et al.*, 1983). Les hyphes les plus externes sont vides de tout contenu cellulaire (pl.34). Ces cordons mycéliens renferment également des bactéries. Les sclérotés de la souche XM002 présentent une organisation structurale différente de ceux des champignons mycorrhiziens *Hebeloma sacchariolens*, *Pisolithus tinctorius* ou *Paxillus involutus* (GRENVILLE *et al.*, 1985 a et b ; FOX, 1986) (pl.35). En section transversale, ces sclérotés présentent un cortex bien épais et une médula. Chez les champignons pathogènes, la capacité de survie des sclérotés en conditions de stress est souvent liée à l'épaisseur du cortex (TOWNSEND et WILLETTS, 1954 ; COLEY-SMITH, 1979). Dans ces conditions il est permis de penser que la souche XM002 est capable de se conserver dans le sol sous trois formes (mycorrhizes, cordons mycéliens et sclérotés), ce qui lui confère une forte aptitude à résister à de forte dessiccation et à se disséminer lorsque les conditions lui sont favorables.

La souche 7732 ("blanc à sclérotés" attribuée à *S. verrucosum* 7732) quant à elle, est présente dans le sol sous forme de sclérotés et probablement sous forme de spores (pl.32 et pl.31, 6). En section, ces sclérotés présentent une structure typique de sclérotés de champignons mycorrhiziens avec de l'extérieur vers l'intérieur des hyphes sans contenu cellulaire constituant le cortex et des hyphes à contenu cellulaire bien vacuolisé constituant la médula.

Lorsque nous comparons les deux souches précoces, il apparaît que le nombre de propagules végétatives par gr de sol de la souche XM002 est significativement plus important que celui de la souche 7732 (tableau 13). Les propagules de la souche XM002 sous forme de mycorrhizes d'aspect nécrosé mais contenant néanmoins des hyphes vivantes, des sclérotés et

des cordons mycéliens présentent un pourcentage de germination au contact des racines latérales d'*Afzelia* respectivement de 41,1%, 7,8% et de 0% (tableau 13). Il paraît à priori étonnant que les sclérotés de XM002, qui présentent une structure parfaitement différenciée et vivante, ne soient pas infectieux dans nos conditions expérimentales. Compte tenu de l'épaisseur du cortex, nous suggérons que des conditions particulières sont requises pour lever la dormance de ces sclérotés (intervention de microorganismes du sol qui fragiliseraient le cortex).

Nous avons également vérifié que l'infection par les propagules de la souche XM002 provenait bien des hyphes vivants et non d'éventuels spores. Pour ce faire, nous avons préparé et inoculé un filtrat de sol (filtrage sur toile à bluter à maille de 40µm) ou une suspension du même sol exempt de propagules de XM002 contre les racines latérales d'*Afzelia*. Dans ces conditions nous n'avons pas observé d'infection par la souche XM002 provenant de spores au moins dans les mêmes délais que ceux des propagules végétatives (tableau 13).

A notre connaissance, ces différentes formes de conservation et de dissémination à l'état végétatif de la souche XM002 n'ont jamais été décrites chez un champignon ectomycorhizien. Cette observation pourrait être liée au fait que nous n'avons pas trouvé de carpophore correspondant à ce Basidiomycète (cf. chapitre 1). Cependant il est bien connu que l'Ascomycète *Cenococcum geophilum* ne présente pas de fructification et que les sclérotés constituent la forme de conservation et de dissémination de ce champignon mycorhizien dans le sol (MIKOLA, 1948 ; TRAPPE, 1969 ; SHAW et SIDLE, 1982).

Le pourcentage de germination des sclérotés de la souche 7732 ("blanc à sclérotés" attribué à *S. verrucosum*) est de l'ordre de 51% (tableau 13). Cette souche présente également des spores qui sont capables de germer 1 mois après l'inoculation en présence du système racinaire d'*Afzelia* (tableau 14). Comme la diversité et le nombre de propagules végétatives sont plus importants chez la souche XM002 nous suggérons, en plus de sa capacité de conservation et de dissémination, qu'elle soit capable de coloniser en premier le système racinaire d'*Afzelia* âgé de 3 semaines. Cependant, du point de vue de l'efficacité du type d'inoculum sur le taux de mycorhization, les sclérotés de la souche 7732 produisent un mycélium qui présente une vitesse de propagation le long du système racinaire significativement plus importante que les autres types de propagules (tableau 15). Nous avons montré également que ces sclérotés étaient capables de germer dans des délais relativement courts sur le substrat humidifié en l'absence du système racinaire d'*Afzelia* (tableaux 13 et 14). Ces propriétés confèrent aux souches précoces un avantage considérable par rapport aux souches tardives.

Tableau 15 : Influence de 3 types d'inoculum sur l'indice de mycorhization (notes de 0 à 4) d'*Azelia africana* par 4 souches indigènes 1mois après l'inoculation.

	XM002	7732	XM004	7731
Papier carton	2,8 a	1 b	1 b	1,4 b
Fragments de mycorhizes	2,6 a	nd	nd	nd
Sclérote	nd	3,2 c	nd	nd

- Chaque valeur représente la moyenne sur 5 plants.

- Les notes diffèrent significativement à 5% d'après le test de FISHER lorsqu'elles ne sont pas suivies de la même lettre.

Tableau 16 : Teneur en glucose, en saccharose ou en hexoses réducteurs des racines latérales d'*Azelia* âgées de 1 à 4 mois.

	Glucose	Saccharose	Hexoses réducteurs
1 mois	17 a	13 a	31 a
2mois	31 a	13 a	64 b
3 mois	69 b	7,5 a	93 c
4 mois	79,0 b	1,7 b	102 c

- Chaque valeur est la moyenne sur 3 plants.

- Les valeurs sont exprimées en mg par g de matière sèche racinaire.

- Dans chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de FISHER.

Les spores de la souche tardive (*S.d.7731*) au contact du système racinaire d'*Afzelia* sont infectieuses environ 1 mois et 7 jours après l'inoculation (tableau 14). Il ne nous a pas été possible d'observer la production de mycélium par ces spores en l'absence du système racinaire (tableau 14). Il est cependant bien connu que la germination des spores est souvent stimulée par la présence d'exsudats racinaires (FRIES, 1981)

Nous suggérons ainsi que dans des conditions favorables (sol humide), les propagules végétatives des souches précoces (XM002 et *S.v.7732*) sont capables de germer en l'absence de la plante hôte. Les premières racines latérales du système racinaire, une fois formées, sont colonisées par ces souches déjà présentes à l'état végétatif. Le nombre et la diversité des propagules végétatives dans le sol favorisent la souche précoce XM002 par rapport à la souche 7732 (*S. verrucosum*). Cependant la souche tardive 7731 (*S. dictyosporum*), dont les spores germent et forment des mycorhizes en chambre de culture après un mois de contact avec les racines d'*Afzelia*, s'installent dans les conditions expérimentales de Dakar à 4 ou 5 mois après le repiquage. Cette colonisation tardive du système racinaire par la souche 7731 pourrait résulter également d'interactions compétitives entre souches tardives et précoces.

En conclusion, cette première hypothèse selon laquelle les propagules végétatives conditionnent l'ordre d'apparition des types de mycorhizes nous semble vérifier dans les expériences n°1 et n°2 de Dakar.

Des expériences complémentaires réalisées en serre (Nancy) montrent que la quantité de sucres solubles des racines latérales d'*Afzelia* augmente au cours du temps (tableau 16). Cette augmentation est significative pendant les trois premiers mois pour le glucose et les hexoses réducteurs. Il n'apparaît pas de différences significatives entre le 3ème et 4ème mois. Bien que les conditions climatiques de la serre soient différentes des conditions du piégeage (Dakar), ces résultats suggèrent que la disponibilité en substrats carbonés peut augmenter au cours du vieillissement de la plante.

Les figures (12 et 13) montrent l'influence de l'ablation des cotylédons sur la cinétique d'apparition des types de mycorhizes sur les racines d'*Afzelia* dans l'expérience n°2. Nous aurions pu nous attendre, après ablation des cotylédons, à un remaniement dans l'apparition et la distribution des types de mycorhizes. La présence des cotylédons favoriserait l'infection par les souches précoces et inhiberait par contre les souches tardives. Nos résultats montrent au contraire que l'ablation partielle ou tardive des cotylédons ne modifie pas la séquence d'apparition des souches fongiques. Pendant la semaine qui suit l'ablation totale des cotylédons, le taux de mycorhization par le champignon précoce XM002 n'augmente pas, contrairement à ce que l'on observe dans le témoin sans ablation (figure 11).

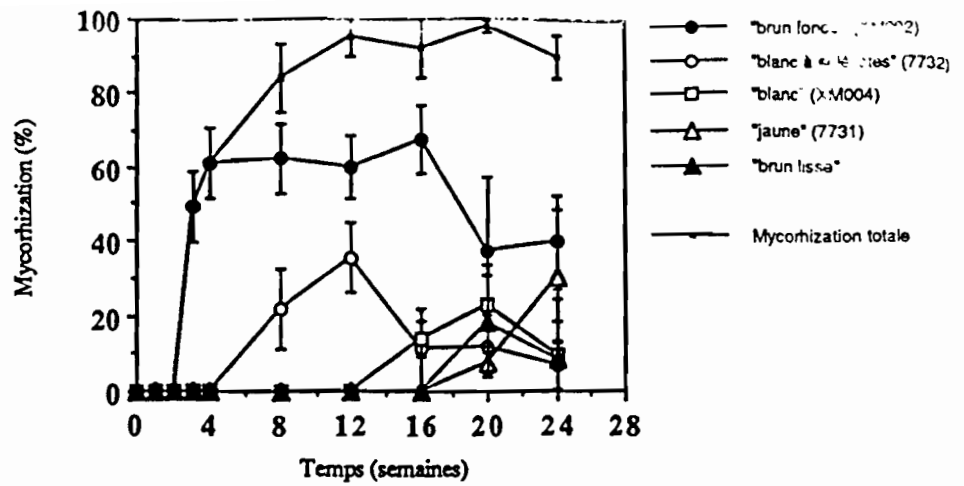


Figure 11 : Séquence d'apparition au cours du temps de 5 types dominants de mycorhizes d'*Afzelia* (expérience n°2).

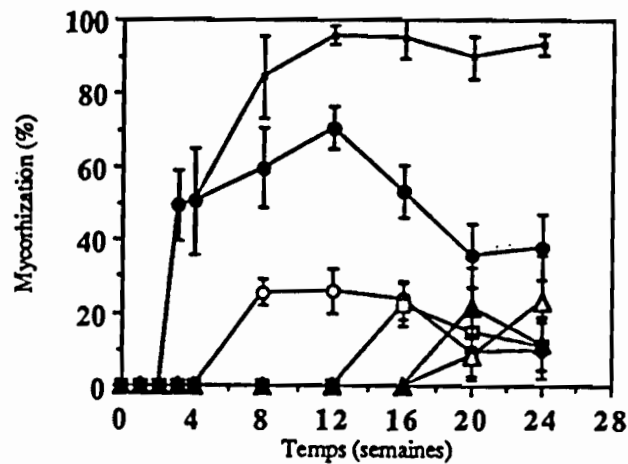


Figure 12 : Séquence d'apparition au cours du temps de 5 types dominants de mycorhizes d'*Afzelia* après ablation partielle des cotylédons (expérience n°2).

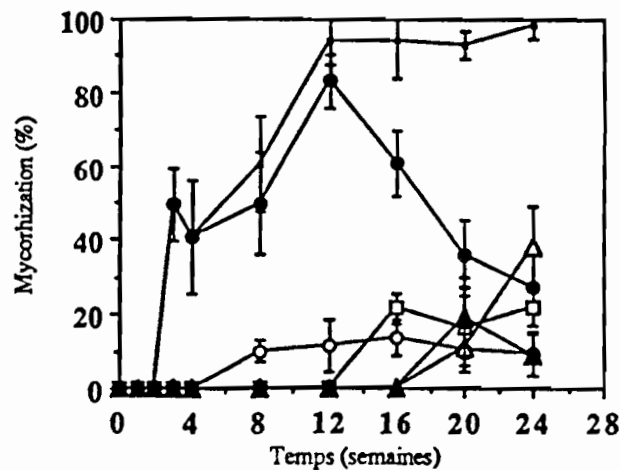


Figure 13 : Séquence d'apparition au cours du temps de 5 types dominants de mycorhizes d'*Afzelia* après ablation totale des cotylédons (expérience n°2).

Tout se passe comme si le déficit qui résulte de l'ablation des réserves, modifie le taux de mycorhization de la souche XM002 d'autant plus que l'ablation est totale. Ces modifications du taux de mycorhization sont également observées avec la souche précoce 7732 (figures 12 et 13).

Des tests *in vitro* en chambre de culture vont nous permettre de préciser le rôle des cotylédons sur le développement et la mycorhization des plants d'*Afzelia* par les souches précoces ou tardives. Nous avons montré dans le chapitre (2) que l'infection ectomycorhizienne en conteneur avait lieu 4 jours après l'inoculation des plants d'*Afzelia*. Le tableau (17) indique l'effet de l'ablation des cotylédons sur la croissance d'*Afzelia* âgé de 10 à 15 jours. Il apparaît qu'à ce stade l'effet cotylédon ralentit considérablement la croissance d'*Afzelia* d'autant plus que l'ablation est totale (tableau 17) (pl.36).

La teneur en hexoses réducteurs des racines latérales d'*Afzelia* est significativement diminuée et d'autant plus que l'ablation des cotylédons est totale (tableau 18). Par contre la teneur en glucose des racines latérales n'est pas significativement affectée alors que la teneur en saccharose est pratiquement négligeable dans tous les traitements cotylédons (tableau 18). Il est *a priori* étonnant que la quantité de saccharose dans les racines soit très faible alors qu'il est considéré en général chez les ligneux comme l'un des composés carbonés majeurs transporté vers les racines par la sève élaborée (LEWIS et SMITH, 1967). Des tests complémentaires nous ont permis de vérifier que l'extrait végétal ne présentait pas d'inhibiteur de l'invertase du commerce (cf.paragraphe 2.4.4.4.2). Nous pouvons considérer que les racines latérales d'*Afzelia* contiennent très peu de saccharose dans nos conditions expérimentales (serre ou chambre de culture).

Comme les cotylédons alimentent les racines latérales en substrats carbonés, nous pouvons considérer qu'ils ont une activité photosynthétique dont dépend la plante au moins pendant sa croissance initiale. Chez les Légumineuses à germination épigée ou hypogée, il est bien connu que le développement des semis dépend des photosynthétats ou d'autres réserves contenus dans les cotylédons (MACHADO *et al.*, 1974 ; VEIERSKOV, 1985).

L'influence des cotylédons sur l'aptitude à la mycorhization d'*Afzelia* par les souches tardives ou précoces a été également étudiée (tableau 19). A l'exception de la souche XM002 toutes les autres souches fongiques testées sont sensibles à l'ablation partielle ou totale des cotylédons.

Avec les souches tardives (7731 et XM004) le processus d'infection est bloqué au niveau

Tableau 17 : Effet des cotylédons sur la croissance d'*Azelia africana* 4 jours après ablation

	Tige (cm)	Pivot (cm)	Nombre de Racines			Tige + Feuille (gr. de matière sèche)	Racine
			d'ordre 1	d'ordre 2	d'ordre 3		
Ablation totale	19,74 a	11,46 a	100,6 a	202,6 a	0 a	0,259 a	0,128 a
Ablation partielle	23,82 b	11,48 a	141 b	415,4 b	7,6 b	0,375 b	0,150 b
Sans Ablation	32,4 c	11,7 a	149 b	740,8 c	11,4 b	0,594 c	0,178 b

- Chaque valeur est la moyenne sur 5 plants.

- Dans chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de FISHER.

Tableau 18 : Effet des cotylédons sur la teneur en glucose, en saccharose ou en sucres réducteurs des racines latérales d'*Azelia* 4 jours après ablation.

	Glucose	Saccharose	Hexoses réducteurs
Ablation totale	51,3 a	1,3 a	51,0 a
Ablation partielle	72,3 a	11 b	97,3 b
Sans ablation	78,0 a	17,3 b	170,6 c

- Chaque valeur est la moyenne sur 3 plants.

- Les valeurs sont exprimées en mg par g de matière sèche racinaire.

- Dans chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de FISHER.

Tableau 19 : Influence des cotylédons sur la mycorhization d'*Azelia* par 4 souches indigènes 4 jours après ablation.

	XM002	7732	XM004	7731
Ablation totale	M	PM	PM	PM
Ablation partielle	M	PM	PM	PM
Sans ablation	M	M	M	M

- M : Mycorhize

- PM : Pseudomycorhize

de la formation du réseau de Hartig. Nous nous retrouvons dans la situation des pseudomycorhizes décrites dans le chapitre (2). La formation des digitations pariétales que nous avons signalées dans les situations d'incompatibilité (chapitre 2) sont également observées dans les traitements "sans ablation" c'est à dire en situation normale. Nous suggérons que ces formations pariétales sont des réactions normales de la plante en présence du symbionte fongique. La réaction de la plante hôte au contact des hyphes semble différente selon l'intensité du traitement.

L'ablation totale des cotylédons se traduit par la présence de matériel pariétal sur la face interne des parois des cellules corticales en contact avec les souches tardives 7731 et XM004 (pls.37, 38, 39, 40 et 41). Ces modifications pariétales ne sont pas observées après ablation partielle des cotylédons bien que le processus d'infection soit également bloqué.

Avec la souche précoce 7732 l'infection mycorhizienne est bloquée sans que nous ayons observé de matériel pariétal sur la paroi des cellules corticales comme dans le cas des souches tardives (pls.42 et 43).

Cependant, avec la souche précoce XM002, l'ablation totale ou partielle des cotylédons n'affectent pas la mycorhization (pls.44 et 45).

Les plants témoins non inoculés ayant subi l'ablation partielle ou totale des cotylédons ne présentent pas de digitations ou de matériel pariétal sur les cellules corticales les plus superficielles (pls.46 et 47).

D'autre part les blessures occasionnées à la limite de l'hypocotyle et de l'épicotyle, suite à l'ablation des cotylédons, ne se traduisent pas par des perturbations morphologiquement observables et similaires par exemple à celles induites après une décortication annulaire (ZIMMERMANN, 1969 ; LEI, 1988).

Des résultats précédents découlent un certain nombre de remarques. Les observations *in vitro* tendent à montrer que l'ablation partielle ou totale des cotylédons n'affecte pas l'aptitude de la souche XM002 à mycorhizer les jeunes plants d'*Afzelia*.

In vitro, le flux des photosynthétats des cotylédons vers la partie racinaire est réduit significativement, d'autant plus que l'ablation est totale. Il est bien connu que la formation et le maintien de l'association mycorhizienne résultent d'un équilibre entre les deux partenaires caractérisé par un double flux d'échanges, des sucres étant transférés de la plante hôte vers le champignon et des minéraux du sol du champignon vers la plante hôte (HARLEY et SMITH,

1983). Un facteur de déséquilibre (faible intensité lumineuse, décapitation de la partie aérienne ou décortication annulaire) peut induire dans certains cas de profondes modifications de la structure de la mycorhize (DAVIS et FUCIK, 1986 ; LEI, 1988).

Dans les conditions de notre test (absence de milieu nutritif dans le substrat) l'ablation totale ou partielle des cotylédons ne modifie pas la formation du manteau qui présente dans tous les cas une structure compacte. D'autres auteurs ont montré que le manteau fongique pouvait présenter une structure plus lâche en situation d'incompatibilité (MOLINA et TRAPPE, 1982b ; MALAJCZUK *et al.*, 1984 ; DUDDRIDGE, 1986a) ou anormalement compacte sur milieu riche en glucose (DUDDRIDGE, 1986b). Ces modifications de la structure du manteau ne sont pas observées dans nos conditions expérimentales. Cela voudrait dire qu'en plus des substrats carbonés résiduels au niveau des racines après ablation, le flux des photosynthétats n'est pas totalement interrompu car les jeunes feuilles et l'hypocotyle présentent une activité photosynthétique qui n'est apparemment pas suffisante pour la formation du réseau de Hartig avec les souches 7732, XM004 et 7731. Ce résultat montre que l'alimentation en substrat carboné par la plante hôte peut moduler la formation du réseau de Hartig.

Avec la souche XM002 qui présente au contraire un réseau de Hartig, nous avons interprété ces résultats comme étant une réaction différentielle des souches fongiques précoces ou tardives à l'ablation des cotylédons qui pourrait traduire des besoins en nutriments différents pour chacune d'elles. Cette hypothèse paraît au moins vraisemblable avec la souche XM002. Ayant des besoins en nutriments carbonés moins importants que les autres souches, la souche XM002 s'installerait en premier sur le système racinaire. Cette hypothèse est en accord avec le concept de succession tel qu'il est défini par DIGHTON et MASON (1985). Cependant les résultats obtenus avec la souche précoce 7732 ne vont pas dans le même sens que ceux de la souche XM002. La souche 7732 aurait des besoins en nutriments carbonés plus importants d'où sa sensibilité à un effet cotylédon.

Par contre, avec les souches tardives, l'ablation totale des cotylédons induit des modifications pariétales qui évoquent celles que nous avons mises en évidence en situation d'incompatibilité (cf. chapitre 2). La plante hôte ne pouvant plus satisfaire à la demande, les champignons présentent alors un comportement "agressif" vis à vis des cellules corticales pour trouver les substrats carbonés qui leur font défaut. Cette "agressivité" déclenche chez la plante-hôte des mécanismes actifs de protection à l'égard de la progression de l'infection. L'ablation totale des cotylédons paraît induire chez la plante-hôte des modifications pariétales d'autant plus intenses que la souche fongique est plus "agressive" parcequ'ayant des besoins en substrats carbonés plus importants à satisfaire.

La deuxième hypothèse (les besoins en substrats carbonés conditionnant l'ordre d'apparition des types de mycohyzes) n'a pas été établie comme dans le cas de la première hypothèse. En situation normale (présence des cotylédons), nous avons vu que les souches précoces ou tardives présentent *in vitro* une aptitude ectomycorhizogène. Cependant chez la souche XM002, la capacité d'infection précoce est corrélée avec son aptitude à la conservation à l'état végétatif dans le sol sec, sa capacité à l'étalement sur milieu "extrait de sol" (résultats non indiqués dans le mémoire) et son absence de sensibilité à l'effet cotylédon. Chez la souche 7732 (*S. verrucosum*), une corrélation a été établie entre sa capacité d'infection précoce et son aptitude à la conservation à l'état végétatif dans le sol sec. Chez les souches 7731 (*S. dictyosporum*) ou XM004 une corrélation a été établie entre leur capacité d'infection tardive, l'absence de propagules végétatives vivantes dans le sol et leur sensibilité à un effet cotylédon.

Planche 22

Figure 1 : Dispositif expérimental du piégeage (expérience 1).

Figure 2 : Racine d'*Azelia* mycorhizée par la souche XM002 3 semaines après repiquage dans l'expérience du piégeage. Noter la présence d'hyphes présumées appartenir à *Glomus* sp. sur la surface de la racine. Gr.x 400.

Figures 3 et 4 : Infection multiple sur racine longue (fig.3) et sur racine courte (fig.4).

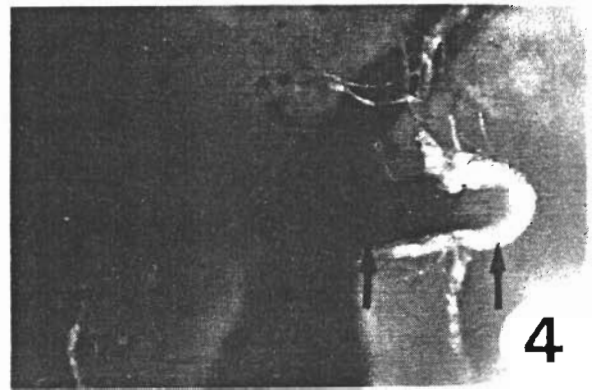


Planche 23

Figure 1 : Mycorhizes du type “brun clair”.

Figure 2 : Vue de dessus d’une mycorhize avec un manteau lâche et un réseau de Hartig. Gr.x 365.

Figure 3 : Section transversale d’une mycorhize avec un manteau et un réseau de Hartig. Gr.x 253.

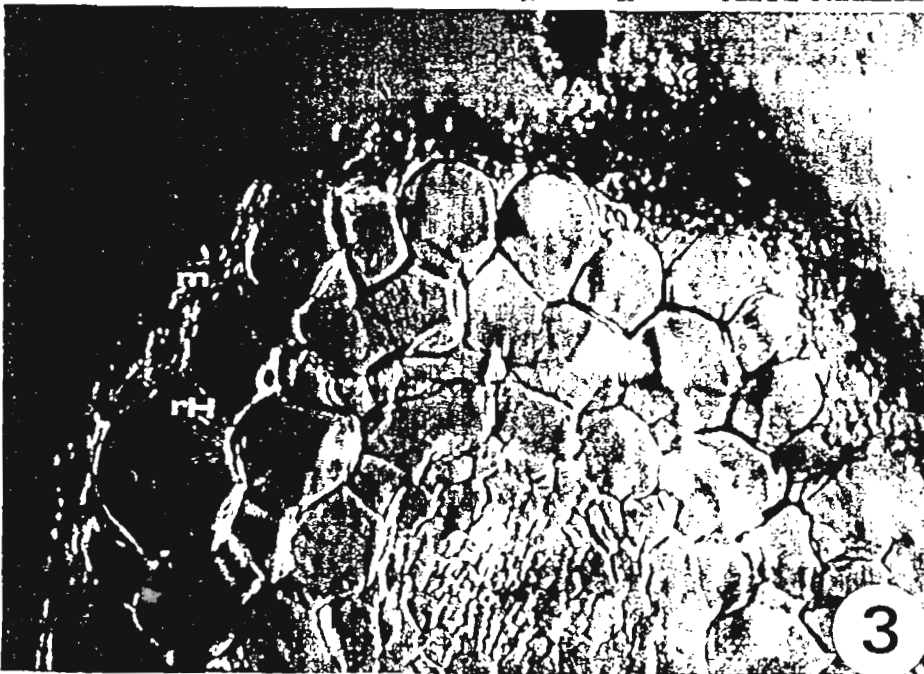
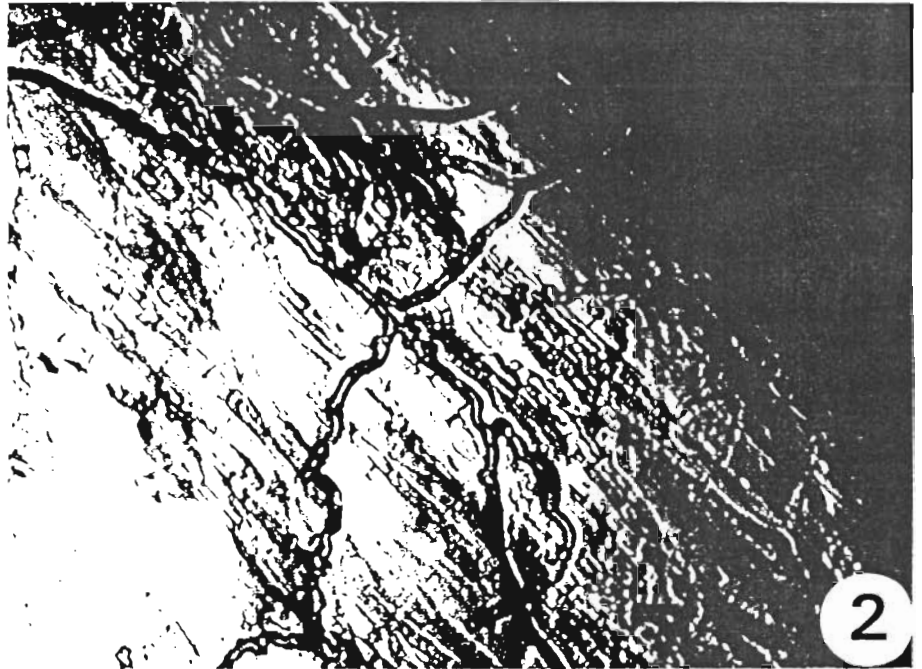
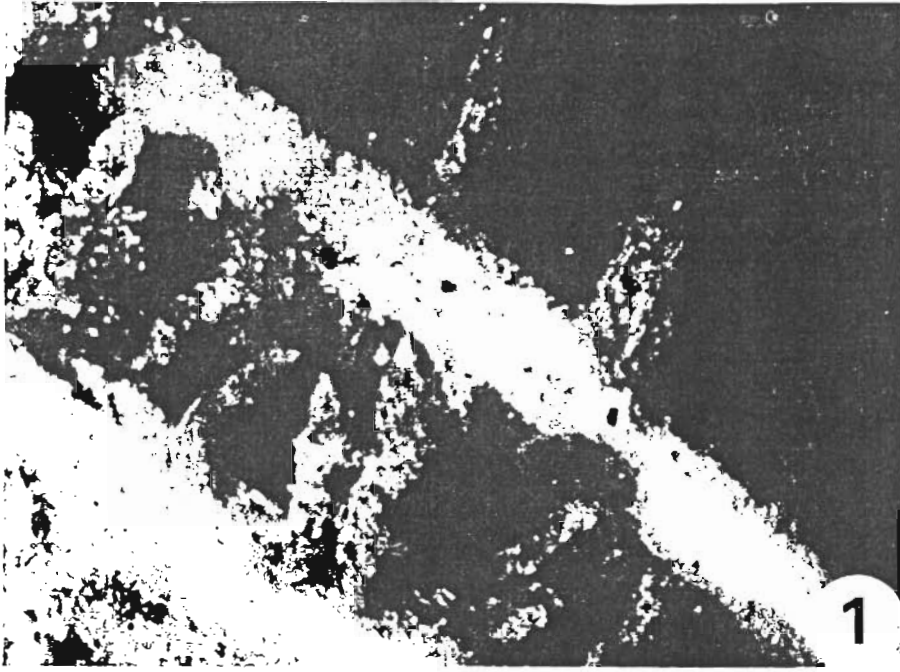


Planche 24

Figure 1 : Mycorhizes du type "brun foncé".

Figure 2 : Section transversale d'une mycorhize avec un manteau (à soies raides) et un réseau de Hartig. Gr.x 267.

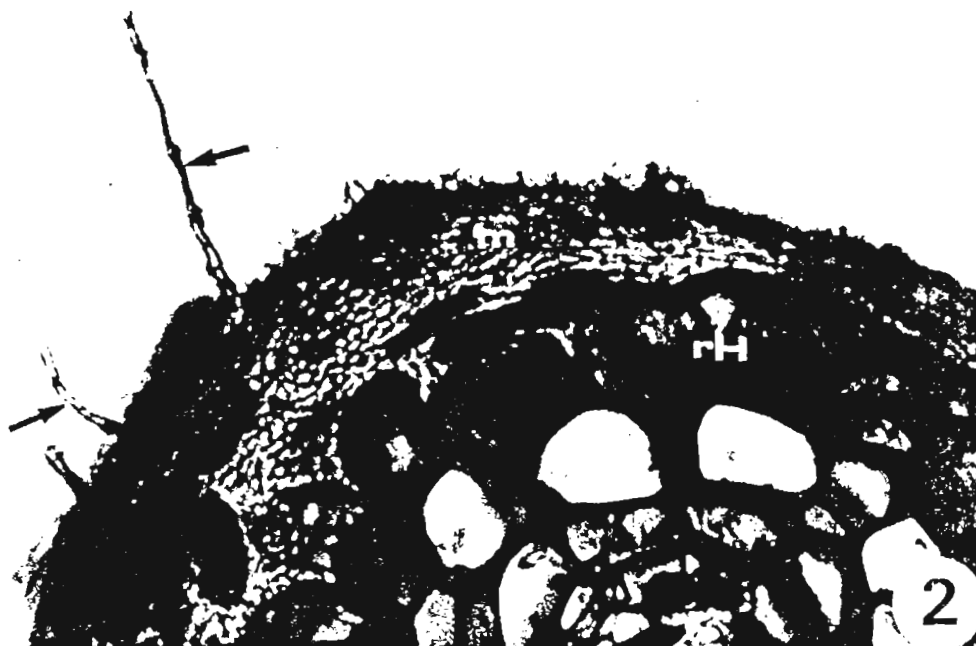
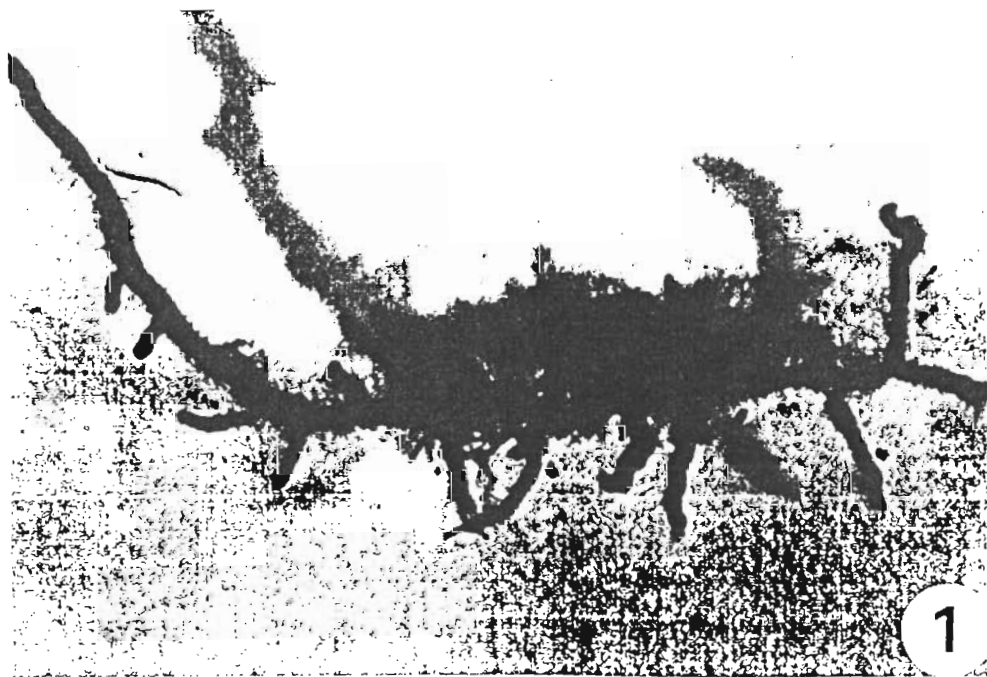


Planche 25

Figure 1 : Mycorhizes du type "blanc à sclerotes".

Figure 2 : Section transversale d'une mycorhize avec un manteau et un réseau de Hartig.
Gr.x 273.

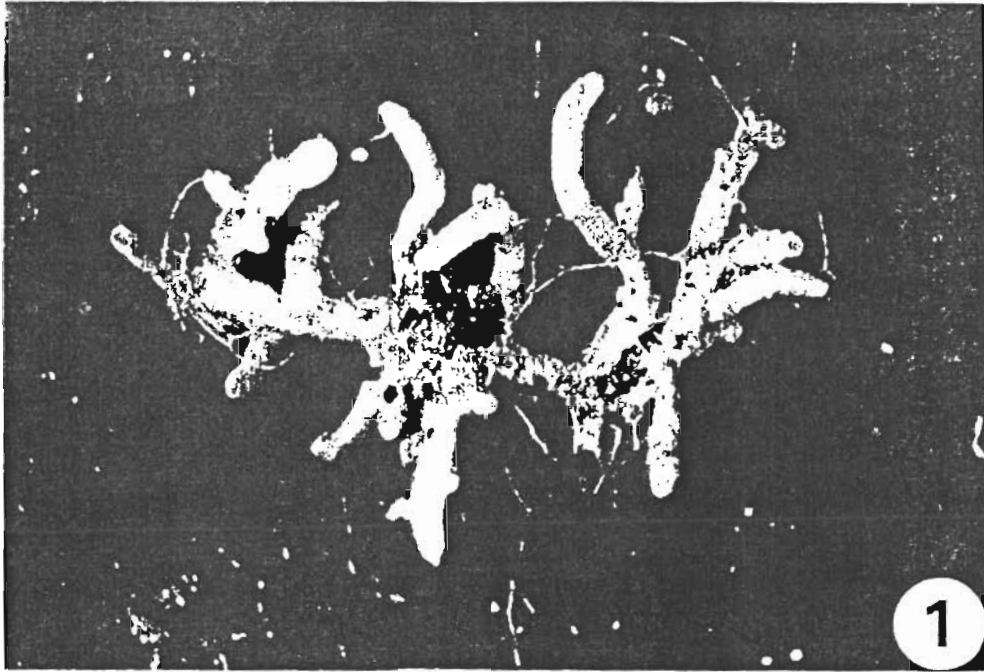


Planche 26

Figure 1 : Mycorhizes du type "blanc".

Figure 2 : Section transversale d'une mycorhize avec un manteau (pseudoparenchymateux stricte) et un réseau de Hartig. Gr.x 283.

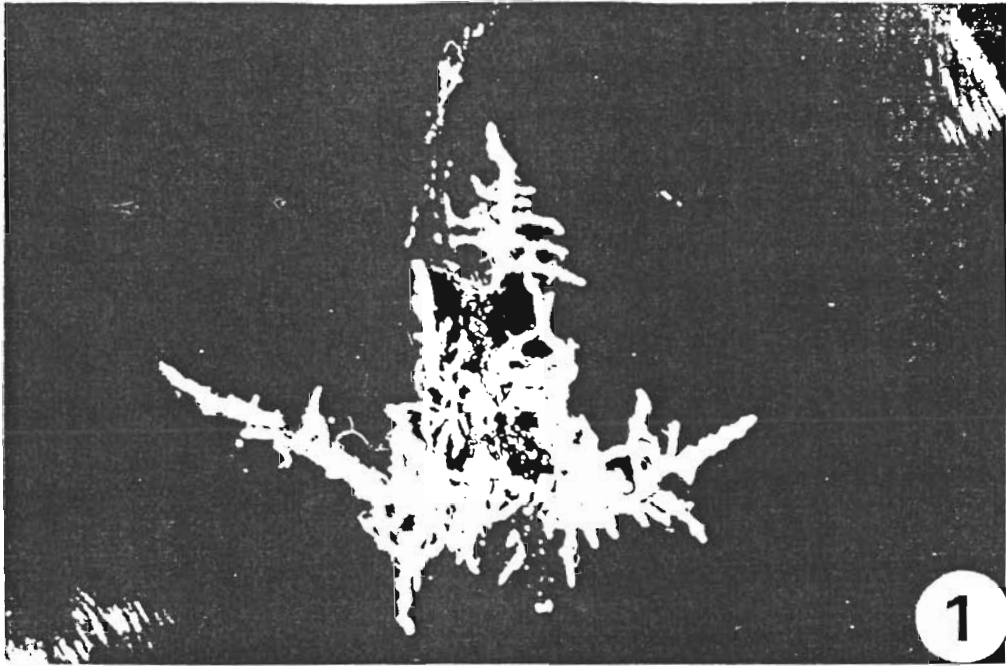


Planche 27

Figure 1 : Mycorhizes du type "jaune".

Figure 2 : Section transversale d'une mycorhize avec un manteau et un réseau de Hartig. Gr. x 283.

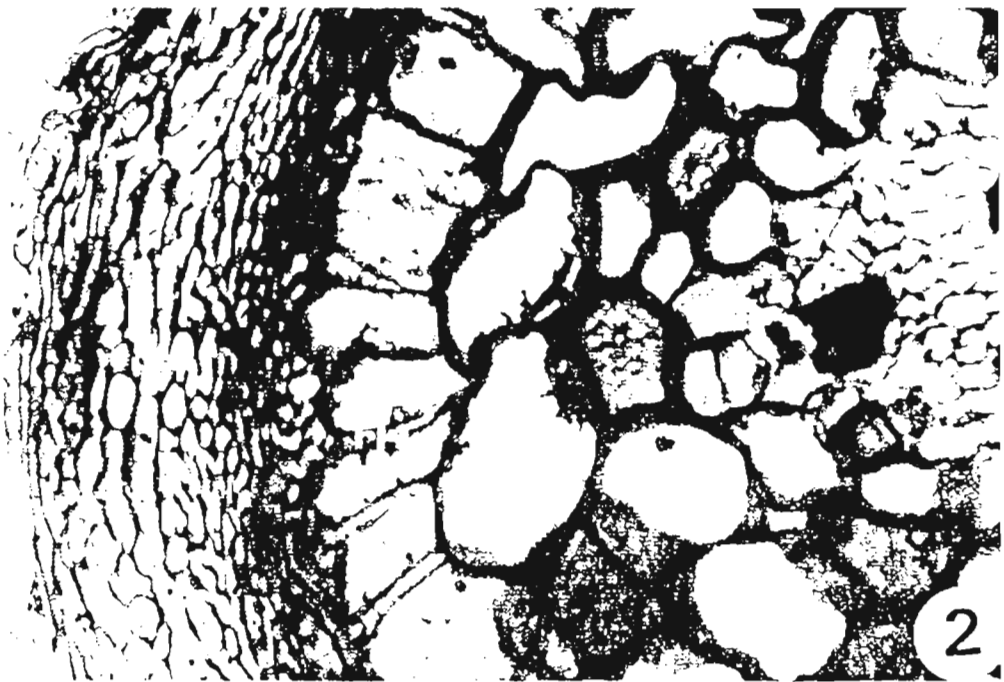
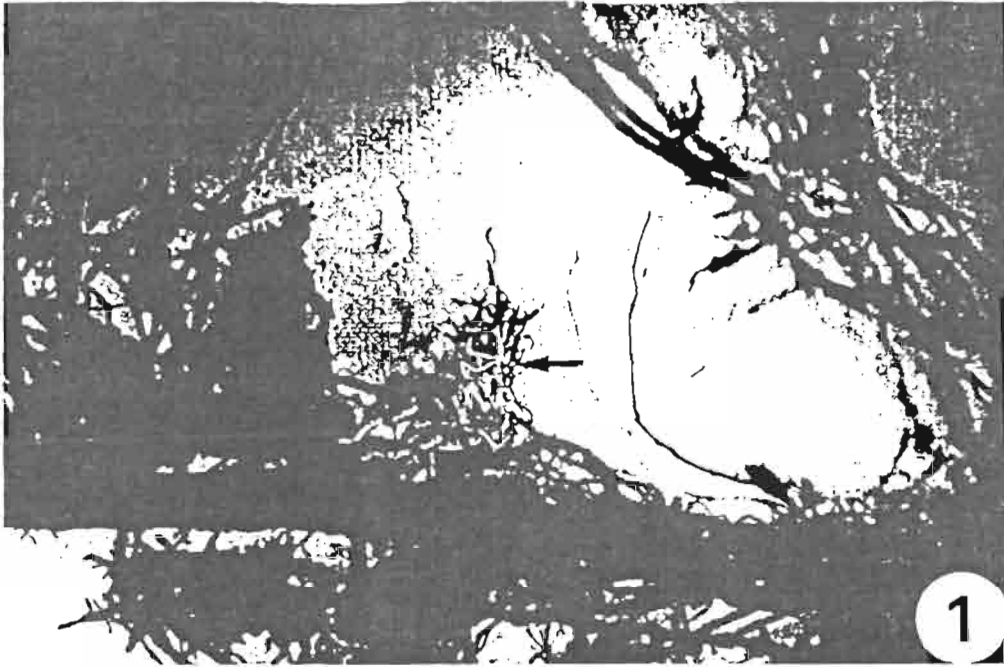


Planche 28

Figure 1 : Mycorhizes du type "brun lisse".

Figure 2 : Section transversale d'une mycorhize avec un manteau épais et un réseau de Harzig.
Gr.x 294.

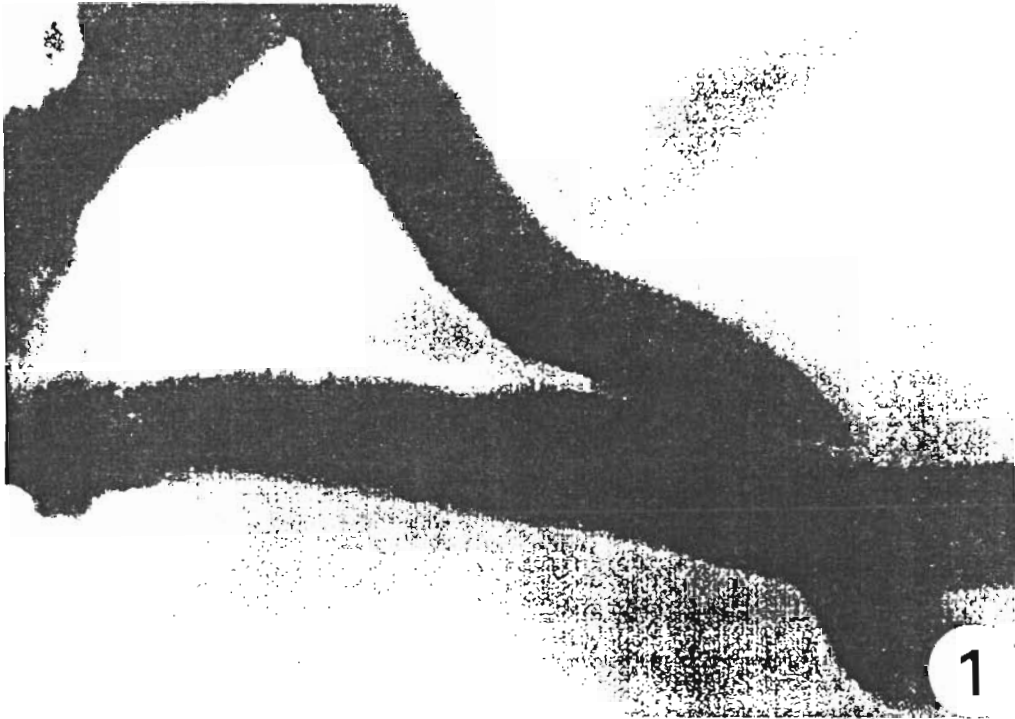


Planche 29

Figure 1 : Section transversale d'une mycorhize avec un manteau et un réseau de Hartig.
Gr.x 406.

Figure 2 : Mycorhizes du type "brun cotonneux".

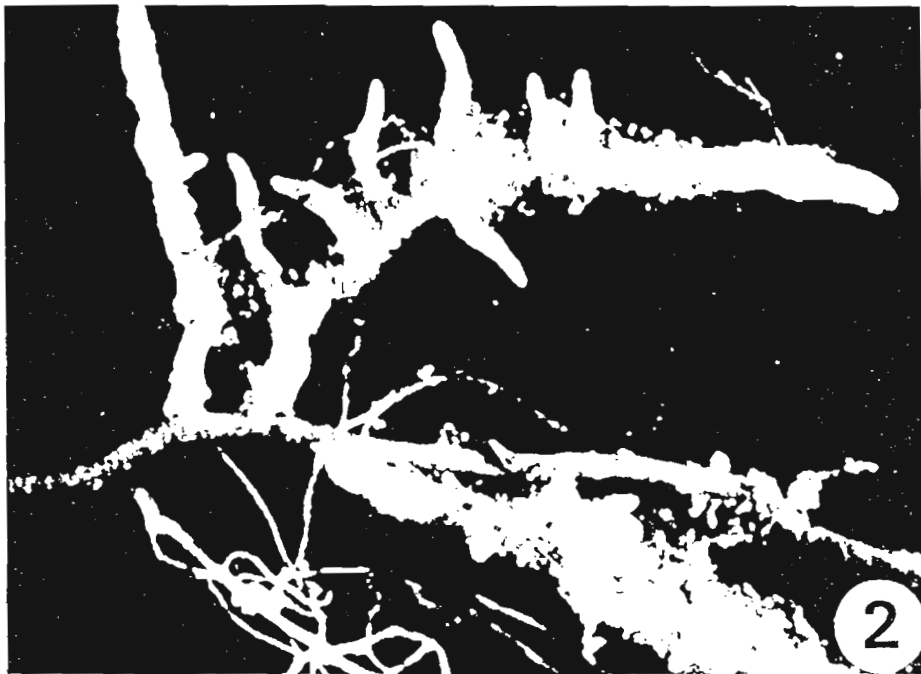
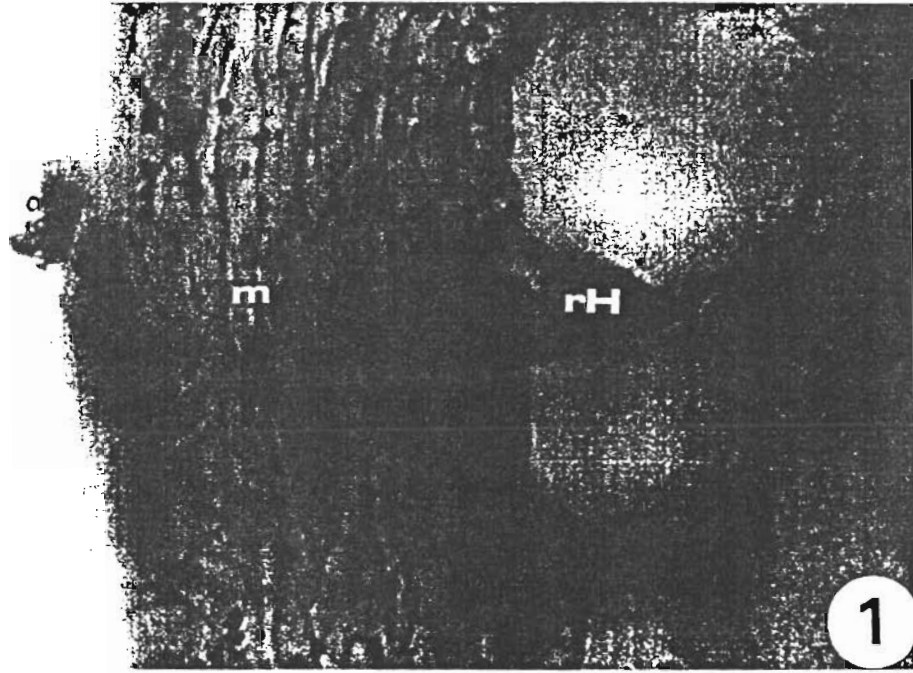


Planche 30

Ultrastructure d'une propagule sous forme de mycorhize non identifiée

Acétate d'uranyle - citrate de plomb.

Figure 1 : Vue partielle d'une mycorhize non identifiée (microscopie photonique et coloration avec le bleu de toluidine 1% dans du Na_2CO_3 à 2,5% pH 11,6). Elle présente une structure (manteau et réseau de Hartig) bien distincte. Gr.x 370

Figure 2 : Les hyphes du manteau et du réseau de Hartig présentent un contenu cellulaire sénescents avec des parois et des cloisons cellulaires qui ont conservées leur intégrité. Gr.x 3085

Figures 3 et 4 : Dans une des cellules du manteau interne une mitochondrie est présente (fig.3) Gr.x 7973. Il est également important de souligner l'absence de bactéries dans les hyphes sénescents (fig.4) Gr.x 15016.

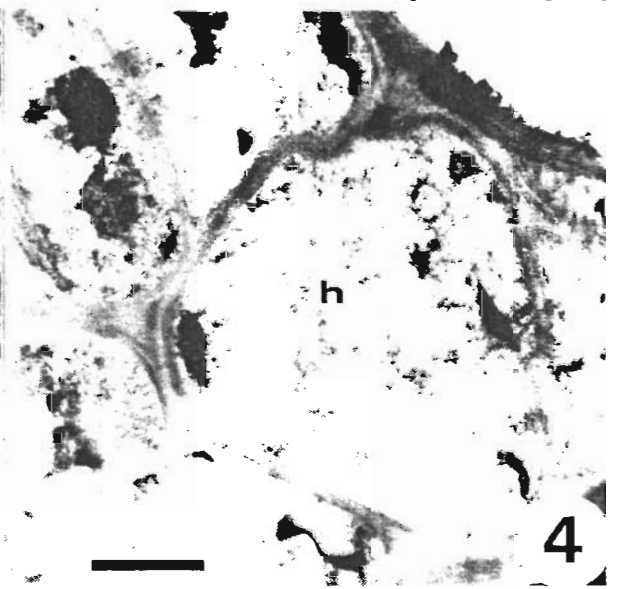
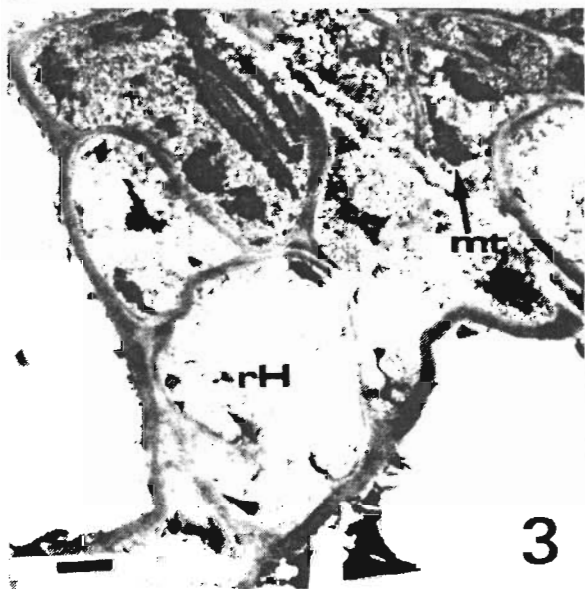
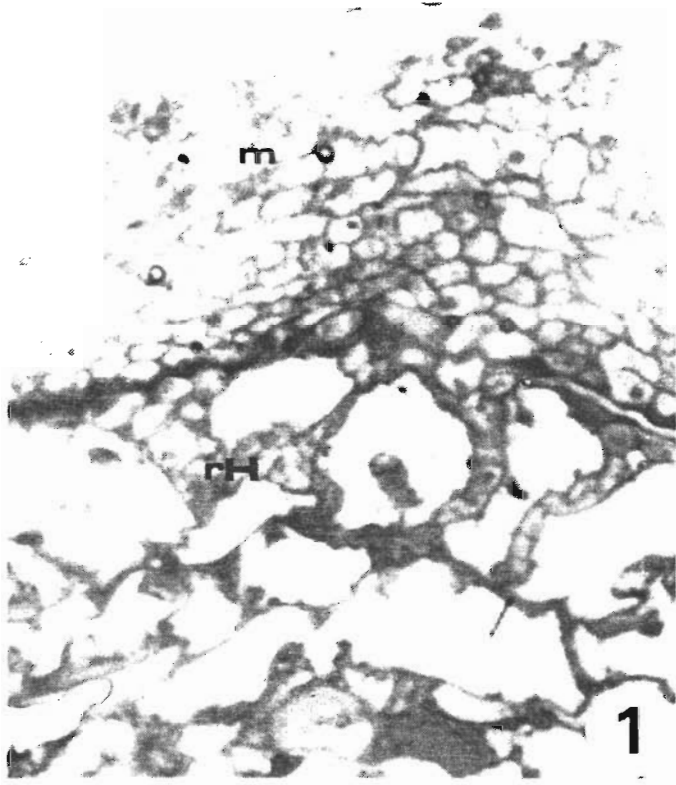


Planche 31

Les différentes propagules mycorrhizogènes dans le sol de la forêt des Bayottes.

Montage dans de l'eau distillée

Figures 1 et 2 : Vue partielle d'un sclérote présumé appartenir à la souche XM002. Des spinules caractéristiques sont présentes à la surface du sclérote (fig.1). Gr.x 242 Des hyphes à boucles (Basidiomycètes) provenant du sclérote ont été également observées (fig.2) Gr.x 237.

Figures 3 et 4 : Vue partielle d'une mycorhize présumée appartenir à la souche XM002. Des hyphes émergent de la racine après 7 jours de contact avec le système racinaire d'*Afzelia africana* (fig.3) Gr.x 275. Ces hyphes présentent également des boucles (fig.4) Gr.x 611.

Figure 5 : Vue d'ensemble d'un cordon mycélien présumé appartenir à la souche XM002. Les hyphes émergent du cordon après 7 jours de contact avec le système racinaire d'*Afzelia africana*. Gr.x 125.

Figure 6 : Spores de *Scleroderma verrucosum* Pers. Gr.x 1083.

Figure 7 : Spores de *Scleroderma dictyosporum* Pat. Gr.x 989.

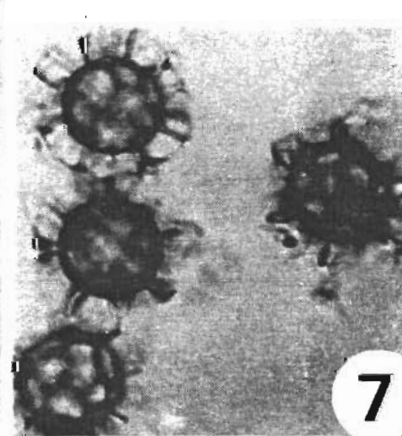
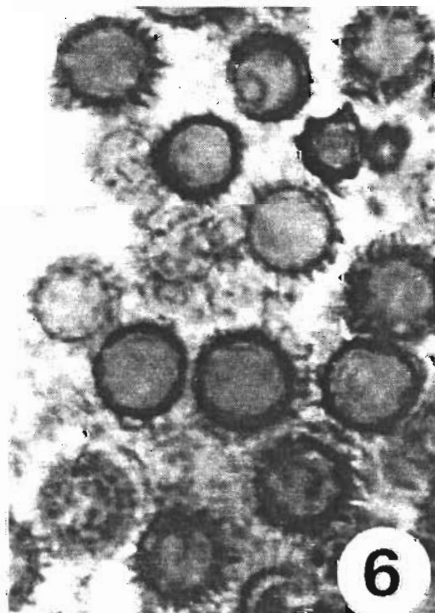
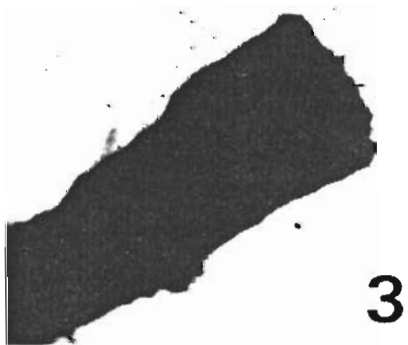
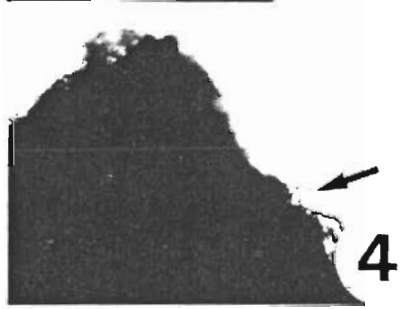


Planche 32

Ultrastructure d'une propagule sous forme de sclérotés présumé appartenir à
Scleroderma verrucosum

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Vue partielle d'un sclérote (microscopie photonique et coloration avec le bleu de toluidine 1% dans du Na₂CO₃ 2,5% pH 11,6). Le sclérote présente un cortex et une médula. La médula montre une structure pseudoparenchymateuse. Gr.x 253.

Figure 2 : Les hyphes externes du cortex sont vides de tout contenu cellulaire. Les hyphes du cortex les plus internes présentent un volume cytoplasmique important. Gr.x 6900.

Figures 3 et 4 : Les hyphes de la médula présentent en général de grandes vacuoles (fig.3) (Gr.x 6900) qui renferment quelques granules de polyphosphate et très peu de cytoplasme (fig.4) Gr.x 7885.

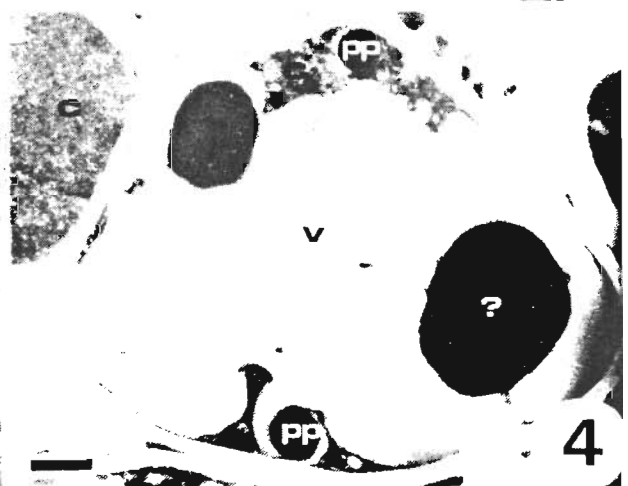
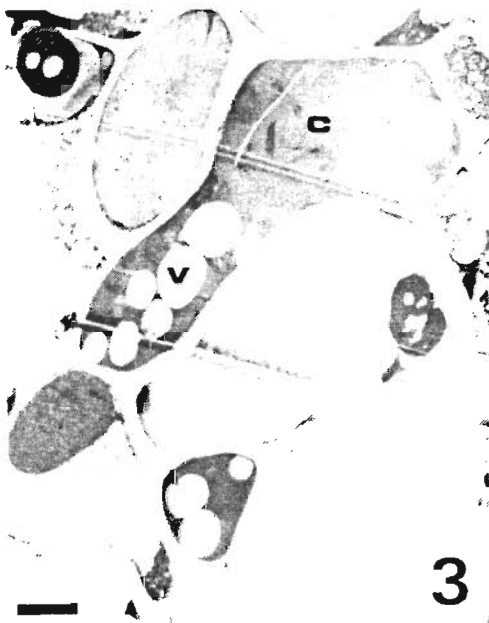
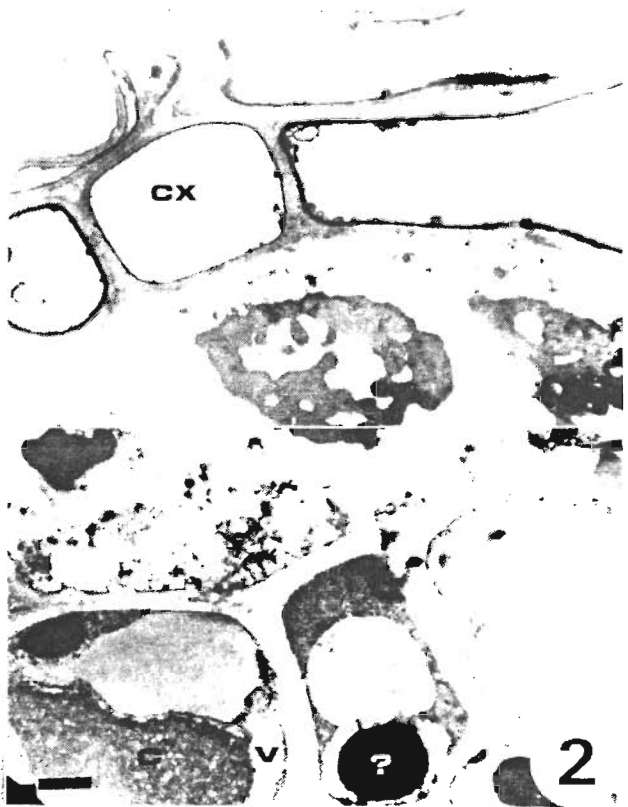
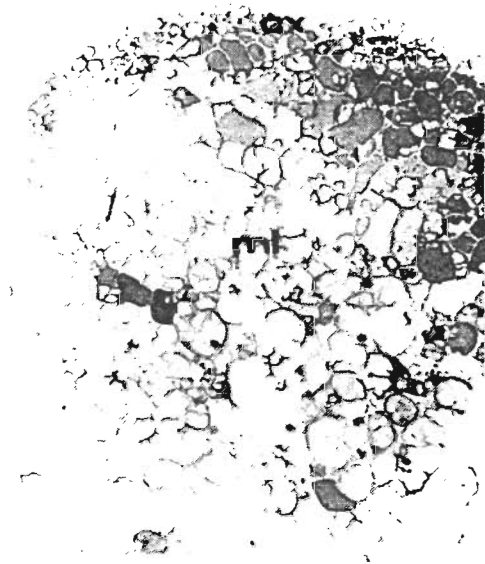


Planche 33

Ultrastructure d'une propagule sous forme de mycorhize présumée appartenir à la souche XM002.

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Vue partielle d'une mycorhize en section transversale (microscopie photonique et coloration avec le bleu de toluidine 1% dans du Na₂CO₃ 2,5% pH 11,6). La mycorhize présente encore une structure distincte (manteau et réseau de Hartig). Le manteau montre dans sa partie interne des hyphes vivantes. Gr.x 236.

Figures 2 et 3 : Les hyphes du manteau externe sont vides de tout contenu cellulaire (fig.2) Gr.x 2828. Quelques hyphes du manteau interne présentent au contraire un contenu cellulaire bien différencié (mitochondries, granules de polyphosphate dans la vacuole) (fig.3) Gr.x 6494.

Figure 4 : Les hyphes à la surface du manteau sont vides de tout contenu cellulaire. Gr.x 7360.

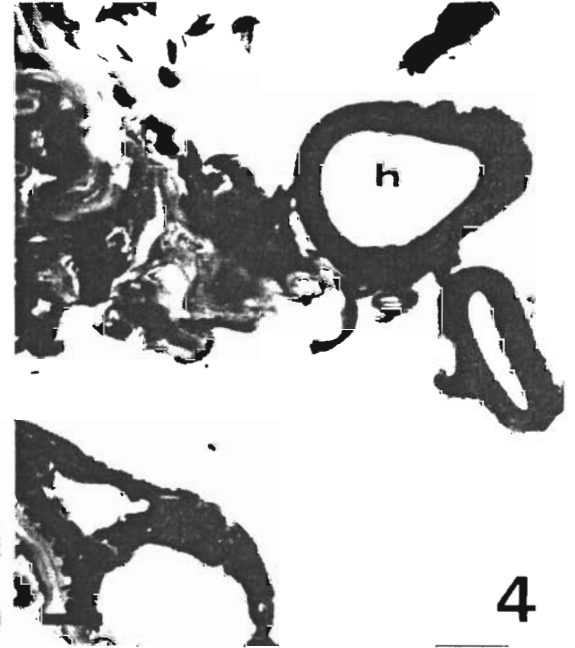
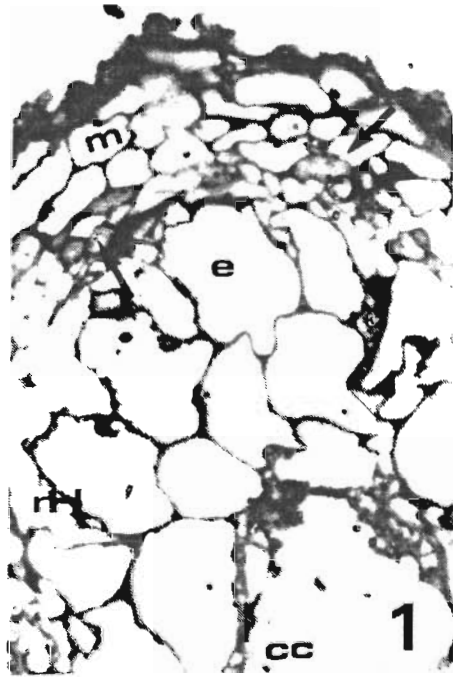


Planche 34

Ultrastructure d'une propagule sous forme de cordon mycélien présumé appartenir à la souche XM002.

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Vue d'ensemble d'un cordon mycélien en section transversale. Les hyphes les plus externes sont arrondies ou aplaties et vides de tout contenu cellulaire. Les hyphes les plus internes présentent au contraire un cytoplasme bien différencié. Gr.x 2902

Figures 2 et 3 : Détails d'un cordon mycélien. Des hyphes jeunes présentent très peu de vacuole. La paroi hyphale présente plusieurs couches (fig.2) Gr.x 14074. Des bactéries sont également présentes entre les hyphes (fig.3) Gr.x 14000.

Figure 4 : Les hyphes externes ne présentent pas de contenu cellulaire. Gr.x 14777.

Figure 5 : Les vacuoles renferment quelque fois des granules de polyphosphate. Gr.x 7053

Figure 6 : La présence d'une cloison à dolipore est caractéristique des Basidiomycètes. Gr.x 15437

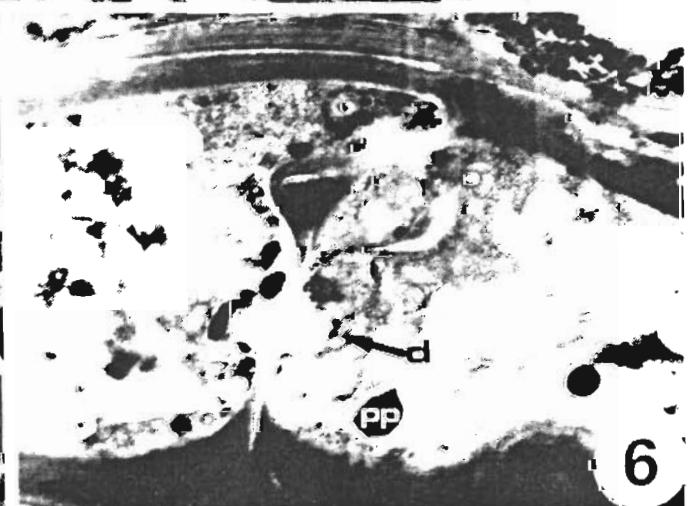
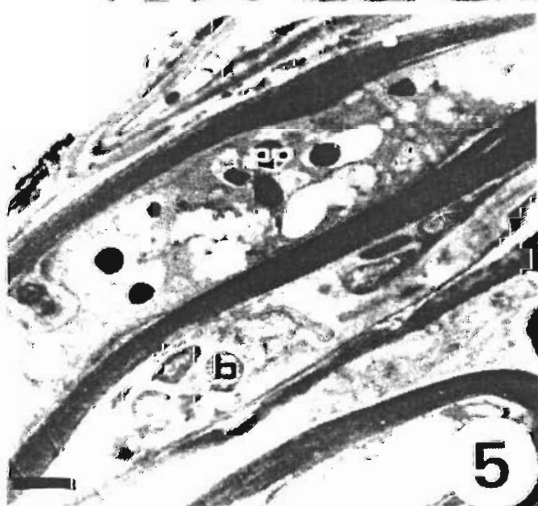
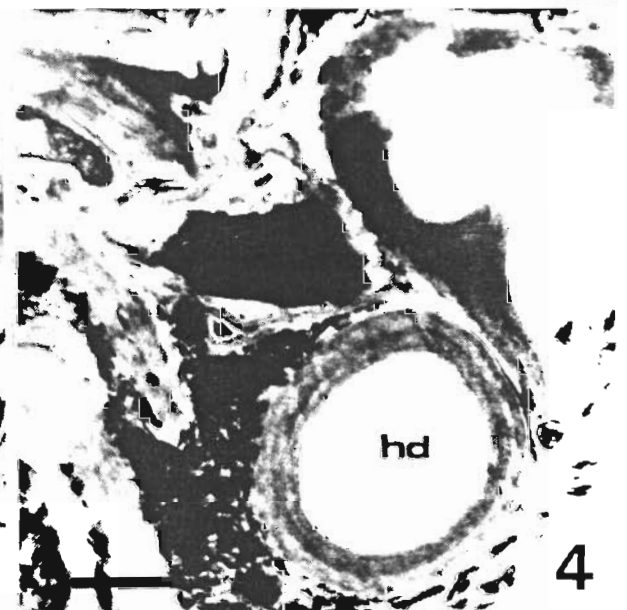
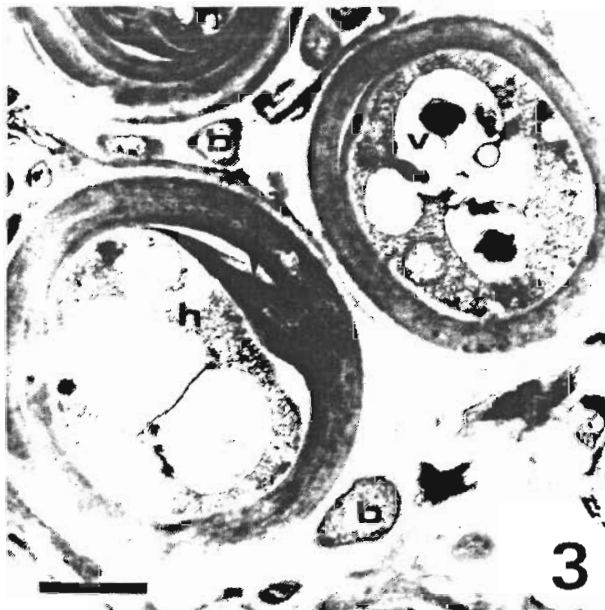
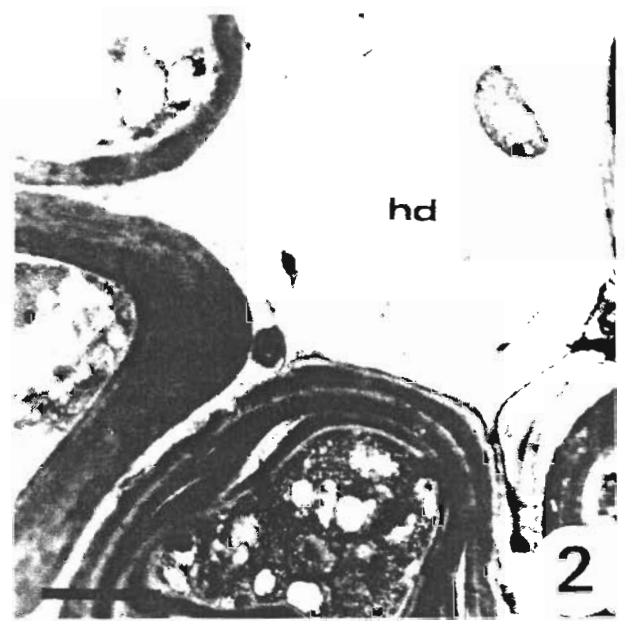
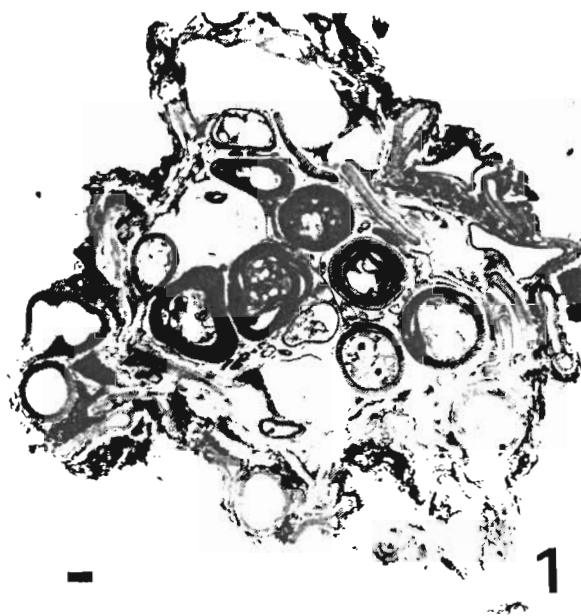


Planche 35

Ultrastructure d'une propagule sous forme de sclérote présumé appartenir à la souche XM002.

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Vue d'ensemble d'un sclérote (microscopie photonique et coloration avec le bleu de toluidine 1% dans du Na_2CO_3 2,5% pH 11,6). Le sclérote présente un cortex et une médula. La médula présente une structure pseudoparenchymateuse. Gr.x 83.

Figures 2 et 3 : Le cortex présente une paroi épaisse et porte des spinules(fig.2) Gr.x 2700. Les hyphes de la médula montre un contenu cellulaire bien différencié (vacuoles et mitochondries) (fig.3) Gr.x 15833.

Figure 4 : Les hyphes de la médula présentent une paroi à plusieurs couches. Gr.x 2945.

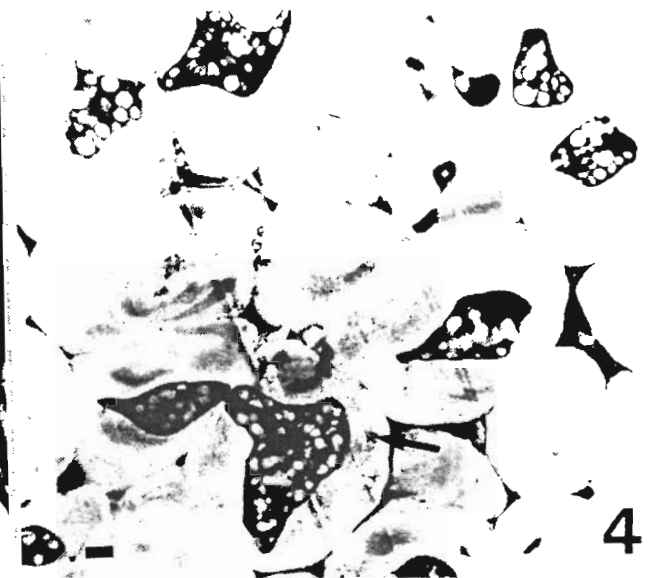
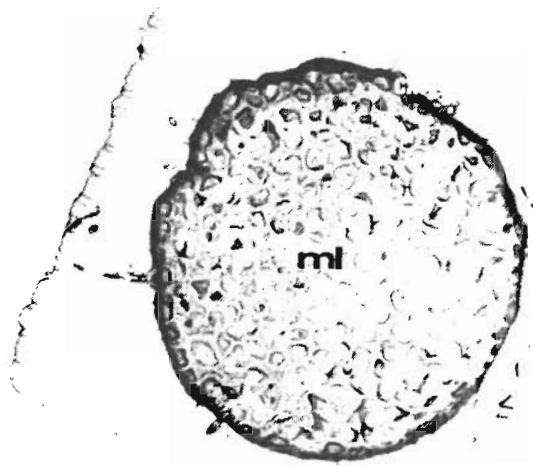


Planche 36

Figure 1 : Jeune plant d'*Azalia* au moment de l'apparition de l'épicotyle.

Figure 2 : Ablation partielle des cotylédons.

Figure 3 : Ablation totale des cotylédons.

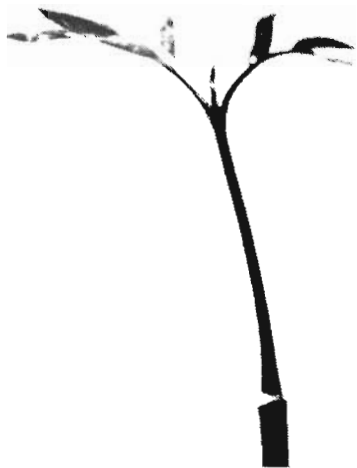
Figure 4 : Effet des cotylédons sur la croissance d'*Azalia* 4 jours après ablation partielle ou totale.



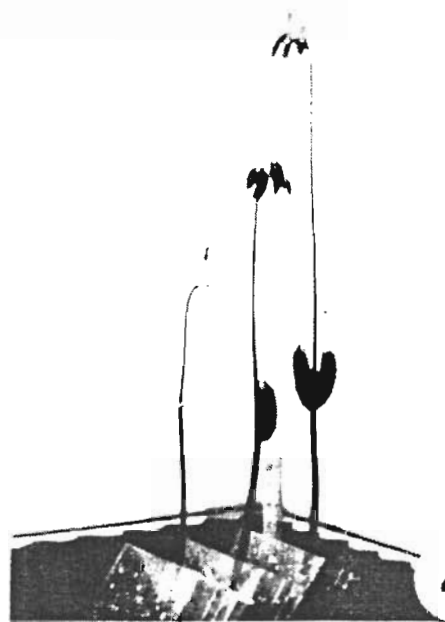
1



2



3



4

Planche 37

Influence de l'ablation partielle ou totale des cotylédons sur la mycorhization d'*Afzelia africana* après 4 jours de contact avec *Scleroderma dictyosporum*.

Coloration au bleu de toluidine 1% dans du Na₂CO₃ à 2,5% pH 11,6

Figure 1 : Section transversale d'une mycorhize obtenue sans ablation des cotylédons. Elle présente un manteau fongique et un réseau de Hartig. Gr.x 262.

Figure 2 : Section transversale d'une pseudomycorhize obtenue après ablation partielle des cotylédons. Elle présente un manteau fongique compacte sans réseau de Hartig. Gr.x 253.

Figure 3 : Section transversale dans la zone méristématique d'une pseudomycorhize obtenue après ablation totale des cotylédons. Elle présente également un manteau fongique compacte sans réseau de Hartig. Des condensations de tanins sont observées. Gr.x 250.

Figure 4 : Section transversale dans la zone subméristématique d'une pseudomycorhize obtenue après ablation totale des cotylédons. Elle présente un manteau fongique compacte sans réseau de Hartig. La coloration avec le bleu de toluidine est plus intense du côté où la paroi de la cellule hôte est en contact avec le champignon. Des pénétrations intracellulaires sont également observées. Gr.x 590.

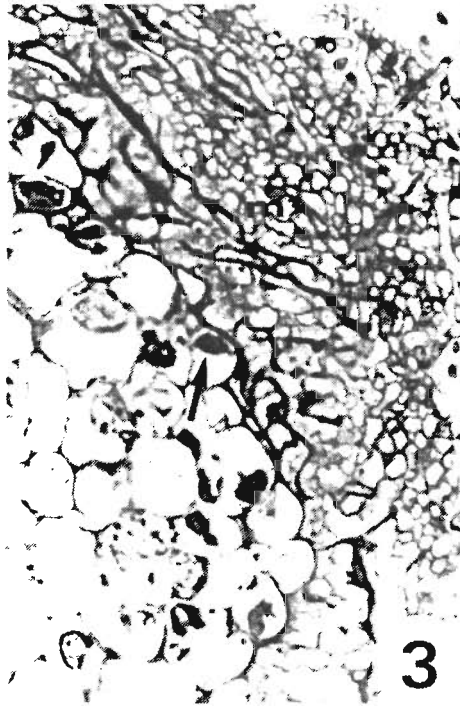


Planche 38

Influence de l'ablation partielle ou totale des cotylédons sur la mycorhization d'*Afzelia africana* après 4 jours de contact avec la souche non identifiée XM004.

Coloration avec le bleu de toluidine 1% dans du Na₂CO₃ à 2,5% pH 11,6

Figure 1 : Section transversale d'une mycorhize obtenue en situation normale. Elle présente un manteau fongique et un réseau de Hartig. Gr.x 263.

Figure 2 : Section transversale d'une pseudomycorhize obtenue après ablation partielle des cotylédons. Elle présente un manteau fongique compacte sans réseau de Hartig. Gr.x 250.

Figures 3 et 4 : Section transversale dans la zone sous-apicale d'une pseudomycorhize obtenue après ablation totale des cotylédons. Elle présente également un manteau fongique compacte sans réseau de Hartig (fig.3) Gr.x 300. Une coloration plus intense avec le bleu de toluidine du côté où la paroi de la cellule hôte est en contact avec le champignon. Des pénétrations intracellulaires sont observées.(fig.4) Gr.x 1050.

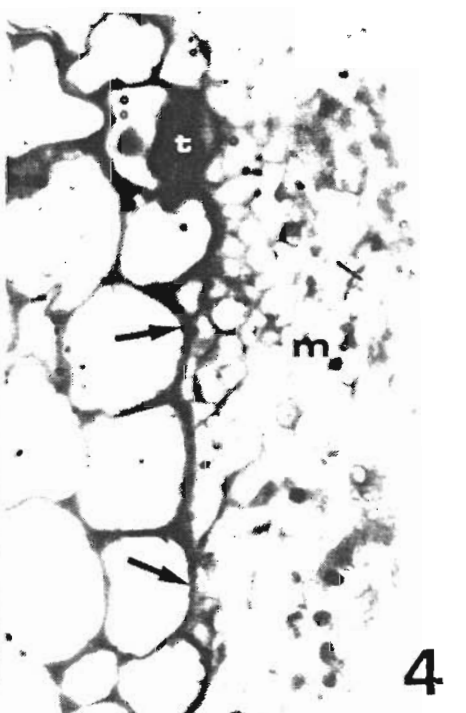
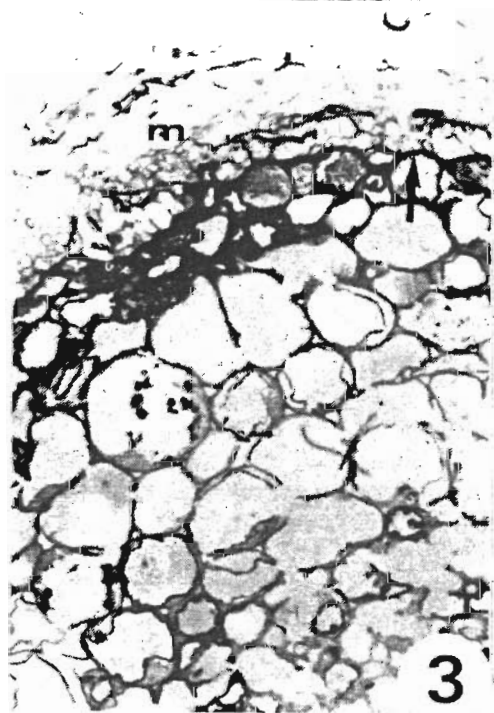
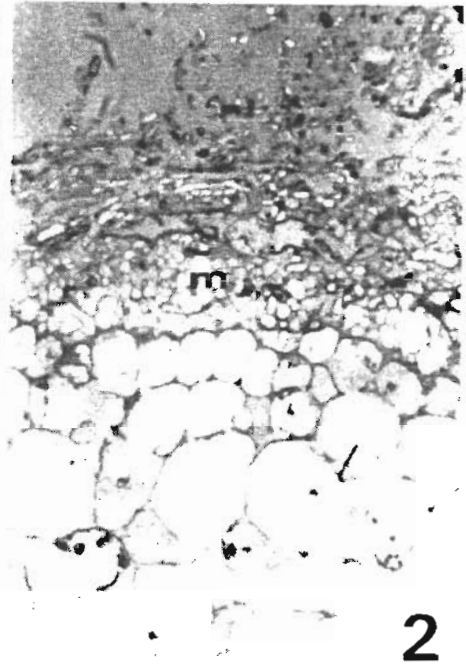
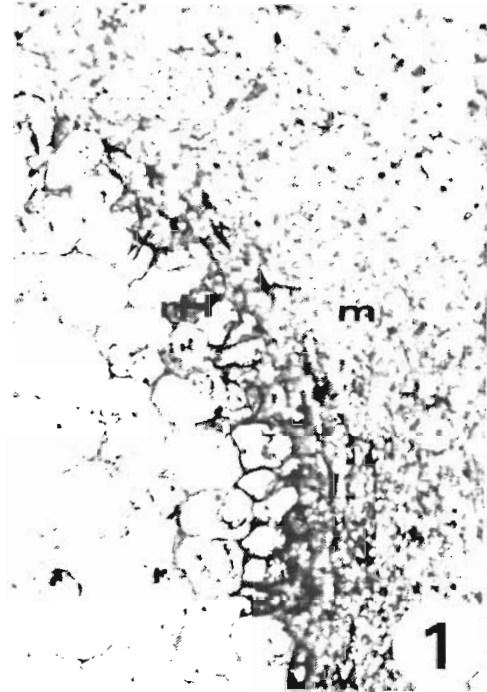


Planche 39

Ultrastructure de l'interface *Afzelia* - *S.dictyosporum* dans la zone apicale ou sous-apicale 4 jours après ablation partielle ou totale des cotylédons.

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Mise en place du réseau de Hartig chez un plant n'ayant pas subi l'ablation des cotylédons. Des digitations pariétales sont observées. Gr.x 15200.

Figures 2 et 3 : Le processus d'infection est interrompue dans la zone sous-apicale après ablation partielle des cotylédons (fig 2) Gr.x 2850. Des digitations pariétales sont également présentes à l'interface (fig.3) Gr.x 17642.

Figures 4, 5 et 6 : Dans la zone apicale des hyphes ont envahi des cellules mortes de la coiffe (fig.4) (Gr.x 3176) et des condensations de tanins sont observées dans le cytoplasme et contre la paroi des cellules de l'apex (figs.5) Gr.x 7053 et (fig.6) Gr.x 22166.

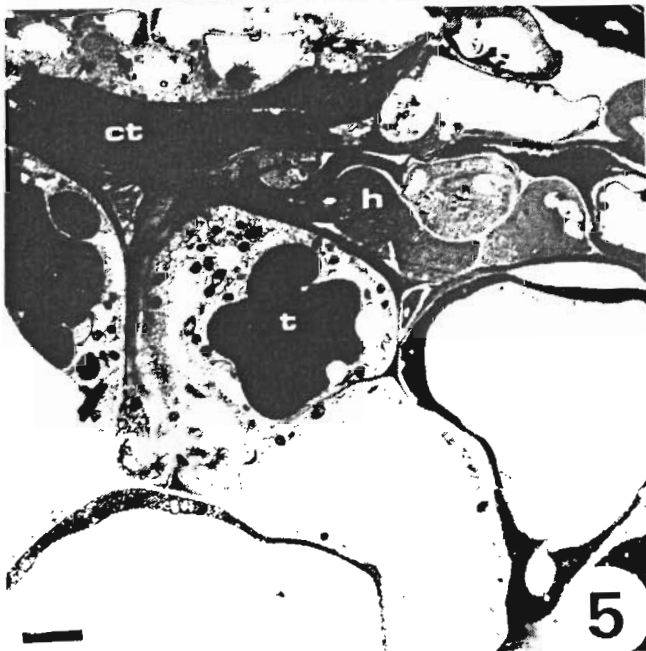
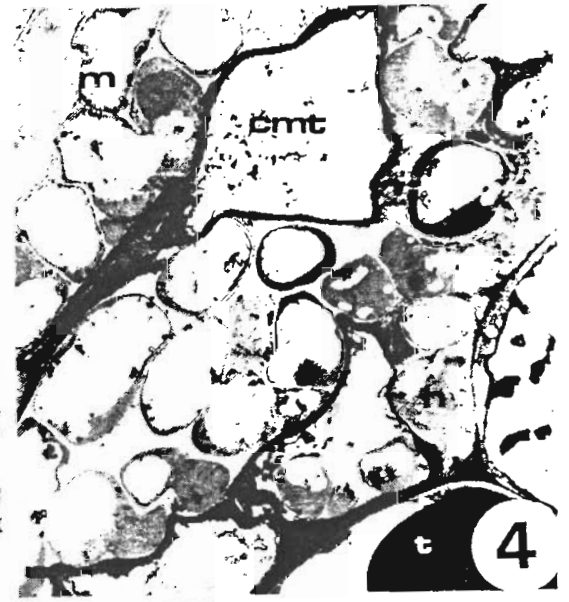
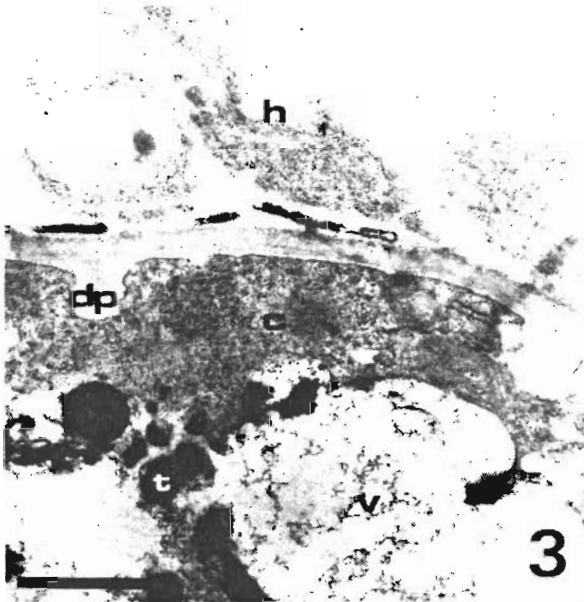
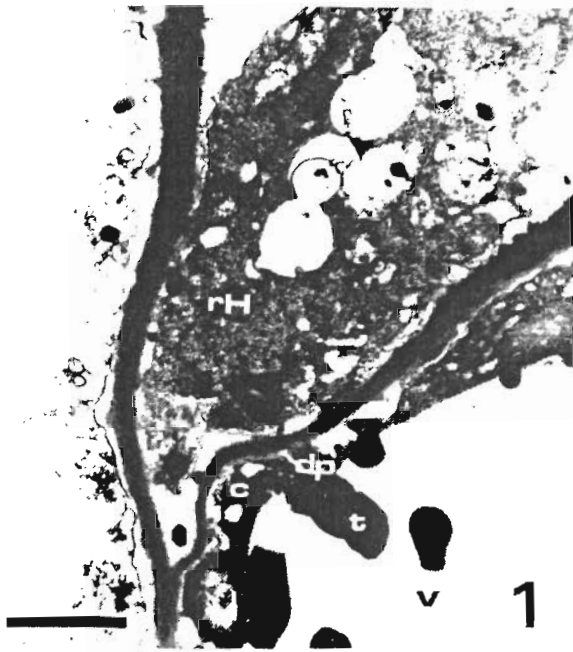


Planche 40

Ultrastructure de l'interface *Afzelia-S.dictyosporum* dans la zone sous-apicale
4 jours après ablation totale des cotylédons.

Figures 1 et 2 : Détails d'une interface plante-champignon. La face interne de la paroi de la cellule hôte en contact avec des hyphes présente du matériel peu contrasté (fig.1) Gr.x 14777. Les digitations pariétales présentent également le même aspect (fig.2) Gr.x 44800 (la barre représente 0,5 μ m). Acétate d'uranyle et citrate de plomb.

Figure 3 : Détails d'une interface plante-champignon. Le matériel peu contrasté et les digitations pariétales sont de nature polysaccharidique. Gr.x 14681. Test PATAg.

Figure 4 : Témoin non incubé avec le TCH 0,2% dans l'acide acétique à 20%. Aucun marquage n'est décelé. Gr.x 14615. Test PATAg.

Figures 5 et 6 : Détails d'une interface plante-champignon (fig.5) Gr.x 13818. Des fibrilles de nature polysaccharidique sont observées dans l'interface (fig.6) Gr.x.43400 (la barre représente 0,5 μ m). Test PATAg.

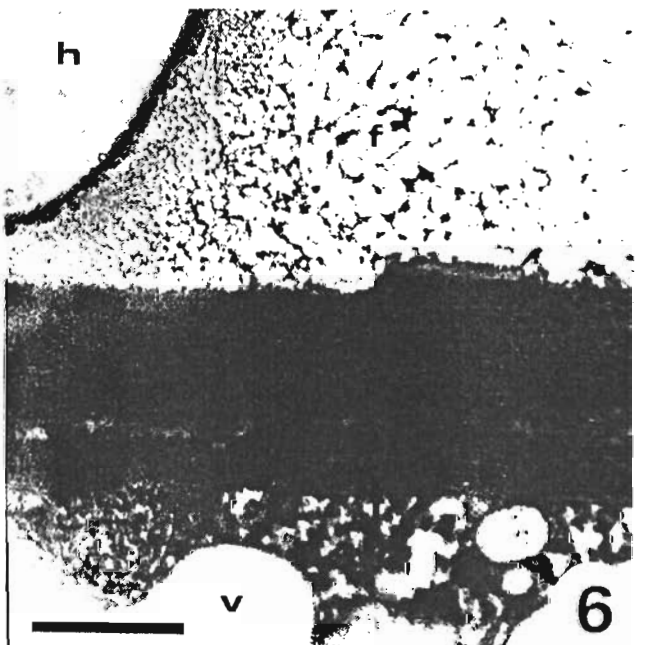
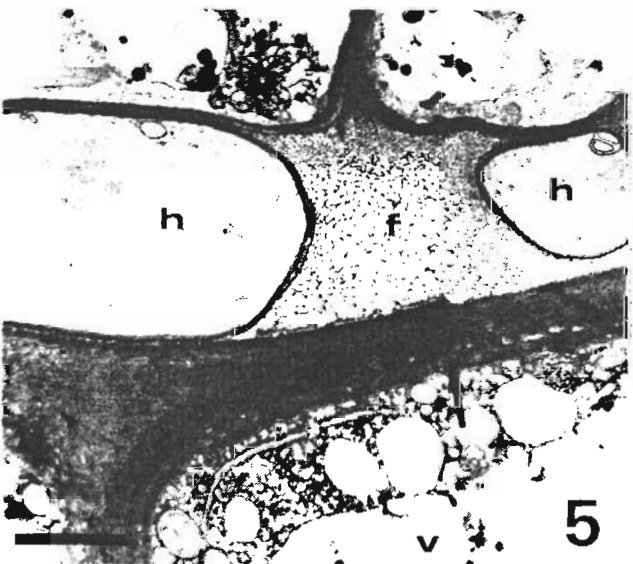
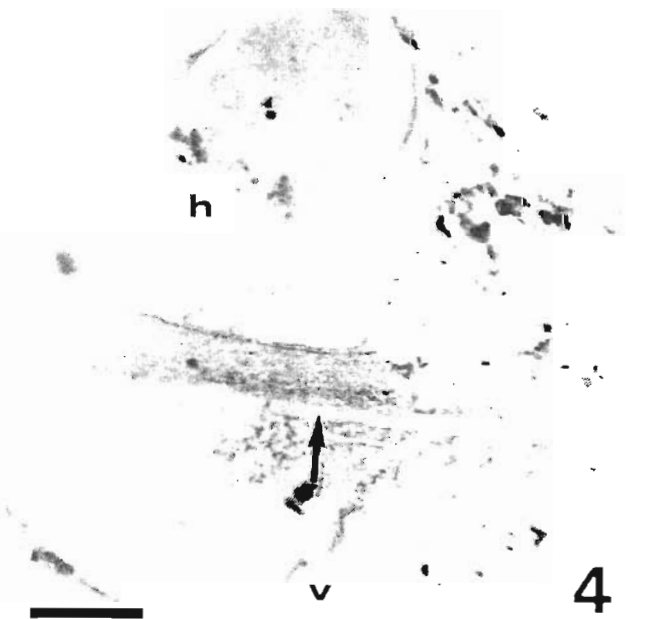
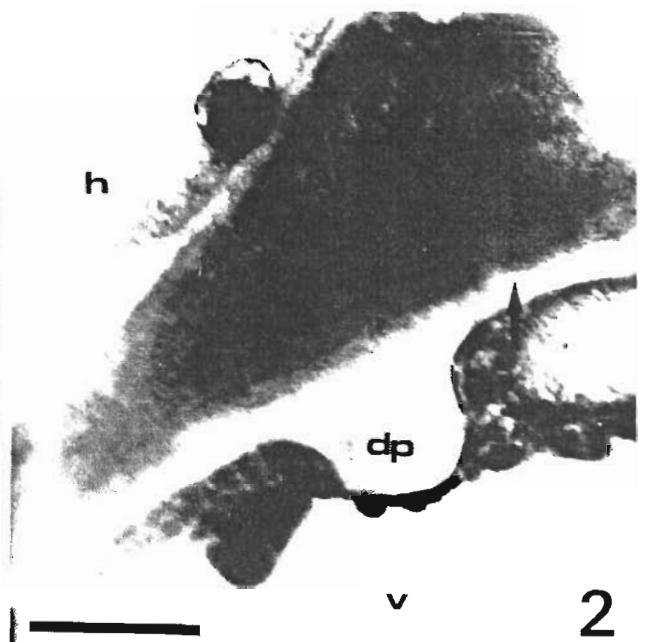
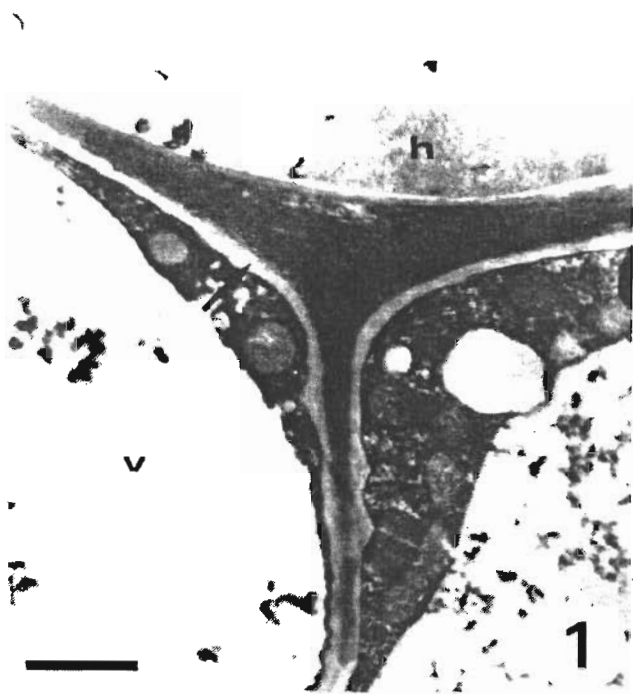


Planche 41

Ultrastructure de l'interface *Afzelia* - XM004 dans la zone sous-apicale 4 jours après ablation partielle ou totale des cotylédons.

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Mise en place du réseau de Hartig chez une racine courte des plants n'ayant pas subi l'ablation des cotylédons. Gr.x 7475.

Figures 2 et 3 : L'infection est interrompue après ablation partielle des cotylédons (fig.2) Gr.x 16285. Des digitations pariétales sont présentes à l'interface plante - champignon. La paroi de la cellule hôte ne présente pas de modifications (fig.3) Gr.x 46666 (la barre représente 0,5 μm).

Figures 4, 5 et 6 : L'infection est également interrompue après ablation totale des cotylédons (fig.4). Gr.x 2880. La paroi de la cellule hôte présente du matériel pariétal sur sa face interne (fig.5) Gr.x 19000 et (fig.6) Gr.x 15500.

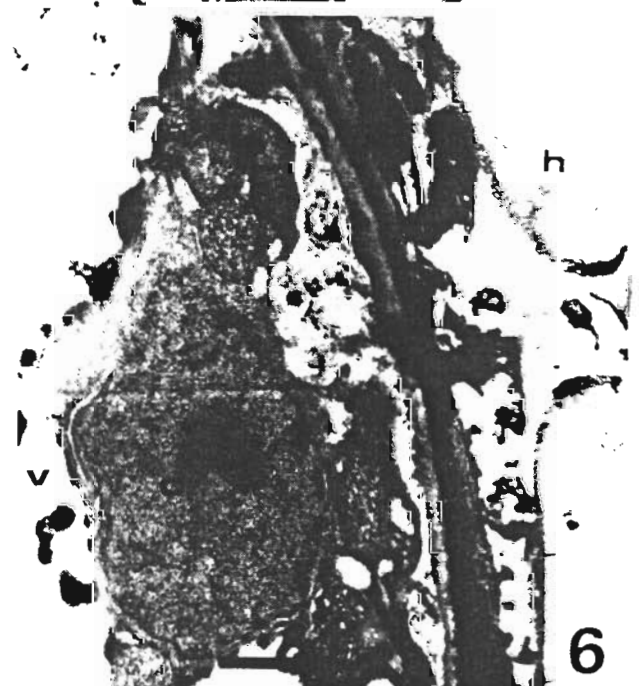
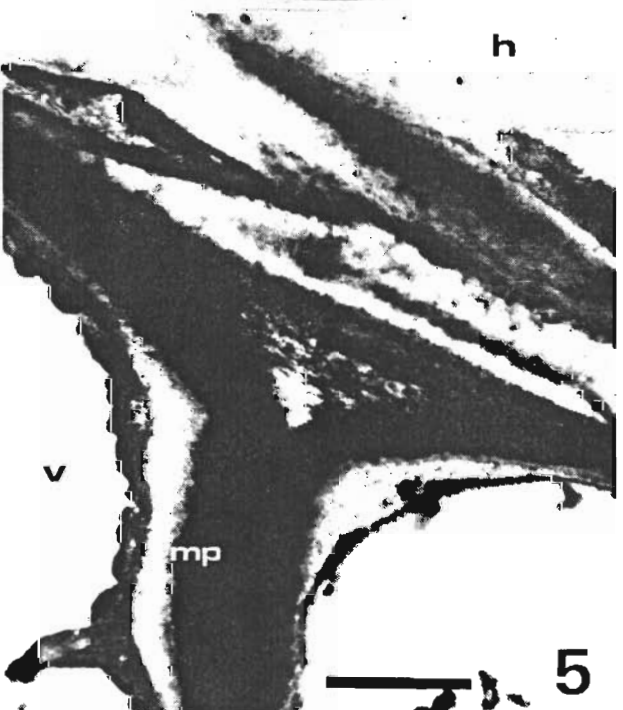
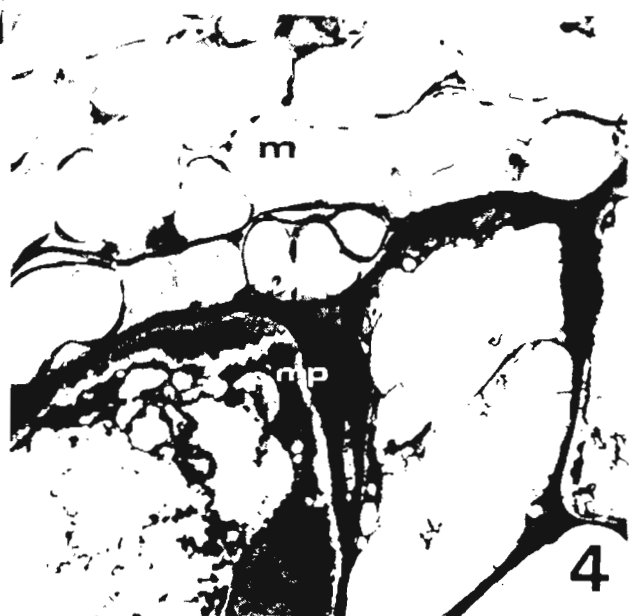
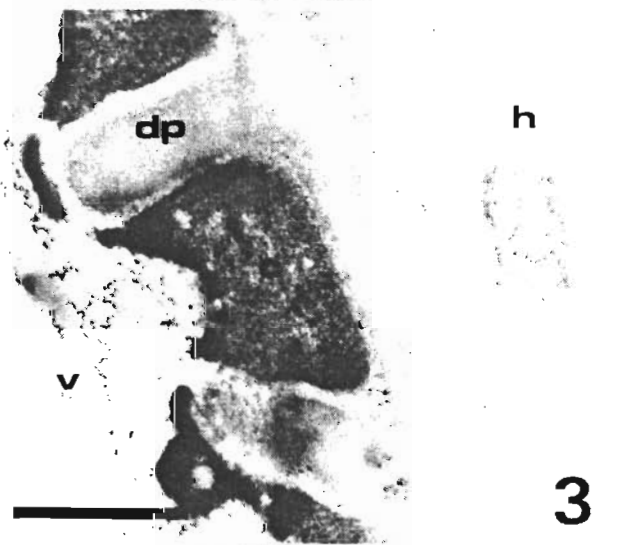
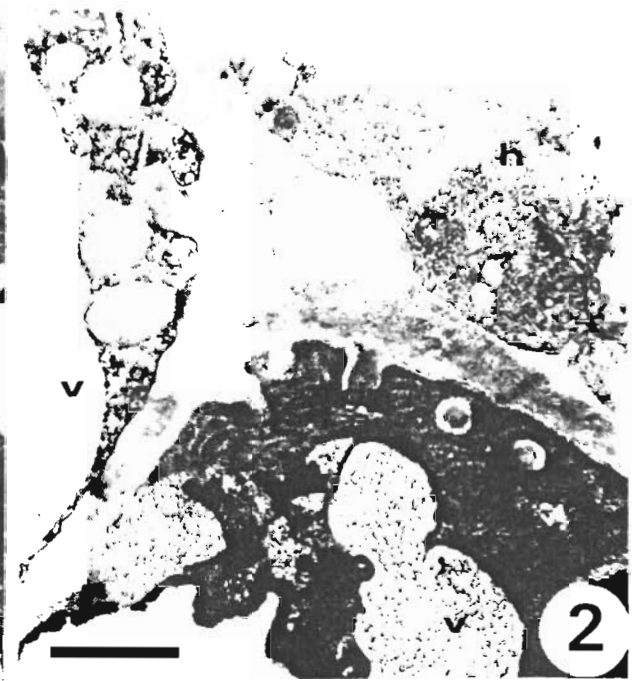
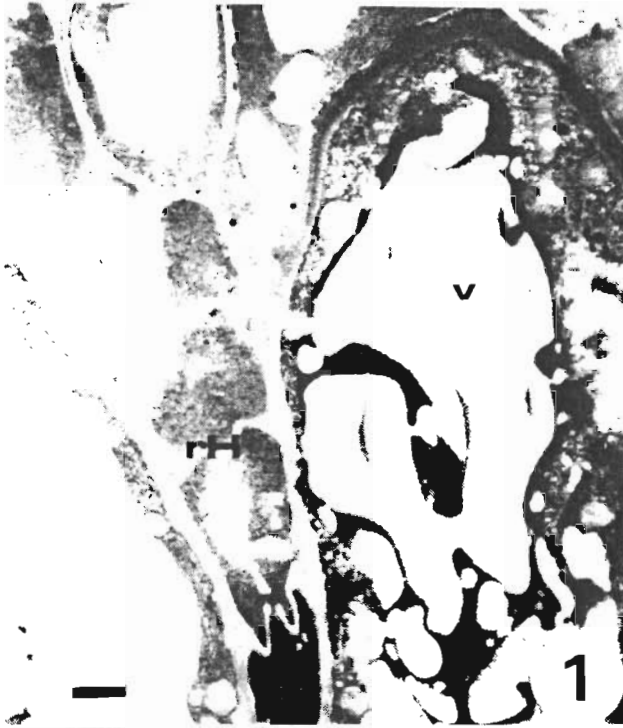


Planche 42

Structure des mycorhizes entre *Afzelia* - *S. verrucosum* 4 jours après ablation partielle ou totale des cotylédons.

Coloration avec le bleu de toluidine 1% dans du Na_2CO_3 2,5% pH 11,6

Figure 1 : Vue partielle d'un manteau fongique et du réseau de Hartig chez des plants n'ayant pas subi l'ablation des cotylédons. Gr.x 387.

Figure 2 : Pseudomycorhizes obtenues après ablation partielle des cotylédons. Gr.x 452.

Figures 3 et 4 : Pseudomycorhizes obtenues après ablation totale des cotylédons (fig.3) Gr.x 300 et (fig.4) Gr.x 463.

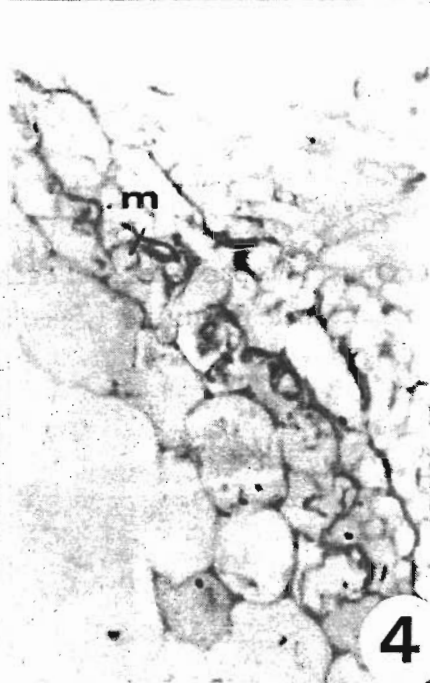
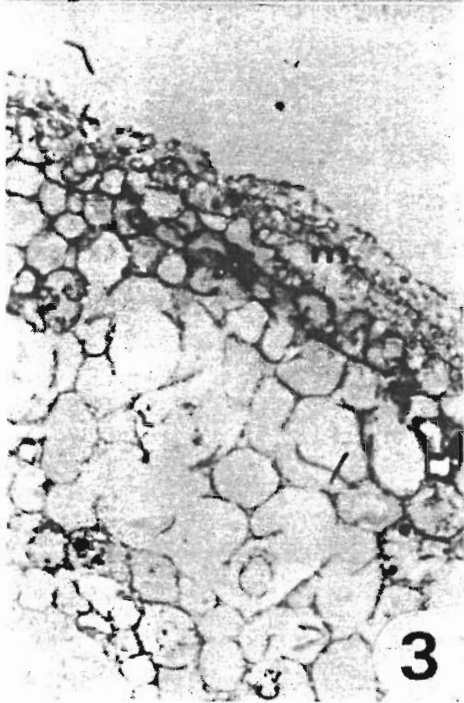
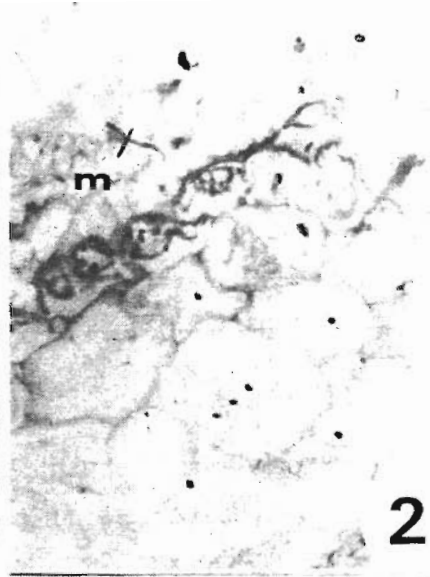
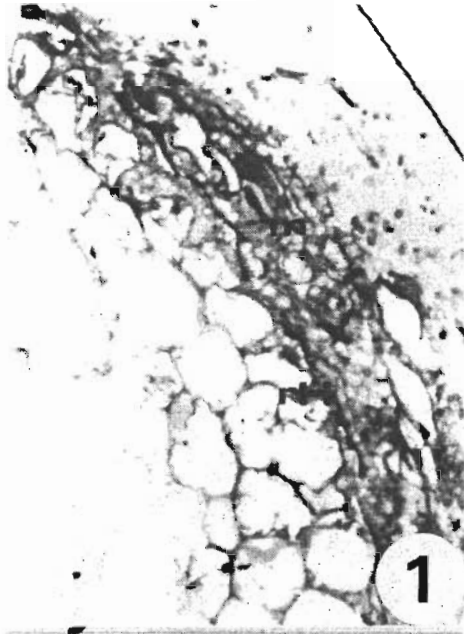


Planche 43

Ultrastructure de l'interface *Afzelia* - *S.verrucosum* dans la zone apicale ou subapicale 4 jours après ablation partielle ou totale des cotylédons.

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Mise en place du réseau de Hartig chez un plant n'ayant pas subi l'ablation des cotylédons. Gr.x 2700.

Figures 2 et 3.: Après ablation partielle des cotylédons, l'infection est interrompue. Des hyphes ont envahi des cellules mortes de la coiffe (fig.2) (Gr.x 3150) et l'interface avec les cellules de l'apex présente des digitations pariétales (fig.3) Gr.x 38400 (la barre représente 0,5 μm).

Figures 4, 5 et 6 : Après ablation totale des cotylédons, l'infection est également interrompue (fig.4) Gr.x 2520. La paroi de la cellule hôte ne présente pas de modification et des digitations pariétales sont également présentes (figs.5) Gr.x 38315 (la barre représente 0,5 μm) et (fig.6) Gr.x 6251.

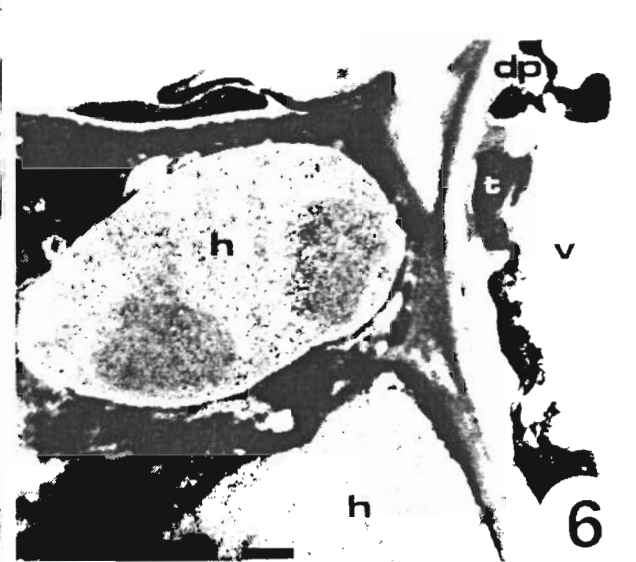
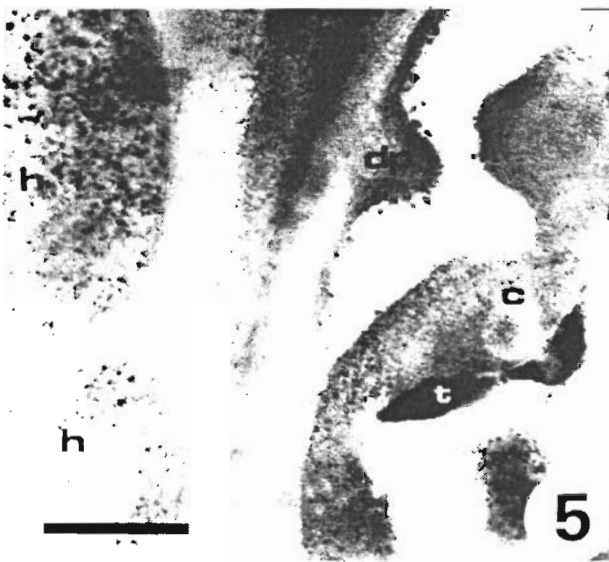
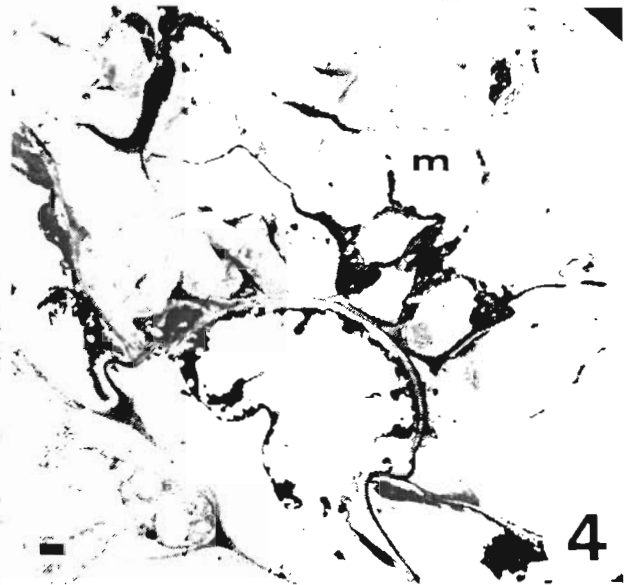
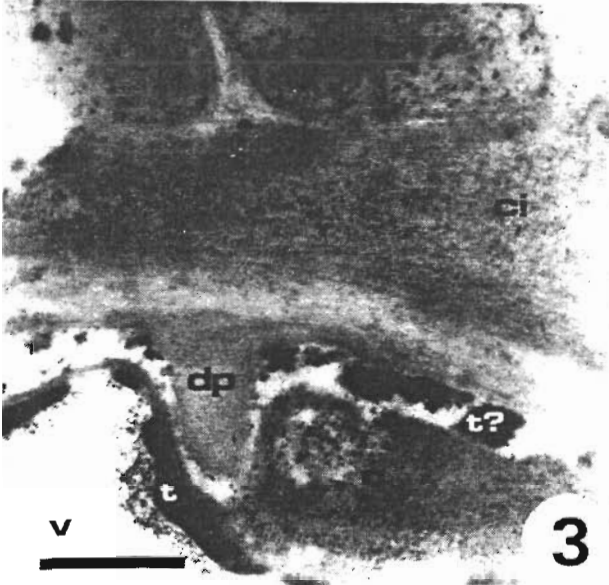
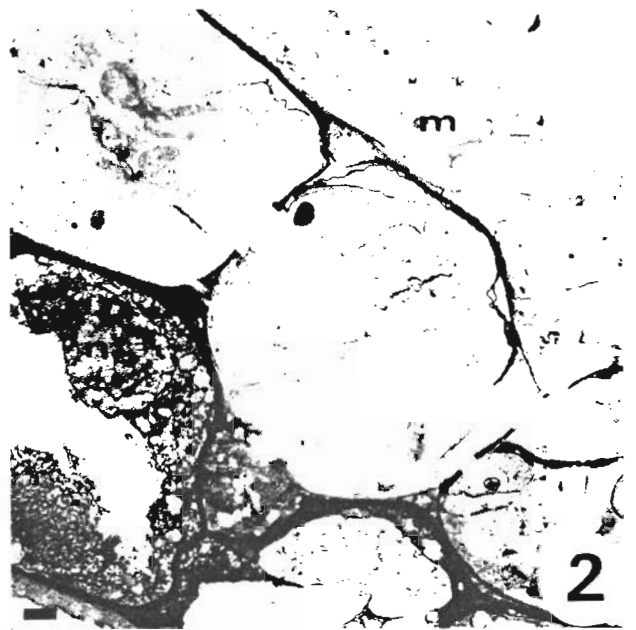
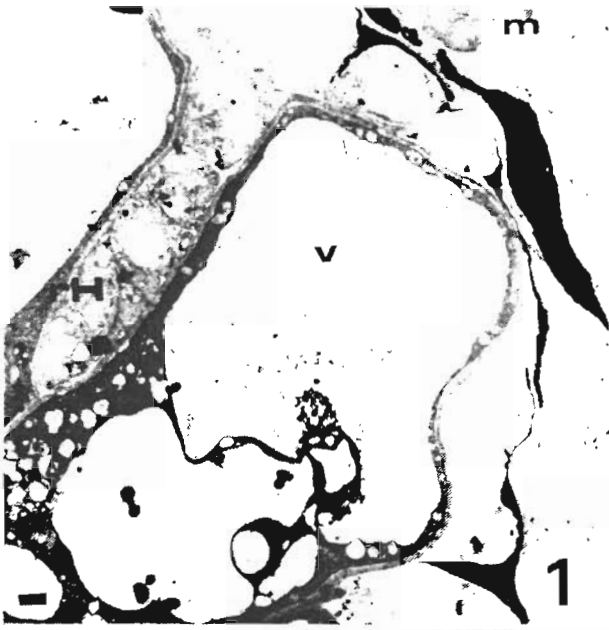


Planche 44

Structure des mycorhizes entre *A.africana* et XM002 4 jours après l'ablation partielle ou totale des cotylédons

Coloration avec le bleu de toluidine à 1% dans du Na₂CO₃ 2,5% pH 11,6

Figure 1 : Mise en place du réseau de Hartig chez les plants n'ayant pas subi l'ablation des cotylédons. Gr.x 379.

Figure 2 : En section tangentielle, le réseau de Hartig est également présent dans la zone sous-apicale après ablation partielle des cotylédons. Gr.x 220.

Figure 3 : Le réseau de Hartig est présent après ablation totale des cotylédons. Gr.x 428

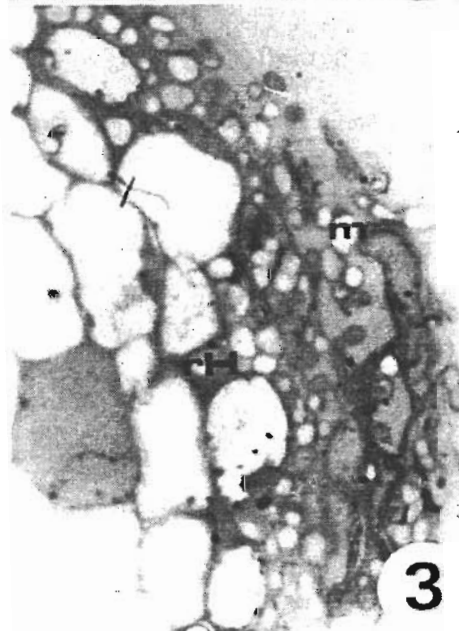
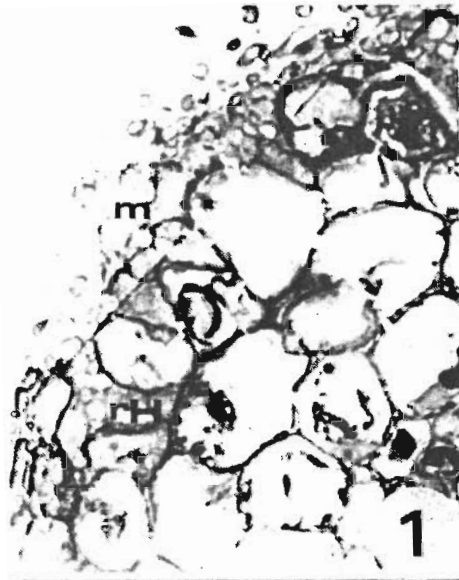


Planche 45

Ultrastructure de l'interface *Afzelia* - XM002 dans la zone subapicale 4 jours après ablation totale ou partielle des cotylédons

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figure 1 : Mise en place du réseau de Hartig chez un plant n'ayant pas subi l'ablation des cotylédon. Des digitations pariétales sont présentes Gr.x 3150.

Figure 2 : L'ablation partielle des cotylédons n'a pas d'influence sur la mise en place du réseau de Hartig. Gr.x 2557.

Figures 3 et 4 : Le réseau de Hartig est également présent après ablation totale des cotylédons (fig.3) Gr.x 2362. Des digitations pariétales sont également présentes (fig.4) Gr.x 5638

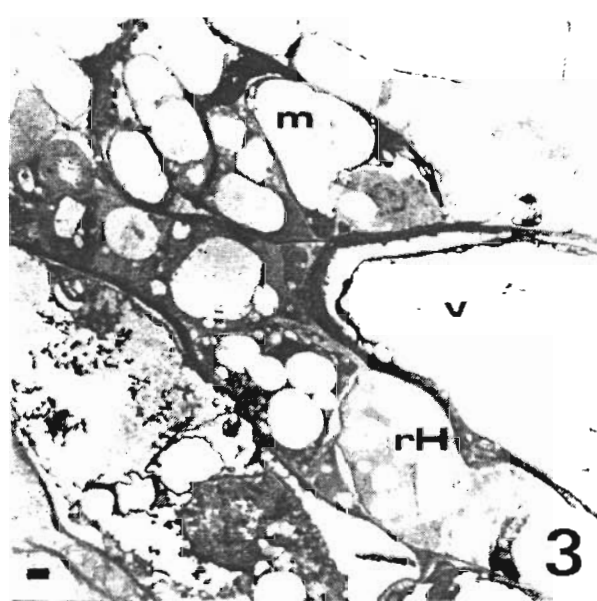
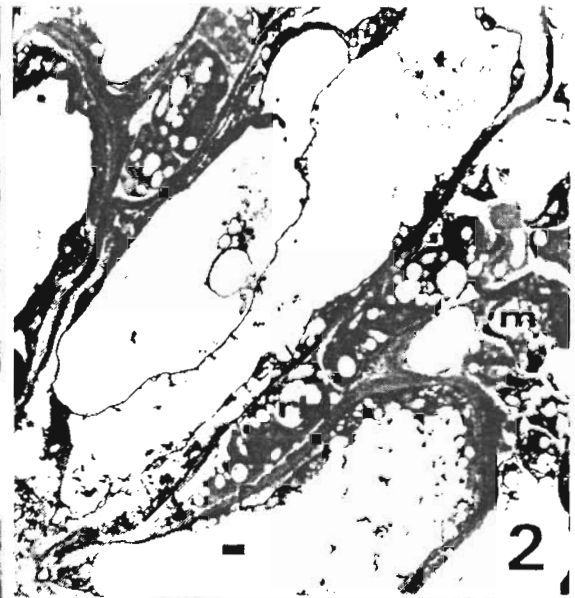
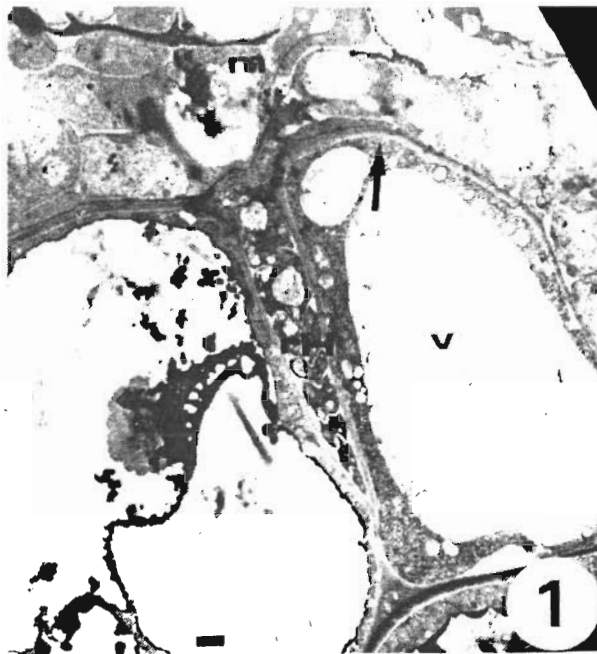


Planche 46

Structure des racines latérales d'ordre 2 (racines courtes) d'*A.africana* 4 jours après ablation partielle ou totale des cotylédons.

Coloration avec le bleu de toluidine à 1% dans du Na_2CO_3 2,5% à pH 11,6

Figure 1 : Section tangentielle d'une racine issue d'un plant n'ayant pas subi l'ablation des cotylédons. La racine présente une coiffe, un méristème et une zone sous-apicale. Des tanins sont observés à l'intérieur des cellules méristématiques. Des cellules à tanins (flèches) sont présentes à la surface des cellules du cortex. Gr.x 235.

Figure 2 : Section tangentielle d'une racine issue d'un plant ayant subi l'ablation partielle des cotylédons. La racine présente une coiffe, un méristème et une zone sous-apicale. Des cellules à tanins (flèches) sont présentes à la surface des cellules du cortex. Gr.x 255.

Figure 3 : Section tangentielle d'une racine issue d'un plant ayant subi l'ablation totale des cotylédons. La racine présente une coiffe, un méristème et une zone sous-apicale. Des cellules à tanins sont également présentes à la surface des cellules du cortex. Gr.x 227.

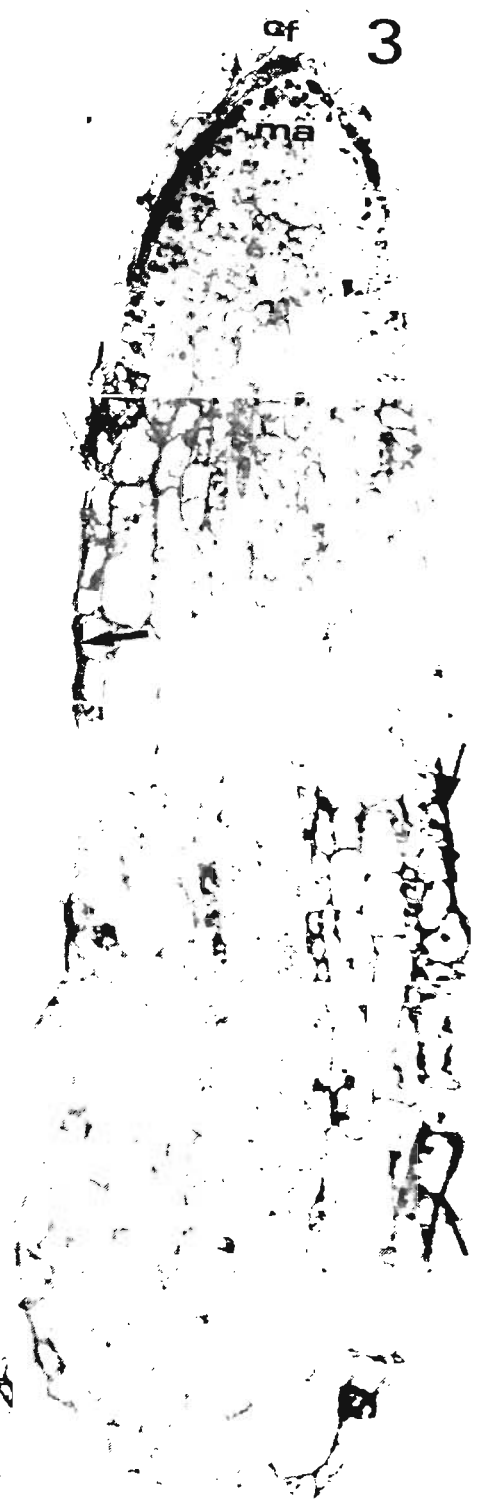
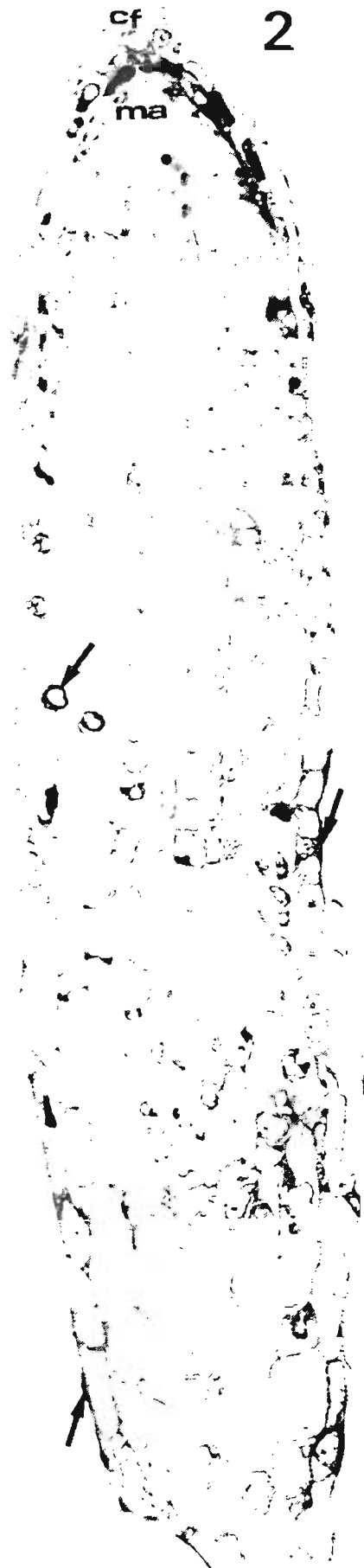
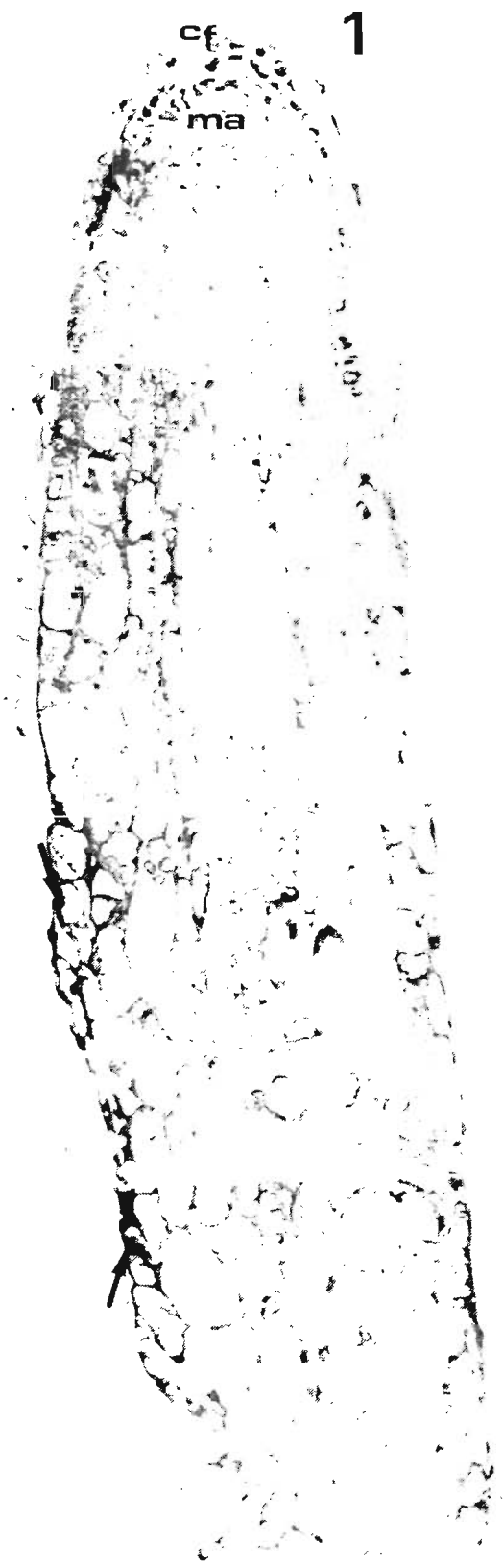


Planche 47

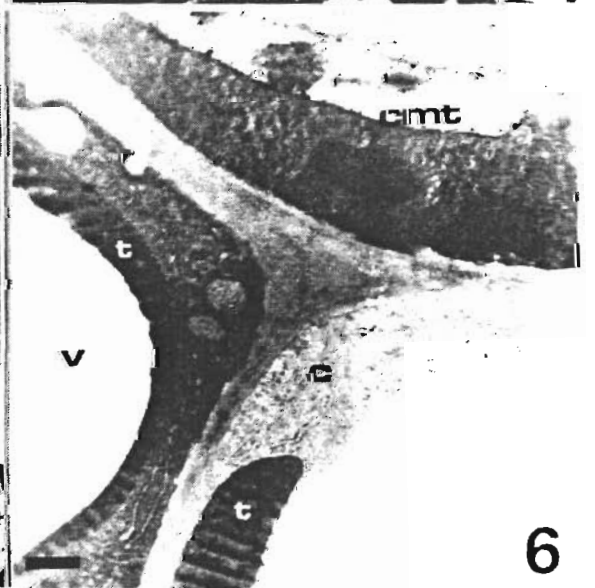
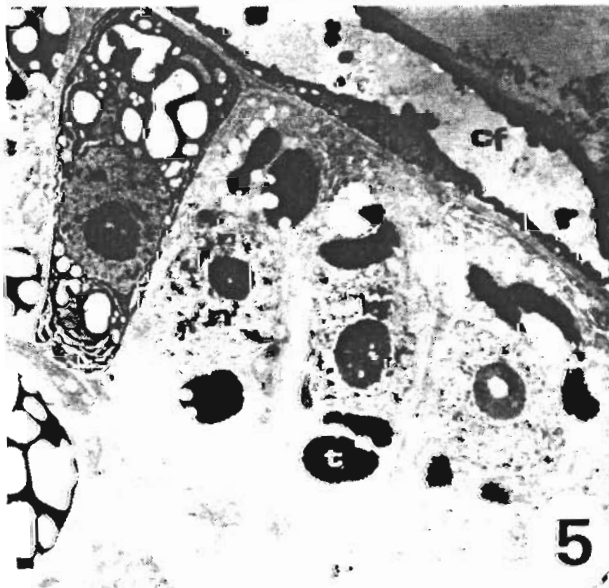
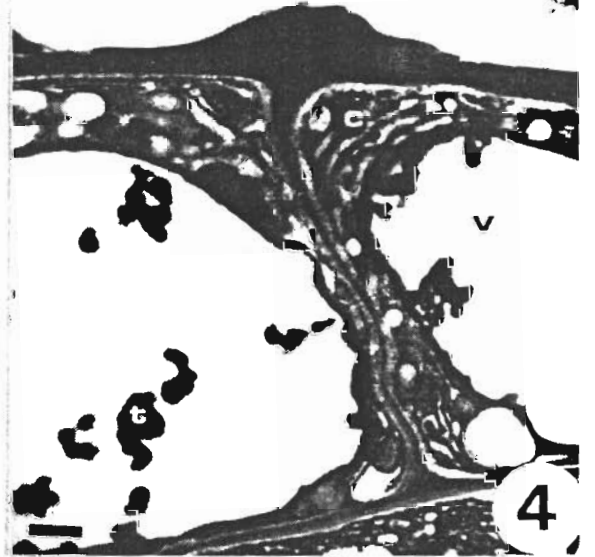
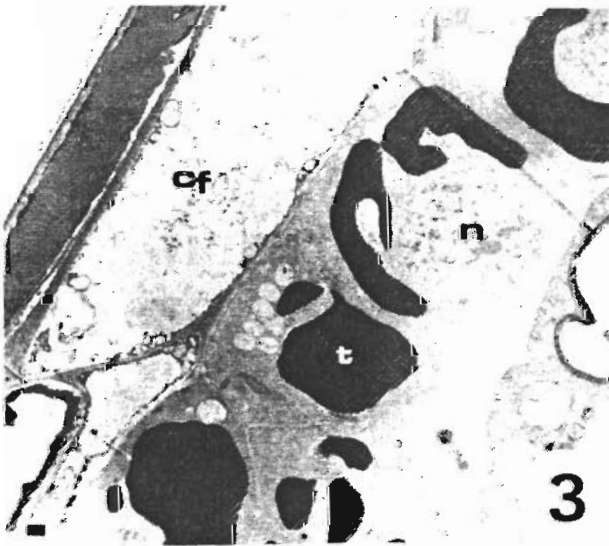
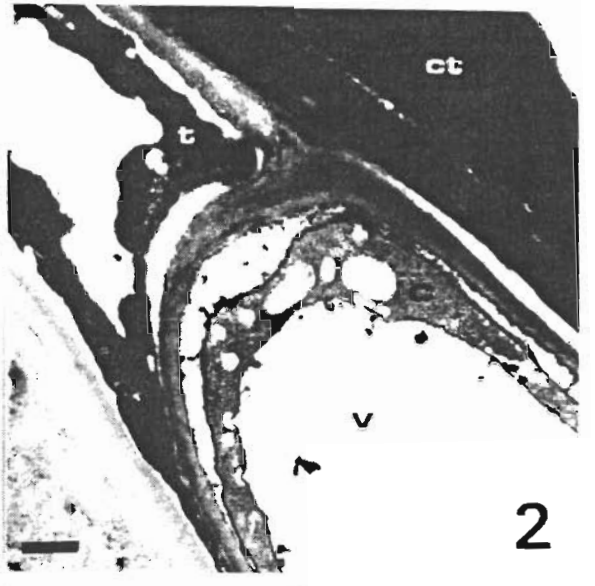
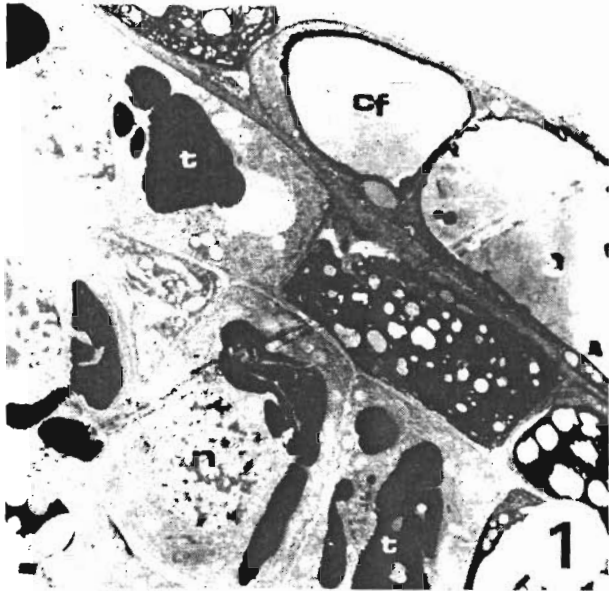
Ultrastructure des racines latérales d'ordre 2 (racines courtes) d'*A.africana* 4 jours après ablation partielle ou totale des cotylédons.

Acétate d'uranyle - citrate de plomb

Figures 1 et 2 : Dans la zone apicale d'une racine courte issue d'un plant n'ayant pas subi l'ablation des cotylédons des cellules isodiamétriques (méristème) renferment des tanins qui sont également présents le long du tonoplaste des cellules de la coiffe (fig.1) Gr.x 2353. Dans la zone sous-apicale la paroi des cellules corticales superficielles présente une structure normale. Des cellules à tanins sont observées à la surface des cellules corticales (fig.2) Gr.x 7666.

Figures 3 et 4 : Chez un plant ayant subi l'ablation partielle des cotylédons, l'apex des racines courtes présente la même structure que précédemment (fig.3) Gr.x 2492. La paroi des cellules de la zone sous-apicale présente également une structure normale (fig.4). Gr.x 7666.

Figures 5 et 6 : L'apex des racines courtes présente une structure normale après ablation totale des cotylédons(fig.5) Gr.x 2880. Dans la zone sous-apicale, la paroi des cellules corticales superficielles présente également une structure normale (fig.6) Gr.x 6400.



Chapitre 4

Etude de la spécificité et des interactions de reconnaissance entre champignons mycorhiziens indigènes ou exotiques et essences forestières introduites dans l'Ouest africain.

1. Introduction

1.1- Quelques indications sur la spécificité et la reconnaissance dans les interactions plantes-microorganismes symbiotiques ou pathogènes.

Les mécanismes de reconnaissance et d'adhésion entre microorganismes symbiotiques ou pathogènes et leur plante-hôte ont fait l'objet de nombreuses études (DAZZO et TRUCHET, 1983 ; WATANABE et LADAH, 1984 ; GIANINAZZI-PEARSON, 1984 ; HALVERSON et STACEY, 1986). Cependant les progrès les plus significatifs ont été obtenus dans les systèmes symbiotiques *Rhizobium*-Légumineuses où la spécificité des interactions de reconnaissance intervient au cours des différentes étapes qui conduisent à la formation des nodosités efficaces (DAZZO et TRUCHET, 1983). Plusieurs travaux suggèrent qu'il existe en premier lieu une spécificité de fixation qui est assurée par des glycoprotéines (lectine) de l'hôte qui relient des déterminants polysaccharidiques complémentaires à la surface pariétale des deux partenaires (DAZZO et HUBBELL, 1975 ; DAZZO, 1980). En second lieu, l'agglutination ("phase 2 adherence" selon DAZZO et TRUCHET, 1983) des bactéries entre elles ou à la surface des parois de la plante hôte est liée à la production d'un mucilage granulaire ou fibrillaire de nature cellulosique (DAZZO et HUBBELL, 1975 ; MARSHALL *et al.*, 1975 ; NAPOLI *et al.*, 1975). Cependant il n'existe pas de corrélation positive entre la production de ces fibrilles et le caractère infectieux par *Rhizobium* (NAPOLI *et al.*, 1975; SMIT *et al.*, 1987).

Dans les interactions plante-pathogène, l'induction des composés de défense (phytoalexines, polymères structuraux ou protéines de défense) n'est pas spécifique alors qu'elle découle d'une reconnaissance initiale spécifique de l'hôte et de l'agresseur qui correspond elle-même à une relation "gène pour gène" (HALVERSON et STACEY, 1986 ; de WIT *et al.*, 1987). Dans ce type d'interaction, des protéines ou glycoprotéines pariétales à action agglutinante (lectine) jouent un rôle important dans la reconnaissance initiale (SEQUIERA, 1978 ; LEACH *et al.*, 1982). Ainsi, une variété de soja génétiquement "résistante" posséderait des récepteurs lectiniques reconnus par des éliciteurs (glucane composé de résidu de mannose) d'une souche génétiquement "avirulente" de *Phytophthora megasperma* (AYERS *et al.*, 1976). Le processus d'agglutination sur la paroi ou sur le plasmalemme de la plante-hôte qui en résulte, met en jeu un mucilage fibrillaire (MENDGEN, 1978 ; GOLD et MENDGEN, 1983) de nature diverse : protéine (ONYILE *et al.*, 1982 ; EPSTEIN *et al.*, 1987), hemicellulose (LAPP et SKOROPAD, 1978).

Plus de 80% des espèces végétales sont associées à des endomycorhizes à vésicules et à arbuscules (GIANINAZZI-PEARSON, 1984). On considère que ce type d'association est très peu spécifique en comparaison avec ce que l'on observe dans les systèmes *Rhizobium*-

Légumineuses ou plante-pathogènes. Cette absence de spécificité suggère que si un mécanisme de reconnaissance existe, il devrait être moins spécifique. Au contact de la surface racinaire, les hyphes sont le siège de profondes modifications d'abord en appressorium, puis en vésicule ou en arbuscule chez les hyphes intraradiculaires. Cette morphogénèse fongique est accompagnée d'un métabolisme actif des cellules corticales infectées (augmentation du volume cytoplasmique et des organites cellulaires, surface accrue du plasmalemme etc...) et d'une simplification de la paroi fongique des hyphes arbusculaires (DEXHEIMER *et al.*, 1979 ; BONFANTE-FASOLO et GRIPPIOLO, 1982 ; BONFANTE-FASOLO, 1984 ; TOTH et MILLER, 1984).

Chez un autre type d'endomycorhize (mycorhizes éricoïdes) où la spécificité est moins large, les hyphes du champignon présentent également des modifications structurales (BONFANTE-FASOLO et GIANINAZZI-PEARSON, 1982 ; GIANINAZZI-PEARSON *et al.*, 1986). Ces auteurs montrent qu'en culture pure que la paroi des hyphes de *Pezizella ericae* présente des fibrilles réactives au test PATAg (THIERY, 1967). L'interface plante-champignon présente cependant une prolifération de fibrilles glycoprotéiques. La quantité de fibrilles diminue dans les hyphes intraradiculaires, ce qui suggère fortement un mécanisme de régulation par la plante hôte. A l'interface, une stimulation des activités phosphatasiques acides de la surface externe de la paroi du champignon est également observée. Elle résulterait d'un contact plante-champignon ou serait une conséquence de la zone de déplétion en phosphore inorganique au voisinage des racines (STRAKER *et al.*, 1989). Cependant ces activités phosphatasiques diminuent dans les hyphes intraradiculaires, ce qui suggère également un mécanisme de régulation par la plante hôte.

En présence de plantes non-hôtes, comme le tréfle, le champignon éricoïde produit des fibrilles glycoprotéiques et provoque, après avoir pénétré la paroi végétale, une désorganisation du cytoplasme qui rappelle des interactions du type plante-pathogène (BONFANTE-FASOLO et GIANINAZZI-PEARSON, 1982).

Chez les endomycorhizes à V.A comme celles des Ericacées (mycorhizes éricoïdes) toutes ces modifications, des hyphes ou de la cellule hôte, découlent d'une reconnaissance initiale et du contrôle par la plante hôte du processus d'infection qui en résulte (GIANINAZZI-PEARSON, 1984).

1.2- Spécificité et reconnaissance chez les ectomycorhizes

En général l'association ectomycorhizienne est considérée comme très peu spécifique (HARLEY et SMITH, 1983). Un champignon peut infecter *in vitro* un grand nombre d'arbres qui à leur tour peuvent être associés à un grand nombre de champignons. Cette absence de

spécificité est telle que certains champignons ectomycorhiziens sont capables de former des ectoendomycorhizes avec des Arbutacées (MOLINA et TRAPPE, 1982a). Cependant il existe différents niveaux de spécificité suivant le champignon et la plante hôte. On peut distinguer des champignons à large spectre d'hôte (*Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius*) qui forment des mycorhizes avec des résineux et des feuillus, des champignons spécifiques des conifères (*Rhizopogon* spp. et *Suillus* spp.) et des champignons dont la spécificité est confinée au niveau du genre (*Hymenogaster* spp. et *Hysterangium* spp. chez les eucalyptus ; *Alpova diplophoeus* chez *Alnus* spp.) (MOLINA, 1981; MOLINA et TRAPPE, 1982b ; MALACJZUK *et al.*, 1982).

Toutefois cette spécificité est moins large *in situ* qu'elle ne l'est *in vitro* (HARLEY, 1985). En effet, dans la nature, il existe une pression de sélection qui résulte de facteurs abiotiques (température du milieu ambiant) ou biotiques (microorganismes auxiliaires ou antagonistes et compétitivité des champignons) (DOMMERGUES et MANGENOT, 1970 ; KABRE, 1982 ; GARBAYE *et al.*, 1988 ; de OLIVIERA et GARBAYE, 1989).

D'un point de vue pratique, lorsqu'on veut planter une essence forestière d'un continent (Australie) à un autre (Afrique) deux stratégies peuvent être envisagées, soit introduire des champignons mycorhiziens ayant coévolué avec elle dans son aire géographique d'origine, soit utiliser des champignons indigènes. Des essais de terrain ont montré que des champignons introduits sont moins compétitifs que des symbiontes indigènes bien qu'ils aient procurés un gain de croissance chez des hybrides d'*Eucalyptus* en pépinière et pendant les deux premières années après la plantation (GARBAYE *et al.*, 1988). Cette observation pourrait être liée au fait que la souche de *Pisolithus tinctorius* (H.270 isolée sous pin) utilisée s'avère moins compétitive que les souches locales ou moins agressive qu'une souche de *Pisolithus tinctorius* (H.445) ayant coévolué avec les eucalyptus. Dans ce dernier cas des tests *in vitro* montrent, après 4 jours de contact entre *E. urophylla* et *Pisolithus tinctorius* (H.445 isolée sous eucalyptus), la production de fibrilles glycoprotéiques et l'induction d'une activité phosphatasique acide du plasmalemme fongique (LEI, 1988). Ces modifications ultrastructurales et biochimiques ne sont pas observées avec l'autre souche de *Pisolithus tinctorius* (H.270 isolée sous pin) qui induit des réactions chez *E. urophylla* qui rappellent des relations de type parasitaire (LEI, 1988). Par ailleurs ces auteurs observent, après 4 jours de contact, que la souche de *Pisolithus tinctorius* H.270 produit des fibrilles glycoprotéiques typiques avec *Pinus caribaea* et après 15 jours seulement de contact avec *E. urophylla*. Il apparaît ainsi une agressivité différentielle des deux écotypes de *Pisolithus* vis à vis d'*Eucalyptus urophylla*. La meilleure agressivité de la souche australienne résulte d'une coévolution avec les eucalyptus.

A notre connaissance, le problème de la spécificité des souches indigènes (isolées sur *A.africana* et *U.guineensis*) sur des essences introduites sous les tropiques n'a jamais été envisagé. On comprend tout l'intérêt d'utiliser ces champignons locaux à priori mieux adaptés au milieu tropical. Une meilleure connaissance des interactions cellulaires entre champignons et plante hôte lors de la phase précoce d'infection peut en particulier permettre de définir dans la pratique les conditions optimales pour l'inoculation des plants forestiers (MALACJZUK *et al.*, 1989)

Nous avons étudié l'aptitude ectomycorhizogène *in vitro* de ces champignons locaux (isolés sous *A.africana* ou *U.guineensis*) sur sept essences forestières exotiques (*Acacia holosericea*, *Casuarina equisetifolia*, *C.glauca*, *C.obesa*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Pinus caribaea*, et *Melaleuca leucadendron*) couramment utilisées dans le reboisement au Sénégal, ainsi que sur deux autres espèces indigènes d'Afrique intertropicale (*Afzelia quanzensis* et *Brachystegia speciformis*).

Nous avons ensuite recherché des couples (souches indigènes ou exotiques + essences exotiques) en fonction de l'aptitude ectomycorhizogène des souches fongiques, dans le but d'étudier et de comparer les premières interactions (vitesse d'infection, agressivité des souches locales par rapport aux souches étrangères) qui précèdent la mise en place du réseau de Hartig en ayant comme critères la formation des "ponts glycoprotéiques" et l'activité phosphatasique acide du plasmalemme fongique (LEI, 1988).

2. Matériel et méthodes

2.1- Matériel végétal

Six essences forestières originaires d'Australie sont étudiées : *Acacia holosericea*, *Casuarina equisetifolia*, *Casuarina obesa*, *Casuarina glauca*, *Eucalyptus camaldulensis* et *Melaleuca leucadendron*. Une espèce qui provient des Caraïbes (*Pinus caribaea*) et deux essences indigènes tropicales (*Afzelia quanzensis* et *Brachystegia speciformis*) ont été également étudiées. En condition naturelle les essences forestières australiennes peuvent être associées à plusieurs microorganismes symbiotiques. Ainsi les espèces appartenant aux genres *Casuarina* spp. et l'espèce *A.holosericea*, outre le fait qu'elles soient respectivement associées aux microorganismes fixateurs d'azote *Frankia* et *Rhizobium*, sont également capables de former des endomycorhizes avec *Glomus mossae* ainsi que des ectomycorhizes avec *Pisolithus tinctorius* (WARCUP, 1970 ; BA *et al.*, 1987 ; DUCOUSSO et THOEN résultats non

non publiés). Il est également bien établi que les genres *Eucalyptus* et *Melaleuca* sont à endomycorhizes et à ectomycorhizes (WARCUP, 1970 ; LAPEYRIE et CHILVERS, 1986).

2.2 - Matériel fongique

Les souches fongiques indigènes ont été isolées sous *A.africana* et *U.guineensis* (cf.chapitre 2). La souche de *Pisolithus* sp.(X003) a été isolée sous *E.camaldulensis* au Sénégal. Les carpophores de *Phlebopus sudanicus* (7589) ont été récoltés au P.N.B.C (Parc National de Basse Casamance). La plante hôte de ce champignon n'a pas été identifiée. La souche de *Pisolithus tinctorius* H.445 a été isolée en Australie sous des eucalyptus.

2.3 - Synthèses axéniques

Nous avons utilisé deux techniques de synthèse axénique, l'une en boîte de Petri (CHILVERS *et al.*, 1986), l'autre en tube (24,5 x 3,5 cm) rempli sur 10 cm de profondeur par un mélange de vermiculite et de tourbe (4:1 ; v/v) imprégné d'un milieu nutritif PACHLEWSKI (1974) diluée à 1/2 (voir en annexe, tableau 3). Dans les deux dispositifs les plants sont entièrement à l'intérieur du récipient. Chez *Afzelia quanzensis* et *Brachystegia specifformis* les synthèses sont effectuées non axéniquement en minirhizotron (cf.chapitre 2). Toutes les synthèses sont réalisées en chambre de culture dans les conditions décrites au chapitre 2 (paragraphe 2.3).

Pour l'obtention de plants stériles, les graines sont traitées de la manière suivante:

- *Casuarina* spp., *Eucalyptus camaldulensis* et *Melaleuca leucadendron* sont traitées 1h dans l'hypochlorite de calcium 20% en agitation, *Pinus caribaea* et *Brachystegia specifformis* 1 à 2 mn dans l'acide sulfurique à 95%, *Acacia holosericea* 30 mn dans l'acide sulfurique 95% ; *Afzelia quanzensis* 2h dans l'acide sulfurique à 95%.

- Rinçage à l'eau distillée stérile

- Mise en boîte ou en tube après germination sur milieu gélosé nutritif en boîte de Petri.

- Inoculation des semis au moment de l'apparition des racines latérales : 15 jours chez *Casuarina* spp., *Melaleuca leucadendron*, *Eucalyptus camaldulensis* et *Afzelia quanzensis* ; 7 jours chez *Acacia holosericea* ; 21 jours chez *Pinus caribaea* et *Brachystegia specifformis*.

- Prélèvement au moins 15 jours après inoculation et traitement des racines entourées par du mycélium comme dans le chapitre 2 (paragraphe 2.6). Pour les études en microscopie électronique, les prélèvements sont effectués 1, 2, 6 ou 21 jours après contact entre le champignon et la plante hôte.

2.3- Techniques de microscopie électronique

2.3.1- Test PATAg (cf.chapitre 2, paragraphe 2.6.4)

2.3.2- Réaction de SWIFT

Elle met en évidence les protéines riches en cystine. Comme dans le cas précédent les coupes, recueillies sur grilles en or, sont immergées dans un réactif préparé extemporanément de la façon suivante :

- 25ml d'une solution renfermant 5ml de nitrate d'argent à 5% et 100ml de méthénamine à 3%.
- 5ml d'une solution composée de 5ml d'acide borique à 1,44% et de 100ml de borax à 1,9%.
- 25ml d'eau distillée.

Après une incubation pendant 1h30 à 45°C et à l'obscurité, les grilles sont rincées à l'eau distillée et séchées avant d'être observées.

2.3.3- Activités phosphatasiques acides

Les mycorhizes sont découpées en petits fragments dans une goutte de fixateur et fixées par le glutaraldehyde à 1,6% dans le tampon cacodylate 0,1M à pH 7,2 pendant 1h à 0°C. Les objets sont ensuite soumis à plusieurs rinçages:

- Tampon cacodylate 0,1M sucré à 5% par du saccharose pendant 1h en renouvelant 3 fois le bain avec quelques passages sous vide.
- Eau distillée sucrée à 5% pendant 1h en renouvelant 3 fois le bain.
- Tampon acetate de sodium 0,02M pH 5 sucré à 5% pendant 1h en renouvelant 3 fois le bain avec quelques passages sous vide.
- Les échantillons sont ensuite incubés une nuit à 0°C et pendant 1h à 37°C dans le milieu de GOMORI (1952) :

Tampon acétate 0,02M	100ml
β-Glycérophosphate de Na 15mM	10ml
Nitrate de plomb	120mg

Pour les témoins, les activités phosphatasiques acides sont inhibées par 10mM de fluorure de sodium (NaF). Les coupes sont recueillies sur des grilles en cuivre et contrastées à l'acétate d'uranyle pendant 30mn.

3. Résultats et Discussion

Dans les conditions de nos tests (en tube ou en boîte de Petri), il apparaît que très peu de souches indigènes isolées sous *Afzelia* ou *Uapaca*, sont capables de former des mycorhizes avec des essences introduites (tableau 20). Le caractère non mycorrhizogène des souches fongiques de la zone tempérée vis à vis d'*Afzelia* (cf.chapitre 2) a été également observée chez les souches indigènes (isolées sous *Afzelia* ou *Uapaca*) vis à vis des essences introduites dans l'Ouest africain. D'une manière générale nous pouvons considérer qu'il existe, dans ces deux cas de figure, une spécificité d'hôte d'un continent à un autre.

Cependant nos résultats montrent que certaines souches fongiques isolées sous *Afzelia* (*Scleroderma dictyosporum* ou l'isolat non identifiée XM004) sont capables de former des mycorhizes avec *Acacia holosericea* ou *Melaleuca leucadendron* (pls.48, 49 et 50).

En plus du manteau fongique des pénétrations intercellulaires d'hyphes ont été observées entre *Phlebopus sudanicus* et *Pinus caribae* ou *Acacia holosericea*, bien que les observations de THOEN (1988) signalent la présence de pseudomycorhizes (pl.51, 1 et 2). Une autre souche indigène (*Gyrodon intermedius*) forme avec *Acacia holosericea* ou *P.caribaea* des pseudomycorhizes du type de celles que nous avons observées dans le chapitre (2) (pl.51, 5). Il en est de même avec les couples suivants : *Casuarina equisetifolia* ou *Eucalyptus camaldulensis* avec *Amanita* sp.(7735) (pl.49, 2 ; pl.51, 4). Cette dernière souche forme également des pseudomycorhizes avec *Afzelia africana* (cf.chapitre 2). Contrairement à des observations de terrain qui révélaient des mycorhizes (BA *et al.*, 1987) nos tests *in vitro* montrent qu'un isolat appartenant au genre *Pisolithus* (*Pisolithus* sp.X003) ne forme que des pseudomycorhizes avec 3 espèces du genre *Casuarina* (pl.51, 3).

Il peut ainsi exister différents niveaux de spécificité *in vitro* entre souches indigènes (Afrique) et essences introduites (Australie ou Caraïbes). Cette spécificité *in vitro* ne se traduit pas *a posteriori* au plan écologique et inversement, des souches fongiques qui s'avèrent non infectieuses *in vitro* peuvent former des mycorhizes *in situ* (cf.chapitre 2). Les souches fongiques isolées sous *Uapaca* présentent au contraire une spécificité d'hôte *in vitro* plus étroite car aucune d'elles n'a formé de mycorhizes avec des essences introduites ou d'autres espèces forestières indigènes.

Tableau 20 : Aptitude ectomycorhizogène *in vitro* des champignons de l'Ouest africain sur des essences forestières introduites ou indigènes.

Espèces fongiques	Hôtes	Essences forestières								
		A.h	A.q	B.s	C.e	C.g	C.o	E.c	M.l	P.c
1. <i>Austrogautiera</i> sp.	U.g	-	-	nd	-	-	-	-	-	-
2. <i>Amanita hemibapha</i>	A.a	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-
3. <i>Amanita</i> sp.(7735)	A.a	-	nd	nd	+/-	-	-	+/-	-	-
4. <i>Amanita</i> aff. <i>rubescens</i> (Pers.Fr) S. F.Gray	A.a	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-
5. <i>Gyrodon intermedius</i> (Pat.) Sing.	A.a	+/-	-	nd	-	-	-	-	-	+/-
6. <i>Phlebopus sudanicus</i>	?	+/-	-	nd	-	-	-	-	-	+/-
7. <i>Pisolithus</i> sp.	E.c	+	nd	nd	+/-	+/-	+/-	+	+	+
8. <i>Pulveroboletus</i> aff. <i>tritinensis</i> Heinem.	U.g	-	-	nd	-	-	-	-	-	-
9. <i>Scleroderma</i> <i>dictyosporum</i> Pat.	A.a	+	+	nd	-	-	-	-	+	-
10. <i>Scleroderma</i> <i>verrucosum</i> Pers.	A.a	-	+	nd	-	-	-	-	-	-
11. <i>Sclerogaster</i> sp.	A.a	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-
12. <i>Tubosaete</i> <i>brunneosetosa</i> (Singer) Horak.	U.g	-	-	nd	-	-	-	-	-	-
13. <i>Xerocomus</i> aff. <i>hypoxanthus</i> Singer	U.g	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-
14. <i>Xerocomus spinulosus</i> Heinem & Goos.	A.a	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-
15. <i>Xerocomus</i> <i>subspinulosus</i> Heinem.	U.g	-	nd	nd	-	-	-	-	-	-
16. Isolat non identifié (XM004)	A.a	+	+	nd	-	-	-	-	-	-
17. Isolat identifié à <i>S.verrucosum</i> (XM001)	A.a	-	+	nd	-	-	-	-	-	-
18. Isolat identifié à <i>S.dictyosporum</i> (XM003)	A.a	+	+	nd	-	-	-	-	+	-
19. Isolat non identifié (XM002)	A.a	-	+	+	-	-	-	-	-	-
20. Isolat identifié à <i>S.verrucosum</i> (XS001)	A.a	-	+	nd	-	-	-	-	-	-

A.a = *Afzelia africana* ; A.h = *Acacia holosericea* ; A.q = *Afzelia quanzensis* ; B.s = *Brachystegia speciformis* ; C.e = *Casuarina equisetifolia* ; C.g = *Casuarina glauca* ; C.o = *Casuarina obesa* ; E.c = *Eucalyptus camaldulensis* ; M.l = *Melaleuca leucadendron* ; P.c = *Pinus caribaea*
U.g = *Uapaca guineensis*. ? = Plante hôte non déterminée
+ = mycorhizogène ; +/- = Peu mycorhizogène ; - = Non mycorhizogène ; nd = Non déterminé

Dans le genre *Afzelia*, nos résultats préliminaires montrent que les souches fongiques associées sont peu spécifiques (pl.52, 1, 2 et 3). Il apparaît que la souche non identifiée XM002 (isolée sur *Afzelia*) est capable de former des mycorhizes avec *Brachystegia speciformis* (pl.52, 4). Ces résultats suggèrent que les souches fongiques indigènes (isolées sur *A. africana*) peuvent présenter une spécificité plus large vis à vis d'autres essences indigènes.

La mise en évidence de couples symbiotiques (souches indigènes + essences introduites) revêt un grand intérêt au plan pratique notamment dans le choix des souches fongiques efficaces et adaptées au climat.

Nous avons ensuite étudié et comparé différents niveaux d'aptitude mycorhizogène des souches locales (*S. dictyosporum* ou *Amanita* sp.7735) ou introduites (*Pisolithus tinctorius*) vis à vis d'essences forestières exotiques (*A. holosericea* ou *E. camaldulensis*) chez des couples où le champignon est :

- ectomycorhizogène : *A.holosericea* + *P.tinctorius* H.445, *A.h* + *S.dictyosporum*, *E.camaldulensis* + *P.tinctorius* H.445
- peu ectomycorhizogène : *E.camaldulensis* + *Amanita* sp.(7735)
- non ectomycorhizogène : *E.camaldulensis* + *S.dictyosporum*

Pour la mise en évidence de ces interactions nous avons préalablement vérifié que les conditions expérimentales (en boîte de Petri selon CHILVERS *et al.*, 1986) n'étaient pas limitantes sur *Afzelia* (cf.chapitre 2).

A 1 jour, les hyphes sont déjà en contact avec les poils absorbants. Il apparaît que chez tous les couples étudiés les fibrilles glycoprotéiques n'ont pas été observée à l'interface des hyphes et des poils absorbants (pl.53). Ces résultats sont en accord avec ceux de LEI (1988) obtenus sur le modèle *E.urophylla* et *Pisolithus tinctorius* après 2 jours de contact. Cependant d'autres auteurs ont mis en évidence des fibrilles polysaccharidiques à l'interface de *Pisolithus tinctorius* et des poils absorbants de *Picea mariana* (THOMSON *et al.*, 1989). Il est possible que la nature de la paroi du poil absorbant chez les feuillus soit différente de celle des résineux comme c'est le cas entre les Légumineuses et d'autres Dicotylédones (SPRENT, 1989). Nous savons que l'infection est intercellulaire chez les ectomycorhizes (CHILVERS *et al.*, 1988). En supposant que les fibrilles glycoprotéiques interviennent dans les premiers stades de reconnaissance (GIANINAZZI-PEARSON *et al.*, 1986 ; LEI, 1988), leur absence à l'interface du poil absorbant et de l'hyphe chez les feuillus suggère que le champignon ne "reconnait" que les sites d'infection localisés sur les cellules corticales sous l'assise pilifère. Dans les interactions symbiotiques *Rhizobium*-Légumineuses, l'infection a lieu en général par le poil

absorbant (SPRENT, 1989). La présence de cations Ca^{++} , liés à des protéines, confère au poil absorbant une capacité agglutinante plus importante que chez les cellules corticales (SMIT *et al.*, 1987 ; WERNER et WOLFF, 1987).

A 2 jours, les hyphes sont en contact avec les cellules corticales chez les couples où le champignon est mycorrhizogène (*E.c + P.t* H.445, *A.h + P.t* H.445 et *A.h + 7731*). La paroi des hyphes et des cellules corticales sont réactives au test PATAg. Des fibrilles de nature glycoprotéique sont observées à l'interface des hyphes et des cellules corticales (pl.54, 1,2 et 3 ; pl.55, 5 et 6). Ces résultats sont en accord avec ceux de LEI (1988).

Chez les couples où le champignon est mycorrhizogène, nous avons également recherché la localisation des activités phosphatasiques acides du champignon en contact avec la plante hôte.

Dans l'association *E.c + P.t* H 445 cette activité enzymatique est localisée à la surface externe de la paroi, sur le plasmalemme et dans les vacuoles des cellules fongiques (pl 56, 1, 2 et 3). Il apparaît également que l'activité phosphatasique acide du plasmalemme fongique, est présente uniquement dans les hyphes en contact avec les cellules corticales et diminue lorsqu'on s'en éloigne (pl.56, 1 et 3). L'induction de l'activité plasmalemme rappelle celle que LEI (1988) a déjà décrite dans l'association *E. urophylla* et *P.t* H.445 après 4 jours de contact.

Dans l'association *A.h x P.t* H.445 les activités phosphatasiques acides présentent une localisation différente de celle que nous avons observées dans le cas précédent. Lorsque les hyphes sont en contact avec des cellules corticales, elles présentent des activités enzymatiques au niveau de la vacuole et peu d'activité à la surface externe de la paroi (pl.56, 4 et 5). Les activités phosphatasiques du plasmalemme fongique sont absentes à ce niveau (pl.56, 5). Cependant, nous avons observé une activité phosphatasique au niveau du plasmalemme fongique chez toutes les hyphes intercellulaires sans qu'il y ait eu ébauche du réseau de Hartig (pl.56, 7, 8 et 9). Les hyphes, éloignées des cellules corticales, présentent des activités phosphatasiques au niveau de la vacuole et sur la surface externe de la paroi (pl.56, 4).

Dans l'association *A.h + S.d* 7731, les activités phosphatasiques acides présentent une distribution similaire à celles que nous avons observées dans l'association *E.c + P.t* H.445. Au contact des cellules corticales, les hyphes présentent une activité phosphatasique plasmalemme qui diminue lorsqu'on s'en éloigne et peu d'activité vacuolaire comme c'est le cas également à la surface externe de la paroi (pl.57, 1, 2, 3 et 4). Les hyphes les plus éloignées présentent au contraire une activité à la surface externe de la paroi ainsi que dans les vacuoles (pl.57, 1).

Dans les trois modèles examinés où le champignon est mycorrhizogène, il apparaît que la localisation des activités phosphatasiques acides n'est pas la même suivant le champignon ou la plante hôte. L'induction des activités phosphatasiques acides au niveau du plasmalemme des hyphes en contact avec les cellules corticales est commune aux mycorhizes de *P.t* .H.445 avec le genre *Eucalyptus* .Cependant en présence d'une plante hôte différente (*Acacia holosericea*), l'induction des activités phosphatasiques du plasmalemme fongique de la souche de *P.t* H.445 n'est observée que dans les hyphes intercellulaires. Ces résultats suggèrent, pour la souche *P.t* H.445, un même mécanisme de régulation de cette activité enzymatique mais avec une intensité différente suivant la plante hôte.

Chez les couples où le champignon est peu mycorrhizogène (*E c* + 7735) la paroi des hyphes et des cellules corticales sont réactives au test PATAg (pl.58, 1). Cependant nous n'avons pas observé de fibrilles glycoprotéiques à l'interface comme c'est le cas chez les couples où le champignon est mycorrhizogène. Nous avons également recherché la localisation des activités phosphatasiques. Chez les hyphes en contact avec les cellules corticales ou celles qui en sont éloignées, ces activités enzymatiques sont localisées uniquement sur la face externe de la paroi fongique et dans la vacuole (pl.58, 6). Après 21 jours de contact il s'est formé, autour des racines d'*Eucalyptus*, un manteau peu compacte mais bien épais avec quelques pénétrations d'hyphes entre les cellules du cortex sans qu'un réseau de Hartig se soit mis en place (pl.58, 2). A ce stade les fibrilles glycoprotéiques sont également absentes (pl.58, 3 et 4).

Chez les couples où le champignon n'est pas mycorrhizogène (*E c.*+ *S. dictyosporum* 7731) l'interface entre le champignon et les cellules de la racine présente des fibrilles glycoprotéiques (pl.55, 1, 3 et 4). Les activités phosphatasiques acides sont localisées à la surface externe des parois et dans les vacuoles des hyphes en contact ou non avec les cellules corticales (pl.57, 6). Elles sont absentes du plasmalemme fongique chez les hyphes en contact avec les cellules corticales (pl.57, 7 et 8).

Parallèlement aux couples symbiotiques examinées précédemment, nous avons étudié un autre type d'interactions afin de vérifier si les marqueurs utilisés sont spécifiques des relations mutualistes. Pour cela nous avons confronté un champignon lignicole du sol (*Collybia platyphylla*) avec *E.camaldulensis* dans les mêmes conditions que précédemment. A 2 jours, des hyphes sont en contact avec les cellules corticales (pl.59, 1). La surface externe de la paroi des cellules corticales peut présenter un aspect lisse (pl.59, 2) ou mucilagineux (pl.59, 1). Quoi qu'il en soit, l'interface ne présente pas de fibrilles glycoprotéiques comparables à ce nous avons observé chez les couples où le champignon est ectomycorrhizogène (pl.59, 1 et 2). Les activités phosphatasiques acides des hyphes en contact avec les cellules corticales sont

localisées sur la surface externe des parois et dans les vacuoles (pl.59, 6). La pénétration des hyphes, à l'intérieur des cellules corticales, ne modifie pas la distribution des activités phosphatasiques acides (pl.59, 7). A 4 jours de contact, les premiers symptômes qui rappellent les relations de type parasitaire apparaissent : lyse de la paroi et pénétration dans le cytoplasme des cellules corticales jusqu'aux cellules du cylindre central entraînant la mort des plants d'*Eucalyptus* (pl.51, 6 ; pl.59, 3).

Chez tous les couples où le champignon est ectomycorhizogène dans les conditions de notre test, l'interface est caractérisée par la présence de fibrilles glycoprotéiques. Ces résultats sont en accord avec ceux de LEI (1988). Ils semblent communs à divers types de mycorhizes (mycorhizes éricoïdes, mycorhizes à *Pisolithus tinctorius* et mycorhizes à *Scleroderma*).

Chez les couples où le champignon n'est pas ectomycorhizogène, nous avons observé deux cas de figure avec *E.camaldulensis* : l'un avec une souche potentiellement mycorhizienne (*S.dictyosporum*) sur une autre espèce, l'autre avec une souche présumée mycorhizienne (*Amanita* sp.7735) (cf.chapitre 1). Dans le premier cas, l'interface du champignon avec une plante non hôte présente des fibrilles glycoprotéiques. Dans le deuxième cas bien que la souche d'*Amanita* sp.(7735) forme un manteau fongique avec *E.camaldulensis*, nous n'avons pas observé de fibrilles glycoprotéiques à l'interface. Il en résulte que la formation de fibrilles glycoprotéiques est spécifique des champignons dont nous avons vérifié l'aptitude ectomycorhizogène ou des champignons potentiellement mycorhiziens (tableau 21).

Dans les modèles où le champignon est ectomycorhizogène (*A.holosericea* + *S.dictyosporum*) ou non (*E.camaldulensis* + *S.dictyosporum*) suivant la plante hôte, l'induction d'une activité phosphatasique acide du plasmalemme fongique peut être considérée, en plus de la présence des fibrilles glycoprotéiques, comme un autre niveau d'interaction cellulaire. Elle apparaît comme une fonction spécifiquement symbiotique (tableau 21).

Il apparaît donc que les interactions de reconnaissance mettent en jeu des mécanismes (fibrilles glycoprotéiques ou phosphatases acides du plasmalemme fongique) communs aux souches indigènes (*S.dictyosporum*) ou exotique (*Pisolithus tinctorius*) ectomycorhizogènes vis à vis d'essences introduites (*A.holosericea* ou *E.camaldulensis*).

Tableau 21 : Interaction plante-champignon mycorhizogène, peu mycorhizogène, non mycorhizogène ou pathogène.

	Fibrilles glycoprotéiques	Phosphatases acides du plasmalemme fongique
1	+	+
2	-	-
3	+	-
4	-	-

+ = Présence ; - = Absence

(1) Couples où le champignon est mycorhizogène

(2) Couple où le champignon est peu mycorhizogène

(3) Couple où le champignon n'est pas mycorhizogène

(4) Couple où le champignon est pathogène

Planche 48

Technique du “paper-sandwich”

Figure 1 : Mycorhizes de synthèse entre *Acacia holosericea* et *Scleroderma dictyosporum* 7731.

Figure 2 : Mycorhizes de synthèse entre *Eucalyptus camaldulensis* et *Pisolithus tinctorius* H.445.

Figure 3 : Mycorhizes de synthèse entre *Melaleuca leucadendron* et *Pisolithus tinctorius* H.445.

Figure 4 : Mycorhizes de synthèse (?) entre *Pinus caribaea* et *Phlebopus sudanicus* 7589.

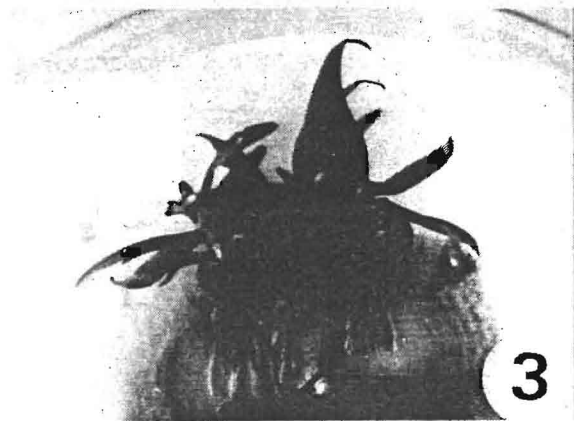
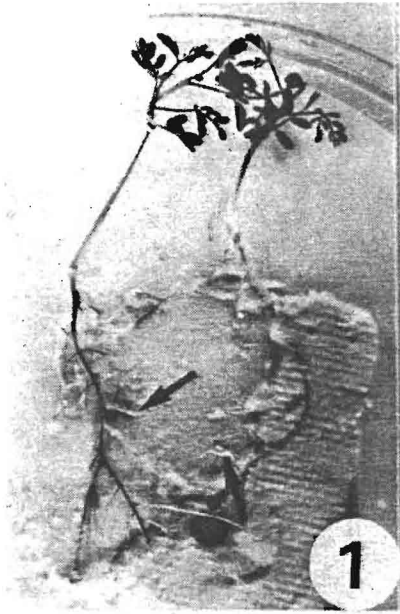


Planche 49

Figure 1 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *E.camaldulensis* et *Pisolithus inctorius* H.445. Noter l'allongement des cellules corticales externes. Gr.x 280.

Figure 2 : Section transversale d'une pseudomycorhize de synthèse entre *E.camaldulensis* et *Amanita* sp.7735. Noter qu'il n'y a pas allongement des cellules corticales externes. Gr.x 1000.

Figure 3 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *A.holosericea* et *Pisolithus tinctorius* H.445. Gr.x 300.

Figure 4 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *A.holosericea* et *Scleroderma dictyosporum* 7731. Gr.x 400.

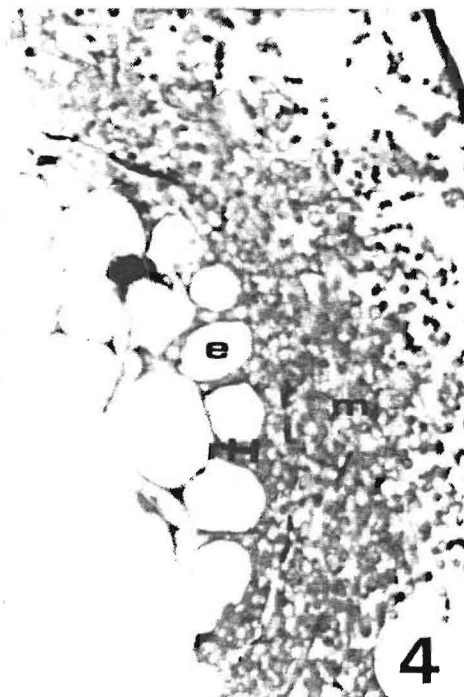
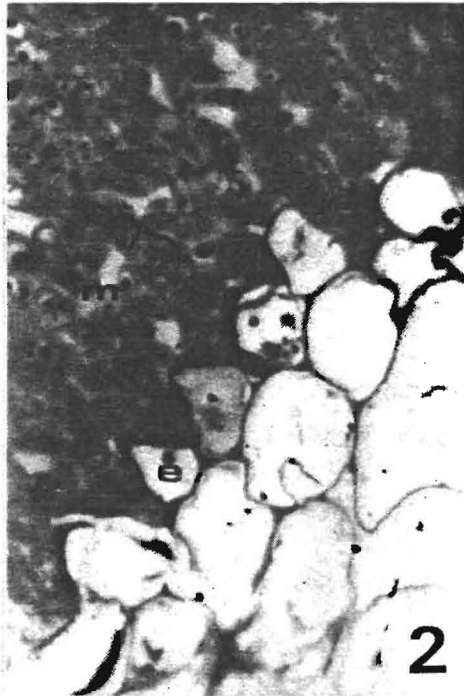
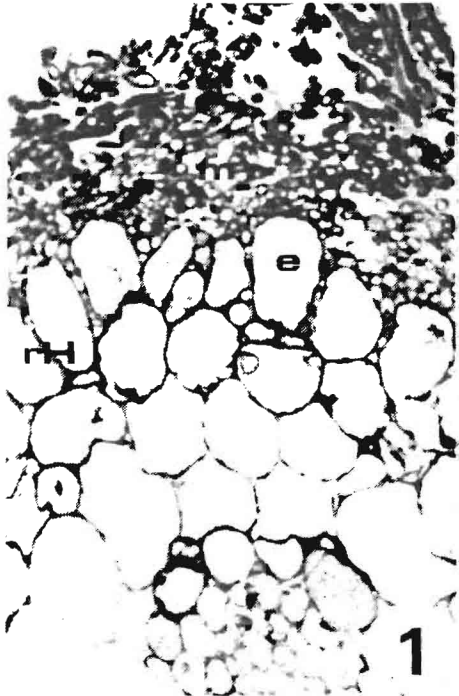


Planche 50

Figure 1 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *A.holosericea* et XM003 (identifiée à *S.dictyosporum*). Gr.x 275.

Figure 2 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *Melaleuca leucadendron* et XM004 (non identifiée). Gr.x 642.

Figure 3 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *A.holosericea* et XM004 (non identifiée). Gr.x 250.

Figure 4 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *Melaleuca leucadendron* et *P.tinctorius* H.445. Gr.x 125

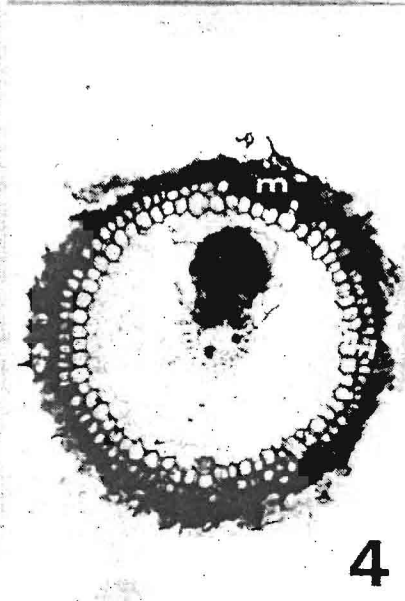
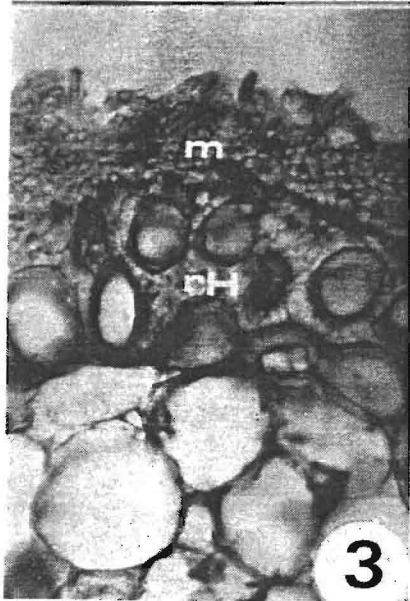
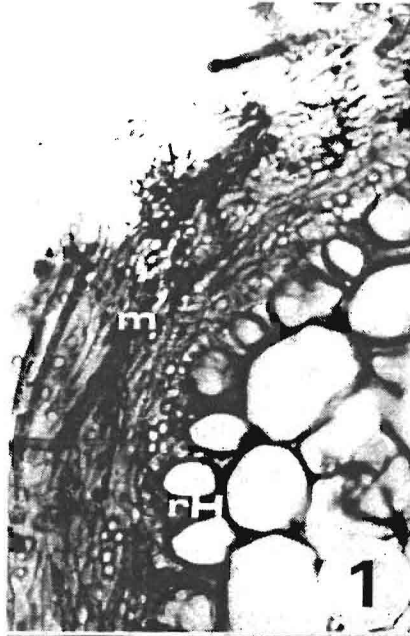


Planche 51

Figure 1 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse (?) entre *Pinus caribaea* et *Phlebopus sudanicus* 7589. Noter des pénétrations d'hyphes entre les cellules à tanins et entre quelques cellules corticales sous-jacentes. Gr.x 366

Figure 2 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse (?) entre *A.holosericea* et *Phlebopus sudanicus* 7589. Noter également des pénétrations d'hyphes entre les cellules corticales. Gr.x 387.

Figure 3 : Section transversale d'une pseudomycorhize de synthèse entre *Casuarina equisetifolia* et *Pisolithus tinctorius* H.445. Gr.x 246

Figure 4 : Section transversale d'une pseudomycorhize de synthèse entre *Casuarina equisetifolia* et *Amanita* sp.7735 . Gr.x 250.

Figure 5 : Section transversale d'une pseudomycorhize de synthèse entre *A.holosericea* et *Gyrodon intermedius* 7739. Gr.x 245

Figure 6 : Section transversale d'une racine d'*E.camaldulensis* infectée par *Collybia platyphylla*. Les cellules corticales sont envahies par des hyphes. Gr.x 53.

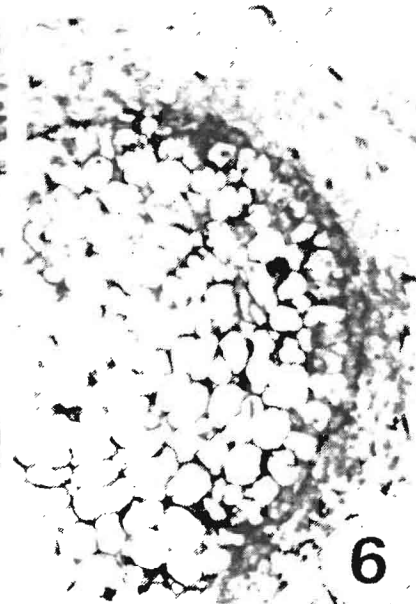
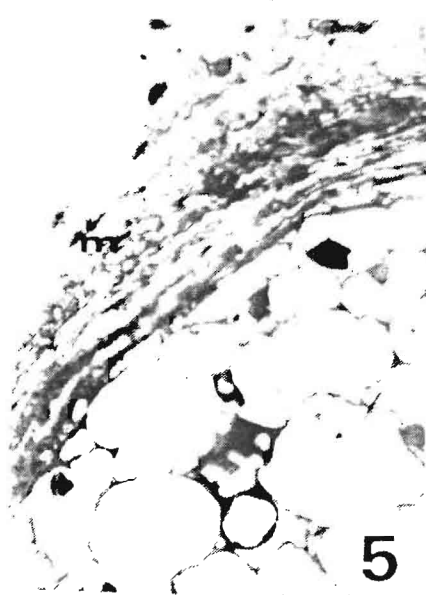
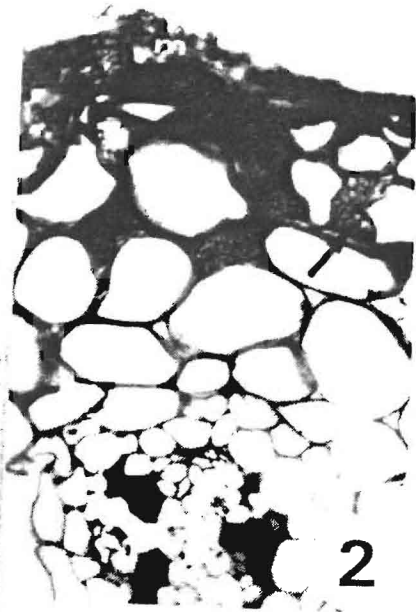
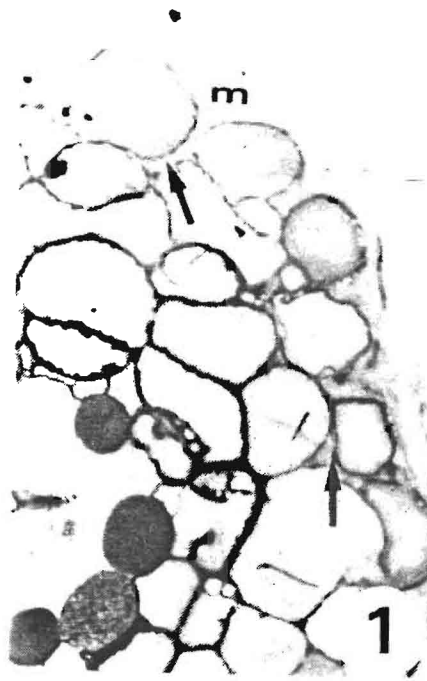


Planche 52

Figure 1 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *Afzelia quanzensis* et *S.verrucosum* 7732. Gr.x 275.

Figure 2 : Vue de dessus d'une racine d'*Afzelia quanzensis* mycorhizée par XM002 (non identifiée). Il y a très peu de manteau mais le réseau de Hartig est présent. Gr.x 248.

Figure 3 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *A.quanzensis* et XM004 (non identifiée). Gr.x 285.

Figure 4 : Section transversale d'une mycorhize de synthèse entre *Brachystegia speciformis* et XM002 (non identifiée). Gr.x 987.

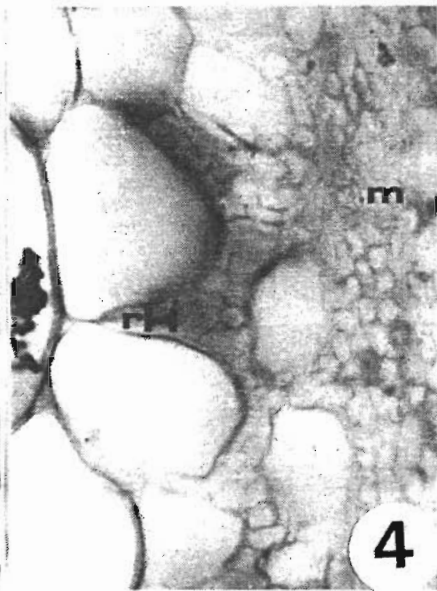
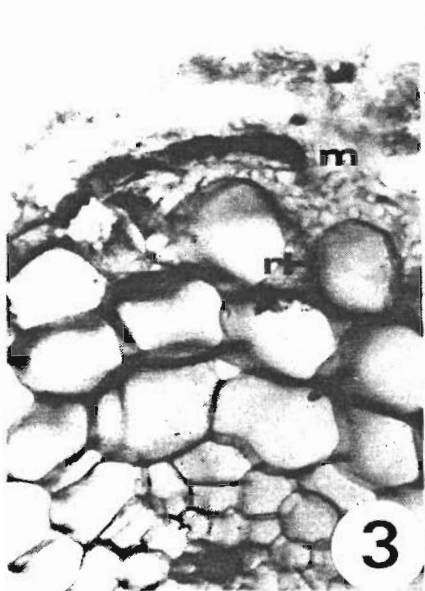
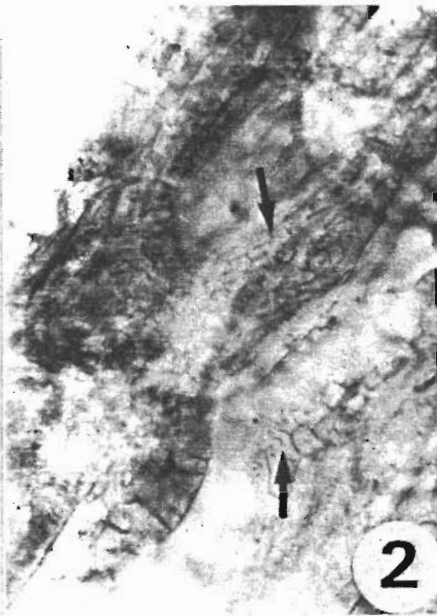
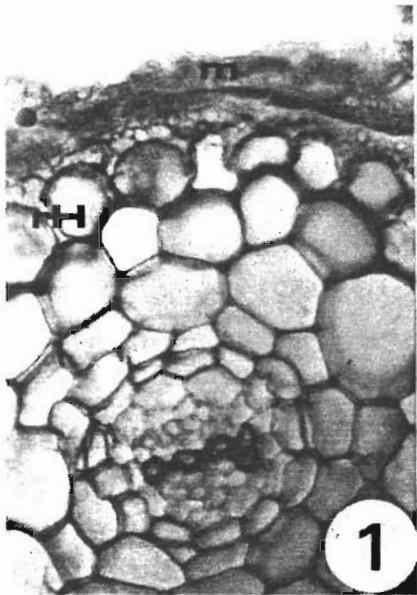


Planche 53

Interaction plante-champignon mycorhizogène ou non après 1 jour de contact.

Figure 1 : *E.camaldulensis* + *P.tinctorius* H.445. L'interface des hyphes et des poils absorbants ne présente pas de fibrilles polysaccharidiques. Gr.x 3600. Test PATAg.

Figure 2 : *E.camaldulensis* + *P.tinctorius* H.445. L'interface des hyphes et des poils absorbants ne présente pas de fibrilles protéiques. Gr.x 6571. Test de SWIFT.

Figures 3 et 4 : *A.holosericea* + *S.dictyosporum*.7731. Vue d'ensemble d'une assise pilifère avec quelques hyphes en contact avec les poils absorbants (fig.3) Gr.x 2700. Détails de l'interface qui ne présente pas de fibrilles polysaccharidiques (fig.4, Gr.x 8280). Test PATAg.

Figure 5 : *E.camaldulensis* + *S.dictyosporum*.7731. L'interface de l'hyphe et du poil absorbant ne présente pas de fibrilles polysaccharidiques. Gr.x 16521. Test PATAg.

Figure 6 : *E.camaldulensis* + *Amanita* sp.(7735). L'interface des hyphes et des poils absorbants ne présente pas de fibrilles polysaccharidiques. Gr.x 8300. Test PATAg.

Figure 7 : *A.holosericea* + *P.tinctorius* H.445. L'interface des hyphes et des poils absorbants ne présente pas de fibrilles polysaccharidiques. Gr.x 15833. Test PATAg.

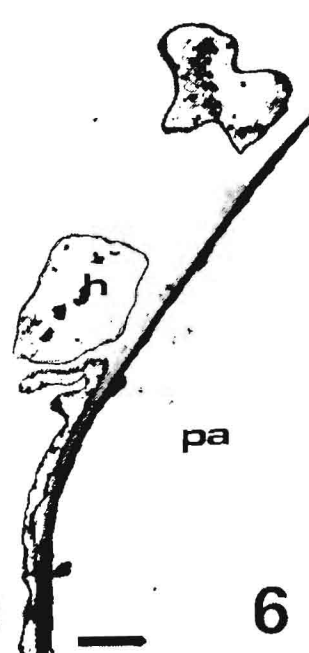
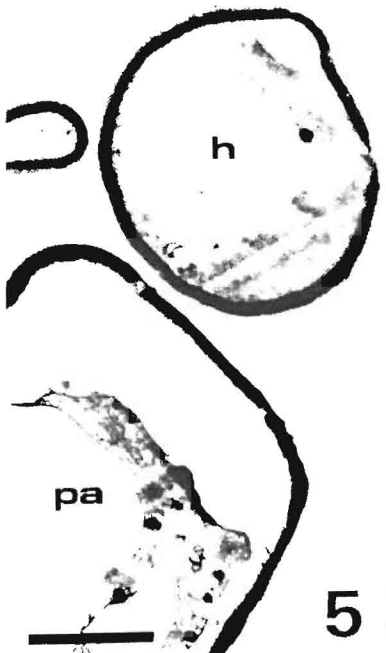
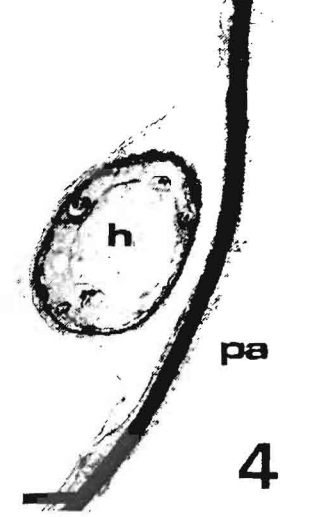


Planche 55

Interaction plante-champignon mycorhizogène ou non après 2 jours de contact.

Figure 1 : *E.camaldulensis* + *S.dictyosporum* 7731. L'interface de l'hyphe et de la cellule corticale présente des fibrilles polysaccharidiques. Gr.x 40233 (la barre représente 0,5 µm). Test PATAg.

Figure 2 : *E.camaldulensis* + *S.dictyosporum* 7731. Témoin. Il n'y a pas de marquage. Gr.x 6250. Test PATAg.

Figures 3 et 4 : *E.camaldulensis* + *S.dictyosporum* 7731. Des fibrilles protéiques sont également observées entre les hyphes et les cellules corticales (fig.3) Gr.x 14500. Détails de la même interface (fig.4) Gr.x 39200 (la barre représente 0,5 µm). Test de SWIFT.

Figure 5 : *A.holosericea* + *S.dictyosporum* 7731. L'interface entre les hyphes et les cellules corticales présentent des fibrilles protéiques. Gr.x 40727 (la barre représente 0,5 µm). Test de SWIFT.

Figure 6 : *A.holosericea* + *S.dictyosporum* 7731. L'interface entre les hyphes et les cellules corticales présentent également des fibrilles polysaccharidiques. Gr.x 15833. Test PATAg.

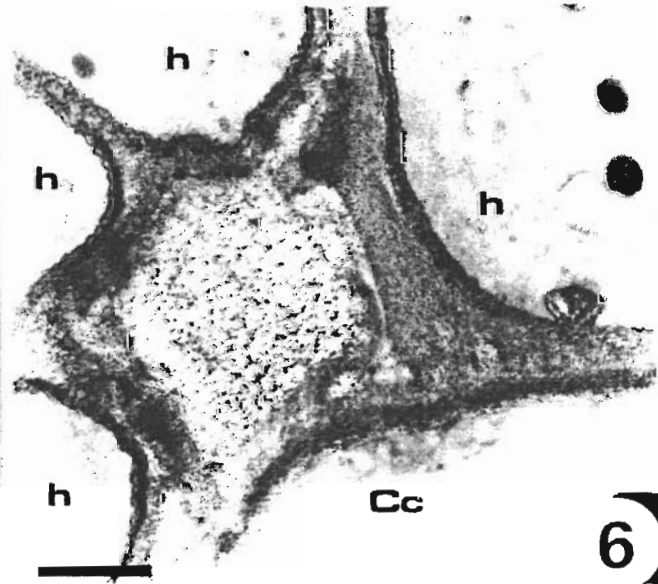
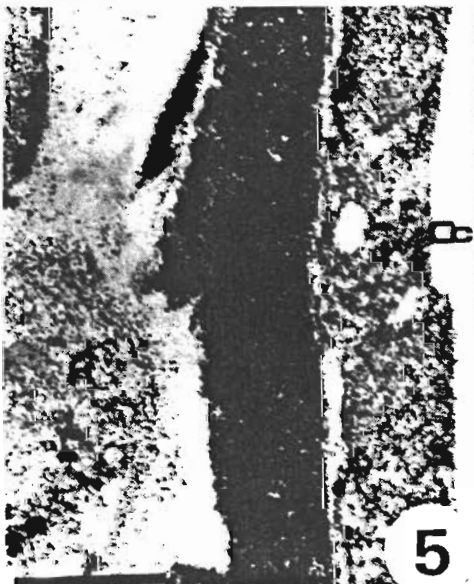
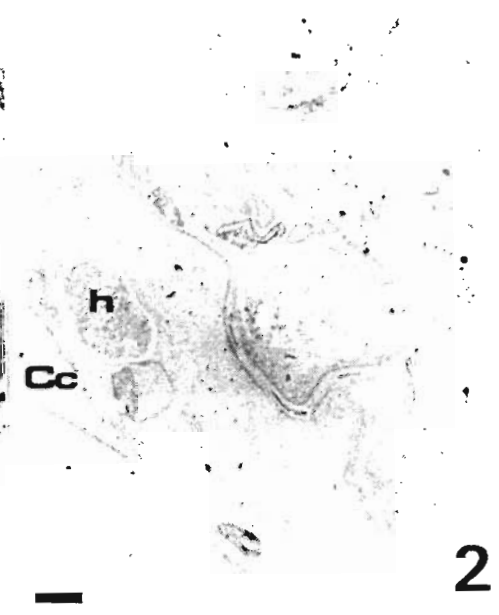
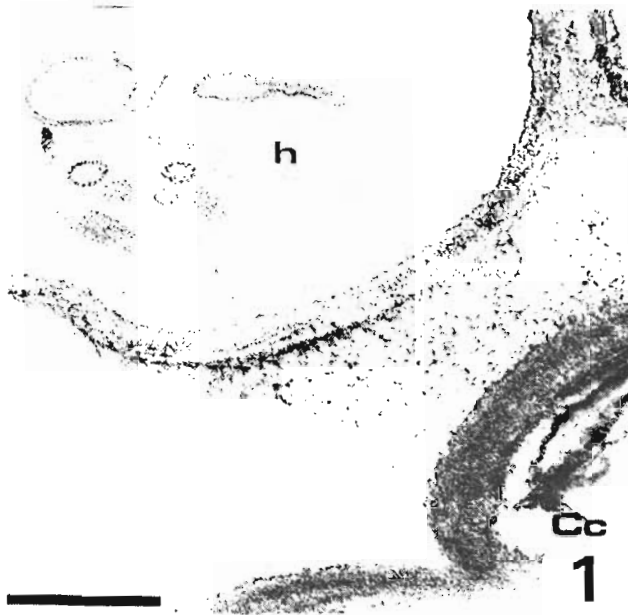


Planche 56

Interaction plante-champignon mycorhizogène après 2 jours de contact.

Figures 1, 2 et 3 : *E.camaldulensis* + *P.tinctorius* H.445 (2 jours). Les hyphes en contact avec les cellules corticales présentent des activités phosphatasiques acides sur le plasmalemme, sur la surface externe de la paroi et dans les vacuoles. Les cellules corticales présentent une activité phosphatasique plasmalemmique. Les hyphes éloignées des cellules corticales présentent également des activités phosphatasiques vacuolaires et sur la face externe de la paroi mais pas d'activité au niveau du plasmalemme (fig 1, Gr.x 8400 ; fig.2, Gr.x 15536 ; fig.3, Gr.x7200). Acétate d'uranyle.

Figure 4 : *A.holosericea* + *P.tinctorius* H.445 (2 jours). Vue d'ensemble de l'interface. Les hyphes éloignées des cellules corticales présentent une activité phosphatasique vacuolaire et sur la face externe de la paroi. Gr.x 3000. Acétate d'uranyle.

Figure 5 : *A.holosericea* + *P.tinctorius* H.445 (2 jours). Détails de l'interface. Les hyphes en contact avec les cellules corticales présentent une activité phosphatasique vacuolaire et peu d'activité sur la surface externe de la paroi. Gr.x 11761. Acétate d'uranyle.

Figure 6 : *A.holosericea* + *P.tinctorius* H.445 (2 jours). Témoin. Il n'y a pas de marquage. Gr.x 6736. Acétate d'uranyle.

Figures 7, 8 et 9 : *A.holosericea* + *P.tinctorius* H.445 (2 jours). Des activités phosphatasiques plasmalemmiques sont observées sur des hyphes ayant pénétré entre les cellules corticales. Le plasmalemme des cellules corticales est également marqué (fig 7, Gr.x 15833 ; fig.8, Gr.x 13818 ; Fig.9, Gr.x 13933). Acétate d'uranyle.

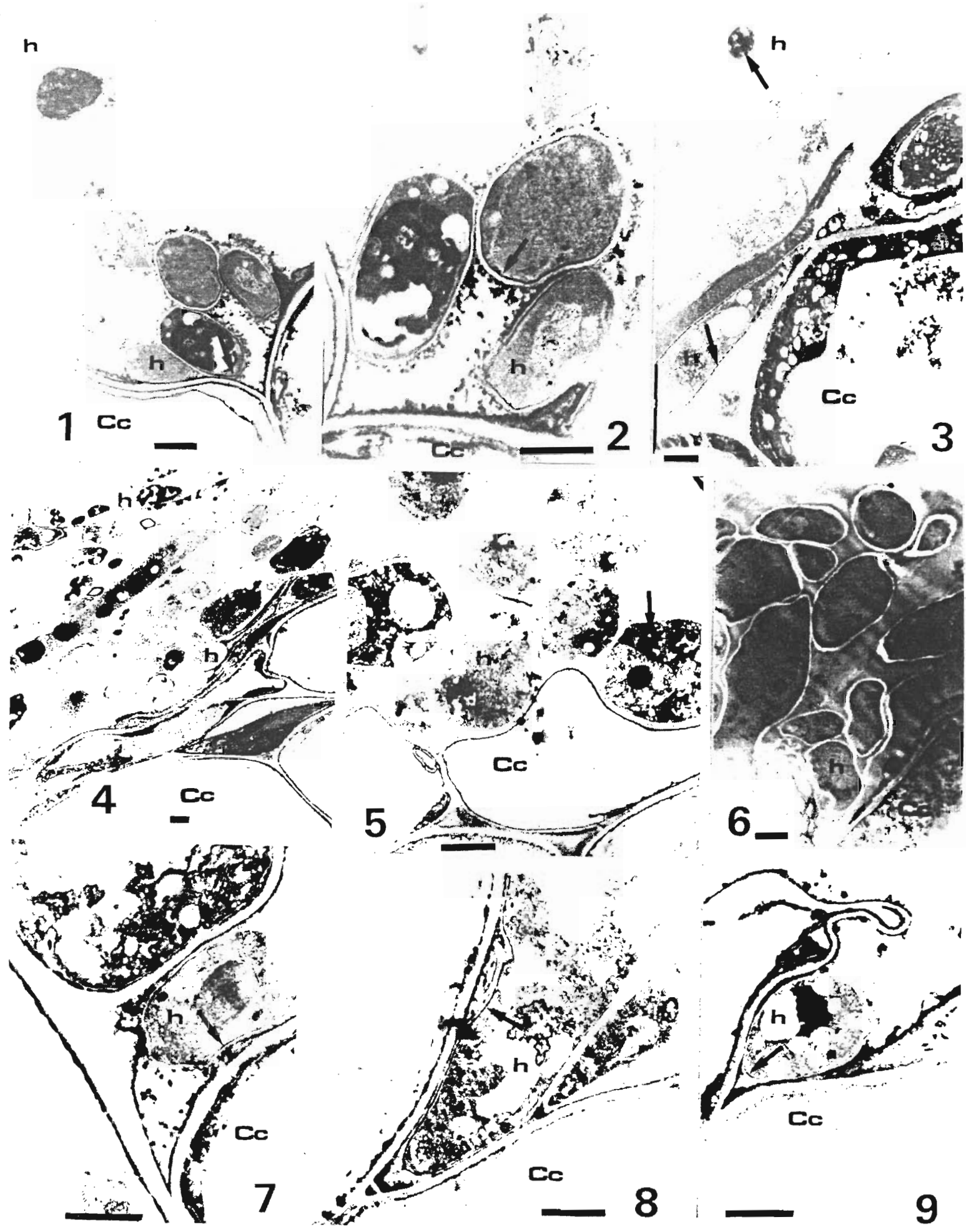


Planche 57

Interaction plante-champignon mycorrhizogène ou non après 2 jours de contact.

Figure 1 : *A.holosericea* + *S.dictyosporum* 7731. Les hyphes éloignées des cellules corticales présentent des activités phosphatasiques acides vacuolaires et sur la surface externe des parois. Gr.x 3750. Acétate d'uranyle.

Figure 2 : *A.holosericea* + *S.dictyosporum* 7731. Vue d'ensemble de l'interface. Lorsque les hyphes sont en contact avec les cellules corticales des activités phosphatasiques sont induites sur le plasmalemme fongique. L'activité plasmalemme est absente lorsque les hyphes en sont éloignées Gr.x 3860. Acétate d'uranyle.

Figures 3 et 4 : *A.holosericea* + *S.dictyosporum* 7731. Détails de l'interface. Une activité plasmalemme fongique est observée au contact des cellules corticales. (fig.3, Gr.x 30000 ; fig.4, Gr.x 31000) (la barre représente 0,5 µm). Acétate d'uranyle

Figure 5 : *A.holosericea* + *S.dictyosporum* 7731. Témoin. Il n'y a pas d'activité. Gr.x 4500. Acétate d'uranyle.

Figure 6 : *E.camaldulensis* + *S.dictyosporum* 7731. Les hyphes éloignées des cellules corticales présentent des activités vacuolaires et sur la face externe des parois. Gr.x 3600. Acétate d'uranyle.

Figure 7 et 8 : *E.camaldulensis* + *S.dictyosporum* 7731. Les hyphes en contact avec les cellules corticales présentent des activités vacuolaires et sur la surface externe de la paroi. Ces activités sont absentes du plasmalemme fongique. (fig 7, Gr.x 4500) (fig.8, Gr.x 28000, la barre représente 0,5 µm). Acétate d'uranyle.

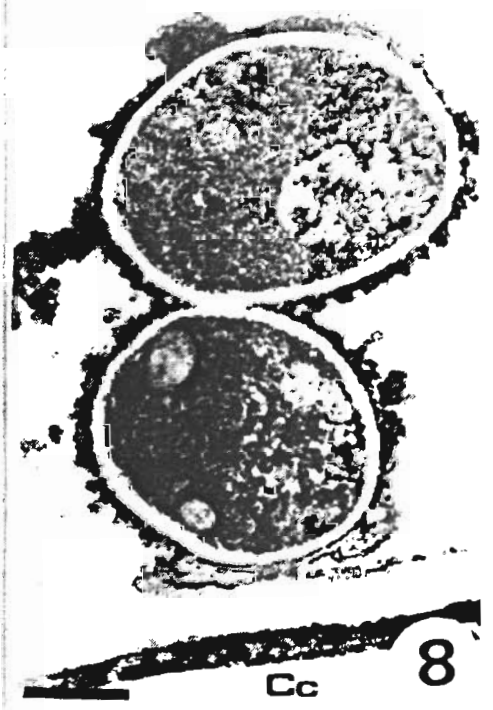
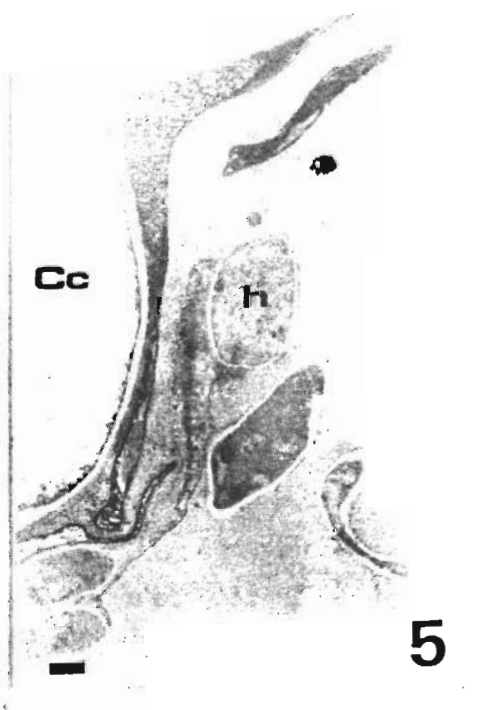
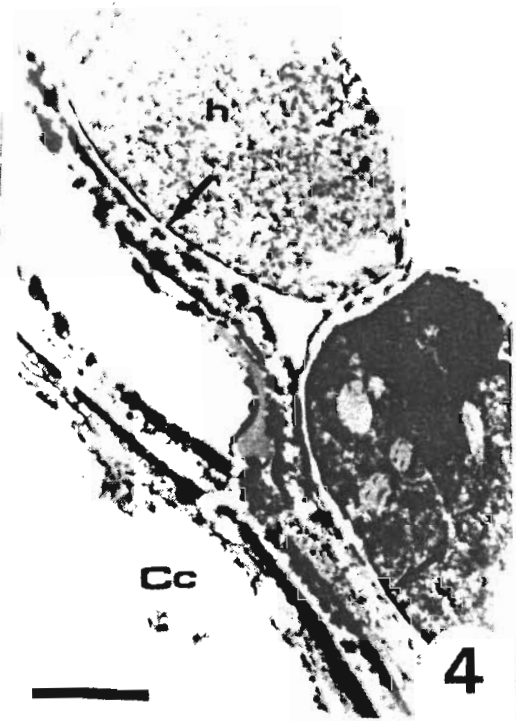
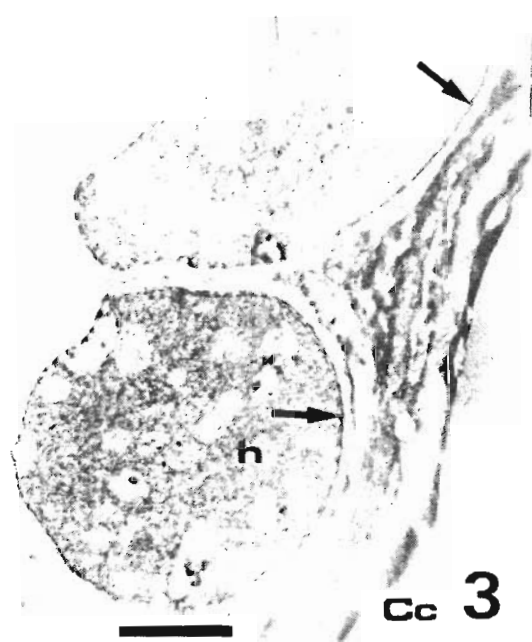
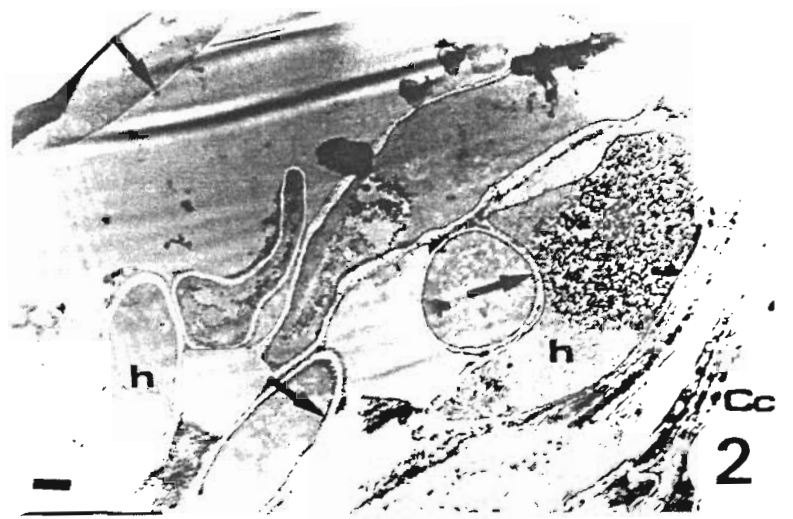
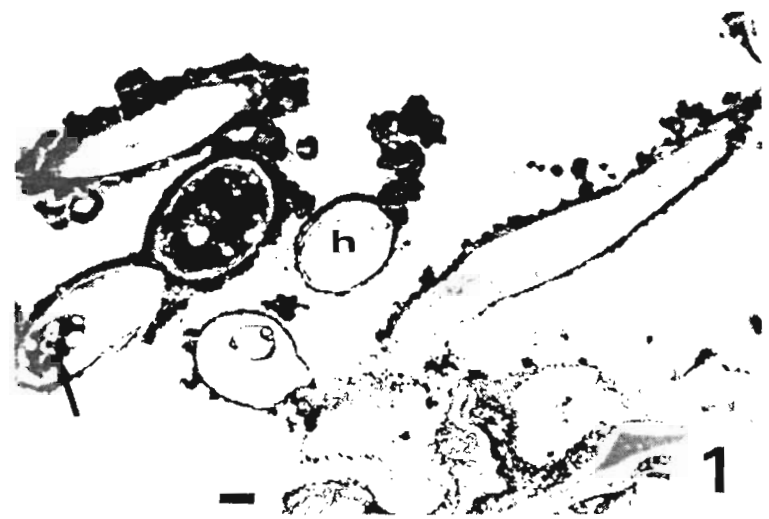


Planche 58

Interaction plante-champignon peu mycorhizogène après 2 ou 21 jours de contact.

Figure 1 : *E.camaldulensis* + *Amanita* sp.(7735) (2 jours). L'interface ne présente pas de fibrilles polysaccharidiques. Gr.x.13018. Test PATAg

Figure 2 : *E.camaldulensis* + *Amanita* sp.(7735) (21 jours). Le champignon a formé un manteau lâche mais très épais. Gr.x 2700.

Figures 3 et 4 : *E.camaldulensis* + *Amanita* sp.(7735) (21 jours). Des pénétrations fongiques en coin sont souvent observées entre les cellules corticales sans qu'un réseau de Hartig se soit mis en place. L'interface ne présente pas de fibrilles polysaccharidiques. (fig 3, Gr.x 5520 et fig 4, Gr.x 14250). Test PATAg

Figure 5 : *E.camaldulensis* + *Amanita* sp.(7735) (21 jours). Noter la présence chez une hyphe d'un dolipore caractéristique des Basidiomycètes. Gr.x 12600. Test PATAg

Figure 6 : *E.camaldulensis* + *Amanita* sp.(7735) (2jours). Les phosphatases acides des hyphes éloignées ou en contact avec les cellules corticales sont localisées dans la vacuole et sur la surface externe de la paroi fongique. Gr.x 4000. Acétate d'uranyle.

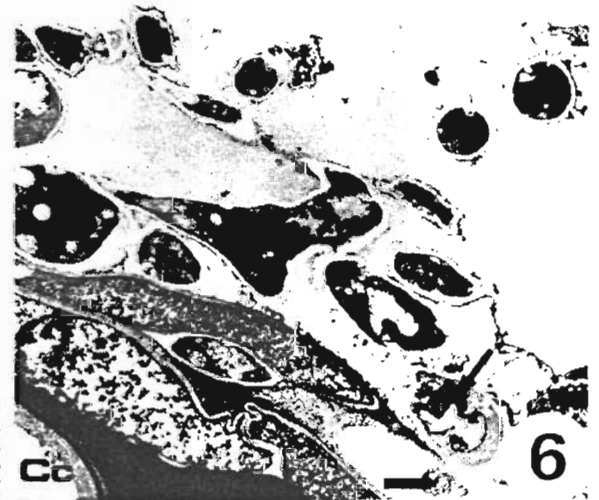
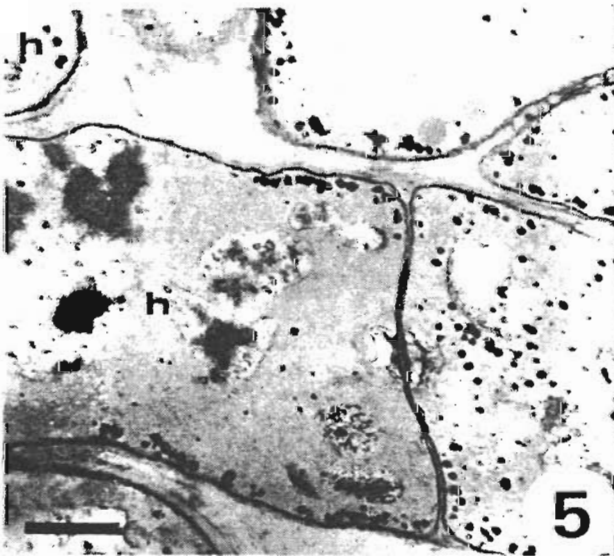
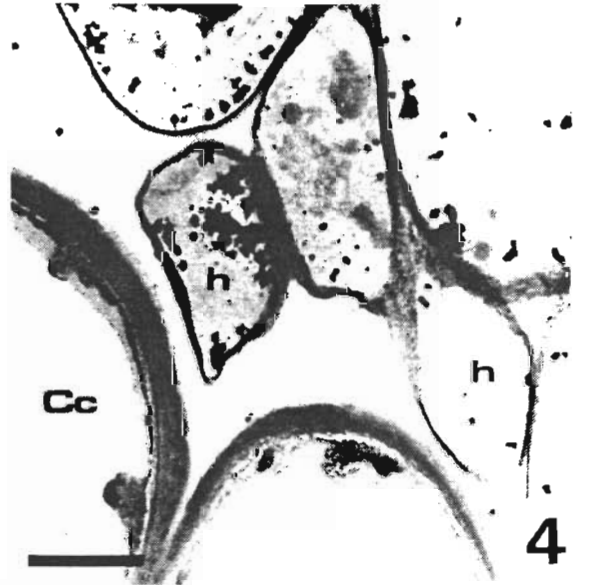
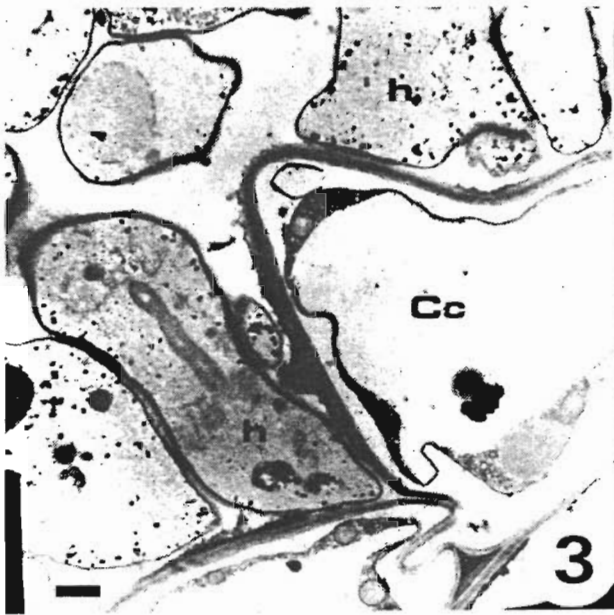
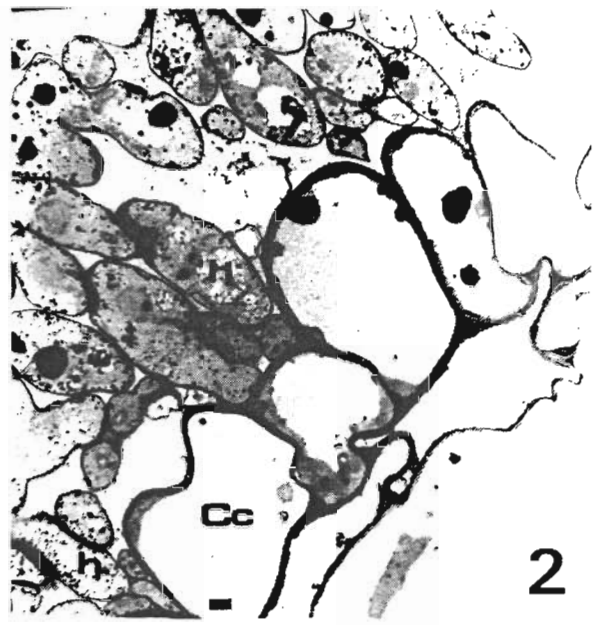
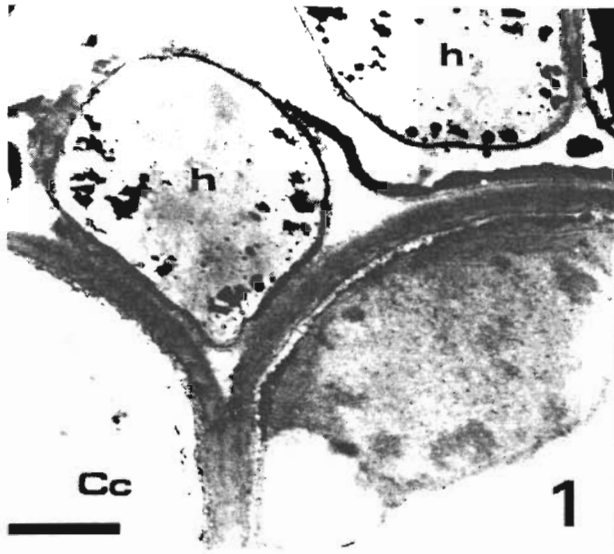


Planche 59

Interaction plante-champignon pathogène après 2 ou 4 jours de contact.

Figures 1 et 2 : *E.camaldulensis* + *Collybia platyphylla* (2 jours) Les hyphes sont en contact avec la surface de la paroi qui peut présenter soit un aspect mucilagineux (fig 1, Gr.x 8781) soit un aspect lisse (fig 2, Gr.x 46200 la barre représente 0,5 µm). Dans tous les cas il n'y a pas de fibrilles polysaccharidiques à l'interface du champignon et de la plante hôte. Test PATAg.

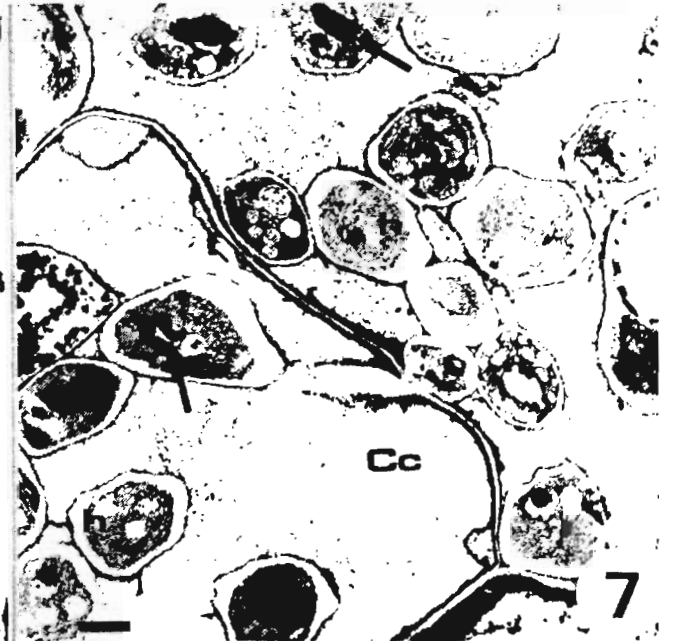
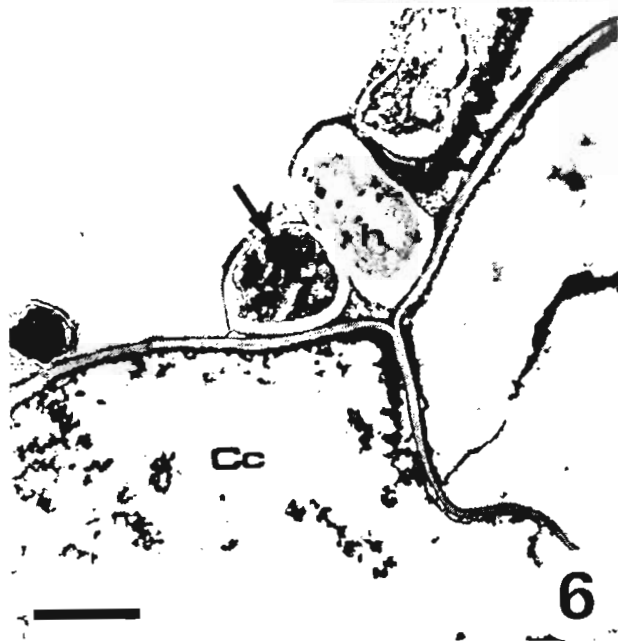
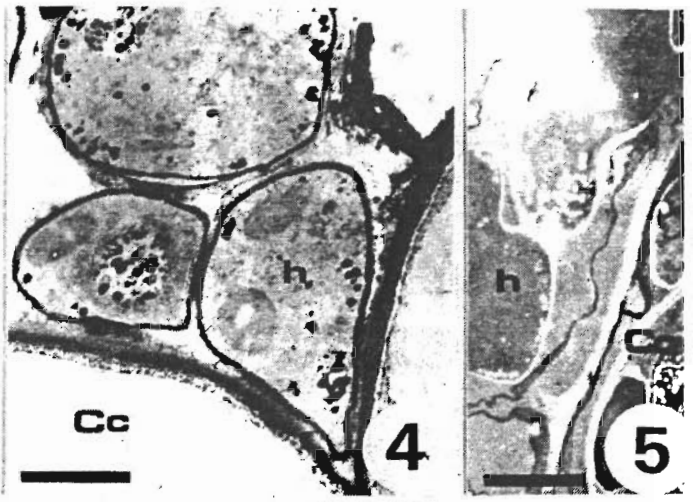
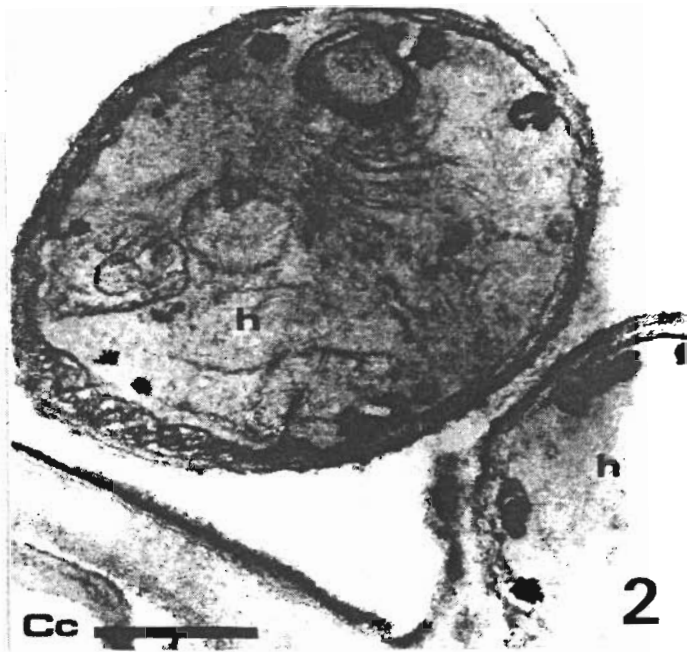
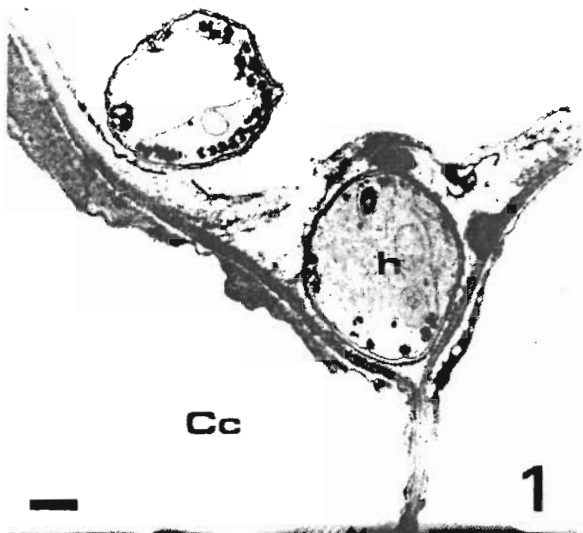
Figure 3 : *E.camaldulensis* + *Collybia platyphylla* (4 jours). Vue d'ensemble de l'interface. Des pénétrations d'hyphes sont observées dans le cytoplasme après lyse de la paroi de la cellule hôte. Gr.x 3700. Test PATAg.

Figure 4 : *E.camaldulensis* + *Collybia platyphylla* (4 jours). Un point de pénétration intercellulaire du champignon. Du mucilage ou des restes de ciment (?) est observé sur la surface de contact entre des hyphes et la plante-hôte. Il n'y a pas de fibrilles polysaccharidiques à l'interface. Gr.x 14820. Test PATAg.

Figure 5 : *E.camaldulensis* + *Collybia platyphylla* (4 jours). Témoin. Il n'y a pas de marquage. Gr.x 13600. Test PATAg.

Figure 6 : *E.camaldulensis* + *Collybia platyphylla* (2 jours). Les hyphes en contact avec les cellules corticales présentent des activités phosphatasiques vacuolaires et sur la surface externe de la paroi fongique. Il n'y a pas d'activité sur le plasmalemme fongique. Gr.x 14681. Acétate d'uranyle.

Figure 7 : *E.camaldulensis* + *Collybia platyphylla* (4 jours). Les hyphes ont pénétré dans le cytoplasme des cellules corticales. Les hyphes éloignées, en contact ou dans les cellules corticales présentent des activités phosphatasiques vacuolaires et sur la surface externe de la paroi fongique. Gr.x 6900. Acétate d'uranyle.



Chapitre 5

Influence de la mycorhization et de la fertilisation phosphatée sur la croissance d'*Azelia africana* Sm.

1. Introduction

Dans les chapitres 1 et 2 nous avons isolé 4 souches fongiques indigènes et montré leur aptitude *in vitro* à s'associer avec *Afzelia africana*. Dans le but de sélectionner des souches fongiques efficaces, nous avons comparé l'effet de la mycorhization par 4 souches fongiques sur la croissance d'*A.africana*. Compte tenu du rôle bien connu de la mycorhization sur la nutrition minérale et en particulier sur la nutrition phosphatée des arbres, il nous est apparu intéressant d'étudier également l'influence de la fertilisation phosphatée sur la mycorhization et la nutrition phosphatée d'*Afzelia africana*.

En zone tropicale, les seules données disponibles sur le rôle des ectomycorhizes concernent les essences introduites, principalement les pins et les eucalyptus. Les expérimentations en pépinière ou sur le terrain montrent l'effet bénéfique de la mycorhization sur la croissance et la nutrition minérale de ces arbres (MOMOH et GBADEGESIN, 1980 ; DELWAULLE *et al.*, 1982 ; KABRE, 1982 ; GARBAYE *et al.*, 1988). Cependant il n'existe pas de données équivalentes de l'effet de la mycorhization sur la croissance et la nutrition des essences indigènes autochtones de la zone tropicale. Le maintien des écosystèmes naturels et la satisfaction des besoins toujours croissants en produits forestiers nécessitent une meilleure connaissance de la sylviculture des essences indigènes. Nous pouvons considérer à priori les mycorhizes comme une composante importante de la sylviculture de ces arbres.

2. Matériel et Méthodes

2.1- Le substrat

Le substrat est constitué par l'horizon C d'un sol brun sableux de la forêt de Bezange (Meurthe et Moselle). La composition physico-chimique de ce sol est en annexe (tableau 2). Le sol a été tamisé de manière à éliminer tous les éléments supérieurs à 2 mm. Il a été utilisé pour l'expérience 1 après désinfection par fumigation au bromure de méthyle. Pour l'expérience 2, il a été utilisé comme tel. Le sol désinfecté ou non est mélangé à des billes de Polystyrène expansé avant utilisation (3:1 ; v/v) afin de corriger son absence de structure et sa tendance à la compaction.

2.2- Dosage du phosphore assimilable dans le sol de Bezange (OLSEN *et al*, 1954)

2.2.1- Principe

Il s'agit d'extraire les formes de phosphore solubles du sol par une solution de bicarbonate de sodium dans des conditions de pH alcalin.

2.2.2- Mode opératoire

Cinq grammes d'un échantillon de sol sec et tamisé (terre fine) en présence de 1g de charbon actif, sont mis en solution dans 100 ml de la solution d'extraction (NaHCO₃, 0,5N). Le mélange est mis en agitation pendant 30 mn puis filtré aussitôt sur filtre (papier Watman n°40) dans l'entonnoir afin de récupérer 50 ml de l'extrait dans un flacon fermé ensuite hermétiquement.

2.2.3- Dosage

Réactifs : Acide ascorbique à 1%.

Réactif sulfomolybdique : 37,5 g.de molybdate d'ammonium

R.P.dans environ 600 ml d'eau distillée. Après dissolution, 300 ml de H₂SO₄ R.P sont ajoutés puis le mélange est jaugé à 1litre après refroidissement.

A 10 ml d'extrait, on ajoute 2 ml de réactif sulfomolybdique et 1 ml d'acide ascorbique. Le mélange est agité et maintenu 5 mn au bain-marie bouillant pour développer la réaction puis refroidi dans un courant d'eau froide. La gamme étalon préparée à partir d'une solution de KH₂PO₄ (5 mg de P par litre d'eau distillée) est traitée dans les mêmes conditions que précédemment (voir en annexe, figure 3). Les concentrations de phosphore soluble sont estimées à partir de la gamme étalon par spectrophotométrie (BECKMAN DU-70) à 660 nm. Les résultats sont exprimés en µg de P par g de sol sec.

2.3- Matériel végétal

Afin de réduire l'hétérogénéité du matériel végétal, nous avons choisi des graines d'*A.africana* dont le poids frais est compris entre 2 et 3 gr. Les graines sont traitées comme dans le chapitre (2) et repiquées lorsque la radicule mesure 2 à 3 cm.

2.4- Préparation de l'inoculum solide

Quatre souches fongiques indigènes ont été utilisées : *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum*, les souches non identifiées XM004 et XM002.

L'inoculum est obtenu par culture du champignon dans un mélange de vermiculite et de tourbe (4:1;v/v) imprégné de milieu nutritif de PACHLEWSKI (1974). Le mélange est d'abord placé à sec dans des bocaux en verre d'environ 1,6 litres remplis au 3/4 et autoclavé à 120°C pendant 20 mn. Le milieu nutritif est ensuite ajouté au mélange (1,2 litres / bocal) pour un deuxième autoclavage (120°C, 20 mn). Les bocaux sontensemencés à raison de 10 implants mycéliens par bocal et mis à incuber à 25°C. Le temps de colonisation du substrat est variable selon la souche. Il est d'environ 1 mois chez la souche de *S.dictyosporum* ou de XM002 et de 2 mois chez la souche XM004. La souche de *S.verrucosum* nécessite environ 3 mois de culture. L'inoculum est apporté à raison de 10% du volume de sol. Il est mélangé avec le sol à la bétonnière. Le mélange est mis ensuite dans des pots de 5 litres (environ 3 kg de terre par pot).

2.5- Fertilisation phosphatée

L'engrais phosphaté a été apporté sous forme de supertriple à 45% de P₂O₅ (0-45-0) dans le sol à 44 ppm de P (cf.paragraphe 2.2). Nous avons étudié l'effet de cet engrais à 3 doses de P.:

- dose 1 : 20 ppm (309,09 mg de P₂O₅ par pot).
- dose 2 : 40 ppm (618,18 mg de P₂O₅ par pot).
- dose 3 : 60 ppm (927,27 mg de P₂O₅ par pot).

L'engrais phosphaté est déposé sur chaque pot puis mélangé avec le substrat sur les 10 premiers centimètres.

2.6- Dispositif et conditions de culture

Pour les deux expériences réalisées à Nancy, les pots sont répartis au hasard sur une tablette métallique (4 x 1,5 m) (pl.60, fig 1). La disposition des pots est modifiée au hasard une fois tous les 2 mois. Une solution nutritive sans phosphore et diluée au 1/10 (voir la composition en annexe, tableau 4), est apportée à raison de 250 ml par pot une fois par semaine.

Pour l'expérience 1 les traitements suivants, répétés 10 fois, ont été étudiés :

- témoin sans inoculation et avec un apport à 4 niveaux de phosphore (P.0, P.20, P.40 et P.60).
- inoculation avec la souche XM002 et sans apport de phosphore (P.0).
- inoculation avec la souche de *S.verrucosum* (7732) et sans apport de phosphore (P.0).
- inoculation avec la souche de XM004 et sans apport de phosphore (P.0).
- inoculation avec la souche de *S.dictyosporum* (7731) et avec 4 niveaux de phosphore (P.0, P.20, P.40.et P60).

Pour l'expérience 2 les traitements suivants, à 3 niveaux de phosphore (P.0, P.40 et P.60) répétés 10 fois, ont été étudiés :

- témoin sans inoculation.
- inoculation avec la souche de XM002.
- inoculation avec la souche de *S.dictyosporum* (7731).

L'expérience 1 a été réalisée en serre chauffée (température maximale 25°C, minimale 10°C ; hygrométrie maximale 90%, minimale 70%) et arrêtée 6 mois après le repiquage des graines (août 1988 à janvier 1989).

L'expérience 2 a été réalisée en serre (température maximale 30°C, minimale 15°C ; hygrométrie maximale 80%, minimale 65%) et arrêtée 5 mois après le repiquage des graines (mi-juin 1989 à mi-novembre 1989). Dans cette expérience des observations ont été effectuées 2 et 3 mois après le repiquage sur le sol à P.0 en déterminant les paramètres suivants : hauteur de l'épicotyle de tous les traitements et indice de mycorhization sur un échantillon de 3 plants par traitement.

2.7- Paramètres étudiés

Nous avons étudié les paramètres suivants :

- indice de mycorhization sur tout le système racinaire (note de 0 à 4, cf.chapitre 3, paragraphe 2.2.3).
- hauteur de la tige (hypocotyle et épicotyle)
- diamètre au collet
- poids sec de la partie aérienne (tige et feuilles) et de la partie racinaire.
- biomasse totale et relative par rapport au témoin (%).

Pour déterminer la biomasse le matériel végétal est séché à l'étuve à 70°C pendant 3 jours.

2.8- Dosage du phosphore foliaire

Le dosage du phosphore foliaire a été effectué par le laboratoire d'analyses végétales de l'I.N.R.A-la Grande-Ferrade (Pont de la Maye).

3. Résultats et Discussion

Expérience 1 :

Il apparaît que les 4 souches fongiques utilisées présentent une aptitude à la mycorhization qui est assez variable au niveau de phosphore normal du sol (tableau 22). Deux souches fongiques (XM002 et 7731) présentent un indice de mycorhization significativement plus important que les souches 7732 et XM004.

Avec les souches les plus infectieuses (XM002 et 7731) la hauteur des plants d'*Azalia* est significativement plus importante que chez tous les autres traitements. Avec la souche XM002 ces différences se traduisent également au niveau des poids secs de la partie aérienne et de la partie racinaire. La biomasse totale qui en résulte va dans le même sens et se traduit par une stimulation de croissance des plants d'*Azalia* de l'ordre 50% par rapport au témoin. Cependant avec la souche 7731 nous n'avons pas observé d'effet significatif sur la biomasse de la partie racinaire alors que la biomasse aérienne et le diamètre au collet sont stimulés par rapport au témoin. Avec cette souche la stimulation de la biomasse totale d'*Azalia* est de l'ordre de 39% par rapport au témoin. Avec les souches les moins infectieuses (7732 ou XM004) nous n'avons pas observé, pour tous les paramètres considérés (à l'exception du diamètre au collet pour XM004), de différence significative par rapport au témoin. L'analyse foliaire du phosphore des plants inoculés avec des souches fongiques infectieuses ou peu infectieuses n'indiquent pas des valeurs différentes de celles du témoin (tableau 22).

Ces premiers résultats permettent de sélectionner les souches fongiques selon leur capacité à coloniser le système racinaire d'*Azalia*. Il apparaît également que la hauteur et la biomasse totale d'*Azalia* peuvent représenter un deuxième critère de sélection car la valeur de ces deux paramètres est significativement plus importante avec les souches infectieuses (XM002 et 7731) qu'avec les souches peu infectieuses (7732 et XM004).

Tableau 22 : Influence de la mycorhization par 4 souches fongiques sur la croissance et la nutrition phosphatée d'*Azelia africana* sur sol désinfecté. (expérience 1).

Traitement PO	Indice de mycorhization (note de 0 à 4)	Hauteur (cm)	Diamètre au collet (cm)	Poids sec Tige et Feuilles (gr. matière sèche)	Poids sec Racines (gr. matière sèche)	Biomasse totale (gr. matière sèche)	Biomasse relative (%)	Phosphore total *
Témoin	0,0 a	21,06 a	0,52 a	1,72 a	0,89 a	2,62 a	100	0,253
XM002	4,0 b	27,97 b	0,52 a	2,43 b	1,61 b	4,04 b	154	0,232
7732	1,3 c	24,86 a	0,48 a	1,77 a	0,92 a	2,70 a	103	0,214
XM004	1,7 c	24,07 a	0,55 b	1,77 a	0,85 a	2,65 a	100	0,179
7731	3,7 b	26,95 b	0,56 b	2,42 b	1,11 a	3,54 b	135	0,212

- Chaque valeur est la moyenne sur 10 plants
- Dans chaque colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de FISHER.
- Les valeurs indiquées en (*) n'ont pas été traitées statistiquement (dosage effectué globalement sur 10 plants). Elles sont exprimées en % de P/g de matière sèche foliaire.

Tableau 23 : Influence de la dose en phosphore sur la mycorhization et la nutrition phosphatée d'*Azelia africana* sur sol désinfecté (expérience 1).

Traitements	Indice de mycorhization (note de 0 à 4)	Hauteur (cm)	Diamètre au collet (cm)	Poids sec Tige et feuilles (gr. matière sèche)	Poids sec Racines (gr. matière sèche)	Biomasse totale (gr. matière sèche)	Biomasse relative (%)	Phosphore total *
P20								
Témoin	0,0 a	21,36 a	0,51 a	1,97 a	0,91 a	2,91 a	100	0,285
7731	3,1 b	27,63 b	0,52 a	2,51 b	1,38 b	3,89 b	133	0,315
P40								
Témoin	0,0 a	20,84 a	0,53 a	2,27 b	1,07 a	3,35 b	100	0,368
7731	2,9 b	27,02 b	0,53 a	2,55 b	1,18 a	3,73 b	111	0,500
P60								
Témoin	0,0 a	24,89 b	0,53 a	2,21 b	0,88 a	3,10 b	100	0,472
7731	2,1 c	26,89 b	0,49 a	2,50 b	1,10 a	3,58 b	115	0,476

- Chaque valeur est la moyenne sur 10 plants.
- Dans chaque colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de FISHER.
- Les valeurs indiquées en (*) n'ont pas été traitées statistiquement (dosage effectué globalement sur 10 plants). Elles sont exprimées en % de P/g de matière sèche foliaire.

Dans nos conditions expérimentales les souches fongiques qui se sont montrées les plus infectieuses (7731 et XM002) ont été également les plus compétitives dans les conditions du piégeage (cf.chapitre 3). Nous pouvons considérer dans les conditions de notre test que ces deux souches sont les plus infectieuses et les plus efficaces. Ces deux souches fongiques ont été ainsi sélectionnées pour l'expérience 2.

Nous avons montré que la teneur en phosphore assimilable du sol (P.0) n'avait pas une influence dépressive sur le taux de mycorhization au moins chez les deux souches les plus infectieuses (tableau 22). Le taux de mycorhization ne semble pas avoir d'influence sur la teneur en phosphore foliaire chez les souches infectieuses ou peu infectieuses au niveau P.0.

Cependant pour des teneurs en phosphore plus élevées (P40 et P.60), nous avons observé un effet dépressif sur l'indice de mycorhization par la souche 7731 (tableau 23). Il apparaît également qu'à ces doses il n'y a pas de différence significative de la biomasse des plants inoculés par rapport au plants non inoculés (tableau 23).

Expérience 2 :

Contrairement à la précédente, l'expérience 2 a été réalisée sur sol non désinfecté et les graines d'*Azalia* ont été repiquées au début de l'été (mi-juin) bénéficiant ainsi de conditions climatiques beaucoup plus favorables. En effet après deux mois de croissance végétative, nous avons obtenu dans le traitement P.0 des hauteurs moyennes de l'épicotyle (tableau 24) tout à fait comparables à la hauteur moyenne des tiges (hypocotyle et épicotyle) 5 mois après le repiquage dans l'expérience 1. *Azalia africana* apparaît très sensible à l'environnement climatique.

Par ailleurs au stade de 2 mois, au moins 50% du système racinaire est colonisé par la souche XM002 alors que nous n'avons pas observé de mycorhize avec la souche 7731 (tableau 24). Les premières mycorhizes de la souche 7731 apparaissent 3 mois après le repiquage (tableau 24).

Après 5 mois de culture il apparaît que sur sol non désinfecté le taux de mycorhization par la souche XM002 est le même quel que soit la dose de phosphore apportée au substrat (tableau 25) (pl.60, fig.4). Cette souche fongique confirme sa capacité infectieuse déjà observée dans l'expérience 1 et dans les expériences de piégeage (cf.chapitre 3). De tous les paramètres considérés nous avons obtenu, avec la souche XM002 et quel que soit le traitement, une stimulation significative de la biomasse totale (tableau 24). Elle résulte d'une augmentation

significative de la biomasse racinaire par rapport au témoin (pl.60, figs 2 et 3). Cette stimulation de la biomasse racinaire a été également obtenue dans l'expérience 1.

Il n'y a pas incompatibilité entre la fertilisation et la mycorhization d'*Afzelia* par la souche XM002 qui tolère des teneurs élevées en phosphore dans le substrat.

Cependant avec la souche fongique 7731, nous avons obtenu un taux de mycorhization des plants d'*Afzelia* relativement faible quel que soit la dose de phosphore apportée (tableau 24). Il s'avère également plus faible que ceux que nous avons obtenus dans l'expérience 1. Des sclérotés de la souche 7731 ont été observés en présence de racines mycorhizées (pl.60, fig.5). Ces sclérotés n'ont jamais été observés dans les expériences du piégeage (cf.chapitre 3). Cette diminution nette du taux de mycorhization par la souche 7731 résulte soit d'une infection tardive soit de l'existence dans le sol non désinfecté de microorganismes antagonistes de l'infection ectomycorhizienne. Nous avons montré dans les expériences de piégeage que la souche fongique 7731 avait une apparition tardive (cf.chapitre 3). Il semble que cette hypothèse soit en partie vraisemblable dans les conditions de l'expérience 2 où nous avons observé les premières mycorhizes 3 mois après le repiquage. Cependant ceci n'explique pas que, deux mois plus tard (c'est à dire 5 mois après le repiquage), nous ayons un taux de mycorhization toujours aussi faible alors que dans l'expérience 1 cette même souche fongique a montré un taux de mycorhization satisfaisant 6 mois après repiquage des graines d'*Afzelia*. L'existence de microorganismes antagonistes de l'infection ectomycorhizienne est bien connue dans la littérature (KABRE, 1982 ; GARBAYE *et al.*, 1989). Dans les conditions de l'expérience 2, il apparaît qu'*Afzelia* est très peu réceptif aux souches ectomycorhiziennes natives du sol de Bezange. Cependant quelques infections sporadiques par *Cenococcum* sp.(pl.60, fig.6) ont été observées sur le système racinaire d'*Afzelia* dans tous les traitements. Le faible taux de mycorhization par la souche 7731 observé dans tous les traitements ne résulte pas de l'infection des racines par des contaminations fongiques du sol de Bezange. L'hypothèse de l'existence de microorganismes antagonistes dans le sol de Bezange est peu vraisemblable dans la mesure où nous avons obtenu dans les mêmes conditions un taux de mycorhization satisfaisant avec la souche XM002.

Dans les deux expériences nous avons utilisé un sol acide, à texture sableuse et pauvre en matière organique. Les caractéristiques physico-chimiques de ce sol rappellent celles des sols du Sénégal (voir en annexe, tableaux 1 et 2). Cependant la teneur en phosphore assimilable du sol de Bezange présente une valeur relativement élevée qui ne paraît pas affecter le taux de mycorhization des souches les plus infectieuses (7731 et XM002).

Tableau 24 : Croissance et mycorhization d'*Azelia* par 2 souches fongiques (*S.dictyosporum* 7731 et XM002) après 2 et 3 mois de culture sur sol non désinfecté de Bezange (expérience 2).

	Indice de mycorhization		Hauteur de l'épicotyle	
	2 mois	3 mois	2 mois	3 mois
Témoin	0	0	24	nd
7731	0	0,9	23,5	nd
XM002	2,3	3,2	22,3	nd

- Indice moyen de mycorhization (note de 0 à 4) déterminé sur 3 plants à P.O.
- Hauteur moyenne de l'épicotyle déterminée sur 10 plants à P.O.

Tableau 25 : Influence de la mycorhization par 2 souches fongiques sur la croissance d'*Azelia africana* sur sol non désinfecté (expérience 2).

Traitement	Indice de mycorhization (note de 0 à 4)	Hauteur de l'hypocotyle (cm)	Hauteur de l'épicotyle (cm)	Hauteur de la tige (cm)	Diamètre au collet (cm)	Poids sec des Feuilles (gr. de mt. sèche)	Poids sec des Tiges (gr. de mt. sèche)	Poids sec Tige + Feuilles (gr. de mt. sèche)	Poids sec Racine (gr. de mt. sèche)	Biomasse Totale (gr. de mt. sèche)	Biomasse relative (%)
P. 0											
Témoin	0,0 a	9,38 a	25,27 a	35,4 a	0,66 a	1,81 a	2,62 a	4,43 a	2,82 a	7,36 a	100
S. d. (7731)	0,3 a	11,56 a	25,52 a	37,2 a	0,80 a	1,81 a	3,06 a	4,87 a	3,09 a	7,36 a	100
XM002	3,6 b	11,32 a	23,6 a	33,7 a	0,83 a	1,61 a	3,23 a	4,83 a	4,80 b	9,78 b	138
P. 40											
Témoin	0,0 a	11,21 a	28,36 a	39,57 a	0,75 a	2,04 a	3,14 a	5,19 a	2,87 a	7,90 a	100
S. d. (7731)	0,6 a	11,12 a	24,66 a	35,66 a	0,78 a	1,56 a	2,91 a	4,48 a	2,95 a	7,36 a	93
XM002	4,0 b	10,64 a	28,74 a	39,28 a	0,88 a	1,76 a	3,53 a	5,29 a	5,77 b	11,06 b	151
P. 80											
Témoin	0,0 a	11,44 a	33,5 a	41,94 a	0,78 a	2,35 a	3,69 a	6,04 a	3,26 a	9,23 a	100
S. d. (7731)	0,1 a	11,84 a	27,22 a	39,28 a	0,91 a	1,84 a	4,24 a	6,09 a	3,87 a	9,74 a	105
XM002	4,0 b	11,02 a	28,84 a	39,91 a	0,89 a	2,07 a	3,63 a	5,70 a	5,89 b	11,86 b	128

- Chaque valeur est la moyenne sur 10 plants.

- Dans chaque colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% selon le test de FISHER.

Bien que réalisées dans des conditions différentes (environnement climatique et sol désinfecté ou non), il apparaît dans les deux expériences une stimulation de la biomasse racinaire des plants d'*Azalia* par la souche fongique XM002. Un meilleur développement du système racinaire pourrait conférer aux plants mycorhizés un avantage important après transplantation sur le terrain (AL ABRAS, 1988).

Planche 60

Figure 1 : Dispositif en serre de l'expérience 2 .

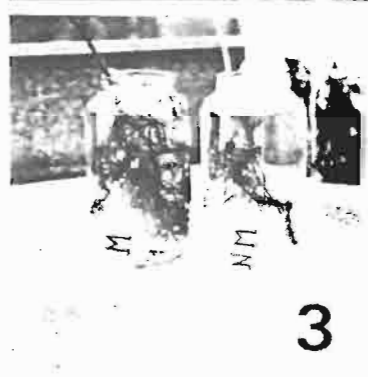
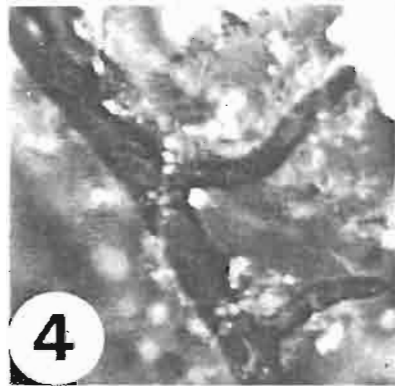
Figure 2 : Plants d'*Azelia* inoculés (M) ou non (NM) avec la souche XM002 après 5 mois de culture en serre. Noter les différences en biomasse racinaire.

Figure 4 : Mycorhizes entre *Azelia* et la souche XM002

Figure 3 : Détails du système racinaire d'*Azelia* mycorhizé (M) ou non (NM) après 5 mois de culture en serre.

Figure 6 : Mycorhizes obtenues entre *Azelia* et une souche fongique (*Cenococcum* sp.) contaminante sur sol non désinfecté.

Figure 5 : Mycorhizes entre *Azelia* et la souche *S.dictyosporum* 7731. Noter la présence de sclérotés.



Conclusions générales

1- Elargissement des connaissances.

Jusqu'à ces dernières années très peu d'études ont été consacrées aux ectomycorhizes des essences forestières autochtones de la zone tropicale. Dans le Sud-Est Asiatique, les forêts claires sont dominées par les Diptérocarpacées qui sont à ectomycorhizes. Ces forêts claires existent également en Afrique intertropicale où la sous Famille des Cesalpinioideae y est fortement représentée chez les essences forestières à ectomycorhizes. Les inventaires forestiers les plus récents révèlent de nouvelles essences forestières à ectomycorhizes en Afrique intertropicale.

Nos travaux sur deux essences forestières indigènes (*Afzelia africana* et *Uapaca guineensis*) ont permis également de montrer une grande richesse et une diversité insoupçonnées de champignons ectomycorhiziens tout à fait comparables à ce que l'on observe en zone tempérée. Elle doit nous amener à reconsidérer une opinion largement répandue selon laquelle la forêt tropicale serait dominée par la symbiose V.A.M. ou par des symbioses ectomycorhiziennes rares et très spécifiques. Une banque de souches indigènes de référence a été constituée à partir d'isolements effectués sur des carpophores, des mycorhizes et des sclérotés (cf. chapitre 1). Pour l'isolement des souches fongiques à partir des mycorhizes, l'acide osmique s'est avéré l'agent désinfectant le plus efficace pour la désinfection superficielle des mycorhizes. Les critères d'identification choisis permettent de rattacher respectivement deux isolats issus de mycorhizes du type "jaune" et du type "blanc à sclérotés" ainsi que l'isolat issu du sclérote aux Gastéromycètes *Scleroderma dictyosporum* Pat. et *Scleroderma verrucosum* Pers. Cependant deux isolats (XM002 et XM004) isolés à partir de mycorhizes ont été comparables à aucune des souches fongiques issues de carpophores.

Pour confirmer le statut mycorhizien d'une souche fongique, on a souvent recours à des tests *in vitro* en conditions axéniques et non axéniques. Dans la littérature les techniques de synthèse proposées tiennent compte de la taille des plants et de la facilité de désinfection des graines. En raison de la taille des plants d'*A. africana* et de son système racinaire très cassant, nous avons recherché une méthode de routine permettant de vérifier expérimentalement l'aptitude ectomycorhizogène d'un grand nombre de souches fongiques (cf. chapitre 2). Parmi les techniques de synthèse proposées, le minirhizotron nous est apparu le plus convenable. Dans ces conditions, l'infection ectomycorhizienne est observée avant l'étalement des premières feuilles, soit 4 jours après l'inoculation de plants d'*A. africana* âgés de 10 à 15 jours. Cette précocité d'infection, comparable à celle des eucalyptus, suggère le rôle des cotylédons dans l'approvisionnement du système racinaire en substrats carbonés. Cependant les tests *in vitro* ne nous ont pas toujours permis de vérifier le statut mycorhizien des souches présumées ectomycorhiziennes. Les conditions environnementales du test ou l'âge des plants d'*A. africana* peuvent interférer sur l'aptitude ectomycorhizogène de ces souches fongiques. Ainsi un isolat

de *Pisolithus* sp.(X003), apte à former des mycorhizes *in situ* avec des plants d'*A.africana* âgés (d'au moins 6 mois), présente au contraire une relation qui rappelle des symptômes de type parasitaire avec des plants moins âgés (10 à 15 jours) en conditions *in vitro*. Cette observation et les données de la littérature suggèrent qu'on ne peut exclure *a posteriori* les souches fongiques dont n'a pas vérifié le statut mycorhizien *in vitro* .

Cependant le choix des souches fongiques pour la pépinière nous oriente vers celles qui ont montré une précocité d'infection. La technique de piégeage, sur sol prélevé sous un arbre adulte, nous a permis de visualiser dans le temps et dans l'espace la séquence d'apparition des différents types de mycorhizes chez des plants d'*A.africana* (cf.chapitre 3). C'est ainsi qu'au moins 6 types de mycorhizes ont été différenciés et caractérisés. Parmi ces types de mycorhizes les souches fongiques de 4 d'entre elles ont été isolées (*Scleroderma verrucosum* 7732 issu des mycorhizes du type "blanc à sclérotés", *Scleroderma dictyosporum* 7731 issu des mycorhizes du type "jaune", XM002 isolat non identifié issu des mycorhizes du type "brun foncé" et XM004 isolat non identifié issu des mycorhizes du type "blanc"). Nous avons classé ces 4 souches fongiques en fonction de leur moment d'apparition : souches fongiques précoces (7732 et XM002) et souches fongiques tardives (7731 et XM004). Nous avons également recherché le déterminisme de ce processus d'infection-addition. Pour cela nous avons formulé deux hypothèses, l'une en relation avec la densité des propagules dans le sol, l'autre avec les besoins nutritifs des souches fongiques précoces ou tardives.

L'examen du sol sec qui a servi au piégeage montre une grande diversité de propagules (mycorhizes, cordons mycéliens et sclérotés) présumées appartenir à des champignons mycorhiziens (cf.chapitre 3). Seules les propagules présumées appartenir aux souches fongiques précoces (XM002 et 7732) ont été mises en évidence. Ces propagules, ayant séjourné dans le sol l'équivalent d'une saison sèche au Sénégal (7 mois), sont parfaitement vivantes. Elles montrent une capacité germinative en présence ou en l'absence du système racinaire d'*A.africana*. Elles sont également infectieuses vis à vis d'*A.africana* dans des délais très courts (7 jours). L'ensemble de ces données suggère fortement que les propagules soient impliquées dans le processus d'infection précoce des jeunes plants d'*A.africana*. Il apparaît ainsi que les champignons ectomycorhiziens tropicaux sont capables de développer différentes stratégies de conservation (en saison sèche) et de dissémination (en saison des pluies).

Nous avons montré que la quantité de sucres solubles des racines latérales augmentait au cours du vieillissement des plants d'*Azelia*. L'effet de l'ablation partielle ou totale des cotylédons sur le ralentissement de la croissance et sur la teneur en sucres solubles des racines latérales d'*A.africana* a été également démontré (cf.chapitre 3). Les souches fongiques tardives ou précoces présentent une aptitude ectomycorhizogène différentielle vis à vis des racines

latérales des plants d'*A. africana* ayant subi l'ablation partielle ou totale des cotylédons. Les souches tardives (7731 et XM004) induisent après ablation totale des cotylédons des modifications pariétales non observées en présence des souches fongiques précoces (XM002 et 7732). Ces modifications de la paroi des cellules corticales (présence de matériel polysaccharidique) sont comparables à celles que nous avons déjà observées entre *A. africana* et *Pisolithus* sp.(X003) (cf.chapitre 2). Ces observations pourraient suggérer des besoins nutritifs plus importants chez les souches tardives.

Lors de l'établissement de la symbiose mycorhizienne, deux types d'interactions existeraient entre la plante et le champignon : des interactions "à longue distance" (rôle des exsudats racinaires) et des interactions "à faible distance" (contact des symbiontes de cellules à cellules). Dans le deuxième type d'interaction le problème de la spécificité et des relations cellulaires qui en découlent est d'une grande importance au plan théorique et pratique. Nous avons montré que des souches fongiques autochtones de la zone tropicale (isolées sous *A. africana* ou *U. guineensis*) sont capables de former *in vitro* des mycorhizes avec des essences australiennes introduites dans l'Ouest africain (*A. holosericea* et *M. leucadendron*) (cf.chapitre 4). Cette observation a des conséquences pratiques importantes dans le choix des souches fongiques efficaces et adaptées au climat lors de l'introduction d'essences forestières en zone tropicale. Au niveau des interactions cellulaires (entre essences forestières introduites et souches fongiques indigènes ou introduites), notre travail s'inscrit dans la continuité des recherches menées à Nancy par l'Université et l'INRA. Chez les 3 associations où le champignon est mycorhizogène nous avons observé à l'interface de tous les couples la présence de fibrilles glycoprotéiques. Nous avons également observé l'induction des activités phosphatasiques acides du plasmalemme des hyphes en contact avec la racine. Il apparaît ainsi que ces réactions (émission de fibrilles glycoprotéiques et activités phosphatasiques acides) sont observées chez tous les couples où le champignon est ectomycorhizogène. La formation des fibrilles glycoprotéiques a été également observée chez un couple (*E. camaldulensis* + *S. dictysporum*) où le champignon est non mycorhizogène. Ce dernier est cependant potentiellement mycorhizien sur une autre espèce végétale (*A. holosericea*). Par contre ces fibrilles glycoprotéiques ne sont pas observées en présence d'un champignon pseudomycorhizien (*Amanita* sp.) ou pathogène (*Collybia platyphylla*). Il apparaît ainsi que la présence de fibrilles glycoprotéiques constitue un niveau d'interaction cellulaire caractéristique des couples où le champignon est mycorhizogène ou potentiellement mycorhizien. Par ailleurs l'induction d'une activité phosphatasique acide du plasmalemme fongique a été observée uniquement chez les couples où le champignon s'est montré ectomycorhizogène. Cette activité enzymatique apparaît comme un autre niveau d'interaction cellulaire et pourrait traduire une fonction spécifiquement symbiotique.

La recherche de souches fongiques efficaces sur la croissance et la nutrition des arbres est le critère décisif de sélection des champignons mycorhiziens. Dans les deux expériences en serre la souche non identifiée XM002 s'est montrée la plus infectieuse et la plus efficace sur sol désinfecté ou non. Il semble que dans les conditions expérimentales de notre étude, la fertilisation phosphatée n'ait pas gêné le développement des mycorhizes. Une stimulation de la biomasse totale et en particulier de celle des racines d'*Afzelia* a été également observée avec la souche XM002. L'avantage pratique d'un plant ayant un bon développement du système racinaire, est considérable lors de la transplantation sur le terrain. Outre cette avantage, la souche fongique XM002 est facile à mettre en culture, résistante à de fortes dessiccations (cf.chapitre 3) et présentent une bonne compétitivité (cf.chapitre 3). Toutes ces propriétés en font une bonne candidate pour l'inoculation en pépinière.

2- Critiques méthodologiques et perspectives de travail

Les résultats présentés dans ce mémoire représentent une première approche dans la compréhension des symbioses ectomycorhiziennes des essences autochtones de la zone tropicale. Ils ont bénéficié de nombreux acquis de la recherche sur les mycorhizes en zone tempérée. Ce travail n'a cependant pas la prétention de répondre à toutes les questions. Quelques problèmes méthodologiques se sont posés à nous, parmi lesquels :

La périodicité dans la fructification des champignons mycorhiziens présente des fluctuations dans des écosystèmes où le climat est fortement saisonnier (saison des pluies très courte, irrégularité dans le temps et dans l'espace des précipitations d'une année à une autre etc...). Les carpophores récoltés sont rarement en bon état et posent des problèmes pour l'identification ou l'isolement. Une meilleure connaissance de la dynamique d'apparition des carpophores en fonction du régime des précipitations apparaît nécessaire.

L'absence d'inventaire exhaustif des différents types de mycorhizes naturelles est une lacune dans ce travail, en particulier chez *A.africana*, bien que quelques mycorhizes naturelles aient été identifiées (*Scleroderma* spp.et XM002). Cependant le but de ce travail chez *A.africana* était beaucoup plus expérimentale que descriptif. Chez *U.guineensis*, des connexions entre carpophores et mycorhizes naturelles ont été établies.

Dans l'expérience de piégeage, la quantification de l'infection ectomycorhizienne a été effectuée sur un échantillon réduit (cf.chapitre 3). Les mycorhizes à forme pyramidale ont été comptées autant de fois qu'il y avait d'apex. Nous avons ainsi surestimé le nombre de racines mycorhizées à forme pyramidale par rapport au nombre de racines à forme monopodiale. Les

monopodiale. Les infections multiples ont rendu nécessaire ce type d'approche. Cependant les deux types de ramification sont présents chez tous les types de mycorhizes. Une tendance du processus d'infection-addition s'est néanmoins dégagée et confirmée par la répétitivité des expériences de piégeage.

Nous avons apporté des compléments d'informations sur l'étude des interactions cellulaires entre le champignon et la plante-hôte. Il convient de caractériser la nature des fibrilles glycoprotéiques observées dans tous les cas de figure (digestion par des solvants organiques ou par des enzymes, recherche des antigènes communs à la surface pariétale des deux partenaires par des lectines "marqueurs"). Il convient également d'y associer des techniques immunocytochimiques pour caractériser les isoformes de phosphatases acides que les techniques classiques de cytoenzymologie ne permettent pas de différencier ou de mettre en évidence.

Au plan pratique, l'inoculation des plants d'*Azalia* est maintenant parfaitement envisageable en pépinière. Le choix des souches fongiques pour l'inoculation doit prendre en compte leur caractère infectieux précoce ou tardif.

Bibliographie

AL ABRAS, K.(1988). La crise de transplantation chez l'épicéa commun. Analyse du comportement des mycorrhizes. Thèse de Doctorat, Université de Nancy I.

AL ABRAS, K., BILGER, I, MARTIN, F., LE TACON, F.& LAPEYRIE, F.F.(1988). Morphological and physiological changes in ectomycorrhizas of spruce (*Picea excelsa* (Lam.) Link.) associated with ageing. *New Phytologist* **110**, 535-540.

ALEXANDER, I.J.(1985). Mycorrhizas of West African forest trees. In : *Proceedings of the 6th North American Conference on Mycorrhizae* (Ed.by R.MOLINA), Forest Research Laboratory, Bend, Oregon, p.447.

ALEXANDER, I.J.(1987). Ectomycorrhizas in indigenous lowland tropical forest and Woodland. In : *Mycorrhizae in the Next Decades* (Ed.by D.M.SYLVA, L.L.HUNG & J.H.GRAHAM), Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, p.115.

ALEXANDER, I.J.& HÖGBERG, P.(1986). Ectomycorrhizas of tropical Angiospermous trees. *New Phytologist* **102**, 541-549.

ALLAWAY, W.G., CARPENTER, J.L.& ASHFORD, A.E.(1985). Amplification of inter-symbiont surface by root epidermal transfert cells in the *Pisonia* mycorrhiza. *Protoplasma* **128**, 227-231.

de ALWIS, D.P.& ABEYNAYAKE, K.(1980). A survey of mycorrhizae in some forest trees of Sri Lanka. In : *Tropical Mycorrhiza Research*.(Ed.by P.MIKOLA), Clarendon Press, Oxford, 146-153.

de ALWIS, D.P.& ABEYNAYAKE, K.(1988). Aseptic synthesis of ectomycorrhizae of *Dipterocarpus zeylanicus*. Trees and mycorrhiza. In : *Proceedings of the Asian Seminar* (Ed.by F.S.P.Ng), Forest Research Institute, Malaysia, 215-226.

ASHFORD, A.E.& ALLAWAYS, W.G.(1982). A sheathing mycorrhiza on *Pisonia grandis* R.BR.(Nyctaginaceaa) with development of transfert cells rather than a Hartig net. *New phytologist* **90**, 511-519.

ASHFORD, A.E.& ALLAWAYS, W.G.(1985). Transfert cells and Hartig net in the root epidermis of the sheathing mycorrhiza of *Pisonia grandis* R.Br. from Seychells. *New Phytologist* **100**, 595-612.

- AYERS, A.R., VALENT, B., EBEL, J.& ALBERSHEIM, P.(1976). Host parasite interactions. XI. Composition and structure of wall released elicitor fractions. *Plant Physiology* **57**, 766-774.
- BA, A.M., SOUGOUFARA, B.& THOEN, D.(1987). The triple symbiosis of *Casuarina equisetifolia* in Sénégal. In : *Mycorrhizae in the Next Decades* (Ed.by D.M.SYLVIA, L.L.HUNG & J.H.GRAHAM), Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, p.121.
- BA, A.M.& THOEN, D.(1989). First syntheses of ectomycorrhizas between *Azelia africana* Sm.(Caesalpinioideae) and native fungi from West Africa. *New Phytologist*, sous presse.
- BEDDIARD, A.(1987). Les possibilités d'association symbiotique de l'aulne glutineux dans divers sols de l'Est de la France. Doctorat de 3ème cycle, Université de Nancy I
- BERHAULT, J.(1967). Flore du Sénégal (Ed.Clairafrique), Dakar.
- BONFANTE-FASOLO, P.& SCANNERINI, S.(1977). Cytological observations on the mycorrhiza *Endogone flammicorona-Pinus strobus*. *Allionia* **22**, 23-34.
- BONFANTE-FASOLO, P.(1984). Morphology and anatomy. In : *V.A.Mycorrhizae* (Eds.C.J.POWELL & D.G.BAGYARAJ), CRC Press, Boca raton, 5-55.
- BONFANTE-FASOLO, P.& GIANINAZZI-PEARSON (1982). Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the Ericaceae. III. Morphology of the dissociated symbionts and modifications occurring during their reassociation in axenic culture. *New Phytologist* **91**, 691-704.
- BONFANTE-FASOLO, P.& GRIPPIOLO, R.(1982). Ultrastructural and cytochemical changes in the wall of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus during symbiosis. *Canadian Journal of Botany* **60**, 2302-2312.
- BOUDARGA, K.(1989). Etude des mycorhizes de l'*Eucalyptus camaldulensis*. Application pratique à la mycorhization de vitroplants. Thèse de Doctorat, Université de Nancy I.
- BOULLARD, B.(1968). Les mycorhizes (Monographie 2) (Eds.Masson et Cie). Saint-Germain, Paris.

BRADLEY, R.K.(1982). Fungi from decayed wood as ectomycorrhizal symbionts of western hemlock. *Canadian Journal of Forest Research* **12**, 36-39.

CHALEMPONGSE, A.(1984). Mycorrhizal survey of dry-deciduous and semi-evergreen dipterocarp forest ecosystems in Thailand. Central Forest Research Laboratory and training centre. Division of Silviculture, Royal Forest department , Bangkok, Thailand.

CHEVALIER, G.(1973). Synthèse axénique des mycorrhizes de *Tuber brumale* Vitt. à partir de cultures pures de champignons. *Annales de Phytopathologie* **5**, 163-182.

CHILVERS, G.A., DOUGLAS, P.A.& LAPEYRIE, F.F.(1986). A paper-sandwich technique for rapide synthesis of ectomycorrhizas. *New phytologist* **103**, 397-402.

CHILVERS, G.A., LAPEYRIE, F.F.& HORAN, D.P.(1987). Ectomycorrhizal vs endomycorrhizal fungi within the same root system. *New phytologist* **97**, 441-448.

CHU-CHOU, M.(1979). Mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* **11**, 557-562.

CHU-CHOU, M.& GRACE, L.J.(1981). Mycorrhizal fungi of *Pseudotsuga menziesii* in the north island of New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* **13**, 557-562.

CHU-CHOU, M.& GRACE, L.J.(1982). Mycorrhizal fungi of *Eucalyptus* in the north island of New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* **14**, 133-137.

CHU-CHOU, M.& GRACE, L.J.(1983). Characterisation and identification of mycorrhizas of Douglas fir in New Zealand. *European Journal of Forest Pathology* **13**, 251-260.

COLEY-SMITH, J.R.& COOKE, R.C.(1971). Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 65-92.

COLEY-SMITH, L.R.(1979). Survival of plant pathogenic fungi in soil in the absence of host plants. In : *Soil-Borne Plant Pathogens* (Eds.B.SCHIPPERS & W.GAMS), London, U.K, Academic Press, 39-57.

COMES, D.(1962). Comment l'oxygène nécessaire à la germination des graines parvient-il à l'embryon ?. *Revue Générale de Botanique* **69**, 563-573.

- DAHM, H., STRZELCZYK, E & MAJEWSKA, L.(1987). Cellulolytic and pectolytic activity of mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes associated with the roots of *Pinus sylvestris*. *Pedobiologia* **30**, 73-80
- DAVIS, R.M.& FUCIK, J.E.(1986). Effect of girdling sour orange seedlings on mycorrhizal development. *Hortscience* **21**, 302-304.
- DAZZO, F.B.& HUBBELL, D.H.(1975). Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. *Applied Microbiology* **30**, 1017-1033.
- DAZZO, F.B.(1980). Lectins and their saccharide receptors as determinants of specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In : *The Cell Surface : Mediator of Developmental Processes* (Eds.S.SUBTELNY & N.K.WESSELS), Academic Press, New York, 277-304.
- DAZZO, F.B.(1982). Plant cell-cell interactions. In : *Cell Interactions and Development : Molecular Mechanisms* (Ed.K.YAMADA), John Wiley, New York, 251-280.
- DAZZO, F.B.& TRUCHET, G.L.(1983). Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Journal of Membrane Biology* **73**, 1-16.
- DEACON, J.W., DONALDSON, S.J.& LAST, F.T.(1983). Sequences and interactions of mycorrhizal fungi on birch. *Plant and Soil* **71**, 257-262.
- DEBAUD, J.C.& GAY, G.(1987). *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytologist* **105**, 429-435.
- DELWAULLE, J.C., DIANGANA, D.& GARBAYE, J.(1982). Augmentation de la production du pin des Caraïbes dans la région côtière du Congo par l'introduction du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. *Revue Forestière Française* **39**, (5), 409-417.
- DENNIS, J.J.(1980). Sclerotia of the Gasteromycete *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Microbiology* **26**, 1505-1507.

- DEXHEIMER, J., GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. (1979). Ultrastructural cytochemistry of the host-fungus interfaces in the endomycorrhizal association *Glomus mosseae*-*Allium cepa*. *Z. Pflanzenphysiol* **92**, 191-206.
- DEXHEIMER, J., GERARD, J., LEDUC, J.P. & CHEVALIER, G. (1985). Etude ultrastructurale comparée des associations symbiotiques mycorrhiziennes *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia claveryi* et *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia leptoderma*. *Canadian Journal of Botany* **63**, 582-591.
- DIEM, H.G. & DOMMERGUES, Y. (1983). The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina*. *Canadian Journal of Botany* **61**, 2822-2825.
- DIGHTON, J. & MASON, P.A. (1985). Developmental biology of higher fungi : mycorrhizal dynamics during forest tree development. In : *Symposium of the British Mycological Society*. Held at the University of Manchester (Eds. by D. MOORE, L.A. CASSELTOM, D.A. WOOD & J.C. FRANKLAND), Cambridge University Press, 117-139.
- DOMINIK, T. (1969). Key to ectotrophic mycorrhizae. *Folia Forestalia Polonica* **15**, serie A, 309-320.
- DOMMERGUES, Y. & MANGENOT, F. (1970). *Ecologie microbienne du sol* (Ed. MASSON), Paris.
- DRING, (1964). Gasteromycetes of West tropical Africa. *Mycological Papers* **98**, 19-22.
- DUDDRIDGE, J.A. (1986a). The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. III. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klozsch) Sing. and 11 species of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the absence of exogenous carbohydrate. *New phytologist* **103**, 457-464.
- DUDDRIDGE, J.A. (1986b). The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. IV. Compatible and incompatible between *Suillus grevillei* (Klozsch) and a number of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the presence of exogenous carbohydrate. *New phytologist* **103**, 465-471.
- EKWEBELAM, S.A. (1977). Isolation of mycorrhizal fungi from roots of caribbean pine. *Transactions of the British Mycological Society* **68**, (2), 201-205.

- EKWEBELAM, S.A.(1980). Preliminary studies of inoculation of *Pinus* spp. with ectomycorrhizal fungi in Nigeria. In : *Tropical Mycorrhiza Research* (Ed.by P.MIKOLA), Clarendon Press, Oxford, 80-81.
- EPSTEIN, L., LACCETTI, L, STAPLES, R.C.& HOCH, H.C.(1987). Cell-substratum adhesive protein involved in surface contact responses of the bean rust fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **30**, 373-388.
- de FARIA, S.M., LEWIS, G.P., SPRENT, J.I.& SUTHERLAND, J.M.(1989). Occurrence of nodulation in the Leguminose. *New phytologist* **111**, 607-619.
- FASSI, B.& FONTANA, A.(1961). Le micorrize ectotrofiche di *Julbernardia seretii*, Caesalpiniaceae del Congo. *Allionia* **7**, 131-137.
- FASSI, B.& FONTANA, A.(1962). Micorrize ectotrofiche di *Brachystegia laurentii* e di alcune altre di Caesalpiniceae minori del Congo. *Allionia* **8**, 121-131.
- FINLAY, R.D.(1989). Functional aspects of phosphorus uptake and carbon translocation in incompatible ectomycorrhizal associations between *Pinus sylvestris* and *Suillus grevillei* and *Boletinus cavipes*. *New Phytologist* **112**, 185-192.
- FLEMING, L.V.(1983). Succession of mycorrhizal fungi on birch : infection of seedlings planted around mature trees. *Plant and Soil* **71**, 263-267.
- FLEMING, L.V.(1985). Experimental study of sequences of ectomycorrhizal fungi on birch (*Betula* sp.) seedling root systems. *Soil Biology and Biochemistry* **17**, (5), 591-600.
- FONTANA, A.& CENTRALLA, E.(1967). Ectomicorrize prodotte da funghi ipogei. *Allionia* **13**, 149-176.
- FORTIN, J.A., PICHE, Y.& LALONDE, M.(1980). Technique for the observation of early morphological changes during ectomycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany* **58**, 361-365.
- FOX, F.M.(1986). Ultrastructure and infectivity of sclerotium-like bodies of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma sacchariolens*, on birch (*Betula* spp.). *Transactions of the British Mycological Society* **87**, (3), 359-369.

- FRANCE, R.C.& REID, C.P.P.(1983). Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* **61**, 964-984.
- FRANK, A.B.(1885). On the root-symbiosis-depending nutrition through hypogeous fungi of certain trees (traduit par J.TRAPPE, 1985). *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **3**, 128-145.
- FRIES, N.(1981). Recognition reactions between basidiospores and hyphae in *Leccinum*. *Transactions of the British Mycological Society* **77**, 9-14.
- GARBAYE, J., MENEZ, J.& WILHELM, M.E.(1986). Les mycorhizes des jeunes chênes dans les pépinières et les régénérations naturelles du Nord-Est de la France. *Acta Oecologia* **7**, (21), n°1, 87-96.
- GARBAYE, J., DELWAULLE, J.C.& DIANGANA, D.(1988). Growth response of eucalyptus in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and Management* **24**, 151-157.
- GENUA, J.M.(1985). A technique for isolating the mycorrhizal fungus *Laccaria laccata* from conifer seedlings. *Plant Disease* **69**, 1080-1081.
- GERDEMANN, J.W.& TRAPPE, J.M.(1974). The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia, Memoir* **5**.
- GIANINAZZI-PEARSON, V.(1984). Host fungus specificity, recognition and compatibility in mycorrhizae. In : *Genes Involved in Plant-Microbe Interactions* (Eds.D.P.S. VERMA & T.H.HOHN), Springer-Verlag, Wien, New-York, 225-253.
- GIANINAZZI-PEARSON, V., BOFANTE-FASOLO, P.& DEXHEIMER, J.(1986). Ultrastructure studies of surface interactions during adhesion and infection by ericoïd endomycorrhizal fungi. In : *Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions.*, NATO ASI series, H4 (Ed.B.Lugtenberg, Springer-verlag), Berlin & Heidelberg, 273-282.
- GIFFARD, P.L.(1974). L'arbre dans le paysage sénégalais. Sylviculture en zone tropicale sèche. C.T.F.T., Dakar.

- GODBOUT, C.& FORTIN, J.A.(1983). Morphological features of synthesized ectomycorrhizas of *Alnus crispa* and *A.rugosa*. *New Phytologist* **94**, 249-262.
- GODBOUT, C.& FORTIN, J.A.(1985). Synthesized ectomycorrhizae of aspen : fungal genus level of structural characterisation. *Canadian Journal of Botany* **63**, 252-262.
- GOLD, R.E.& MENDGEN, K.(1983). Vegetative development of *Uromyces appendiculatus* var.*appendiculatus* in *Phaseolus vulgaris*. *Canadian Journal of Botany* **62**, 2003-2010.
- GOMORY, G.(1952). Microscopic histochemistry. Chicago, University of Chicago Press.
- GRENVILLE, D.J., PETERSON, R.L.& PICHE, Y.(1985a). Sclerotia as viable sources of mycelia for the establishment of ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Microbiology* **31**, (12), 1085-1088.
- GRENVILLE, D.J., PETERSON, R.L.& PICHE, Y.(1985b). The development, structure, and histochemistry of sclerotia of ectomycorrhizal fungi. I. *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany* **63**,(8), 1402-1411.
- GRENVILLE, D.J., PETERSON, R.L.& PICHE, Y.(1985c). The development, structure, and histochemistry of sclerotia of ectomycorrhizal fungi. II. *Paxillus involutus*. *Canadian Journal of Botany* **63**, (8), 1412-1417.
- HACSKAYLO, E.(1953). Pure culture synthesis of pine mycorrhizae in terralite. *Mycologia* **45**, 971-975.
- HARLEY, J.L.(1948). Mycorrhiza and soil ecology. *Biological Review* **23**, 127-158.
- HARLEY, J.L.& SMITH, S.E.(1983). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, New York & London.
- HARLEY, J.L.(1985). Specificity and penetration of tissues by mycorrhizal fungi. In : *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Science)* **94**, (2&3), 99-109.
- HALVERSON, L.J.& STACEY, G.(1986). Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiological Reviews* **50**, (2), p.193-225.

HEIM, R.(1937). Les Lactario-Russulés du domaine oriental de Madagascar. *Prodrome de la Flore Mycologique de Madagascar* 1, pl.I-VIII, figs.1-56.

HEIM, R.(1955). *Lactarius*. *Flore Iconographique des Champignons du Congo* fasc.4, Jardin Botanique National de Belgique.

HEIM, R.(1970). Particularités remarquables des Russules tropicales Pelliculariae lilliputiennes: les complexes annulata et radicans. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 86, 59-57.

HEINEMANN, P.(1954). Boletineae. *Flore Iconographique des Champignons du Congo*, Fasc.3, pl.9-12, 50-80.

HEINEMANN, P.(1959). Cantharellineae. *Flore Iconographique des Champignons du Congo*, Fasc.8, pl.26-28, 153-165.

HEINEMANN, P.(1966). Hygrophoraceae, *Laccaria* et Boletineae 2 (compléments). *Flore Iconographique des Champignons du Congo*, Fasc.15, pl.47-49, 279-308.

HEINEMANN, P.& RAMMELOO, J.(1983). Gyrodontaceae p.p.(Boletineae). *Flore Illustrée des Champignons de l'Afrique Centrale*, Fasc.10, pl.32-35, 183-198.

HÖGBERG, P.& NYLUND, J.E.(1981). Ectomycorrhizae in coastal miombo woodland of Tanzania. *Plant and Soil* 63, 283-289.

HÖGBERG, P.(1982). Mycorrhizal associations in some woodlands and forest trees and shrubs in Tanzania. *New Phytologist* 92, 407-415.

HÖGBERG, P.(1986). Mycorrhizas and nitrogen-fixing root nodules in trees in East and South-Central Africa. Dissertation, St.n°5. Swedish University of Agriculture Sciences, Department of Forest Site Research.

HÖGBERG, P.& PIEARCE, G.D.(1986). Mycorrhizas in Zambian trees in relation to host taxonomy, vegetation type and successional patterns. *Journal of Ecology* 74, 775-785.

HORAN, D.P., CHILVERS, G.A.& LAPEYRIE, F.F.(1988). Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytologist* 109, 451-458.

JACQUELINET-JEANMOUGIN, S.(1986). Les endomycorhizes de *Gentiana lutea* : Détermination des champignons symbiotiques ; Aspects physiologiques et ultrastructuraux de ces associations. Thèse de Doctorat, Université de Dijon.

JANOS, D.P.(1983). Tropical mycorrhizas, nutrient cycles and plant growth. In : *Tropical Rain Forest : Ecology and Management* (Eds.by S.L.SUTTON, T.C.WHITMORE and A.C.CHADWICK), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 327-345.

JANOS, D.P.(1984). Mycorrhizal fungi : agents or symptoms of tropical community composition ?. In : *Proceedings of the 6th North American Conference on Mycorrhizae* (Ed.by R.MOLINA), Forest Research Laboratory, Bend, Oregon, 98-103.

JANSE, J.M.(1896). Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanaises. *Annales de Jardin Botanique Buitenzorg* **14**, 53-212.

JOHNSTON, A.(1949). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in Sea Island cotton and other tropical plants. *Tropical Agriculture, Trinidad* **26**, 118-121.

JENIK, J.& MENSAH, K.O.A. (1967). Root system of tropical trees. I. Ectotrophic mycorrhizae of *Azalia africana* Sm. *Preslia* **39**, 59-65.

KABRE, A.(1982). Mycorrhization de *Pinus caribaea* (morelet) var. *Hondurensis* dans différents sols du Sénégal. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle, Université de Nancy I.

KOTTKE, I., GUTTENBERGER, M., HAMPP, R.& OBERWINKLER, F.(1987). An *in vitro* method establishing mycorrhizae on coniferous tree seedlings. *Trees* **1**, 191-194.

LADAH, J.K.& WATANABE, I (1984). Antigenic analysis of *Anabaena azollae* and the role of lectin in the *Azolla-anabaena* symbiosis. *New Phytologist* **98**, 295-300.

LAIHO, O.(1970). *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. *Acta Forestalia Fennica* **106**, 1-72.

LALONDE, M., CALVERT, H.E.& PINE, S. (1981). Isolation and use of *Frankia* strains in actinorrhizae formation. In : *Current Perspectives in Nitrogen Fixation* (Eds.by A.H.GIBSON & N.E.NEWTON), *Australian Journal of Science*, Canberra, 296-299.

LAMB, R.J.& RICHARDS, B.N.(1970). Some mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* and *P.elliottii* var.*elliottii* in Australia. *Transactions of the British Mycological Society* **54**, (3), 371-378.

LAMB, R.J.(1979). Factors responsible for the distribution of mycorrhizas of *Pinus* in eastern Australia. *Australian Forest Research* **9**, 25-34.

LAPEYRIE, F.F.(1983). Recherches préliminaires sur le rôle des ectomycorhizes dans l'implantation d'*Eucalyptus delegatensis* en France. Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Université Claude-Bernard Lyon I.

LAPEYRIE, F.F.& CHILVERS, G.A.(1985). An endomycorrhiza-ectomycorrhiza succession associated with enhanced growth of *Eucalyptus dumosa* seedlings planted in calcareous soil. *New Phytologist* **100**, 93-104.

LAPP, M.S.& SKOROPAD, W.P.(1978). Nature of adhesive material of *Colletotrichum graminicola* appressoria. *Transactions of British Mycological Society* **70**, 221-223.

LARSEN, M.J.& ZAK, B.(1978). *Byssoporia* gen.nov.: taxonomy of the mycorrhizal fungus *Poria terrestris*. *Canadian Journal of Botany* **56**, 1122-1129.

LAST, F.T., MASON, P.A., WILSON, J.& DEACON, J.W.(1983). Fine roots and sheathing mycorrhizas : their formation, function and dynamics. *Plant and Soil* **71**, 9-12.

LEACH, J.E., CANTRELL, M.A.& SEQUIERA, L.(1982). A hydroxyproline-rich bacterial agglutinin from potato : extraction, purification and characterisation. *Plant Physiology* **70**, 1353-1358.

LEE, S.S.(1988). The ectomycorrhizas of *Shorea leprosula*. Trees and mycorrhiza. In : *Proceedings of the Asian Seminar* (Ed.by F.S.N.Ng), Forest Research Institute, Malaysia, 189-206.

LEI, J.(1988). Etude expérimentale des systèmes symbiotiques mycorrhiziens de quelques essences ligneuses. Application pratique à la mycorrhization de vitroplants. Thèse de doctorat, Université de Nancy I.

LEVISOHN, I.(1957). Antagonistic effect of *Alternaria tenuis* on certain root-fungi of forest trees. *Nature* **179**, 1143-1144.

- LEWIS, D.H.& SMITH, D.C.(1967). Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plant. I Distribution, physiology and metabolism. *New phytologist* **66**, 143-184.
- LIM, L.L., FINERAN, B.A.& COLE, A.L.J.(1983). Ultrastructural of intrahyphal hyphae of *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerdeman and Trappe in roots of white clover (*Trifolium repens* L.). *New Phytologist* **95**, 231-239.
- LINDEBERG, G.& LINDEBERG (1980). Stimulation of litter-decomposing Basidiomycetes by flavonoids. *Transactions of the British Mycological Society* **75**, (3), 455-459.
- LITTKE, W.R., BLEDSOE, C.S., NADKARNI, N.M.& EDMONDS, R.L.(1980). Technique for rapid mycorrhizal colonization of container-grown douglas fir by *Hebeloma crustuliniforme*. *Soil Biology and Biochemistry* **12**, 575-578.
- LOCQUIN, M. & LANGERON, M.(1978). Manuel de microscopie. (Ed.Masson) Paris.
- LOUIS, I & SCOTT, E.(1988). Technique for studying mycorrhizal establishment in roots cultures of *Shorea roxburghii*. Trees and mycorrhiza. In : *Proceedings of the Asian Seminar* (Ed.by F.S.N.Ng), Forest Research Institute, Malaysia, 907-914.
- MACHADO, A.D., WILLIAMS, W.A.& TUCKER, C.L.(1974). Dry matter contributions by cotyledons of lima beans and other epigeal legumes. *Crop Science* **36**, 561-566.
- MALAISSSE, F.(1973). Contribution à l'étude de l'écosystème forêt claire (miombo). Note 8. Le projet Miombo. *Annales de l'Université d'Abidjan* **6**, E, (2), 227-250.
- MALAJCZUK, N., MOLINA, R.& TRAPPE, J.M.(1982). Ectomycorrhizas formation in *Eucalyptus* . I. Pure culture synthesis, host specificity and mycorrhizal compatibility with *Pinus radiata*. *New phytologist* **91**, 467-482.
- MALAJCZUK, N., MOLINA, R.& TRAPPE, J.M.(1984). Ectomycorrhizas formation in *Eucalyptus*. II. The ultrastructure of compatible and incompatible mycorrhizal fungi and associated roots. *New phytologist* **95**, 43-53.
- MALAJCZUK, N., DELL, B.& BOUGHER, N.L.(1987). Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. III.Superficial ectomycorrhizas initiated by *Hysterangium* and *Cortinarius* species. *New Phytologist* **105**, 421-428.

MALAJCZUK, N., LAPEYRIE, F.F.& GARBAYE, J.(1989). Infectivity of two isolates of *Pisolithus tinctorius* isolated from beneath pines and eucalypts respectively on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. I. Mycorrhizal formation in model systems. *New phytologist*, sous presse.

MALLOCH, D.W., PIROZINSKI, K.A.& RAVEN, P.H.(1980). Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plant (a review). In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A., **77**, 2113-2118.

MARSHALL, K.C., CRUICKSHANK, R.H.& BUSHBY, H.V.A.(1975). The orientation of certain root-nodule bacteria at interfaces, including legume root-hair surfaces. *Journal of General Microbiology* **91**, 198-200.

MARX, D.H.& ZAK, B.(1965). Effect of pH on mycorrhizal formation of slash pine in aseptic culture. *Forest Science* **11**, 66-75.

MARX, D.H.(1969). The influence of ectotropic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* **59**, 153-163.

MARX, D.H., HATCH, A.B.& MENDICINO, J.F.(1977). High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Botany* **25**, 1569-1574.

MARX, D.H.(1980). Ectomycorrhizal fungus inoculations : a tool for improving forest on practices. In : *Tropical Mycorrhiza Research* (Ed.by P.MIKOLA), Clarendon Press, Oxford, 13-71.

MASON, P.A.(1980). Aseptic synthesis of sheathing (ecto) mycorrhizas. In : *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists* (Eds.D.S.INGRAM & J.P.HELGESON), Blackwell Scientific Oxford, 173-178.

MASON, P.A., LAST, F.T., PELHAM, J.& INGLEBY, K.(1982). Ecology of some fungi associated with and ageing stand of birches (*Betula pendula* and *Betula pubescens*). *Forest Ecology and Management* **4**, 19-39.

- MASON, P.A., WILSON, J., LAST, F.T.& WALKER, C.(1983). The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. *Plant and Soil* **71**, 247-256.
- MELIN, E.(1921). Über die mykorrhizenpilze von *Pinus sylvestris* L.und *Picea abies* L. *Karst.Svensk.Bot.Tidkr* **15**, 192-203.
- MENDGEN, K.(1978). Attachment of bean rust cell wall material to host and non-host plant tissue. *Archives of Microbiology* **119**, 113-119.
- MILLER, G.L.(1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, (3), 426-428.
- MIKOLA, P.(1948). On the physiology and ecology of *Cenococcium graniforme* especially as a mycorrhizal fungus on birch. *Commun.Inst.For.Fenn.* **36**, 1-101.
- MIKOLA, P.(1970). Mycorrhizal inoculation in afforestation. In : *International Review of Forestry Research* (Eds.by J.A.ROMBERGER & P.MIKOLA) **3**, Academic Press, New York and London, 123-196
- MIKOLA, P.(1973). Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. In : *Ectomycorrhizae, their Ecology and Physiology* (Eds.G.C.MARKS & T.T.KOZLOWSKI), Academic Press, London, 383-411.
- MIKOLA, P.(1980). Tropical Mycorrhiza Research. Clarendon Press, Oxford & New York.
- MOLINA, R.(1981). Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. *Canadian journal of Botany* **59** (3), 325-334.
- MOLINA, R.& PALMER, J.G.(1982). Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In : *Methods and Principles of Mycorrhizal Research* (Ed.SCHENCK), The American Phytopathology Society, 115-129.
- MOLINA, R.& TRAPPE, J.M.(1982a). Lack of mycorrhizal specificity by the Ericaceous hosts *Arbutus-menziessii* and *Arctostaphylos uva-ursi*. *New phytologist* **90**, 495-509.

MOLINA, R.& TRAPPE, J.M.(1982b). Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential amongst pacific northest conifers and fungi. *Forest Science* **28**, 423-457.

MOLINA, R.& TRAPPE, J.M.(1984). Mycorrhiza management in bare-root nurseries. In : *Forest Nursery Manual : Production of Bareroot Seedlings* (Eds.M.L.DURYEA & T.D.LANDIS), MARTINUS NIJHOFF & Dr.W.JUNK Publishers, The Hague/Boston/Lancaster for Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis, 211-223.

MOMOH, Z.O.& GBADEGESIN, R.A.(1980). Field performance of *Pisolithus tinctorius* as a mycorrhizal fungus of pines in Nigeria. In : *Tropical Mycorrhiza Research* (Ed.by P.MIKOLA), Clarendon Press, Oxford, 72-79.

MOSSE, B., STRIBLEY, D.P.& LE TACON, F.(1981). Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. *Advances in Microbial Ecology* **5**, 137-210.

NAPOLI, C., DAZZO, F.& HUBBELL, D.(1975). Production of cellulose microfibrils by *Rhizobium*. *Applied Microbiology* **30**, (1), 123-131.

NEWBERY, D.M., ALEXANDER, I.J., THOMAS, D.W.& GARTLAN, J.S.(1988). Ectomycorrhizal rain-forest legumes and soil phosphorus in Korup National Park, Cameroon. *New phytologist* **109**, 433-455.

de OLIVEIRA, V.L.& GARBAYE, J.(1989). Les microorganismes auxilliaires de l'établissement des symbioses mycorrhiziennes. *European Journal of Forest Pathology* **19**, 54-64.

OLSEN, S.R., COLE, L.V., WATANABE, F.S.& DEAN, L.A.(1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circular of U.S.Department of Agriculture, n°939.

ONYILE, A.B., EDWARDS, H.H.& GESSNER, R.V.(1982). Adhesive material of the hyphopodia of *Buergenerula spartinae*. *Mycologia* **74**, (5), 777-784.

PALENZONA, M.(1969). Sintesi micorrizica tra *Tuber aestivum* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt. e semenzali di *Corylus avellana* L. *Allionia* **15**, 121-131.

- PEGLER, D.N.(1977). *A preliminary Agaric Flora of East Africa*. Kew Bulletin Additional Series VI, figs.1-129, HMSO, London, 1-615.
- PEGLER, D.N.(1983). *Agaric Flora of the Lesser Antilles*. Kew Bulletin Additional Series IX, pl.1-27, figs.1-129, HMSO, London, 1-668.
- PEYRONEL, B.& FASSI, B.(1957). Micorrize ectotrofiche in una Caesalpiniaceae del Congo Belge. *Atti della Accademia delle Scienze di Torino* **91**, 569-576.
- PEYRONEL, B.& FASSI, B.(1960). Nuevo casi de symbiosi ectomicorrizici in Leguminose della famiglia delle Caesalpiniacea. *Atti della Accademia delle Scienze di Torino* **94**, 36-38.
- PHILLIPS, J.M.& HAYMAN, D.S.(1970). Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**, 158-161.
- RAMBELLI, A.(1971). Preliminary mycological studies on the forest and savanna soils of the Ivory Coast. *Review of Ecology and Biology of soil* **8**, 219-226.
- RAMSTEDT, M.& SÖDERHÄLL, K.(1983). Protease, phenoloxidase and pectinase activities in mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **81**, (1), 157-160.
- RIESS, S.& RAMBELLI, A.(1980). Preliminary notes on mycorrhizae in a natural tropical rain forest. In : *Tropical Mycorrhiza Research* (Ed.by P.MIKOLA), Clarendon Press, Oxford, 141-145.
- READ, D.J., KIANMEHR, H.& MALIBARI, A.(1977). The biology of mycorrhiza in *Helianthemum* Mill. *New Phytologist* **78**, 305-312.
- REDHEAD, J.F.(1968a). Mycorrhizal associations in some Nigerian forest trees. *Transactions of the British Mycological Society* **51**, 377-387.
- REDHEAD, J.F.(1968 b). *Inocybe* sp.associated with ectotrophic mycorrhiza on *Azelia bella* in Nigeria. *Commonwealth Forestry Review* **47**, 63-65.
- REDHEAD, J.F.(1974). Aspects of the biology of mycorrhizal associations occurring on the tree species in Nigeria. Ph.D. Thesis, University of Ibadan, Nigeria.

- REDHEAD, J.F.(1980). Mycorrhiza in natural tropical forest. In : *Tropical Mycorrhiza Research* (Ed.by P.MIKOLA), Clarendon Press, Oxford, 127-142.
- REDHEAD, J.F.(1982). Ectomycorrhizae in the tropics. In : *Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity* (Eds.by Y.DOMMERGUES & H.G.DIEM), JUNK, The Hague, 253-269.
- REID, C.P.P., KIDD, F.A.& EKWEBELAM, S.A.(1983). Nitrogen nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine. *Plant and Soil* **71**, 415-432.
- REYNOLDS, E.S.(1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of the Cell Biology* **17**, 208-212.
- RIEDACKER, A.(1974). Un nouvel outil pour l'étude des racines et de la rhizosphère : le minirhizotron. *Annales des Sciences Forestières* **31** (2), 129-134.
- RYVARDEN, L.& JOHANSEN, J.(1980). *A preliminary Polypore Flora of East Africa*. Fungiflora, Oslo.
- SCANNERINI, S.& BOFANTE-FASOLO, P.(1982). Données actuelles sur la cytologie des mycorhizes. Dans : *Les Mycorhizes, Partie Intégrante de la Plante : Biologie et Perspectives d'Utilisation* **13**, (Ed.INRA), 25-40.
- SCHNELL, R.(1976). La flore et la végétation de l'Afrique tropicale. Introduction à la Phytogéographie des Pays Tropicaux **3**, (Ed.GAUTHIER-VILLARS).
- SEQUIERA, L.(1978). Lectins and their role in host-pathogen specificity. *Annual Review of Phytopathology* **16**, 453-481.
- SEQUIERA, L.(1984). Recognition systems in plant-pathogen interactions. *Biology of Cell* **51**, 281-286.
- SHAW, C.G.& SIDLE, R.C.(1982). Evaluation of planting sites common to a southeast Alaska clear-cut. II. Available inoculum of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *Canadian Journal of Forest Research* **13**, 9-11.
- SINGER, R.(1962). *The Agaricales in Modern Taxonomy*, (Ed.J.CRAMER), New York.

- SINGER, R.& ARAUJO, I.J.G.(1979). Litter decomposition and ectomycorrhiza in Amazonian forests. I. A comparison of litter decomposing and ectomycorrhizal Basidiomycetes in latosol-terra-firme rain forest and white podzol campinarana. *Acta Amazonica* 9, 25-41.
- SINGH, K.G.(1966). Ectotrophic mycorrhiza in equatorial rain forests. *Malayan Forester* 39, 13-19.
- SINGH, S.G.& KUMAR, A.(1966). Field survey of mycorrhiza in eucalyptus and pines. *Indian Forester* 92, 517-520.
- SMIT, G., KIJNE, J.W.& LUGTENBERG, B.J.J.(1987). Involvement of both cellulose fibrils and a Ca⁺⁺ dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *Journal of Bacteriology* 169, 4294-4301.
- SOUTHWOOD, T.R.E.(1977). Habitat, the templet for ecological strategies ?. *Journal of Animal Ecology* 46, 337-365.
- SPRENT, J.I.(1989). Which steps are essential for the formation of functional legume nodules ?. *New Phytologist* 111, 129-153.
- STRAKER, C.J., GIANINAZZI-PEARSON, V., GIANINAZZI, S., CLEYET-MAREL, J.C.& BOUSQUET, N.(1989). Electrophoretic and immunological studies on acid phosphatase from a mycorrhizal fungus of *Erica hispidula*. *New Phytologist* 111, 215-221.
- THAPAR, H.S., SINGH, B.& BAKSHI, B.K.(1967). Mycorrhizae in *Eucalyptus*. *Indian Forester* 93, 756-759.
- THAPAR, H.S.& KHAN, S.N.(1973). Studies on endomycorrhiza in some forest species. In: *Proceedings of Indian National Science of Academy B*. Forest Research Institute, Dehra Dun.
- THIERY, J.P.(1967). Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal de Microscopie* 6, 987-1018.
- THOEN, D.(1985). Is *Pisolithus* found under *Eucalyptus* in Sénégal conspecific with the mycorrhizal *Pisolithus tinctorius* ?. In : *Abstract of the 9th European Mycological Congress*. Oslo, Norway.

THOEN, D.(1988). Mycorrhizal habit and sclerogenesis of *Phlebopus sudanicus* (Gyrodontaceae) in Sénégal. In : 2th European Symposium on Mycorrhizae, Prague, Czechoslovakia, p.104.

THOEN, D.& BA, A.M.(1989). Ectomycorrhizas and putative ectomycorrhizal fungi of *Azelia africana* Sm. and *Uapaca guineensis* Müll.Arg. in southern Sénégal. *New Phytologist*, sous presse.

THOMSON, J., MELVILLE, L.H.& R.L.PETERSON (1989). Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and root hairs of *Picea mariana* (Pinaceae). *American Journal of Botany* 76, (4), 632-636.

THOMAZINI, L.I.(1974). Mycorrhiza in plants of the "Cerrado". *Plant and Soil* 41, 707-711.

TOMMERUP, I.C.& ABBOTT, L.K.(1981). Prolonged survival and viability of V.A.mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biology and Biochemistry* 13, 431-433.

TONKIN, C.M., MALAJCZUK, N.& McCOMB, J.A.(1989). Ectomycorrhizal formation by micropopagated clones of *Eucalyptus marginata* inoculated with isolates of *Pisolithus tinctorius*. *New Phytologist* 11, 209-214.

TOTH, R.& MILLER, R.M.(1984). Dynamics of arbuscule development and degeneration in a *Zea mays* mycorrhiza. *American Journal of Botany* 71, 449-460.

TOWNSEND, B.B.&WILLETTS, H.J.(1954). The development of the sclerotia of certain fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 37, 213-221.

TRAPPE, J.M.(1962). Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Botanical Review* 28, Forest service, U.S.Department of Agriculture, 538-606.

TRAPPE, J.M.(1969). Studies on *Cenococcum graniforme*. I. An efficient method for isolation of sclerotia. *Canadian Journal of Botany* 47, 1389-1390.

TRAPPE, J.M.& STRAND, R.F.(1969). Mycorrhizal deficiency in a Douglas fir region nursery. *Forest Science* 15, 381-389.

- TRAPPE, J.M.(1971). Mycorrhizae : mycorrhiza-forming Ascomycetes. In : *Proceedings of the 1th North American Conference on Mycorrhizae*, US.Government Printing Office, Washington, D.C, 19-37.
- TROJANOWSKI, J., HAIDER, K.&HÜTTERMANN (1984). Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin, holocellulose and lignocellulose by mycorrhizal fungi. *Archives of Microbiology* **139**, 202-206.
- TUPAS, G.L.& SAJISE, P.E.(1976). Mycorrhizal associations in some savanna and reforestation trees. *Kalikasan* **5**, 235-240.
- VALENTINES, R.C.(1961). Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. *Advance of the Viruse Reseach* **8**, p.287.
- VEIERSKOV, B.(1985). Pea seedling growth and development regulated by cotyledons and modified by irradiance. *Physiology Plant* **65**, 79-84.
- VOIRY, (1981). Classification morphologique des ectomycorhizes du chêne et du hêtre dans le Nord-Est de la France. *European Journal of Forest Pathology* **11**, 284-299.
- VOGT, K.A., MOORE, E.E., VOGT, D.J., REDLIN, M.J.& EDMONDS, R.L.(1983). Conifer fine root and mycorrhizal root biomass within the forest floors of Douglas fir stand of different ages and site productivities. *Canadian Journal of Forest Research* **13**, 429-437.
- VOZZO, J.A.& HACKSKAYLO, E.(1971). Inoculation of *Pinus caribaea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. *Forest Science* **17**, 239-245.
- WARCUP, J.H.(1980). Ectomycorrhizal association of Australian indigenous plants. *New Phytologist* **81**, 531-535.
- WENT, F.W.& STARK, N.(1968). The biological and mechanical role of soil fungi. In : *Proceedings of the National Academy of Science* **60**, 497-504.
- WERNER, D.& WOLFF, A.B.(1987). Root hair specific proteins in *Glycine max*. *Zeitschrift für Naturforschung* **42c**, 537-541.

WHITE, F.(1965). The savanna woodlands of the Zambezi and Sudanic domains. An ecological and phytogeographical comparison. *Webbia* **19**, 651-681.

de WIT, P.J.G.M., HOFMAN, A.E., VELTHUIS, G.C.M. & TOMA, I.M.J.(1987). Specificity of active defense responses in plant-fungus interactions : tomato-*Cladosporium fulvum*, a case study. *Plant Physiology and Biochemistry* **25**, (3), 345-351.

ZAIYOU, M.(1989). Approche de la variabilité du Genre *Laccaria* par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADNr. D.E.A, Université de Nancy I.

ZAK, B. & BRYAN, W.C.(1963). Isolation of fungal symbionts from pine mycorrhizae. *Forest Science* **9**, (3), 272-278.

ZAK, B.(1964). Role of mycorrhizae in root disease. *Annual Review of Phytopathology* **2**, 377-392.

ZAK, B. & MARX, D.H.(1964). Isolation of mycorrhizal fungi from roots of individual slash pines. *Forest Science* **10**, (2), 214-219.

ZAK, B.(1969). Characterisation and classification of mycorrhizae of Douglas fir .I. *Pseudotsuga menziesii* + *Poria terrestris* (blue and orange, staining strains). *Canadian Journal of Botany* **47**, 1833-1840.

ZAK, B (1973). Classification of ectomycorrhizae. In : *Ectomycorrhizae* (Eds.G.C.MARKS & T.T.KOZLOWSKI), Academic Press, New York & London, 43-78.

ZIMMERMANN, M.(1969). Translocation of nutrients. In : *The Physiology of Plant Growth and Development* (Eds.M.B.WILKINS & McGRAW-HILL), London, 383-417.

Annexes

Tableau 1 : Principales caractéristiques physiques et chimiques du sol des Bayottes (station II, figure 4) (analyses effectuées par le laboratoire de chimie de l'ORSTOM-Dakar).

Argile	Limon	Sable	P assimilable	P total	N total	C/N	pH eau
%	%	%	ppm*	%	%		
3,7	31	67,9	13	223	25	12	5,8

* Dosage par la méthode de OLSEN *et al.*(1954).

Tableau 2 : Principales caractéristiques physiques et chimiques du sol de Bezange (analyses effectuées par le laboratoire d'analyse de sol de l'INRA-Arras).

Capacité d'échange	Calcium échangeable	Magnesium échangeable	Potassium échangeable	P assimilable	N total	C/N	pH eau
(m eq.%)	(m eq.%)	(m eq.%)	m eq.%	ppm*	%		
2,6	0,1	0,05	0,0064	44	1,8	13,3	4,88

* Dosage par la méthode de OLSEN *et al.*(1954).

Tableau 3 : Milieux de culture dans un litre d'eau distillée.

Produits utilisés	Melin et Norkrans modifié par Marx MNM (1969)	Pachlewski (1974)	Shemakanova modifié par Chilvers <i>et al.</i> , 1986
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25 g		0,125 g
(NH ₄) ₂ SO ₄			0,125 g
Tartrate di-amonium		0,50 g	
Extrait de malt	3 g		
Glucose	10 g	20 g	
Maltose		5 g	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,05 g		0,050 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g	1 g	0,250 g
MgSO ₄	0,15 g	0,5 g	0,150 g
NaCl	0,025 g		
Thiamine-HCl 1mg/ml	1 ml	1 ml	
Kanieltria 1/10*		1 ml	1 ml
Citrate ferrique 1%	1,2 ml		1 ml
Agar	20 g	20 g	20 g
pH	5,5	5,5	6,37-6,50

(*) Kanieltria : Fer (sous forme chélatée) 6 g/l, Molybdène 0,27 g/l, Bore (B₂O₃) 8,45 g/l, Manganèse 5 g/l, Cuivre 0,625 g/l et Zinc 2,27 g/l.

Tableau 4 : Solution nutritive (expériences en serre)

KNO ₃ (g)	Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O (g)	NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O (g) (**)	MgSO ₄ , 7H ₂ O (g)	Oligoéléments ml (*)
4	9,4	1,8	3,7	10

- Dose pour 10 litres de solution mère à diluer au 1/10 avant utilisation (pH 5,5-6).

- (***) Absence de cet élément dans la solution nutritive sans phosphore.

- (*) Kanieltria : Fer (sous forme chélatée) 6 g/l, Molybdène 0,27 g/l, Bore (B₂O₃) 8,45 g/l, Manganèse 5 g/l, Cuivre 0,625 g/l et Zinc 2,27 g/l.

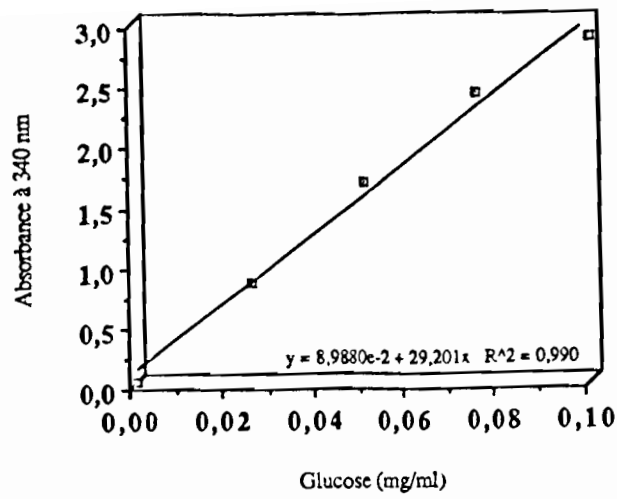


Figure 1 : Courbe étalon établie pour le dosage du glucose.

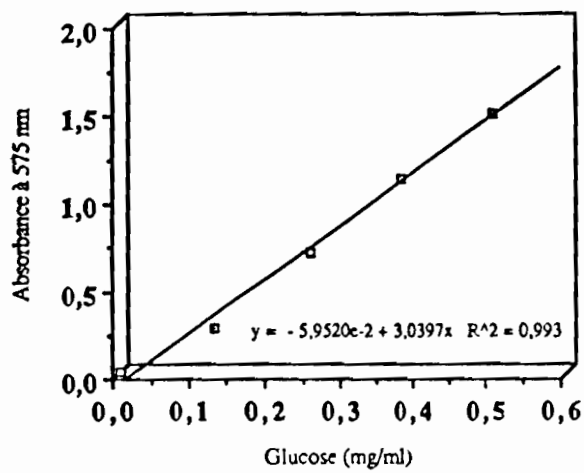


Figure 2 : Courbe étalon établie pour le dosage des sucres réducteurs.

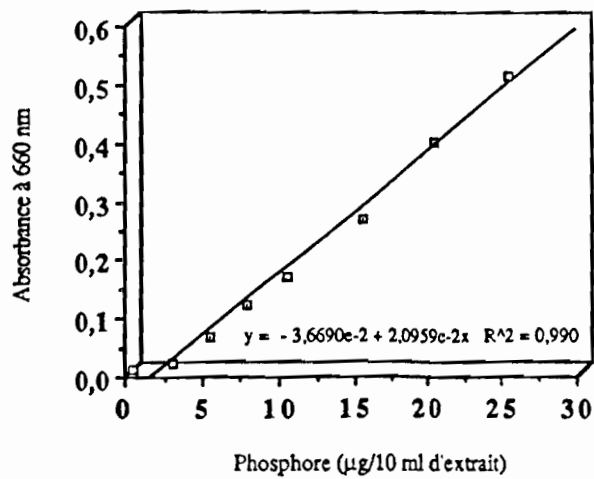


Figure 3 : Courbe étalon établie pour le dosage du phosphore assimilable.

Contribution à l'étude de la symbiose ectomycorhizienne chez deux essences forestières d'Afrique intertropicale : *Afzelia africana* Sm. et *Uapaca guineensis* Müll.Arg.

Résumé

Les symbioses ectomycorhiziennes chez les essences forestières autochtones de la zone tropicale ont fait l'objet de très peu d'étude. Dans ce mémoire, nous nous sommes proposés de les étudier chez *Afzelia africana* Sm. et *Uapaca guineensis* Müll.Arg.

Une richesse et une diversité insoupçonnées de champignons ectomycorhiziens ont été mises en évidence chez ces deux essences forestières. Une banque de souches indigènes a été constituée à partir d'isollements effectués sur des carpophores, des mycorhizes et des sclérotés.

Parmi les dispositifs de synthèse proposés, le minirhizotron s'est avéré le plus adéquat pour confirmer *in vitro* le statut mycorhizien de 4 souches fongiques indigènes vis à vis d'*A.africana* (*Scleroderma dictyosporum* Pat.7731, *Scleroderma verrucosum* Pers.7732 et 2 isolats non identifiés XM002 et XM004). Cependant d'autres facteurs, liés aux conditions environnementales du test ou à l'âge des plants d'*A.africana*, se sont avérés limitants. Ainsi un isolat de *Pisolithus* sp.(X003), capable de former des mycorhizes *in situ* avec des plants d'*A.africana* âgés (au moins de 6 mois), présente au contraire un comportement *in vitro* qui rappelle des relations du type parasitaire avec des plants moins âgés (de 10 à 15 jours). Ces tests doivent nous conduire à ne pas exclure *a posteriori* les souches fongiques non infectieuses *in vitro*.

Avec la technique de piégeage sur sol, nous avons mis en évidence une séquence d'apparition au cours du temps de 6 types de mycorhizes que nous avons différenciés, caractérisés, et classés en deux groupes : souches fongiques précoces (7732 et XM002) et souches tardives (7731 et XM004). Nous avons montré que le déterminisme du processus d'infection-addition était lié à la densité des propagules des souches précoces dans le sol. Ces propagules (mycorhizes, cordons mycéliens et sclérotés) montrent une capacité germinative et infectieuse qui leurs confèrent un avantage dans les premiers stades de l'infection par rapport aux souches fongiques tardives. Ces dernières induisent des modifications de la paroi (matériel polysaccharidique) des cellules corticales que nous n'avons pas observées avec les souches précoces après l'ablation totale des cotylédons d' *A.africana*. Cette réaction de la plante, induite par la présence du champignon rendu "agressif" par la diminution des sucres solubles racinaires, suggère des besoins nutritifs plus importants chez les souches fongiques tardives.

Outre les interactions nutritionnelles, nous avons étudié des niveaux de spécificité et les premiers stades d'interactions cellulaires plante-champignon mycorhizogène, peu mycorhizogène, non mycorhizogène ou pathogène. Nous avons montré qu'il pouvait exister des souches fongiques indigènes (isolées sous *A.africana*) mycorhizogènes vis à vis d'essences forestières introduites dans l'Ouest africain (*Acacia holosericea* et *Melaleuca leucadendron*) ou vis à vis d'autres essences forestières d'Afrique intertropicale (*Afzelia quanzensis* et *Brachystegia specifformis*). Au niveau des interactions de reconnaissance, la présence de fibrilles glycoprotéiques est caractéristique des champignons dont nous avons vérifié *in vitro* l'aptitude mycorhizogène ou des champignons potentiellement mycorhiziens. L'induction des activités phosphatasiques acides du plasmalemme fongique apparaît comme une fonction spécifiquement symbiotique.

L'efficacité d'une souche fongique sur la croissance et la nutrition des arbres est le critère décisif pour la sélection des champignons mycorhiziens. Parmi les champignons mycorhiziens que nous avons testés en serre sur *A.africana*, la souche fongique non identifiée XM002 s'est avérée la plus infectieuse, tolérante à de fortes doses en phosphore et efficace par stimulation de la biomasse racinaire. Elle apparaît également résistante à de forte dessiccation et compétitive dans les expériences de piégeage.

Mots clés : Ectomycorhizes tropicales, synthèse ectomycorhizienne, cotylédons, piégeage, propagules, souches tardives, souches précoces, interactions cellulaires, fibrilles glycoprotéiques, phosphatases acides, nutrition minérale, fertilisation, *Afzelia africana*, *Afzelia quanzensis*, *Brachystegia specifformis*, *Uapaca guineensis*, *Acacia holosericea*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Melaleuca leucadendron*, *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum*, *Amanita* sp., *Pisolithus* sp., *Pisolithus tinctorius*.

Contribution to the study of ectomycorrhizal symbiosis of two tropical trees :
Afzelia africana Sm. and *Uapaca guineensis* Müll.Arg.

Summary

Ectomycorrhizal symbioses of tropical trees are poorly documented. The aim of this work was to study them on *Afzelia africana* Sm. and *Uapaca guineensis* Müll.Arg.

The richness and diversity of putative ectomycorrhizal fungi on *A.africana* and *U.guineensis* are high. A culture collection were obtained from sporocarps, ectomycorrhizas and sclerotia.

Among the synthesis techniques, the plastic container had the advantage of being adequate to confirm the ability of four strains to infect *Afzelia* (*Scleroderma dictyosporum* 7731, *Scleroderma verrucosum* 7732 and two unidentified strains XM002 and XM004). However, mycorrhiza formation in axenic culture may be influenced by environmental conditions and seedling age. For example, one isolate of *Pisolithus* sp.(X003) formed mycorrhizas on *Afzelia* in a nursery after 6 months but pathogenic symptoms occurred *in vitro* after 4 days suggesting that *in vitro* axenic synthesis was not conclusive as for a symbiotic relationship.

A succession of ectomycorrhizal fungi have been observed on *Afzelia* lateral roots. Six ectomycorrhiza types obtained by a baiting method were characterized and distinguished between those fungi that occurred early in the succession (7732 and XM002) and those that occurred later such as 7731 and XM004. This succession was interpreted as follows : early ectomycorrhizal built-up was related to high vegetative propagules density in the soil (mycorrhizas, mycelial strands and sclerotia) and to their ability to germinate and quickly colonize *Afzelia* root system. Another hypothesis suggesting that "early-stage" fungi required a lower carbohydrate level than "late-stage" fungi was examined on *Afzelia* seedling. When translocation of reserves such as carbohydrates from cotyledons to the roots was interrupted after cotyledons ablation, the deposition of polysaccharides occurred on the cortex cell walls only in presence of "late-stage" fungi. This hypersensitivity reaction suggests a higher food base requirement for late-stage fungi.

Interactions between native fungi and exotic or indigenous trees have been studied. Our results have shown that two native fungi, *S.dictyosporum* and unidentified strain (XM004) formed mycorrhizas on australian trees (*Acacia holosericea* and *Melaleuca leucadendron*) or another indigenous trees (*Afzelia quanzensis*). At a sub-cellular level between native (*S.dictyosporum* 7731) or exotic (*Pisolithus tinctorius* H.445) fungi and introduced trees (*Eucalyptus camaldulensis* and *Acacia holosericea*), the induction of acid phosphatase activity on the fungal plasmalemma and the glycoprotein bridges were associated with the mycorrhizal fungi growing close to the host root. Both reactions were absent with non-mycorrhizal and pathogenic fungi. It could be speculated that glycoprotein bridges and plasmalemmic acid phosphatase activity may be respectively a characteristic of mycorrhizal fungi and an important indicator of mutual relationships.

The efficiency of fungi for growth and nutrition of trees is the decisive criterium for the choice of mycorrhizal fungi. Among indigenous fungi the unidentified strain (XM002) was infective and effective (stimulation of root system biomass) on *Afzelia* seedling. This strain also displayed prolonged survival, viability and infectivity after root death in drought conditions.

Key words : Tropical ectomycorrhizas, ectomycorrhizal synthesis, cotyledons, baiting method, vegetative propagules, "early-stage" fungi, "late-stage" fungi, cellular interaction, glycoprotein bridges, acid phosphatase, mineral nutrition, fertilization, *Afzelia africana*, *Afzelia quanzensis*, *Brachystegia speciformis*, *Uapaca guineensis*, *Acacia holosericea*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Melaleuca leucadendron*, *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum*, *Amanita* sp., *Pisolithus* sp., *Pisolithus tinctorius*.