



FACULTE DES SCIENCES

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques  
Ecole Doctorale Biologie et Santé  
D.F.D. Biologie Végétale et Forestière

INERA/DPF

Institut de l'Environnement et  
de Recherche Agricole  
Laboratoire de Microbiologie

INSTITUT NATIONAL DE  
RECHERCHE AGRONOMIQUE  
Centre de Recherche de Nancy  
Laboratoire de Microbiologie

## THESE

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université Henri-Poincaré-Nancy 1**

Spécialité  
Biologie Végétale et Forestière

par

**Bibata Kadidia SANON**

### **La symbiose mycorhizienne chez quelques Césalpiniacées et Euphorbiacées des Forêts du Sud-Ouest du Burkina Faso.**

Etude morphologique et cytologique, mycorhization contrôlée et étude de la diversité  
inter- et intraspécifique de Sclérodermes ectomycorhiziens.

Soutenue publiquement le 15 Février 1999

Membres de jury :

Président	Pr. J. DEXHEIMER	Université H. Poincaré, Nancy 1
Rapporteurs	Pr. J.C. DEBAUD Dr. B. VIAN	Université Claude Bernard, Lyon 1 INA Paris-Grignon
Examineurs	Pr. B. BOTTON Dr. F. MARTIN	Université H. Poincaré, Nancy 1 INRA-Nancy

## *Avant propos*

*Le mot forêt communément utilisé au Burkina Faso, où les forêts proprement dites n'existent pas ou seulement de manière très localisée, désigne les milieux dits naturels c'est-à-dire plus exactement non labourés depuis les jachères jusqu'à des formations plus ou moins proches du climax. (Plan Stratégique de la recherche, 1996).*

## Remerciements

*Ce travail a été réalisé dans trois laboratoires, au Burkina Faso et en France. Je ne pourrais présenter les résultats obtenus au cours de ces quelques années sans adresser mes vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué, d'une manière ou d'une autre, à sa réalisation.*

*Ces remerciements s'adressent :*

*Aux responsables des Instituts et laboratoires qui m'ont ouvert leurs portes,*

*Aux membres de jury pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Le sujet de cette thèse a été initié avec le Docteur Amadou BA, alors responsable du laboratoire de microbiologie de l'ex IRBET au Burkina Faso. Je tiens à lui adresser ma reconnaissance pour avoir guidé mes premiers pas sur les ectomycorhizes. Après de nombreuses péripéties, cette thèse a pu être achevée dans de bonnes conditions.*

*Les mots me manquent pour remercier le Docteur Francis MARTIN pour m'avoir acceptée dans son équipe en 1996 et qui a spontanément accepté de m'encadrer durant la dernière année de mes travaux. Sa disponibilité, ses grandes compétences, ses conseils et ses encouragements ont été déterminants pour l'achèvement de la thèse. Un grand merci pour tout.*

*Au Professeur Jean DEXHEIMER qui a accepté de diriger le travail en tant que Directeur de thèse. Ses conseils et ses compétences ont été indispensables à la réalisation des travaux de microscopie. Qu'il trouve ici le témoignage de ma très haute considération.*

*J'ai pu bénéficier au cours de ces années de conseils et d'appui des scientifiques et techniciens des différents laboratoires que je remercie très chaleureusement :*

*Mr Jean GARBAYE, pour sa disponibilité et ses conseils au cours de la rédaction.*

*Mr Denis TAGU, pour ses remarques très constructives sur le manuscrit.*

*Mme Pascale KLETT-FREY, pour son aide à la préparation de la présentation orale.*

*Mrs François LE TACON et Frédéric LAPEYRIE, pour leurs conseils.*

*Mme Céline DI-BATTISTA-LEBOEUF, pour m'avoir initiée aux techniques de biologie moléculaire des champignons ectomycorhiziens*

*Mmes Christine DELARUELLE et Dominique VAIRELLES, pour leur apport technique et leur constante disponibilité.*

Mme Joëlle GERARD qui m'a initiée aux techniques de microscopie électronique.

Issouf OUATTARA, toujours présent au cours des sorties de terrain. Ses compétences en botanique et sa connaissance de la végétation du Burkina Faso ont été d'une grande importance pour l'identification des sites.

Mr Wétien BOGNOUNOU, pour avoir permis d'effectuer nos missions de prospection en compagnie de son technicien.

Marcel BAZIE et Ngafien KONE, les "collègues" du laboratoire du DPF pour leur apport technique.

Rasmané OUEDRAOGO, Yaya GNANOU et Bila WININGA, les chauffeurs du Département qui nous ont souvent conduit sur les différents sites.

Jean-Marie OUDBA, Sibiri OUEDRAOGO, Assimi SALAWU et tous les autres chercheurs de l'INERA/DPF qui m'ont soutenue durant ces années.

Je n'oublie pas les autres stagiaires et personnels de mes laboratoires d'accueil, Jean-Luc, Chantal, Cathy, Hubert, Patricia, Stéphanie, Franck, Tarik, Tiby, Sébastien, Marc-André, Béatrice, Ana, Nasser, Muriel, Valérie, et les amis rencontrés, Michel, Hadissa, Tikou, Diami, Kady Diallo, Rock, Maurice dont je garderais un souvenir inoubliable.

*Une pensée particulière*

*A ma mère, pour sa patience et sa compréhension.*

*A mes frères et soeurs et à ma copine Armande qui n'ont cessé de m'encourager tout au long de cette thèse.*

*A Olivier, pour son soutien sans faille.*

*A Erwin DREYER, et sa famille pour leur sympathie et leur disponibilité.*

*A Carole, qui n'a ménagé aucun effort pour s'occuper de mes dossiers à la faculté.*

*Aux sympathiques secrétaires Laure et Annick, de l'ex IRBET qui ont été plus que des amies pour moi.*

*Merci également à tous ceux dont les noms n'ont pu être cités ici.*

*Enfin, ce travail a pu être réalisé grâce au soutien financier de différents organismes que je remercie tout particulièrement.*

*La Fondation Internationale pour la Science (FIS) qui m'a accordée en 1994 un financement sur 3 ans.*

*L'UNESCO Biotechnology Fellowships dont le financement m'a permis de d'effectuer mon premier séjour au laboratoire de microbiologie de l'INRA.*

*L'INRA dont l'allocation de 3 mois m'a permis d'achever la rédaction de la thèse dans de meilleures conditions.*

# RESUME

Durant 3 années de prospection, vingt et huit espèces fongiques ont été recensées sous 6 plantes hôtes (*Afzelia africana*, *Isobertinia doka*, *I. dalziellii*, *Uapaca guineensis*, *U. somon* et *Monotes kerstingii*) appartenant à 3 familles (Leguminosae, sous-famille Caesalpinioideae, Euphorbiaceae et Dipterocarpaceae) dans les forêts du Sud-Ouest du Burkina Faso. Ces champignons se répartissent en 8 ordres et 13 genres. Parmi les espèces identifiées, les Sclérodermes sont particulièrement abondants, 5 espèces dont 4 (*Scleroderma dictyosporum* (8 isolats), *S. verrucosum* (4 isolats), *Scleroderma* sp1 (3 isolats), et *Scleroderma* sp5 (1 isolat) ont été isolées et maintenues en culture pure. L'étude du statut ectomycorhizogène de ces espèces de Sclérodermes vis-à-vis de différentes plantes hôtes montre qu'elles possèdent un large spectre d'hôte.

L'étude de la diversité génétique des différents isolats et des carpophores de Sclérodermes par PCR/RFLP des régions ITS et IGS1 de l'ADN ribosomique révèle la présence de quatre ribotypes (A, B, C et D) au sein des espèces de *S. dictyosporum* et trois (A, B et C) au sein des *S. verrucosum*. Le séquençage de l'ITS ribosomique a révélé la proximité génétique de *Scleroderma* sp1 et *S. verrucosum* et permis d'identifier l'isolat indéterminé ORSXM002 isolé au Sénégal à un Telephoraceae. L'analyse du polymorphisme de l'ADN total par RAPD permet de confirmer la diversité intraspécifique des isolats révélée par PCR/RFLP et aussi de différencier les isolats génétiquement très proches à l'aide de marqueurs spécifiques des amorces utilisées (152C et 174). Ainsi les ribotypes B de *S. dictyosporum* et *S. verrucosum* se composent de deux génotypes différents.

Des champignons précoces d'*A. africana* ont été piégés en pépinière pendant 4 mois sur le sol de 8 sites expérimentaux. L'étude anatomo-morphologique des mycorhizes obtenues a permis d'identifier 3 morphotypes suivant la couleur du manteau (blanc, brun et beige) repartis en 2 groupes en fonction de la structure du manteau (prosenchymateux uniforme et pseudoparenchymateux uniforme). L'ultrastructure de ces morphotypes mycorhiziens indique que les champignons impliqués sont des basidiomycètes. A l'aide de la PCR/RFLP, les morphotypes blancs et le morphotype beige ont été identifiés aux ribotypes B et, A et B respectivement de *S. dictyosporum* et *S. verrucosum*. Les morphotypes bruns seraient dus à une même espèce fongique non identifiée aux Sclérodermes maintenus en culture.

La mycorhization contrôlée en pépinière de deux provenances d'*A. africana* (Sénégal et Burkina Faso) inoculées avec trois Sclérodermes et le Telephoraceae ORSXM002 a montré le rôle bénéfique de l'inoculation ectomycorhizienne sur la croissance et la nutrition minérale de ces deux plantes-hôtes.

**Mots clés :** Ectomycorhizes tropicales, Burkina Faso, *Afzelia africana*, Cytologie, Sclérodermes, PCR/RFLP, RAPD, Séquençage, Mycorhization contrôlée.

## *Abréviations*

**CNRST** : Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (Burkina Faso)

**INERA** : Institut de l'Environnement et de Recherche Agricole

**IRBET** : Institut de Recherche en Biologie et Ecologie Tropicale

**DPF** : Département Productions Forestières

**ICRAF** : International Council Research in Agro-forestry

**ICRISAT** : International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics

**IGS** : Intergenic Spacer

**ITS** : Internal Transcribed Spacer

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**RAPD** : Random Amplified Polymorphic DNA

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism

Pour les figures :

**b** : bactéries

**Cc** : cellules corticales

**Ci** : ciment interhyphal

**d** : dolipore

**he** : hyphes extramatriciels

**M** : manteau

**mt** : mitochondries

**RH** : réseau de Hartig

**T** : tanins

**V** : vacuoles

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
----------------------------	---

## CHAPITRE I.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
------------------------------	---

1.1. LE BURKINA FASO : GRANDS TRAITES DU CLIMAT ET DE LA VÉGÉTATION .....	6
---	---

1.1.1. <i>Le climat</i> .....	6
-------------------------------	---

1.1.2. <i>Les sols</i> .....	7
------------------------------	---

1.1.3. <i>La végétation et la flore</i> .....	8
---	---

1.1.3.1. Le domaine phytogéographique sahélien .....	8
--	---

1.1.3.2. Le domaine phytogéographique soudanien.....	9
--	---

1.2. POURQUOI S'INTÉRESSER À <i>A. AFRICANA</i> ?.....	10
--	----

1.3. LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE.....	11
-------------------------------------	----

1.4. LA SYMBIOSE ECTOMYCORHIZIENNE EN ZONE TROPICALE.....	12
---	----

1.5. MYCORHIZATION CONTRÔLÉE ET SÉLECTION DE CHAMPIGNONS EFFICIENTS .....	13
---	----

1.6. SUIVI DES SOUCHES INTRODUITES EN PÉPINIÈRE ET AU CHAMP, CRITÈRES D'IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS.....	15
--	----

1.6.1. <i>Critères morphologiques et anatomiques</i> .....	15
--	----

1.6.2. <i>Critères moléculaires</i> .....	17
---	----

## CHAPITRE II.

INVENTAIRE DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS ASSOCIÉS À <i>A. AFRICANA</i> ET D'AUTRES ESPÈCES ECTOMYCORHIZIENNES DANS LES FORÊTS DU SUD-OUEST BURKINA FASO.....	20
---	----

2.1. INTRODUCTION.....	21
------------------------	----

2.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	22
2.2.1. <i>Matériel végétal : description botanique des espèces</i> .....	22
2.2.2. <i>Description des sites expérimentaux</i> .....	24
2.2.3. <i>Inventaire des champignons réputés ectomycorhiziens</i> .....	28
2.2.4. <i>Isolement des cultures mycéliennes et aptitude ectomycorhizogène des isolats de Sclérodermes en conditions semi-axéniques</i> .....	29
2.2.4.1. <i>Isolement des cultures mycéliennes</i> .....	29
2.2.4.2. <i>Aptitude ectomycorhizogène de quelques isolats de Sclérodermes</i> .....	29
2.3. RÉSULTATS .....	30
2.3.1. <i>Champignons ectomycorhiziens récoltés au Sud-ouest du Burkina Faso</i> .....	30
2.3.2. <i>Description morphologique des différents Sclérodermes isolés</i> .....	31
2.3.3. <i>Aptitude ectomycorhizogène des isolats fongiques</i> .....	35
2.4. DISCUSSION ET CONCLUSION .....	35

### CHAPITRE III.

#### ETUDE ANATOMIQUE ET MORPHOLOGIQUE DES MYCORHIZES DE SYNTHÈSE ET DE PIÉGEAGE D'*A. AFRICANA*.....

3.1. INTRODUCTION .....	38
3.2 . MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	39
3.2.1. <i>Piégeage des champignons ectomycorhiziens à l'aide de plantules cultivées sur du sol issus des différents sites expérimentaux</i> .....	39
3.2.2. <i>Obtention des mycorhizes de synthèse</i> .....	39
3.2.3. <i>Description anatomo-morphologique et cytologique des mycorhizes de piégeage et de synthèse</i> .....	40
3.2.3.1. <i>Fixation et postfixation</i> .....	40
3.2.3.2. <i>Déshydratation et inclusion</i> .....	40



3.2.3.3. Réalisation des coupes .....	40
3.2.3.4. Les observations microscopiques.....	41
3.3. RÉSULTATS .....	41
3.3.1. <i>Morphologie et anatomie des mycorhizes</i> .....	41
3.3.1.1. Les mycorhizes de synthèse.....	41
3.3.1.2. Les mycorhizes obtenues par piégeage.....	42
3.3.2. <i>Structure des mycorhizes</i> .....	46
3.3.2.1 Les mycorhizes de synthèse.....	46
3.3.2.2. Les mycorhizes obtenues par piégeage.....	48
3.4. DISCUSSION ET CONCLUSION .....	50

#### CHAPITRE IV.

ETUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES SCLÉRODERMES ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS ASSOCIÉS À <i>A. AFRICANA</i> .....	54
4.1. INTRODUCTION .....	55
4.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	56
4.2.1. <i>Les souches fongiques</i> .....	56
4.2.2. <i>Extraction de l'ADN total</i> .....	56
4.2.2.1. Extraction à partir de cultures mycéliennes.....	57
4.2.2.2. Extraction à partir de mycorhizes et de carpophores.....	58
4.2.3. <i>Amplification enzymatique in vitro de l'espaceur interne transcrit (ITS) et l'espaceur intergénique (IGS1) de l'ADNr nucléaire</i> .....	58
4.2.4. <i>Polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ITS et l'IGS1 ribosomiaux</i> .....	60
4.2.5. <i>Séquençage de l'ITS</i> .....	61
4.2.6. <i>Analyse de parcimonie</i> .....	61

4.2.7. Analyse du polymorphisme de l'ADN par RAPD.....	61
4.3. RÉSULTATS .....	62
4.3.1. Variabilité génétique inter- et intraspécifique des Sclérodermes .....	62
4.3.1.1. Analyse du polymorphisme de longueur des régions ribosomiques ITS et IGS1.....	62
4.3.1.2. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction des régions ribosomiques ITS et IGS1 .....	63
4.3.1.3. Séquences nucléotidiques de l'ITS de différents isolats de Sclérodermes.....	67
4.3.1.4. Distribution écologique des différents génotypes.....	72
4.3.1.5. Estimation de la variabilité intraspécifique par RAPD .....	72
4.3.2. Identification des champignons des mycorhizes d' <i>A. africana</i> obtenues par piégeage après amplification et digestion des régions ITS et IGS1.....	76
4.4. DISCUSSION .....	77

## CHAPITRE V.

EFFET DE L'INOCULATION ECTOMYCORHIZIENNE SUR LA CROISSANCE ET LA NUTRITION MINÉRALE D' <i>A. AFRICANA</i> EN PÉPINIÈRE.....	80
5.1. INTRODUCTION .....	81
5.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	82
5.2.1. Souches fongiques.....	82
5.2.2. Matériel végétal.....	82
5.2.3. Préparation de l'inoculum fongique.....	82
5.2.4. Substrat de culture et inoculation .....	83
5.2.5. Dispositif expérimental.....	83
5.2.6. Paramètres mesurés.....	84
5.3. RÉSULTATS .....	85

5.3.1. Taux de mycorhization et longueur totale du réseau extramatriciel.....	85
5.3.2. Morphologie des mycorhizes.....	86
5.3.3. Effet de la mycorhization sur la croissance des plants.....	86
5.3.4. Concentration en éléments minéraux des feuilles des deux provenances d' <i>A. africana</i> .....	87
5.4. DISCUSSION .....	89
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES .....	91
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	97
ANNEXES.....	110

Les écosystèmes forestiers couvrent 3450 millions d'hectares dans le monde soit 26% de la surface des continents (CEE/FAO, 1992 dans INRA-mensuel, 1996) et jouent un rôle important dans l'équilibre de la biosphère, du climat et des sols. Les arbres fournissent des biens et services importants pour les industries et l'artisanat, pour l'alimentation, etc. Enfin, ils contribuent au stockage du CO<sub>2</sub> atmosphérique. Ces différents rôles bénéfiques des forêts expliquent les craintes nées à la suite de leur dépérissement dans l'hémisphère Nord dans les années 1980, de la déforestation massive en région tropicale et de la gestion forestière de type minier en Amérique du Nord.

Ces menaces imposent la mise en place rapide d'une gestion durable des forêts, c'est-à-dire de garantir leur pérennité écologique, sociologique et économique. Cela suppose une connaissance du fonctionnement de ces écosystèmes pour une production soutenue mais tout en maintenant la qualité de l'environnement. Le sol, ressource non renouvelable, se trouve au centre de cette préoccupation car les arbres en tirent l'essentiel des éléments minéraux nécessaires à leur croissance

Il a été montré que la plupart des arbres forestiers puisaient l'eau et les éléments minéraux du sol par l'intermédiaire de champignons telluriques associés à leur système racinaire. Cette association de type symbiotique, appelée mycorhize, contribue à la nutrition minérale et hydrique et à la protection phytosanitaire des racines. En retour, le champignon reçoit les photosynthétats nécessaires à sa croissance et à son développement. Deux principaux types d'association mycorhizienne ont été décrits en fonction de leurs caractéristiques morphologiques : les endomycorhizes et les ectomycorhizes. Les premières sont les plus répandues (90% des végétaux) et se rencontrent essentiellement chez les plantes cultivées et chez la plupart des arbres tropicaux ; quant aux secondes, elles concernent peu d'espèces (5% des végétaux), mais se rencontrent chez les essences forestières qui couvrent une grande partie des régions tempérées, boréales et montagnardes (Read, 1991).

Les ectomycorhizes sont ainsi utilisées surtout dans les programmes de reboisement dans différents pays pour améliorer la croissance des plants en pépinière et en plantation grâce à la sélection de partenaires fongiques efficaces. Ces programmes dits de "mycorhization contrôlée" font désormais l'objet d'une exploitation commerciale (Marx, 1982 ; Le Tacon *et al*, 1997 ; Généré *et al*, 1997)

En zone tropicale, les forêts abondent d'espèces mycorhiziennes à arbuscules (Redhead, 1968 ; Thapar et Khan, 1973 ; Högborg et Nylund, 1981 ; Newbery *et al*, 1988 ; Khasa *et al*, 1990). Cependant quelques essences locales, de grand intérêt économique, sont ectomycorhiziennes comme les Dipterocarpaceae en Asie du Sud-est, les espèces du genre *Azelia* en Afrique... (Jenik et Mensah, 1967 ; Smits, 1983 cité par Lee, 1988 ; Alexander, 1988 ; Thoen et Bâ, 1990). L'urgence de reboiser en zone tropicale justifie une étude approfondie de ces systèmes symbiotiques en général et ectomycorhizien en particulier.

En Afrique tropicale, la mycorhization a longtemps concerné les espèces exotiques utilisées dans les reboisements (Eucalyptus, Pins, Acacias australiens). Cependant, ces dernières années, il y a un regain d'intérêt pour certaines espèces locales de grand intérêt économique dans les programmes de reboisement ou d'aménagement des ressources naturelles ; cas de *Azelia africana* en Guinée, Côte d'Ivoire, Sénégal et Burkina Faso (Evy, 1995 ; Bâ, 1990) ; *A. quanzensis* et les espèces du genre *Brachystegia* en Tanzanie (Munyaziza, 1996) et qui vivent en symbiose avec des champignons ectomycorhiziens. L'exploitation de cette symbiose par la sélection de souches efficaces pourrait alors contribuer à une meilleure connaissance de la sylviculture de ces espèces (en particulier au stade juvénile) et à la réussite des plantations (utilisation de plants mycorhizés par des souches écologiquement adaptées au site de reboisement).

Cependant, la sélection de souches efficaces pour la croissance d'une espèce suppose une connaissance des champignons associés à l'espèce dans son aire naturelle. Aussi, une souche fongique susceptible d'être utilisée en pépinière doit non seulement être apte à former des mycorhizes au stade du semis, mais aussi être facile à cultiver *in vitro* pour la production d'inoculum (Garbaye, 1990). Bâ (1990) a montré que parmi les champignons récoltés au Sud du Sénégal, des souches de Sclérodermes et un champignon non identifié (ORSXM002) isolés de carpophores, d'ectomycorhizes ou de sclérotés récoltés sous *A. africana*, répondaient à ces caractéristiques.

La compréhension du fonctionnement des populations de champignons, la précision de leur évolution et leur gestion, nécessitent l'intégration de connaissances relevant de deux axes de recherches complémentaires en écologie microbienne :

— l'étude des interactions entre les facteurs du milieu et les populations microbiennes,

— l'étude des interactions d'ordre biologique entre populations microbiennes et entre populations microbiennes et populations hôtes.

Il serait inutile de sélectionner une souche efficace en pépinière si celle-ci était incapable de se maintenir au champ après plantation. Le maintien de l'effet positif de la mycorhization contrôlée au champ dépend alors de l'adaptation et de la compétitivité de la souche introduite. Il est donc important de déterminer cette capacité en suivant la persistance et la dissémination de la souche introduite en plantation. Il convient alors de caractériser les populations de mycobiontes à l'échelle spécifique et intraspécifiques, de mettre en évidence l'activité mycorhizogène de ces populations, d'analyser leur mode d'action et de suivre leur dynamique. Des critères morphologiques et anatomiques ont souvent été utilisés pour identifier les espèces fongiques au niveau des mycorhizes. Cependant la grande ressemblance intraspécifique des morphotypes ectomycorhiziens limite leur utilisation. Ainsi différents travaux ont mis en évidence à l'aide de techniques d'analyse d'acides nucléiques (PCR/RFLP, RAPD, analyse d'hétéroduplex) la variabilité génétique inter- et intraspécifique chez plusieurs espèces de champignons ectomycorhiziens (Sélosse *et al*, 1996 ; Martin *et al*, 1998b). Le typage moléculaire d'isolats ectomycorhiziens a été appliqué à grande échelle pour suivre le devenir de deux souches ectomycorhiziennes utilisées en mycorhization contrôlée : *Laccaria bicolor* S238 et *Laccaria bicolor* 81306 (Henrion *et al*, 1994 ; Di Battista, 1997 ; Selosse *et al*, 1998a & b). L'utilisation de tels outils permet alors une meilleure identification des champignons introduits et un suivi efficace. Elle permet également d'envisager l'analyse de la structuration des communautés et populations de champignons mycorhiziens (Gardes et Bruns, 1996 ; Gryta *et al*, 1997 ; Sélosse *et al*, 1998a).

Dans ce projet de recherche, nous nous sommes intéressés à la mycorhization d'*Azelia africana*, une Légumineuse tropicale de la sous-famille des Caesalpinioideae. Cette espèce est très appréciée pour son excellent bois d'oeuvre et de service, pour son feuillage comme fourrage et est utilisée dans les reboisements en Afrique tropicale (Sénégal, Guinée, Burkina Faso, Cameroun, etc.). C'est une espèce commune des forêts du Sud et Sud-Ouest du Burkina Faso qui a retenu l'attention des différents programmes d'aménagement et d'agroforesterie. Cependant, le manque de données sur les champignons associés à cette espèce au Burkina Faso explique que ceux-ci ne soient pas pris en compte dans la production des plants. Outre l'action néfaste du bétail, l'absence d'inoculation pourrait expliquer l'échec des plantations effectuées notamment dans des systèmes agro-forestiers. Nous avons ainsi entrepris cette étude avec comme objectifs :

1. L'identification des principaux champignons ectomycorhiziens associés à *A. africana* et à d'autres plantes-hôtes dans la région du Sud-Ouest du Burkina Faso,

2. L'analyse morphologique et anatomique des mycorhizes de quelques Sclérodermes (*Scleroderma verrucosum*, *S. dictyosporum*, *Scleroderma* sp1, *Scleroderma* sp2 et *Scleroderma* sp3), un groupe de champignons ectomycorhiziens abondant sur le système racinaire d'*A. africana*,

3. L'étude de la diversité génétique de ces Sclérodermes du Burkina Faso, et de la distribution écologique des génotypes observés, à l'aide des techniques de PCR/RFLP, de RAPD et le séquençage des régions intergéniques ITS et IGS1,

4. La mise au point d'une technique de mycorhization contrôlée de *A. africana* pour évaluer l'efficacité de souches de Sclérodermes sur la croissance et la nutrition minérale de cette plante-hôte.

Les résultats obtenus seront exposés dans les Chapitres II, III, IV et V. Ils sont précédés d'un Chapitre d'analyse bibliographique (chapitre I) qui présente le cadre de l'étude, fait le point sur les symbioses ectomycorhiziennes dans la zone tropicale et souligne l'importance des outils de biologie moléculaire dans l'identification et le suivi de souches fongiques introduites en plantation.

Dans le Chapitre II, nous présenterons l'inventaire des champignons ectomycorhiziens du Sud-Ouest du Burkina Faso associés à *A. africana* ou à d'autres espèces ectomycorhiziennes. L'accent est mis sur la description des différentes espèces de Sclérodermes présentes dans cette région.

Le Chapitre III est consacré à la description anatomo-morphologique et ultrastructurale des mycorhizes de synthèse induites sur *A. africana* par différentes espèces de Sclérodermes en conditions semi-axéniques et celles obtenues sur des jeunes plants d'*A. africana* élevés sur les sols de différents sites expérimentaux étudiés.

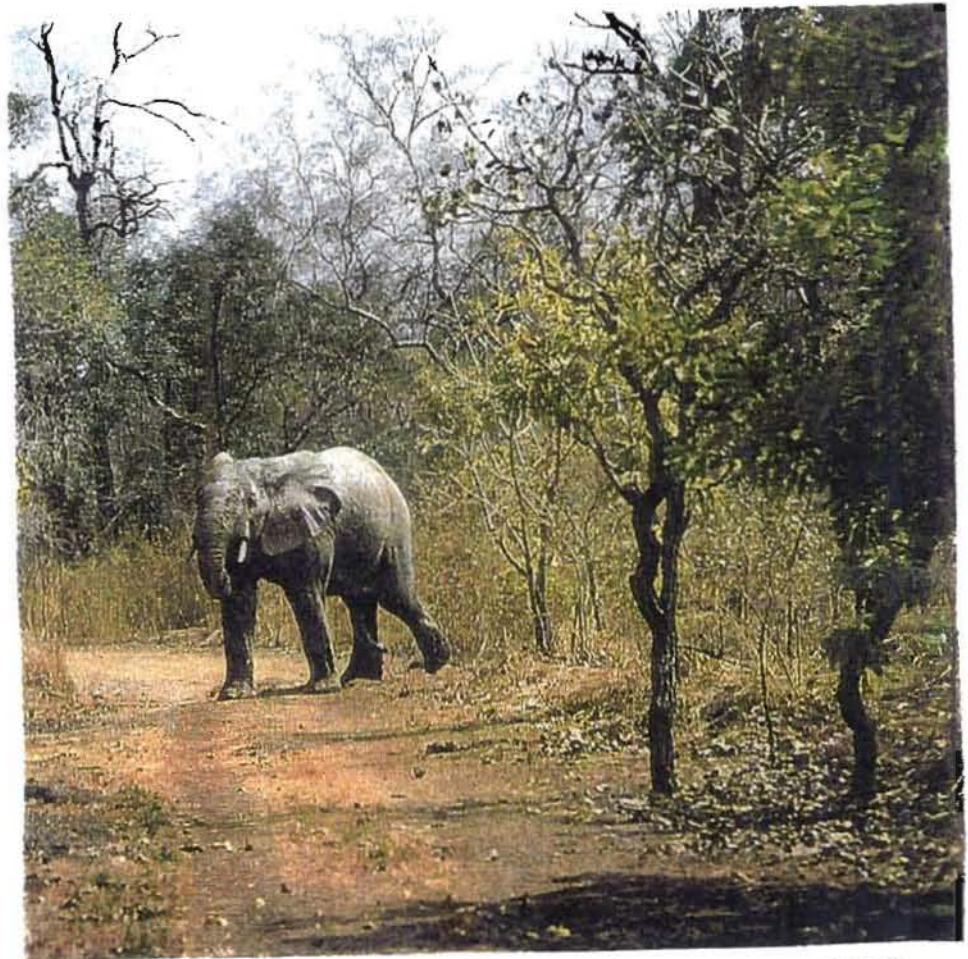
Le Chapitre IV traite de la variabilité génétique d'une trentaine d'isolats de Sclérodermes par l'étude du polymorphisme des fragments de restriction des régions intergéniques (ITS et IGS1) de l'ADN ribosomal nucléaire, le séquençage de ces régions et l'étude du polymorphisme de l'ADN par RAPD.

Enfin, dans le Chapitre V, nous exposerons les résultats obtenus sur la mycorhization contrôlée d'*A. africana* en pépinière avec trois espèces de Sclérodermes.

Ce mémoire se conclura par une synthèse des résultats acquis et envisagera les perspectives résultant de nos études.

*Chapitre I.*

*Analyse bibliographique*



Kessler et Geerling (1994)





Notre étude a été réalisée dans la région du Sud-Ouest du Burkina Faso. Ce premier chapitre commence par une brève présentation du cadre géographique.

## ***1.1. Le Burkina Faso : grands traits du climat et de la végétation***

Le Burkina Faso est situé au coeur de l'Afrique occidentale entre les latitudes 9° 20' et 15° 05' et les longitudes 2° 03 et 5° 20' (fig. 1.1). Limité au Nord et à l'Ouest par le Mali, à l'Est par le Niger et au Sud par la Côte d'Ivoire, le Ghana, le Togo et le Bénin, il s'étend sur 274 000 km<sup>2</sup> et compte plus de 9 millions d'habitants.

C'est un pays plat à relief peu accidenté notamment dans sa moitié Nord. L'altitude moyenne ne dépasse pas 400 m. Le point culminant est le mont Tenakourou (747 m) situé au Sud-ouest.

### **1.1.1. Le climat**

Le climat est caractérisé par l'alternance de deux saisons : une saison sèche et une saison des pluies. La saison sèche varie de 8 à 9 mois au Nord à 5 mois au Sud-Ouest. Quant à la saison pluvieuse, elle s'étend d'avril à octobre au Sud (6-7 mois) et de juin à septembre (4 mois) au Nord.

Les précipitations sont irrégulièrement réparties dans l'espace et dans le temps. La pluviométrie moyenne annuelle décroît du Sud-ouest (1200 à 1300 mm) au Nord (moins de 400 mm). Les précipitations sont concentrées en une seule saison des pluies avec un maximum au mois d'Août. Depuis la sécheresse des années 1973-1974, les isohyètes initiaux ont perdu entre 100 et 200 mm (Kessler et Geerling, 1994).

Les moyennes mensuelles des températures sont rarement supérieures à 35°C. Les extrêmes sont rencontrés au Nord, où les amplitudes thermiques diurnes journalières et annuelles sont importantes. Suivant les variations de température, les deux saisons peuvent être divisées chacune en deux périodes thermiques distinctes :

— saison sèche froide de novembre à février avec des températures minimales moyennes en décembre-janvier,

— saison sèche chaude de mars à mi-juin avec des températures maximales moyennes en mars-avril ou mai.

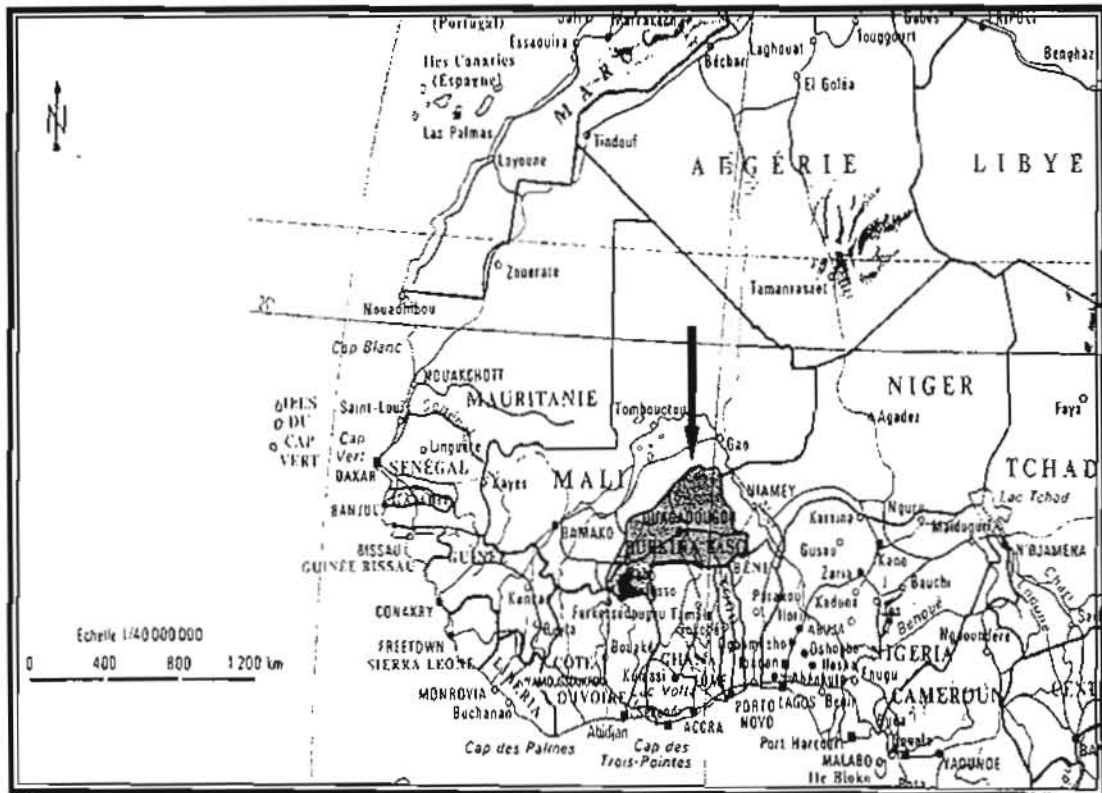


Figure 1.1. Situation géographique du Burkina Faso en Afrique de l'Ouest (Laclavère, 1993).

— saison pluvieuse fraîche de juin à septembre où les températures moyennes minimales se situent au mois d'août.

— une brève saison pluvieuse chaude en octobre.

Les vents sont relativement faibles mais peuvent atteindre 120 km/h en fin d'hivernage. En saison des pluies dominant les vents humides (la mousson) du secteur Sud-Ouest à Sud.

En fonction de ces principaux éléments du climat, en particulier la pluviométrie, le pays est subdivisé en 3 régions climatiques principales (fig. 1.2, Laclavère, 1993) :

— la zone soudanienne ou Sud-soudanienne : elle couvre le Sud et Sud-ouest du pays et est délimitée au Nord par l'isohyète 900 mm. C'est donc la partie la plus arrosée et la plus humide du pays avec des pluviométries > 900 mm/an.

— la zone soudano-sahélienne ou Nord-soudanienne : elle se situe entre les isohyètes 900 et 600 mm et occupe la moitié de la superficie du pays. La saison des pluies est de 4 à 5 mois.

— la zone sahélienne : région la plus sèche du pays, elle couvre environ 25% du territoire et est limitée au Sud par l'isohyète 600 mm. La saison sèche y est la plus longue (8-9 mois ou plus) et les pluviométries pouvant descendre en dessous de 150 mm (Laclavère, 1993).

### 1.1.2. Les sols

Ils dépendent du substrat géologique sous-jacent et de l'évolution géo-morpho-pédologique et climatique de celui-ci. On distingue 8 principaux types de sols caractérisés par les matériaux qui les constituent. Les plus dominants sont :

— les sols ferrugineux tropicaux peu lessivés et lessivés sur matériau sableux, sablo-argileux ou argilo-sableux couvrant environ la moitié du pays avec de faibles teneurs en potassium, calcium et phosphore,

— les sols peu évolués d'érosion sur matériau gravillonnaire qui s'étendent essentiellement au centre et à l'est et sont également pauvres en éléments nutritifs principaux,

— les sols hydromorphes minéraux à pseudogley sur matériau à texture variée caractérisés par un excès d'eau temporaire ; ils ont une potentialité chimique moyenne.

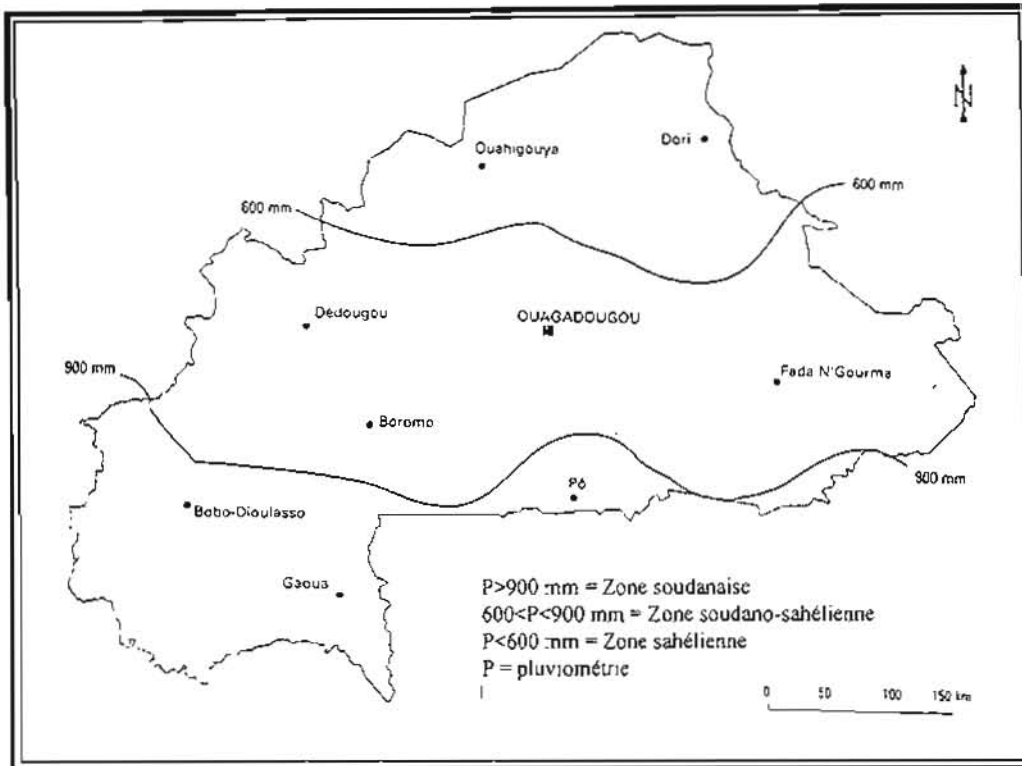


Figure 1.2. Zones climatiques du Burkina Faso (Lacivère, 1993).

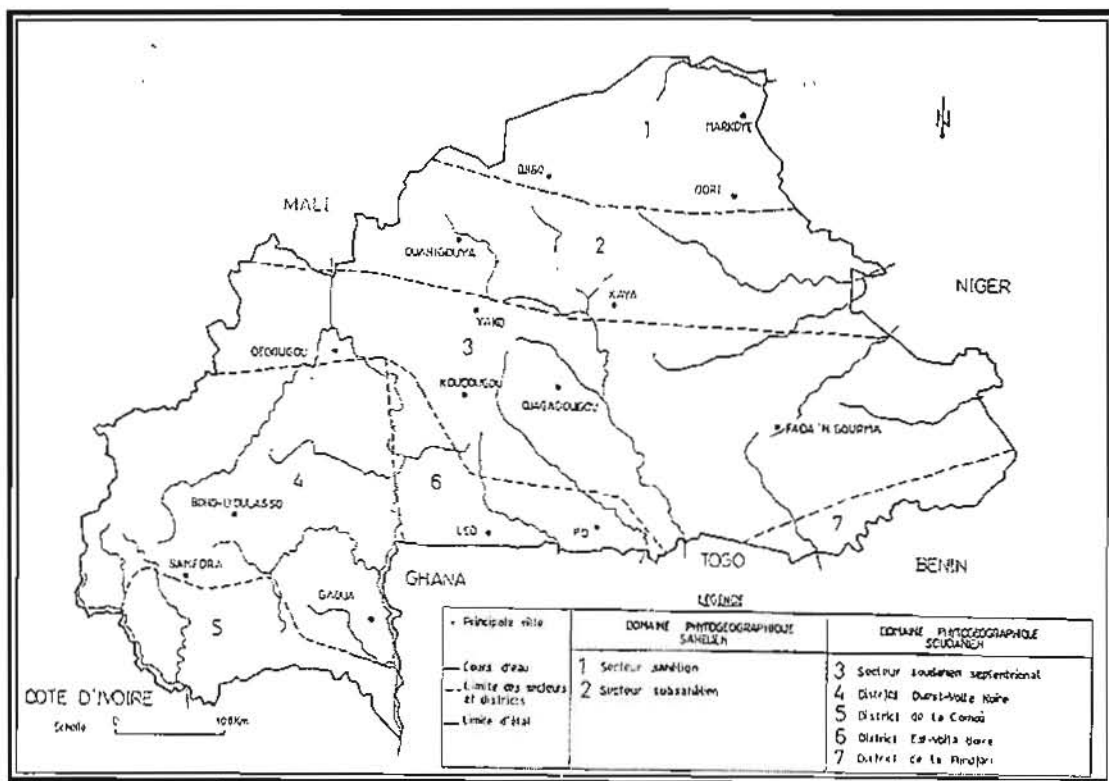


Figure 1.3. Territoires phytogéographiques du Burkina Faso. (Guinko, 1984 repris par Depommier, 1996)

### 1.1.3. La végétation et la flore

Le pays appartient à la vaste région phytogéographique soudano-zambézienne de l'Afrique qui s'étend du Sénégal à l'Ouest à la Namibie au Sud en passant par la Somalie (Laclavère, 1993).

La végétation est caractérisée par la prédominance de formations mixtes ligneuses et herbacées à couvert peu fermé (steppes, savanes, forêts claires). Les formations végétales naturelles occupent 60% du territoire (FAO, 1987). On rencontre au Sud des forêts galeries (1%) et des forêts claires (1%), au Nord des brousses tigrées (1%) et la steppe (4%) et enfin des savanes arborées et arbustives (53%) dans le reste du pays.

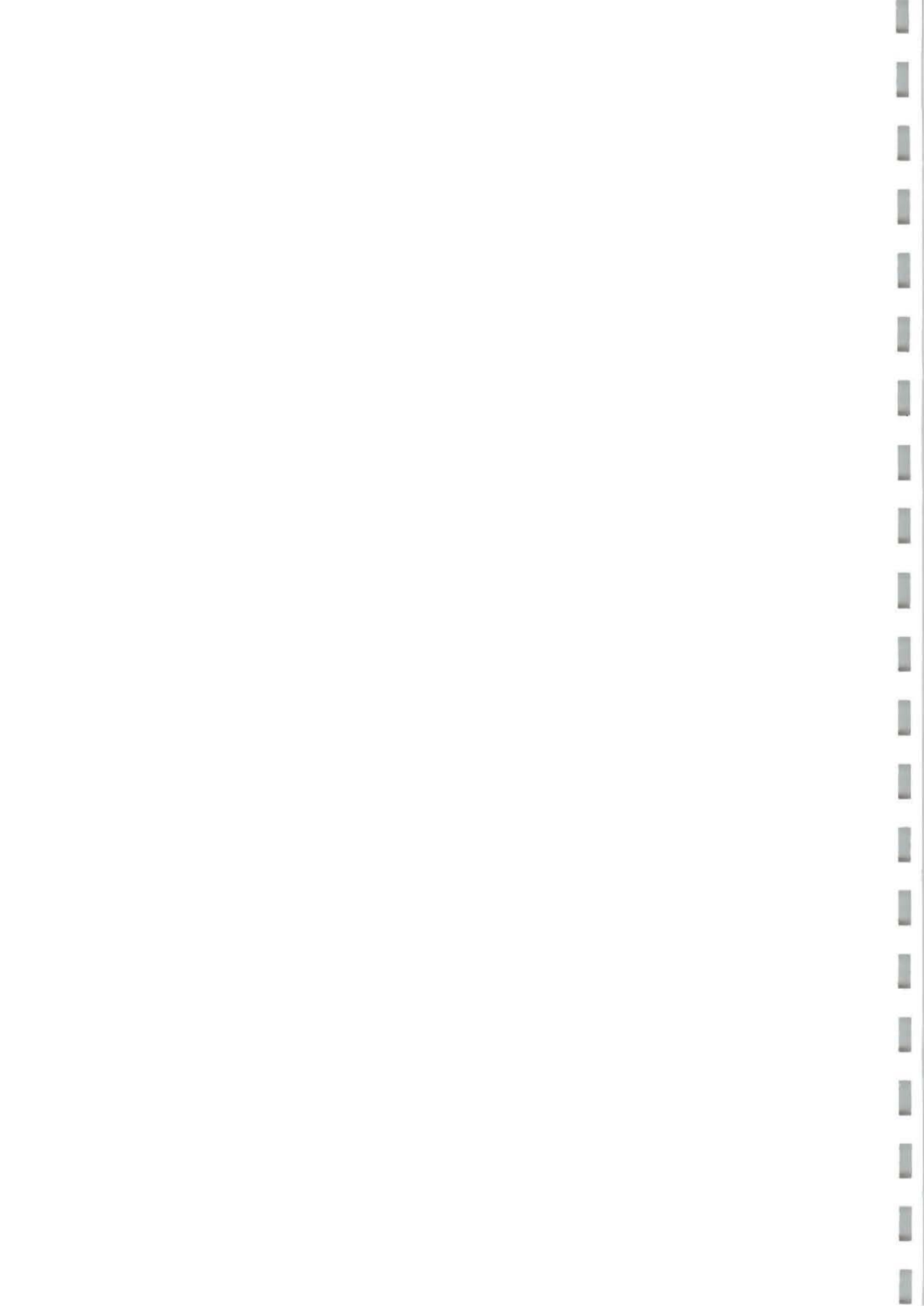
Le facteur déterminant pour le couvert végétal est la pluviosité effective liée à la topographie. Ainsi du Nord au Sud, le pays a été découpé en deux domaines phytogéographiques, sahélien au Nord et soudanien au Sud (fig. 1.3) eux mêmes divisés en secteurs et districts (Guinko, 1984).

#### 1.1.3.1. Le domaine phytogéographique sahélien

Il se situe sous le climat sahélien. La formation végétale caractéristique est la steppe à herbes annuelles à la steppe arborée et/ou arbustive et la brousse tigrée du Nord au Sud. On y rencontre quelques forêts ripicoles dans les dépressions. Ce domaine se subdivise en deux secteurs.

*Le secteur sahélien strict* : Situé au Nord du 14<sup>ème</sup> parallèle, il est dominé par les espèces sahariennes et sahéliennes typiques telles que *Acacia* spp., *Leptadenia pyrotechnica*, le palmier doum *Hyphaene thebaica* et les graminées, *Aristida* spp. et *Cenchrus* spp.

*Le secteur subsahélien* : Ce secteur s'étend entre le 13<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> parallèle. La steppe arbustive fait progressivement place à la steppe arborée vers le Sud. Les espèces sahéliennes et soudaniennes ubiquistes y coexistent dont : *Acacia senegal*, *Capparis sepiaria*, *Aristida hordeacea*, *Bauhinia rufescens*, *Cenchrus biflorus*, *Chloris* spp. ; *Boscia senegalensis*, *Commiphora africana*, *Grewia* spp. *Euphorbia balsamifera* et *Pterocarpus lucens*. Les quelques rares forêts ripicoles sont dominées par *Anogeissus leiocarpus*, *Mitragyna inermis*, *Acacia erythrocalyx* et *Acacia seyal*. Les brousses tigrées sont à prédominance d'*Acacia macrostachya* et *Combretum* spp.



### 1.1.3.2. Le domaine phytogéographique soudanien

Il est régi par le climat soudanien et soudano-sahélien. Comparé au domaine précédent, la végétation apparaît plus dense et hétérogène constituée d'une mosaïque de formations primaires (forêts galeries, forêts claires, savanes, prairies) et secondaires (savanes boisées, arborées ou arbustives).

Ce domaine est divisé en deux secteurs séparés par l'isohyète 1000 mm, le secteur Nord-soudanien et le secteur Sud-soudanien.

*Le secteur Nord-soudanien* : Situé entre les isohyètes 750 et 1000 mm, ce secteur correspond à la partie la plus peuplée et par conséquent la plus cultivée du pays. Les formations secondaires, en raison de l'action de l'homme et du feu y prédominent. La végétation a l'allure de paysages agricoles où dominent les parcs agro-forestiers avec les espèces à usages multiples, *Parkia biglobosa* (Néré), *Lannea microcarpa* (raisinier), *Adansonia digitata* (baobab), *Tamarindus indica* (tamarinier) et *Faidherbia* (*Acacia*) *albida*. Des forêts galeries de plus en plus larges vers le Sud sont rencontrées. Des bois sacrés (îlots de forêts sèches) protégés du feu et des abattages existent à proximité des villages.

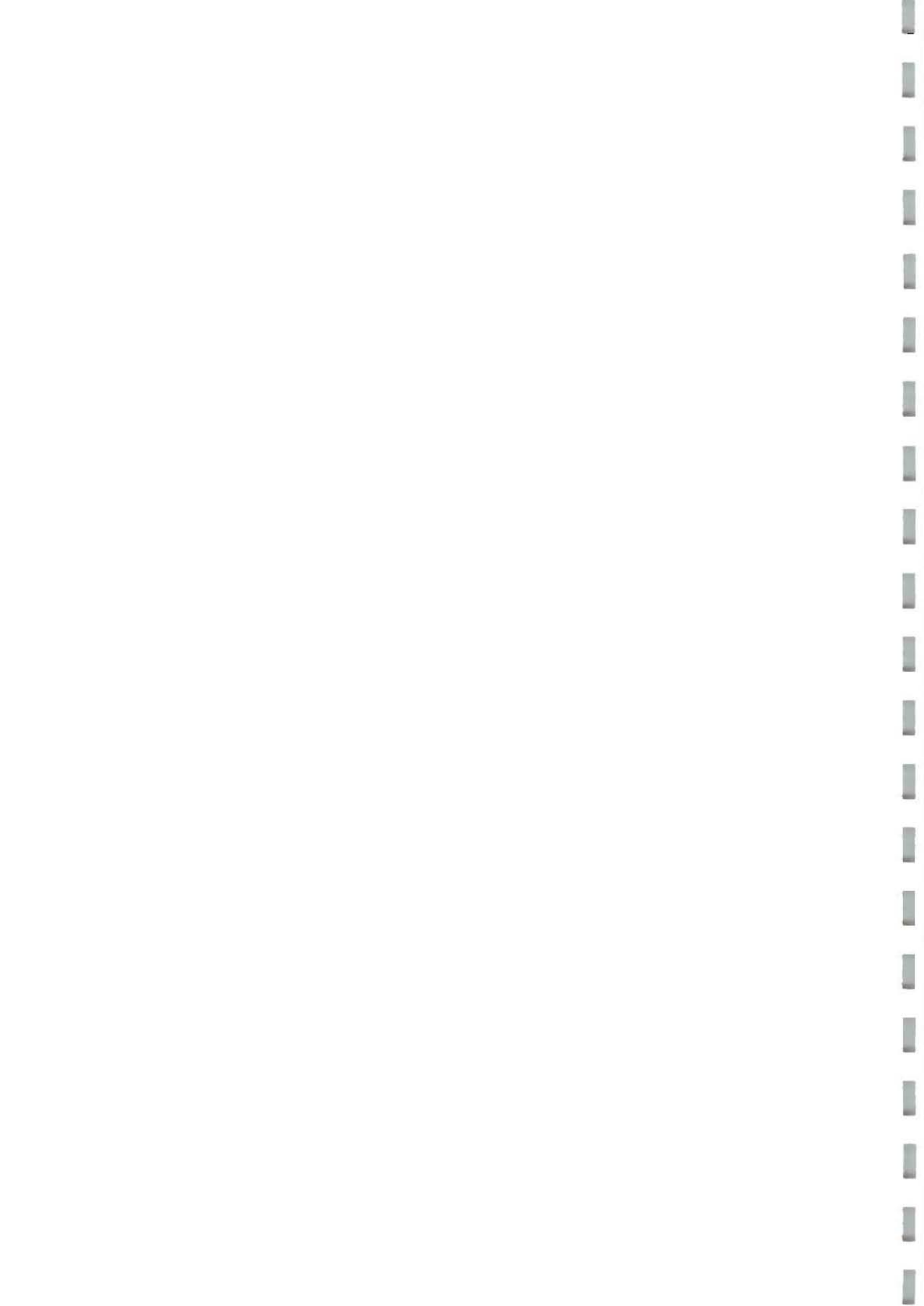
*Le secteur Sud-soudanien* : Avec une pluviométrie de 1000 à 1400 mm, ce secteur est caractérisé par des savanes boisées, des forêts claires et des galeries forestières constituées d'espèces guinéennes sempervirentes. Dans beaucoup de forêts claires domine l'espèce *Anogeissus leiocarpus* avec d'autres espèces telles que *Pterocarpus erinaceus*, *Burkea africana*, *Azelia africana*, *Albizia chevalieri* et surtout *Isobertinia doka* et *Detarium microcarpum*. La présence de l'espèce *Isobertinia doka* en peuplements monospécifiques ou associé à *Isobertinia dalziellii* caractérise également ce secteur.

On distingue de l'Ouest à l'Est les faciès suivants :

— le district Ouest-Volta Noire : L'abondance des eaux de surface entraîne la présence de larges galeries forestières à espèces guinéennes : *Antiaris africana*, *Chlorophora excelsa*, *Dialium guineense*, *Rauwolfia vomitoria* et *Voacanga africana*.

— le district Est-Volta Noire : Relativement moins riche que le précédent en espèce, ce district se caractérise par une moindre abondance des eaux de surface. Les espèces ripicoles rencontrées sont : *Cola launifolia*, *Pterocarpus santalinoides*, *Elaeis guineensis* (palmier à huile), *Manilkara multinervis*.





— le district de la Pendjari : Galeries forestières dominées par *Borassus aethiopicum* (rhônier) associée ou non à *Khaya senegalensis* (caïlcédrat), *Daniellia oliveri* et *Anogeissus leiocarpus*.

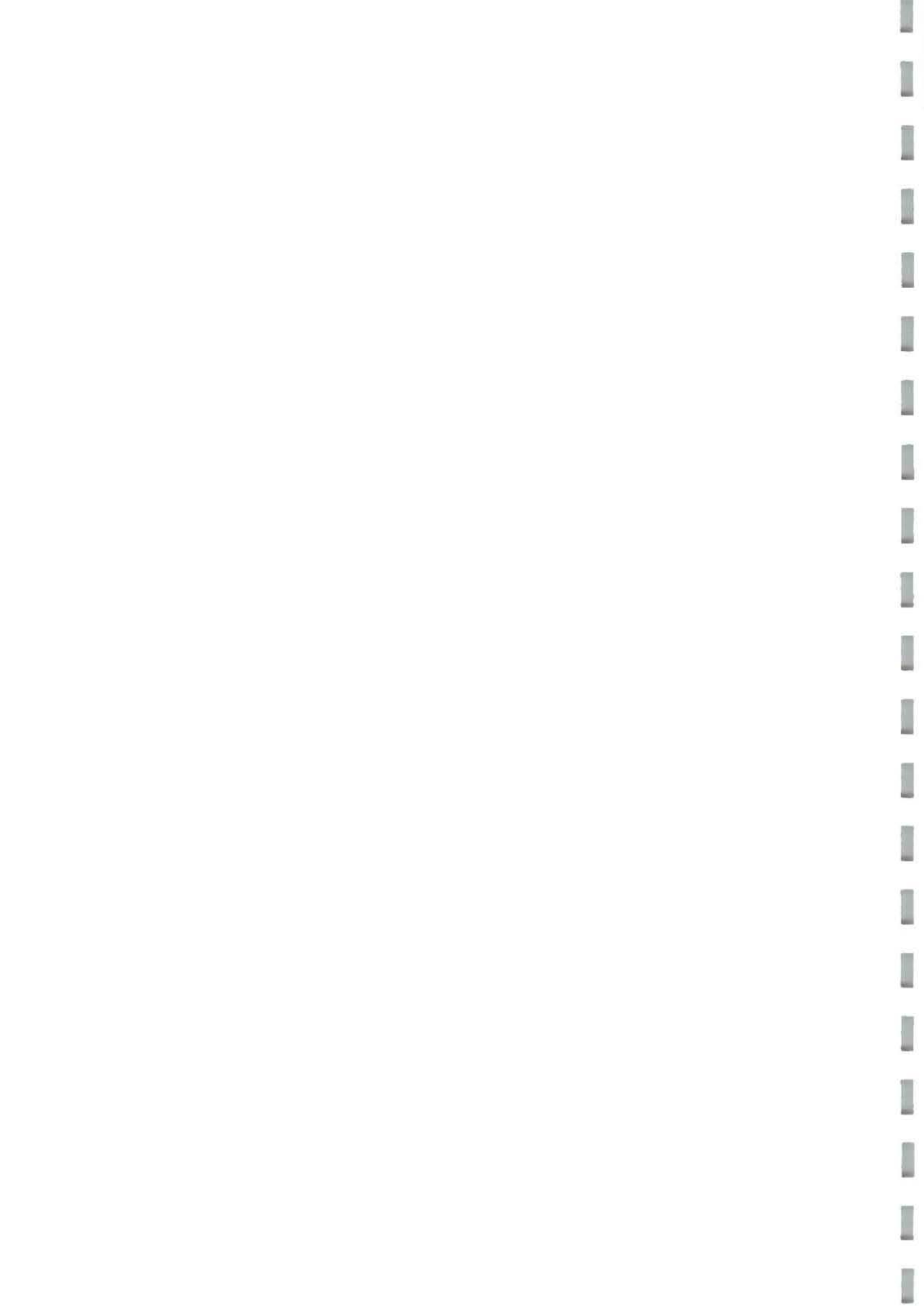
— le district de la Comoé : Il est situé à l'extrême Sud-Ouest, dans la partie la plus humide du pays et par conséquent la plus boisée avec quelques forêts classées. Le rhônier y est répandu en particulier dans les champs.

Du point de vue floristique, le Burkina Faso compte de nos jours environ 1054 espèces dont une centaine introduites par l'homme (Kessler et Geerling, 1994). Les légumineuses sont taxonomiquement dominantes avec 60 genres (sur un total de 500) et 178 espèces.

## 1.2. Pourquoi s'intéresser à *A. africana* ?

Pendant longtemps, la politique forestière au Burkina Faso comme dans beaucoup d'autres pays soudano-sahéliens a consisté à la protection stricte du domaine classé de l'état (390 500 ha de parcs nationaux, 2 545 500 ha de réserves faunistiques et 880 000 ha de forêts classées) et très peu de programmes ont été élaborés en faveur de la production forestière. Récemment est née la nécessité de reboiser face à l'ampleur des phénomènes de dégradation de l'écosystème naturel liés aux conditions climatiques défavorables et à la pression des facteurs anthropiques. En effet, sous l'action conjuguée des défrichements, du surpâturage, des feux de brousse, de la sécheresse, de pathologies diverses et de la dégradation des sols, certaines espèces ont disparu du territoire Burkinabé (Plan stratégique de la recherche, 1997). Cependant, faute de connaissance suffisantes sur la sylviculture des espèces locales et la faible productivité de celles-ci, les premiers reboisements ont reposé essentiellement sur des espèces exotiques (*Eucalyptus camaldulensis*, *Cassia siamea*, *Gmelina arborea*, *Prosopis juliflora*, *Azadirachta indica*...).

Ces espèces exotiques ont permis de remplir certaines fonctions des formations naturelles disparues (bois de feu, bois d'oeuvre et de service, ombrage, lutte contre l'érosion et l'amélioration de la fertilité des sols), mais les populations ont toujours eu recours aux espèces locales pour des biens et services nécessaires à leur survie (alimentation, fourrage, médecine et pharmacopée traditionnelles et fonctions socioculturelles). Par conséquent, il est nécessaire de conjuguer les objectifs de lutte contre la désertification et la dégradation des écosystèmes avec les besoins des populations. A cet effet, des espèces locales sont de plus en plus utilisées dans les reboisements au Burkina Faso (*Tamarindus indica*, *Parkia biglobosa*, *Butyrospermum*



*parkii*, *Khaya senegalensis*, *Adansonia digitata*) et différents projets s'occupent de l'aménagement des formations naturelles avec la participation des populations riveraines. Aussi beaucoup d'autres espèces ont été retenues en fonction de leur degré d'utilisation (Plan stratégique de la recherche, 1997) pour des programmes de recherche visant à connaître et préserver la diversité génétique de ces espèces, à maîtriser leur biologie et à améliorer leur productivité.

Si *Azelia africana* ne figure pas parmi les 16 premières espèces retenues, elle reste cependant une espèce de grand intérêt économique appréciée par les paysans et très exploitée pour le bois d'oeuvre et de service, les feuilles comme fourrage et l'alimentation dans certaines régions. Les premières tentatives de plantations forestières dans les champs menées par l'ICRAF (Centre International pour la Recherche en Agroforesterie) au Burkina Faso ont échoué. Les plantations effectuées en forêt en 1995 par le projet BKF93/003 d'aménagement des forêts n'ont malheureusement pas fait l'objet d'un suivi scientifique.

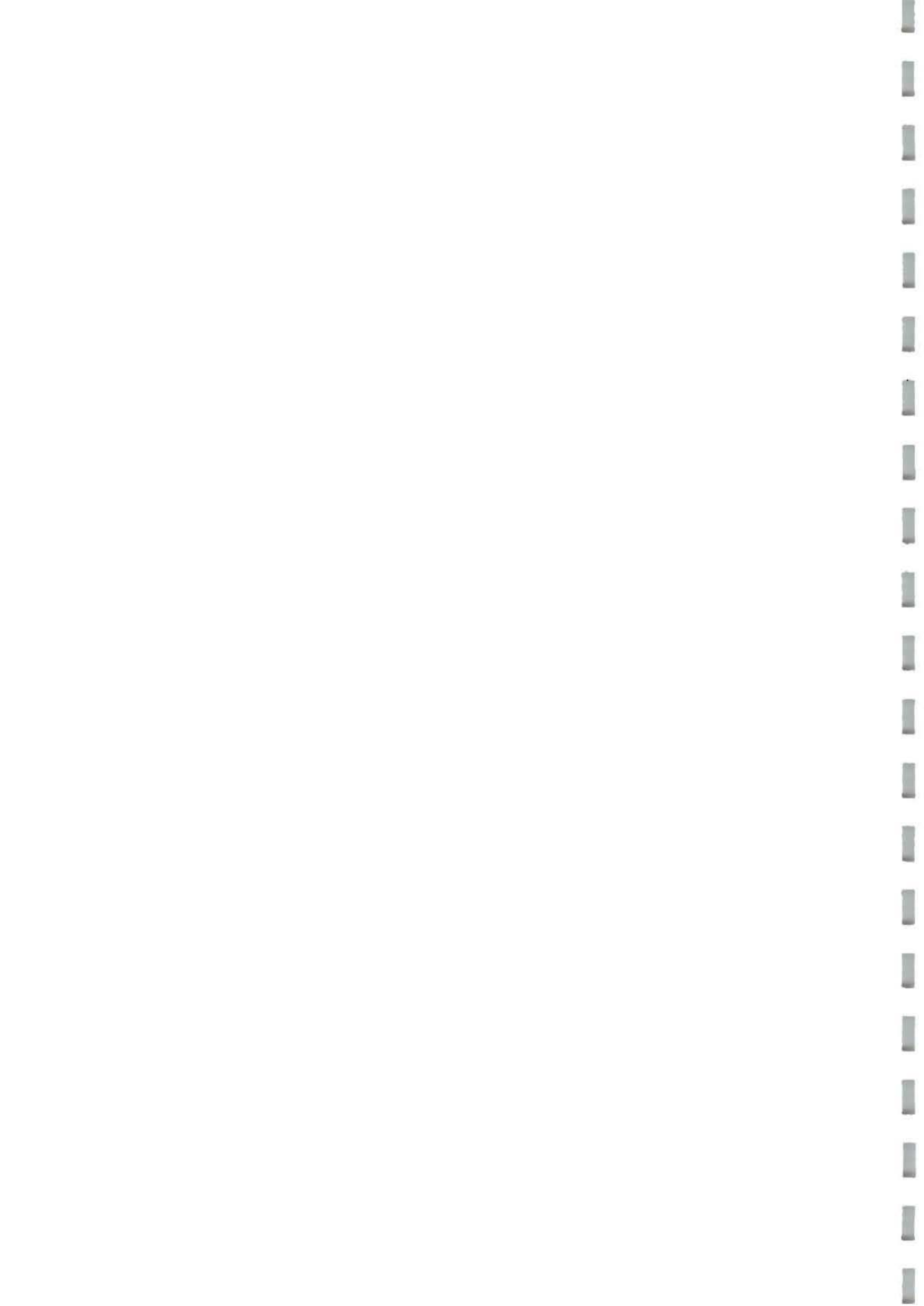
Ainsi dans le cadre des activités de recherche de notre laboratoire (Laboratoire de Microbiologie Forestière, INERA/DPF) sur les symbioses racinaires des plantes et en particulier la symbiose ectomycorhizienne, *A. africana* a retenu notre attention.

### ***1.3. La symbiose mycorhizienne***

La symbiose mycorhizienne est une association à bénéfice réciproque entre certains champignons et les racines des plantes. L'organe mixte appelé mycorhize est constitué de tissus du champignon et de la plante-hôte. C'est une association presque universelle chez les plantes terrestres. Deux principaux types d'associations mycorhiziennes ont été décrits en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et anatomiques :

1. les endomycorhizes, dans ce type d'association, le champignon pénètre à l'intérieur des cellules corticales de la plante-hôte et y forme des arbuscules au niveau desquels s'effectuent les échanges entre la plante-hôte et le champignon et des arbuscules et vésicules (organes de stockage). Cette association, non visible à l'oeil nu, est due à des champignons mycorhiziens stricts non cultivables en culture pure en l'absence de l'hôte.

2. les ectomycorhizes, le mycélium du champignon entoure la racine de l'hôte pour former le manteau, visible à l'oeil nu, à partir duquel des hyphes pénètrent entre les cellules corticales de l'hôte et forment ce que l'on appelle le réseau de Hartig. Les champignons impliqués sont des Basidiomycètes et des Ascomycètes et sont cultivables en l'absence de leur hôte.

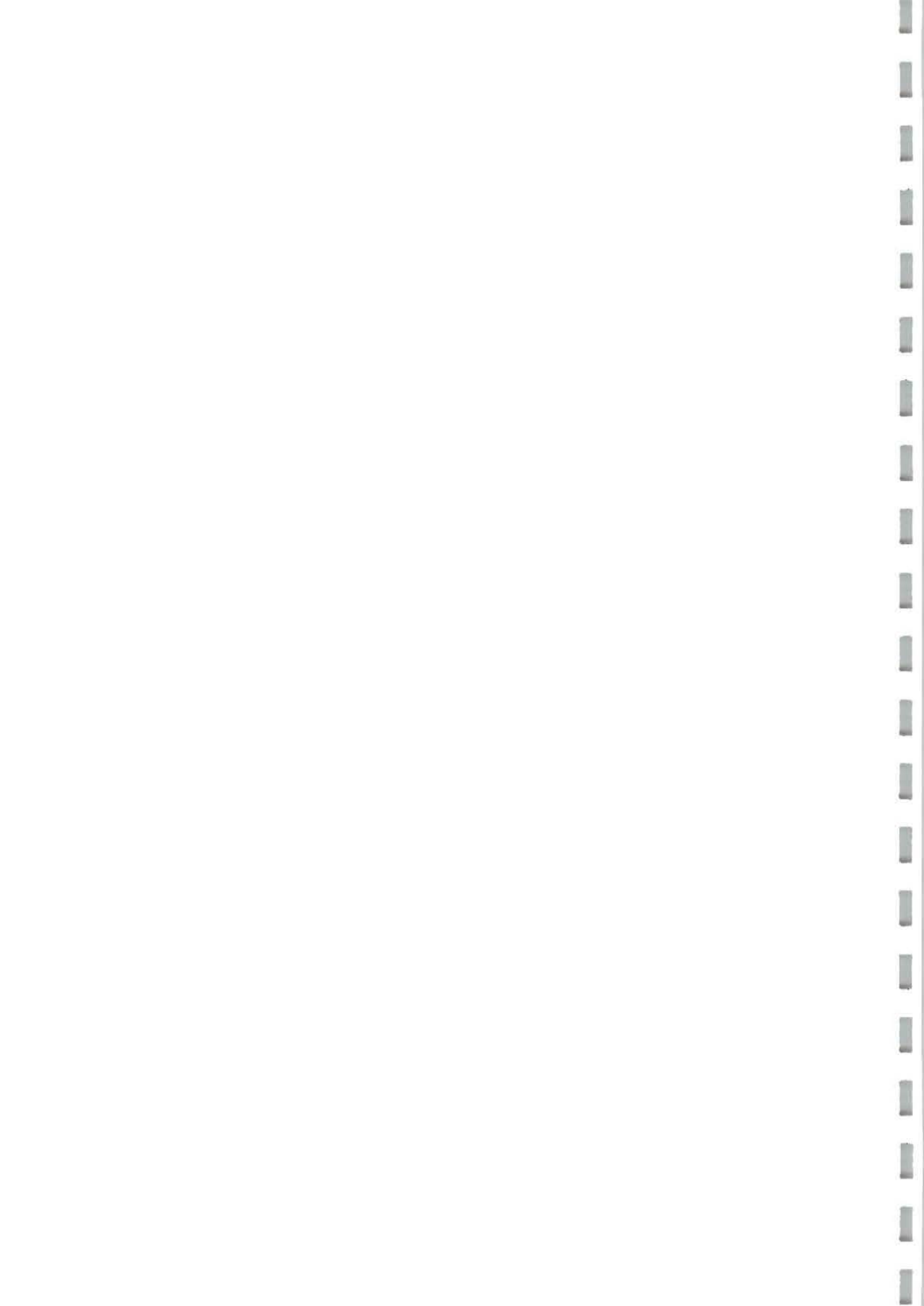


Dans tous les cas, des hyphes externes partent des racines "infectées", explorent des volumes importants de sol environnant les racines et prélèvent des éléments minéraux indispensables à la croissance de la plante-hôte. En retour, grâce à la photosynthèse, la plante fournit au champignon les substances carbonées nécessaires pour sa croissance et son développement.

Environ 80% des végétaux terrestres, notamment les plantes cultivées, la plupart des arbres tropicaux forment des endomycorhizes alors que seulement 5% sont ectomycorhiziens. La richesse spécifique des champignons endomycorhiziens est faible avec environ une centaine d'espèces connues dans le monde (Malloch *et al*, 1980) ; en revanche les espèces ectomycorhiziennes sont estimées à plus de 5000. Il existe une spécificité plus importante des champignons ectomycorhiziens vis-à-vis des plantes-hôtes.

#### ***1.4. La symbiose ectomycorhizienne en zone tropicale***

La plupart des arbres des forêts boréales, tempérées et montagneuses sont ectomycorhiziens (Harley, 1984). Environ 90% des arbres en zone tempérée sont ectomycorhizés (Le Tacon *et al*, 1991). Par contre, en zone tropicale domine l'association endomycorhizienne chez la majorité des arbres forestiers, fruitiers et chez les plantes cultivées. Ainsi, plusieurs auteurs ont révélé une proportion importante d'espèces endomycorhiziennes dans les forêts tropicales. Sur 62 espèces examinées dans les forêts de Sri Lanka, de Alwis et Abeynayake (1980) ont dénombré 5 espèces à ectomycorhizes (essentiellement des Dipterocarpaceae), 4 espèces non mycorhiziennes et 53 à endomycorhizes ; de même au Nigeria, Redhead (1968) signale 4 espèces ectomycorhiziennes et 44 endomycorhiziennes sur un total de 51 espèces locales examinées. En Tanzanie, 6 espèces ectomycorhiziennes et une à ectendomycorhizes ont été recensées sur 47 dont 40 endomycorhiziennes (Högberg, 1982). Dans la forêt tropicale humide de la Guyane Française, Béreau et Garbaye (1994) n'ont observé aucune ectomycorhize sur 21 espèces examinées. Des observations similaires ont été faites un peu partout dans les forêts tropicales (Thapar et Khan, 1973 ; Tupas et Sajise, 1976 ; Högberg et Nylund, 1981 ; Högberg, 1982 ; Kasha *et al*, 1990). De ces observations, il ressort que les ectomycorhizes sont présentes essentiellement chez les Dipterocarpaceae, les Myrtaceae (*Eucalyptus*, *Melaleuca*, *Syzygium*), les Casuarinaceae (*Casuarina*, *Allocasuarina*), les Mimosaceae (Acacias australiens) et les Caesalpinioideae (*Azelia*, *Isoberlinia*, *Tetraberlinia*, ...).



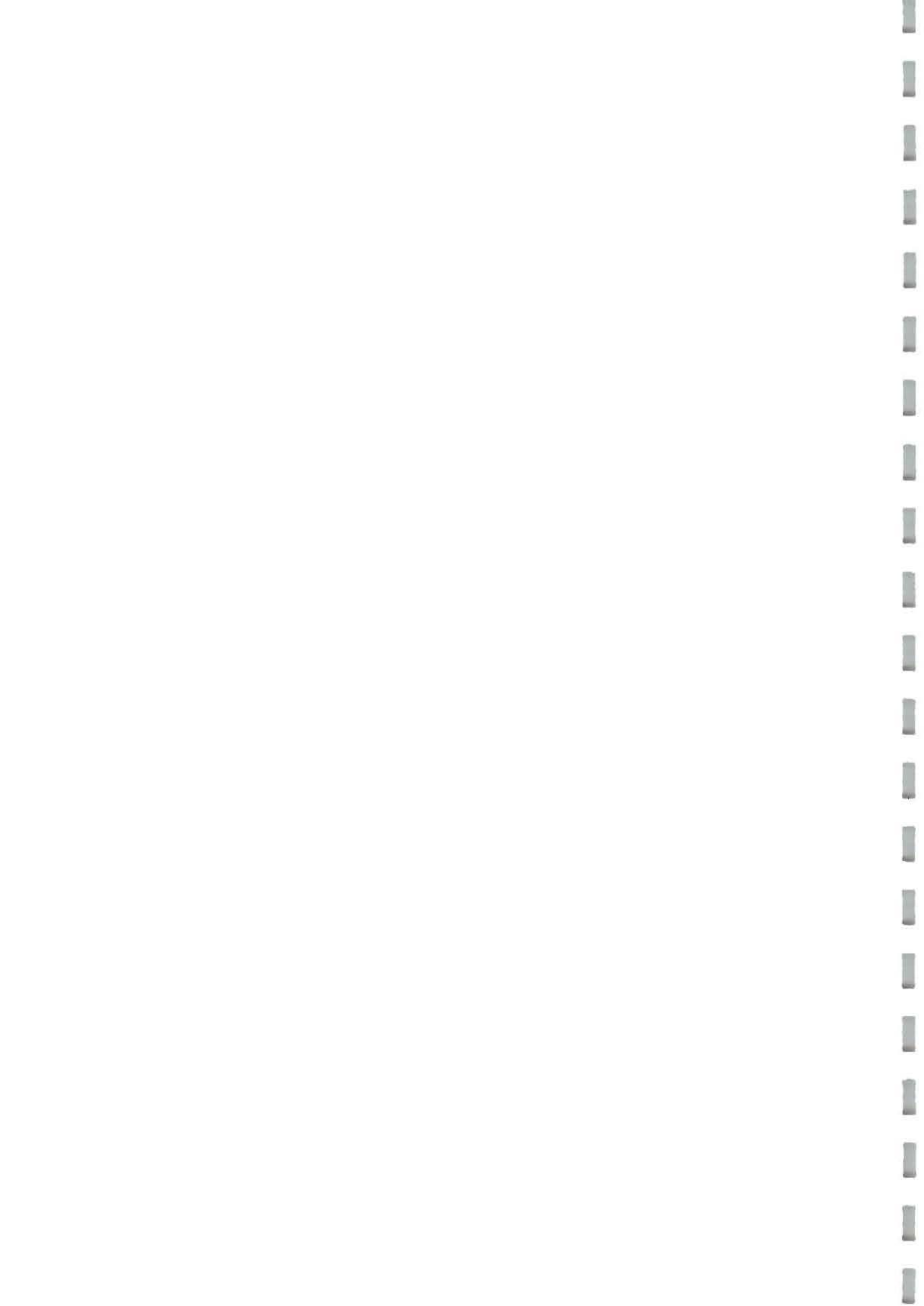
En Afrique tropicale, le nombre d'espèces forestières à ectomycorhizes est estimé de nos jours à 67 (Bâ et Duponnois, 1998) réparti en 18 genres dont essentiellement des *Caesalpinioideae* (tribu des *Amherstieae*). Des inventaires mycologiques indiquent qu'il existe également une grande diversité de champignons ectomycorhiziens vis-à-vis de ces arbres (Buyck et al, 1996). Par exemple, en Afrique de l'Ouest (Burkina Faso, Guinée, Sénégal) au moins 85 espèces fongiques ont été repertoriées parmi lesquelles 7 ont montré une aptitude à l'ectomycorhization (Thoen et Bâ, 1989 ; Thoen et Ducouso, 1989 ; Bâ et Thoen, 1990 ; Sanon *et al.*, 1997). Ce nombre est probablement sous estimé puisque 43 espèces ont été inventoriées sous seulement *Afzelia africana* et *Uapaca guineensis* au Sénégal (Bâ, 1990). Comme en zone tempérée, certaines espèces à ectomycorhizes signalées en Afrique tropicale sont de grand intérêt économique et écologique et pour cela sont utilisées dans les reboisements et les programmes d'aménagement. Nous pouvons citer entre autres les espèces du genre *Afzelia* et *Brachystegia* (Bâ, 1990 ; Munyaziza et Kuyper, 1994 ; Ahouangonou, 1997 ; Onana, 1998).

### ***1.5. Mycorhization contrôlée et sélection de champignons efficaces***

Il est bien établi que la symbiose ectomycorhizienne joue un rôle très important dans l'écologie et la biologie des plantes-hôtes par l'amélioration de leur croissance et leur nutrition minérale (Smith et Read, 1997). Elle confère aux plantes mycorhizées une protection phytosanitaire des racines (Perin, 1991) et une résistance à la crise de transplantation (Garbaye, 1990). Cette amélioration de la production végétale de l'hôte a été mise en évidence expérimentalement grâce à la mycorhization contrôlée qui consiste à introduire en pépinière des souches fongiques sélectionnées et à évaluer leur effet sur la croissance de l'hôte (Le Tacon, 1982 ; Le Tacon et Bouchard, 1986 ; Garbaye *et al.*, 1988 ; Yazid *et al.*, 1994). Ainsi dans certains pays tempérés tels que la France, l'Espagne, les Etats Unis, des plantations ont été effectuées avec des plants inoculés à l'aide de souches fongiques sélectionnées (Marx et Cordell, 1988 ; Garbaye et Wihlem, 1984 ; Garbaye, 1990 ; Le Tacon *et al.*, 1988, 1992 ; Garbaye et Churin, 1998). L'analyse des populations fongiques quelques années après plantation a révélé la persistance et la compétitivité de certaines souches introduites (Villeneuve *et al.*, 1991 ; Di Battista, 1997 ; Sélosse *et al.*, 1998a).

En zone tropicale, en particulier en Afrique, l'échec des premières tentatives d'introduction de Pins a révélé l'importance de la symbiose ectomycorhizienne. Les



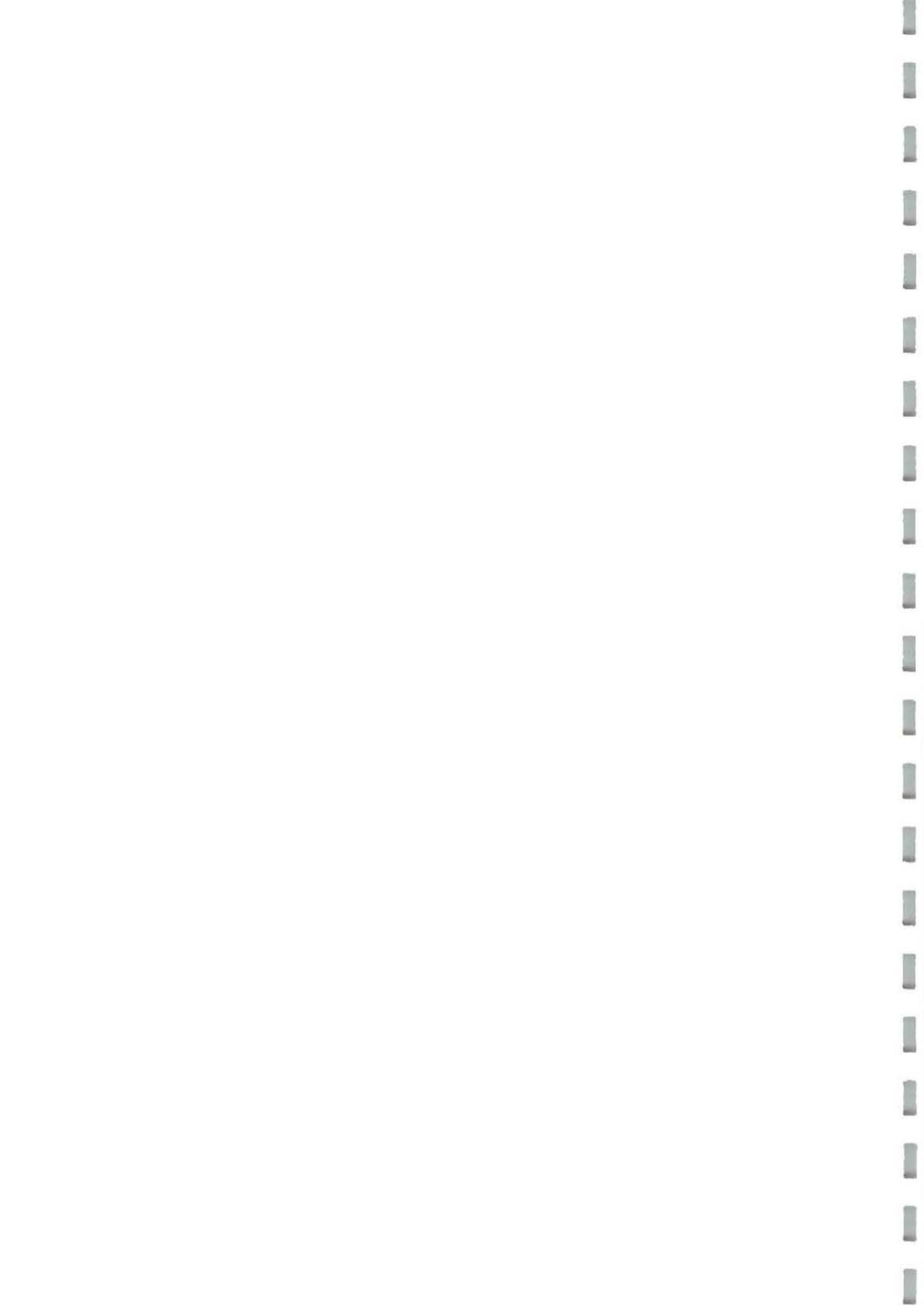


premières plantations de Pins en Afrique tropicale (*Pinus radiata* au Kenya, *Pinus oocarpa* et *P. khasya* au Nigeria) (Mikola, 1970) doivent leur succès à l'inoculation des plants à l'aide d'humus issu de plantations précédentes ou de spores de symbiote fongique. Néanmoins, les premiers auteurs qui se sont intéressés à la mycorhization des espèces des forêts tropicales d'Afrique ont essentiellement décrit le statut mycorhizien de celles-ci (Peyronnel et Fassi, 1960 ; Fassi et Fontana, 1962 ; Jenik et Mensah, 1967 ; Redhead, 1968 ; Högberg, 1982 ; Högberg et Pearce, 1986 ; Alexander et Högberg, 1986 ; Newberry *et al.*, 1988). Les symbiotes fongiques ont été quelques fois identifiés (Heinemann, 1954, 1959, 1966 ; Heim, 1970 ; Pegler, 1977 ; Munyaziza et Kuyper, 1994 ; Buyck *et al.*, 1996). Cependant, les isolements de mycélium en culture ont été rarement réalisés expliquant ainsi la rareté des essais de mycorhization contrôlée des essences locales.

Dans les forêts tropicales où la pauvreté des sols (surtout en phosphore) constitue un facteur limitant la production végétale, les mycorhizes doivent fortement contribuer au maintien de leur productivité.

*La nécessité s'impose donc d'identifier et de sélectionner les myco-symbiotes efficaces pour la croissance des plants destinés au reboisement .*

Différentes espèces de champignons peuvent s'associer à un arbre au cours de sa croissance (Masson *et al.*, 1983 ; Bâ *et al.*, 1991). La sélection de souches efficaces pour la croissance en pépinière concerne celles capables de mycorhizer l'hôte au stade juvénile. Garbaye (1990a) a défini 4 contraintes principales qui doivent être prises en compte lors la sélection d'une souche performante : (i) l'aptitude à former des mycorhizes au stade juvénile, ce qui élimine les champignons dits tardifs (Fleming *et al.*, 1984 ; Masson *et al.*, 1983) qui forment des mycorhizes au delà des premières années de plantation, (ii) la possibilité et la facilité de culture *in vitro* pour la production d'inoculum, (iii) l'efficacité sur la croissance de l'hôte dans différentes conditions écologiques et (iv) la compétitivité vis-à-vis des autres micro-organismes en plantation. La sélection de champignons efficaces en pépinière nécessite la prise en compte des deux premiers critères ainsi que l'effet de la souche sur la croissance de l'hôte dans les conditions de pépinière. Par contre, l'efficacité des souches fongiques sur le terrain et leur compétitivité dépendent de plusieurs facteurs dont les caractéristiques du site à reboiser (ancien terrain de culture, site forestier, ...), le type de plantation (exotique ou non) et l'adaptation du champignon aux conditions écologiques. Ainsi, l'étude de la persistance et de la compétitivité des souches



introduites nécessite qu'il soit possible de les identifier en pépinière et au champ à partir de leurs différentes formes biologiques.

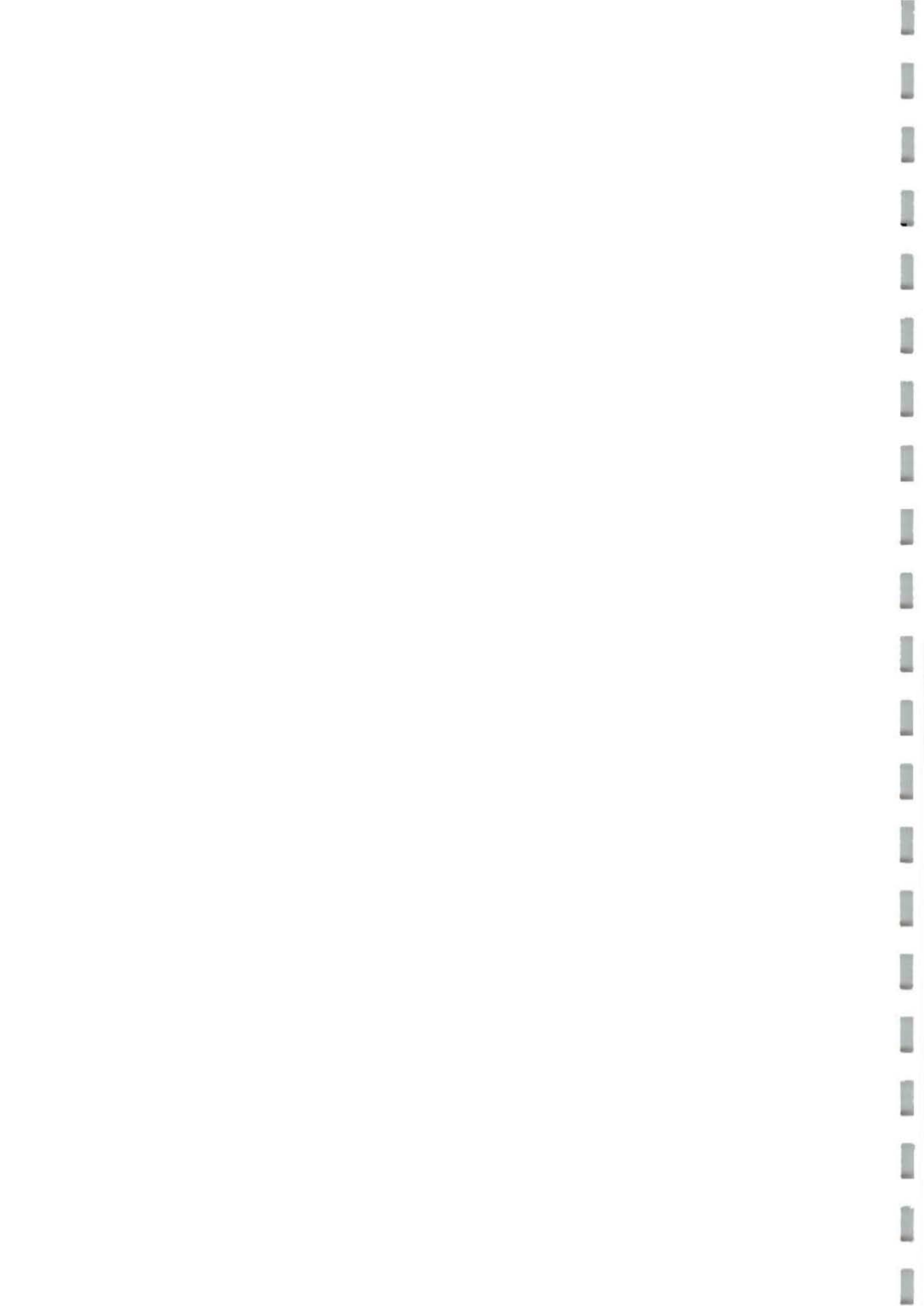
### ***1.6. Suivi des souches introduites en pépinière et au champ, critères d'identification des champignons ectomycorhiziens***

Chaque mycorhize nécessite d'être identifiée comme une unité biologique afin de permettre d'explorer ses différents rôles sur la croissance et la survie de la plante-hôte. Aussi, l'importance écologique et la diversité des champignons ectomycorhiziens dans un écosystème ont été couramment évaluées à partir de leur fructification ou de leurs structures sexuelles de reproduction (Gardes et Bruns, 1996). Cependant plusieurs facteurs écologiques et climatiques peuvent influencer la fructification des champignons d'une année à l'autre (pluviométrie, température, ...). La fructification est ainsi sporadique, surtout sous climat peu humide, et nécessite une longue période d'observation. Différents auteurs indiquent que la présence de carpophores sur un site ne peut être un bon indicateur de la diversité des champignons présents (Gibson et Deacon, 1988 ; Danielson et Pruden, 1989 ; Dahlberg, 1991 cités par Mehmman *et al*, 1994). Certains champignons présents au niveau des mycorhizes et absents sous forme de carpophores pourraient être ignorés. Il est donc indispensable de pouvoir identifier sans ambiguïté les champignons présents au niveau des mycorhizes. Des critères morphologiques et anatomiques couplés à des critères génétiques sont de nos jours utilisés pour l'identification des isolats fongiques à partir des mycorhizes. Cette identification est nécessaire à l'étude de la persistance d'une souche introduite et à l'évaluation de la diversité génétique des champignons ectomycorhiziens en l'absence de fructification.

#### **1.6.1. Critères morphologiques et anatomiques**

L'identification des champignons ectomycorhiziens a d'abord été basée sur les caractères macroscopiques des carpophores (taille, forme) et des mycorhizes (grosueur, forme, couleur et aspect) (Agerer, 1987). Les caractéristiques morphologiques des spores ont ensuite été prises en compte, puis certains chercheurs ont considéré l'anatomie des différentes parties des carpophores et aussi des mycorhizes.

Ainsi Dominik (1969) a établi une classification des mycorhizes en 12 sous-types subdivisé chacun en 8 genres en fonction des caractéristiques macroscopiques et microscopiques de la mycorhize et du manteau (couleur, forme, texture et structure du manteau). Cette classification s'est avérée insuffisante puisqu'elle ne prend pas en compte



la plante-hôte et l'espèce fongique. De plus, un genre peut regrouper plusieurs ectomycorhizes différentes. La classification de Zak (1969, 1973) définit des critères applicables à plusieurs espèces avec une description détaillée des 2 partenaires. L'utilisation de ces critères (une dizaine) nécessite l'isolement du champignon en culture pure et la comparaison avec des souches de référence, la synthèse mycorhizienne en conditions contrôlées, l'établissement de lien entre les hyphes des rhizomorphes et des carpophores et la comparaison entre le mycélium à la base du carpophore et les mycorhizes sous-jacentes. Outre l'énorme investissement en temps, l'aspect sporadique des fructifications limitent l'efficacité de ces critères à l'identification, en particulier, des espèces fongiques pour lesquelles il n'est pas connu de fructifications.

Voiry (1981) a également défini des critères morphologiques et anatomiques à la classification des mycorhizes du chêne et du hêtre. Les critères de Agerer (1995) sont assez complexes et leur utilisation n'est pas aisée pour les non spécialistes. De plus ils sont limités à certaines espèces mycorhiziennes bien connues.

Les différentes classifications anatomo-morphologiques sont efficaces à l'identification des champignons formant des mycorhizes typiques (*Cenococcum geophilum*). Elles restent cependant insuffisantes face aux multitudes d'associations ectomycorhiziennes existant dans le monde. La grande ressemblance morphologique et anatomique des mycorhizes de genres (cas des mycorhizes de *Rhizopogon* et *Suillus* difficiles à identifier en l'absence de carpophores), d'espèces (mycorhizes du genre *Laccaria*) et d'isolats (mycorhizes de Sclérodermes) différents rendent plus difficile l'utilisation de ces critères. Des essais de mycorhization contrôlée ont pourtant mis en évidence une variabilité inter- et intra-spécifique des propriétés mycorhizogènes de différents champignons (Theodorou et Bowen, 1970 ; Le Tacon *et al*, 1991 ; Thomson *et al*, 1994 ; Dell et Malajczuck, 1997).

*Il s'avère donc indispensable de pouvoir identifier au niveau intra-spécifique les souches fongiques sélectionnées et introduites en pépinière pour un suivi rigoureux en plantation.*

Ces dernières années, différentes techniques biochimiques et/ou moléculaires ont été développées pour permettre un examen efficace de la diversité génétique des symbiontes fongiques, identifier les souches fongiques à partir des mycorhizes et suivre la compétitivité des souches introduites au champ. Parmi ces techniques, l'analyse de l'ADN est désormais la plus utilisée.

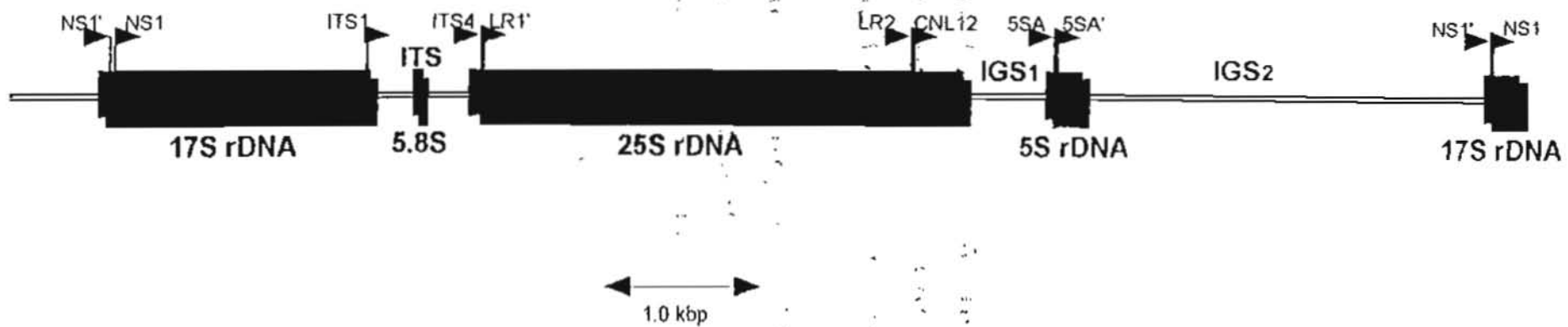


Figure 1.4. Structure de l'ADN ribosomal et sites d'appariement de différentes amorces

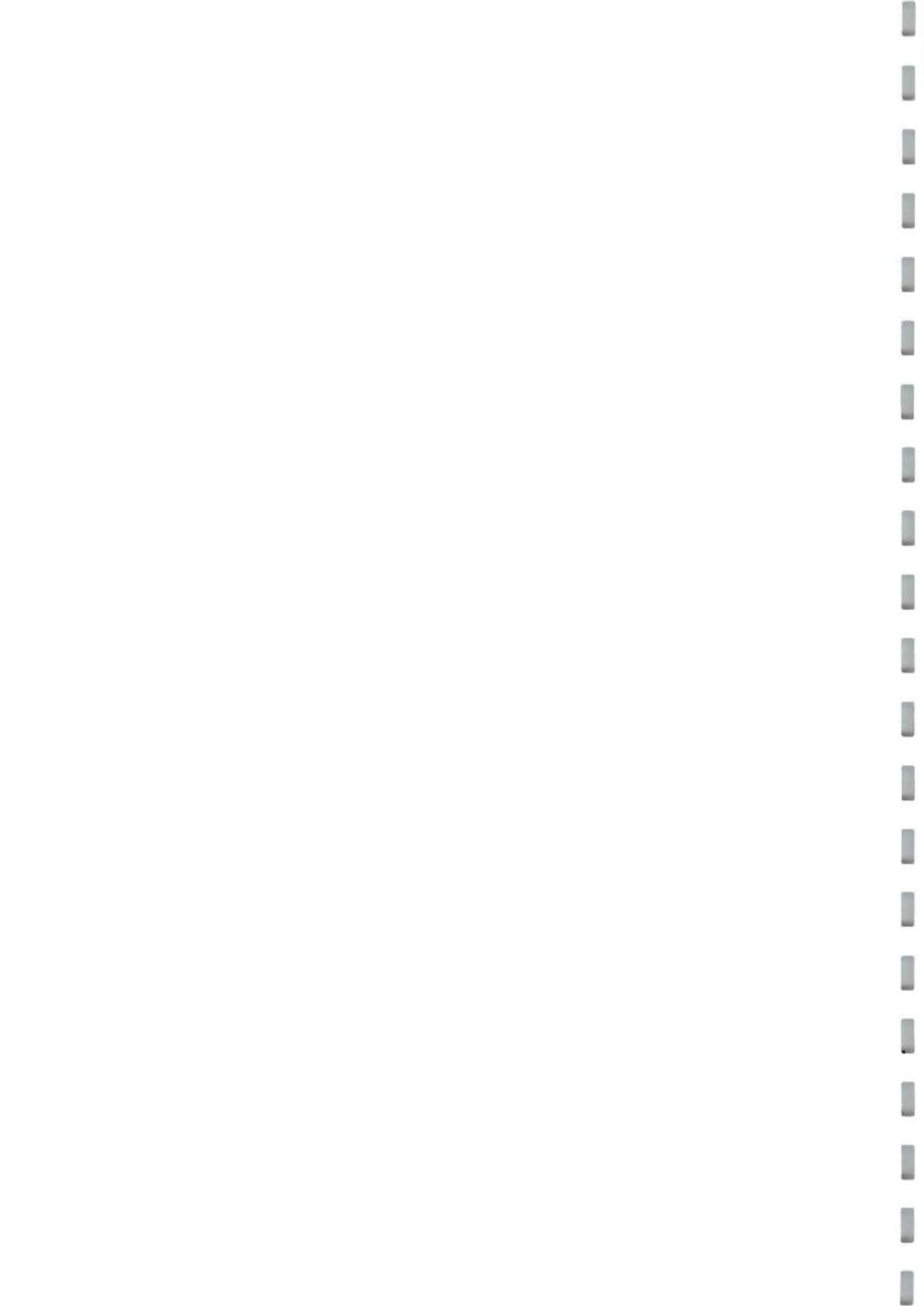
### 1.6.2. Critères moléculaires

Des techniques biochimiques et moléculaires (immunologie, isoenzyme, analyse des polypeptides, analyse de l'ADN génomique) ont été utilisées pour l'identification et pour l'étude de la diversité génétique de populations fongiques à partir de leurs différentes formes biologiques (carpophores, mycélium et mycorhizes) (Henrion, 1995). D'énormes progrès ainsi ont été réalisés dans l'étude de la diversité génétique de champignons mycorrhiziens et l'identification du symbiote impliqué dans les mycorhizes (Gardes et Bruns, 1997 ; Mehmman *et al*, 1995 ; Henrion *et al*, 1994). Les études ont d'abord porté sur le polymorphisme de l'ADN total digéré par différentes endonucléases et hybridé à des sondes ribosomales. La comparaison des profils d'hybridation a permis de différencier des espèces et des isolats fongiques au sein d'une espèce (Armstrong, 1989 ; Martin *et al*, 1991). Toutefois son utilisation nécessite des précautions particulières relatives aux produits radioactifs. La mise au point de la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki *et al*, 1988) a permis dans de nombreux domaines de s'affranchir du clonage et l'utilisation de sondes radiomarquées (Haras et Amoros, 1994). C'est une technique qui permet d'augmenter de façon exponentielle le nombre de copie d'un segment d'ADN à partir d'un échantillon contenant des traces d'ADN génomique. Le principe est basé sur l'utilisation d'amorces nucléotidiques spécifiques, construites à partir des séquences conservées de l'ADN, et le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermo-résistante.

Face à l'insuffisance des critères anatomo-morphologiques d'identification intra- et même interspécifique de champignons ectomycorhiziens en particulier à partir de mycorhizes, la technique de PCR a été beaucoup utilisée pour l'étude de la diversité génétique de populations fongiques et au suivi de champignons introduits en pépinière et au champ (Gardes *et al*, 1991a, b ; Gandeboeuf *et al*, 1995 ; Di Battista *et al*, 1996 ; Gardes et Bruns, 1996 ; Dahlberg *et al*, 1997 ; Gryta *et al*, 1997 ; Horton et Bruns, 1998 ; Selosse *et al*, 1998). Au cours de ces études, différentes parties du génome ont été utilisées comme cibles :

— *l'ADN ribosomal nucléaire* : les ADN ribosomiaux (ADNr) ont été très utilisés pour l'étude des relations phylogénétique et systématique chez les champignons. Les séquences codant les ARN ribosomiaux sont présentes en plusieurs copies et leur structure répétée en tandem est connue chez beaucoup d'organismes dont les champignons (Kochel et Kuntzel, 1982). L'analyse des séquences répétées ribosomiques met en évidence des régions intergéniques variables (l'Espaceur Interne Transcrit, ITS et l'Espaceur Intergénique, IGS) et des régions à séquences très conservées (fig. 1.4)





codant les ARN 17s, 5,8s, 25s, et 5s pouvant servir comme amorces universelles (White *et al*, 1991 ; Henrion *et al*, 1992 ; Gardes et Bruns, 1993).

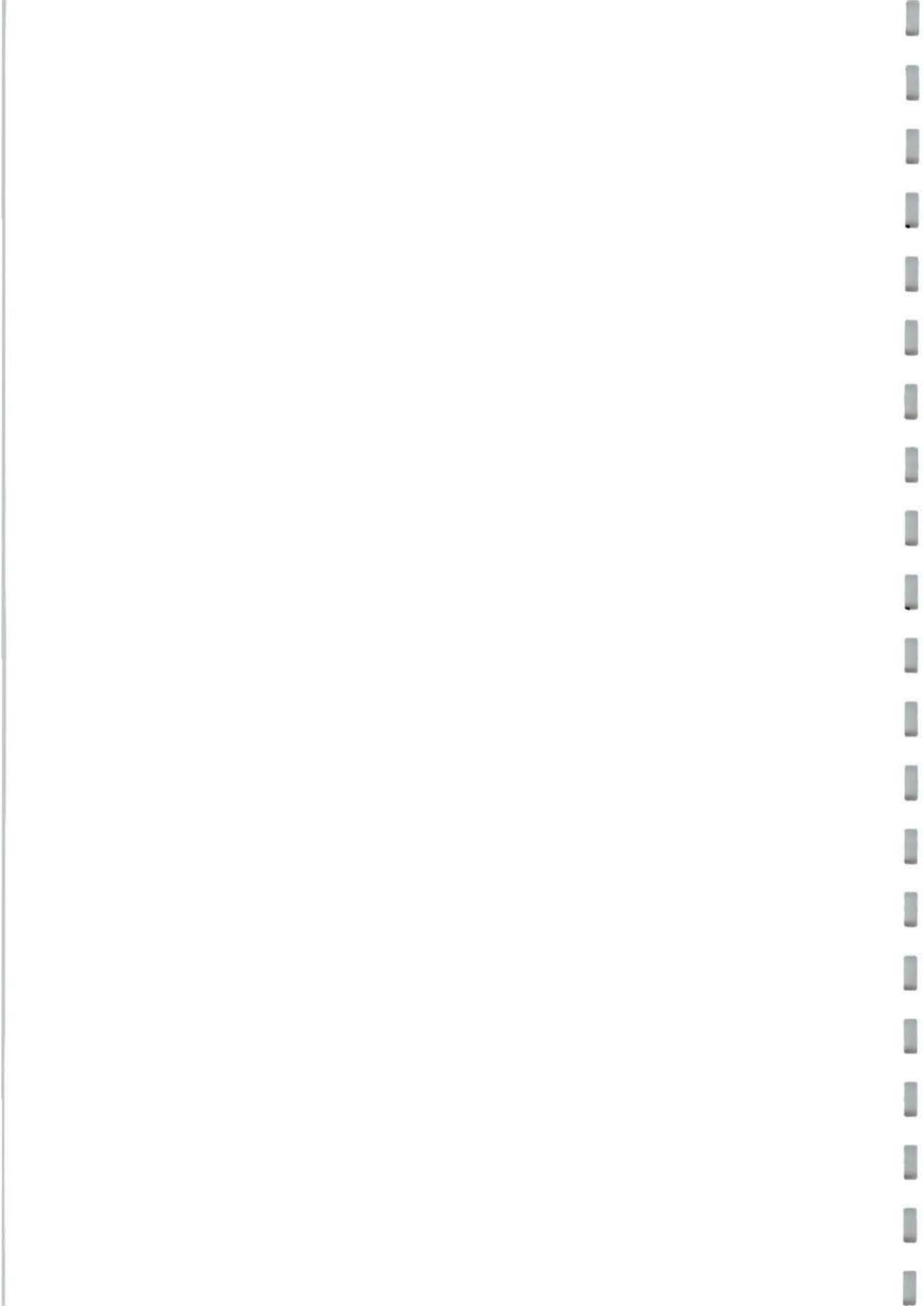
— *l'ADN ribosomal mitochondrial* : présents également en plusieurs copies, les ADN ribosomaux mitochondriaux sont indépendants du génome nucléaire et facilement accessibles pour des études génétiques. Des régions polymorphes de la grande et la petite sous-unités des ADNr mitochondriaux ont été utilisées par certains auteurs pour différencier des espèces fongiques (Gardes *et al*, 1991 ; Tagliavini *et al*, 1994 ; Gardes *et al*, 1995 ; Bruns *et al*, 1998).

Des amorces nucléotidiques ont été construites à partir des régions conservées de l'ADNr nucléaire et mitochondrial pour permettre l'amplification des régions spécifiques. Le couple d'amorces ITS1/ITS4 est utilisé pour amplifier la région ITS et l'IGS1 est amplifié à l'aide des amorces 5SA et CNL12. La petite et la grande sous-unités de l'ADNr mitochondrial sont respectivement amplifiées par les amorces MS1 et MS2 (Tagliavini *et al*, 1994) et ML7 et ML8 (Gardes *et al*, 1995).

Il a été possible de différencier des espèces et/ou des isolats fongiques après électrophorèse et analyse de la longueur des fragments des différentes régions amplifiées (Henrion *et al*, 1992). Mais très souvent c'est l'analyse de la longueur des fragments de restrictions (RFLP), générés par la digestion de ces régions avec différentes endonucléases, qui permet de différencier des espèces et des isolats de champignons ectomycorhiziens (Gardes *et al*, 1991 ; Gardes et Bruns, 1993 ; Gardes et Bruns, 1996 ; Karen *et al*, 1997 ; Dahlberg *et al*, 1997 ; Gryta *et al*, 1998 ; Selosse *et al*, 1998a ; Bruns *et al*, 1998).

La séquence nucléotidique des régions ITS et IGS déterminée par séquençage permet d'estimer les pourcentages de similarité et d'établir des relations phylogénétiques entre espèces et isolats de champignons ectomycorhiziens (Anderson *et al*, 1998 ; Martin *et al*, 1998).

— *l'ADN total* : la RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), ou amplification aléatoire de segments d'ADN, à l'aide d'une seule amorce oligonucléotidique courte est également basée sur la technique de la PCR. Elle permet d'accéder au polymorphisme de larges portions du génome. C'est une technique à grande résolution pour l'étude de la variabilité intraspécifique et permet de différencier des individus génétiquement très proches (De la Bastide, 1994 ; Selosse *et al*, 1998b). Elle a été employée pour l'étude de la distribution spatio-temporelle et de la persistance des populations de *Laccaria bicolor* en plantations (De la Bastide *et al*, 1994 ; Selosse *et al*, 1998b) et aussi pour l'identification des espèces du genre *Tuber* (Gandebœuf *et al*,



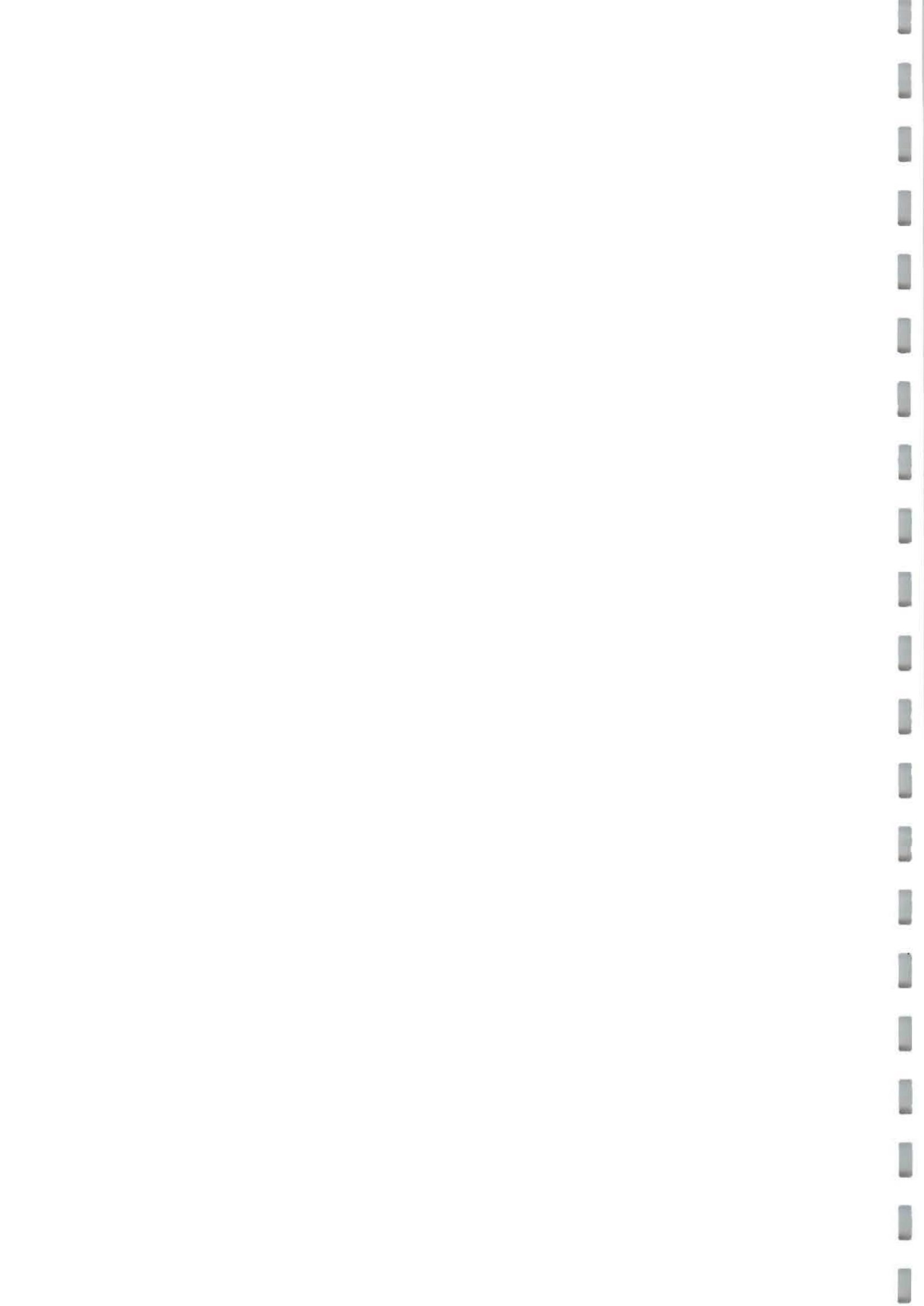
1994). Elle est sujette à des problèmes de reproductibilité et nécessite des répétitions et l'utilisation de plus d'une amorce pour un matériel donné (Welsh et McClelland, 1990 cités par Trappe et Jumpponen, 1994). Toutefois, l'utilisation de températures d'hybridation des amorces élevées (50°C) permet d'éviter ces problèmes (Selosse *et al*, 1998b).

Grâce à la possibilité d'extraire et d'amplifier l'ADN de champignons à partir de leur différentes formes biologiques, la PCR permet ainsi d'étudier assez rapidement la diversité génétique des communautés et des populations de champignons mycorhiziens d'un écosystème et de suivre rigoureusement, par utilisation de marqueur spécifique, la persistance d'une souche introduite en pépinière et en plantation.

Notre projet de recherche de thèse visait à :

1. estimer la diversité des champignons ectomycorhiziens associés à différentes plantes-hôtes au Burkina Faso,
2. étudier, en particulier, la diversité intra- interspécifique des Sclérodermes,
3. identifier les symbiotes d'*A. africana* élevé en pépinière.

Afin d'atteindre ces objectifs, j'ai été amené à développer une gamme de méthodologies d'identification complémentaires basées sur (i) des critères morphologiques (carpophores, mycorhizes), (ii) anatomiques et structurales (mycorhizes) et (iii) moléculaires (mycorhizes, mycélium).



## *Chapitre II.*

### *Inventaire des champignons ectomycorhiziens associés à A. africana et d'autres espèces ectomycorhiziennes dans les forêts du Sud-Ouest du Burkina Faso.*





## 2.1. Introduction

En zone tropicale, en particulier en Afrique, les inventaires de champignons ectomycorhiziens associés aux espèces locales sont peu abondants. Les différents travaux ont surtout été orientés sur le statut endo- ou ectomycorhizien de ces espèces (Fassi et Fontana, 1962 ; Jenik et Mensah, 1967, Redhead, 1968 ; Högberg et Nylund, 1981 ; Newbery *et al.*, 1988 ; Khasa *et al.*, 1990 ; Ivory *et al.*, 1994). Quelques auteurs ont cependant identifié des champignons symbiotiques des espèces telles que *Afzelia africana*, *A. bracteata*, *Uapaca guineensis*, *U. chevaleri*, *Anthonota crassifolia*, *Gilbertiodendron* sp et *Brachystegia eurycoma* (Redhead, 1968 ; Thoen et Bâ, 1989 ; Thoen et Ducouso, 1989, Mikola, 1970 cité par Bâ, 1990 ; Bâ, 1990). En effet, au Sénégal, 43 espèces fongiques ont été récoltées sous *A. africana* et *U. guineensis* (Bâ, 1990) ; Thoen et Ducouso (1989) ont récolté une trentaine d'espèces sous 6 essences (*A. africana*, *A. bracteata*, *U. guineensis*, *U. chevaleri* et *Anthonota crassifolia*) des forêts du Fouta-Djalón. Dans les forêts congolaises des Bolets et des Lactaires ont été signalés sous *Gilbertiodendron* sp (Mikola, 1970 cité par Bâ, 1990). Des *Inocybes* ont également été observés sous des jeunes plants d'*A. bella* au Nigeria (Redhead, 1968). Excepté ce dernier cas, la plupart des inventaires ont été effectués au sein de peuplements adultes. Pourtant, la diversité des champignons mycorhiziens associés à une espèce résulte de la succession de différents champignons au cours du temps (Last *et al.*, 1983 ; Masson *et al.*, 1983 ; Fleming *et al.*, 1985 ; Dighton et Masson, 1985 ; Bâ *et al.*, 1991 ; Bâ *et al.*, 1994). Les champignons qui s'installent en premier sont les pionniers souvent appelés précoces et ceux apparaissant plus tard dans les peuplements âgés sont appelés champignons tardifs. En Tanzanie, Munyaziza et Kuyper (1995) ont montré que certains champignons ne formaient de mycorhizes sur jeunes plants d'*A. quanzensis* que si ceux-ci étaient associés à des pieds adultes.

Lorsque les jeunes plants sont élevés en pépinière sur des sols issus des plantations, seuls les champignons précoces forment des mycorhizes (Fleming, 1983). Cette pratique présente ainsi le double avantage de permettre de piéger et d'identifier les champignons précoces importants pour le choix des souches destinées à la mycorhization contrôlée (Garbaye, 1986) et aussi de disposer de matériel pour caractériser les mycorhizes et isoler les champignons impliqués (Bâ, 1990). Néanmoins certains champignons comme *Laccaria* spp. et *Pisolithus* spp. présents ou introduits au niveau des pépinières sont capables de se maintenir après plantation (Dighton et Masson, 1985, Villeneuve *et al.*, 1991 ; Selosse *et al.*, 1998 ; Dell et Malajczuck, 1997). Ce pourrait être



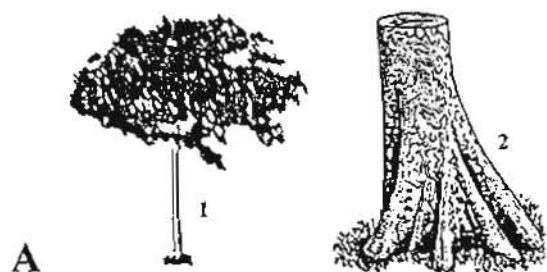
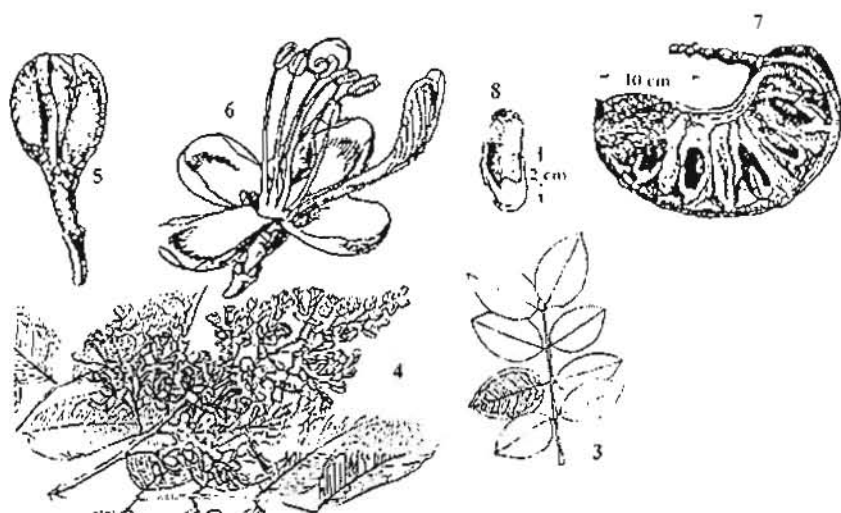


Figure 2.1a. Schéma de différents organes d'*Afzelia africana*. 1, houpier ; 2, tronc avec contrefort ; 3, feuille ; 4, inflorescence ; 5, bouton floral ; 6, fleur ; 7, gousse contenant des graines ; 8, graine. (Evy, 1995).



Figure 2.1b. Schéma de différents organes d'*Isoberlinia doka*. 1, feuille ; 2, stipules ; 3, inflorescence ; 4, fleur ; 5, fruits ; 6, fruit desséché enroulé ; 7, fruit (face dorsale) ; 8, insertion des pétioles ; 9, graines. (Aubréville, 1959).

le cas des Sclérodermes récoltés sous des pieds adultes et capables de former des mycorhizes sur *A. africana* en conditions semi-contrôlées et en pépinière. C'est pourquoi, nous nous sommes particulièrement intéressés aux Sclérodermes présents au Sud-Ouest du Burkina.

Afin d'explorer la diversité des champignons ectomycorhiziens présents dans les forêts du Sud-Ouest du Burkina Faso, nous nous sommes également intéressés au cortège fongique de 5 autres essences forestières ectomycorhiziennes : *Isobertia doka*, *I. dalziellii*, *Monotes kerstingii*, *Uapaca guineensis* et *U. somon*.

Ainsi, dans ce chapitre, notre approche a consisté à :

1. faire un inventaire des champignons ectomycorhiziens dans les savanes arborées et forêts claires du Sud-Ouest du Burkina Faso ; à l'issue de cet inventaire, il est apparu que différentes espèces morphologiques de Sclérodermes, *Scleroderma verrucosum*, *S. dictyosporum*, *Scleroderma* sp1, et *Scleroderma* sp2 étaient particulièrement abondantes.

2. isoler le mycélium végétatif des différentes espèces de Sclérodermes et tester leur infectivité sur *A. africana* en condition semi-axénique.

## 2.2. Matériels et méthodes

### 2.2.1. Matériel végétal : description botanique des espèces

Les caractéristiques botaniques des six espèces d'arbres ectomycorhiziens que nous avons étudiées sont les suivantes :

- *Azelia africana*

Famille : Leguminosae

Sous-Famille : Caesalpinioideae

Genre : *Azelia*

Espèce : *africana* Sm.

Nom commun : Linké

Arbre de 10 à 35 m à fût assez droit muni de contreforts hauts de 1 à 1,5 m. Le feuillage dense est d'un vert brillant. Les feuilles sont composées, pari-pennées et alternes avec 3 à 5 paires de folioles opposées. Les fleurs, en racèmes terminaux longs de 10 à 15 cm, sont très odoriférantes. Les fruits sont des gousses ligneuses et épaisses contenant une graine à arille rouge ou orange par loge (fig. 2.1a).

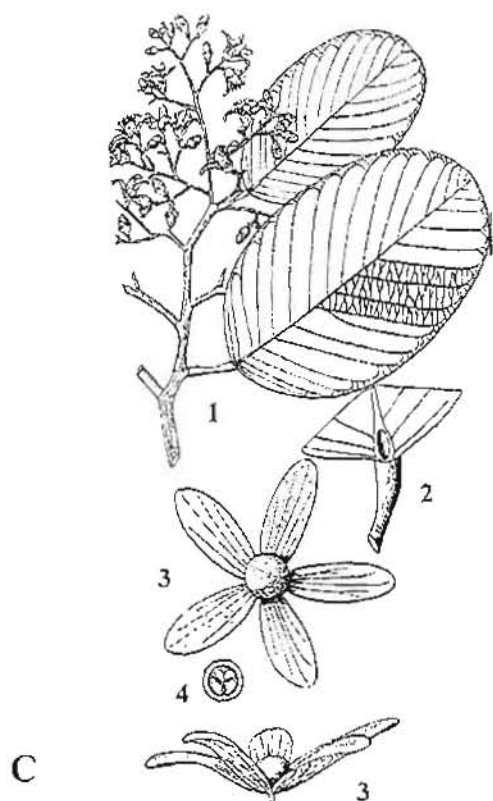


Figure 2.1c. Schéma de différents organes de *Monotes kerstingii*. 1, feuilles et inflorescence ; 2, base du limbe ; 3, fruit ; 4, coupe transversale de fruit. (Aubréville, 1959).

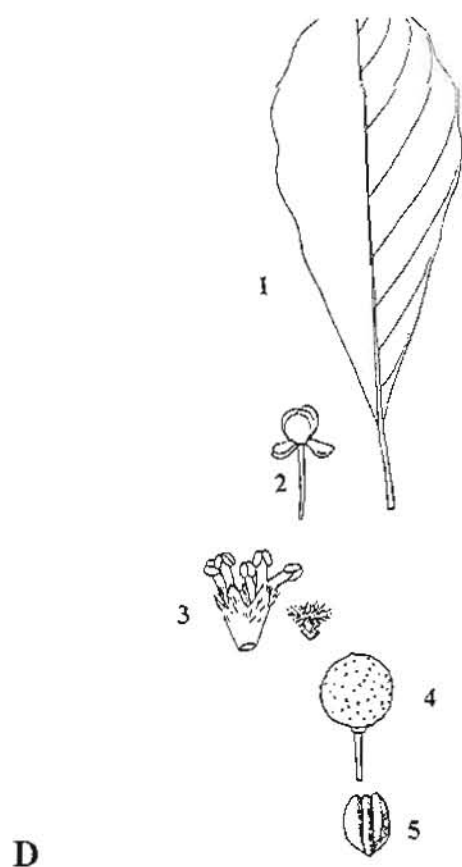


Figure 2.1d. Schéma de différents organes de *Uapaca guineensis*. 1, feuille ; 2, inflorescence mâle ; 3, fleur mâle et rudiment d'ovaire ; 4, fruit ; 5, graine. (Aubréville, 1959).

• *Isoberlinia doka*

Famille : Leguminosae

Sous Famille : Caesalpinioideae

Genre : *Isoberlinia*Espèce : *doka* Craib. & Stapf.

Arbre de 10 à 20 m de haut vivant en groupes. Les feuilles sont composées de 2 à 4 paires de folioles opposées coriaces et toujours présentes. Les fleurs sont blanches, subsessiles en grands panicules dressés de 10 à 15 cm. Les gousses, ligneuses sont plates, brunes, finement striées transversalement et glabres (18-20 cm de long et 5-6 cm de large). Les graines sont aplaties et de couleur brune à maturité lorsque la gousse éclate (fig. 2.1b).

• *Isoberlinia dalziellii*

Famille : Leguminosae

Sous-Famille : Caesalpinioideae

Genre : *Isoberlinia*Espèce : *dalziellii* Craib. & Stapf.

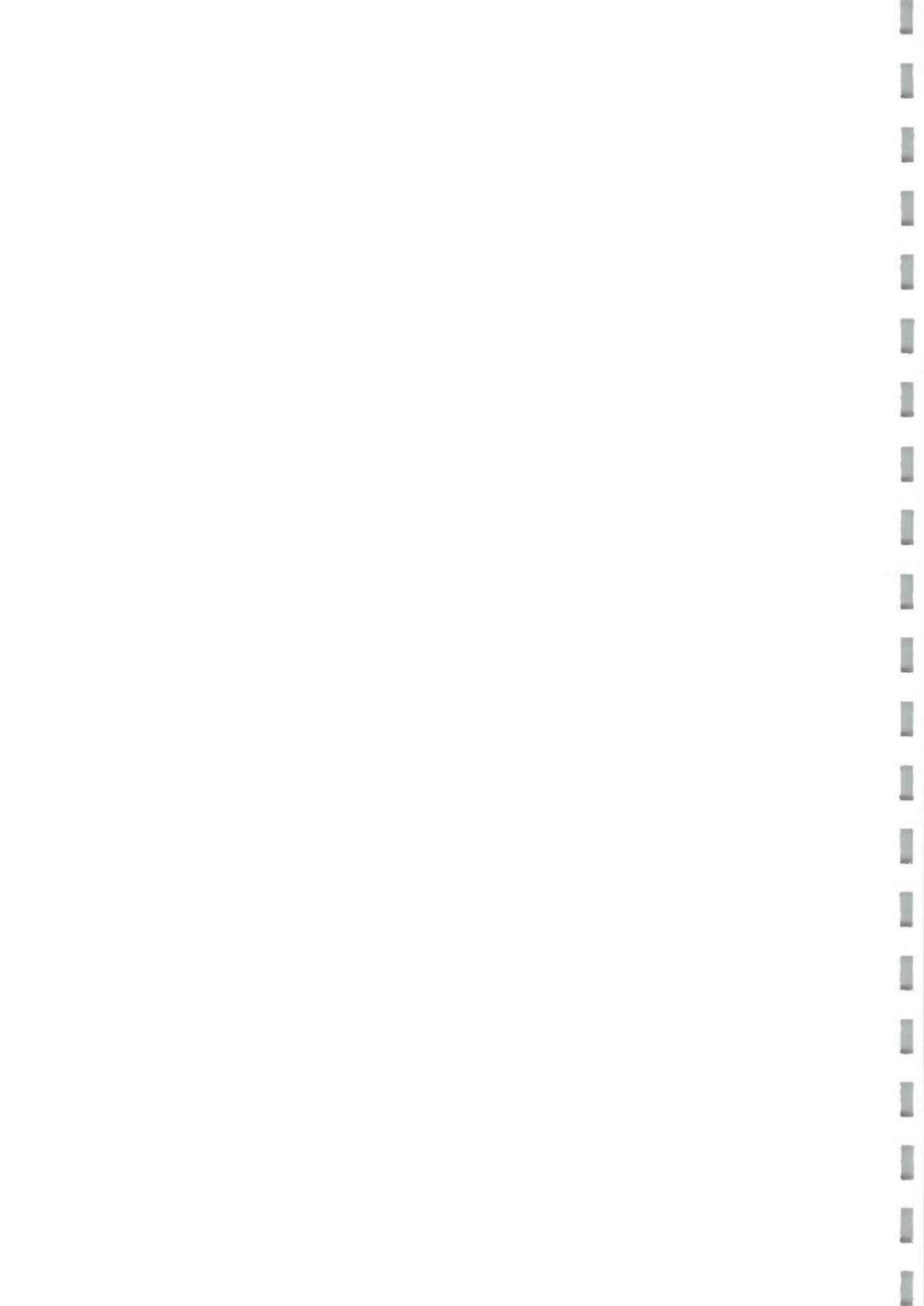
Espèce généralement confondue à *I. doka*, elle en diffère par la présence de grandes stipules caduques à la base du pétiole, des feuilles un peu plus larges et moins brillantes surtout la face inférieure qui est légèrement pubescente. Elle possède des gousses plus larges et également pubescentes.

• *Monotes kerstingii*

Famille : Dipterocarpaceae

Genre : *Monotes*Espèce : *kerstingii* Gilg.

Seule espèce de cette famille présente en Afrique de l'Ouest, elle présente des individus de petite taille (environ 10 m de haut). Les feuilles simples, sont elliptiques et duveteuses sur la face inférieure. Les fleurs blanches et jaunes sont en cymes. Les fruits sont subglobuleux très durs de 1,5 cm de diamètre. Ils sont entourés de 5 ailes rougeâtres dérivés du calice et constitués de 3 loges renfermant trois graines (fig. 2.1c).



- *Uapaca guineensis*

Famille : Euphorbiaceae

Genre : *Uapaca*

Espèce : *guineensis* Mull. & Arg.

C'est une espèce dioïque très répandue dans les zones forestières, elle se rencontre au Burkina Faso le long des cours d'eau. Elle porte des racines échasses qui sont une adaptation aux conditions d'inondation. Les feuilles obovées, allongées et étroitement cunéiformes en général sont groupées en touffes dressées terminales. Le limbe atteint 25 cm de long et 12 cm de large et les pétioles mesurent 3 à 8 cm de long. Les fleurs mâles sont petites (5-6,5 mm de diamètre) et les ovaires glanduleux. Les fruits sont petits et globuleux (2 cm de diamètre) et contiennent 3 à 4 graines elliptiques de 1,5 à 1,7 cm de long et 1 à 1,2 cm de large (fig. 2.1d).

- *Uapaca somon*

Famille : Euphorbiaceae

Genre : *Uapaca*

Espèce : *somon* Aubr. & Léan.

Espèce des savanes arborées et des plateaux très secs, elle se rencontre indifféremment le long des galeries forestières. Elle diffère de *U. guineensis* par sa taille plus petite et l'absence de racines échasses. Les feuilles sont également de petite taille et les fruits sont légèrement pubescents.

### 2.2.2. Description des sites expérimentaux

En 1992, une prospection réalisée en collaboration avec le Département de Botanique de l'IRBET avait permis d'identifier 13 sites où sont représentées les six espèces ectomycorhiziennes ci-dessus citées (paragraphe 2.2.1.). Ces sites sont situés au Sud-Ouest du Burkina Faso (entre les latitudes 9°45' et 12°15' et les longitudes 3°10' et 5°25') dans le domaine phytogéographique soudanien et plus précisément dans le district Ouest Volta-noire et celui de la Comoé (cf. fig. 1.3). Ils s'étendent sur 3 provinces administratives, les provinces du Houet, du Kéné Dougou et de la Comoé qui sont les mieux arrosées du pays. Ces provinces sont caractérisées de nos jours par une pluviométrie de 900 à 1000 mm/an du Nord au Sud et par une saison pluvieuse de 6 à 7 mois. Cette pluviométrie est assez mal répartie dans l'espace et dans le temps avec un

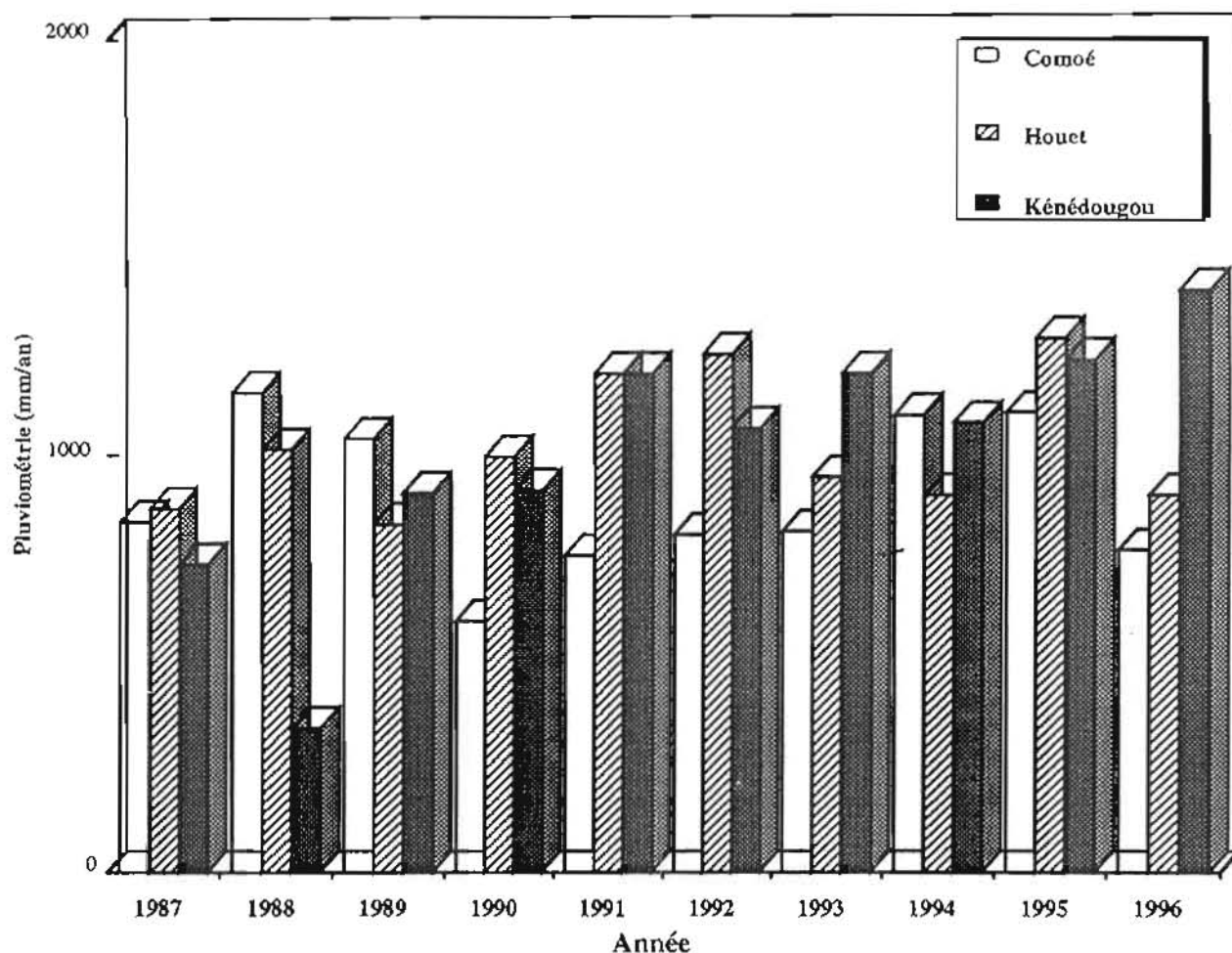


Figure 2.2. Pluviométrie moyenne annuelle sur 10 ans (1987-1996) des trois provinces couvrant les sites expérimentaux

Tableau 2.1. Quelques caractéristiques physico-chimiques des sols (0-20 cm) des différents sites

Sites	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Argile (%)	7,8	9,8	7,8	1,9	5,8	17,6	5,8	17,6	21,5	23,5	5,8	11,3
Limon (%)	17,6	11,7	27,4	11,7	11,7	17,6	11,7	35,2	25,4	23,3	11,7	13,7
Sable (%)	74,5	78,4	64,7	86,2	82,3	64,7	82,3	47,0	52,9	52,9	82,3	75
pH (H <sub>2</sub> O)	7,0	5,8	6,5	6,9	6,2	6,5	5,6	6,6	5,4	5,0	6,1	6,20
pH (KCl)	5,9	4,4	5,3	5,5	4,8	5,5	4,8	5,1	4,3	3,6	4,5	4,67
C total (%)	1,5	0,6	1,1	0,3	0,8	1,3	0,6	1,6	2,0	1,1	0,5	0,42
N total (%)	0,2	0,04	0,07	0,01	0,07	0,10	0,05	0,11	0,10	0,07	0,02	0,03
Matière organique totale (%)	2,7	1,1	1,9	0,6	1,4	2,3	1,1	2,7	3,4	1,9	0,9	0,73
C/N	7	16	16	28	12	14	14	14	20	16	22	13
P total (mg/g)	65	65	22	43	324	32	259	259	97	22	43	48,9
P assimilable (mg/g*)	5,5	2,2	4,9	2,7	1,2	2,4	3,0	5,2	2,6	4,7	12,1	0,88
V (%)**	64	49	103	32	54	51	35	72	109	11	17	66

\* Méthode Bray 1

\*\* Taux de saturation

maximum de pluies au mois d'août. La pluviométrie moyenne annuelle sur 10 ans (1987-1996) des trois provinces est représentée sur la fig. 2.2.

La végétation est composée de savanes boisées, forêts claires constituées d'arbres, d'arbustes et de graminées pérennes. Les galeries forestières le long des cours d'eau conservent les reliques de forêts guinéennes sempervirentes.

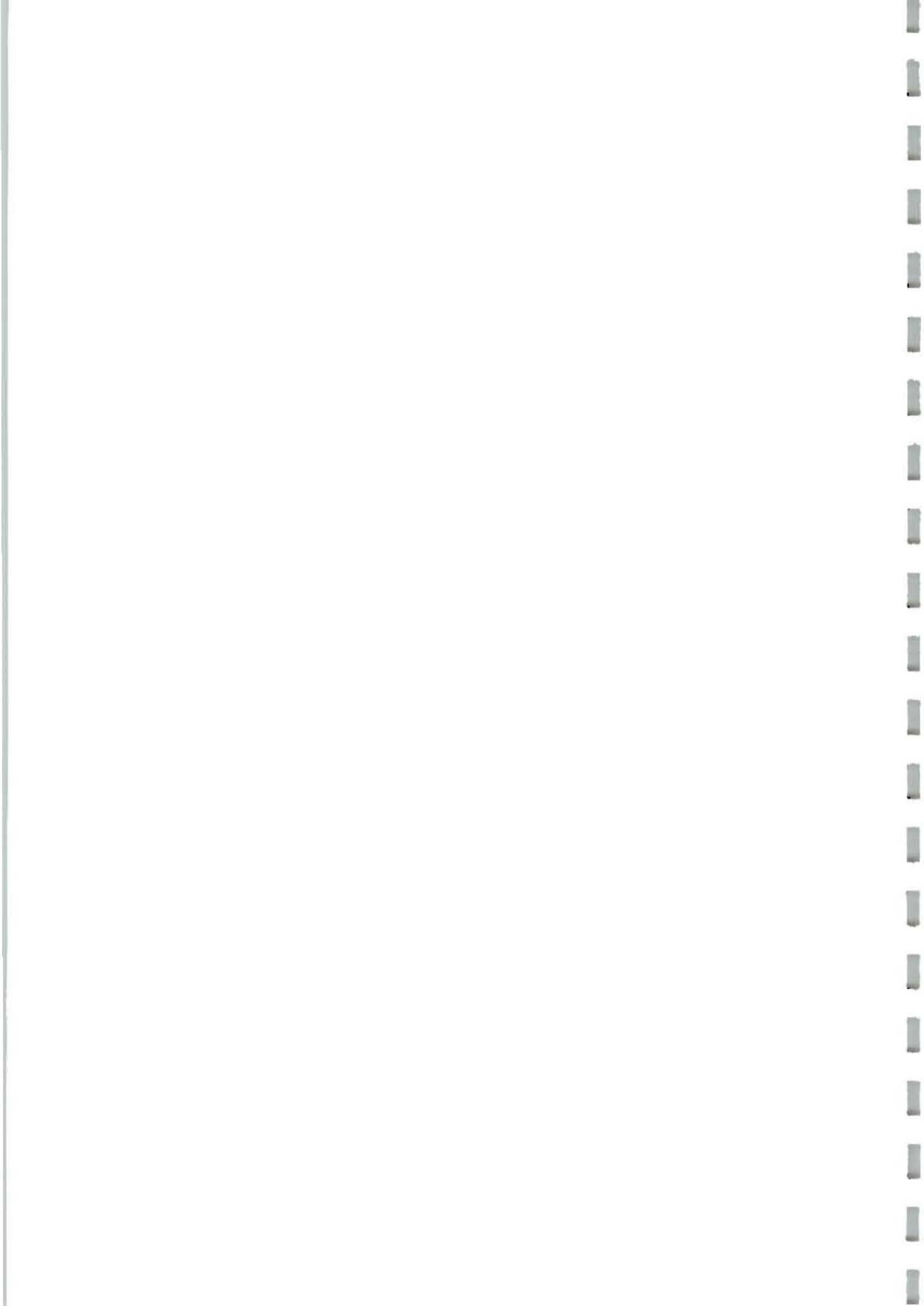
Les caractéristiques physico-chimiques des sols (0-20 cm de profondeur) de 12 des 13 sites expérimentaux sont présentées dans le tableau 2.1. Les sols sont essentiellement sableux à sablo-limoneux et pauvres en phosphore et en matière organique. Le pH est neutre à légèrement acide.

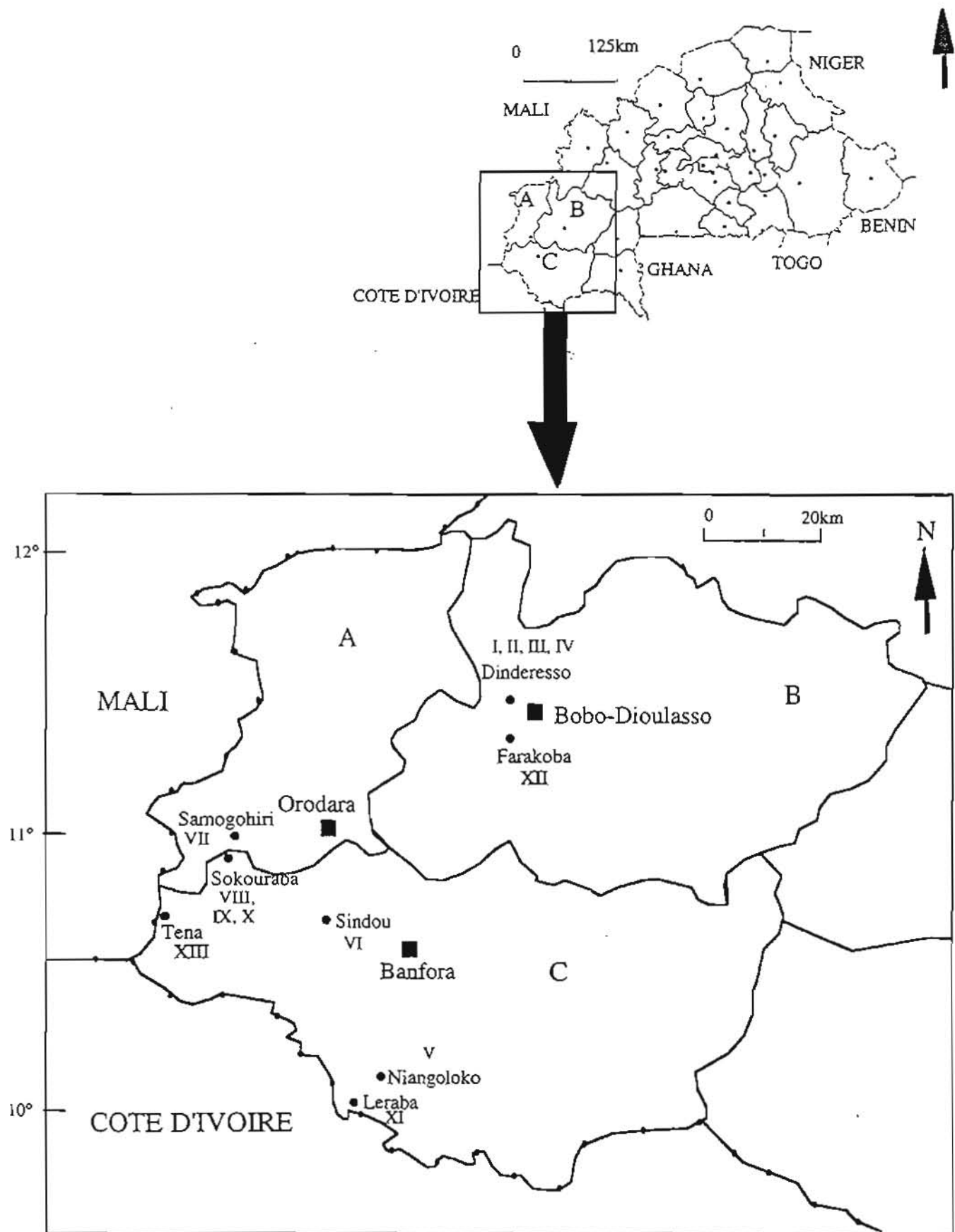
Les arbres dominants se répartissent dans les 13 sites comme suit : 4 sites dominés par *Isobertinia* spp (sites I, VIII, IX et XII), 3 sites dominés par *Uapaca guineensis* (sites III, VI et X), 2 sites dominés par *Afzelia africana* (site IV et VII), 2 sites dominés par *Monotes kerstingii* (sites II et V), un site dominé par *Uapaca somon* (site XI) et un site dominé par *Isobertinia dalziellii* et *Monotes kerstingii* (site XIII) (fig. 2.3 et tableau 2.2).

- Sites à *Afzelia africana* : Espèce la plus importante sur le plan économique des six arbres, elle fut abusivement exploitée et n'existe pratiquement plus en peuplement. Elle est rencontrée de façon sporadique en savane, en forêt claire et aussi le long des cours d'eau. Ainsi le site IV est situé à l'entrée de la forêt classée de Dindéresso (fig. 2.4). La végétation ligneuse a quasiment disparue laissant place à des graminées pérennes. On note la présence de quelques régénérations naturelles (semis et rejet de souches) qui ne résistent pas au passage des feux en saison sèche. Le site VII se situe le long d'une galerie forestière où *Afzelia* est associé à des espèces ripicoles.

- Sites à *Isobertinia* spp : Les 2 espèces d'*Isobertinia* sont essentiellement utilisées comme bois de feu et par conséquent font l'objet de coupes fréquentes. Ce sont des espèces à rejet de souches et à régénération naturelle importants. Les sites retenus sont soit une vieille jachère (site XII) avec des individus ne dépassant pas 5 à 7 m de haut ou des sols impropres aux cultures (sites I, VIII et IX) où les arbres peuvent atteindre 10 à 15m de haut. Les sites VIII et XII sont constitués d'*Isobertinia doka* associés à d'autres arbustes et surtout à des graminées (fig. 2.5). Au niveau des sites I et IX, les deux espèces sont associées.



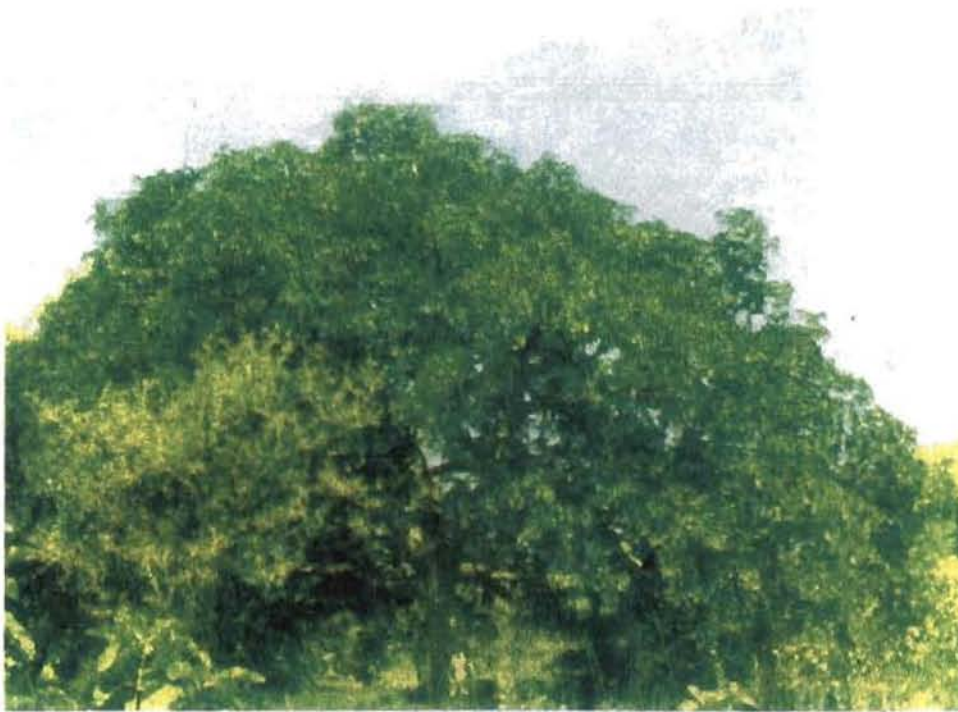




**Figure 2.3.** Localisation des sites. A = Province de Kéné Dougou ; B = Province du Houet ; C = Province de la Comoé. (■) Chef lieu de province (●) Village, (—) limite de province (—) Limite de pays ; I, VIII, IX, XII = *Isoberlinia doka* & *I. dalziellii* ; IV, VII = *Afzelia africana*; III, VI, X = *Uapaca guineensis* ; II, V = *Monotes kerstingii* ; XI = *Uapaca somon*. XIII = *Isoberlinia dalziellii* & *Monotes kerstingii*.

Tableau 2.2. Liste des différents sites prospectés avec les plantes dominantes

Sites	Plantes dominantes	Situation géographique (Provinces)
IV	<i>Azelia africana</i>	Houet
VII	<i>Azelia africana</i>	Kéné Dougou
I	<i>Isobertinia doka</i> & <i>Isobertinia dalziellii</i>	Houet
VIII	<i>Isobertinia doka</i>	Comoé
IX	<i>Isobertinia doka</i> & <i>Isobertinia dalziellii</i>	Comoé
XII	<i>Isobertinia doka</i>	Houet
III	<i>Uapaca guineensis</i>	Houet
VI	<i>Uapaca guineensis</i>	Comoé
X	<i>Uapaca guineensis</i>	Comoé
II	<i>Monotes kerstingii</i>	Houet
V	<i>Monotes kerstingii</i>	Comoé
XI	<i>Uapaca somon</i>	Comoé
XIII	<i>Isobertinia dalziellii</i> & <i>Monotes kerstingii</i>	Kéné Dougou



**Figure 2.4.** *Afzelia africana*, site IV



**Figure 2.5.** *Isoberlinia doka*, site VIII



**Figure 2.6.** *Monotes kerstingii*, site II



**Figure 2.7.** *Uapaca guineensis*, site III

• Sites à *Monotes kerstingii* : Cette espèce dont les feuilles sont utilisées en pharmacopée traditionnelle est également très exploitée dans la province du Houet où il ne restait en 1997 aucun des pieds observés sur le site (II) en 1992 (fig. 2.6). Situé sur une colline gravillonnaire, le site V est moins exploité et *M. kerstingii* y est associé à d'autres espèces mycorhiziennes et à des graminées. Contrairement aux Dipterocarpaceae de l'Asie du Sud-Est, *M. kerstingii* présente une croissance tortueuse due probablement à la pauvreté du sol et au passage annuel des feux de brousse généralement tardifs.

• Sites à *Uapaca guineensis* : Espèce relique des forêts guinéennes, *U. guineensis* est rencontrée en alignement le long des galeries forestières en parties inondées en août. La présence des racines échasses constitue vraisemblablement une adaptation à ces inondations cycliques (fig. 2.7).

• Site à *Uapaca somon* : Espèce des plateaux secs, *U. somon* a été rencontrée à l'extrême Sud-Ouest du pays. Le site est temporairement inondé après de fortes pluies. Sur ce site, *U. somon* est associée à *Afzelia africana* et *Isoberlinia* spp et d'autres espèces non ectomycorhiziennes.

• Site à *M. kerstingii* et *I. dalziellii* : Ce site situé sur un sol argileux est dominé par *M. kerstingii* et *I. dalziellii*. Les espèces graminéennes y sont peu représentées.

### 2.2.3. Inventaire des champignons réputés ectomycorhiziens

La fructification des champignons ectomycorhiziens varie en fonction des conditions environnementales (pluviométrie, température) et est, de ce fait, particulièrement erratique en zone tropicale. Aussi, certains champignons fructifient une ou plusieurs fois chaque année alors que d'autres espèces ne fructifient que tous les dix ans (Brundrett *et al*, 1996). Entre 1994 et 1996, nous avons donc effectué des prospections pour collecter et identifier des champignons ectomycorhiziens sur les sites sélectionnés. Ces prospections se sont déroulées lors de la saison des pluies au cours de la période privilégiée de fructification. Chaque site a été ainsi visité 2 à 3 fois (juin-juillet, août et septembre) par an durant les 3 ans de notre projet de recherche.

Les sites étant situés de 365 à 500 km de notre laboratoire, nous avons choisi comme base le Laboratoire du Programme Coton (INERA/CNRST), situé dans la ville de Bobo-Dioulasso (365 km de Ouagadougou), pour l'isolement des champignons récoltés quotidiennement.

Nous avons récolté tous les champignons réputés ectomycorhiziens et fructifiant au voisinage des espèces forestières à ectomycorhizes. Pour chaque espèce de champignons, les carpophores en développement ou matures sont soigneusement récoltés



**Figure 2.8.** Mini-rhizotron contenant deux plants d '*Azelia africana*  
Le mycélium développé sur papier bisulfite est mis en contact avec  
le système racinaire des plants (flèches).

photographiés et étiquetés (numéro d'herbier, lieu et date de récolte, plante-hôte). Les échantillons à conserver en herbier sont séchés à l'étuve à 50°C. La plupart des carpophores ont été décrits et identifiés par rapport à un herbier de référence (Thoen et Bâ, 1989).

Les carpophores de Sclérodermes ont souvent été observés sous la litière ou à proximité des termitières dans des endroits très humides. Les différentes espèces ont été identifiées au laboratoire après observation des spores au microscope photonique.

#### **2.2.4. Isolement des cultures mycéliennes et aptitude ectomycorhizogène des isolats de Sclérodermes en conditions semi-axéniques**

##### **2.2.4.1. Isolement des cultures mycéliennes**

Les isollements de mycélium végétatif ont été réalisés essentiellement sur les Sclérodermes. Ils sont effectués sur des carpophores fermes selon la méthode décrite par Bâ (1990). Les carpophores sont débarrassés des particules de sol avec un pinceau et du coton imbibé d'alcool 96% puis fractionnés en deux en conditions stériles. A l'aide d'un scalpel flambé, des fragments de carpophores sont prélevés dans la partie interne du péridium et déposés sur milieu gélosé MNM (Marx, 1969) en boîtes de Petri puis incubés à 30°C dans une étuve. Des repiquages successifs sur milieu contenant de la streptomycine (300 ppm) permettent d'éliminer les contaminants bactériens et d'obtenir des cultures pures de mycéliums ectomycorhiziens dicaryotiques. Ces cultures sont maintenues par repiquage sur un milieu frais une fois par mois.

##### **2.2.4.2. Aptitude ectomycorhizogène de quelques isolats de Sclérodermes**

Les différents isolats fongiques étant issus de plantes-hôtes différentes, nous avons effectué des tests d'infectivité vis-à-vis d'*Afzelia africana* et aussi étudié le spectre d'hôte de ces espèces vis-à-vis d'autres plantes (*Isobertia doka*, *I. dalziellii*, *A. quanzensis* et *Brachystegia speciformis*). Compte tenu de la taille des graines de ces espèces, en particulier celles d'*Afzelia* et d'*Isobertia*, ces tests ont été réalisés en conditions semi-axéniques dans des mini-rhizotrons (Bâ, 1990). Ce sont des parallélépipèdes plats transparents en polystyrène (20 x 8 x 2,5cm) et ouvrables sur une face (Riedacker, 1974) (fig. 2.8). En expérimentation, ils sont inclinés de 30°C à 45°C par rapport à la verticale du côté de la face ouvrable permettant ainsi l'étude des systèmes racinaires.

Les graines d'*A. africana* et *A. quanzensis* sont scarifiées et désinfectées à l'acide sulfurique 95% pendant 2 h puis rincées à l'eau distillée stérile. Les graines d'*Isobertia*



Tableau 2.3. Champignons ectomycorhiziens récoltés sous *Azelia africana*, *Isobertinia doka*, *Isobertinia dalziellii*, *Monotes kerstingii*, *Uapaca guineensis* et *Uapaca somon*

Ordres Espèces	Plantes- Hôtes*						Isolement du mycélium	N° herbier
	<i>I. do.</i>	<i>I. da.</i>	<i>A. a.</i>	<i>M. k.</i>	<i>U. g.</i>	<i>U. s.</i>		
<b>Aphylliphorales</b>								
+ <i>Coltricia cinnamomea</i> (Pers.) Murr.	-	-	-	-	-	+	-	41
<b>Agaricales</b>								
+ <i>Amanita hemibapha</i> (Brek. & Br.) Sacc.	+	+	+	-	-	+	-	25,43
+ <i>Amanita</i> sp1 (brun)	+	+	+	+	-	-	-	67, 42
<i>Amanita</i> sp2 (rose)	-	-	+	+	-	-	-	26,50
<i>Inocybe</i> sp1	+	+	+	-	-	-	-	10, 39
<i>Inocybe</i> sp2	+	+	-	-	-	+	-	11, 12, 38
<b>Boletales</b>								
<i>Boletellus</i> sp1 (brun)	+	+	+	-	+	+	-	13, 19, 46, 90
<i>Boletellus</i> sp2 (jaune)	+	+	+	-	-	+	-	48, 60
<i>Boletellus</i> sp3 (jaune-vert)	+	+	-	-	-	-	-	52
<i>Boletellus</i> sp4 (bleu)	-	-	+	-	-	-	-	53
<i>Boletellus</i> sp5 (orange)	-	-	-	-	+	-	-	65
<i>Strobilomyces</i> sp	-	-	-	+	-	-	-	40
<i>Tubosaeta bruneosetosa</i> (Siz.) Horak.	+	+	-	-	+	-	+	17a, 17b
+ <i>Xeroconus subspinulosus</i> Heinem.	+	+	+	-	-	-	-	66
<b>Cantharellales</b>								
+ <i>Cantharellus pseudofriesii</i> Heinem.	+	+	+	+	+	+	-	28, 33, 37, 77, 80, 81
<b>Gautierales</b>								
<i>Austrogautiera</i> sp (hypogé)	+	+	-	-	+	-	-	29
<b>Hymenogastrales</b>								
<i>Sclerogaster</i> sp (hypogé)	+	+	+	+	+	-	-	34, 61, 72, 104
<b>Russulales</b>								
+ <i>Lactarius gymnocarpus</i> Heinem.	+	+	+	+	+	+	-	23, 24, 27, 36, 45, 47
+ <i>Lactarius</i> sp1 (brun-orangé)	-	-	-	-	+	-	-	64
<i>Lactarius</i> sp2 (jaune)	+	-	-	-	-	-	-	68
<i>Russula annulata</i> Heinem	-	-	-	-	+	-	-	46
+ <i>Russula</i> sp1 (rouge)	+	+	+	+	+	+	-	14, 49, 54, 58, 69, 70
+ <i>Russula</i> sp2 (brun)	-	-	-	-	-	+	-	62
<b>Sclerodermatales</b>								
+ <i>Scleroderma dictyosporum</i> Pat.	+	+	+	+	+	+	+	103, 109, 215, 300, 304, 205
+ <i>Scleroderma verrucosum</i> Pers.	+	+	+	+	+	+	+	105, 200, 256, 305, 401, 500, 600, 503
<i>Scleroderma</i> sp1	-	-	-	-	+	-	+	406, 407, 409, 410, 420
<i>Scleroderma</i> sp2	+	+	+	+	+	-	+	100, 208, 254, 510
<i>Scleroderma</i> sp3	+	+	-	-	-	-	+	252
<i>Scleroderma</i> sp4	-	-	-	-	-	+	+	520
<i>Scleroderma</i> sp5	+	+	-	-	-	-	-	605
Nombre total d'espèces (30)	19	18	15	10	14	12	7	

Les noms de champignons précédés du signe (+) sont illustrés sur les planches I et II

(\*) *I. do.* = *Isobertinia doka*, *I. da.* = *Isobertinia dalziellii*, *A. a.* = *Azelia africana*, *M. k.* = *Monotes kerstingii*, *U. g.* = *Uapaca guineensis*, *U. s.* = *Uapaca somon*. (+) = présence ; (-) = absence

*doka*, *I. dalziellii* et *Brachystegia speciformis* sont désinfectées dans l'hypochlorite de sodium (1%) pendant 10 min, rincées et trempées dans l'eau 24 h. Les graines sont ensuite mises à germer dans des bacs contenant de la vermiculite stérile arrosée d'eau distillée stérile et maintenus dans une chambre de culture (température, 35°C jour/27°C nuit ; photopériode, 16h jour/8h nuit ; humidité 60-70% ; intensité lumineuse 60W/m<sup>2</sup>). Les graines prégermées sont repiquées dans des mini-rhizotrons remplis d'un mélange de tourbe/vermiculite stérile (1 : 4, v/v) et arrosées avec de l'eau distillée. Les plants sont élevés en chambre de culture comme précédemment. Parallèlement, la préparation de l'inoculum et l'inoculation sont faites selon la méthode "paper sandwich" décrite par Chilvers *et al* (1986). Les champignons sont repiqués sur papier carton absorbant (papier bisulfite de la société Cellulose de Strasbourg) placé sur milieu MNM gélosé en boîte de Petri pendant 15 jours à 30°C. Au bout de 2 semaines, les papiers recouverts de mycélium sont appliqués sur le système racinaire ayant colonisé la face ouvrable du minirhizotron des plants âgés de 10 à 15 jours. Les observations sont effectuées sous la loupe binoculaire après 7 à 10 jours de contact entre le mycélium et les racines d'*A. africana*. La couleur et l'aspect du manteau sont notés pour chaque type de mycorhizes. Les mycorhizes sont soigneusement prélevées et fixées dans du glutaraldéhyde 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium (0,1M, pH 7,2).

Des coupes à main levée ont été effectuées dans la moelle de sureau. Les coupes sont éclaircies à l'hypochlorite de sodium 12%, rincées à l'eau acidifiée et colorées au rouge Congo glycérolé (0,5%). Elles sont ensuite montées dans du glycérol 50% entre lame et lamelle et observées au microscope photonique. Le statut mycorhizien du champignon vis-à-vis de la plante-hôte est confirmé par la présence du manteau et du réseau de Hartig.

## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Champignons ectomycorhiziens récoltés au Sud-ouest du Burkina Faso

Trente espèces de champignons ectomycorhiziens ont été récoltés sous les plantes-hôtes étudiées (*A. africana*, *I. doka*, *I. dalziellii*, *M. kerstingii*, *U. guineensis* et *U. somon*) (tableau 2.3). Ces espèces fongiques se répartissent en 8 ordres (Aphylophorales, Agaricales, Boletales, Cantharellales, Hyménogastrales, Russulales, Gautiérales et Sclérodermatales) et 13 genres. Parmi les 30 espèces, 6 (*Cantharellus pseudofriesii*, *Lactarius gymnocarpus*, *Scleroderma dictyosporum*, *S. verrucosum*, *Scleroderma* sp 2 et

Tableau 2.4. Liste des différents isolats de *Scleroderma* en culture

Espèces fongiques	Isolats	Plantes hôtes	Sites d'isolement	Collecteur/année de récolte
<i>Scleroderma dictyosporum</i>	IR 109	<i>A. africana</i>	Site IV	Bâ & Sanon (1994)
	IR 215	<i>I. doka &amp; I. dalziellii</i>	Site I	Bâ & Sanon (1994)
	IR 250	<i>I. doka &amp; I. dalziellii</i>	Site VIII	Sanon (1996)
	IR 412	<i>U. guineensis</i>	Site XII	Sanon (1996)
	IR 602	<i>I. dalziellii &amp; M. kerstingii</i>	Site XIII	Sanon (1996)
<i>Scleroderma verrucosum</i>	IR 500	<i>U. somon</i>	Site XI	Bâ & Sanon (1994)
	IR 600	<i>I. dalziellii &amp; M. kerstingii</i>	Site XIII	Sanon (1996)
	IR 256	<i>I. doka &amp; dalziellii</i>	Site IX	Sanon (1996)
<i>Scleroderma</i> sp1	IR 406	<i>U. guineensis</i>	Site III	Bâ & Sanon (1994)
	IR 409	<i>U. guineensis</i>	Site III	Bâ & Sanon (1995)
	IR 410	<i>U. guineensis</i>	Site III	Sanon (1996)
	IR 414	<i>U. guineensis</i>	Site XI	Sanon (1996)
<i>Scleroderma</i> sp2	IR 100	<i>A. africana</i>	Site IV	Bâ & Sanon (1994)
	IR 408	<i>U. guineensis</i>	Site III	Bâ & Sanon (1995)
	IR 510	<i>U. somon</i>	Site XI	Sanon (1996)
<i>Scleroderma</i> sp3	IR 252	<i>I. doka &amp; I. dalziellii</i>	Site XI	Sanon (1996)
<i>Scleroderma</i> sp5	IR 605	<i>I. doka &amp; dalziellii</i>	Site I	Bâ (1993)

*Russula* sp1) sont communes aux 6 plantes-hôtes. Cependant, certains champignons semblent plus spécifiques à un genre ou une famille de plantes. Ainsi, *Amanita hemibapha*, *Inocybe* sp1, *Boletellus* sp3, *Xerocomus subspinulosus*, *Lactarius* sp2, *Scleroderma* sp3 et *Scleroderma* sp5 n'ont été récoltées que sous les Caesalpinioideae. Les carpophores de *Coltricia cinnamomea*, *Boletellus* sp5, *Lactarius* sp1, *Russula annulata*, *Russula* sp2, *Austrogautiera* sp *Scleroderma* sp1 et *Scleroderma* sp4 sont plus spécifiques aux espèces du genre *Uapaca*. Nous avons également rencontré deux espèces de champignons hypogés (*Austrogautiera* sp. et *Sclerogaster* sp.) qui pourraient correspondre aux espèces collectées au Sénégal.

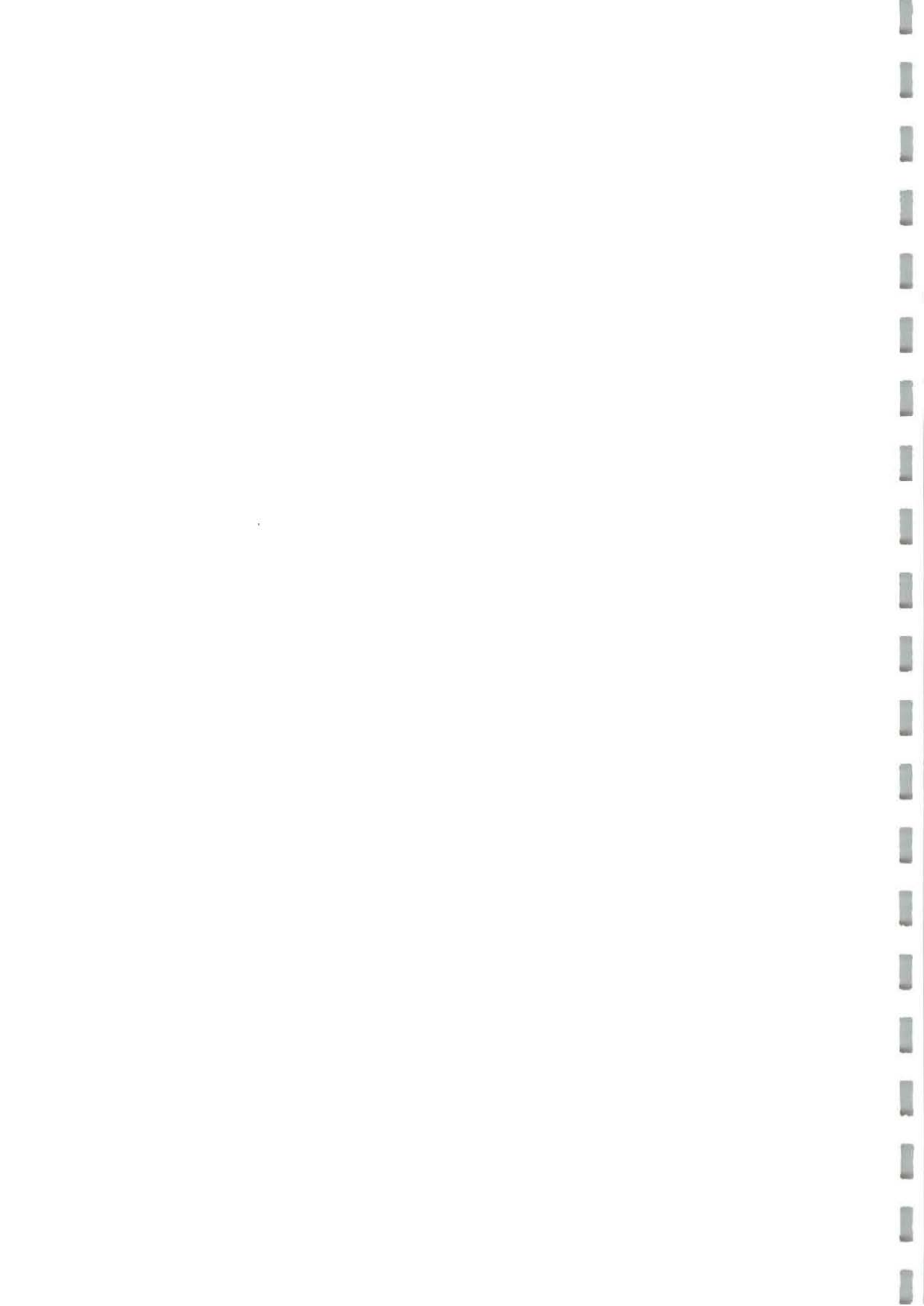
Les espèces fréquemment rencontrées au cours des trois années de notre inventaire sont : *Scleroderma* spp, *Cantharellus pseudofriesii*, *Lactarius gymnocarpus*, *Austrogautiera* sp, *Russula* sp1, *Sclerogaster* sp., *Inocybe* sp1 et *Boletellus* sp1. Au cours de certaines prospections effectuées en début de saison pluvieuse, nous avons essentiellement rencontré des Sclérodermes ; ils sont peu abondants vers la fin de la saison pluvieuse.

Hormis *Cantharellus pseudofriesii*, *Inocybe* spp et *Boletellus* spp, nous avons tenté d'isoler le mycélium végétatif de tous les champignons récoltés. Seuls les Sclérodermes et *Tubosaeta brunneosetosa* ont pu être isolés avec succès et maintenus en culture. Parmi les 7 espèces morphologiques de *Scleroderma* identifiées, l'isolement de mycélium de *Scleroderma* sp4 a échoué. Les carpophores de cette espèce récoltés en fin de saison pluvieuse étaient secs et déhiscents. Nous avons donc constitué une collection de 17 isolats avec les 6 autres espèces de *Scleroderma* (tableau 2.4).

### 2.3.2. Description morphologique des différents Sclérodermes isolés

Les carpophores des Sclérodermes sont sphériques à sub-sphériques et contractés à la base pour former une structure en forme de tige (pl. III). La face externe du péridium peut-être aréolée, lisse, verruqueuse ou en forme d'écaille. Ils sont souvent rencontrés en groupe dans des endroits assez humides, sous la litière ou sur des termitières.

— *Scleroderma dictyosporum* : péridium de couleur brun à la base à marron-noire sur la face concave lisse (pl.III, fig. 1). Carpophores de diamètre variant de 1 à 4 cm contenant une masse sporale de couleur marron à noire. Les spores sont très fortement réticulées avec un diamètre de 7 à 9  $\mu\text{m}$  sans les réticules (pl.III, fig. 2).



## PLANCHE I

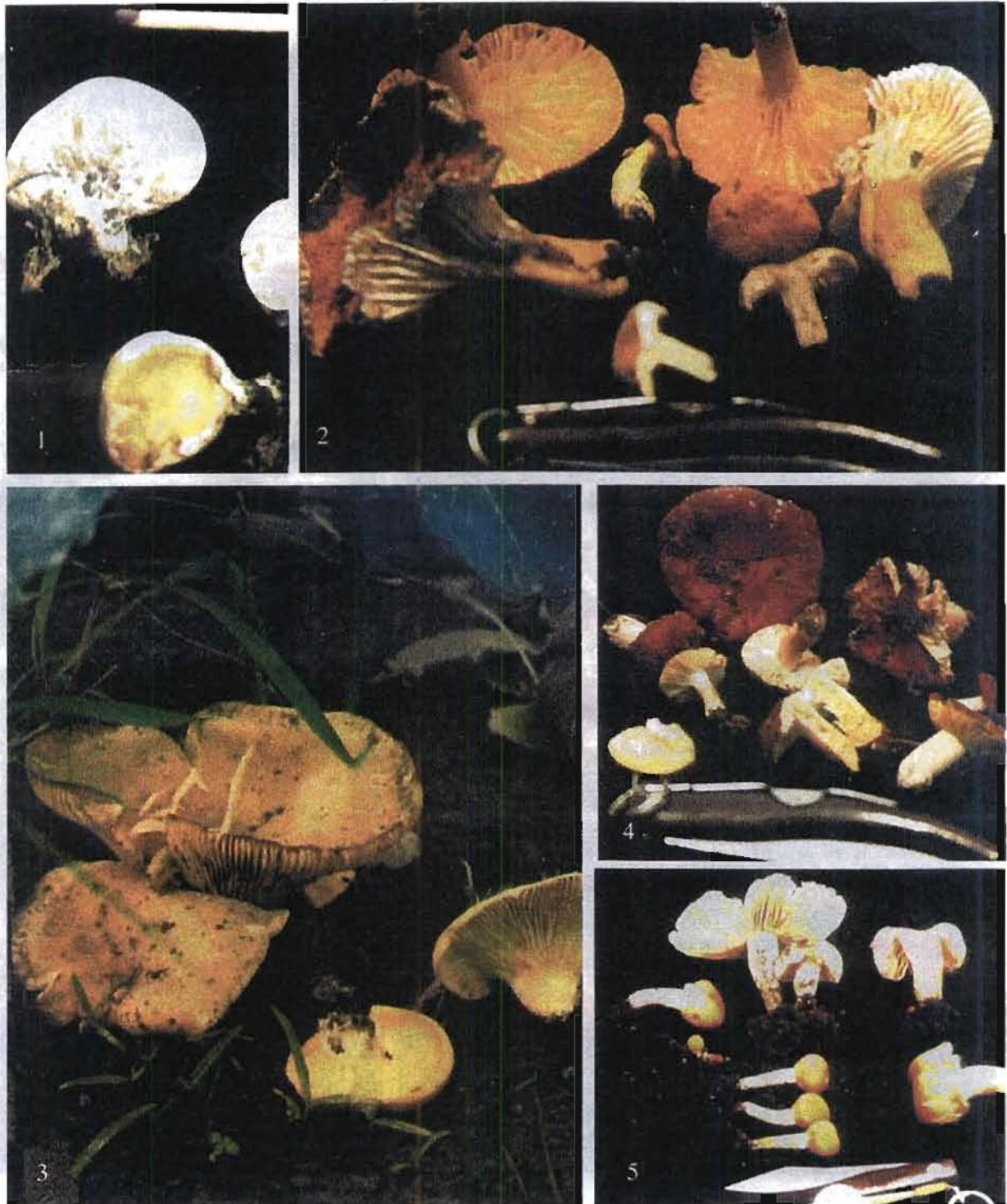
Photographies de quelques champignons ectomycorhiziens récoltés dans les forêts claires et savanes arborées du Sud-Ouest du Burkina Faso



- Figure 1. *Coltricia cinnamomea* (site XI)  
Figure 2. *Amanita hemibapha* (site I)  
Figure 3. *Amanita* sp1 (site VII)  
Figure 4. *Cantharellus pseudofriesii* (site XI)  
Figure 5. *Xerocomus subspinulosus* (site I)

## PLANCHE II

Photographies de quelques champignons ectomycorhiziens récoltés dans les forêts claires et savanes arborées du Sud-Ouest du Burkina Faso



**Figure 1.** *Sclerogaster* sp (site V)

**Figure 2.** *Lactarius gymnocarpus* (site IX)

**Figure 3.** *Lactarius* sp2 (site VIII)

**Figure 4.** *Russula* sp1 (site IV)

**Figure 5.** *Russula* sp2 (site XI)

— *Scleroderma verrucosum* : carpophores (2 à 5 cm de diamètre parfois plus) bruns, sessiles ou présentant une pseudo-tige (pl.III, fig. 3). Le péridium est couvert de petites tâches brunes foncées en forme d'écaille. Les spores brun-noires sont verruqueuses, 5 à 9  $\mu\text{m}$  de diamètre avec des épines de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de long (pl.III, fig. 4).

Si l'on considère que l'ornementation des spores constitue un critère taxonomique clé, on peut distinguer dans notre collection 5 espèces morphologiques supplémentaires de *Scleroderma*.

— *Scleroderma* sp1 : carpophores brun-rosâtre de 2 à 4 cm de diamètre. Péridium portant de nombreuses écailles marron. La masse sporale est de couleur brun-jaune à sec. Les spores présentent de longues épines de 2 à 3  $\mu\text{m}$  et ont un diamètre moyen de  $11 \pm 2$   $\mu\text{m}$  (pl.III, fig. 5).

— *Scleroderma* sp2 : deux morphotypes de cette espèce ont été rencontrés, ils sont caractérisés par des spores lisses sans ornementation. Le premier (IR100 et IR408) est de couleur brun-jaune et a été identifié sous pratiquement toutes les plantes-hôtes. Pour le second morphotype (IR510), les carpophores correspondent aux descriptions de *S. verrucosum*. Le diamètre moyen des spores est de  $6 \pm 1$   $\mu\text{m}$  (pl.III, fig. 6).

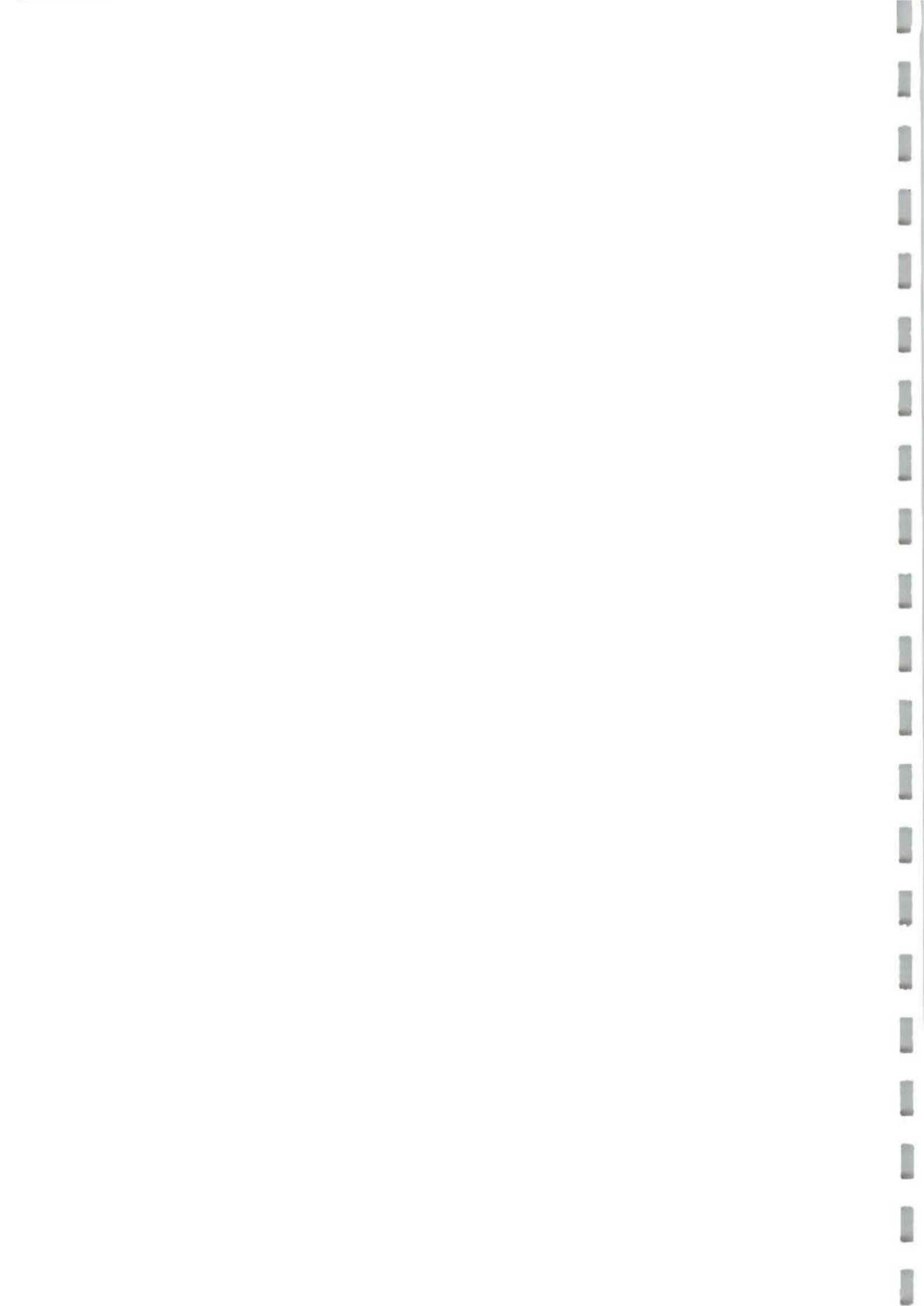
— *Scleroderma* sp3 : carpophores assez proche de ceux de *Scleroderma verrucosum* mais de taille plus grande (plus de 5 cm), cette espèce est caractérisée par des spores ponctués de 5 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre (pl.IV, fig. 1).

— *Scleroderma* sp4 : deux carpophores (environ 3 à 4 cm de diamètre) secs et déhiscent de cette espèce ont été récoltés sous *U. somon*. L'état sénescence des fructifications n'a pas permis l'isolement du mycélium végétatif. Les spores brunes sont de très petites tailles,  $3,5 \pm 1$   $\mu\text{m}$  (pl.IV, fig. 2).

— *Scleroderma* sp5 : cette espèce récoltée sous *I. doka* et *I. dalziellii* en 1993 n'a pas été décrite. L'aspect du mycélium en culture est spécifique et différent des autres (pl.IV, fig. 3).

L'analyse moléculaire de ces espèces morphologiques putatives (chapitre IV) permettra de confirmer l'existence de certains de ces taxons.





## PLANCHE III

Carpophores et spores de 4 espèces morphologiques de Sclérodermes

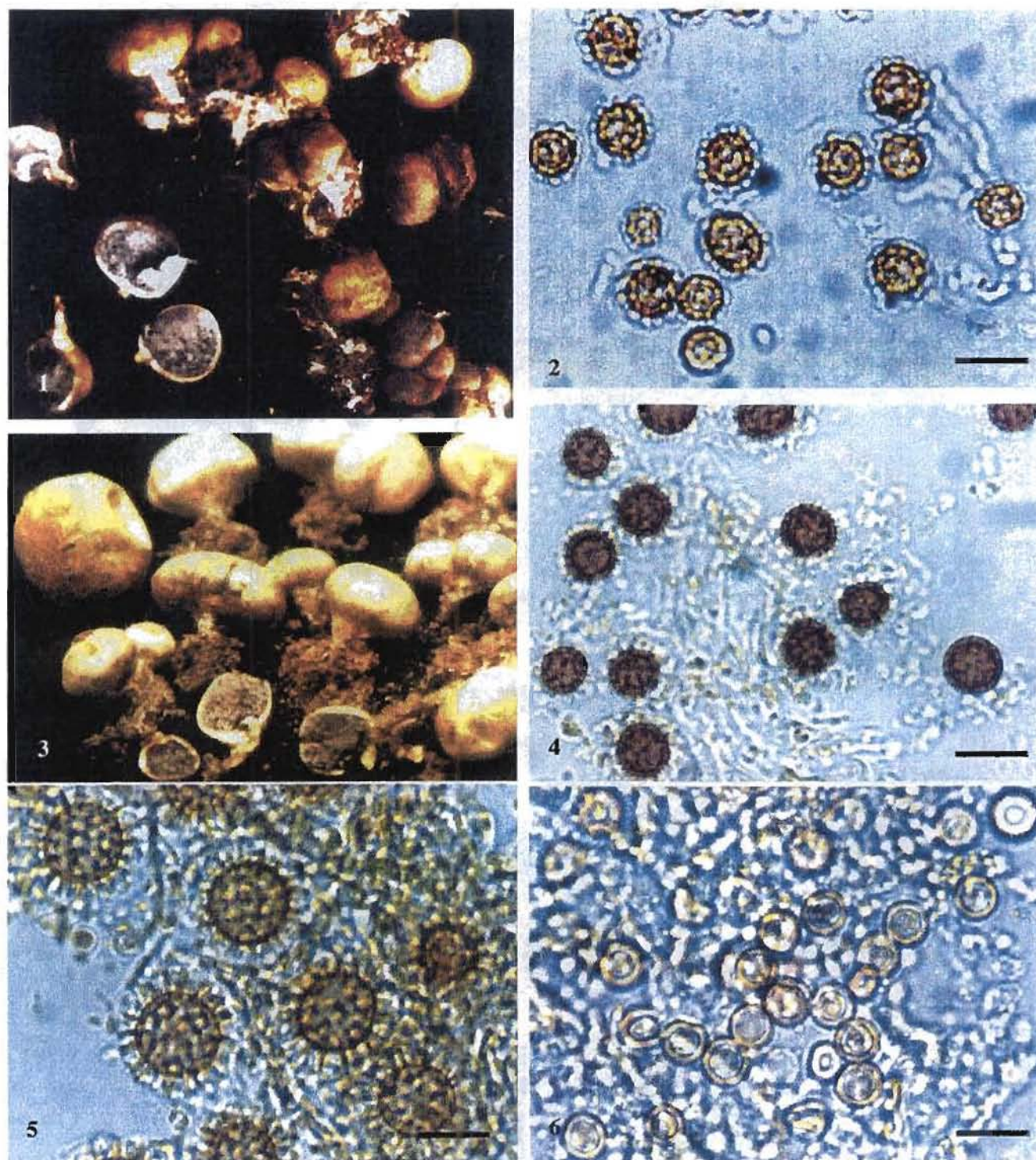


Figure 1. Carpophores de *S. dictyosporum* (site IV)

Figure 2. Spores de *S. dictyosporum*

Figure 3. Carpophores de *S. verrucosum* (site I)

Figure 4. Spores de *S. verrucosum*

Figure 5. Spores de *Scleroderma* sp1

Figure 6. Spores de *Scleroderma* sp2

Barre d'échelle, 10 µm

# PLANCHE IV

Spores et mycélium en culture de différentes espèces de Sclérodermes

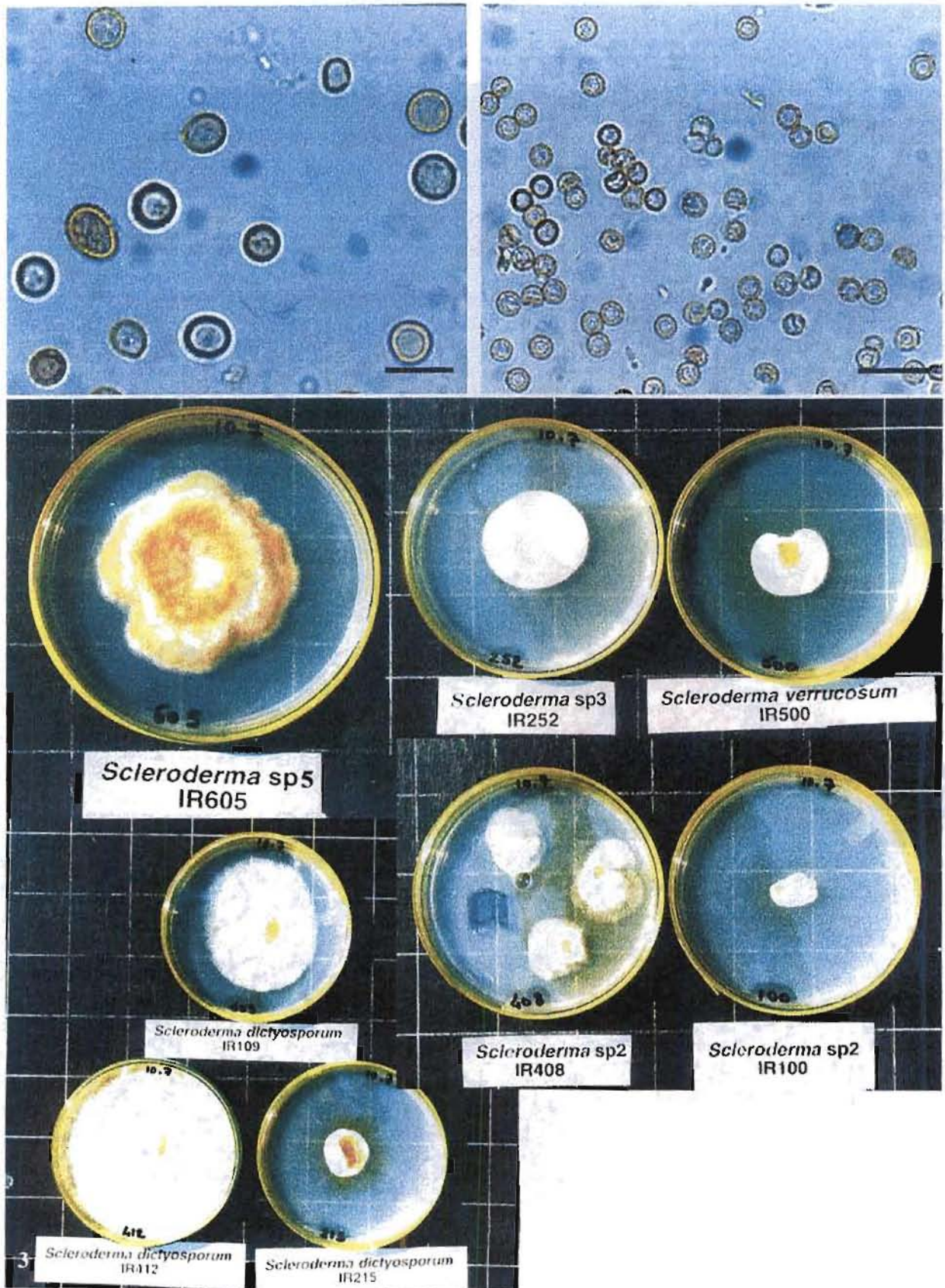


Figure 1. Spores de *Scleroderma* sp3

Figure 2. Spores de *Scleroderma* sp4

Figure 3. Mycélium en culture de *Scleroderma* sp5 et d'autres isolats

Barre d'échelle, 10 µm

### 2.3.3. Aptitude ectomycorhizogène des isolats fongiques

Nous avons testé l'aptitude ectomycorhizogène d'au moins un isolat par espèce ainsi qu'une souche de *Scleroderma dictyosporum* (ORS7731) isolée au Sénégal (tableau 2.5). Tous les Sclérodermes testés ont colonisé le système racinaire d'*A. africana*, *I. doka*, *I. dalziellii* et deux Caesalpinioideae de l'Afrique de l'Est (*A. quanzensis* et *Brachystegia speciformis*). Les mycorhizes formées par les différents Sclérodermes sont toutes de couleur blanche avec un manteau blanc cotonneux. L'examen des coupes des racines colonisées effectuées à main levée, a montré la présence d'un manteau et d'un réseau de Hartig permettant ainsi de confirmer le statut ectomycorhizien de ces isolats. L'espèce *Scleroderma* sp1 qui paraissait spécifique à *U. guineensis* mycorhize bien toutes les espèces. L'isolat ORS7731 du Sénégal est également infectif sur toutes les espèces. Ces résultats suggèrent que les espèces du genre *Scleroderma* sont peu spécifiques et colonisent un spectre d'hôte large, du moins en ce qui concerne les essences tropicales testées. Par contre l'isolat IR605 de *Scleroderma* sp5 collecté sous *Isoberlinia* spp, sa plante-hôte apparente, n'infecte ni *Isoberlinia* spp, les plantes d'isolement ni les autres espèces d'arbres étudiées.

## 2.4. Discussion et Conclusion

Le nombre d'espèces fongiques ectomycorhiziennes rencontrées dans trois régions du Burkina Faso sous six plantes-hôtes (30 espèces) (tableau 2.3) est plus faible par rapport aux espèces identifiées au Sud du Sénégal (44 espèces) et au Fouta-Djalon (37 espèces) (Thoen et Bâ, 1989 ; Thoen et Ducouso, 1989). Au Sénégal et en Guinée, les genres les plus représentés en nombre d'espèces sont les genres *Amanita* et *Russula* alors qu'au Burkina Faso (tableau 2.6), ce sont les *Scleroderma* et *Boletellus*. Cette différence entre les 3 régions pourrait être liée aux plantes-hôtes (Fouta-Djalon) et aux caractéristiques écologiques de ces sites (Sud du Sénégal et Fouta-Djalon). En effet, les sites prospectés au Burkina Faso sont situés pour l'essentiel en forêts claires et savanes arborées où les températures et la pluviométrie influent certainement sur la diversité spécifique et la fructification. Certaines espèces ectomycorhiziennes que nous avons inventoriées ont également été signalées dans d'autres régions de l'Afrique telles que le Kenya (Ivory *et al.*, 1994), la Tanzanie, et l'Afrique du Sud et pourraient avoir une large répartition géographique (tableau 2.7).

**Tableau 2.5.** Infectivité de certains isolats fongiques vis-à-vis d'*Afzelia africana* (A.a.), *Afzelia quanzensis* (A. q.), *Isoblerlinia doka* (I. do.), *Isoblerlinia dalziellii* (I. da.) et *Brachystegia speciformis* (B.s.)

Isolats/espèces	Plantes hôtes	Origine	Plantes testées				
			A.a.	A.q.	I.do.	I.da.	B.s.
IR109 <i>S. dictyosporum</i>	<i>A. africana</i>	Burkina Faso (site IV)	+	+	+	+	+
IR406 <i>Scleroderma</i> sp1	<i>U. guineensis</i>	Burkina Faso (site III)	+	+	+	+	+
IR408 <i>Scleroderma</i> sp2	<i>U. guineensis</i>	Burkina Faso (site III)	+	+	+	+	+
IR500 <i>S. verrucosum</i>	<i>U. somon</i>	Burkina Faso (site XI)	+	+	+	+	+
IR605 <i>Scleroderma</i> sp5	<i>Isoblerlinia</i> spp.	Burkina Faso (site I)	-	-	-	-	-
ORS 7731 <i>S. dictyosporum</i>	<i>A. africana</i>	Sénégal	+	+	+	+	+

(+) = présence du manteau et du réseau de Hartig, (-) = absence du manteau et du réseau de Hartig

Les espèces du genre *Scleroderma* sont associées à toutes les plantes-hôtes indigènes étudiées et aussi à des plantes exotiques introduites (cas de *S. verrucosum* associé à *Eucalyptus camaldulensis* et *Cinnamomum zeylanicum* au Fouta-Djalon). Ceci suggère que ces champignons indigènes comme ceux de la zone tempérée (Harley et Smith, 1983) soient peu spécifiques et confirme les résultats obtenus par Thoen et Bâ (1989). D'ailleurs au Burkina Faso, deux espèces morphologiques, *Scleroderma* sp1 et *Scleroderma* sp4 n'ont été rencontrées que sous *Uapaca* spp et *Scleroderma* sp1 ne montre pas de spécificité vis-à-vis des autres espèces d'arbres indigènes. Par contre, les espèces *Russula annulata*, *Austrogautiera* sp et *Coltricia cinnamomea* n'ont été identifiés que sous *Uapaca* spp en Afrique de l'Ouest suggérant que cette espèce est spécifique à ce genre du moins dans cette partie du continent.

L'étude du statut ectomycorhizien a permis de confirmer le large spectre d'hôte des Sclérodermes. Quelque soit l'hôte sous lequel le carpophore a été récolté, ces Sclérodermes infectent toutes les plantes testées, *A. africana*, *A. quanzensis*, *I. doka*, *I. dalziellii* et *Brachystegia speciformis*. La large répartition géographique des Sclérodermes sous les tropiques (Guzman (1970) cité par Sims *et al* (1997)), en particulier *S. verrucosum*, pourrait expliquer leur large spectre d'hôte.

Nos résultats suggèrent que les espèces de *Scleroderma* récoltées sous des arbres adultes et capables d'infecter les jeunes plants d'*A. africana* sont des champignons dont la capacité mycorhizogène est peu dépendante de l'âge de l'hôte. Il s'agit donc de candidats potentiels pour la mise en place de la mycorhization contrôlée.

L'isolat IR605 de *Scleroderma* sp5, isolé à partir de carpophores associés à *Isobertinia* spp., n'infecte aucune plante-hôte. Cet isolat pourrait donc être considéré comme un champignon mycorhizien tardif pour *Isobertinia* spp.

La diversité de champignons ectomycorhiziens dans le Sud-Ouest du Burkina Faso est relativement faible par rapport à d'autres régions d'Afrique telle que le Sud du Sénégal et le Fouta-Djalon en Guinée. Cette différence inter-régionale est vraisemblablement liée aux caractéristiques écologiques, phytosociologiques et physiogéographiques des régions étudiées. Toutefois, l'inventaire que nous avons réalisé ne couvre que trois années de récolte et il n'est pas exclu que certaines espèces à fructification sporadique n'aient pas été observées sur une période si courte.

L'abondance des espèces du genre *Scleroderma* sur le terrain, leur spécificité mycorhizienne réduite et la facilité relative de maintien en culture pure du mycélium de ces espèces font d'elles des candidats potentiels pour la mycorhization contrôlée.

Tableau 2.6 : Nombre d'espèces fongiques par genre en fonction de quelques zones géographiques

Genres	Nombre d'espèces		
	Fouta-Djalou	Sud du Sénégal	Sud-Ouest du Burkina Faso
<i>Boletellus</i>	1	1	5
<i>Gyrodon</i>	-	2	-
<i>Gyroporus</i>	-	1	-
<i>Rammeloo</i>	-	1	-
<i>Porphyrellus</i>	1	1	-
<i>Pulveroboletus</i>	1	1	-
<i>Strobilomyces</i>	2	1	1
<i>Tubosaeta</i>	1	1	1
<i>Xerocomus</i>	3	3	1
<i>Leccinum</i>	2	-	-
<i>Mucilopilus</i>	1	-	-
<i>Tylopilus</i>	2	-	-
<i>Amanita</i>	7	7	3
<i>Inocybe</i>	2	2	2
<i>Elasmomyces</i>	-	1	-
<i>Lactarius</i>	3	4	3
<i>Russula</i>	4	11	3
<i>Cantharellus</i>	2	2	1
<i>Coltricia</i>	-	1	1
<i>Austrogautiera</i>	-	1	1
<i>Sclerogaster</i>	1	1	1
<i>Scleroderma</i>	3	2	7

Références : Thoen et Bâ (1989), Thoen et Ducouso (1989), Sanon et al (1997).

Tableau 2.7. Distribution en Afrique de quelques champignons ectomycorhiziens récoltés au Burkina Faso.

Espèces	Pays
<i>Lactarius gymnocarpus</i>	Guinée, Sénégal, Cameroun, Côte d'Ivoire, Zaïre, Tanzanie
<i>Russula annulata</i>	Guinée, Sénégal, Zaïre, Tanzanie, Madagascar
<i>Tubosaeta brunneosetosa</i>	Guinée, Sénégal, Liberia, Kenya
<i>Scleroderma dictyosporum</i>	Guinée, Sénégal, Ghana, Zaïre, Kenya
<i>Scleroderma verrucosum</i>	Guinée, Sénégal, Centrafrique, Cameroun, Sierra Leone, Zimbabwe, Kenya, Afrique Sud

Références : Bottomley (1947), Dring et Rayner (1967), Demoulin et Dring (1975), Pegler (1977), Levin (1985) cités par Thoen et Ducouso (1989), Thoen et Bâ (1989) ; Ivory et al (1996) ; Sanon et al (1997).

### *Chapitre III.*

#### *Etude anatomique et morphologique des mycorhizes de synthèse et de piégeage*

*d' A. africana*





1974  
1975  
1976  
1977  
1978  
1979  
1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990  
1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012  
2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023  
2024  
2025  
2026  
2027  
2028  
2029  
2030

1974  
1975  
1976  
1977  
1978  
1979  
1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990  
1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012  
2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020  
2021  
2022  
2023  
2024  
2025  
2026  
2027  
2028  
2029  
2030

### 3.1. Introduction

L'abondance d'une espèce fongique ectomycorhizienne est mal évaluée par le dénombrement des fructifications. En effet, la fructification des champignons ectomycorhiziens est sporadique surtout en zone tropicale peu humide à pluviométrie annuelle très irrégulière. De plus, certains champignons ectomycorhiziens précoces sont absents des peuplements adultes ou encore d'autres ne produisent pas de fructifications connues (cas de *Cenococcum* en zone tempérée et de la souche ORSXM002 isolée au Sénégal à partir de mycorhizes). La présence de carpophores sous une plante-hôte suppose pourtant que ceux-ci sont associés à l'hôte par le biais du réseau mycélien souterrain. Cependant, il est difficile de tirer une conclusion sur la présence ou l'absence d'une espèce lorsque le carpophore est inexistant. En d'autres termes, les communautés de champignons ectomycorhiziens sont mal représentées par la distribution quantitative des fructifications (Gardes et Bruns, 1996). L'inventaire des champignons ectomycorhiziens d'un écosystème donné doit alors être complété par une identification des champignons impliqués *au niveau des mycorhizes*, prélevées sur le terrain ou piégées en pépinière (champignons précoces). Cependant, dans le cadre de notre projet de mycorhization contrôlée de jeunes plants, ce sont essentiellement les champignons précoces qui nous intéressaient. Nous avons ainsi choisi d'utiliser la méthode de piégeage qui consiste à élever pendant quelques mois en pépinière des jeunes plants d'*A. africana* sur le sol provenant des sites étudiés afin de piéger les différents champignons précoces qui pourraient s'y trouver sous forme de propagules infectieuses (spores, sclérotés, fragments racinaires).

Afin d'identifier les multiples morphotypes ectomycorhiziens présents sur les différents sites étudiés, une analyse morphologique comparative a été réalisée. En nous basant sur des critères morphologiques et anatomiques définis par Zak (1973) (forme des mycorhizes, couleur, texture et structure du manteau, présence ou absence de rhizomorphes et sclérotés), nous avons décrit les mycorhizes obtenues en pépinière sur *A. africana* et nous les avons comparés aux mycorhizes de synthèse obtenues sur *A. africana* avec des isolats de Sclérodermes définis.

**Tableau 3.1.** Liste des morphotypes mycorhiziens obtenus par piégeage

Morphotypes mycorhiziens	Origine (plante-hôte/site) des sols utilisés pour piégeage
<b>Mycorhizes blanches</b>	
BL11	<i>U. somon</i> (site XI)
BL12	<i>I. doka</i> (site XII)
BL9	<i>I. doka</i> & <i>I. dalziellii</i> (site IX)
BL10	<i>U. guineensis</i> (site X)
BL7	<i>A. africana</i> (site VII)
<b>Mycorhizes beiges</b>	
BE12	<i>I. doka</i> (site XII)
<b>Mycorhizes brunes</b>	
BR10	<i>U. guineensis</i> (site X)
BR2	<i>M. kerstingii</i> (site II)
BR11	<i>U. somon</i> (site XI)
BR8	<i>I. doka</i> (site VIII)
BR3	<i>U. guineensis</i> (site III)

## 3.2 . Matériels et méthodes

### 3.2.1. Piégeage des champignons ectomycorhiziens à l'aide de plantules cultivées sur du sol issus des différents sites expérimentaux

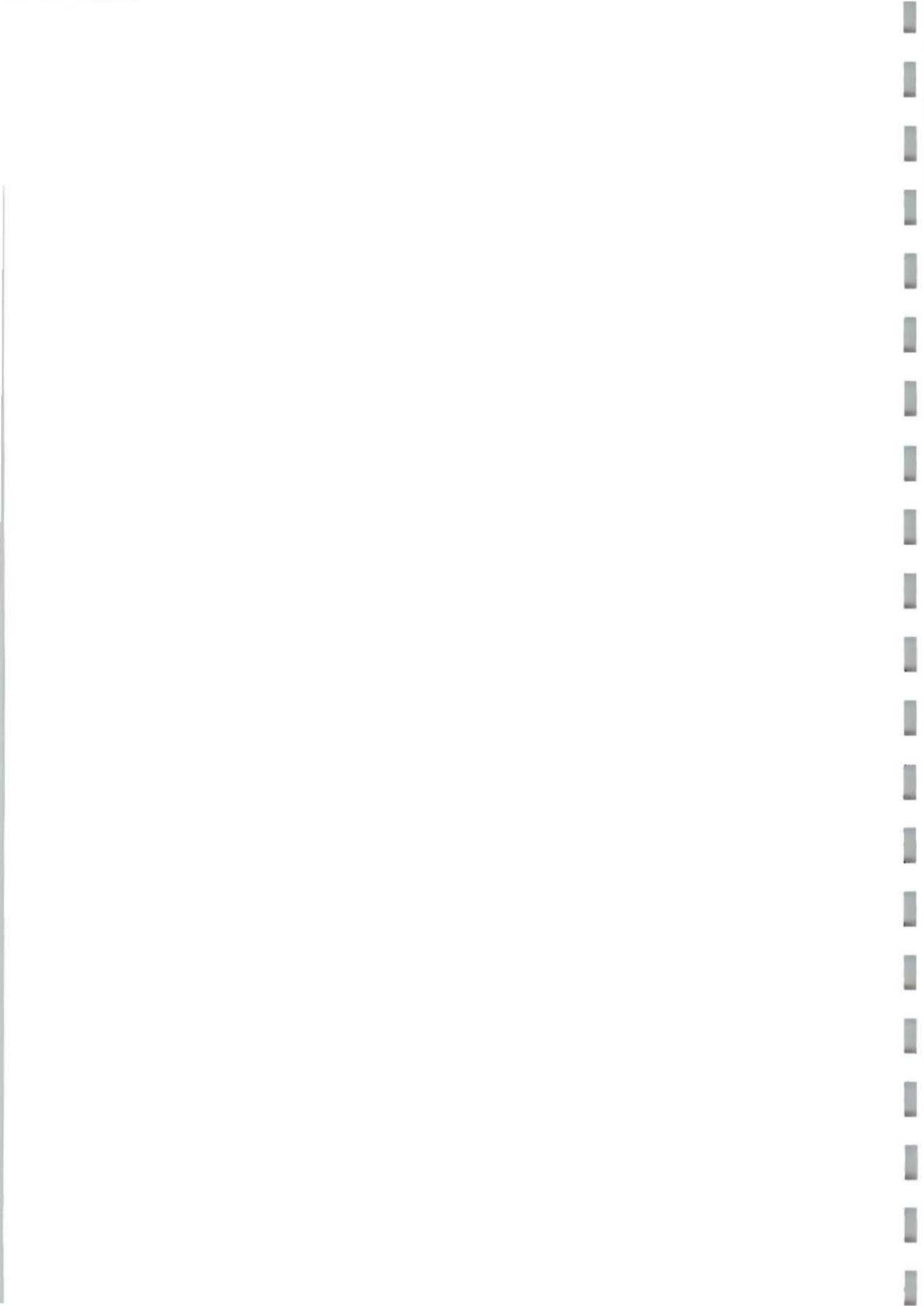
Au cours de nos différentes missions de prospection, des échantillons de sol (0-20 cm) ont été prélevés afin de cultiver les jeunes plants d'*A. africana*. Les expériences de piégeage ont été réalisées sur le sol de 8 sites (tableau 3.1). Pour chaque type de sol, trois gaines en plastique de 2 litres sont remplies et maintenues dans la pépinière du DPF/CNRST dans les conditions climatiques de Ouagadougou (Burkina Faso) pendant 4 mois. Les graines d'*A. africana* sont scarifiées comme décrit au paragraphe 2.2.4.2 et repiquées à raison de deux graines par gaine. L'arrosage est effectué au besoin avec l'eau de robinet. Un traitement témoin négatif a été réalisé sur du sable afin de tenir compte des contaminants éventuels de la pépinière et ainsi de s'assurer de l'origine des mycorhizes formées sur chaque sol. Au bout des 4 mois de culture, les plantules sont prélevées, le système racinaire est soigneusement lavé et les racines fines sont trempées dans de l'eau. Pour chaque sol, la proportion des différents types de mycorhizes est estimée sous la loupe en attribuant des coefficients de 1 à 4 (1 : 0-25 %; 2 : 25-50 %; 3 : 50-75 % et 4 : 75-100 %), puis ces dernières sont décrites morphologiquement (couleur et forme de la mycorhize, couleur et aspect du manteau, présence de cordons mycélien, présence de sclérotés) (Zak, 1973). Les différents morphotypes sont regroupés en fonction de l'origine du sol, puis repartis en 2 lots destinés à :

- la fixation et l'inclusion en résine pour les études anatomiques et ultrastructurales en microscopies photonique et électronique, et

- l'identification moléculaire des champignons impliqués à l'aide de la PCR/RFLP (cf. chapitre IV)

### 3.2.2. Obtention des mycorhizes de synthèse

Les mycorhizes de synthèse ont été obtenues comme indiqué au chapitre II (paragraphe 2. 4. 2) avec quatre isolats appartenant à trois espèces morphologiques, *Scleroderma dictyosporum* (IR109 et IR250), *Scleroderma* sp1 (IR406) et *Scleroderma* sp2 (IR408). Nous montrerons (chapitre IV) que *Scleroderma* sp1 (IR406) est taxonomiquement affilié à *S. verrucosum* et *Scleroderma* sp2 (IR408) à *S. dictyosporum*.



### **3.2.3. Description anatomo-morphologique et cytologique des mycorhizes de piégeage et de synthèse**

Les mycorhizes de synthèse et de piégeage sont bien nettoyées et rincées à l'eau distillée, puis traitées suivant le protocole décrit par Le Disquet (1997) afin de permettre leur observation en microscopies photonique et électronique.

#### **3.2.3.1. Fixation et postfixation**

Les mycorhizes sont placées dans une goutte de fixateur (glutaraldéhyde 2,5% tamponné à pH 7,2 par du cacodylate de sodium 0,05M) et sont découpées en petits fragments (1 mm). Les échantillons sont ensuite transférés dans des tubes contenant du fixateur neuf, dégazés sous vide et fixés pendant toute une nuit à 4°C. Ils sont ensuite rincés pendant au moins 1 heure dans du tampon cacodylate 0,05M et postfixés pendant 1h dans le tétroxyde d'osmium à 2% dans du tampon cacodylate 0,05M.

#### **3.2.3.2. Déshydratation et inclusion**

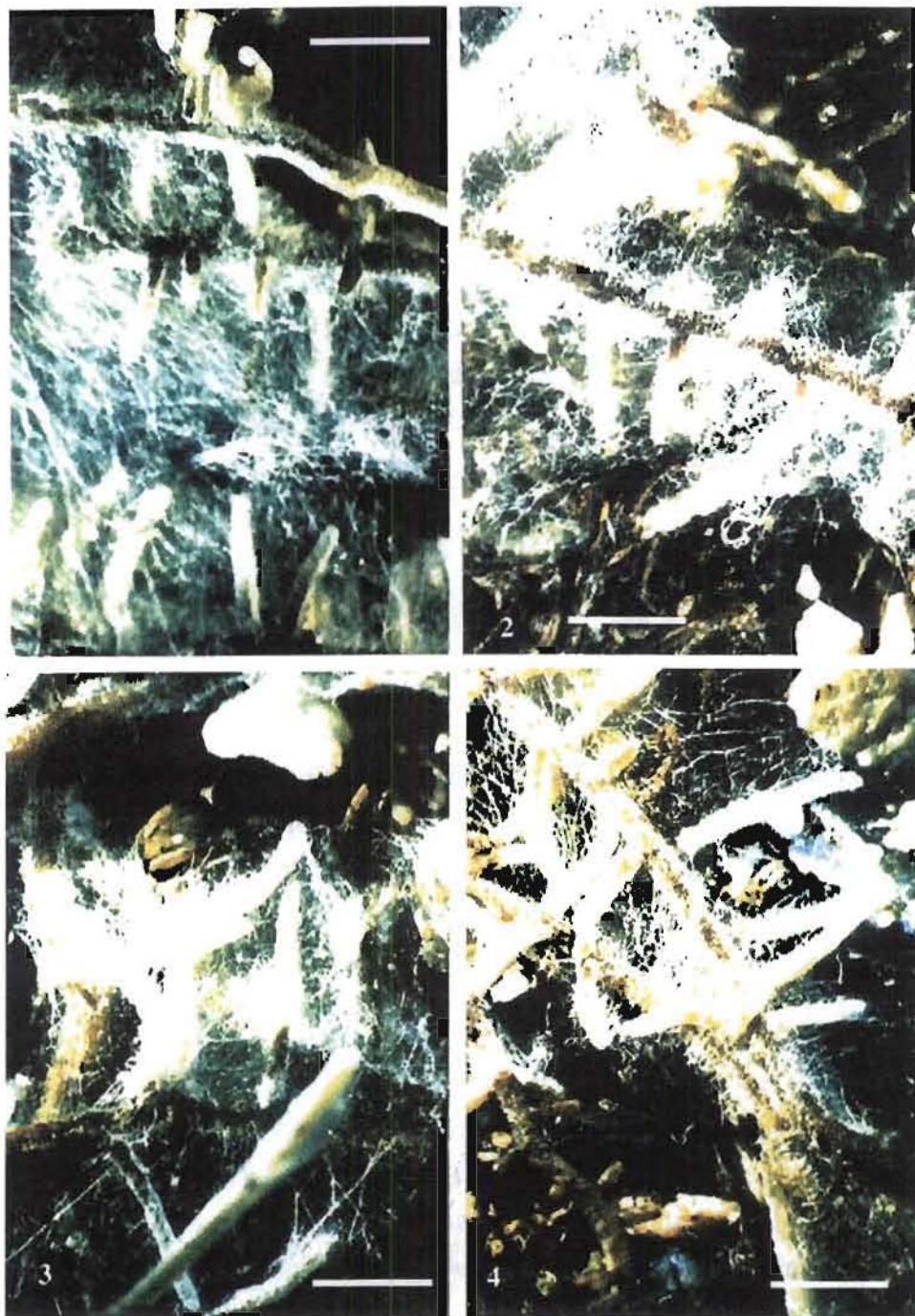
A l'issue de la postfixation, les échantillons sont rincés abondamment à l'eau distillée par passages successifs dans plusieurs bains, puis déshydratés par transferts consécutifs de 15 à 30 min dans des concentrations croissantes d'acétone (10%, 20%, 40%, 60%, 80%), puis à 90% et 2 x 100% pendant 24 h chacun. Les échantillons déshydratés sont imprégnés dans une série de mélanges acétone-résine. L'acétone est progressivement remplacé par la résine Epon 812S (TAAB). Le temps d'imprégnation est fonction du type de matériel et est de 24 h pour les mycorhizes pour chaque bain. Un passage sous vide est également effectué pour chaque bain d'imprégnation. L'inclusion est réalisée dans la résine pure dans des moules et polymérisée à 70°C pendant 48 h.

#### **3.2.3.3. Réalisation des coupes**

Les blocs obtenus après polymérisation de la résine sont taillés en pyramide sous la loupe à l'aide d'une lame de rasoir afin d'isoler l'objet à couper. Les coupes sont réalisées à l'aide d'un couteau de diamant (Diatome) sur un ultramicrotome (RMC modèle MT-7). Pour les observations au microscope photonique, nous avons effectué des coupes semi-minces de 0,45 à 0,55  $\mu\text{m}$ . Ces coupes sont récupérées sur une lame de verre et collées par un léger chauffage. Elles sont ensuite colorées au bleu de toluidine à 1% dans 2,5% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 11,6). Pour l'observation ultrastructurale, des coupes fines (80 à 120 nm) sont récupérées sur des grilles de 3,05 mm de diamètre en cuivre rhodié (HR24

## PLANCHE V

Mycorhizes de synthèse d'*A. africana*



**Figure 1.** Mycorhize *A. africana* / *S. dictyosporum* IR109

**Figure 2.** Mycorhize *A. africana* / *S. dictyosporum* IR250

**Figure 3.** Mycorhize *A. africana* / *Scleroderma* sp1 IR406

**Figure 4.** Mycorhize *A. africana* / *Scleroderma* sp2 IR408

Barre d'échelle, 4 mm

Cu/Rh) ou cuivre simple (G3 00 HEX). Elles sont contrastées pendant 15 min à l'acétate d'uranyle selon Valentines (1961), puis 15 min au citrate de plomb selon Reynolds (1963), suivi d'un rinçage abondant à l'eau distillée après chaque traitement. Ce double marquage est effectué sous atmosphère confinée dans une boîte de Pétri contenant du KOH déposé dans un verre de montre pour éviter la précipitation du plomb en présence de CO<sub>2</sub>.

#### 3.2.3.4. Les observations microscopiques

Les coupes semi-minces sont observées à l'aide d'un photomicroscope II CARL ZEISS en contraste de phase et les photos sont prises sur un film Ektachrome 160T Kodak. L'épaisseur du manteau, la profondeur de pénétration du réseau de Hartig et le diamètre de la mycorhize ont été mesurés à l'aide d'un micromètre gradué sur au moins 20 coupes par échantillon (3 à 4 blocs).

Les observations ultrastructurales sont faites au microscope électronique à transmission (ZEISS EM 9 S 2). Les photos sont réalisées à l'aide d'un film de marque AGFA (8/10 cm).

### 3.3. Résultats

#### 3.3.1. Morphologie et anatomie des mycorhizes

##### 3.3.1.1. Les mycorhizes de synthèse

Au bout de trois à quatre jours de contact entre les racines d'*A. africana* et le mycélium de *S. dictyosporum* IR109, il est possible de voir à travers les parois transparentes des mini-rhizotrons des mycorhizes. Les autres souches testées, IR250, IR406 et IR408 ont mycorhizé plus tardivement (5 à 7 jours).

Toutes les mycorhizes obtenues se présentent sous forme de racines courtes (racines latérales d'ordre 2) entourées d'un feutrage blanc de mycélium. Elles ont une forme pyramidale-monopodiale. Elles présentent toutes un manteau plus ou moins lisse de couleur blanche avec un réseau de mycélium frangant assez bien développé (pl. V, fig. 1, 2, 3, 4) et sont ainsi impossible à différencier les unes des autres.

Des coupes transversales, observées au microscope photonique, permettent d'avoir une vue d'ensemble de l'organisation de ces mycorhizes présentes après 10 jours de



## PLANCHE VI

Microscopie photomique des mycorhizes de synthese d'*A. africana* après 10 jours de contact entre le mycélium et le système racinaire (coloration au bleu de toluidine)

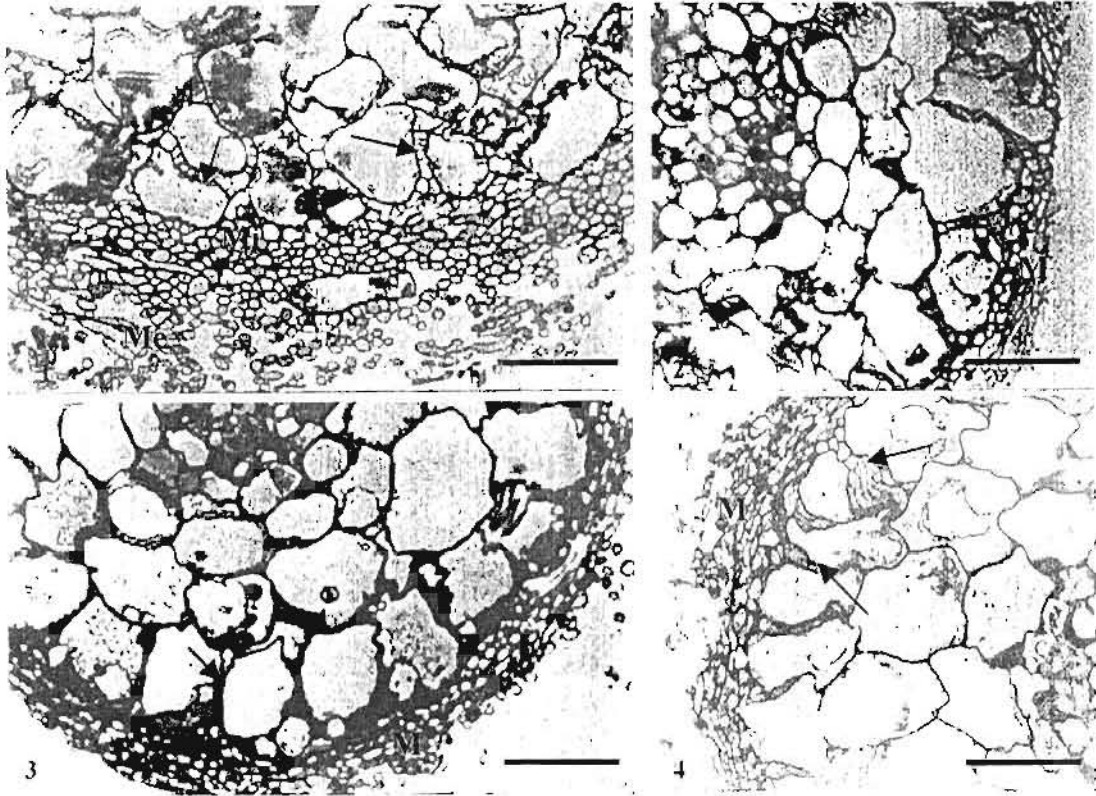


Figure 1. Coupe transversale d'une mycorhize d'*A. africana* / *Scleroderma* sp1 IR406. Le manteau est constitué de deux couches, une couche interne (Mi) constituée d'hyphes isodiamétriques et une couche externe (Me) d'hyphes peu soudés. Le réseau de Hartig (flèches) est limité à la première couche de cellules corticales dont certaines sont complètement entourées par les hyphes (barre d'échelle 9 µm).

Figure 2. Coupe transversale d'une mycorhize d'*A. africana* / *S. dictyosporum* IR109. Le réseau de Hartig s'intercale entre les cellules corticales qui sont allongées radialement. Le manteau (M), de structure prosenchymateuse est très peu épais. (barre d'échelle 9 µm).

Figure 3. Coupe transversale d'une mycorhize d'*A. africana* / *S. dictyosporum* IR250. Structure semblable à celle de la mycorhize formée par IR109. Le manteau est peu épais et le réseau de Hartig est limité à la première couche de cellules corticales. (barre d'échelle 9 µm).

Figure 3. Coupe transversale d'une mycorhize d'*A. africana* / *Scleroderma* sp2 IR408. Cette mycorhize présente une organisation voisine de celles obtenues avec les isolats de *S. dictyosporum* (barre d'échelle 9 µm).

contact (pl.VI). Le manteau présente une épaisseur variable de 3 à plusieurs couches d'hyphes. Le réseau de Hartig, en continuité avec le manteau est peu développé et limité à la première couche de cellules rhizodermiques. Ces dernières sont allongées radialement. Les couches internes du rhizoderme et les cellules endodermiques ne sont jamais atteintes. Le réseau de Hartig présente un arrangement unisérié.

Avec la souche IR406, le manteau est constitué d'une couche interne de structure pseudoparenchymateuse (manteau interne) composée de 3 à 4 couches d'hyphes et d'une couche externe prosenchymateuse (pl.VI, fig.1). Les autres souches sont caractérisées par un manteau prosenchymateux uniforme de 3 à 5 couches d'hyphes (pl.VI, fig.2, 3, 4).

### 3.3.1.2. Les mycorhizes obtenues par piégeage

Après les 4 mois de culture des jeunes plants d'*A. africana* sur les différents sols, trois types de mycorhizes (blanc, beige et brun) ont été identifiés sur le système racinaire (tableau 3.1).

Les taux de mycorhization obtenus sont assez faibles : 25 à 50% du système racinaire colonisé. Le morphotype blanc est le plus abondant. Il est rencontré sur les plantes cultivées sur les sols des sites VII, IX et XII (pl.VII, fig.1, 2 et 3). Il est observé en association avec le type brun sur les sites X et XI (pl.VII, fig.4 et 5). Dans ce dernier cas, 80% des mycorhizes sont de type blanc. Le morphotype brun a été rencontré sur 5 sols (sites II, III, VIII, X et XI.) (pl.VIII, fig.1, 2, 3, 4 et 5) et le type beige sur le sol du site XII (pl.VII, fig.6). Ce morphotype beige pourrait correspondre à des mycorhizes âgées du type blanc présentes sur le même site.

Les formes des mycorhizes sont pyramidale-monopodiales (type blanc et beige) à monopodiales (type brun). Les caractéristiques morphologique et structurale des différents types de mycorhizes sont présentées dans le tableau 3.2. Pour le morphotype blanc, on distingue les mycorhizes blanches à sclérotés et cordons mycéliens ou rhizomorphes (sites VII et XII) et les mycorhizes blanches avec présence ou non de cordons mycéliens (sites IX, X et XI).

Hormi l'importance du mycélium frangant chez les mycorhizes de synthèse, les mycorhizes de synthèse obtenues avec les 4 isolats de Sclérodermes testés présentent une morphologie semblable à celle des morphotypes mycorhiziens blancs observés après piégeage. Il est donc probable que certaines mycorhizes de piégeage de couleur blanche soient dues à des Sclérodermes.

Tableau 3.2. Caractéristiques anatomo-morphologiques des mycorhizes de piégeage et de synthèse d'*Afzelia africana*

Références dans le texte	Couleur	Forme	Mycorhize (Diamètre moyen (µm))	Manteau			Profondeur du réseau de Hartig (µm)	Sclérotés	Cordons ou mycélium frangant
				Texture	Structure	Epaisseur			
<b>Mycorhizes de piégeage</b>									
BL11	blanche	pyramid-monop	349	± lisse	prosen-	23,6	40	-	+
BL12	blanche	pyramid-monop	341	± lisse	pseudoparench	26	32,8	+	+
BL9	blanche	pyramid-monop	327	lisse	prosenchym	21,2	27,6	-	+
BL10	blanche	pyramid-monop	259	± lisse	pseudoparench	16	29,6	-	+
BL7	blanche	pyramid-monop	212	lisse	prosenchym	15,2	43,2	+	+
BR10	brune	monopodiale	312	lisse	prosenchym	35,6	32,8	-	-
BR2	brune	monopodiale	359	poils	pseudoparench	21,2	43,2	-	-
BR11	brune	monopodiale	322	poils	pseudoparench	36,8	34,8	-	-
BR8	brune	monopodiale	382	± lisse	pseudoparench	32,4	35,2	-	-
BR3	brune	monopodiale	378	poils	pseudoparench prosenchym	15	10	-	-
<b>Mycorhizes de synthèse</b>									
IR109	blanche	pyramid-monop	205	± lisse	prosenchym.	13,6	24	-	+
IR250	blanche	pyramid-monop	214	± lisse	prosenchym	13,6	19,6	-	+
IR406	blanche	pyramid-monop	312	± lisse	prosenchym & pseudoparench	30	19,2	-	+
IR408	blanche	pyramid-monop	198	± lisse	prosenchym	12,8	22	-	+

pyramid-monop : pyramidale-monopodiale ; prosenchym : prosenchymateux ; pseudoparench : pseudoparenchymateux.

## PLANCHE VII

Morphotypes mycorhiziens blancs et beige obtenus par piégeage

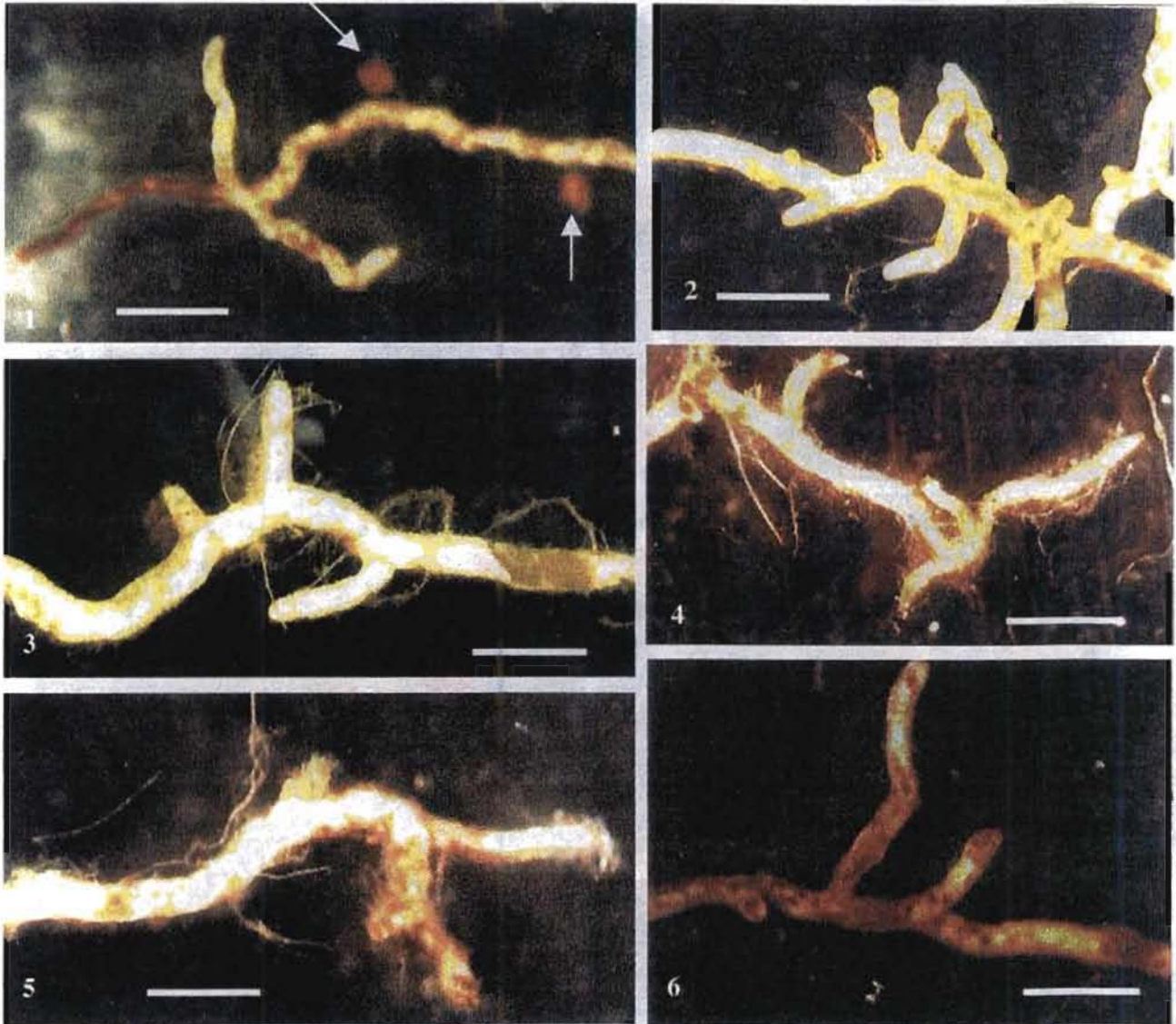


Figure 1. Mycorhize du site VII. Noter la présence de sclérotés (flèches)

Figure 2. Mycorhize du site IX.

Figure 3. Mycorhize du site X.

Figure 4. Mycorhize du site XI.

Figure 5. Mycorhize du site XII.

Figure 6. Morphotype beige du site XII.

Barre d'échelle, 5.5 mm

## PLANCHE VIII

Morphotypes mycorhiziens bruns obtenus par piégeage

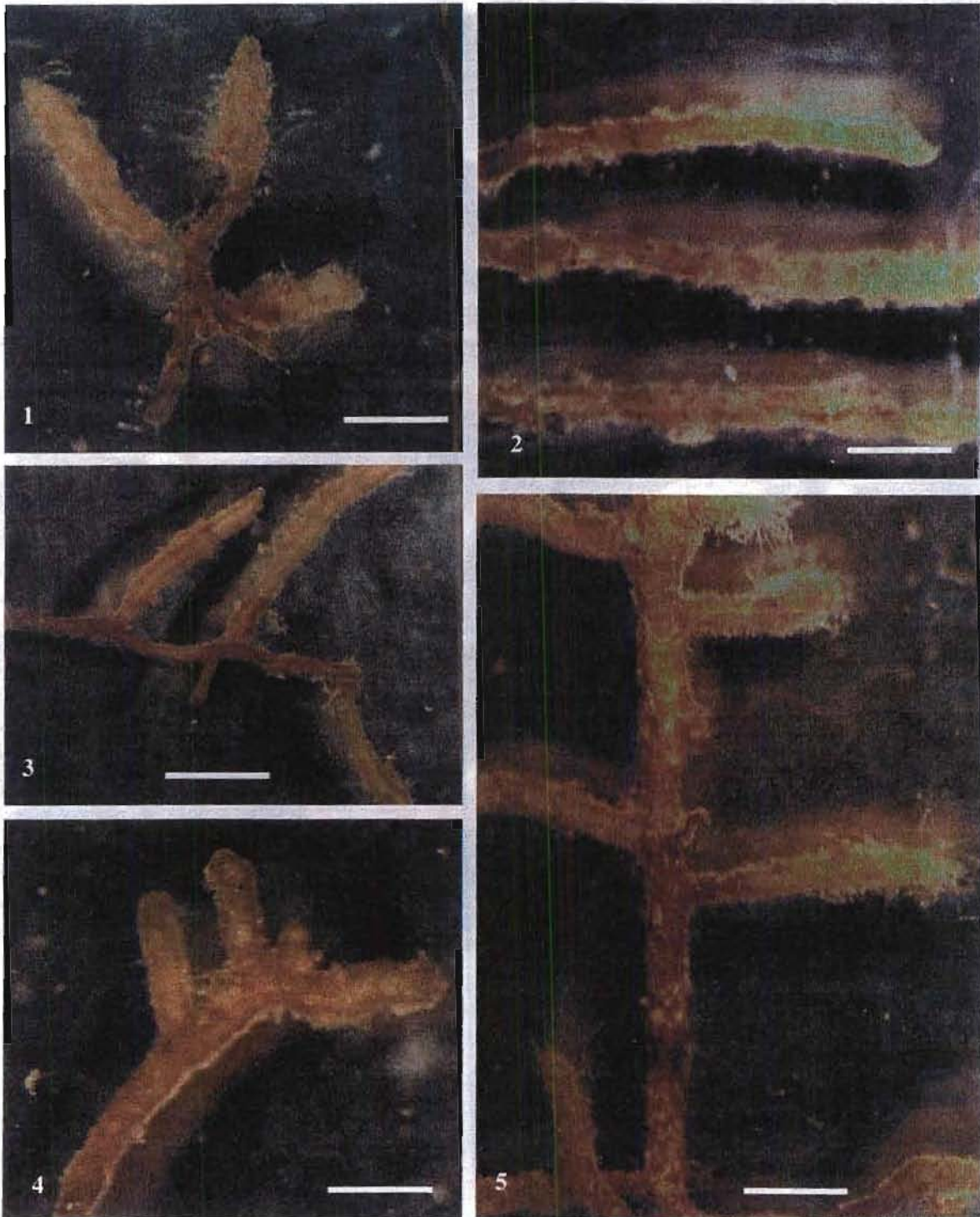


Figure 1. Mycorhize du site II  
Figure 2. Mycorhize du site III  
Figure 3. Mycorhize du site VIII  
Figure 4. Mycorhize du site XI  
Figure 5. Mycorhize du site X  
Barre d'échelle, 5,5 mm

La structure des mycorhizes obtenus par piégeage est assez variable d'un morphotype à l'autre. Dans tous les cas, l'organisation générale est maintenue à savoir un manteau constitué de plusieurs couches d'hyphes et un réseau de Hartig limité à la première couche de cellules corticales. Cependant, contrairement aux mycorhizes de synthèse, il peut être plurisériel (pl. XI, fig. 2b, 3). Le diamètre des mycorhizes en coupe transversale est relativement plus grand pour les mycorhizes de piégeage. Les hyphes du manteau présentent également un diamètre important en fonction des morphotypes. Les hyphes de gros diamètre se rencontrent en particulier chez les morphotypes bruns. Par conséquent, le manteau constitué de 3 à 5 couches d'hyphes a une épaisseur moyenne variant de 15 à 35  $\mu$ m. La plupart des mycorhizes présente une structure prosenchymateuse uniforme (pl. IX, fig. 1, 2a & b, 3, 4) ou pseudoparenchymateuse uniforme (pl. X, fig. 1, 2, 3 et pl. XI, fig. 1, 2a & b, 3). Il est également possible de distinguer entre un manteau interne de 1 à 2 couches et un manteau externe (pl. X, fig. 1 ; pl. XI, fig. 2a & b). Cette variabilité dans la structure du manteau n'est pas liée aux morphotypes mycorhiziens. En effet, les deux types d'organisation du manteau se rencontrent aussi bien chez les morphotypes bruns que chez les morphotypes blancs. Cependant, les morphotypes bruns présentent essentiellement un manteau pseudoparenchymateux (pl. X, fig. 1, 2 ; pl. XI, fig. 1, 3).

Excepté la taille des cellules, la structure du manteau des morphotypes blancs (BL7, BL10, BL12) rappelle celle des mycorhizes de synthèse obtenues avec les isolats IR109, IR250 et IR408. Aucune mycorhize obtenue par piégeage ne présente une structure semblable à la mycorhize de synthèse obtenue avec l'isolat IR406.

L'organisation des hyphes du manteau permet de classer les mycorhizes obtenues par piégeage en 2 groupes :

- Groupe 1 : mycorhizes présentant un manteau à structure prosenchymateuse uniforme (BL7, BL10, BL12 et BR3).
- Groupe 2 : mycorhizes à manteau pseudoparenchymateux uniforme (BL9, BL11, BR2, BR10, BR8 et BR11).

## PLANCHE IX

Microscopie photonique de mycorhizes d'*A. africana* obtenues par piégeage présentant un manteau prosenchymateux uniforme (coloration au bleu de toluidine).

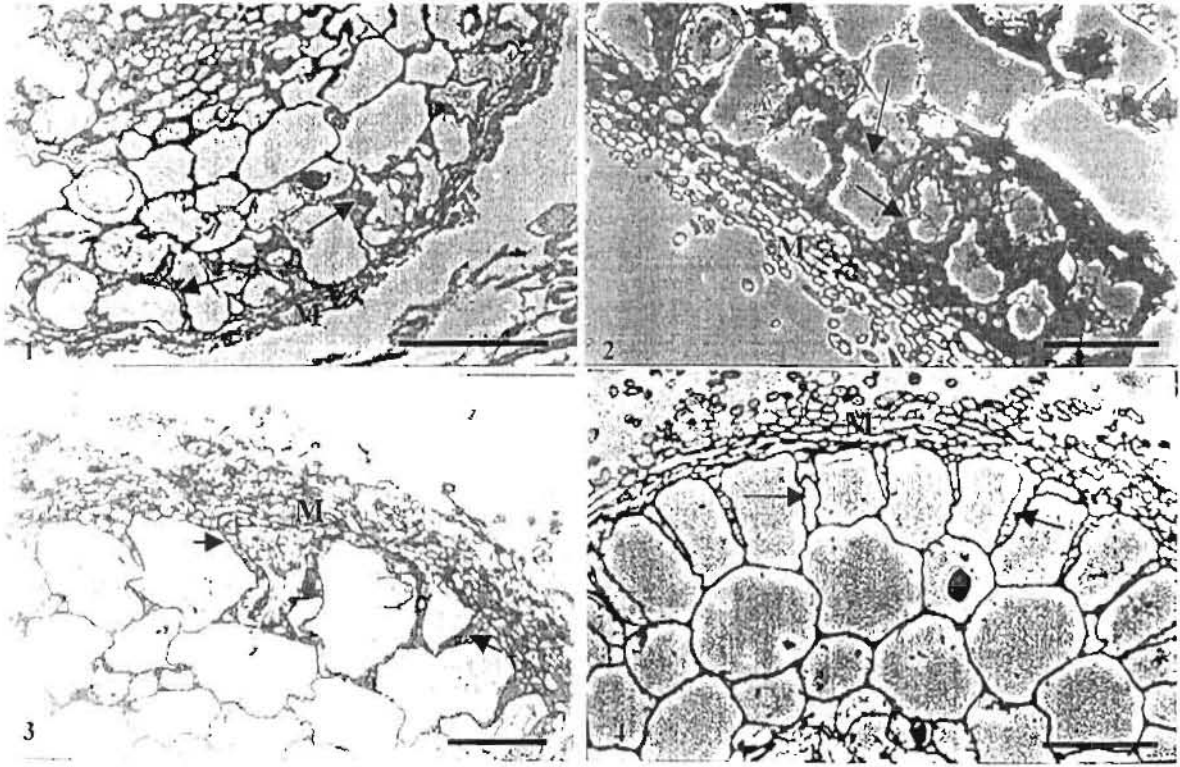


Figure 1. Coupe transversale d'une mycorhize de morphotype brun (site III). Le manteau est très réduit le réseau de Hartig se limite à la première couche de cellules corticales. (barre d'échelle 14  $\mu\text{m}$ ).

Figure 2. Coupe longitudinale d'une mycorhize de morphotype blanc (site VII). Noter le développement important du réseau de Hartig (barre d'échelle 7,8  $\mu\text{m}$ ).

Figure 3. Coupe transversale d'une mycorhize de morphotype blanc (site X). (barre d'échelle 9,3  $\mu\text{m}$ ).

Figure 4. Coupe transversale d'une mycorhize de morphotype blanc (site XII). (barre d'échelle 9,3  $\mu\text{m}$ ).

## PLANCHE X

Microscopie photonique de mycorhizes d'*A. africana* obtenues par piégeage  
présentant un manteau pseudoparenchymateux uniforme  
(coloration au bleu de toluidine)

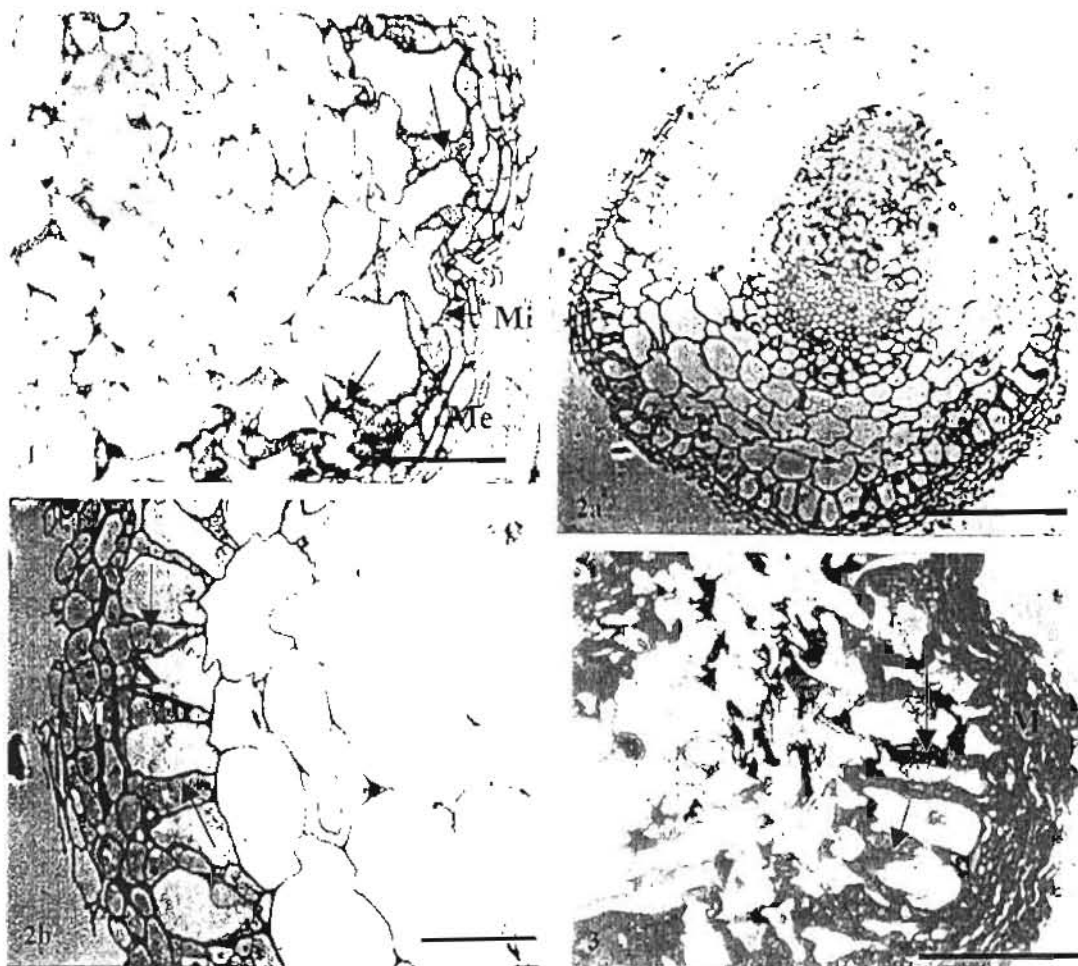


Figure 1. Coupe transversale d'une mycorhize de morphotype brun (site II). Le manteau présente une à deux couches d'hyphes isodiamétriques entourés de quelques couches d'hyphes moins soudés. Les cellules corticales présentent des formes variées plus ou moins allongées radialement. (barre d'échelle 10  $\mu$ m).

Figure 2a & b. Coupe transversale d'une mycorhize de morphotype brun (site VIII). La figure 2a (barre d'échelle 4,8  $\mu$ m) présente une ébauche de racine latérale émergeant d'une racine mycorhizée. On note des dépôts de tanins dans le manteau (2b) et le réseau de Hartig est bien développé. (barre d'échelle 10  $\mu$ m)

Figure 3. Coupe transversale d'une mycorhize de morphotype blanc (site IX). Les hyphes du manteau sont très soudés. (barre d'échelle 11  $\mu$ m)



## PLANCHE XI

Microscopie photonique de mycorhizes d'*A. africana* obtenues par piégeage  
présentant un manteau pseudoparenchymateux uniforme.  
(coloration au bleu de toluidine).

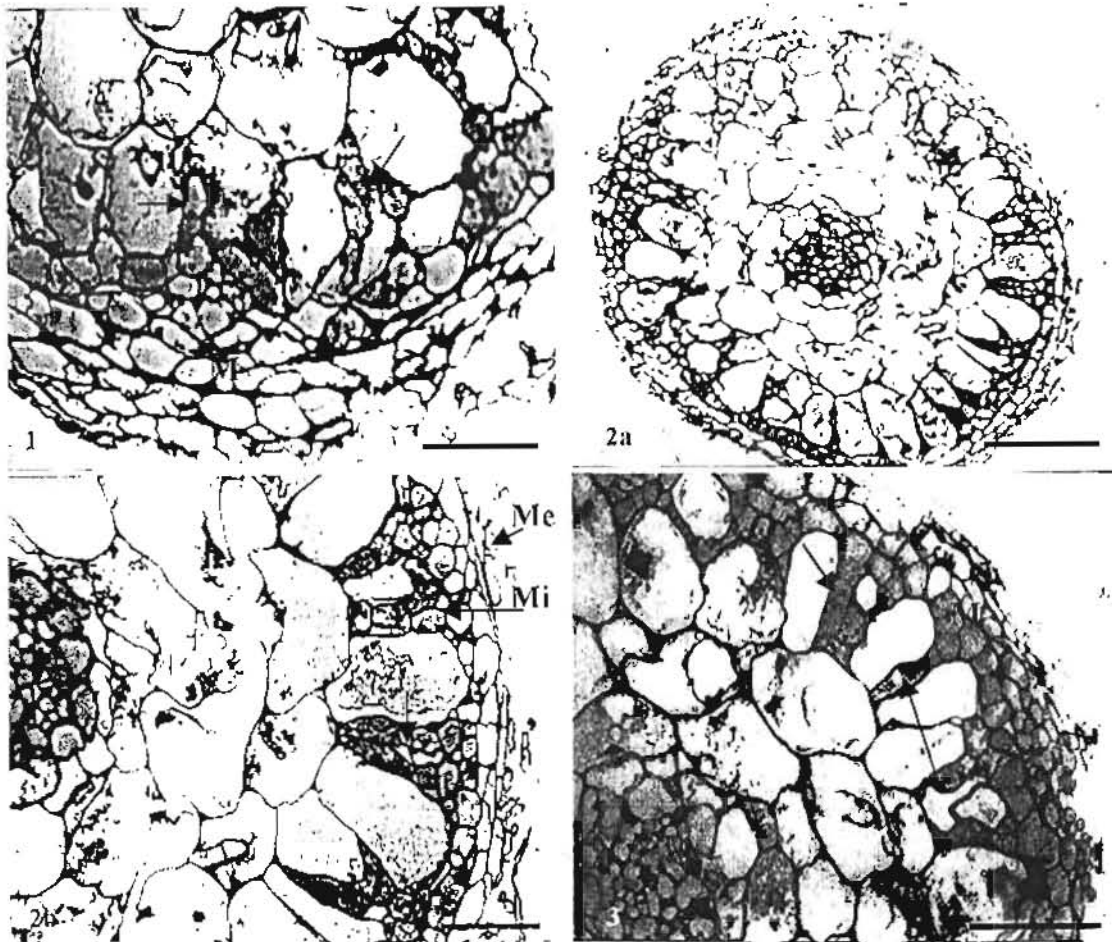


Figure 1. Coupe transversale d'une mycorhize de morphotype brun (site XI). Les hyphes sont de grande taille. (barre d'échelle 9,3  $\mu\text{m}$ ).

Figure 2a & b. Coupe transversale d'une mycorhize de morphotype blanc (site XI). Le manteau présente une à deux couches d'hyphes plus ou moins sphériques (manteau interne) et au moins une couche d'hyphes plus allongés (manteau externe). Le réseau de Hartig est bisérié par endroit (2a, barre d'échelle 25  $\mu\text{m}$  et 2b, barre d'échelle 8  $\mu\text{m}$ ).

Figure 3. Coupe transversale d'une mycorhize de morphotype brun (site XI). Les hyphes sont de grande taille et le réseau de Hartig peut être bisérié (barre d'échelle 14  $\mu\text{m}$ ).

### 3.3.2. Structure des mycorhizes

#### 3.3.2.1. Les mycorhizes de synthèse

L'observation au microscope électronique à transmission a été faite sur toutes les mycorhizes obtenues par synthèse. Nous présentons ici l'organisation structurale des mycorhizes obtenues avec les souches *S. dictyosporum* IR250, *Scleroderma* sp2 IR408 et *Scleroderma* sp1 IR406.

##### *A. africana* / *S. dictyosporum* IR250

Le manteau est constitué de 3 couches d'hyphes plus ou moins individualisés. Ces derniers sont vivants pour la plupart et de forme très variée (pl.XII, fig.1). Certains hyphes extramatriciels montrent des signes de dégénérescence à côté d'autres présentant un cytoplasme riche en organites (pl.XII fig.2). Du manteau partent des hyphes qui s'intercalent entre les cellules corticales de l'hôte pour former le réseau de Hartig qui présente une structure labyrinthique caractéristique de mycorhize fonctionnelle (pl.XII, fig.1). On note un dépôt important de tanin au voisinage du réseau de Hartig. Les cellules corticales sont vivantes et contiennent de grosses vacuoles qui occupent un grand volume du cytoplasme, réduisant celui-ci en un fin film pariétal (pl.XII, fig.1, 3).

##### *A. africana* / *Scleroderma* sp2 IR408

La structure de cette mycorhize rappelle celle décrite ci-dessus. Les hyphes du manteau sont soudés par un ciment lâche (pl.XIII, fig.1). Le réseau de Hartig est par contre plus développé. Les hyphes sont vivants ainsi que les cellules corticales de l'hôte (pl.XIII, fig.2, 3). Le séquençage de la région ITS ribosomique révèle que cet isolat est un *S. dictyosporum* (cf. chapitre IV), ce qui explique cette similitude de structure avec les autres isolats de *S. dictyosporum* (IR109 et IR250).

Les observations effectuées sur les mycorhizes obtenues avec l'isolat IR109 ont montré des cellules corticales dégénérescentes (résultat non présenté ici) avec des dépôts de tanin sous forme de couche importante ou de granules.

##### *A. africana* / *Scleroderma* sp1 IR406

Les mycorhizes induites par l'isolat IR406, apparenté à *S. verrucosum* (cf. chapitre IV) sont différentes de celles formées par les isolats de *S. dictyosporum*. Dans le manteau externe, les hyphes présentent une section allongée et sont pour la plupart vivantes (pl.XIV, fig.1). Ils apparaissent peu soudés entre eux. Le manteau interne par contre est formé d'hyphes à section ovale soudés par un ciment plus dense (pl.XIV, fig. 2a & b).

## PLANCHE XII

Ultrastructure d'une mycorhize *A. africana* / *S. dictyosporum* IR250  
(contrastée à l'acétate d'uranyle/citrate de plomb)

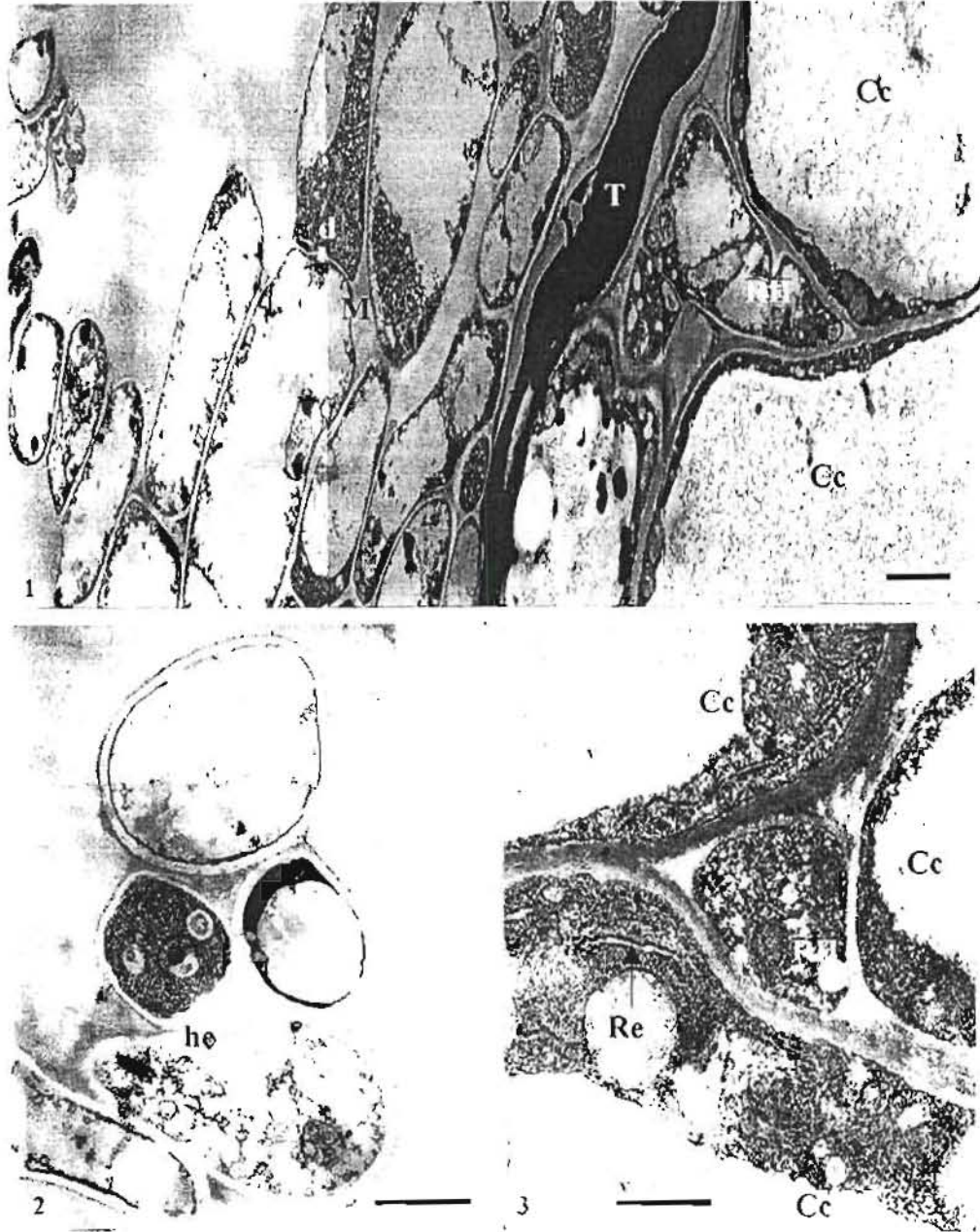


Figure 1. Le manteau (M) est formé d'hyphes vivants soudés par un ciment lâche. Une couche importante de tannin (T) est située à l'interface des hyphes du manteau. Le réseau de Hartig (RH) en cours de formation est également constitué d'hyphes vivants. On note la présence de dolipore (d) caractéristique des basidiomycètes. Les cellules corticales (Cc) contiennent de grosses vacuoles (V) centrales réduisant le cytoplasme en un fin film pariétal. (barre d'échelle 1  $\mu\text{m}$ ).

Figure 2. Certains hyphes extramatriciels (he) sont vides de contenu cytoplasmique. (barre d'échelle 0,4  $\mu\text{m}$ ).

Figure 3. Hyphes du réseau de Hartig entourée par 3 cellules corticales toutes vivantes. Noter la présence de réticulum endoplasmique (Re) (barre d'échelle 0,7  $\mu\text{m}$ ).

# PLANCHE XIII

Ultrastructure d'une mycorhize *A. africana* / *Scleroderma* sp2 IR408  
(contrastée à l'acétate d'uranyle/citrate de plomb)

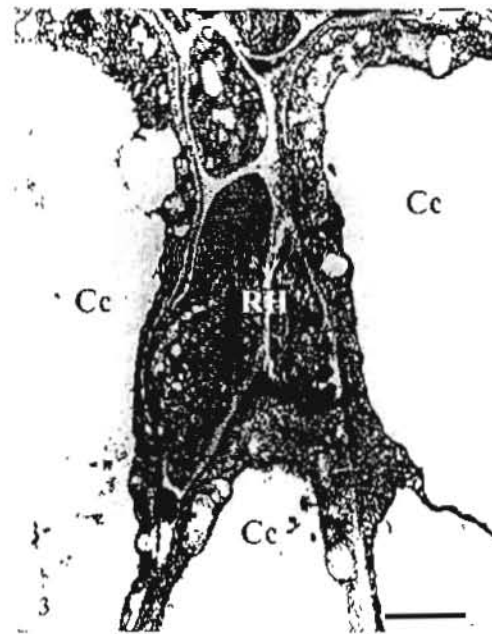
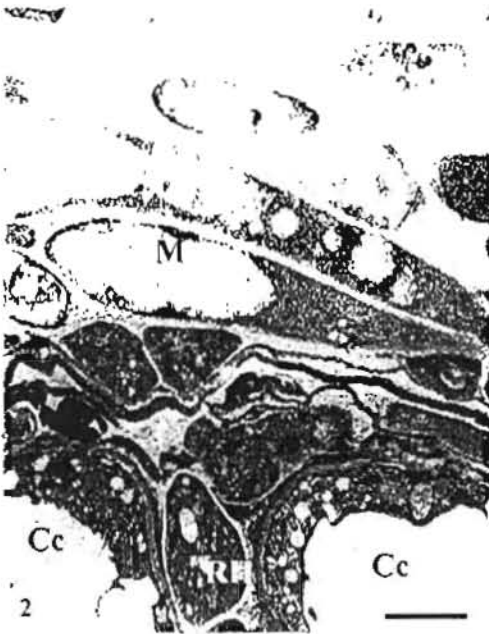


Figure 1. Les hyphes du manteau sont très peu soudés. (barre d'échelle 0,8  $\mu$ m)  
Figure 2a & b. Le réseau de Hartig et les cellules corticales de l'hôte sont vivantes. (barre d'échelle 1,7  $\mu$ m)

## PLANCHE XIV

Ultrastructure d'une mycorhize *A. africana* / *Scleroderma* sp1 IR406  
(contrastée à l'acétate d'uranyle/citrate de plomb)

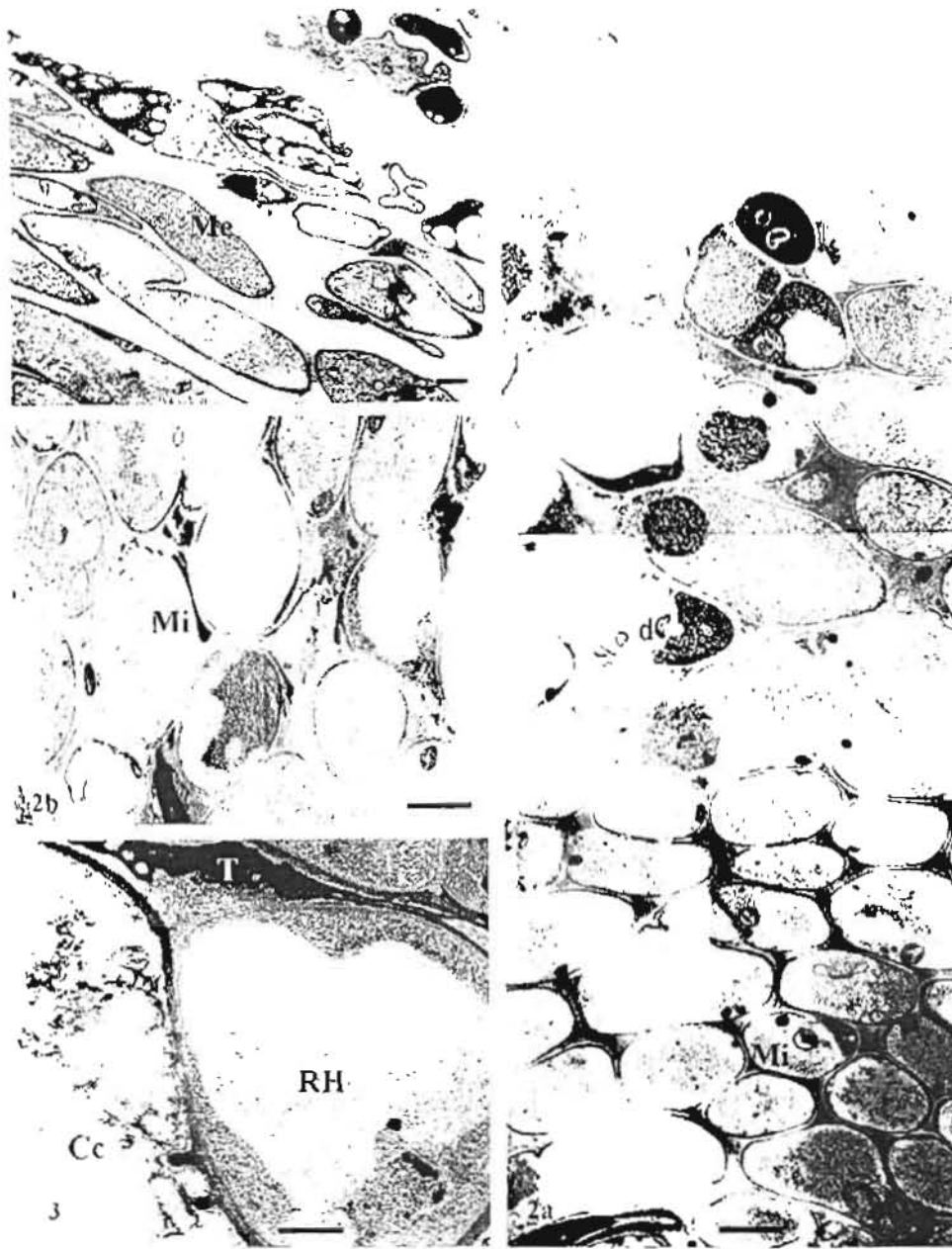


Figure 1 & 2. Le manteau est constitué de deux couches, une couche externe (Me) dont les hyphes sont soudés par un ciment lâche (1, barre d'échelle 0,5  $\mu$ m) et une couche interne (Mi) à ciment plus dense (2a & b, barre d'échelle 1,5  $\mu$ m)  
Figure 3. Le réseau de Hartig est vivant et les cellules corticales sont mortes. (barre d'échelle 0,6  $\mu$ m).

Le réseau de Hartig est vivant avec cependant des cellules corticales mortes présentant des dépôts granuleux de tanins (pl.XIV, fig.3).

### 3.3.2.2. Les mycorhizes obtenues par piégeage

L'étude ultrastructurale des mycorhizes de piégeage a porté sur un morphotype blanc à manteau prosenchymateux obtenu sur les plants cultivés sur le sol du site XII (BL12) et deux morphotypes bruns à manteau pseudoparenchymateux constitué de deux couches (manteau interne et externe, BR2) ou d'une seule couche (BR8). Le morphotype BR2 est issu des plants cultivés sur le sol du site II et BR8 sur le sol du site VIII.

L'ultrastructure de ces différentes mycorhizes présente la même organisation que les mycorhizes obtenues en conditions semi-contrôlées. La présence de dolipores suggèrent qu'il s'agit de Basidiomycètes.

#### Cas du morphotype blanc BL12

Les hyphes présentent une taille relativement plus importante. Comparativement aux mycorhizes obtenues par synthèse avec les isolats de *S. dictyosporum*, les hyphes du manteau sont soudés par un ciment plus dense (pl.XV, fig.1a & b). Ces hyphes sont riches en organites cellulaires, essentiellement des mitochondries. Une couche de tanin sépare les hyphes du manteau de ceux de réseau de Hartig (pl.XV, fig.1a, 2). Ces derniers sont intercalés entre des cellules corticales dégénérées.

#### Cas du morphotype brun BR2

Le manteau externe est constitué d'hyphes morts, allongés et dépourvus de contenu cytoplasmique. Par contre, les hyphes du manteau interne sont vivantes et riches en organites (pl.XVI, fig.1, 2). On observe une couche de tanin à la limite du manteau interne et externe (pl.XVI, fig.2). Les hyphes du réseau de Hartig contiennent beaucoup de mitochondries (pl. XVI, fig.3).

#### Cas du morphotype brun BR8

Le manteau présente des hyphes vivants (pl.XVII, fig. 1). Cependant, certains hyphes externes sont dégénérescents et encadrent des bactéries probablement saprophytes (pl.XVII, fig.2). On observe de nombreux organites cellulaires au niveau du réseau de Hartig qui présente par endroit une organisation bisériée (pl.XVII, fig.3, 4). Certaines cellules corticales de l'hôte sont vivantes (pl.XVII, fig.3) et d'autres présentent des signes de dégénérescence (pl.XVII, fig.4).

## PLANCHE XV

Ultrastructure d'une mycorhizose de morphotype blanc (BL12)  
(contrastée à l'acétate d'uranyle/citrate de plomb)

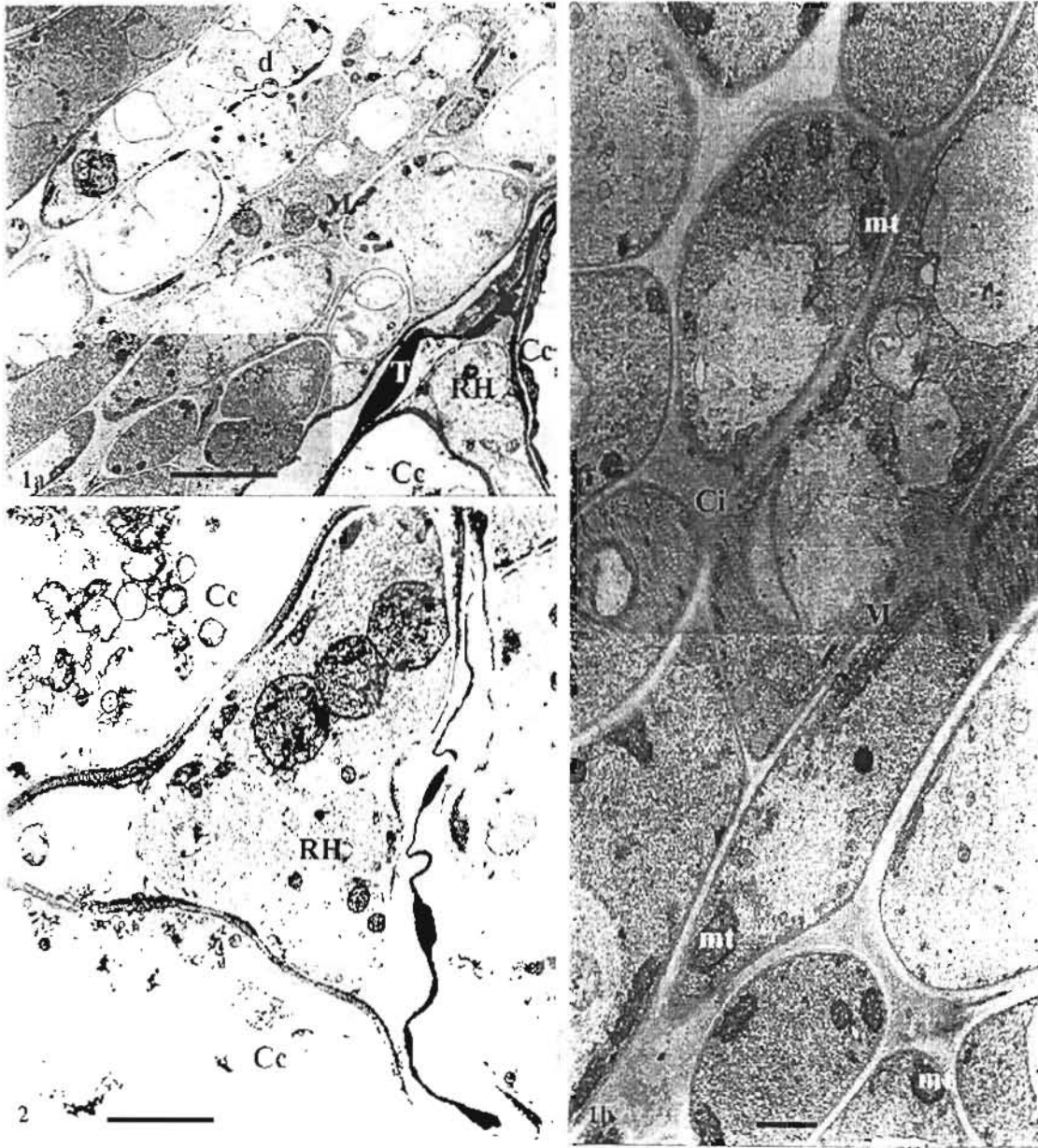


Figure 1a & b. Le manteau prosenchymateux est constitué d'hyphes vivants et riches en mitochondries (1a, barre d'échelle 0,85  $\mu\text{m}$  et 1b, barre d'échelle 2,7  $\mu\text{m}$ ). Noter la présence de dolipore (d) caractéristique des basidiomycètes (1a). Le ciment interhyphal (Ci) est peu soudé.

Figure 2. Les cellules corticales sont mortes cependant le réseau de Hartig est vivant. (barre d'échelle 1,5  $\mu\text{m}$ ).

## PLANCHE XVI

Ultrastructure d'une mycorhize de morphotype brun (BR2)  
(contrastée à l'acétate d'uranyle/citrate de plomb)



Figure 1. Les hyphes du manteau interne sont vivantes et celles du manteau externe sont vides de contenus cellulaires. Le réseau de Hartig est également vivant (barre d'échelle 1,6  $\mu\text{m}$ )

Figure 2. Détail des hyphes du manteau montrant un dépôt de tanin entre les deux couches. (barre d'échelle 1,5  $\mu\text{m}$ )

Figure 3. Les hyphes du réseau de Hartig sont riches en mitochondries (barre d'échelle 1,1  $\mu\text{m}$ )



## PLANCHE XVII

Ultrastructure d'une mycorhizine de morphotype brun (BRS)  
(contrastée à l'acétate d'uranyle/citrate de plomb)

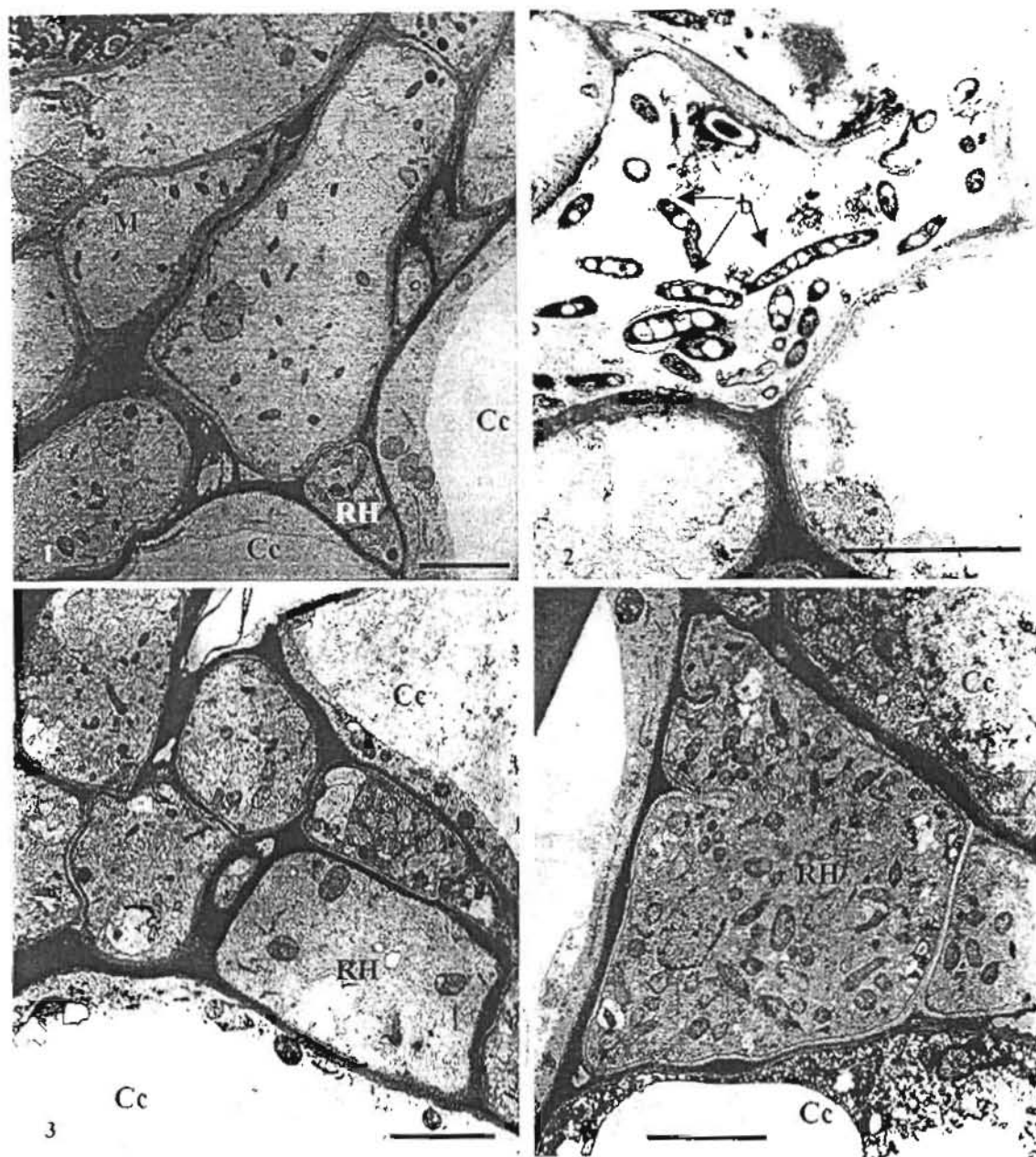


Figure 1. Le manteau présente une structure pseudoparenchymateuse et est constitué d'hyphes vivants (barre d'échelle 2,5  $\mu\text{m}$ )

Figure 2. On note la présence de bactéries (b) probablement saprophytes à proximité des hyphes dégénérescents du manteau. (barre d'échelle 2  $\mu\text{m}$ )

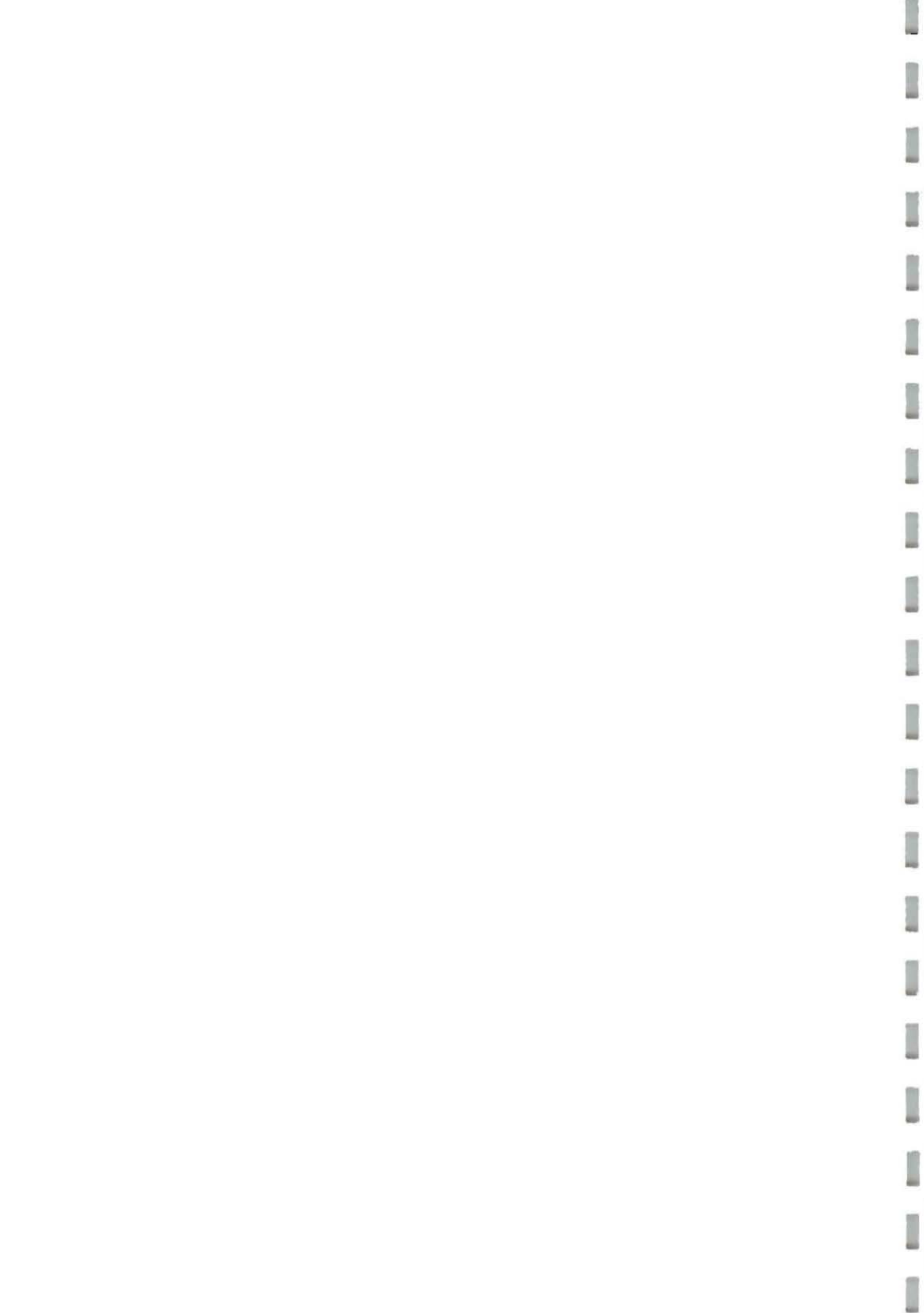
Figure 3 & 4. Le réseau de Hartig est bisérié (3, barre d'échelle 2,5  $\mu\text{m}$ ) avec des hyphes riches en organites (4, barre d'échelle 2,7  $\mu\text{m}$ ).

La présence d'organites chez les deux partenaires est l'indication des zones physiologiquement actives.

### 3.4. Discussion et conclusion

L'analyse cytologique des mycorhizes développées sur *A. africana* a permis de confirmer que celles induites par les isolats de Sclérodermes définis et tous les morphotypes identifiés sur les plantules piégées constituaient des mycorhizes fonctionnelles avec un manteau bien développé, ou en dégénérescence, et un réseau de Hartig présentant par endroit des hyphes labyrinthiques. L'utilisation des seuls critères morphologiques permet dans certains cas d'identifier l'espèce fongique impliquée dans une mycorhize et surtout les genres (Zak, 1973 ; Mehmman et al, 1995). Les mycorhizes formées par les différentes espèces de sclérodermes que nous avons testées présentent une morphologie qui pourrait caractériser les mycorhizes du genre *Scleroderma* au stade juvénile. En effet, bien que la croissance de la souche IR406 en milieu de culture diffère fortement de celle des autres isolats, toutes les mycorhizes formées par les souches IR109, IR250, IR408 (*S. dictyosporum*) et IR406 (*Scleroderma* sp1) sont semblables. Les mycorhizes de *S. citrinum* sur *Betula pendula* (Agerer, 1987) et celles de *Scleroderma* sp sur chêne (Garbaye, 1990b) présentent également une morphologie semblable à celles que nous avons décrites. Cependant, au cours des essais en pépinière (cf. chapitre V), nous avons obtenu des mycorhizes de couleur jaune pâle avec les souches IR109 et IR408, 4 mois après inoculation. Garbaye (1990) signale également un changement de couleur des mycorhizes de *Scleroderma* passant du blanc au jaune pâle. Ces observations soulignent les difficultés d'identification du partenaire fongique à partir d'une mycorhize à l'aide des seuls critères morphologiques.

En considérant les critères anatomiques (organisation du manteau en particulier), il est possible d'identifier aisément les mycorhizes formées par *Scleroderma* sp1 IR406 (génétiquement proche de *S. verrucosum*, chapitre IV) qui sont caractérisées par un manteau externe lâche entourant un manteau interne à hyphes noyés dans un ciment dense. Les mycorhizes obtenues avec l'isolat IR408, que nous avons attribué à *S. dictyosporum* (cf. chapitre IV), présentent la même organisation anatomique que celles des deux autres souches de *S. dictyosporum* (IR109 et IR250). Par conséquent, les critères morphologiques et anatomiques sont utiles afin d'identifier l'espèce mycorhizant les plants, mais ils sont insuffisants pour différencier les souches fongiques.

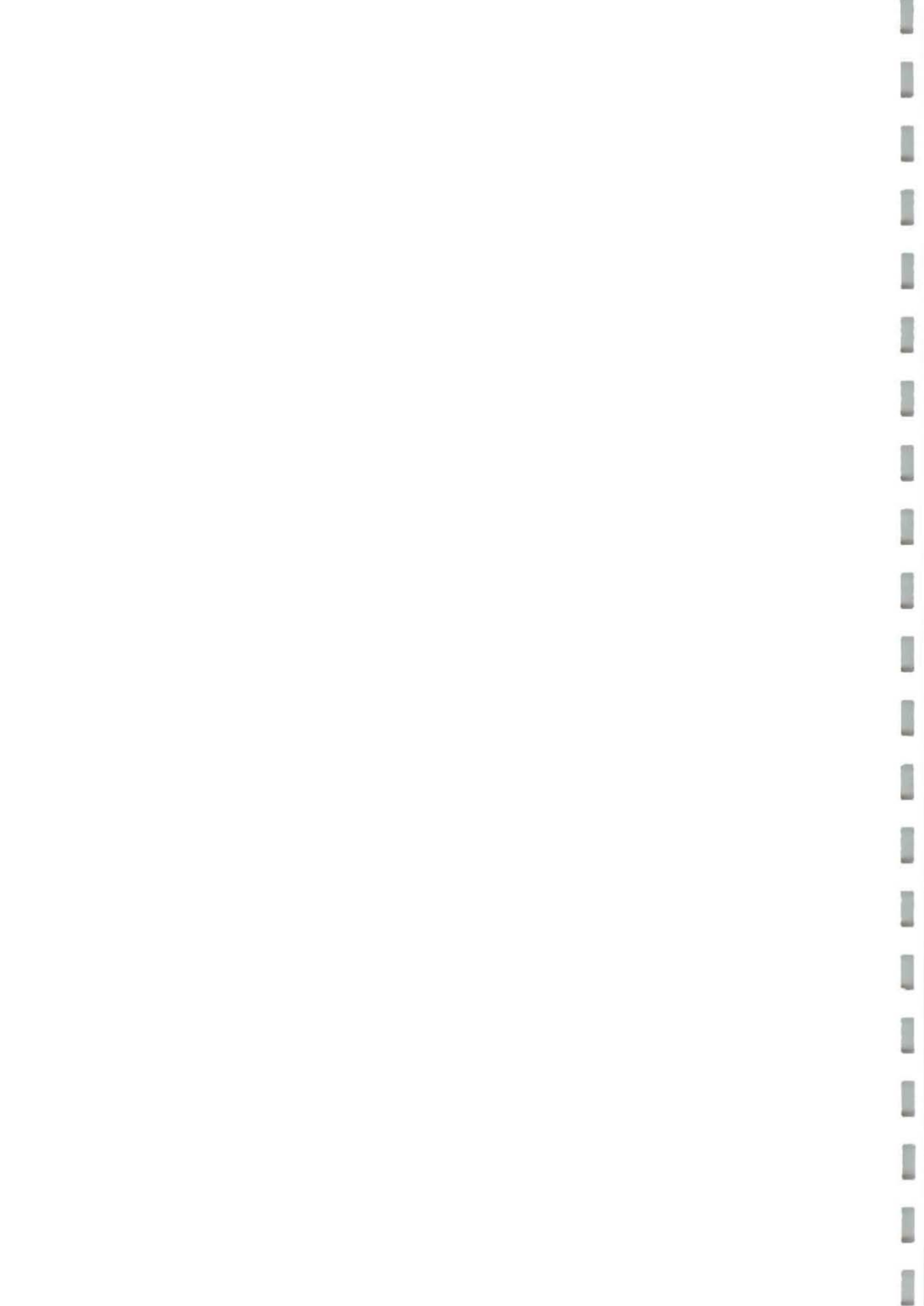


Les mycorhizes obtenues par piégeage présentent la même organisation générale (manteau d'épaisseur variable et réseau de Hartig peu profond) que celles qui sont obtenues par synthèse. Cependant, le diamètre des mycorhizes de piégeage est légèrement plus grand. On observe chez les deux morphotypes des structures variables du manteau, prosenchymateuse ou pseudoparenchymateuse uniforme. Son épaisseur est assez variable et généralement, plus importante au niveau des mycorhizes de piégeage. La souche IR406 présente cependant une épaisseur du manteau supérieure à celle de certains morphotypes (BL7, BL10). La profondeur de pénétration intercellulaire du réseau de Hartig est également plus importante chez les mycorhizes de piégeage. Ce réseau mycélien semble être en cours de formation pour certaines mycorhizes de synthèse (pl.XII, fig.1). La faible épaisseur du manteau des mycorhizes de synthèse pourraient donc traduire le stade de développement précoce des tissus observés. En effet, des travaux ont montré une augmentation de l'épaisseur du manteau au cours de l'évolution de la mycorhize (Bâ, 1990 ; Pargney et Leduc, 1990). Il est peu important chez les mycorhizes jeunes et devient plus épais au niveau des mycorhizes plus âgées. L'anatomie comparée montre que certaines mycorhizes blanches et brunes ont la même organisation du manteau.

Excepté la taille des cellules et aussi l'âge des mycorhizes, certaines mycorhizes de piégeage ont des structures semblables à celles de synthèse (cas des mycorhizes formées par les isolats de *S. dictyosporum* et BL10, BL12 et BR3).

Toutes les mycorhizes examinées présentent la structure typique des mycorhizes d'Angiospermes (Hêtre, Bouleau, Eucalyptus, *Azelia*, *Brachystegia*) avec une seule couche de cellules corticales colonisées par le réseau de Hartig (Högberg et Nylund, 1981; Alexander et Högberg, 1986 ; Bâ, 1990 ; Strullu, 1991 ; Dexheimer *et al.*, 1994). L'organisation du manteau en deux couches (interne et externe) a déjà été décrite chez *A. africana* et *A. quanzensis* (Högberg et Nylund, 1981 ; Bâ, 1990). La présence d'un manteau pseudoparenchymateux strict a également été observée chez des mycorhizes blanches d'*A. africana* obtenues par piégeage (Bâ, 1990). Cette dernière organisation rappelle le morphotype blanc BL9 (site IX).

Les études ultrastructurales ont permis de montrer que pratiquement toutes les mycorhizes sont physiologiquement actives avec des cellules vivantes des deux partenaires plus ou moins riches en organites. La présence de dolipores au niveau des hyphes des mycorhizes de piégeage observées au microscope électronique confirme qu'elles sont dues à des Basidiomycètes. Les hyphes extramatriciels sont généralement dégénérescentes ou mortes chez les mycorhizes obtenues par synthèse et par piégeage. Les hyphes du manteau interne sont généralement vivants et ceux du réseau de Hartig sont riches en organites traduisant une forte activité mitotique. Cependant, certaines



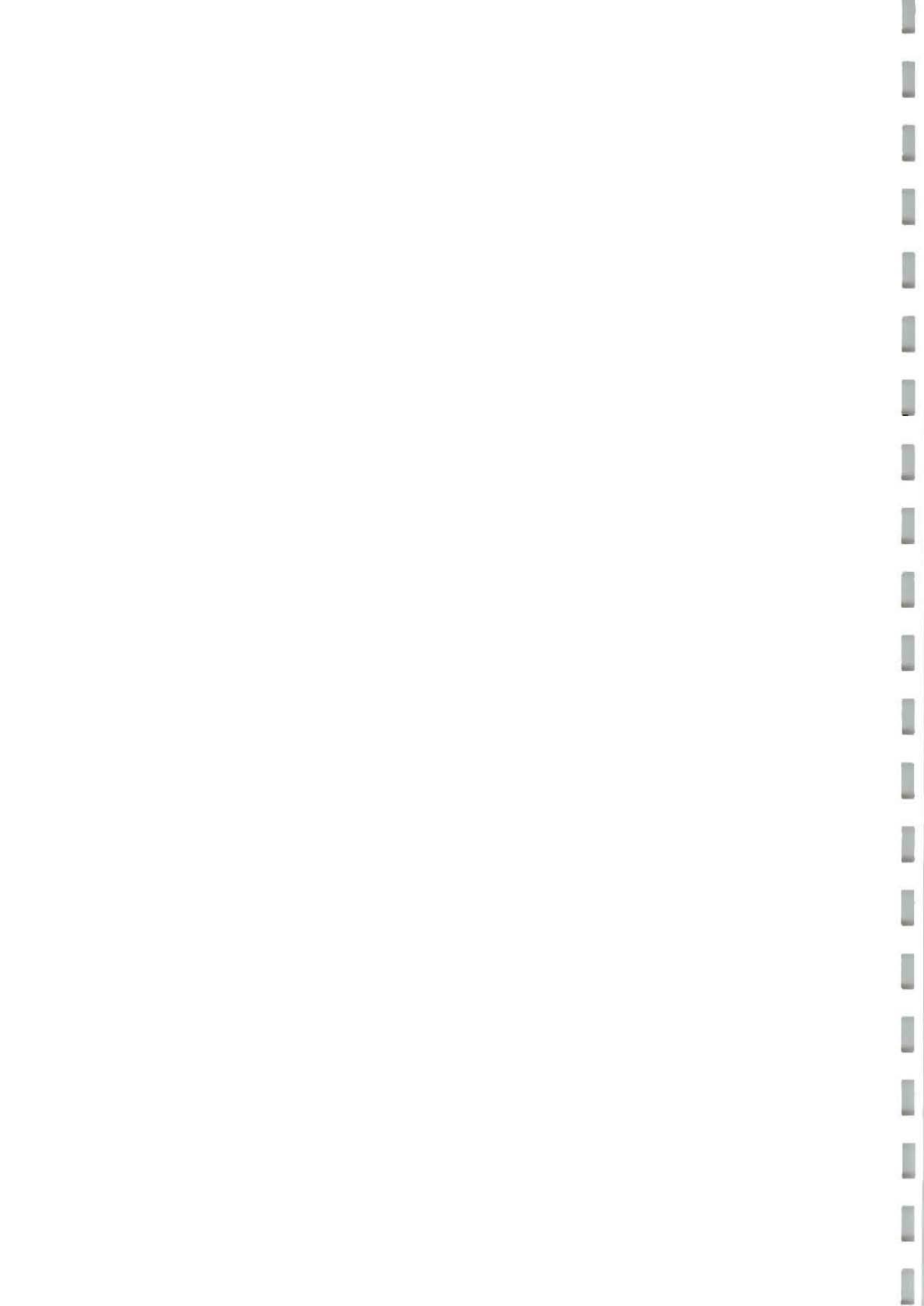
cellules corticales sont mortes. Compte tenu de l'âge des mycorhizes de synthèse, ceci pourrait être liée à la zone de coupe. En effet, Lei (1988) a délimité dans l'organisation longitudinale des mycorhizes de synthèse de *Pinus sylvestris* trois zones : une zone âgée présentant des cellules corticales dégénérescentes ou mortes, une zone sous-apicale sous-jacente courte montrant des cellules corticales vivantes et une zone active avec la présence d'hyphes et de cellules corticales vivants.

Nous avons observé des couches de cellules à tanins à l'interface des hyphes du manteau et du réseau de Hartig. Cette configuration est fréquente chez les associations ectomycorhiziennes (Massicotte et Petterson, 1987 ; Lei, 1988, Pargney et Leduc, 1990). Ces tanins qui interviendraient dans la coloration des mycorhizes et dans le contrôle de la croissance du champignon par les cellules radiculaires (Malajczuk, 1984) sont plus importants au niveau des mycorhizes de synthèse que celles de piégeage et cette accumulation pourrait être liée aux conditions de culture.

*La morphologie, l'anatomie et la structure des différentes mycorhizes décrites dans ce chapitre permettent de rapprocher certains morphotypes blancs (BL10, BL12) formées par l'inoculum présent dans le sol, à certaines mycorhizes de synthèse obtenues avec les souches IR109, IR250 et IR408 de S. dictyosporum.*

Les variations de l'épaisseur du manteau et de la profondeur du réseau de Hartig pourraient être liées à l'âge des mycorhizes. Cependant, il est difficile de confirmer avec certitude l'appartenance taxonomique des morphotypes. Les champignons précoces, associés à *A. africana* dans les 8 sites expérimentaux, comprennent des Sclérodermes et d'autres espèces fongiques (chapitre IV). Nous ne pouvons pas identifier en l'absence de mycorhizes de synthèse ces autres espèces de champignons rencontrés sur les sites. Ainsi, l'utilisation de ces critères anatomo-morphologiques pour identifier les champignons au niveau des mycorhizes nécessite que l'on puisse les isoler à partir des mycorhizes et réaliser des synthèses mycorhiziennes sur plantule. Les mycorhizes de synthèse ainsi obtenues sont alors comparées à des mycorhizes obtenues dans les mêmes conditions avec des souches de référence comme cela a été signalé par Zak (1973). Cela demande un temps assez long et la nécessité d'isoler les champignons à partir des mycorhizes. Malgré tout, il serait très difficile, voire impossible, de différencier les mycorhizes formées par des souches de même espèce tels que IR109, IR250 et IR408.

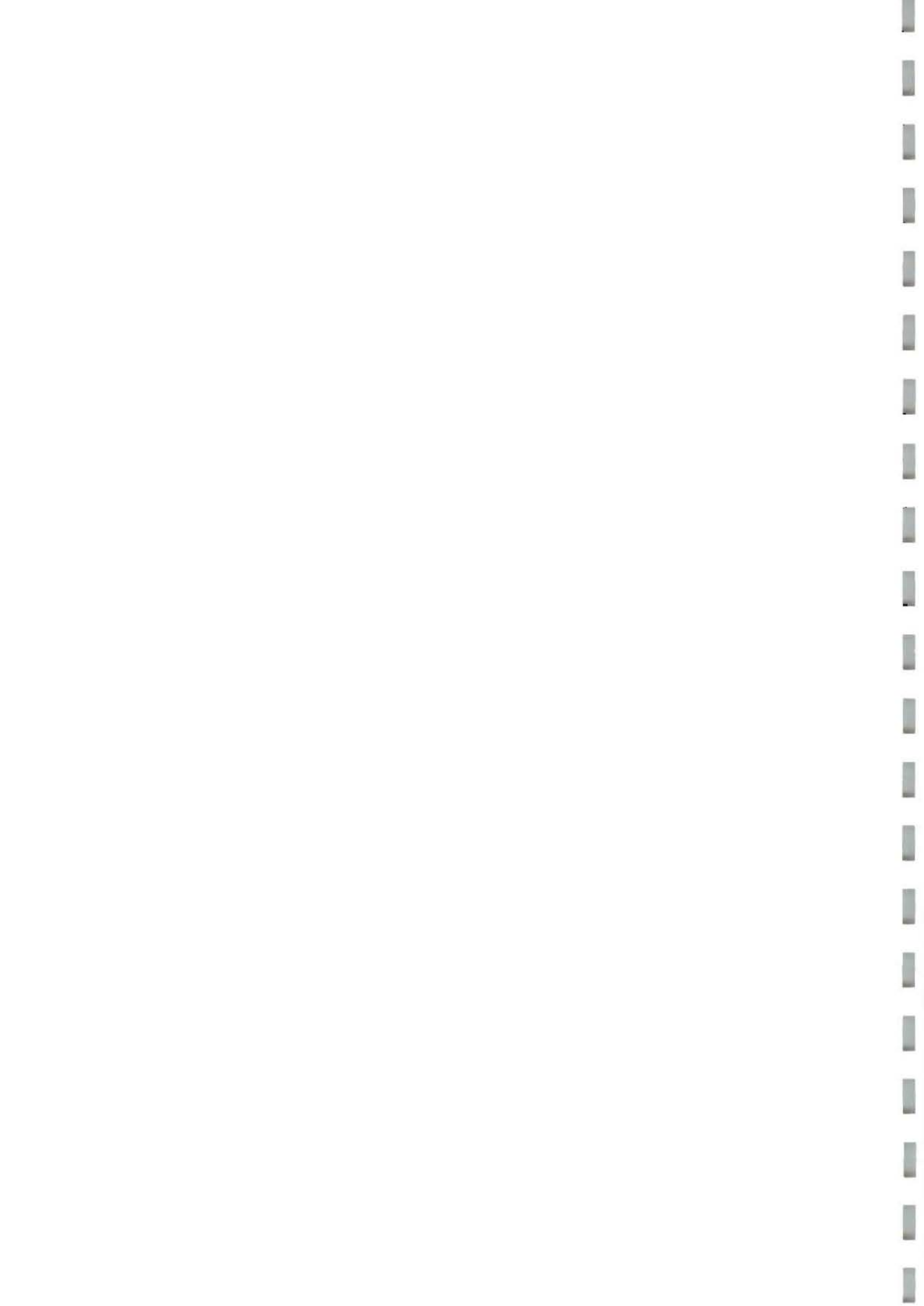
Les techniques de biologie moléculaire développées ces dernières années (PCR/RFLP, RAPD) ont permis de s'affranchir de ces difficultés en associant des critères génétiques aux caractéristiques morphologiques (Gardes et Bruns, 1996). Ainsi,



grâce à ces techniques, il est possible d'identifier le champignon d'une ectomycorhize au niveau intraspécifique. Elles sont assez simples et de plus en plus utilisées pour l'étude de la diversité génétique des communautés et des populations fongiques d'un écosystème et au suivi de souches introduites en pépinière et au champ (Henrion *et al*, 1994 ; Gardes et Bruns, 1996 ; Di Battista, 1997 ; Sélosse *et al*, 1998a ; Gryta *et al*, 1997).

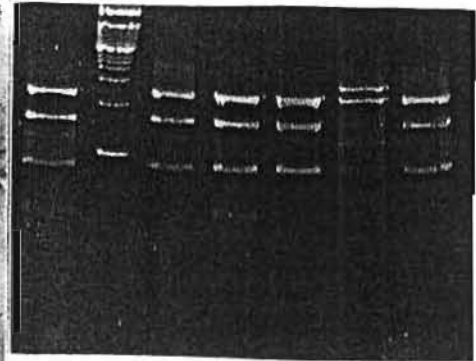
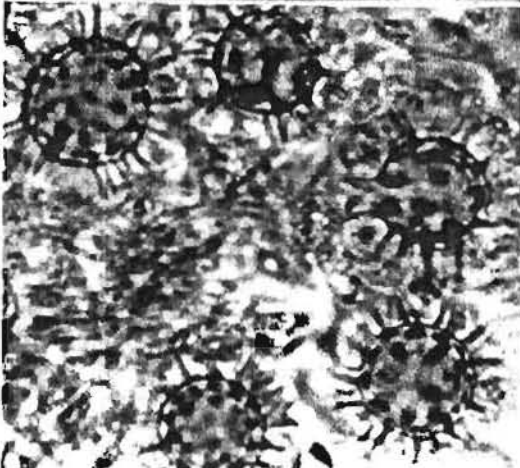
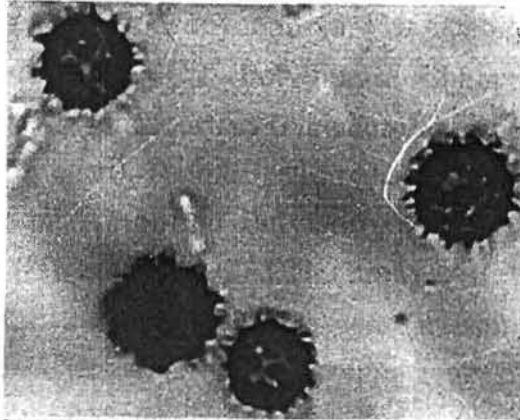
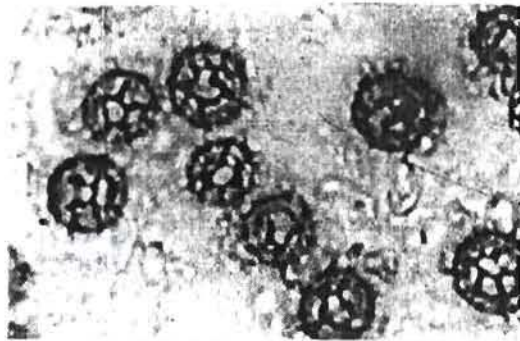
Dans le chapitre suivant, les techniques de PCR/RFLP sont appliquées pour identifier les mycorhizes de sclérodermes parmi les symbioses formées sur les racines des plantules piégés. Compte-tenu des caractéristiques morphologiques des mycorhizes de sclérodermes décrites plus haut, l'accent est mis sur les morphotypes blancs qui pourraient être formés par les sclérodermes.

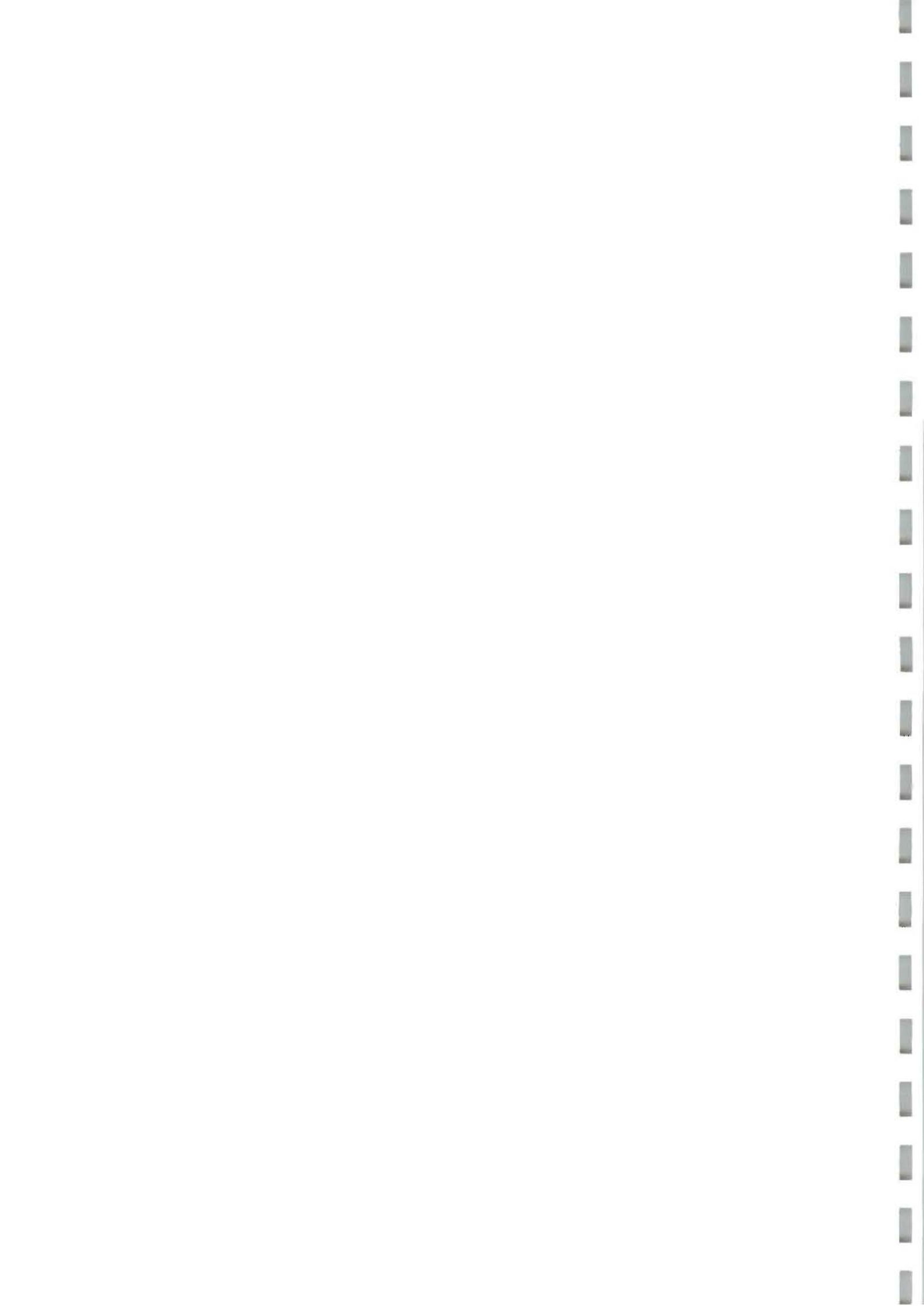




*Chapitre IV.*

*Etude de la diversité génétique des sclérodermes et  
identification des champignons associés à  
A. africana.*





#### 4.1. Introduction

Des différences inter- et intraspécifiques dans la capacité mycorhizogène ou la stimulation de croissance des plantes-hôtes ont été mises en évidence chez les champignons ectomycorhiziens au cours de différents travaux réalisés en laboratoire, en pépinière et au champ (Malajczuk *et al.*, 1990 ; Lei *et al.*, 1990 ; Le Tacon *et al.*, 1992 ; Thomson *et al.*, 1994). Afin de vérifier si le gain de croissance des plantes-hôtes résulte des symbiotes inoculés, il est indispensable d'apprécier la persistance de ceux-ci. En absence de fructification, l'étude de la persistance du mycosymbiote implique qu'il soit possible de l'identifier à partir des mycorhizes formées *in situ*. Pourtant, l'identification des champignons ectomycorhiziens sur les racines est assez délicate, ceci étant dû à des caractéristiques morphologiques et structurales semblables (chapitre III) (Agerer, 1987 ; Harley and Smith, 1983 ; Gardes *et al.*, 1991b). Nous avons également souligné dans le chapitre précédent la difficulté d'identifier la souche fongique au niveau des mycorhizes d'*A. africana* par des critères anatomiques et morphologiques. Pour remédier à ces difficultés, les techniques de biologie moléculaire sont de plus en plus utilisées pour permettre l'identification de champignons ectomycorhiziens à partir de carpophores, de mycélium en culture et de mycorhizes. Ces techniques sont entre autres l'amplification génique *in vitro*, ou PCR (Polymerase Chain Reaction), suivie de l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP, Restriction Fragments Length Polymorphism), l'amplification aléatoire de segments de l'ADN génomique ou RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et le séquençage des espaceurs intergéniques (ITS et IGS) de l'ADNr (Bruns *et al.*, 1998 ; Horton et Bruns, 1998, Martin *et al.*, 1998b). Elles reposent sur la comparaison de profils RFLP ou de séquences nucléotidiques d'un échantillon inconnu avec ceux d'un échantillon de référence taxonomiquement défini.

Un de nos objectifs étant la sélection de souches de Sclérodermes efficaces pour la croissance d'*A. africana* en pépinière, avec à court terme une étude de la compétitivité de la souche introduite après plantation, il était important :

1. de caractériser moléculairement les différentes espèces de Sclérodermes récoltées au Burkina Faso et d'évaluer leur diversité génétique inter- et intraspécifique,
2. de définir la filiation taxonomique des espèces morphologiques indéfinies, *Scleroderma* sp1, *Scleroderma* sp2 et *Scleroderma* sp5, et

**Tableau 4.1.** Liste des différents isolats et carpophores de Sclérodernes étudiés avec les sites expérimentaux d'origine, les plantes associées et leur appartenance taxonomique.

N° échantillons	Espèces	Année de récolte	Site	Plante-hôte
<b>Carpophores</b>				
Sd1	<i>Scleroderma dictyosporum</i>	1997	IV	<i>A. africana</i>
Sd2	"	1997	VII	<i>A. africana</i>
Sd3	"	1997	IX	<i>I. doka</i> & <i>I. dalziellii</i>
Sd4	"	1997	X	<i>U. guineensis</i>
Sd5	"	1997	XII	<i>I. doka</i>
Sd6	"	1997	XIII	<i>M. kerstingii</i> & <i>I. dalziellii</i>
Sd7	"	1997	II	<i>M. kerstingii</i>
Sd8	"	1997	XIII	<i>M. kerstingii</i> & <i>I. dalziellii</i>
<b>Mycélium</b>				
Sd109	<i>Scleroderma dictyosporum</i>	1994	IV	<i>A. africana</i>
Sd215	"	1994	I	<i>I. doka</i> & <i>I. dalziellii</i>
Sd250	"	1996	VIII	<i>I. doka</i>
Sd412	"	1996	X	<i>U. guineensis</i>
Sd602	"	1996	XIII	<i>M. kerstingii</i> & <i>I. dalziellii</i>
Sd7731	"	1989	Sénégal	<i>A. africana</i>
<b>Carpophores</b>				
Sv1	<i>Scleroderma verrucosum</i>	1997	V	<i>M. kerstingii</i>
Sv2	"	1997	VI	<i>U. guineensis</i>
Sv3	"	1997	VIII	<i>I. doka</i>
Sv4	"	1997	IX	<i>I. doka</i> & <i>I. dalziellii</i>
Sv5	"	1997	X	<i>U. guineensis</i>
Sv6	"	1997	XII	<i>I. doka</i>
Sv7	"	1997	XIII	<i>M. kerstingii</i> & <i>I. dalziellii</i>
<b>Mycélium</b>				
Sv256	<i>Scleroderma verrucosum</i>	1996	IX	<i>I. doka</i> & <i>I. dalziellii</i>
Sv500	"	1994	XI	<i>U. somon</i>
Sv600	"	1996	XIII	<i>M. kerstingii</i> & <i>I. dalziellii</i>
<b>Carpophore</b>				
Ssp1	<i>Scleroderma</i> sp1	1997	III	<i>U. guineensis</i>
<b>Mycélium</b>				
Ssp1-406	<i>Scleroderma</i> sp1	1994	III	<i>U. guineensis</i>
Ssp1-409	"	1995	III	<i>U. guineensis</i>
Ssp1-410	"	1996	III	<i>U. guineensis</i>
Ssp1-414	"	1996	III	<i>U. guineensis</i>
<b>Mycélium</b>				
Ssp2-100	<i>Scleroderma</i> sp2	1994	IV	<i>A. africana</i>
Ssp2-408	"	1995	III	<i>U. guineensis</i>
Ssp2-510	"	1996	XI	<i>U. somon</i>
<b>Mycélium</b>				
Ssp3-252	<i>Scleroderma</i> sp3	1996	XII	<i>I. doka</i>
<b>Mycélium</b>				
Ssp5-605	<i>Scleroderma</i> sp5	1993	I	<i>I. doka</i> & <i>I. dalziellii</i>
ORSXM002	nd	1989	Sénégal	<i>A. africana</i>

Dans ce tableau, l'initial IR des isolats en culture a été remplacé par sd, sv, ssp1, ssp2, ssp3 ou ssp5 permettant de les identifier respectivement aux espèces *S. dictyosporum*, *S. verrucosum*, *Scleroderma* sp1, *Scleroderma* sp2, *Scleroderma* sp3 et *Scleroderma* sp5. Cette dénomination est uniquement utilisée pour ce chapitre.  
nd = non déterminé

3. d'identifier les champignons précoces, dont les Sclérodermes, impliqués dans les mycorhizes obtenues en pépinière sur les sols provenant de sites expérimentaux.

Nous avons ainsi utilisé trois techniques de diagnostic : la PCR/RFLP, le séquençage des régions intergéniques de l'ADN ribosomique (ITS et IGS1) et la RAPD.

## **4.2. Matériels et méthodes**

### **4.2.1. Les souches fongiques**

L'étude de la diversité inter- et intraspécifique a été réalisée sur 17 isolats de Sclérodermes obtenus au cours de cette étude (chapitre II) et deux autres isolats dont un *S. dictyosporum* (ORS7731) et un isolat indéterminé (ORSXM002) provenant du Sud du Sénégal (tableau 4.1). Afin d'élargir l'échantillonnage des Sclérodermes en culture, des carpophores ont également été récoltés sur les sites expérimentaux en 1997 (tableau 4.1). L'appartenance taxonomique des différents Sclérodermes a été déterminée initialement à partir des caractéristiques morphologiques des carpophores et des spores.

Au cours de notre expérience de piégeage de souches fongiques sur plantules cultivées sur le sol provenant des différents sites expérimentaux (chapitre III), nous avons identifié trois morphotypes principaux de mycorhizes (tableau 4.2). Dans ce chapitre, les espèces fongiques ayant formé ces mycorhizes sont comparées aux différents isolats fongiques, taxonomiquement définis, provenant de carpophores.

Les isolats fongiques sont maintenus en culture sur milieu gélosé MNM à 25-30°C depuis leur isolement. Quant aux mycorhizes et carpophores, ils ont été conservés dans un mélange de glycérol/eau/éthanol (30 : 40 : 30, v/v/v) à 4°C.

### **4.2.2. Extraction de l'ADN total**

Notre étude portant sur du matériel très peu utilisé en analyse moléculaire (carpophores de Sclérodermes) ou pas du tout (mycorhizes d'*Afzelia africana*), nous avons initialement testé et optimisé différents protocoles d'extraction d'ADN sur chaque type de matériel afin d'obtenir le rendement d'extraction d'ADN le plus élevé et un ADN apte à être amplifié par PCR.

**Tableau 4.2.** Liste des différents morphotypes mycorhiziens obtenus par piégeage sur les plantules d'*A. africana*

Morphotypes de mycorhizes /code sur les gels	Origine du sol utilisé en pépinière et plante-hôte
Mycorhizes blanches	
BL11	<i>U. somon</i> (site XI)
BL12	<i>I. doka</i> (site XII)
BL9	<i>I. doka</i> & <i>I. dalziellii</i> (site IX)
BL10	<i>U. guineensis</i> (site X)
BL7	<i>A. africana</i> (site VII)
Mycorhizes beiges	
BE12	<i>I. doka</i> (site XII)
Mycorhizes brunes	
BR10	<i>U. guineensis</i> (site X)
BR2	<i>M. kerstingii</i> (site II)
BR11	<i>U. somon</i> (site XI)
BR8	<i>I. doka</i> (site VIII)
BR3	<i>U. guineensis</i> (site III)

#### 4.2.2.1. Extraction à partir de cultures mycéliennes

Pour l'extraction de l'ADN total à partir de mycélium, nous avons utilisé la méthode CTAB 2 (Hexadecyltrimethylammonium bromide) décrite par Henrion *et al* (1994b) modifiée par Di Battista (1997). Le protocole est le suivant :

1. Environ 10 mg de mycélium sont prélevés à partir des cultures sur milieu gélosé MNM et broyés en présence de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) insoluble à l'aide d'un piston en plastique dans un tube à microcentrifuger. Le broyât est mis en suspension dans 650  $\mu$ l de tampon d'extraction (100 mM Tris HCl pH 9,0 ; 20 mM EDTA pH 8 ; 1,4 M NaCl ; 2% CTAB, 0,2%  $\beta$ -mercaptoéthanol) contenant 0,2 mg de protéinase K (Bioprobe PROK02). Le mélange est ensuite incubé à 65°C pendant 1 heure.

2. Après cette incubation, les échantillons sont centrifugés à 14 000g pendant 1 à 2 min et le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un autre tube. Ce surnageant est déprotéinisé par addition de 600  $\mu$ l d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24 : 24 : 1, v/v/v). Le mélange est agité pendant 15 sec sur un agitateur de tubes (Bioblock) et centrifugé 15 min à 14 000g.

3. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube et additionnée de 600  $\mu$ l de chloroforme afin d'éliminer les traces de phénol résiduel. Le mélange est de nouveau agité et centrifugé à 14 000g pendant 10 min.

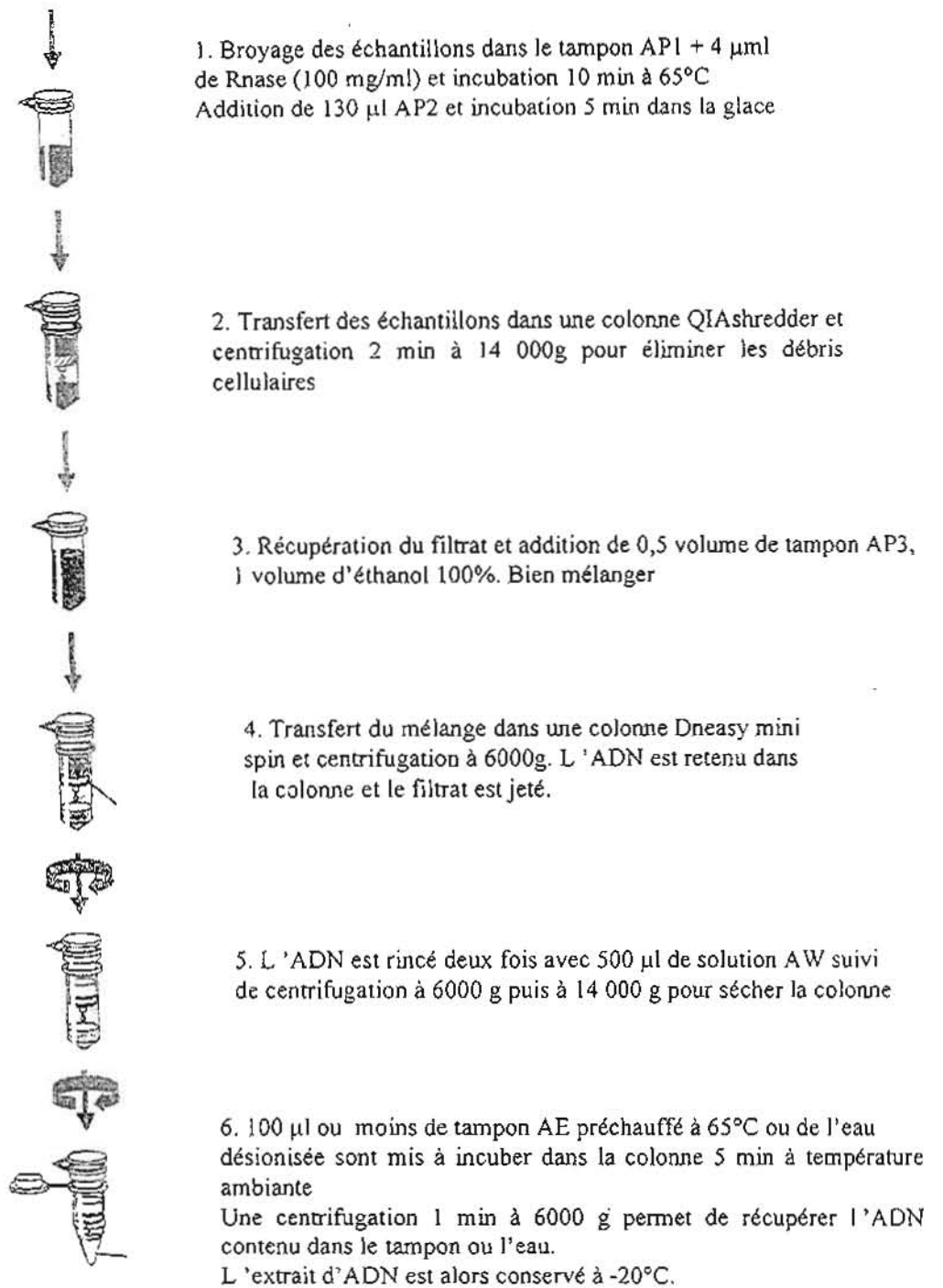
4. La phase aqueuse est prélevée et l'ADN est précipité par addition de 900  $\mu$ l d'isopropanol et incubation à -20°C pendant au moins 1 heure.

5. Après centrifugation à 14 000g pendant 30 min, le surnageant est éliminé et le précipité contenant l'ADN est rincé trois fois à l'éthanol 70% (v/v) par centrifugations successives. Le culot est séché une dizaine de minutes à l'air afin d'éliminer les traces d'alcool. Le culot est alors suspendu dans 50  $\mu$ l d'eau déionisée stérile et incubé pendant 5 min à 65°C afin de faciliter la solubilisation de l'ADN.

Cette solution d'ADN est conservée à 4°C sur de courtes périodes (quelques jours) ou à -20°C pour une plus longue durée. Les réactions de PCR s'effectuent sur des solutions diluées (1 : 25) d'ADN.

Si nécessaire, une étape supplémentaire de précipitation des polyphénols dans du PEG (Polyéthylène glycol) permet de purifier les extraits fortement colorés. 32  $\mu$ l de la solution d'ADN sont alors additionnés de 8  $\mu$ l d'acétate de sodium 5 M et de 40  $\mu$ l de PEG (13%, p/v). Après incubation dans la glace pendant 30 min, le mélange est centrifugé à 14 000 g pendant 30 min. Le culot est récupéré et rincé trois fois à l'éthanol 70% (v/v) par centrifugations successives, puis repris dans 50  $\mu$ l d'eau désionisée.





**Figure 4.1.** Schéma d'extraction de l'ADN à l'aide du kit DNeasy de Qiagen

#### 4.2.2.2. Extraction à partir de mycorhizes et de carpophores

L'extraction à partir de mycorhizes et de carpophores est effectuée selon la méthode décrite par Grube *et al* (1995) modifiée Martin *et al* (1998a). L'extraction est réalisée sur 10 mg de fragments de carpophores, débarrassés des spores, ou sur une seule racine mycorhizée.

1. Les échantillons sont broyés à l'aide d'un piston en plastique dans un tube à microcentrifuger et le broyât est mis en suspension dans 300 µl de tampon thiocyanate de guanidine préparé selon Maniatis *et al* (1982) (cf. annexe 2). La suspension est incubée à 65°C pendant environ 1 heure. Après avoir éliminé les protéines de l'extrait (cf. étapes 2 et 3 protocole CTAB 2, paragraphe 4.2.2.1), l'ADN est précipité dans de l'iodure de sodium (NaI, 6 M) additionné de 5 µl de billes de silice (Glassmilk, GeneCleanII, Bio 101, La Jolla, CA 1001-400), dans de la glace pendant 10 min à toute une nuit.

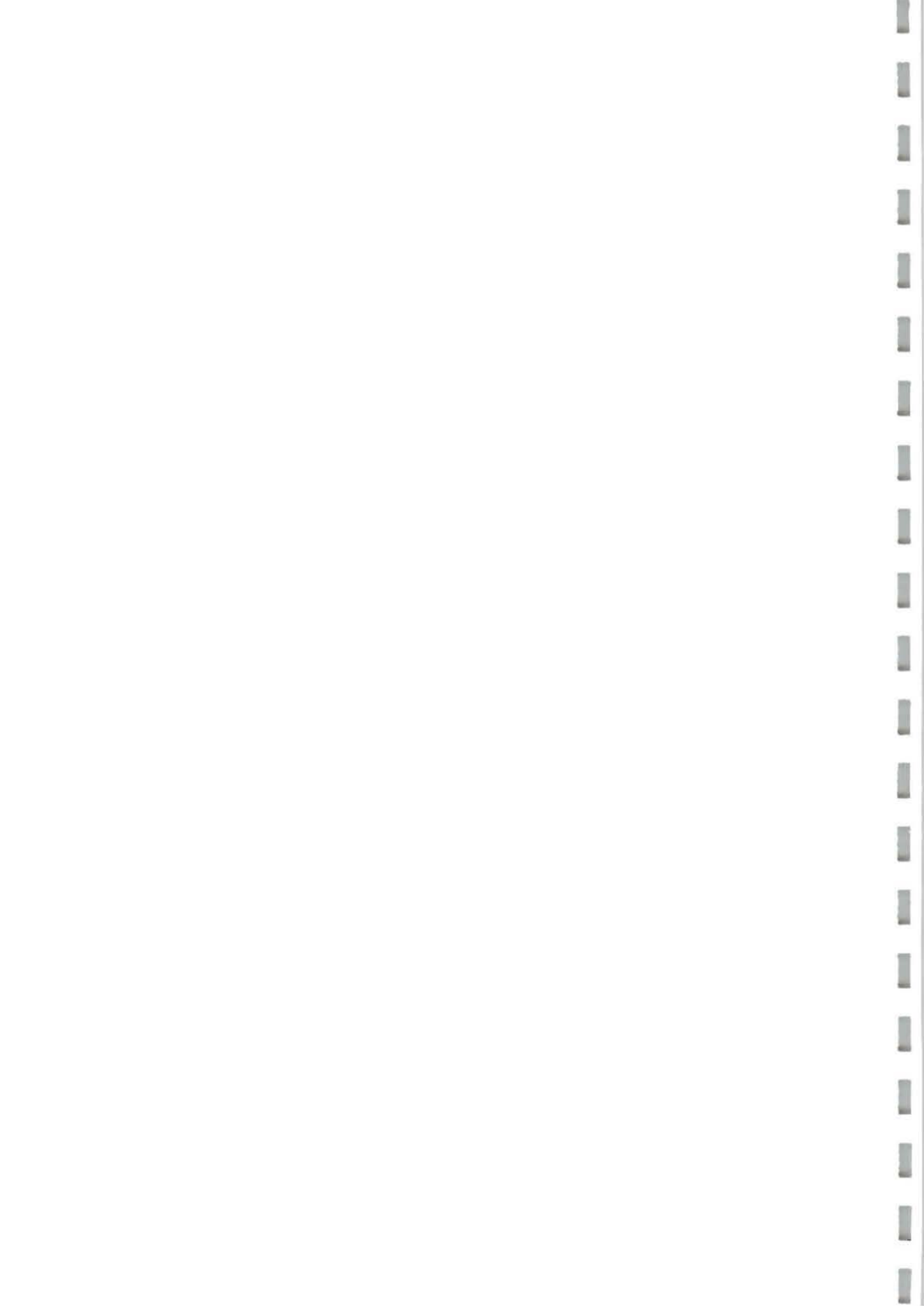
2. Les tubes sont ensuite centrifugés 1 min à 14 000g et le surnageant éliminé. Le culot contenant l'ADN lié aux billes de silice est rincé deux fois avec 300 µl d'éthanol 80% (conservé à -20°C), puis séché.

3. Le culot de billes est ensuite suspendu dans de l'eau désionisée (MilliQ, Millipore). Les tubes sont centrifugés 1 min à 14 000g et le surnageant contenant l'ADN, élué des billes, est récupéré. Cet extrait est dilué 10 fois (1 : 10) et utilisé pour la PCR.

A plusieurs reprises, l'ADN des mycorhizes et des carpophores, extrait à l'aide de ces deux protocoles, était contaminé par des composés inhibant l'amplification PCR. Nous avons alors employé le Kit de purification d'ADN DNeasy de Qiagen (fig. 4.1). Plus coûteux, il est généralement plus efficace dans l'élimination des composés interférents avec la PCR.

#### 4.2.3. Amplification enzymatique *in vitro* de l'espaceur interne transcrit (ITS) et l'espaceur intergénique (IGS1) de l'ADNr nucléaire

Les régions ITS et IGS1 de l'ADN ribosomal nucléaire ont été amplifiées à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques des champignons ITS1/ITS4 et 5SA/CNL12 (White *et al*, 1990 ; Henrion *et al*, 1992) (tableau 4.3). Pour la réaction de PCR, 25 µl d'ADN dilué dans l'eau désionisée sont mélangés avec 25 µl du milieu réactionnel (Appligène-Oncor) (tableau 4.4). La réaction s'effectue dans un cycleur Thermojet (EUROGENTEC, St Quentin/Yvelines) ou GeneAmp 9600 (PERKIN ELMER, St Quentin/Yvelines). Lorsque le cycleur Thermojet est utilisé, le mélange est recouvert d'une goutte d'huile minérale (Sigma) afin d'éviter l'évaporation aux fortes températures.



La durée et la température des différentes étapes d'amplification sont : dénaturation initiale de l'ADN, 3 min à 95°C, suivie de 25 à 30 cycles de dénaturation (1 min à 95°C), fixation des amorces (30 sec à 50°C) et polymérisation (2 min à 72°C) et enfin une étape de polymérisation finale de 10 min à 72°C. Chaque série d'amplification inclue une solution témoin sans ADN fongique afin de détecter d'éventuels contaminants dans les tampons et réactifs.

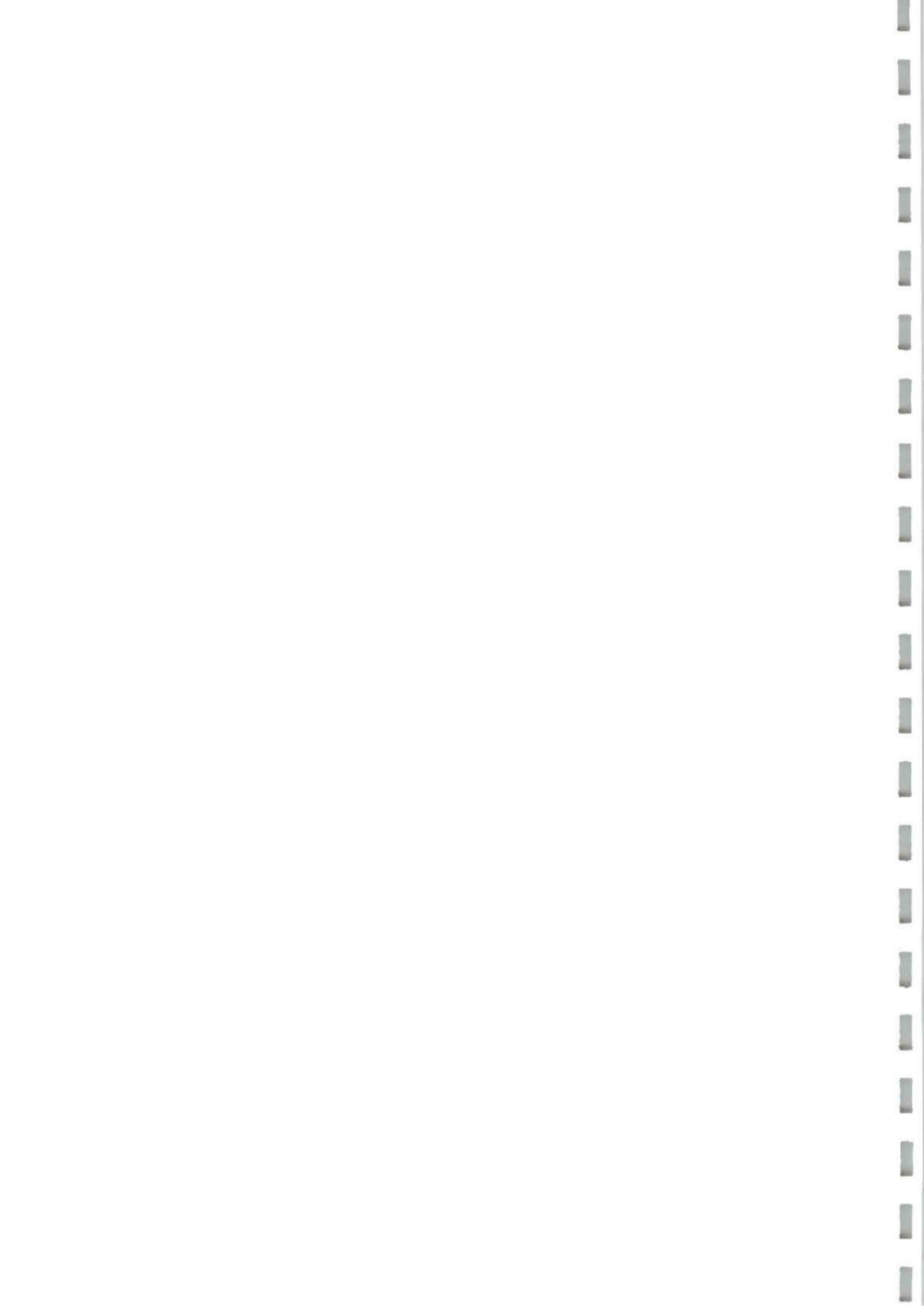
**Tableau 4.3.** Séquences des amorces nucléotidiques ITS1/ITS4 et SSA/CNL12 utilisées pour l'amplification de l'ITS et l'IGS1.

Amorces	Séquences (5' à 3')	Cibles
ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	région ITS
SSA CNL12	CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT GACTGAATCTCCGCAAGTC	région IGS1

**Tableau 4.4.** Composition du mélange réactionnel utilisé pour la PCR dirigée de l'ITS et de l'IGS1 et en RAPD

Milieu	Volume ( $\mu$ l)	Concentration finale
Tampon réactionnel 10 x Appligène	5	1x (100 mM KCl; EDTA 0,1 mM 20 mM Tris-Hcl pH 8 ; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1% triton X-100; 0,2 mg/ml gélatine)
dXTP Quantum Bioprobe (10 mM)	1	200 $\mu$ M
Amorce 1	0,1	10 mM
Amorce 2	0,1	10 mM
Taq Polymérase Appligène (5 u/ $\mu$ l)	0,1	0,05 unité
Eau	qsp 25	-
Solution d'ADN	25	-

A la fin de la réaction, les amplifiats sont déposés sur un gel d'agarose (1%, p/v) (Sambrook *et al.*, 1989). Dix  $\mu$ l d'amplifiats sont mélangés avec 2  $\mu$ l de tampon de charge (bleu de bromophénol 10 mg ; glycérol 87% (v/v), 2,8 ml ; EDTA 0,5M, 2 ml ; xylène cyanol FF 10 mg ; eau désionisée, qsp 5 ml) et le mélange est déposé dans les puits d'un gel horizontal d'agarose placé dans une cuve d'électrophorèse Midi Sub Cell (Bio-Rad). La migration s'effectue à 8V/cm pendant 90 min dans du TBE 1x (Tris base, 108 g ; acide borique, 55 g ; EDTA 0,5 M (pH 8), 40 ml ; eau désionisée qsp 1 l pour un tampon 10x). Un marqueur de masse moléculaire (100 pb DNA ladder, GIBCO BRL) migre



dans une piste parallèle à celles des échantillons afin de déterminer la longueur des amplifiats.

Après migration, les gels sont incubés dans du bromure d'éthidium (BET) pendant 5 à 10 min afin de colorer l'ADN. Le BET s'intercale entre les bases d'ADN et permet d'observer les fragments d'ADN par fluorescence sur un transilluminateur UV (254 nm). Les gels sont ensuite incubés 10 à 15 min dans de l'eau désionisée afin d'éliminer l'excès de BET, puis des photos sont prises à l'aide d'un système vidéo (Bioprobe System) comprenant une caméra Hitachi, une unité de numérisation Polaroid et une imprimante thermique.

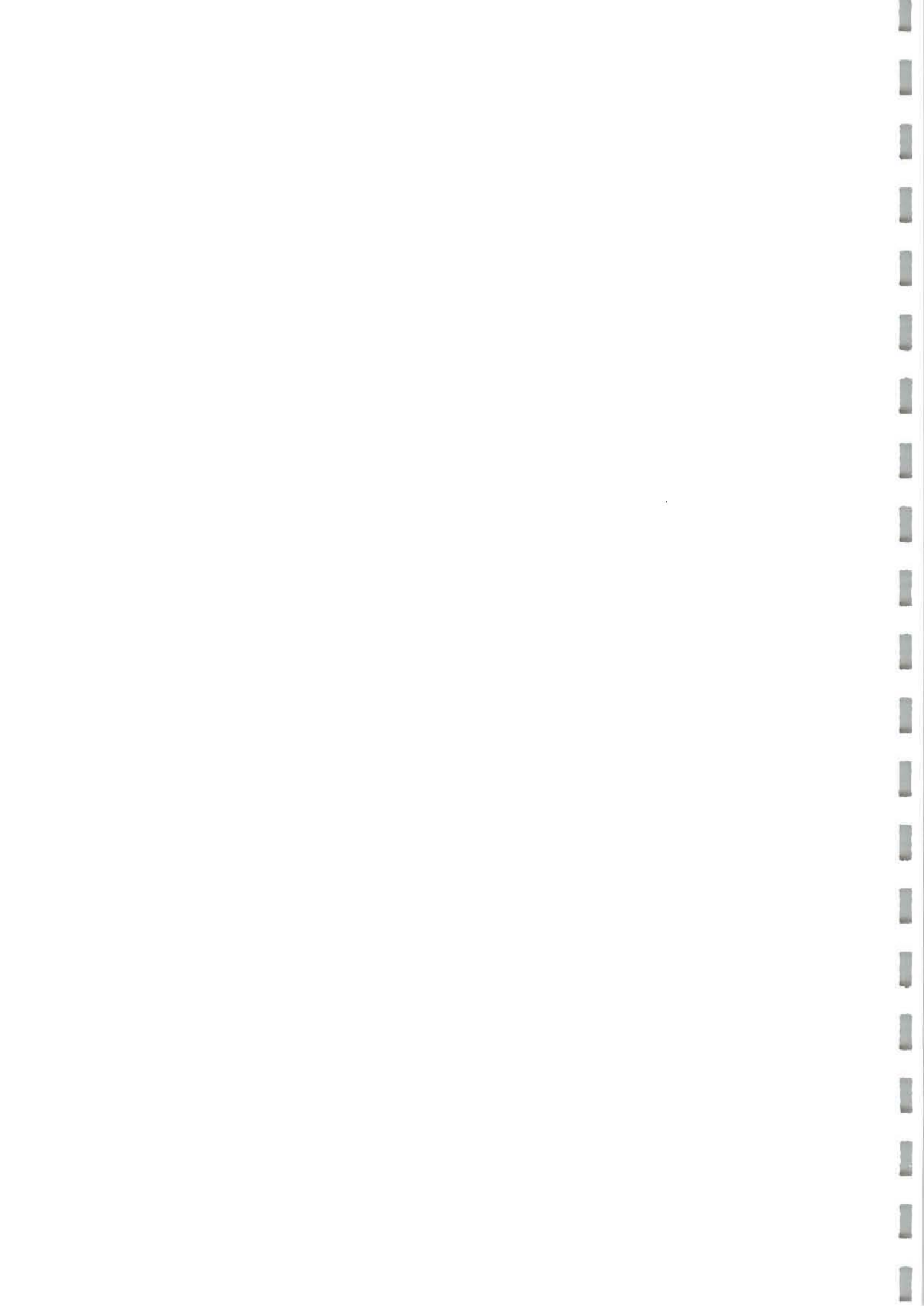
#### 4.2.4. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ITS et l'IGS1 ribosomaux

Afin de révéler la présence éventuelle d'un polymorphisme de séquence dans les régions ITS et IGS1, les amplifiats (20 µl) correspondants sont digérés toute la nuit à 37°C avec 2,5 unités d'enzymes de restriction, *Hinf*I (Biolabs) et *Mbo*I (Promega) selon les instructions du fournisseur. Les fragments de restriction sont séparés sur des gels verticaux d'acrylamide composés d'un gel de concentration (3%) et d'un gel de séparation (8% ou 15%) (tableau 4.5). Ce type de gel possède une résolution supérieure au gel d'agarose et permet de séparer avec une bonne résolution les fragments de longueur inférieure à 100 pb. La migration s'effectue à 4,5 mA/cm pendant 75 min dans des cuves d'électrophorèse Protean II (Bio-Rad) contenant du TBE 1x. Le marqueur de masse moléculaire (100 pb) est mis à migrer à une des extrémités de chaque gel. Les fragments d'ADN sont colorés au BET et observés comme décrit ci-dessus (paragraphe 4.2.3).

**Tableau 4.5.** Composition des gels d'acrylamide utilisés pour la séparation des fragments d'ADN après RFLP ou RAPD

Composants	Gel de séparation (8%)	Gel de concentration (3,5%)
Acrylamide/Bisacrylamide 30% (p/v), 29:1	1,33 ml	0,29 ml
TBE 10x	0,5ml	-
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	-	0,5 ml
Eau ultrapure	3,135 ml	1,693 ml
APS (ammonium persulfate) 10% (p/v)	50 µl	37,5 µl
TEMED	5 µl	5 µl

3,5 ml du gel de séparation sont coulés entre les plaques en verre, compléter par 1,5 ml de gel de concentration.



#### 4.2.5. Séquençage de l'ITS

Les produits d'amplification correspondant à l'ITS de différents isolats de Sclérodermes sont purifiés par précipitation à l'acétate d'ammonium 10 M afin d'éliminer les amorces oligonucléotidiques (Martin et Voiblet, 1998). Les deux brins d'ADN sont séquencés à l'aide des amorces ITS1/ITS4 et du kit Big Dye Terminator (PE ABI). Les fragments d'ADN, issus de la réaction de séquençage, sont séparés sur une colonne capillaire (57 cm x 100 µm) placée dans le séquenceur automatique GenoTyper ABI 310 (PE ABI). Les séquences lues par le logiciel "Sequence Analysis" (PE ABI) sont éditées et corrigées à l'aide du logiciel Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MT). Les alignements de séquences sont réalisés à l'aide des logiciels MultAlin (Corpet, 1988) et ClustalW 1.74 (Thompson *et al*, 1994) installés respectivement sur les serveurs Web ProDom (INRA-Toulouse) et IBPC (Lyon, France), puis comparées afin de déterminer les pourcentages de similarité. La recherche de similarité avec d'autres séquences de champignons ectomycorhiziens est effectuée par comparaison aux séquences répertoriées dans la base de données d'ADN (NCBI GenBank) à l'aide du logiciel Blast 2.0 du site Web du NCBI (Altschul *et al*, 1997).

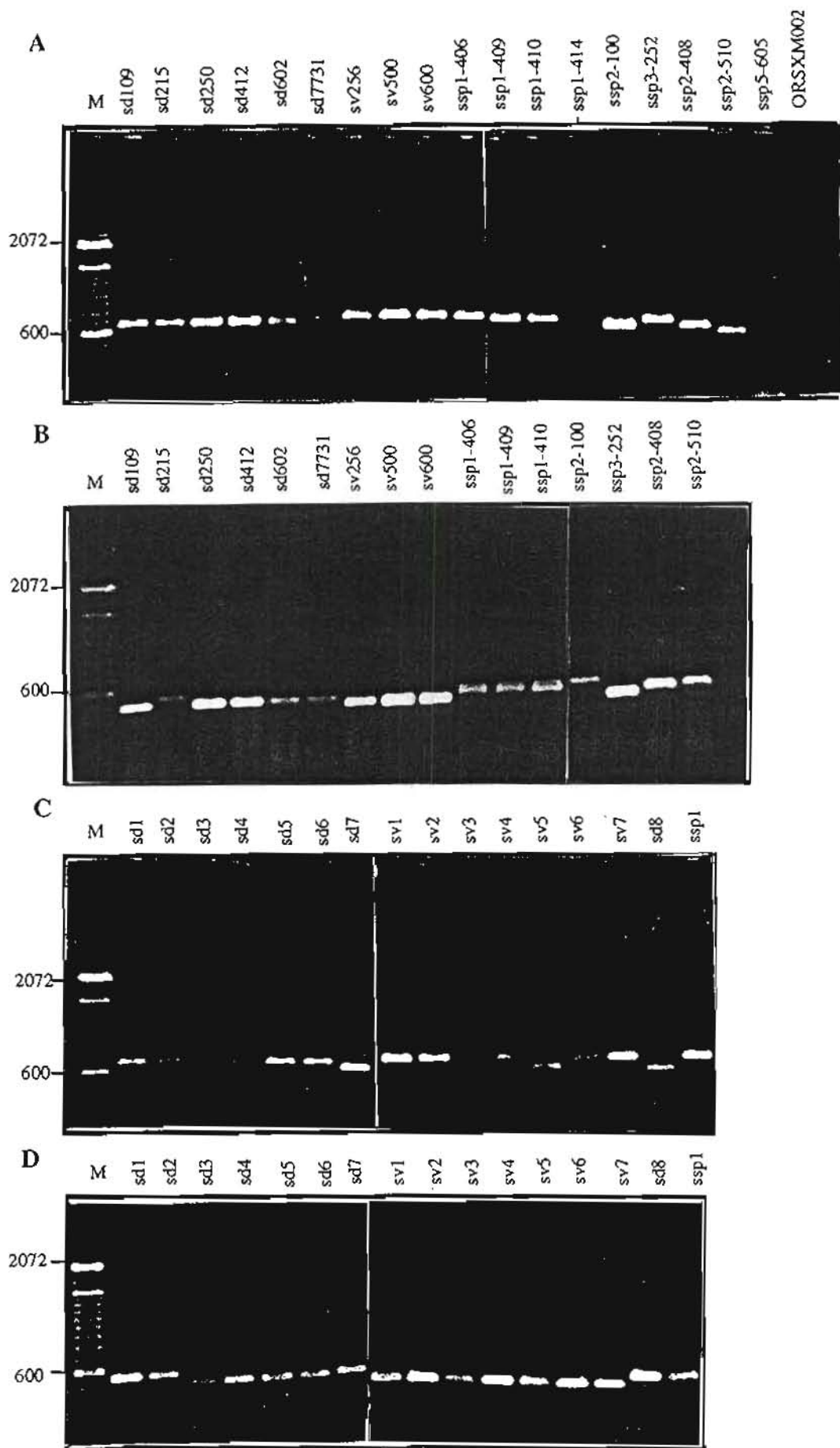
#### 4.2.6. Analyse de parcimonie

Différents algorithmes de calculs, tous basés sur la recherche de l'arbre le plus court permettant d'établir les relations phylogénétiques entre isolats étudiés à partir des séquences ITS alignées par MultAlin et ClustalW, ont été utilisés. Il s'agit des algorithmes exacts et des algorithmes heuristiques, méthode de réarrangement des branches ou "Branch Swapping" du programme PAUP 3.1. Ces algorithmes génèrent des arbres assez voisins pour les Sclérodermes étudiés parmi lesquels nous avons retenu celui de la méthode heuristique

#### 4.2.7. Analyse du polymorphisme de l'ADN par RAPD

Pour l'étude du polymorphisme de l'ADN génomique par RAPD, nous avons utilisé les amorces 152C (5'CGCACCGCAC3') et 174 (5'AACGGGCAGC3'). Afin d'améliorer la reproductibilité des amplifications, Sélosse *et al* (1998a) recommandent la réalisation de la RAPD dans les conditions utilisées pour la PCR dirigée, en particulier une température d'hybridation des amorces de 50°C. La réaction d'amplification se déroule donc dans les conditions décrites au paragraphe 4.2.3. Le mélange réactionnel est composé du tampon de réaction Appligène-Oncor (20 mM Tris-HCl, pH 9 ; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ; 100 mM KCl ;





**Figure 4.2A - D.** Variabilité inter- et intraspécifique de l'ITS (A) et de l'IGS1 (B) amplifiés des isolats en culture de sclérodermes (récolte 1994-1996), de l'ITS (C) et l'IGS1 (D) de carpophores (récolte 1997). M = marqueur de masse moléculaire (échelle de 100 pb). Gels d'agarose (1%)

1% Triton X-100), 0,2 mM de chaque dNTP, 1-2 ng/μl d'ADN et 0,06 unités de *Taq* DNA polymérase. Les fragments d'ADN sont séparés sur gel d'acrylamide comme décrit dans le paragraphe 4.2.4 (tableau 4.5).

### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Variabilité génétique inter- et intraspécifique des Sclérodermes

##### 4.3.1.1. Analyse du polymorphisme de longueur des régions ribosomiques ITS et IGS1

Afin d'apprécier la variabilité génétique inter- et intraspécifique des Sclérodermes, nous avons étudié le polymorphisme des régions intergéniques ITS et IGS1 des différents isolats et carpophores. Ces séquences ribosomiques ont été amplifiées à l'aide des amorces PCR ITS1/ITS4 et CNL12/5SA (tableau 4.3). L'analyse des produits d'amplification de l'ITS et de l'IGS1 révèle l'existence d'une variabilité inter-, mais aussi intraspécifique, au sein des isolats et carpophores étudiés (fig. 4.2A-D, tableau 4.6). En effet, on note un polymorphisme de la longueur de l'ITS entre les différentes espèces et également au sein d'une même espèce. Ainsi, la longueur de l'ITS des isolats, la plupart des carpophores de *S. verrucosum* (sv256, sv500, sv600, sv1, sv2, sv3, sv4 et sv6) et de l'isolat *Scleroderma* sp3 (ssp3-252) est plus grande (760 pb) que celle des *S. dictyosporum* sd109, sd250, sd412, sd602, sd7731, sd1, sd2, sd3, sd4, sd5 et sd6 (670 pb) et sd7, sd8 (590 pb). Par contre, les 3 isolats de *Scleroderma* sp1 (ssp1-406, ssp1-409 et ssp1-410) et le carpophore ssp1 présentent un ITS de longueur identique à celle de l'ITS des *S. verrucosum*. D'autres isolats et carpophores, supposés appartenir à la même espèce, présentent des ITS de longueur différente. C'est le cas des isolats ssp1-414 de *Scleroderma* sp1 (590 pb), ssp2-510 (590 pb) et ssp2-408 (670 pb) de *Scleroderma* sp2 et le carpophore sv5 (620 pb). L'ITS de *Scleroderma* ssp5-605 a la même longueur que celui des isolats de *S. verrucosum* (760 pb). L'isolat indéterminé ORSXM002 et *S. dictyosporum* sd7731 du Sénégal présentent un ITS de même longueur que les isolats et carpophores de *S. dictyosporum* (670 pb).

Inversement, la longueur de l'IGS1 des isolats et carpophores de *S. verrucosum* (440) est inférieure à celle des *S. dictyosporum* (470, 500 et 550 pb). Les espèces identifiées à *Scleroderma* sp1 (ssp1-406, ssp1-409, ssp1-410 et ssp1) ont des IGS1 de longueur identique à celle des *S. dictyosporum* (470 pb). L'IGS1 de l'isolat ssp1-414 a une taille identique à celle des autres isolats de même espèce (*Scleroderma* sp1) (résultat

**Tableau 4.6.** Longueur des régions ITS et IGS amplifiées des isolats et carpophores de Sclérodermes.

Isolats et carpophores	Longueur ITS (pb)	Longueur IGS (pb)
<i>Scleroderma dictyosporum</i>		
Sd109	670	470
Sd215	670	530
Sd250	670	470
Sd412	670	470
Sd602	670	470
Sd7731	670	470
Sd1	670	550
Sd2	670	550
Sd3	670	470
Sd4	670	470
Sd5	670	470
Sd6	670	470
Sd7	590	500
Sd8	590	500
<i>Scleroderma verrucosum</i>		
Sv256	760	440
Sv500	760	440
Sv600	760	440
Sv1	760	440
Sv2	760	440
Sv3	760	440
Sv4	760	440
Sv5	620	440
Sv6	760	440
Sv7	760	440
<i>Scleroderma</i> sp1		
Ssp1-406	760	470
Ssp1-409	760	470
Ssp1-410	760	470
Ssp1-414	590	470
Ssp1	760	470
<i>Scleroderma</i> sp2		
Ssp2-100	670	550
Ssp2-408	670	470
Ssp2-510	590	500
<i>Scleroderma</i> sp3		
Ssp3-252	760	440
<i>Scleroderma</i> sp5		
Ssp5-605	760	-
ORSXM002	670	-

non présenté sur le gel). Les isolats de *Scleroderma* sp2 ont des tailles différentes de l'IGS1, 550 pb pour ssp2-100, 500 pb pour ssp2-510 et 470 pb pour ssp2-408. *Scleroderma* sp3 (ssp3-252) présente un IGS1 de 440 pb.

Cette analyse comparative révèle donc un polymorphisme de longueur de l'ITS et de l'IGS1 au sein de cette population de *Scleroderma* du Burkina Faso. Cependant, ce polymorphisme ne permet pas d'identifier les isolats d'une même espèce et aussi des espèces différentes, telles que *S. verrucosum* et *Scleroderma* sp1 qui ne peuvent être différenciées sur ce critère.

#### 4.3.1.2. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction des régions ribosomiques ITS et IGS1

La digestion de l'ITS et de l'IGS1, amplifiés à partir des différentes souches de Sclérodermes, par les deux enzymes de restriction *Hinf*I et *Mbo*I génère plusieurs fragments de restriction (tableau 4.7 et 4.8).

##### ITS coupé par *Hinf*I et *Mbo*I

La digestion de l'ITS par *Hinf*I génère des patrons de 2 à 8 fragments selon la souche de scléroderme. Les isolats sd109, sd250, sd412, sd602, sd7731 et les carpophores sd3, sd4, sd5 et sd6 présentent un profil à 8 bandes (174, 127, 113, 87, 60, 37, 36 et 8 pb) (tableau 4.7, fig. 4.3A & B). La souche ssp2-408 présente le même profil de digestion suggérant qu'elle appartient à l'espèce *S. dictyosporum*. Trois autres profils existent au sein de ces *S. dictyosporum* dont l'un est représenté par sd215 (287 et 240 pb), le second par le profil des deux carpophores sd1 et sd2 (331, 294 et 87 pb) et le dernier par sd7 et sd8 (206, 186, 99 et 69 pb). Ces deux derniers profils s'identifient respectivement à ceux de ssp2-100 et ssp2-510 qui seraient des isolats de *S. dictyosporum*. Cependant, on note une bande supplémentaire à 149 pb pour sd8 qui résulterait de la présence de deux ITS différents du mycélium dicaryotique. Les profils de digestion *Hinf*I de l'ITS des *S. verrucosum*, sv500 et sv600 possèdent 7 bandes (fig. 4.3A & B). L'isolat ssp3-252 que nous avons identifié à *Scleroderma* sp3, présente le même profil (285, 146, 110, 66, 49, 37, 36, 25, 8 pb) et serait donc un isolat de *S. verrucosum*. Les profils obtenus avec ssp1-406, ssp1-409, ssp1-410 et ssp1 (322, 149, 110, 66, 30 et 26 pb) sont très voisins de ceux des isolats de *S. verrucosum* sv500 et sv600. Parmi les *S. verrucosum*, le carpophore sv5 présente un profil à 6 fragments (264, 114, 104, 93, 48 et 41 pb). L'isolat sv256 a un profil de digestion de l'ITS par *Hinf*I (311, 246, 93 pb) identique à celui des carpophores sv1, sv2, sv3, sv4 et sv6.

**Tableau 4.7.** Longueur des fragments de restriction obtenus après amplification et digestion par les endonucléases *HinfI* et *MboI* de la région ITS des isolats et carpophores de Sclérodermes.

Isolats et carpophores	ITS/ <i>HinfI</i>	ITS/ <i>MboI</i>	Ribotypes
<i>Scleroderma dictyosporum</i>			
Sd109	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Sd215	287, 240	218, 198, 167, 76	A
Sd250	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Sd412	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Sd602	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Sd7731	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Sd1	331, 294, 87	284, 227, 91	C
Sd2	331, 294, 87	284, 227, 91	C
Sd3	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Sd4	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Sd5	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Sd6	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Sd7	206, 186, 99,69	152, 137, 113, 106, 87	D
Sd8	206, 186, 99,69	152, 137, 113, 106, 87	D
<i>Scleroderma verrucosum</i>			
Sv256	311, 246, 93, 35, 29,24	171, 162, 153, 119, 91	A
Sv500	285, 146, 110, 66, 49, 37, 36, 25,8	254, 146, 124, 98, 77	B
Sv600	285, 146, 110, 66, 49, 37, 36, 25,8	254, 146, 124, 98, 77	B
Sv1	311, 246, 93, 35, 29, 24	171, 162, 153, 119, 91	A
Sv2	311, 246, 93, 35, 29, 24	171, 162, 153, 119, 91	A
Sv3	311, 246, 93, 35, 29, 24	171, 162, 153, 119, 91	A
Sv4	311, 246, 93, 35, 29, 24	171, 162, 153, 119, 91	A
Sv5	264, 114, 104, 93, 48, 41	208, 159, 135, 92	C
Sv6	311, 246, 93, 35, 29, 24	171, 162, 153, 119, 91	A
Sv7	311, 246, 93, 35, 29, 24	171, 162, 153, 119, 91	A
<i>Scleroderma</i> sp1			
Ssp1-406	322, 149, 110, 66, 30, 26	241, 153, 140, 119, 102	B
Ssp1-409	322, 149, 110, 66, 30, 26	241, 153, 140, 119, 102	B
Ssp1-410	322, 149, 110, 66, 30, 26	241, 153, 140, 119, 102	B
Ssp1-414	256, 179, 84, 17	315, 174, 129, 98	A
Ssp1	322, 149, 110, 66, 30, 26	241, 153, 140, 119, 102	B
<i>Scleroderma</i> sp2			
Ssp2-100	331, 294, 87	284, 227, 91	A
Ssp2-408	174,127,113,87,60,37,36,8	208, 159, 135, 119	B
Ssp2-510	206, 186, 99,69	152, 137, 113, 106, 87	C
<i>Scleroderma</i> sp3			
Ssp3-252	285, 146, 110, 66, 49, 37, 36, 25,8	254, 146, 124, 98, 77	A
<i>Scleroderma</i> sp5			
Ssp5-605	180, 138, 113, 95, 74	284, 175, 119, 96	A
ORSXM002	254, 206, 83, 74	340, 210, 129, 96	A

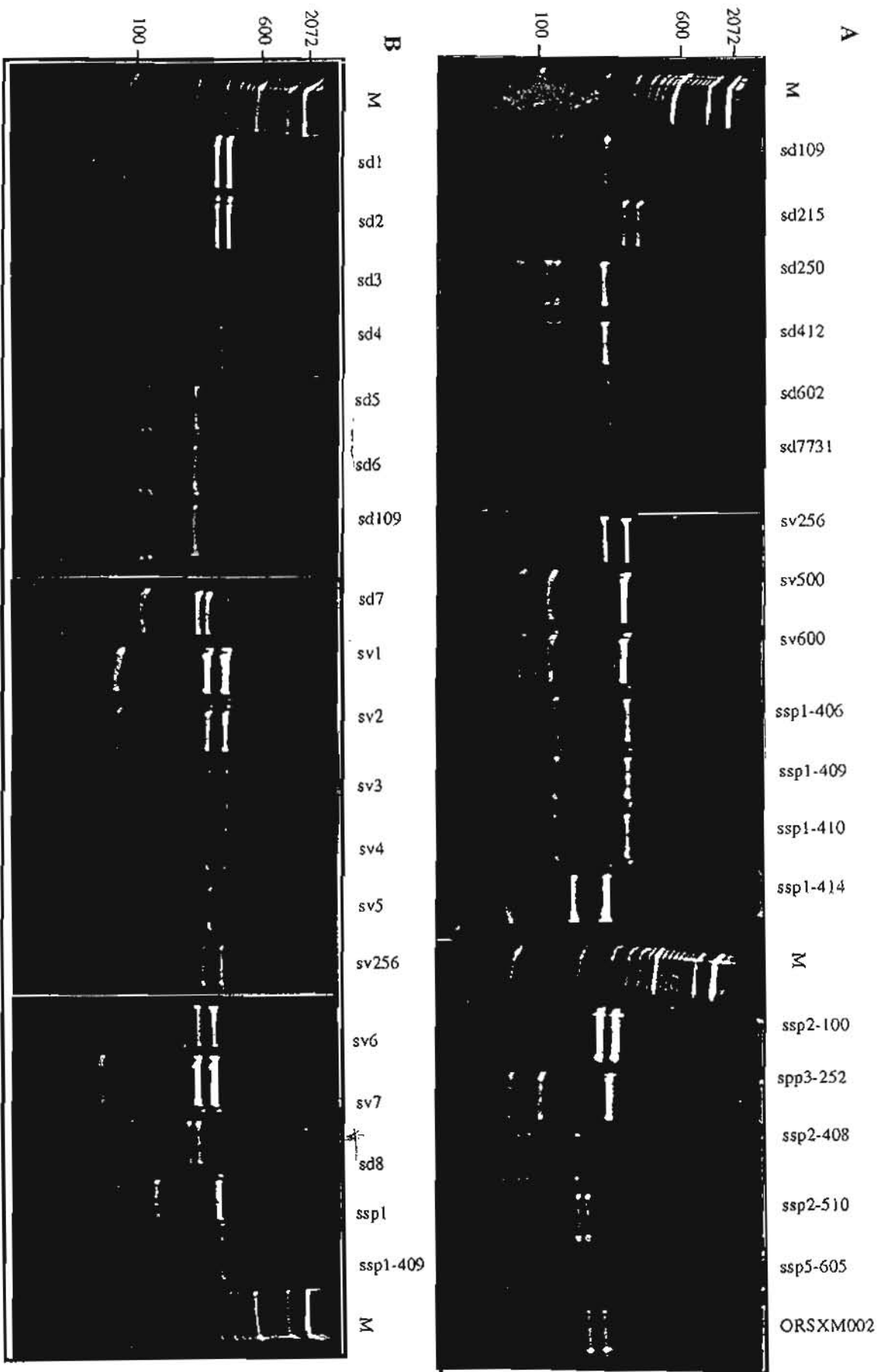
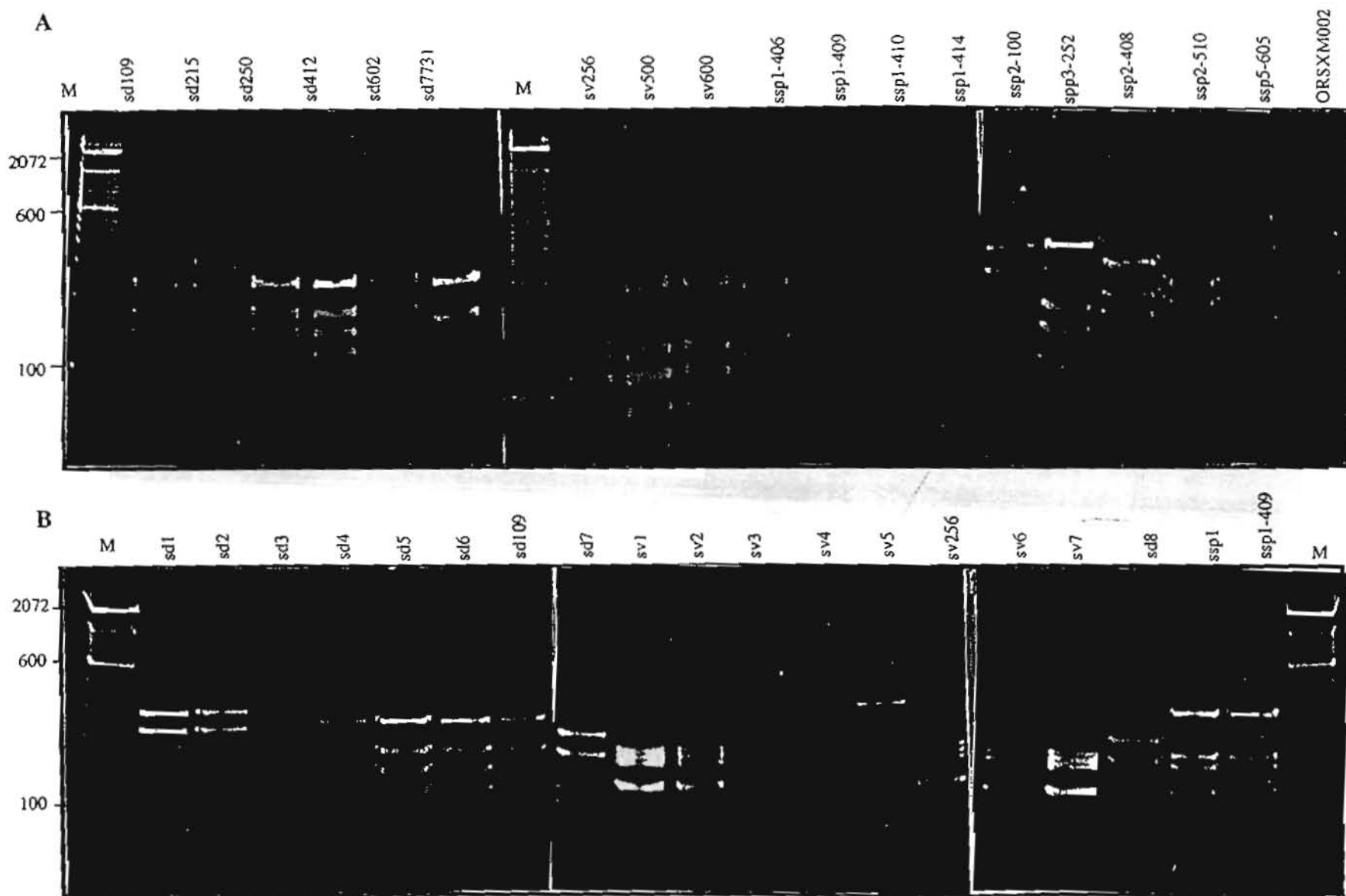


Figure 4.3. Variabilité inter et intraspécifique des produits de digestion de l'ITS des isolats (A) et des carpophores (B) de sclérodermes. Digestion par *Hinf*I. M = marqueur de masse moléculaire (échelle de 100 pb). Gels d'acrylamide (15%).



**Figure 4.4.** Variabilité inter et intraspécifique des produits de digestion de l'ITS des isolats (A) et des carpophores (B) de sclérodermes. Digestion par *Mbo*I. M = marqueur de masse moléculaire (échelle de 100 pb). Gels d'acrylamide (15%)

Il apparaît que nous avons regroupé, sur la base des critères morphologiques (cf. chapitre II), dans l'espèce indéfinie *Scleroderma* sp2 des souches de *S. dictyosporum* puisque les 3 profils différents obtenus (ssp2-100, ssp2-510 et ssp2-408) s'identifient à des carpophores de cette espèce. Aussi, l'isolat ssp3-252 serait un *S. verrucosum*. La souche ssp5-605 est très différente des autres avec 5 bandes (180, 138, 113, 95 et 74 pb). ORSXM002 qui est un champignon indéterminé présente un profil unique à 4 bandes (254, 206, 83 et 74 pb).

Les profils de digestion *Mbo*I de l'ITS possèdent 3 à 5 bandes selon les espèces (fig. 4.4A & B, tableau 4.7). L'analyse de ces profils permet de confirmer que les isolats ssp2-408 et ssp3-252 sont respectivement des isolats de *S. dictyosporum* et *S. verrucosum*. C'est également le cas des deux isolats de *Scleroderma* sp2 qui présentent les mêmes profils que sd1 et sd2 (ssp2-100) et sd7 et sd8 (ssp2-510). Dans la suite du texte, ces isolats ont été quelques fois désignés par sd408, sv252, sd100 et sd510. Le polymorphisme observé entre les différents isolats avec cette enzyme est le même qu'avec l'enzyme *Hinf*I. Les isolats regroupés sur la base des patrons de digestion *Hinf*I le sont également avec *Mbo*I. La digestion de l'ITS de l'isolat indéterminé ORSXM002 présente là aussi un profil spécifique avec 4 fragments de restriction (340, 210, 129 et 96 pb). Il en est de même pour ssp5-605 avec 4 fragments de 284, 175, 119 et 96 pb.

L'analyse RFLP de la région ribosomique ITS, coupée par *Hinf*I et *Mbo*I, des différents Sclérodermes étudiés permet de distinguer 4 ribotypes de *S. dictyosporum*, 3 ribotypes de *S. verrucosum* et 2 ribotypes de *Scleroderma* sp1 (tableau 4.7). Les isolats de *Scleroderma* sp2 et *Scleroderma* sp3 appartiendraient aux espèces *S. verrucosum* (ssp3-252) et *S. dictyosporum* (ssp2-100, ssp2-510, ssp2-408).

#### **IGS1 coupé par *Hinf*I et *Mbo*I**

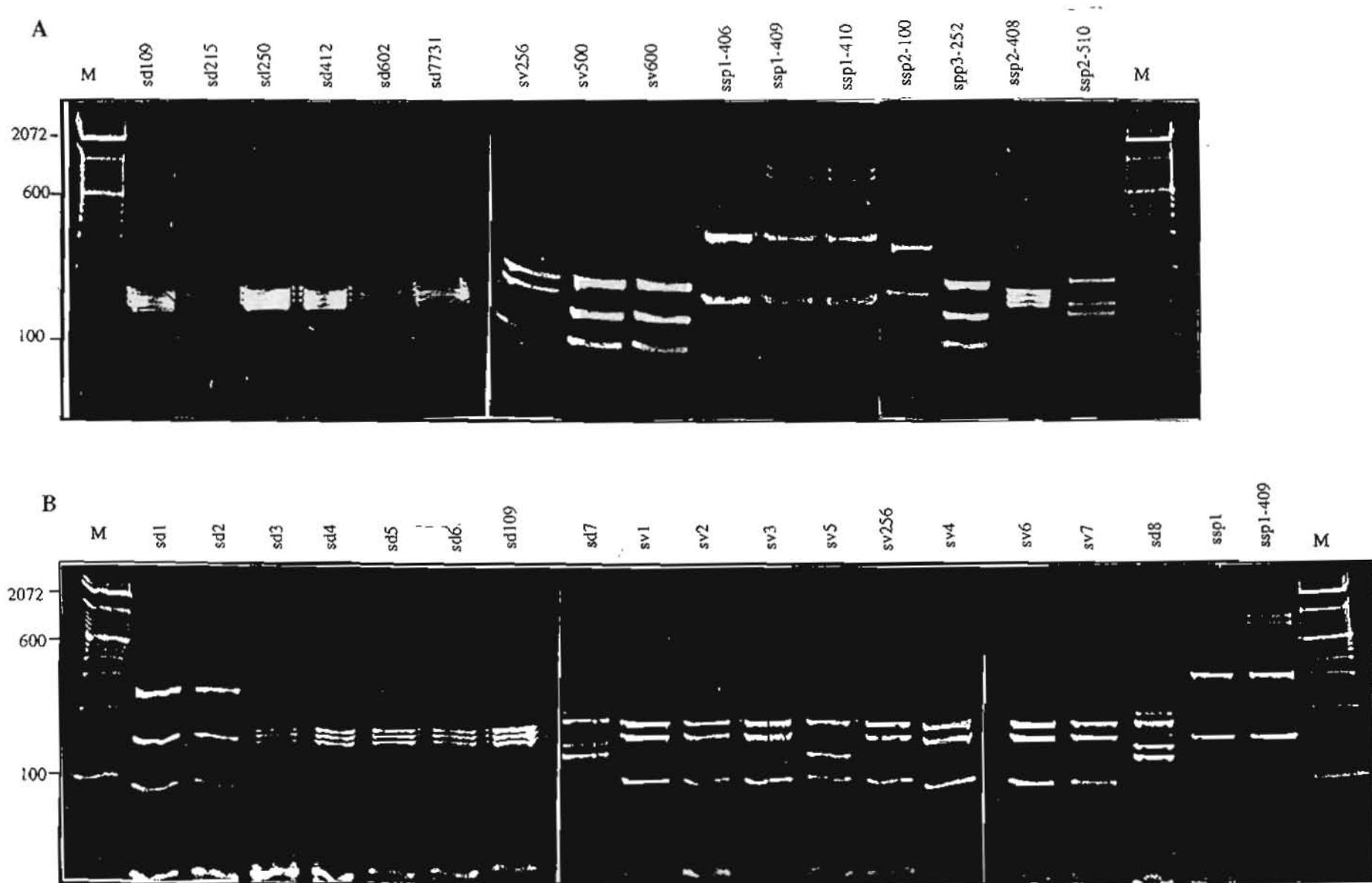
La digestion de l'IGS1 par l'endonucléase *Hinf*I conduit à la formation de 2 à 5 fragments (fig. 4.5A & B, tableau 4.8). Les souches appartenant à *S. dictyosporum* présentent 3 bandes de 160, 151 et 82 pb pour l'isolat sd215 ; 143, 135 et 128 pb pour les isolats et carpophores sd109, sd250, sd-408, sd412, sd602, sd7731, sd3, sd4, sd5 et sd6 ; 232, 143 et 88 pb pour sd1, sd2 et sd100, et 173, 139 et 124 pb pour sd7, sd8 et sd510. Les souches de *S. verrucosum* (sv252, sv500 et sv600) se distinguent facilement, elles présentent 3 fragments (182, 147 et 88 pb). L'isolat sv256 et les carpophores sv1, sv2, sv3, sv4 et sv6 se différencient des autres *S. verrucosum* par la présence de 3 fragments de restriction (182, 167 et 100 pb).



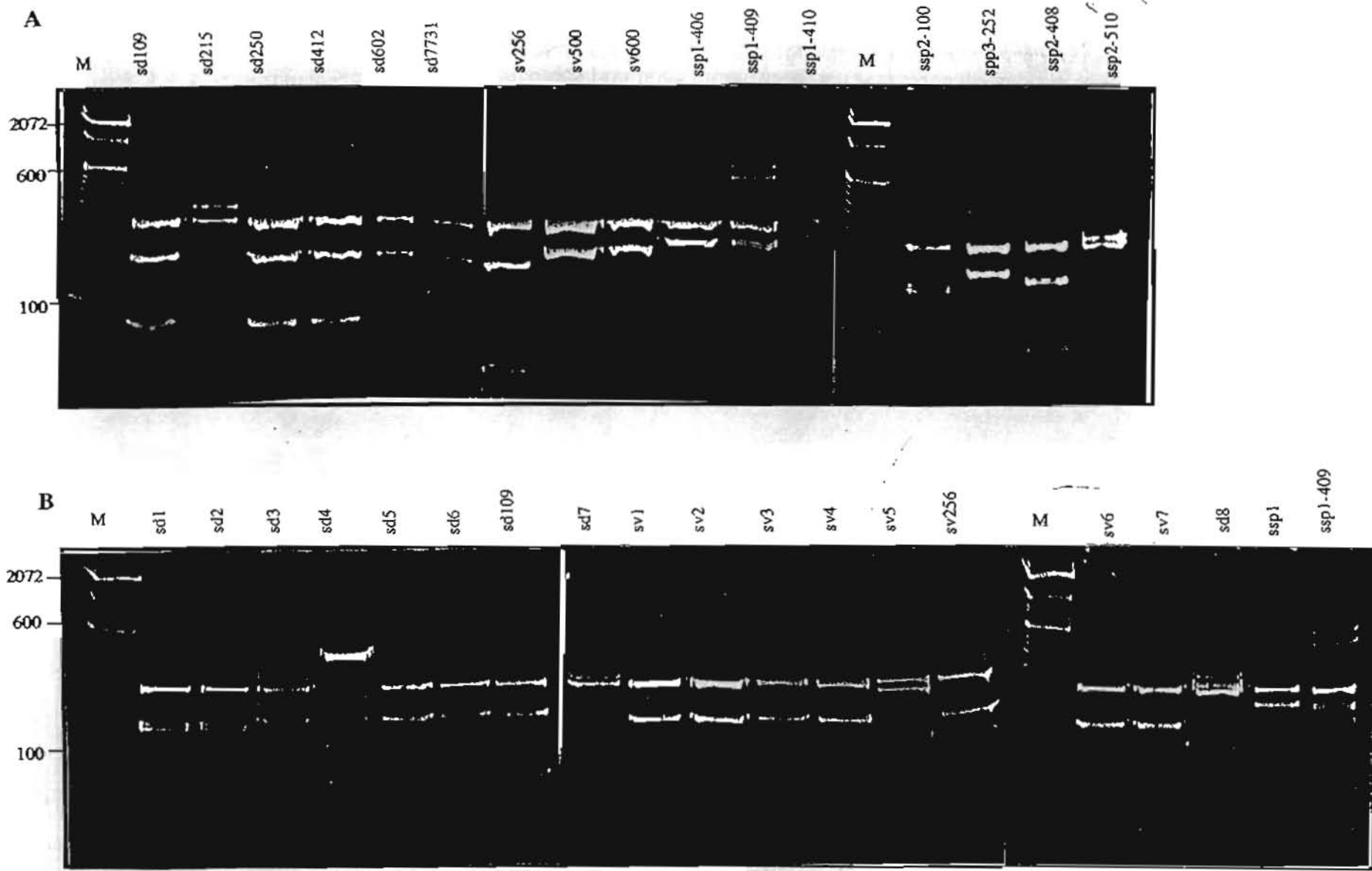
**Tableau 4.8.** Longueur des fragments de restriction obtenus après amplification et digestion par les endonucléases *Hinf*I et *Mbo*I de la région IGS1 des isolats et carpophores de *Sclérodermes*.

Isolats et carpophores	IGS/ <i>Hinf</i> I	IGS/ <i>Mbo</i> I	Ribotypes
<i>Scleroderma dictyosporum</i>			
Sd109	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Sd215	160, 151, 82	280, 240	A
Sd250	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Sd412	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Sd602	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Sd7731	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Sd1	232, 143, 88	228, 153	C
Sd2	232, 143, 88	228, 153	C
Sd3	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Sd4	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Sd5	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Sd6	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Sd7	173, 139, 124	231, 209	D
Sd8	173, 139, 124	231, 209	D
<i>Scleroderma verrucosum</i>			
Sv256	182, 167, 119, 63	238, 151, 54	A
Sv500	182, 147, 63	228, 178	B
Sv600	182, 147, 63	228, 178	B
Sv1	182, 167, 119, 63	238, 151, 54	A
Sv2	182, 167, 119, 63	238, 151, 54	A
Sv3	182, 167, 119, 63	238, 151, 54	A
Sv4	182, 167, 119, 63	238, 151, 54	A
Sv5	182, 139, 119	238, 210	C
Sv6	182, 167, 119, 63	238, 151, 54	A
Sv7	182, 167, 119, 63	238, 151, 54	A
<i>Scleroderma</i> sp1			
Ssp1-406	286, 143	228, 196	B
Ssp1-409	286, 143	228, 196	B
Ssp1-410	286, 143	228, 196	B
Ssp1-414	-	-	A
Ssp1	286, 143	228, 196	B
<i>Scleroderma</i> sp2			
Ssp2-100	232, 143, 88	228, 153	A
Ssp2-408	143, 135, 128	228, 153, 86	B
Ssp2-510	173, 139, 124	231, 209	C
<i>Scleroderma</i> sp3			
Ssp3-252	182, 147, 63	228, 178	A
<i>Scleroderma</i> sp5			
Ssp5-605	-	-	A
ORSXM002	-	-	A

Les profils IGS1 des isolats ssp1-409 et ssp1-410 montrent des fragments d'hétéroduplexe situés entre 1000 et 1200pb.



**Figure 4.5.** Variabilité inter- et intraspécifique des produits de digestion de l'IGS1 des isolats (A) et des carpophores (B) de sclérodermes. Digestion par *Hinf*I. M = marqueur de masse moléculaire (échelle de 100 pb). Gels d'acrylamide (15%).



**Figure 4.6.** inter- et intraspécifique des produits de digestion de l'IGS1 des isolats (A) et des carpophores (B) de sclérodermes. Digestion par *Mbo*I. M = marqueur de masse moléculaire (échelle de 100 pb). Gels d'acrylamide (15%).

Deux bandes caractérisent les profils de 3 isolats (ssp1-406, ssp1-409, ssp1-410) et le carpophore ssp1 de *Scleroderma* sp1 (286 et 143 pb).

La région IGS1 amplifiée des différents isolats et coupée par *Mbo*I permet d'obtenir 2 à 4 profils différents au sein de chaque espèce (fig. 4.6A & B, tableau 4.8). Là aussi, les regroupements d'isolats définis sur les profils RFLP IGS1/*Hinf*I sont confirmés par les profils RFLP IGS1/*Mbo*I.

Certains fragments de restriction non révélés par électrophorèse n'ont pas été considérés dans les tableaux 4.7 et 4.8 sauf dans le cas des ITS séquencés

La digestion des deux régions intergéniques de l'ADN ribosomal par les deux enzymes de restriction permet d'identifier 2 à 4 ribotypes au sein de chaque espèce. Pour *S. dictyosporum*, le type A avec 11 fragments de restriction est représenté par la souche sd215 ; quant au type B, identifié par 18 fragments, il regroupe les autres isolats et les carpophores sd3, sd4, sd5 et sd6. Le type C est représenté par les carpophores sd1, sd2 et sd100 (11 fragments) et le type D par sd7, sd8 et sd510 (14 fragments). Le ribotype A de *S. verrucosum* est représenté par sv256, sv1, sv2, sv3, sv4 et sv6 (17 fragments), le ribotype B (19 fragments) par sv500, sv600 et sv252, le C (15 fragments) par sv5. Les profils de *Scleroderma* sp1 (ssp1-406, ssp1-409, ssp1-410 et ssp1) constituent le type B des isolats de cette espèce (15 fragments) et ssp1-414 est de type A (8 fragments pour la région ITS coupée par les deux enzymes).

L'analyse RFLP de l'ITS ou de l'IGS1 permet une distinction aisée des différentes espèces de *Scleroderma* présentes sur les sites étudiés. Elle met en évidence une forte variabilité interspécifique. Au contraire la variabilité intraspécifique apparaît réduite. Il serait toutefois nécessaire d'analyser un échantillonnage plus large de Sclérodermes afin de confirmer ce résultat. L'isolat sd7731 de *S. dictyosporum* du Sénégal présente des profils PCR/RFLP identiques au ribotype B de *S. dictyosporum* du Burkina Faso. L'isolat indéterminé ORSXM002 apparaît très différents des Sclérodermes.

#### 4.3.1.3. Séquences nucléotidiques de l'ITS de différents isolats de Sclérodermes

La différence de longueur de l'ITS et l'IGS1 des différents isolats de Sclérodermes, ainsi que la variabilité dans les profils de restriction traduisent une variation en bases

Tableau 4.9. Longueur de la région ITS séquencée de 13 isolats de sclérodermes.

Isolats	ITS amplifié (pb)	ITS séquencé (pb) .. (longueur des amorces)
<i>Scleroderma dictyosporum</i>		
sd109	670	581
sd215	670	563
sd250	670	581
sd408	670	581
sd412	670	581
sd602	670	581
<i>Scleroderma verrucosum</i>		
sv252	760	637
sv256	760	628
sv500	760	637
sv600	760	638
<i>Scleroderma</i> sp1		
ssp1-406	760	613
ssp1-410	760	619

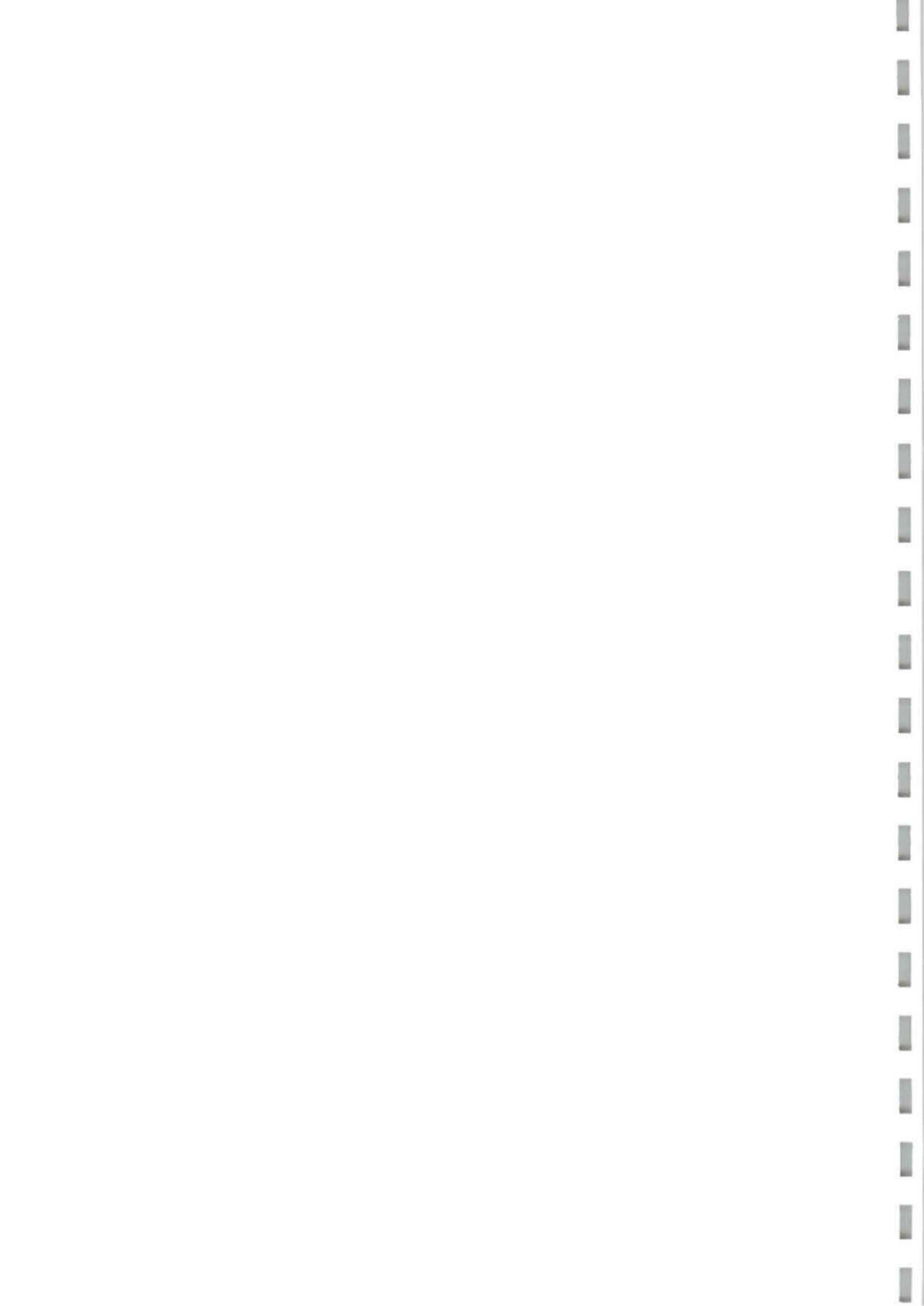
Tableau 4.10. Pourcentage de similarité de l'ITS ribosomique entre différents isolats de sclérodermes

Isolats	sd109	sd215	sd250	sd412	sd602	ssp2-408	sv256	sv500	sv600	ssp3-252	ssp1-406	ssp1-410
sd109	100		99,8	100	100	87,7	66,9	75	65	64	71	70
sd215		100										
sd250	99,8	-	100	99,8	99,8	87,7	66,9	75	65,2	64,7	71	70
sd412	100	-	99,8	100	100	87,7	66,9	75	65	64,7	71	70
sd602	100	-	99,8	100	100	87,7	66,9	75	65	64,7	71	70
ssp2-408	87,7	-	87,7	87,7	87,7	100	64	-	56,6	59	65	67
sv256	66,9	-	66,9	66,9	66,9	64	100	64,5	78,8	78,6	79,8	79,5
sv500	75	-	75	75	75	-	64	100	62,8	64,5	63,9	75
sv600	65	-	65	65	65	56,6	78,8	62,8	100	97,6	67,6	68
ssp3-252	64	-	64,7	64,7	64,7	59	78,6	64,5	97,6	100	68	68
ssp1-406	71	-	71	71	71	65	79,8	63,9	67,6	68	100	98,8
ssp1-410	70	-	70,	70	70	67	79,5	75	68	68	98,8	100

nucléotidiques de cette séquence. Les deux brins d'ADN de la région ITS de certains isolats de Sclérodermes représentant les trois principales espèces, *S. dictyosporum* (sd109, sd215, sd250, sd408, sd412 et sd602), *S. verrucosum* (sv252, sv256, sv500 et sv600) et *Scleroderma* sp1 (ssp1-406, ssp1-410 et ssp1-414) et l'isolat indéterminé ORSXM002 ont donc été séquencés.

Une légère variation entre la longueur de l'ITS de 13 isolats de Sclérodermes (sd109, sd215, sd250, sd408, sd412, sd602, sv252, sv256, sv500, sv600, ssp1-406, ssp1-410 et ssp1-414) et l'isolat indéterminé ORSXM002 amplifié et celle obtenue par séquençage (tableau 4.9) est observée. Cette différence entre la longueur de l'ITS amplifié et la longueur séquencée provient de l'imprécision liée à l'estimation de la distance de migration sur les gels. Ces séquences ont été alignées et montrent, outre la séquence conservée correspondant à l'ADNr 5,8 S, de larges portions de l'ITS1 et l'ITS2 très voisines (figure 4.7). L'ITS de deux espèces (*S. dictyosporum* et *S. verrucosum*) présente une faible divergence de 25 à 45% (tableau 4.10). Cependant, on distingue nettement deux ensembles de séquences sur la base de leur similarité, l'un correspond aux *S. dictyosporum* et l'autre aux *S. verrucosum*. La séquence de l'ITS des *S. verrucosum* est supérieure à celle des *S. dictyosporum*. Cette différence résulte essentiellement de quatre insertions -TTCCGGAT- centrée sur 60 pb, -TTCGGGGACCTGC- vers 195 pb, -TTCCTTC- vers 465 pb et GAC-GGGG vers 620 pb. Hormis ces insertions, les mutations de transition et de transversions (substitution d'une base purique par une base pyrimidique ou réciproquement) sont rares. Les *Scleroderma* sp1 sont très voisins des *S. verrucosum*. L'isolat ssp1-414 de *Scleroderma* sp1 est très éloigné de tous les Sclérodermes examinés (résultat non présenté). Cet isolat qui présente une particularité de croissance en culture et dont on a jamais pu mettre en évidence la capacité mycorhizogène vis à vis d'*Afzelia africana* ne serait vraisemblablement pas un champignon ectomycorhizien. Son ITS présente une forte homologie avec un champignon entomo-pathogène du genre *Beauveria*.

Les données de séquençage ont été codées et exploitées afin de déterminer la filiation taxonomique des isolats indéterminés (*Scleroderma* sp1) et d'apprécier les relations phylogénétiques entre l'ensemble des Sclérodermes étudiés. Un alignement des séquences a été réalisé à l'aide des programmes MultAlin (Corpet, 1988) et ClustalW (Thompson *et al*, 1994). Ces programmes sont basés sur des algorithmes différents. Les résultats des alignements ont été vérifiés et optimisés manuellement pour les zones les plus délicates à aligner (points chauds d'insertion/délétion). Ces alignements optimisés ont ensuite été analysés par le programme de parcimonie PAUP 3.1.1 (Swofford, 1991).



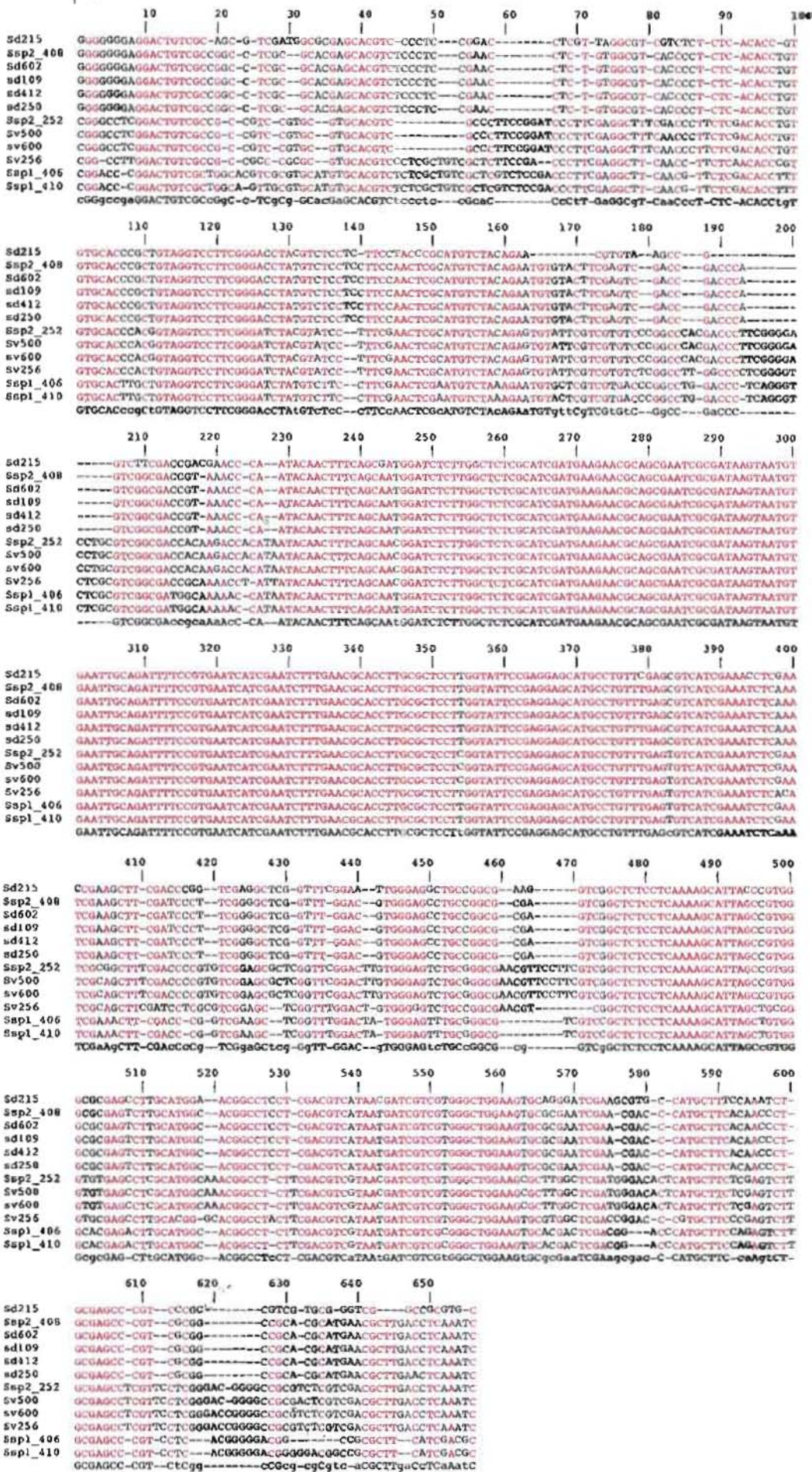


Figure 4.7. Aligement multiple des séquences de l'ITS de l'ADNr nucléaire des Sclérodermes par MultAlin.



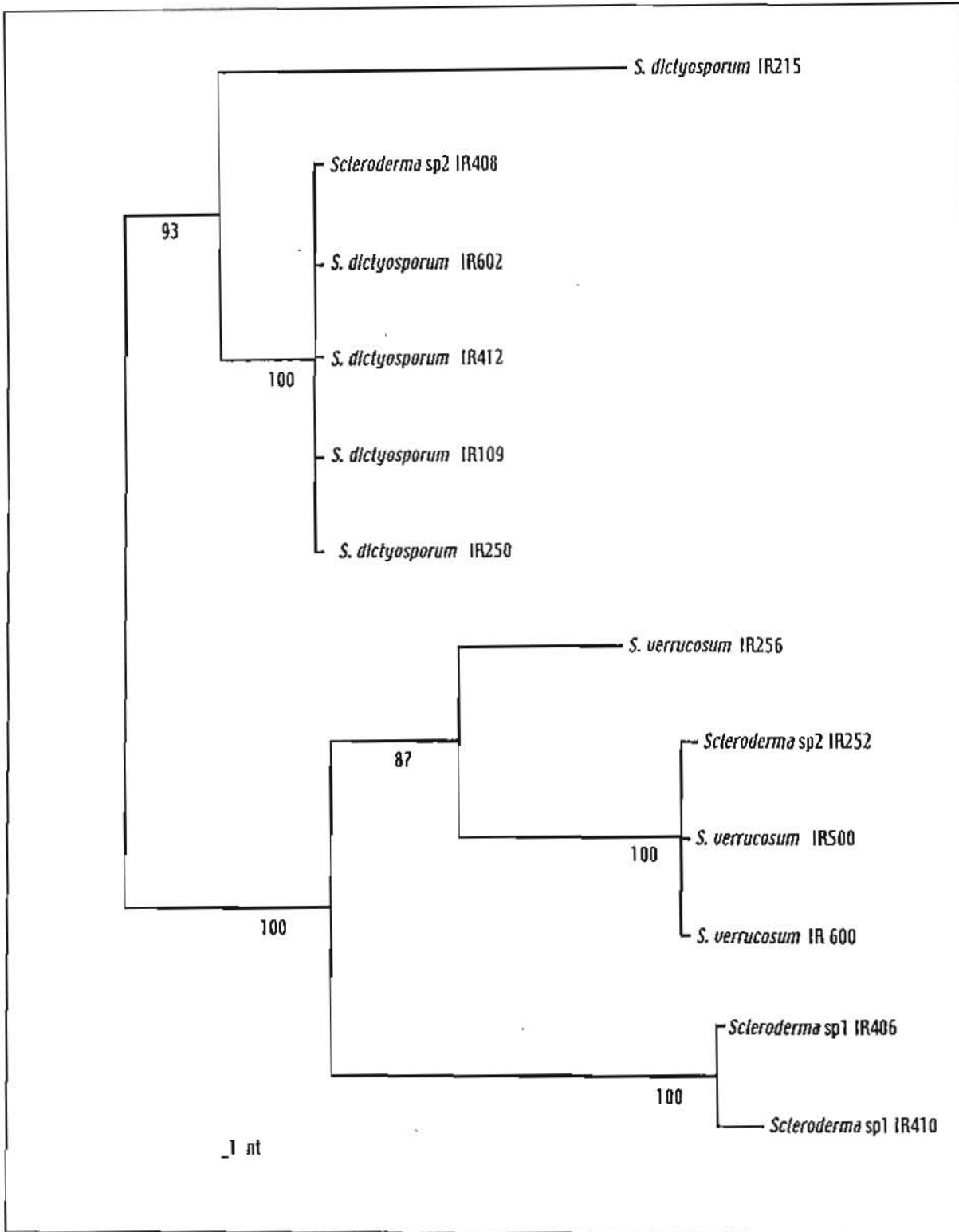
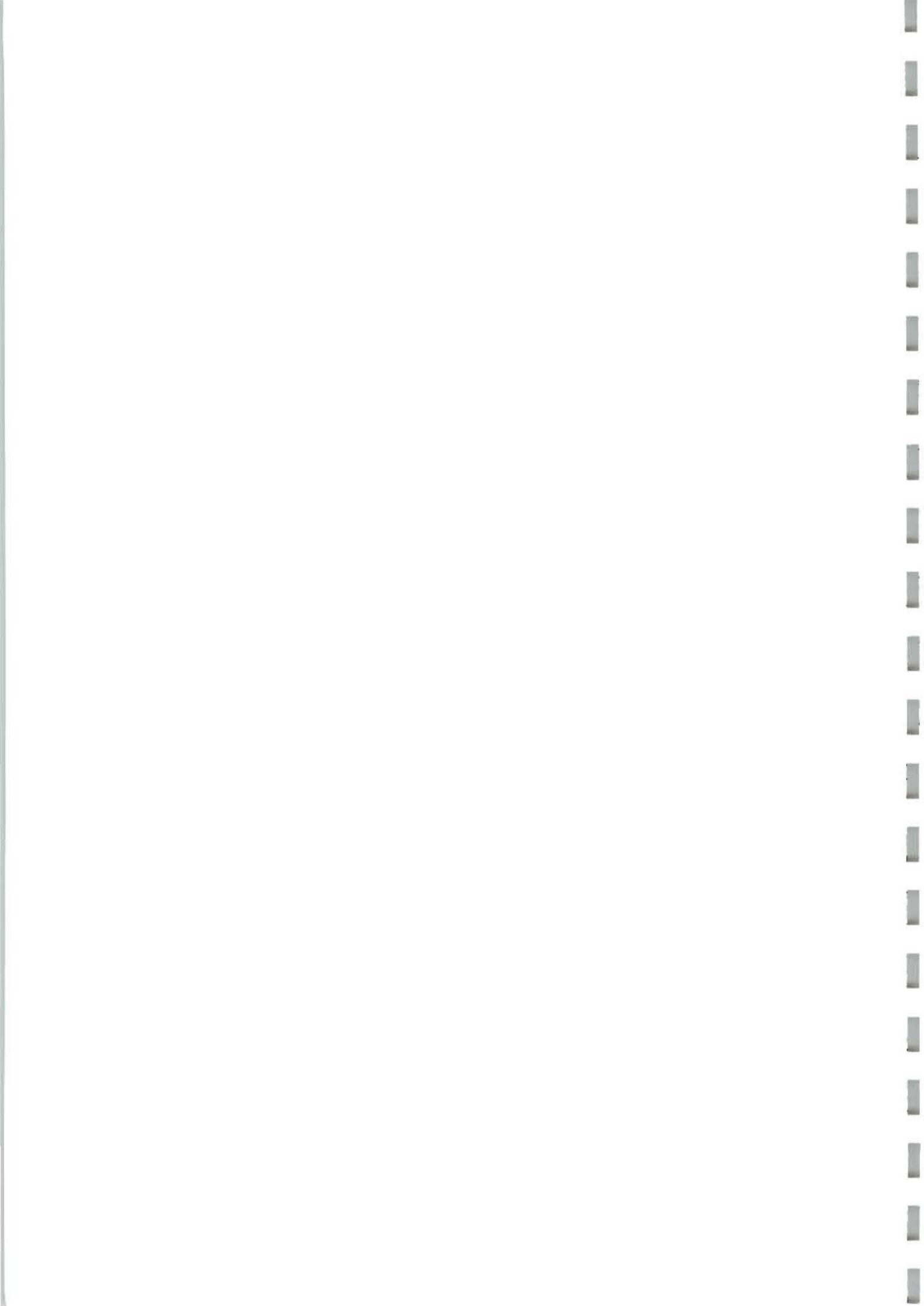


Figure 4.8. Phylogramme des ITS de l'ADNr nucléaire des Sclérodermes. Méthode heuristique de parcimonie (PAUP 3.1.1). L'alignement a été réalisé par MultiAlin.

L'arbre phylogénétique le plus parcimonieux (méthode heuristique, PAUP 3.1.1) repartit l'ensemble des isolats en deux branches distinctes (fig. 4.8) portant les isolats de *S. dictyosporum* ou ceux de *S. verrucosum*. Les deux isolats de *Scleroderma* sp1 (ssp1-406 et ssp1-410) sont clairement affiliés à *S. verrucosum* avec en moyenne 30% de divergence. Au sein de chacune des espèces, le pourcentage de divergence oscille entre 20 et 35%. L'arbre phylogénétique obtenu à partir de l'alignement des séquences par ClustalW est pratiquement identique à celui obtenu par MultAlin (cf. annexe 3).

Ces résultats confirment ceux obtenus par PCR/RFLP et différencient les ribotypes A et B au sein de chaque espèce. L'alignement des séquences confirme également l'appartenance de ssp3-252 et ssp2-408 respectivement aux espèces *S. verrucosum* et *S. dictyosporum*. Une légère différence de séquences nucléotidiques existe cependant entre les génotypes très proches, différence qui ne pouvait être révélée par la PCR/RFLP. La PCR/RFLP, approche peu onéreuse, permet donc une identification efficace des espèces de Sclérodermes. Le séquençage permet une connaissance totale de la variation de l'ADN des individus génétiquement très proches, non détectable par la PCR/RFLP. Il s'agit cependant d'une technique coûteuse qui ne saurait être utilisée en routine.

L'alignement de séquence de l'ITS de l'isolat indéterminé ORSXM002 (fig. 4.9) indique que celui-ci présente 89% de similarité avec l'ITS de *Telephora terrestris* (Taylor et Bruns, 1997). L'arbre phylogénétique établi à partir de ces séquences montre une grande filiation génétique entre ORSXM002 et les champignons du genre *Tomentella* et *Telephora* (fig. 4. 10). Cette souche indéterminée serait donc un *Telephoraceae*.



```

10          20          30          40          50          60
Thelephora Len:AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCCGAAGGATCAAN
ORSXM002   Len:-----GGTGG-CCT-----
           Len-----GGTga-CCT-----

           70          80          90          100         110         120
Thelephora ACTGAATTGTCAAACGGGNTGTGCTGNCCTCATAGGGGGCATGTGCACGCTCTGTTTA
ORSXM002   -----TCAAACGGG-----GCATGTGCACGCTCTGTTTG
           -----TCAAACGGG-----GCATGTGCACGCTCTGTTTa

           130         140         150         160         170         180
Thelephora CACATCCACTCACACCTGTGCACCCTCTGTAGTTCTATGGTCTGGGGACCCTGTCTCCTTC
ORSXM002   CA--TCCACTCACACCTGTGCACCCTCTGTAGTTCGGTGGTGAAGGACGATGTCTTTC
           CA--TCCACTCACACCTGTGCACCCTCTGTAGTTCcaTGGTcgGaaGGACcaTGTcCTTC

           190         200         210         220         230         240
Thelephora CTTCTGTGGTCTTACGTCTCTACACACACACTGTAATAAAGTTTATGGAATGTACATCG
ORSXM002   CTCCCGTGGTCTCTGCGTCTTTACACACACACTGTAATGCGGTTTATGGAATGTAAAGCGG
           CTcCcGTGGTcCTaCGTCTcTACACACACACTGTAATaaGTTTATGGAATGTaaaccG

           250         260         270         280         290         300
Thelephora CGTCTAACGCAATACAATAACAACCTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAA
ORSXM002   CGTTTGACGCAATACAATAACAACCTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAA
           CGTcTcAACGCAATACAATAACAACCTTTAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAA

           310         320         330         340         350         360
Thelephora GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
ORSXM002   GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
           GAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTT

           370         380         390         400         410         420
Thelephora TGAACGCACCTTGCGCCCTTGGCTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAAC
ORSXM002   TGAACGCACCTTGCGCCCTTGGCTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAAC
           TGAACGCACCTTGCGCCCTTGGCTATTCCGaaGGGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAAC

           430         440         450         460         470         480
Thelephora ACCTCAACTCTCATGGTTTGCCATGATGAGTTGGACTCTGGGGGTTTGCTGGCCTGTGG
ORSXM002   ACCTCAACCTCATGGCTATCCATGATGGGCTGGACTCTGGAGGTTTGCTGGCCTGTTC
           ACCTCAACcCTCATGGcTagCCATGATGaGcTGGACTCTGGaGGgTTTGCTGGCCTGTgG

           490         500         510         520         530         540
Thelephora TCGGCTCCTCTCAAATTAATCAGCCTCCAGTGTGGTGGCATCACGGGTGTGATAAAT
ORSXM002   TCGGCTCCTCTCAAAGAATAGCCTACCGCGTGTGGTGGCATCCCGAGTGTGATAAAT
           TCGGCTCCTCTCAAaagAATcAGCCTaCCaGcGTgTGGTGGCATCaCGaGTGTGATAAAT

           550         560         570         580         590         600
Thelephora ATCTACGCTCGCTGTTGTCTGCCAGGTAACCTTTGGTCACAAAGGTTTGCTGGAGCTCAC
ORSXM002   ATCTGCGCTTGGCGTTGCTCACCAGATGACCTTCATCCTTGGAGGTTGCTGGGGCTTAC
           ATCTaCGCTcGCGgTTGcccaCCaGaTaACCTTcagcCacaaAGGTTcGCTGGaGCTcAC

           610         620         630         640         650         660
Thelephora AGATGTCTCTCCTCAGCGAGGACAGCTTTTTTAACGTTCCGATCTCAAATCAGGTAGGACT
ORSXM002   AGACGTCTTTC-TCCGTGAAAACAG-----
           AGAcGTCTcTC-TCaGcGaaaACAG-----

```

Figure 4.9. Alignement multiple de la séquence de l'ITS de l'ADNr de l'isolat indéterminé ORSXM002 par rapport à la séquence de *Telephora terrestris*

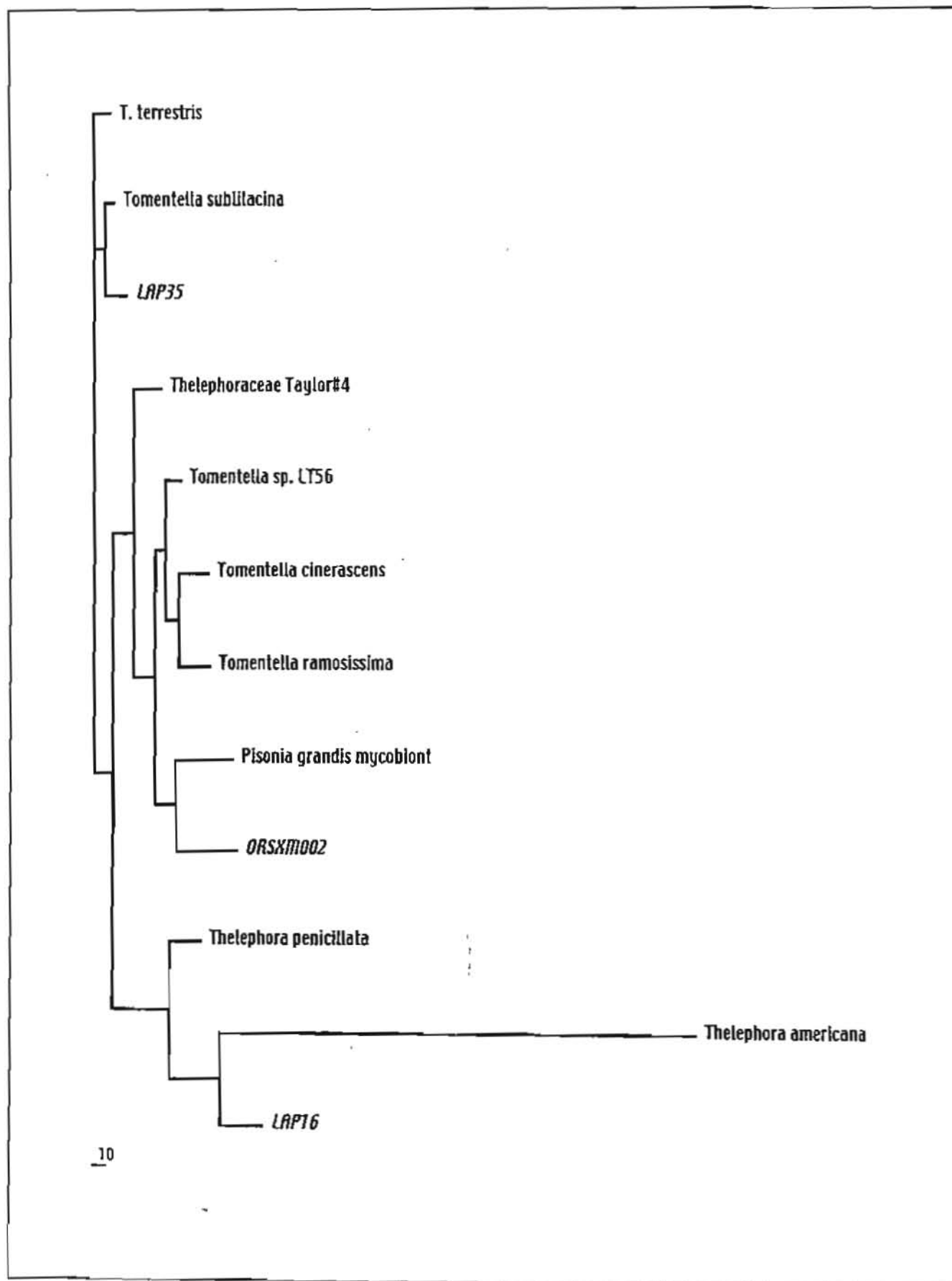


Figure 4.10. Phylogramme de l' ITS de l'ADNr nucléaire de quelques Telephoraceae et des champignons ectomycorhiziens non identifiés ORSXM002, LAP16 et LAP35.

#### 4.3.1.4. Distribution écologique des différents génotypes

Les différentes espèces et isolats étudiés proviennent de différentes plantes-hôtes (tableau 4.1) et de sites écologiques différents allant des sols périodiquement inondés à des sols pauvres argileux ou gravillonnaires. Pour *S. dictyosporum*, le ribotype B est associé à toutes les plantes-hôtes d'isolement (*A. africana*, sd109 ; *Isoberlinia doka*, sd250, sd5 ; *I. doka* & *I. dalziellii*, sd3 ; *Uapaca guineensis*, sd408, sd412, sd4 et *Monotes kerstingii* et *I. dalziellii*, sd602, sd6). L'isolat sd7731, isolé sous *A. africana* au Sénégal, appartient également à ce ribotype. Ces données suggèrent que ce ribotype a une large répartition en Afrique de l'Ouest. Ce ribotype semble également adapté à différentes conditions édaphiques, sol à inondation temporaire des bords des cours d'eau (sd408 sd412 et sd4), sol argileux à érosion hydrique importante (sd602 et sd6) et sol relativement riche (sd109, sd250, sd3 et sd5). L'isolat de type A (sd215) est spécifique à *I. doka* et *I. dalziellii*. Le ribotype C apparaît spécifique à *A. africana* (sd1, sd2 et sd100) et le ribotype D est présent sur deux sites où on rencontre *M. kerstingii* (site II et XIII, sd7 et sd8) et sur le site à *U. somon* (sd510).

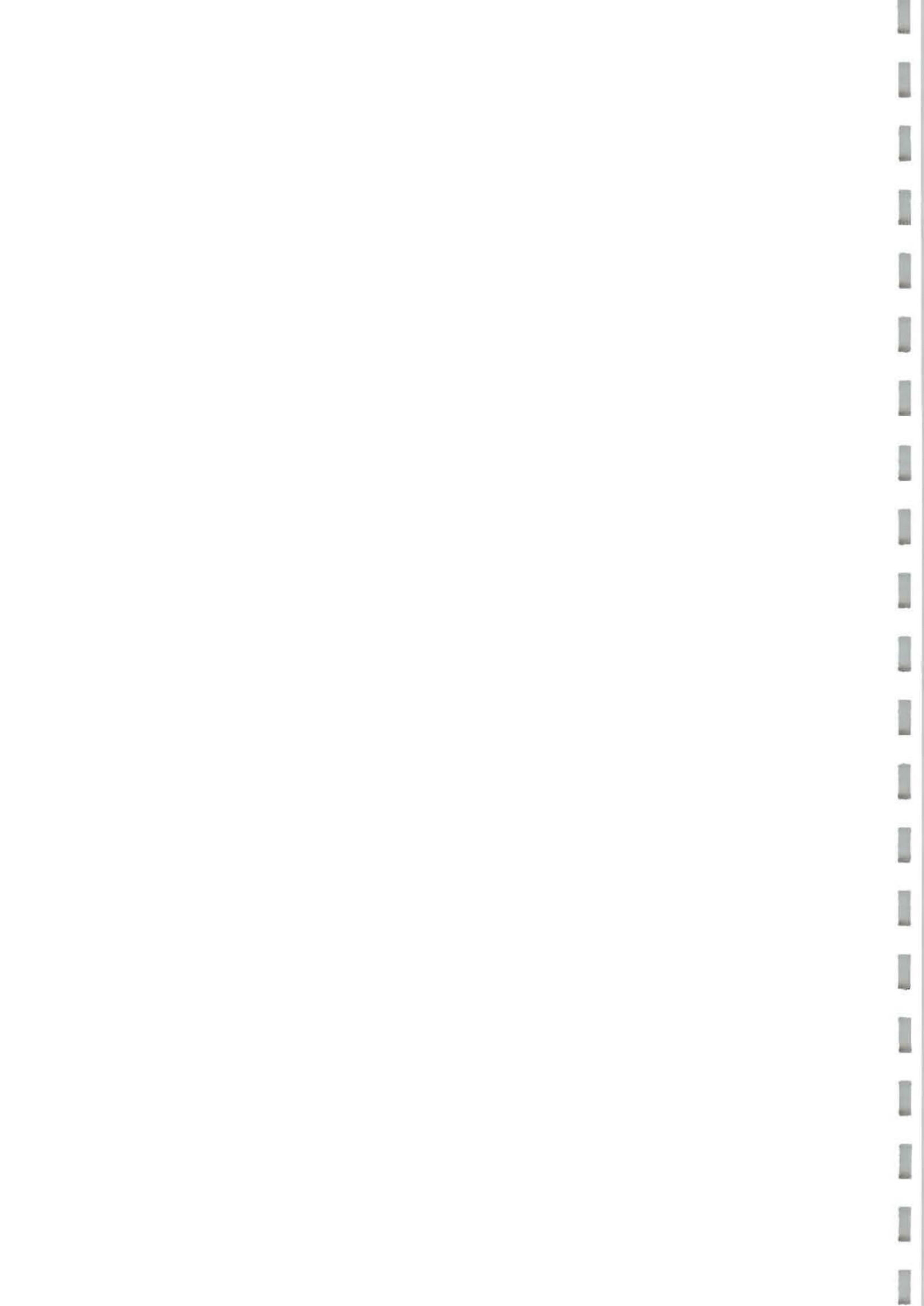
Le ribotype B des isolats de *S. verrucosum* a également un large spectre d'hôte (*I. doka* et *I. dalziellii*, sv252 ; *U. somon*, sv500 et *M. kerstingii* et *I. dalziellii*, sv600). Il en est de même pour le type A qui a été identifié sous *I. doka* et *I. dalziellii* (sv256, sv4), *M. kerstingii* (sv1), *U. guineensis* (sv2), *I. doka* (sv3 et sv6), *M. kerstingii* et *I. dalziellii* (sv7). Un seul carpophore du ribotype C a été identifié sous *U. guineensis* (sv5).

Le type ribosomique B de *Scleroderma* sp1 a été identifié sous *U. guineensis* ; compte-tenu des résultats de séquence ITS, il pourrait être un *S. verrucosum* adapté aux conditions de sol temporairement inondé.

#### 4.3.1.5. Estimation de la variabilité intraspécifique par RAPD

Nous avons détecté un polymorphisme intraspécifique chez les deux espèces de Sclérodermes par séquençage de l'ITS et l'IGS1. Nous avons ensuite utilisé la RAPD pour évaluer ce polymorphisme sur une portion plus large du génome des isolats de Sclérodermes en culture.

Compte-tenu des problèmes de reproductibilité de la RAPD, nous avons effectué au moins deux répétitions pour chaque amorce utilisée. Nous avons seulement considéré les bandes majeures et reproductibles pour l'analyse des profils.



L'utilisation des deux amorces 152C et 174 génèrent respectivement 25 et 33 marqueurs (tableaux 4.11 et 4.12, fig. 4.11 et 4.12) pour l'ensemble des 18 isolats de Sclérodermes et confirme la diversité inter- et intraspécifique au sein de ces taxa. Les marqueurs amplifiés par l'amorce 152C indiquent que les isolats de *S. dictyosporum* examinés se composent de 5 génotypes. Le génotype représenté par l'isolat sd215 n'a aucune similarité avec les autres isolats, il en est de même des isolats ssp2-100 (sd100) et ssp2-510 (sd510). Les six autres isolats se répartissent en 2 génotypes qui diffèrent par la présence ou l'absence du marqueur 1089 pb. L'un, caractérisé par la présence du marqueur 1089 pb, regroupe les isolats sd408 et sd7731, deux isolats d'origine géographique (Burkina Faso et Sénégal) et de plantes-hôtes différentes, une *Euphorbiaceae* (*Uapaca guineensis*) et une *Cesalpinioideae* (*A. africana*). Le dernier génotype regroupe les 4 isolats restant (sd109, sd250, sd412 et sd602) prélevés sur les sites IV, VIII, X et XIII. Il apparaît que les génotypes de sd215, sd100 et sd510 présentent 100% de divergence entre eux et avec les autres génotypes de *S. dictyosporum*. Les deux autres génotypes divergent seulement de 10%. Les marqueurs amplifiés par l'amorce 174 discriminent seulement les génotypes de sd215, sd100 et sd510 par rapport aux autres avec également 100% de divergence.

Parmi les isolats de *S. verrucosum*, nous avons généré 7 marqueurs avec l'amorce 152C et 9 avec 174. La combinaison de ces deux amorces permet d'identifier 4 génotypes représentés chacun par un isolat. Le génotype de sv256 présente 87% de divergence avec sv252 et 100% avec les autres isolats lorsqu'on considère l'amorce 152C ; par contre avec l'amorce 174 ce pourcentage de divergence est de 77% avec sv252 et 80 et 83% avec respectivement sv500 et sv600. Avec l'amorce 174, nous avons observé une divergence de 10% entre sv500 et sv600 due à la présence du marqueur 22 pb chez l'isolat sv600. Le pourcentage de divergence entre l'isolat sv252 et sv500, sv600 est de 20% avec l'amorce 152C. Cependant, avec l'amorce 174, le pourcentage est plus élevé, 60% et 54%.

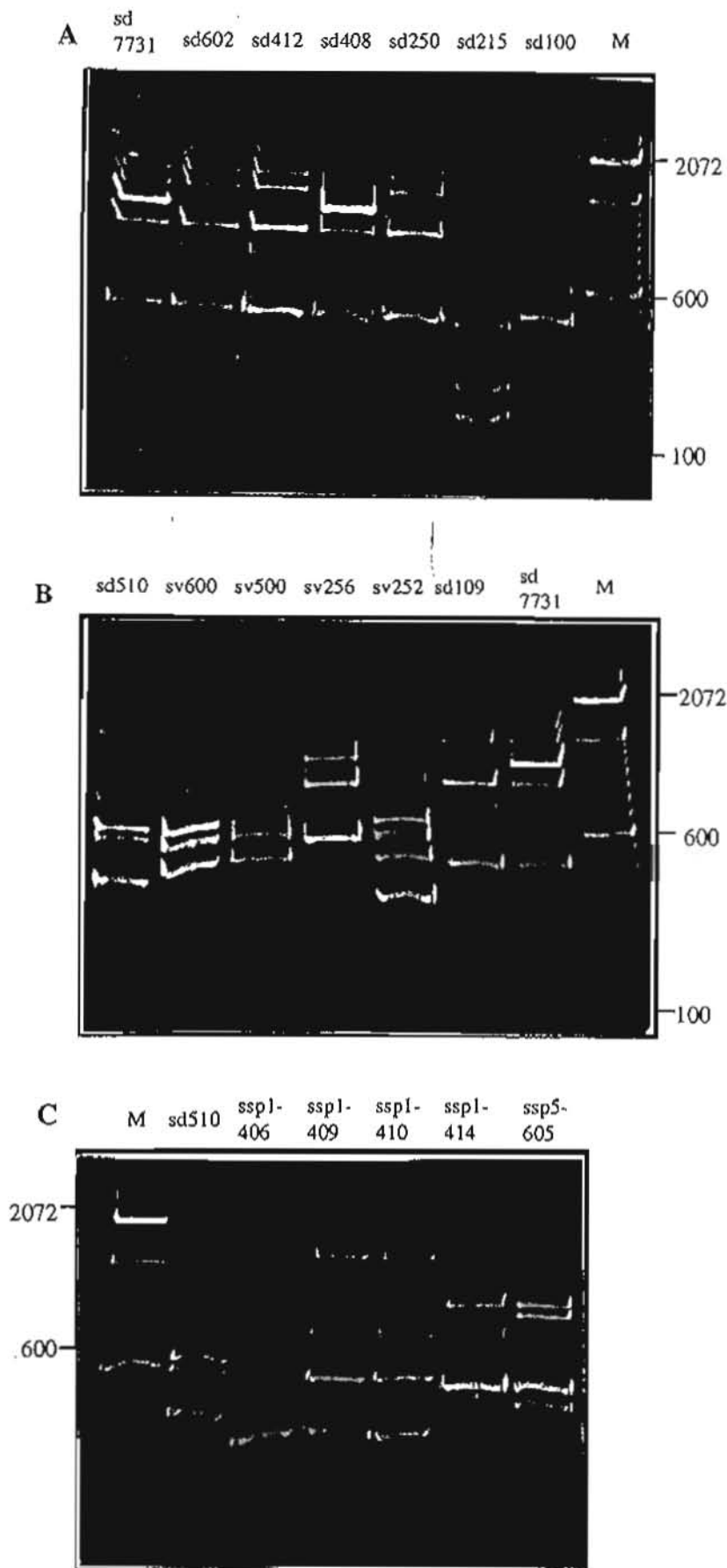
Les 4 marqueurs de l'amorce 174 sont présents chez les 3 isolats de *Scleroderma* sp1 qui ont donc 100% de similarité. Par contre avec l'amorce 152C l'isolat ssp1-406 diverge de 50% des deux autres. La plupart des isolats d'espèces différentes sont à 100% divergents. Néanmoins, quelques faibles similarités entre isolats d'espèces différentes sont à signaler. C'est notamment le cas de l'isolat sd510 qui présente environ 10% de similarité avec sv252, sv500 et sv600.



Tableau 4.11. Matrice des marqueurs RAPD obtenus avec l'amorce 152C sur les différents isolats de Sclérodermes.\*

Marqueurs	sd109	sd215	sd250	sd408	sd412	sd602	sd 7731	sv252	sv256	sv500	sv600	spp1- 406	spp1- 409	spp1- 410	spp1- 414	spp2- 100	spp2- 510	spp5- 605	
152C																			
1551	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1290	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1089	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1018	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
972	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
899	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
889	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
806	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
587	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
577	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
535	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
514	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
502	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
499	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
471	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
447	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
421	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
410	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
335	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
308	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
288	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
237	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
173	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* (1) : présence ; (0) : absence

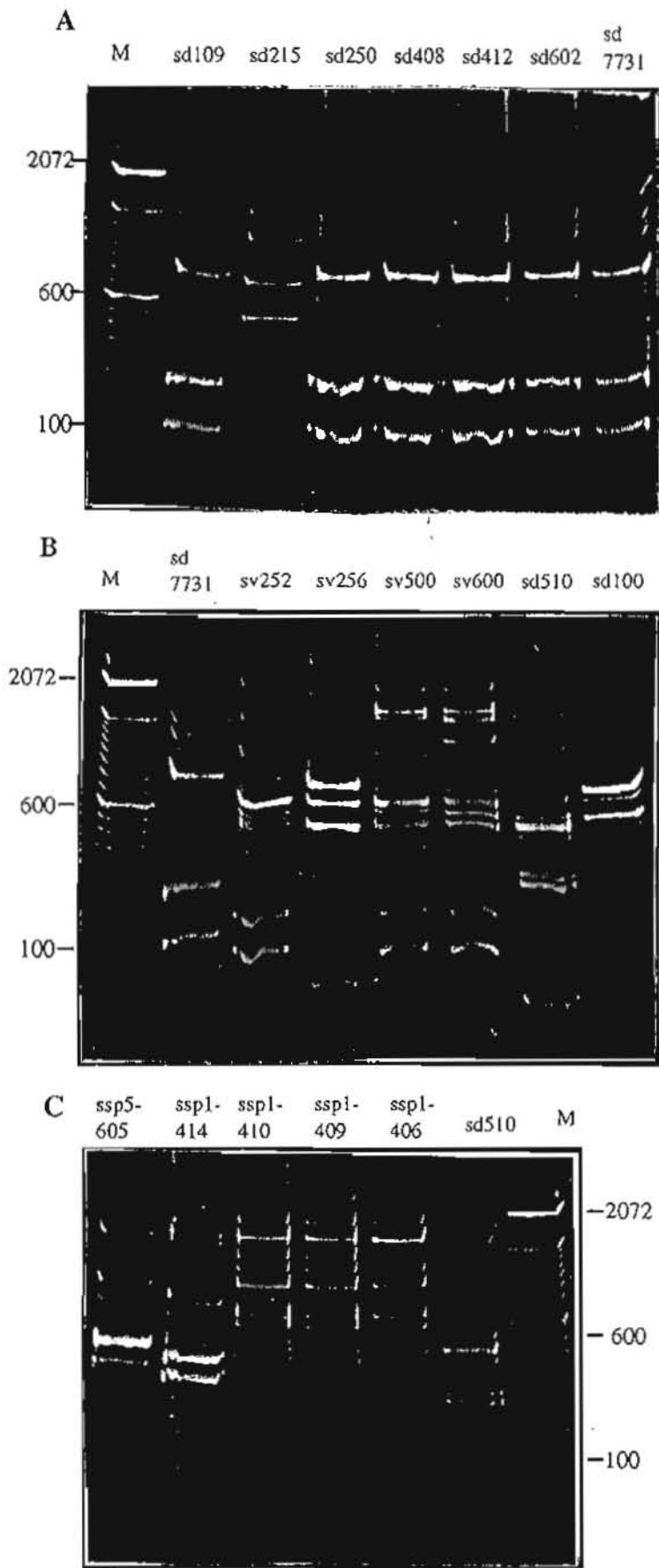


**Figure 4.11 (A, B et C).** Profils RAPD obtenus sur gel acrylamide (15%) avec l'amorce 152C des différents isolats de sclérodermes. M = marqueur de masse moléculaire (échelle de 100 pb).

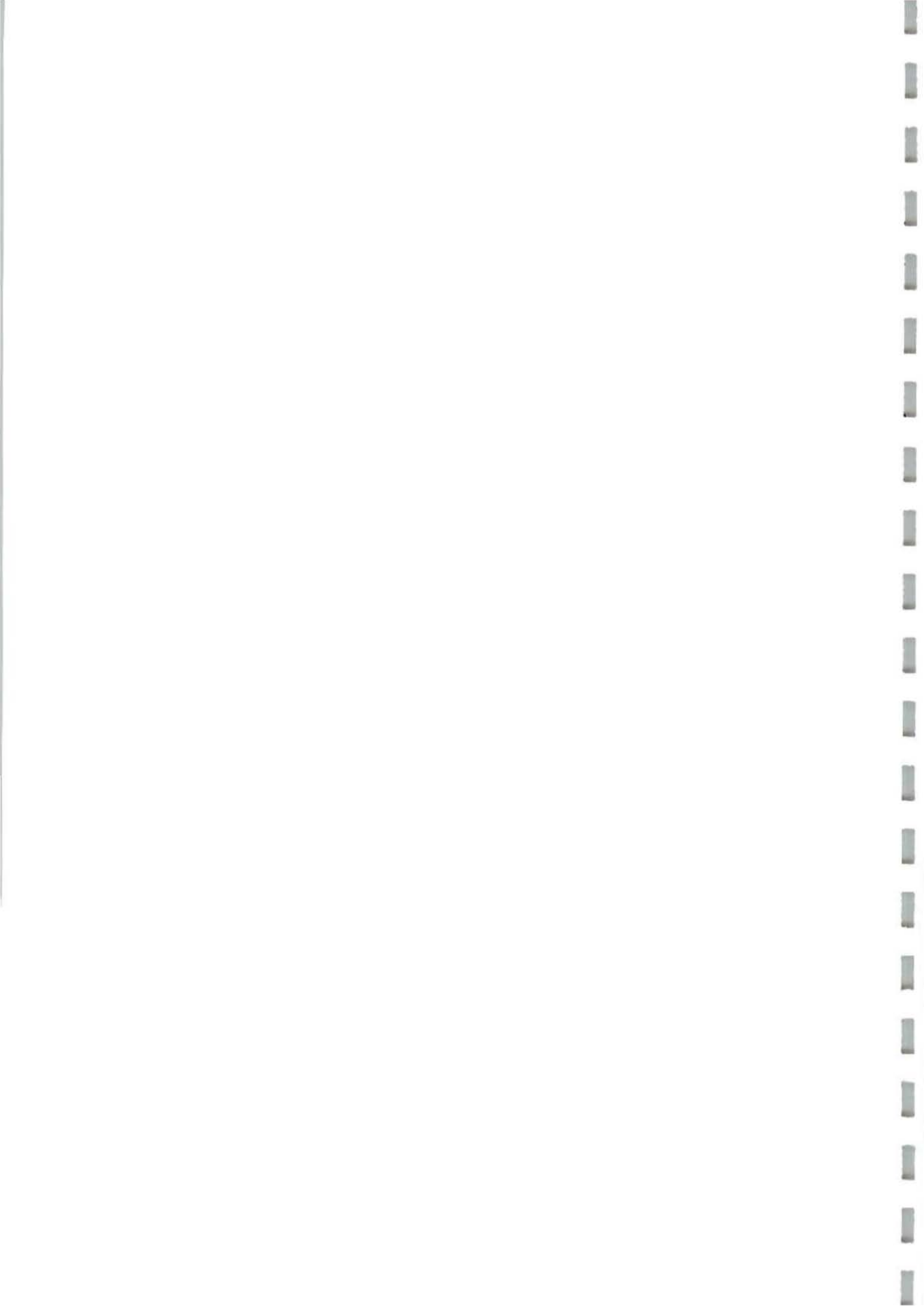
Tableau 4.12. Matrice des marqueurs RAPD obtenu avec l'amorce 174 sur les différents isolats de sclérodermes.\*

Marqueurs	sd109	sd215	sd250	sd408	sd412	sd602	sd7731	sv252	sv256	sv500	sv600	ssp1-406	ssp1-409	ssp1-410	ssp1-414	ssp2-100	ssp2-510	ssp5-605	
174																			
1757	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1332	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
1287	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
827	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
779	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
719	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
553	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
532	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
522	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
516	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
504	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
461	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
439	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
396	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
383	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
369	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
347	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
335	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
325	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
323	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
304	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
198	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
190	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
149	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
100	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

\* (1) : présence ; (0) : absence



**Figure 4.12. (A, B et C).** Profils RAPD obtenus sur gel acrylamide (15%) avec l'amorce 174 des différents isolats de sclérodermes. M = marqueur de masse moléculaire (échelle de 100 pb).



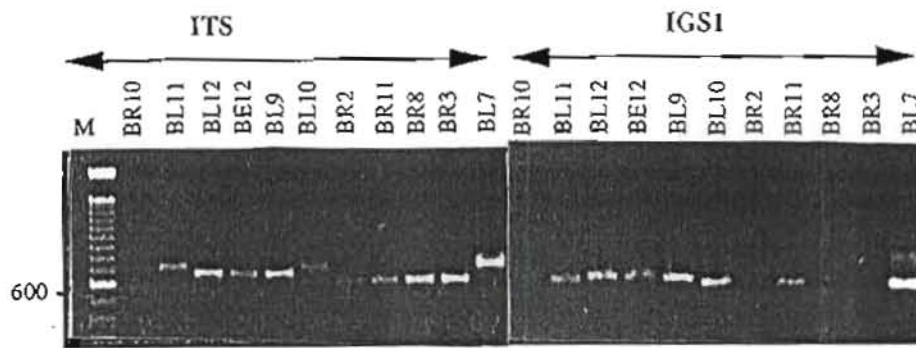
En confirmation des résultats obtenus par PCR/RFLP, l'isolat de *Scleroderma* sp5, ssp5-605 est spécifique et présente quelques similarités avec ssp1-414 (présence des marqueurs 972 pb et 471 pb de l'amorce 152C) qui ne serait pas un scléroderme comme signalé au paragraphe 4.3.1.3.

#### 4.3.2. Identification des champignons des mycorhizes d'*A. africana* obtenues par piégeage après amplification et digestion des régions ITS et IGS1

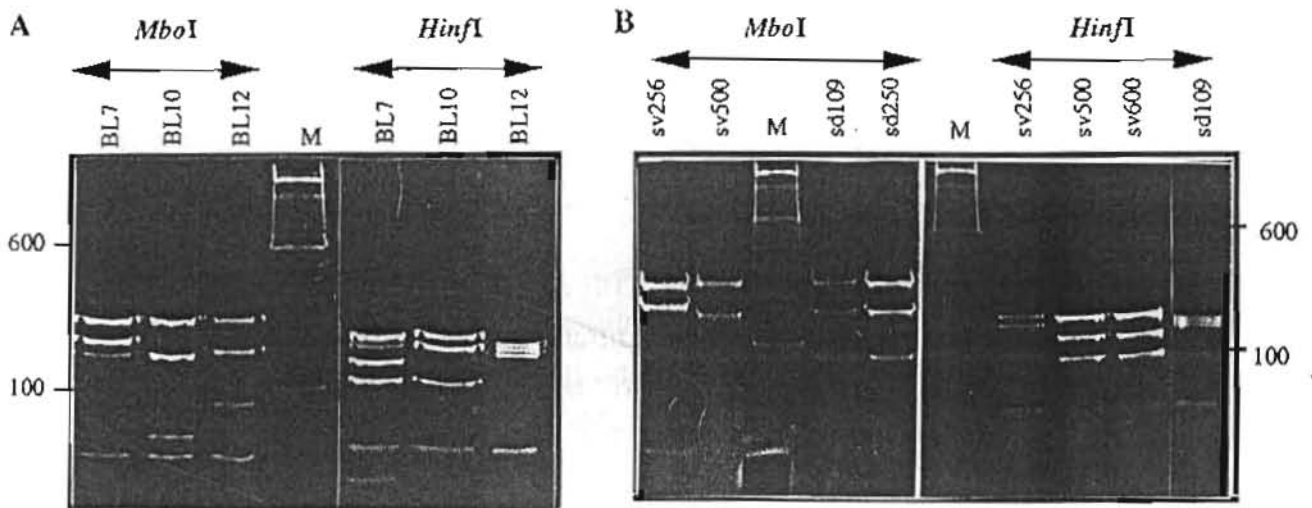
L'amplification de l'ITS des différents morphotypes de mycorhizes montre que toutes les mycorhizes de morphotype brun (BR2, BR3, BR8, BR10 et BR11) ont un ITS de 600 pb (fig. 4.13). Au contraire, les mycorhizes présentant le morphotype blanc regroupent un ensemble de taxa car elles présentent des ITS de longueur variée. La longueur de l'ITS varie entre 670 pb (BL9, BL12) et 760 pb (BL7). Le morphotype beige (BE12) présente un ITS identique à celui de BL9 et BL12.

La région IGS1 présente également un polymorphisme au niveau des mycorhizes blanches (fig. 4.13). Ainsi, la longueur de cette région est identique (470 pb) chez les deux morphotypes blancs BL9, BL12 et le morphotype beige (BE12). La taille de l'IGS1 (440 pb) des morphotypes bruns est identique à celle des morphotypes blancs (BL7, BL10 et BL11).

La digestion par *Hinf*I et *Mbo*I de l'IGS1 des morphotypes bruns génèrent tous un profil identique que nous n'avons pu identifier à aucun des profils des mycéliums en culture (résultats non montrés). Par contre, la digestion de l'IGS1 des morphotypes blancs par *Hinf*I et *Mbo*I donne trois types de profils (fig. 4.14). L'IGS1 des morphotypes BL10 et BL11 digérés par *Hinf*I et *Mbo*I génèrent respectivement 4 bandes de 182, 167 et 100 pb et 3 bandes de 238, 151 et 54 pb qui correspondent aux profils de digestion de l'IGS1 du ribotype <sup>B</sup>A de *S. verrucosum*. La digestion de l'IGS1 du morphotype blanc BL7 par *Hinf*I et *Mbo*I donne un profil qui s'identifie à celui des isolats de ribotype <sup>A</sup>B de *S. verrucosum* avec 3 bandes (182, 147 et 88 pb) et 2 bandes (228 et 178 pb) respectivement pour *Hinf*I et *Mbo*I. Les profils RFLP obtenus après digestion de l'IGS1 par *Hinf*I et *Mbo*I des morphotypes blancs (BL9 et BL12) et beige (BE12) sont semblables à ceux obtenus avec les ribotypes B de *S. dictyosporum*. En effet, la digestion de l'IGS1 de ces mycorhizes génèrent 3 bandes avec l'enzyme *Hinf*I (143, 135 et 128 pb) et *Mbo*I (228, 153 et 86 pb).



**Figure 4.13.** Variabilité des produits d'amplification de l'ITS et de l'IGS1 des morphotypes de mycorhizes de piégeage. M = marqueur de masse moléculaire (échelle de 100 pb). Gels d'agarose (1%)



**Figure 4.14.** Variabilité des produits de digestion de l'IGS1 (*MboI* et *HinfI*) des morphotypes blancs représentatifs des mycorhizes de piégeage (A) et des isolats de Sclérodermes (B) auxquels ils sont identifiés. M = marqueur de masse moléculaire (échelle de 100 pb). Gels acrylamide (8%)

#### 4.4. Discussion

Les espèces *S. dictyosporum* et *S. verrucosum*, homogènes d'un point de vue taxonomique, morphologique, présentent un polymorphisme intraspécifique important en terme de pouvoir mycorrhizogène (chapitre V). Outre un intérêt taxonomique évident, l'analyse de la structuration génétique des populations de ces deux espèces constitue donc une approche pertinente des interactions de ces symbiotes avec leur plante-hôte.

Disposant d'une collection d'isolats provenant de diverses origines géographiques et isolés sous une gamme d'hôtes, représentatives des forêts du Sud-Ouest du Burkina Faso, nous avons cherché à déterminer

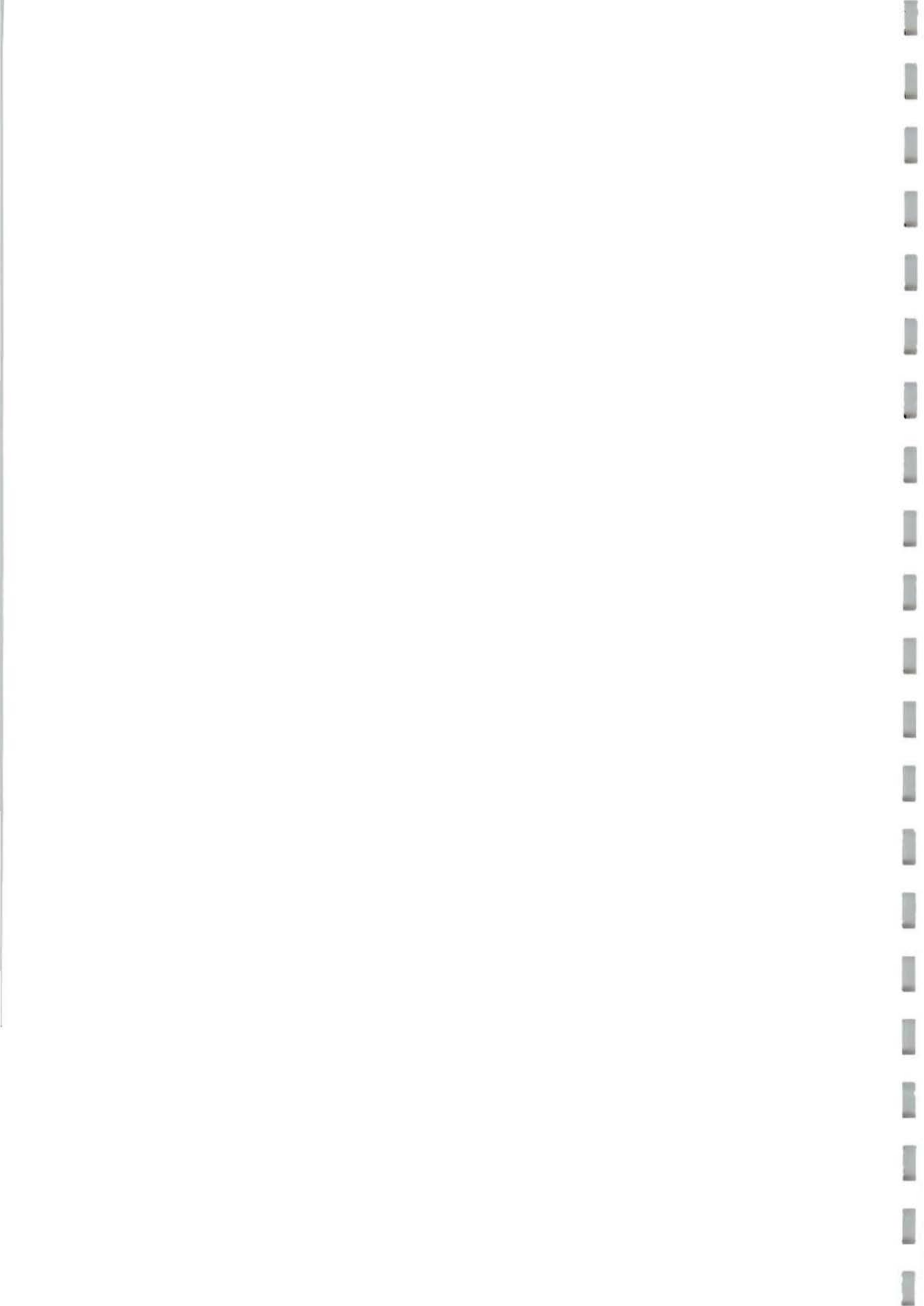
- le niveau de variabilité du génome de *S. dictyosporum* et *S. verrucosum*,
- s'il existait une corrélation entre le polymorphisme observé et une éventuelle spécificité d'hôte ou appartenance à un groupe fonctionnel,
- la correspondance entre morphotypes mycorrhiziens et appartenance taxonomique.

La réponse à ces questions a imposé un effort important de mises au point méthodologique sur un matériel étudié pour la première fois. Nous disposons désormais d'une panoplie d'outils moléculaires (PCR, RFLP, séquençage, RAPD) permettant l'identification de marqueurs génétiques présentant des taux d'évolution et des degrés de polymorphisme compatibles avec la résolution des problèmes posés.

La variabilité génomique d'une trentaine d'isolats a été caractérisée par une analyse comparative du polymorphisme obtenu par différentes approches : la RFLP de l'ITS et l'IGS1 de l'ADNr nucléaire, leur séquençage, et les profils RAPD.

Nous avons ainsi pu amplifier les régions intergéniques ITS et IGS1 de l'ADN ribosomique des espèces africaines de Sclérodermes à l'aide des amorces universelles ITS1/ITS4 et CNL12/5SA. Comme beaucoup de basidiomycètes mycorrhiziens (Karen *et al.*, 1997), la longueur de l'ITS des souches étudiées oscille entre 600 et 800 pb. L'IGS1 des Sclérodermes a une longueur voisine de 500 pb. L'IGS des *Pisolithus* qui appartiennent également aux Sclérodermatales présente une longueur voisine (Martin *et al.*, 1998b). Cette région est donc plus courte que chez les *Laccaria* (Henrion *et al.*, 1992) et d'autres espèces ectomycorhiziennes telles que *Tuber* spp. (Gandboeuf *et al.*, 1995). Di Battista (1997) a obtenu pour une espèce de *S. dictyosporum* (OXF5517) une longueur de 894 pb de la région ITS. Cette longueur est largement plus grande que celles des isolats de Sclérodermes du Burkina Faso et celui du Sénégal (sd7731). Par contre, l'ITS



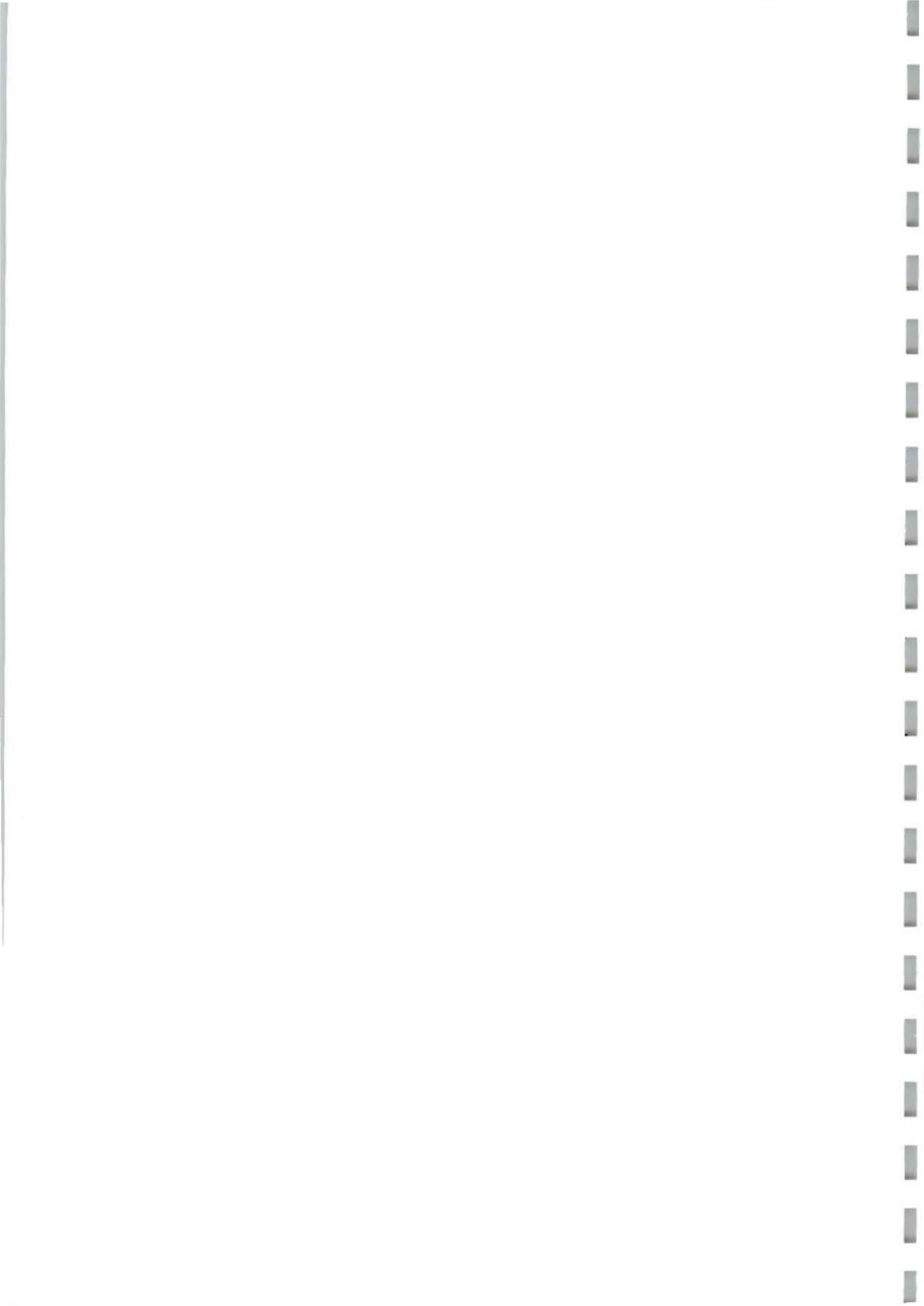


d'une autre espèce de *Scleroderma* (SEL), déterminé par cet auteur présente une taille de l'ITS assez proche (633 pb) des Sclérodermes du Burkina Faso.

Il est difficile d'identifier les isolats et certaines espèces les uns des autres par la longueur des seuls produits d'amplification comme déjà signalé chez la plupart des champignons ectomycorhiziens caractérisés par typage moléculaire (Henrion *et al*, 1992 ; Gardes *et al*, 1991b, Di Battista, 1997, Karen *et al*, 1997 ; Pritsch *et al*, 1997 ; Martin *et al*, 1998b). Cependant la RFLP de ces régions intergéniques a permis de différencier certaines souches. Nous avons pu ainsi regrouper les isolats (sd408, sv252, sd100 et sd510) à des espèces définies à partir de l'analyse comparative des profils de restriction. Ces isolats avaient été initialement identifiés à partir des caractéristiques morphologiques de leurs spores. Des taxa génétiquement très proches peuvent donc présenter des différences morphologiques remarquables.

Au sein de chacune des espèces, les isolats très proches ne sont pas différenciés après PCR/RFLP des régions intergéniques par les deux enzymes de restriction que nous avons utilisées. Les types ribosomiques identifiés semblent posséder une large répartition géographique au Burkina Faso et sont adaptés à différentes plantes-hôtes. Il ne semble pas exister de groupes génotypiques liés à la plante-hôte. Il est cependant possible que les deux enzymes utilisées soient insuffisantes pour révéler une différence entre isolats très voisins. Afin de vérifier l'importance du polymorphisme de l'ITS et de l'IGS1, nous avons utilisé le séquençage. L'analyse des séquences nucléotidiques de la région ITS de 13 isolats a confirmé la faible variabilité génétique entre isolats de la même espèce. L'alignement multiple des séquences ITS a permis d'étudier les relations phylogénétiques et de mettre en évidence la proximité génétique des isolats de *S. verrucosum* et *Scleroderma* sp1. Il a également permis de confirmer l'appartenance de ssp2-408 à *S. dictyosporum* et ssp3-252 à *S. verrucosum*.

Les résultats obtenus par RAPD confirment la variabilité inter- et intraspécifique des isolats de Sclérodermes observée par PCR/RFLP. Ces résultats montrent que la RAPD est un outil efficace pour l'identification intraspécifique des champignons ectomycorhiziens. En effet, quelques isolats de Sclérodermes que nous n'avions pas pu différencier par PCR/RFLP présentent des marqueurs RAPD différents permettant de les identifier (cas de sv252 de *S. verrucosum*, sd408 et sd7731 de *S. dictyosporum*, ssp1-406 de *Scleroderma* sp1). Cependant, certains isolats ne peuvent toujours pas être différenciés à l'aide des deux amorces que nous avons utilisées suggérant qu'ils appartiennent au même clone ou genet. Toutefois, il faudra vérifier l'absence de variation entre les phénotypes RAPD en utilisant d'autres amorces ou d'autres types de sondes (microsatellites, télomériques).

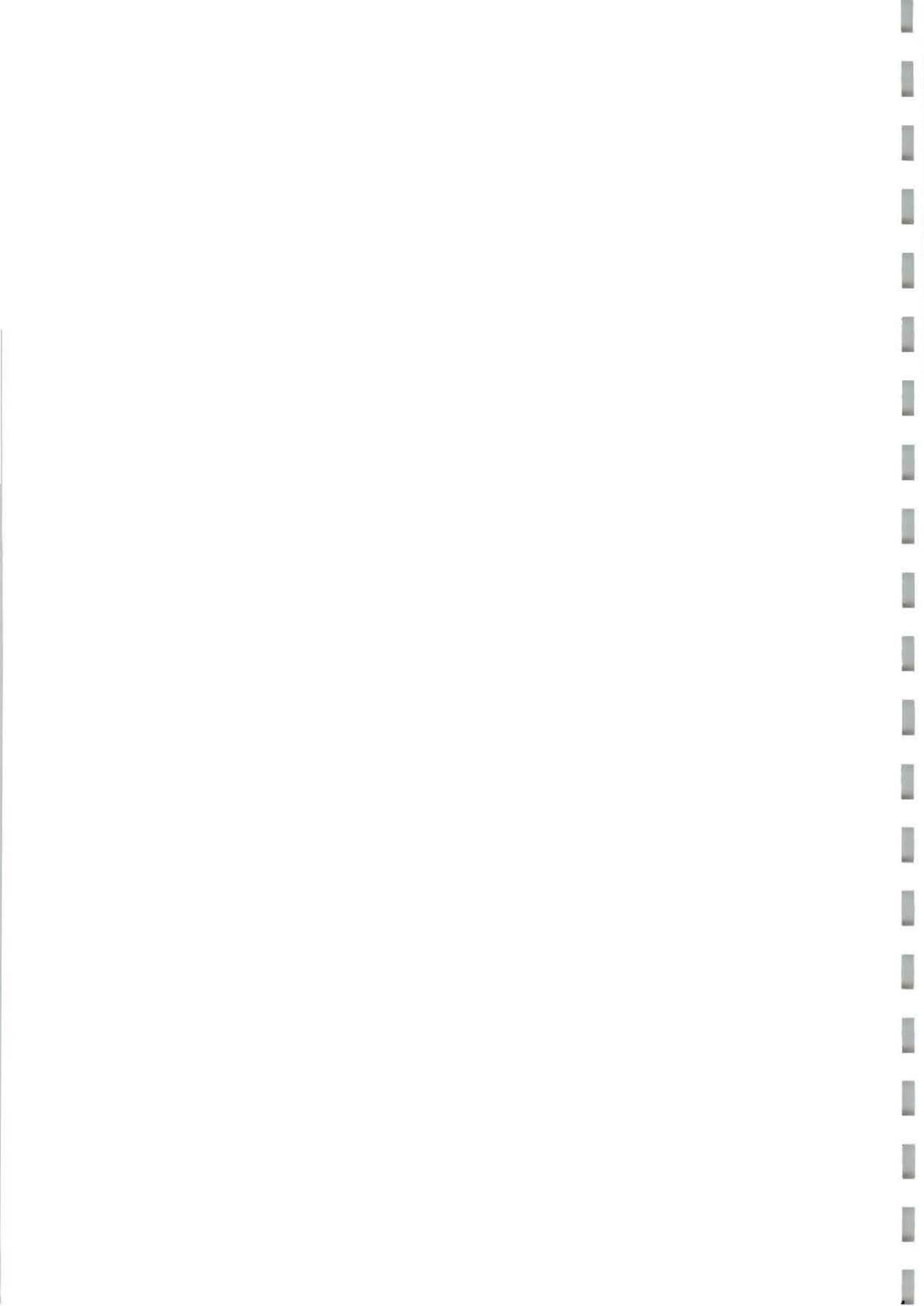


L'ensemble de ces données moléculaires indique que les espèces *S. dictyosporum* et *S. verrucosum* sont monophylétiques. Elles sont, au regard de leur séquence ITS, proches au plan évolutif car elles ne diffèrent entre elles que par moins de 40%. L'essentiel de la divergence réside dans quelques insertions d'une dizaine de nucléotides. Les populations de *S. dictyosporum* et *S. verrucosum* sont remarquablement homogènes compte-tenu de la distance (2 à 200 km) séparant les différents prélèvements de carpophores (ex. : sd109, sd250, sd412, sd602, ssp2-408, fig. 4.12A). L'homogénéité moléculaire des populations de Sclérodermes du Burkina Faso pourrait s'expliquer par une prédominance de la multiplication végétative sur la reproduction sexuée. Elle rappelle l'homogénéité moléculaire des trois types de Pisolithes mise en évidence dans la forêt claire de la plaine côtière du Kenya (Martin *et al.*, 1998b). Il reste à déterminer par quels mécanismes (phénomènes d'incompatibilité?) cette homogénéité moléculaire persiste au sein de ces populations de Sclérodermatales.

Enfin, aucun génotype n'est spécifiquement associé à *A. africana* ou à une autre plante-hôte étudiée.

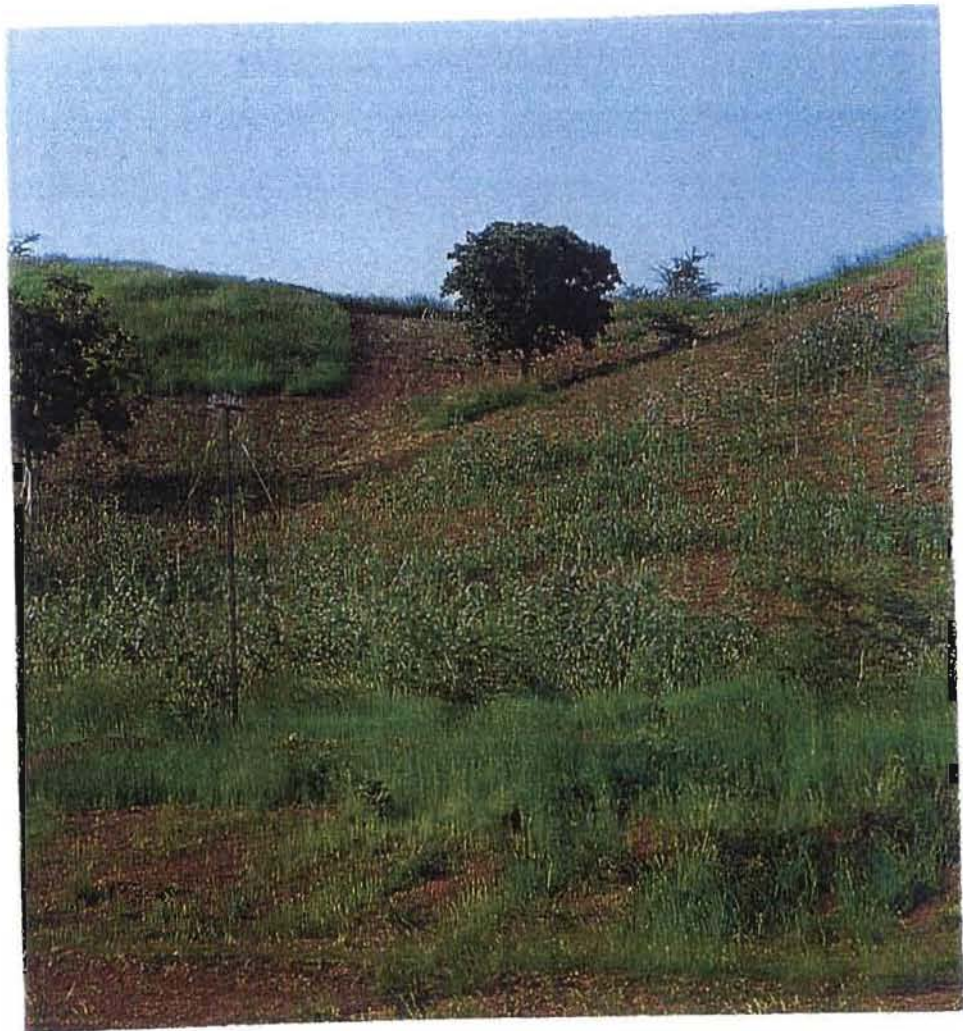
Pour les mycorhizes, les résultats montrent que les morphotypes bruns des différents sites sont dus à un même champignon. Par contre, les morphotypes blancs génèrent trois profils différents que nous avons identifiés à trois isolats de Sclérodermes (*S. dictyosporum* ribotype B, BE12, BL12 et BL9 ; *S. verrucosum* ribotype A, BL10 et BL11 et *S. verrucosum* ribotype B, BL7). Le morphotype beige (BE12) présente le même profil que le morphotype blanc du même site (BL12) et confirme l'hypothèse selon laquelle ce morphotype serait une mycorhize âgée du morphotype blanc. Comme indiqué par (Mehmann *et al.*, 1995), nous avons montré la correspondance entre un morphotype et une espèce fongique (morphotype brun) et un morphotype et plusieurs espèces fongiques (morphotype blanc).

Dans le chapitre précédent, l'utilisation des critères anatomo-morphologiques, en particulier la structure du manteau, avait permis de classer ces morphotypes blancs en 2 groupes. Cette classification différencie les morphotypes BL9 et BL12 qui pourtant sont dus à une même espèce fongique sur la base des données moléculaires. Ces résultats montrent la nécessité d'associer les deux types de critères (morphologique et moléculaire) à l'identification des champignons au niveau des mycorhizes. Les champignons précoces susceptibles de s'associer à *A. africana* au stade juvénile en plantation incluraient les Sclérodermes et le champignon responsable des mycorhizes brunes. La sélection de champignons pour la mycorhization contrôlée devrait s'orienter vers les Sclérodermes qui sont relativement faciles à isoler en culture pure.



*Chapitre V.*

*Effet de l'inoculation ectomycorhizienne sur la  
croissance et la nutrition minérale d'A. africana  
en pépinière.*



Kessler et Geerling (1994)

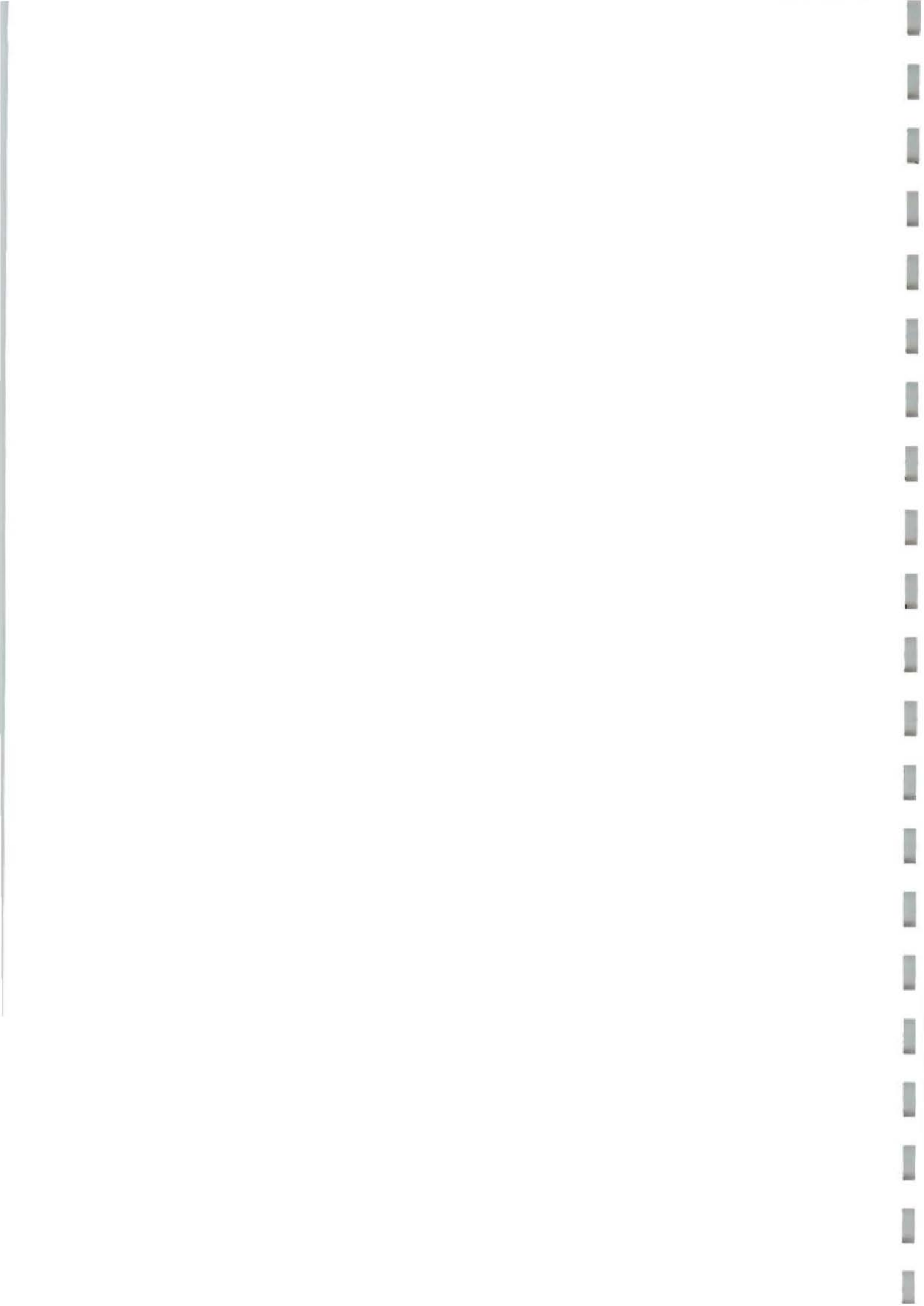


## 5.1. Introduction

Le rôle bénéfique de l'inoculation ectomycorhizienne sur la croissance et la nutrition minérale des plants forestiers a été mis en évidence grâce à la technique de mycorhization contrôlée (Garbaye, 1990). C'est une technique qui consiste à associer une souche fongique bien définie et compatible avec la plante-hôte dans des conditions contrôlées et à mesurer l'effet de ce champignon sur la croissance de l'hôte. Elle a permis ces dernières années de sélectionner des champignons compatibles pour la production de plants pour le reboisement (Garbaye *et al*, 1988 ; Garbaye, 1990a ; Le Tacon *et al*, 1992 ; Le Tacon *et al*, 1997 ; Palardé *et al*, 1997 ; Dell et Malajczuk, 1997). Les critères retenus pour la sélection des meilleurs champignons sont entre autres l'aptitude à la mycorhization des jeunes plants, l'effet bénéfique sur la croissance des plants inoculés et la teneur en éléments minéraux des différents organes des plants, en particulier le phosphore. Cette meilleure nutrition traduit une efficacité dans l'absorption de ces éléments par le champignon associé. Aussi, la longueur du réseau extramatriciel développé dans le sol par le mycosymbionte ou la proportion d'hyphes métaboliquement actifs dans le sol associée aux autres paramètres, sont également indiqués par certains auteurs comme pouvant caractériser l'efficacité du champignon (Jones *et al*, 1990 ; Hamel *et al*, 1990).

Cette technique est très largement utilisée en zone tempérée (France, Espagne, USA, Canada, ...) (Le Tacon *et al*, 1992). En revanche, elle a fait l'objet de très peu d'études sur les arbres tropicaux. Des résultats intéressants ont surtout été obtenus en pépinière avec des souches et/ou des essences exotiques. En Asie du Sud-Est, l'inoculation des plants d'*Hopea* spp (*Dipterocarpaceae*) avec une souche exotique de *Pisolithus tinctorius* a permis d'améliorer la croissance et la nutrition phosphatée de ces plantes-hôtes (Yazid *et al*, 1994). En Chine et aux Philippines, différents travaux ont mis en évidence l'efficacité de souches fongiques australiennes (*Pisolithus* spp., *Hydnagium* spp.) dans l'amélioration de la croissance d'eucalyptus en plantation (Dell et Malajczuk, 1997). En Afrique tropicale, une expérience de terrain réalisée au Congo a permis de montrer que l'inoculation en pépinière par *Pisolithus tinctorius* augmentait la production en volume d'un hybride d'eucalyptus de près de 30% (Garbaye *et al*, 1988). Cependant, ce Pisolithe Nord Américain a été remplacé par un Scléroderme local. Ceci implique la nécessité d'introduction de souches fongiques ayant coévoluées avec les eucalyptus tropicaux dans leur aire d'origine. Au Sénégal, la première tentative d'inoculation d'*Afzelia africana* avec un champignon introduit, *Pisolithus tinctorius* n'a pas donné de résultats concluants (Sary, 1989). Il n'existe pratiquement pas de données publiées sur le





rôle des champignons ectomycorhiziens vis-à-vis des arbres indigènes d'Afrique ; Bâ (1990) a montré l'effet bénéfique de l'inoculation ectomycorhizienne sur la croissance et la nutrition minérale d'*A. africana* cultivé en serre à l'INRA de Nancy. Ces résultats ont toutefois besoin d'être éprouvés dans des conditions de pépinière en zone tropicale. C'est pourquoi nous avons comparé en pépinière l'efficacité de trois Sclérodermes isolés au Burkina Faso avec la souche fongique ORSXM002 isolée au Sénégal et qui s'est montrée la plus performante en serre. Ces champignons ont été testés pour leur effet sur la croissance et la nutrition minérale de deux provenances d'*A. africana* : Sénégal (AaSN) et Burkina Faso (AaBF).

## 5.2. Matériels et méthodes

### 5.2.1. Souches fongiques

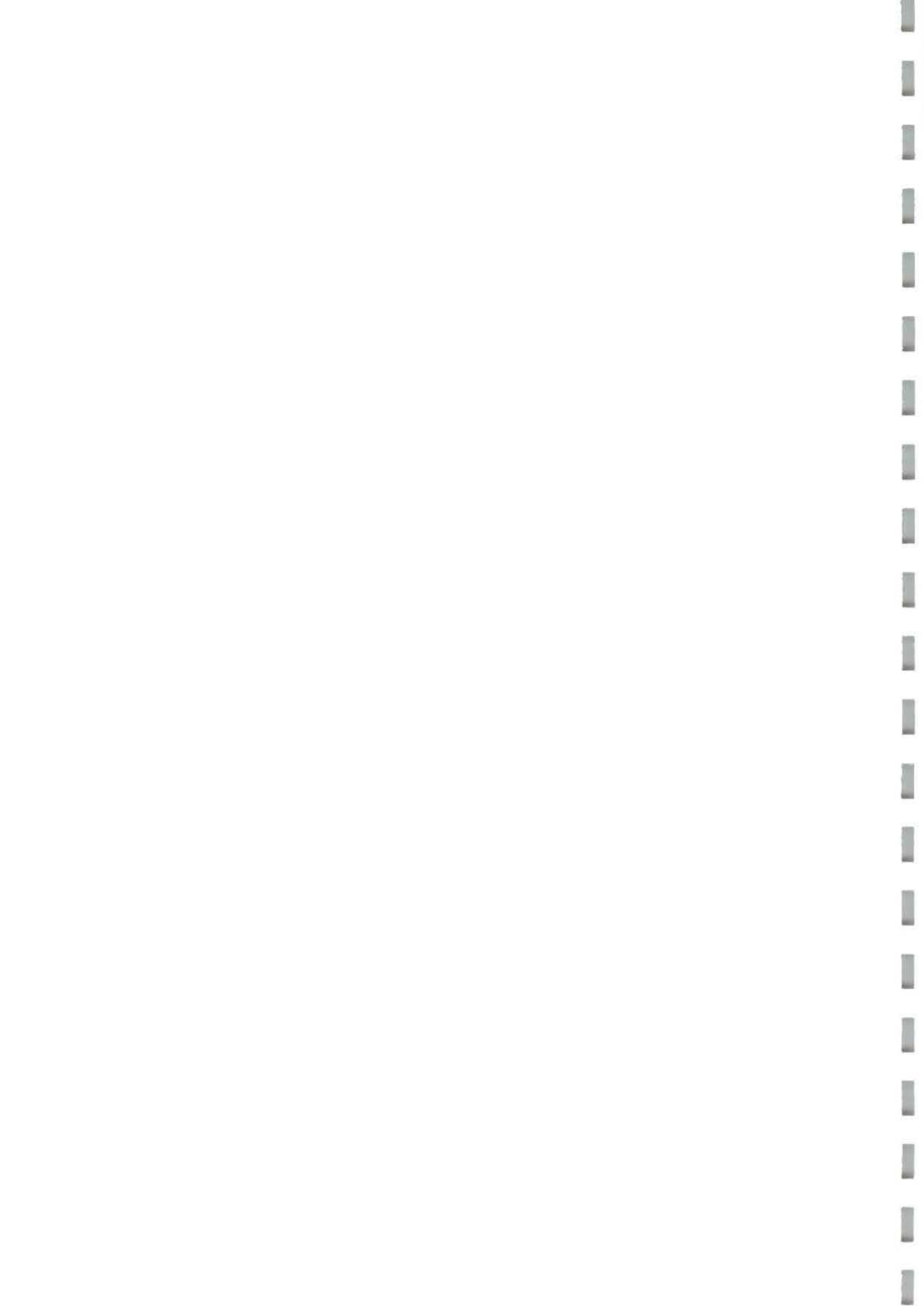
Parmi les souches fongiques dont le mycélium végétatif a pu être isolé en culture pure (cf. Chapitre II), nous avons choisi, à cause de leur croissance rapide, les isolats IR109 et IR408 de *Scleroderma dictyosporum* et IR406 de *Scleroderma* sp1. Tous ces isolats sont issus de carpophores récoltés sous *A. africana* (IR109) et *Uapaca guineensis* (IR406 et IR408) au Sud-Ouest du Burkina Faso (Sanon *et al*, 1997). Nous avons également utilisé un champignon ectomycorhizien (ORSXM002) identifié à un Telephoraceae (cf. chapitre IV) qui a été isolé d'ectomycorhizes d'*A. africana* piégées sur un sol du Sud du Sénégal (Bâ et Thoen, 1990). Ces isolats sont maintenus en culture sur un milieu MNM (cf. Chapitre II).

### 5.2.2. Matériel végétal

Les graines des deux provenances ont été gracieusement fournies par le CNSF (Centre National de Semences Forestières, Burkina Faso, provenance Nazinga) et par le CNRF (Centre National de Recherche Forestière, Sénégal, provenance Diatock). Les graines ont été scarifiées avec de l'acide sulfurique 95%, rincées à l'eau de robinet et mises à germer dans les conditions décrites précédemment (Chapitre II).

### 5.2.3. Préparation de l'inoculum fongique

Pour la préparation de l'inoculum ectomycorhizien, nous nous sommes basés sur la méthode décrite par Duponnois et Garbaye (1991). Le mycélium végétatif est repiqué sur milieu gélosé MNM (quatre implants par boîte) et incubé à 30°C pendant deux à trois



semaines. Des bocaux de 800 ml sont remplis à moitié avec un mélange de tourbe et de vermiculite (1/4 ; v/v) et autoclavés à 120°C pendant 20 min. Après refroidissement, 300 ml de milieu liquide MNM sont additionnés au contenu des bocaux qui sont de nouveau autoclavés. Une dizaine d'implants fongiques de mycélium végétatif de chaque souche sont repiqués dans chaque bocal. Les bocaux inoculés sont hermétiquement fermés et incubés à l'étuve à 30°C. Il sont agités régulièrement au fur et à mesure que le champignon colonise le substrat afin d'améliorer la croissance du mycélium.

#### 5.2.4. Substrat de culture et inoculation

Le mycélium colonise entièrement le substrat après 2 à 3 mois de culture et l'inoculum est mélangé au sol de la pépinière afin d'assurer la mycorhization des semis. Le sol utilisé a été prélevé (0-20 cm) à Sangalkam (région de Dakar) en zone de savane où *A. africana* est absent des formations végétales. Les caractéristiques physico-chimiques de ce sol sont présentées sur le tableau 5.1. Le sol a été tamisé et mélangé à l'inoculum (10 : 1, v/v). Le mélange est distribué dans des sachets en polyéthylène de 2 litres et arrosé à l'eau de robinet. Les graines prégermées y sont repiquées à raison de 2 graines par gaine. Dix jours après repiquage des graines, le nombre de plantules est réduit à une par gaine.

Table 5.1. Quelques caractéristiques physico-chimiques du sol de Sangalkam (Sénégal).

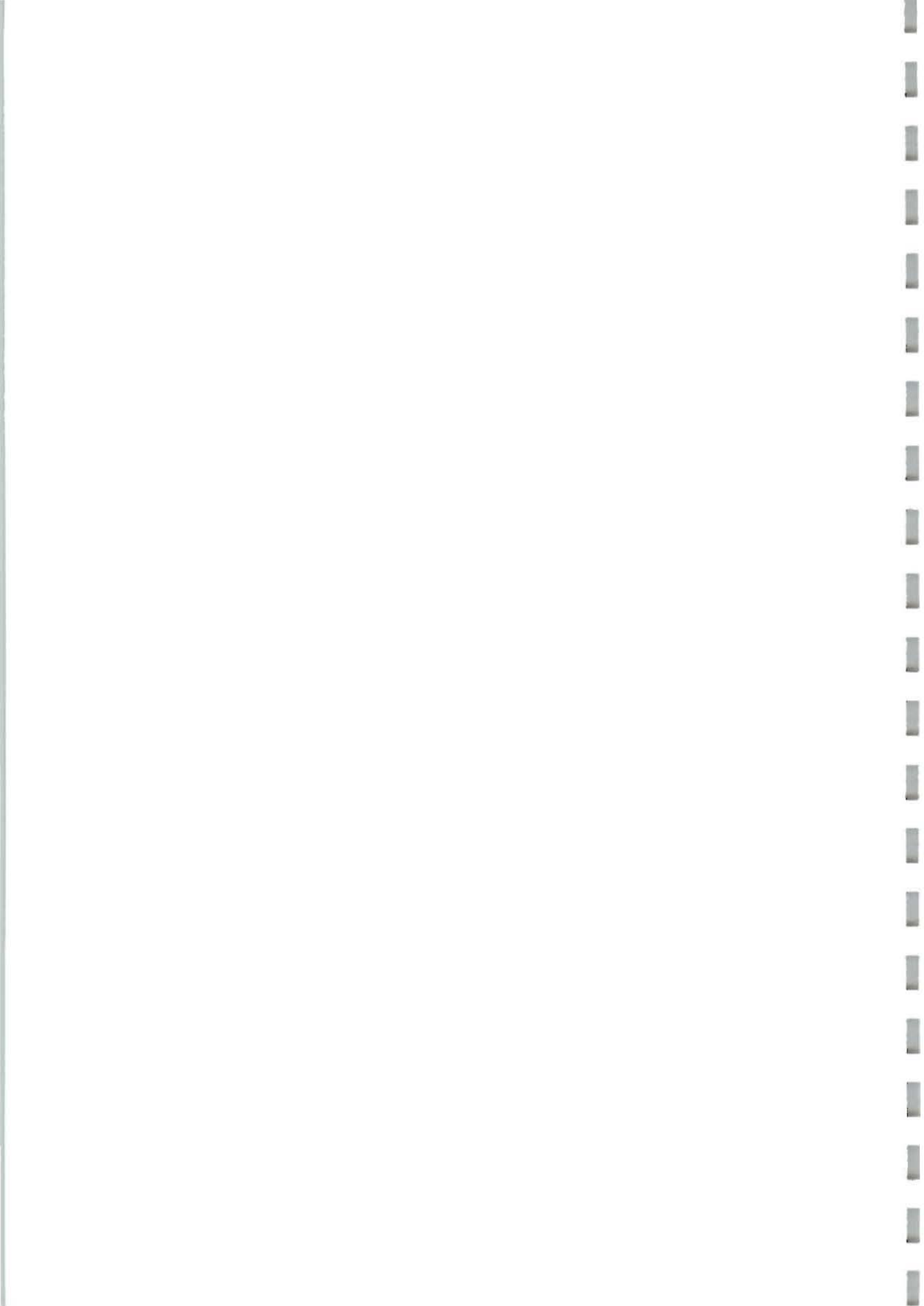
Argile	Limon	Sable	pH (H <sub>2</sub> O)	pH (KCl)	C total (%)	N total (%)	MO total(%)	C/N	P total (%)	P. ass.* (ppm)	V (%) **
5,4	5,8	88,8	6,03	4,61	0,39	0,027	0,68	14	41,92	2,15	47

\* méthode Bray 1

\*\* Capacité d'échange cationique. MO = matière organique.

#### 5.2.5. Dispositif expérimental

Chacune des provenances d'*A. africana* a été inoculée avec les 4 souches fongiques (*Sclerotium dictyosporum*, IR109 et IR408 ; *Sclerotium sp1*, IR406 et ORSXM002) plus le témoin non inoculé ayant reçu un mélange de tourbe et de vermiculite arrosé de milieu MNM. Chaque traitement a été répété 10 fois. Le dispositif expérimental est de type factoriel (2 provenances d'*A. africana* x 5 champignons) et les traitements ont été disposés au hasard sur une tablette métallique sous un abri grillagé non étanche dans les



conditions climatiques de Dakar (Sénégal) de Mai à Août (température moyenne journalière 25-30°C, photopériode environ 12h). L'arrosage a été effectué tous les deux jours.

### 5.2.6. Paramètres mesurés

L'expérience a duré 4 mois. A la récolte, des paramètres de croissance ont été mesurés : hauteur des plants et diamètre au collet. La masse de matière sèche des feuilles, des tiges et des racines a été mesurée après séchage à l'étuve pendant 72 h à 80°C. Nous avons également mesuré la dépendance mycorhizienne [(biomasse des plants inoculés - biomasse des plants non inoculés) x 100 / biomasse des plants inoculés] (Plenchette, 1983). Les feuilles séchées sont broyées et des éléments minéraux (N, P, K, Ca et Mg) dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique (Ca et Mg), spectrophotométrie d'émission de flamme (K) et colorimétrie autoanalyseur (N et P) au laboratoire de l'ICRISAT (Niamey, Niger).

Pour l'évaluation du taux de mycorhization, les racines latérales sont soigneusement débarrassées des débris de sol et échantillonnées. Cinq racines latérales, découpées du pivot et composées elles mêmes de racines de premier et deuxième ordre sont prélevées au hasard et observées sous la loupe binoculaire. Cent à 200 apex radiculaires sont examinés. Le nombre de racines courtes mycorhizées par rapport au nombre total de racines courtes est noté et permet d'exprimer le taux de mycorhization en pour cent.

L'évaluation de la longueur totale du réseau extramatriciel est réalisée sur cinq répétitions choisies au hasard par traitement. Cinq échantillons de sol ont été prélevés dans chaque sachet à l'aide d'une mini-tarière (1 cm de diamètre et 10 cm de profondeur). Les échantillons de sol sont ensachés et conservés à -20°C jusqu'à l'utilisation pour l'extraction du mycélium extramatriciel. L'extraction du mycélium est réalisée selon la méthode décrite par Thomson *et al* (1994). Dix g de sol de chaque échantillon sont mis en suspension dans 500 ml d'eau, puis agités vigoureusement pendant 1 min. Après 1 à 2 min de décantation, une aliquote de 10 ml est filtrée sous vide sur un filtre de 0,45 µm pour retenir le mycélium. Le filtre est ensuite coupé en deux et la face ayant retenue le mycélium est coloré au bleu trypan à 0,05% (p/v) dans du lactoglycérol et conservé à 4°C pendant une nuit. Chaque moitié de filtre est montée entre lame et lamelle dans du glycérol à 50% et observée au microscope (40x) équipé d'un oculaire gradué. La longueur totale du réseau extramatriciel a été évaluée selon la formule de Newman (1966) :  $R = pNA/2H$  où R est la longueur totale du réseau extramatriciel, N est le nombre de fois que les filaments coupent la ligne de graduation de l'oculaire dans les différentes

**Tableau 5.2.** Effet de l'inoculation de 3 souches fongiques de sclérodermes : *S. dictyosporum* IR109 et IR408, *Scleroderma* sp1 IR406 et la souche indéterminée ORSXM002 sur la croissance des plants inoculés de AaBF et AaSN

	Hauteur (cm)	Diamètre au collet (cm)	Matière sèche racines (g)	Matière sèche tige (g)	Matière sèche totale (g)	Matière sèche racine/tige	Taux de mycorbization (%)	Croissance relative (%)
<b>AaBF</b>								
Témoin	38,98 b	0,64 a	1,76 c	4,39 b	6,15 b	0,40 b	00 c	100
<b>NM*</b>								
IR109	41,97 ab	0,65 a	2,83 bc	4,98 ab	7,81 ab	0,58 ab	69 a	126,9
IR406	44,96 ab	0,69 a	2,53 bc	5,20 ab	7,74 ab	0,49 b	32 b	125,7
IR408	47,78 a	0,70 a	3,29 ab	5,71 a	9,01 a	0,58 ab	64 a	146,3
ORSXM002	42,75 ab	0,69 a	3,98 a	5,12 ab	9,10 a	0,78 a	46 ab	147,9
<b>AaSN</b>								
Témoin	52,60 a	0,64 a	1,73 b	4,62 a	6,33 a	0,37 b	00 c	100
<b>NM*</b>								
IR109	46,85 a	0,61 a	2,07 ab	4,27 a	6,34 a	0,47 ab	58 a	100,17
IR406	47,80 a	0,64 a	2,71 ab	4,23 a	6,95 a	0,64 a	38 ab	109,6
IR408	52,40 a	0,77 a	2,17 ab	4,86 a	7,03 a	0,44 ab	22 bc	110,9
ORSXM002	52,78 a	0,63 a	2,92 a	5,26 a	8,18 a	0,55 ab	64 a	129,2

Chaque valeur est la moyenne de 10 répétitions par traitement. Dans la même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (SAS, Test de Bonferroni).

NM = non mycorhizé

**Tableau 5.3.** Comparaison des deux provenances au niveau des différents paramètres de croissance et de la concentration en éléments minéraux des feuilles.

	Hauteur (cm)	Diamètre au collet (cm)	Poids sec racines (g)	Poids sec tige (g)	Poids sec total (g)	Rapport racine/tige	Taux de mycorbization (%)
AaBF	43,28 b	0,68 a	2,88 a	5,08 a	7,96 a	0,57 a	0,42 a
AaSN	50,48 a	0,66 a	2,32 b	4,65 b	6,97 b	0,49 b	0,36 a
	N (%)	P (%)	Ca (%)	K (%)	Mg (%)		
AaBF	2,023 b	0,115 a	2,114 b	1,536 b	0,593 a		
AaSN	2,168 a	0,114 b	2,345 a	1,731 a	0,586 a		

Dans la même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de Bonferroni).

positions (une fois verticalement et deux fois horizontalement pour chaque filtre), A est la surface examinée (celle du filtre) et H est la longueur totale de la ligne de graduation de l'oculaire dans les 3 positions.

Les données sont soumises à une analyse de variance et les moyennes sont comparées avec le test de Bonferroni au seuil de 5%.

### 5.3. Résultats

#### 5.3.1. Taux de mycorhization et longueur totale du réseau extramatriciel

A la fin de l'expérience de mycorhization contrôlée d'*A. africana*, aucune mycorhize n'a été observée sur les plants témoins suggérant l'absence dans le sol non désinfecté de champignons ectomycorhiziens compatibles avec *A. africana*. Les deux provenances d'*A. africana* ont réagi différemment aux différentes souches fongiques.

Le taux de mycorhization des deux provenances varie à peu près dans les mêmes proportions, 32% à 69% pour AaBF et 22% à 64% pour AaSN (tableau 5.2).

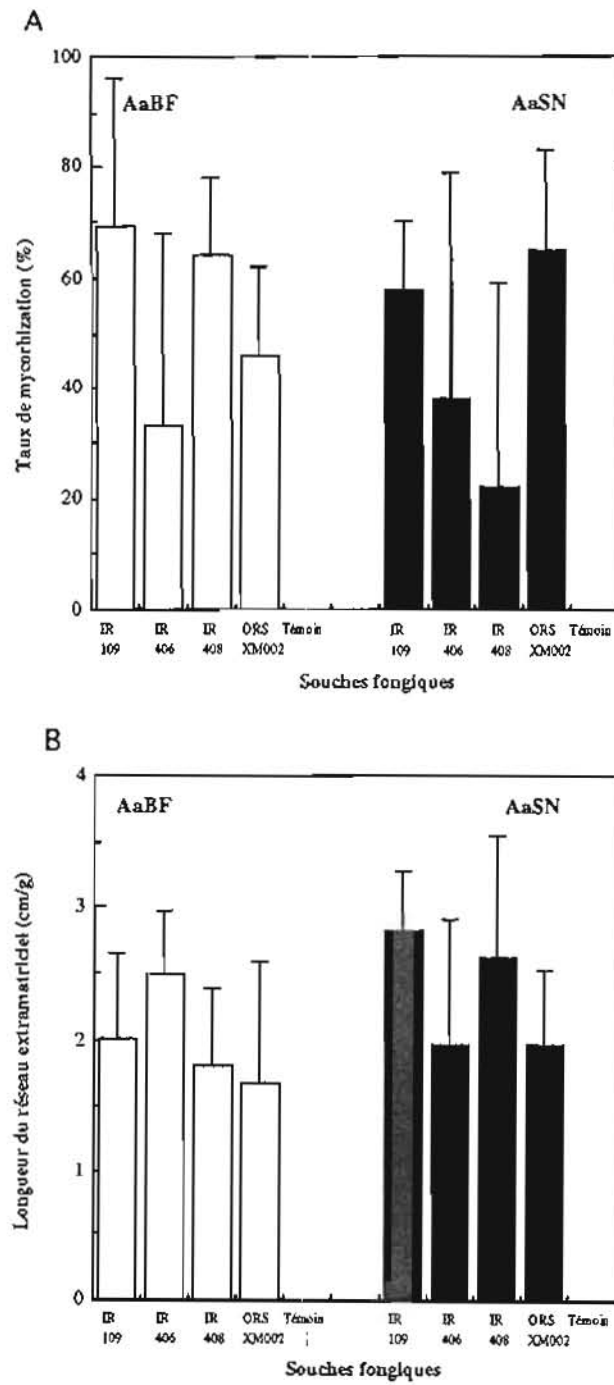
Pour la provenance du Burkina Faso (AaBF), les meilleurs taux de mycorhization ont été obtenus avec les souches de *Scleroderma dictyosporum*, IR109 (69%) et IR408 (64%). La souche indéterminée ORSXM002 mycorhize moyennement AaBF avec un taux de 46%. *Scleroderma* sp1 IR406 présente un taux plus faible de 32%.

Les souches IR408 et IR406 donnent les taux de mycorhization les plus faibles (22% et 32%) avec la provenance *A. africana* sénégalaise (AaSN). IR109 et ORSXM002 induisent des taux de mycorhization élevés : 58% et 64%.

Ainsi une forte interaction souche fongique/provenance est mise en évidence pour ce paramètre (Fig. 5.1A). La souche IR408 par exemple mycorhize fortement la provenance sénégalaise et très faiblement la provenance burkinabé. Nous n'avons décelé aucune différence significative entre les champignons étudiés au niveau de la longueur du réseau extramatriciel développé dans le substrat (Fig. 5.1B).

Pour ces deux paramètres (taux de mycorhization et longueur du réseau extramatriciel), il n'y a pas de différence significative entre les deux provenances indépendamment des souches fongiques (tableau 5.3).





**Figure 5.1.** Taux de mycorhization (A) et longueur du réseau extramatriciel (B) des plants des deux provenances d'*A. africana* inoculés avec 4 souches fongiques (IR109, IR406, IR408 et ORSXM002)

### 5.3.2. Morphologie des mycorhizes

Les mycorhizes formées par les différentes souches sont de forme monopodiale et pyramidale. Les mycorhizes des Sclérodermes IR250 et IR408 présentent une couleur jaune pâle avec un manteau plus ou moins lisse. Par contre, les mycorhizes d'IR406 gardent la couleur blanche caractéristique des mycorhizes de Sclérodermes au stade juvénile (cf. chapitre III). Des mycorhizes brunes claires à brunes foncées caractéristiques ont été obtenues avec la souche ORSXM002. Le manteau présente des soies raides. D'abondants cordons mycéliens ont été observés pour chacune des souches. Les mycorhizes formées par ORSXM002 présentent un manteau à structure pseudoparenchymateuse plus ou moins épaisse en fonction de l'âge (Bâ, 1990). Cependant, les coupes effectuées sur les jeunes mycorhizes d'*A. africana* avec les Sclérodermes testés (cf. chapitre III) montrent un manteau peu épais à structure prosenchymateuse (IR109 et IR408) ou plus épais avec deux couches de manteau, prosenchymateux externe et pseudoparenchymateux interne (IR406). Malgré ces deux couches de manteau, la mycorhize d'IR406 présente un manteau plus lâche par rapport à ORSXM002.

### 5.3.3. Effet de la mycorhization sur la croissance des plants

L'inoculation se traduit par une stimulation de la croissance en hauteur des plants inoculés d'AaBF, mais seul *S. dictyosporum* IR408 stimule cette croissance de façon significative (tableau 5.2, fig. 5.2A). A l'inverse, pour AaSN aucune souche fongique n'a stimulé la croissance des plants de manière significative. L'inoculation n'a pas d'effet sur le diamètre au collet pour les deux provenances d'*A. africana* (tableau 5.2).

De tous les paramètres, la biomasse racinaire est le plus influencée par l'inoculation. En effet, les plants des deux provenances inoculés avec la souche fongique indéterminée ORSXM002 présentent une masse de matière sèche des racines significativement supérieure à celle des plants témoins. Il en est de même pour les plants d'AaBF inoculés avec *S. dictyosporum* IR408 (fig. 5.2B). Cette stimulation de la biomasse racinaire n'est cependant pas corrélée avec le taux de mycorhization.

Le rapport des masses de matière sèche des racines et des tiges (fig. 5.2C) traduit une influence de la mycorhization dans la répartition de biomasse entre la partie aérienne et la partie souterraine des plants inoculés avec ORSXM002 et IR406 respectivement pour les provenances AaBF et AaSN.

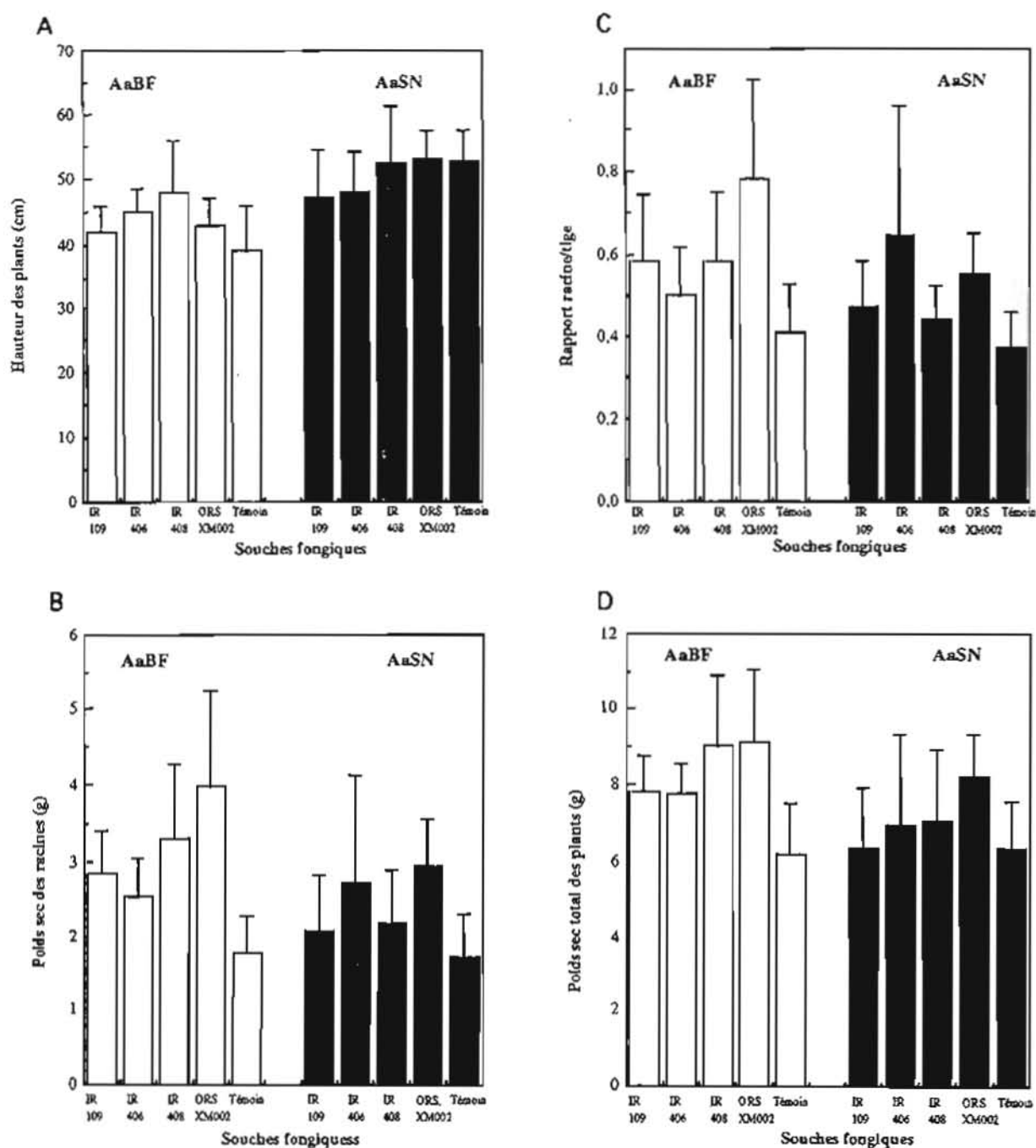


Figure 5.2. Hauteur des plants (A), poids sec des racines (B), rapport racine:tige (C) et poids sec total (D) des plants des deux provenances d'*A. africana* inoculés avec 4 souches fongiques (IR109, IR406, IR408 et ORSXM002)

La mycorhization induit un gain en matière sèche totale des plants inoculés, de 25,7% à 47,9% pour AaBF et 0,17% à 29,2% pour AaSN, par rapport aux plants témoins (tableau 5.2, fig. 5.2D). Ceci se traduit par une augmentation significative de la biomasse totale pour les plants d'AaBF inoculés avec les souches IR408 et ORSXM002. Cependant cette stimulation de biomasse n'est pas significative pour les plants d'AaSN inoculés.

L'effet provenance montre que AaSN a une croissance en hauteur significativement supérieure à AaBF (tableau 5.3). Cependant pour les autres paramètres de croissance (hormis le diamètre au collet), la provenance burkinabé présente les meilleures performances.

La dépendance mycorhizienne (tableau 5.4) montre que la croissance des plants de la provenance burkinabé dépend de 20 à 30% de l'inoculation mycorhizienne. Par contre, pour la provenance sénégalaise, sa croissance dépend de seulement 22,2% avec la souche ORSXM002. La croissance des plants de cette provenance due à l'inoculation par les Sclérodermes est très faible, voire nulle (0% pour IR109 à 10% pour IR408).

#### 5.3.4. Concentration en éléments minéraux des feuilles des deux provenances d'*A. africana*.

La concentration des feuilles en éléments minéraux (N, P, K, Ca et Mg) est un effet plus ou moins affectée par l'inoculation ectomycorhizienne (tableau 5.5). Comme pour les paramètres de croissance et le taux de mycorhization, les variations de la concentration en éléments minéraux est fonction des souches fongiques et des provenances d'*A. africana*.

La concentration en K des plants des deux provenances inoculés avec l'une ou l'autre des souches fongiques est significativement plus importante que celle des plants témoins. La souche fongique *Scleroderma* sp1 IR406 a un impact particulièrement bénéfique sur les deux provenances, ainsi que *S. dictyosporum* IR408 sur la provenance AaSN. La concentration en N et Ca est significativement stimulée par les souches isolées sous *U. guineensis* IR406 et IR408 pour la provenance sénégalaise et seulement par la souche IR406 pour la provenance burkinabé. Pour les deux provenances, AaBF et AaSN, seule l'inoculation avec les souches IR408 et IR109 augmentent la concentration en P de façon significative. Les concentrations en Mg les plus élevées ont été obtenues avec *S. dictyosporum* IR109 et *Scleroderma* sp1 IR406 pour AaBF et *S. dictyosporum* IR408 pour AaSN. Pour N, Ca et K, l'effet positif de la mycorhization sur les deux provenances se traduit par une concentration plus importante des plants de la provenance

**Tableau 5.4.** Dépendance mycorhizienne (DM) des deux provenances d'*A. africana* (AaBF et AaSN) inoculées avec 4 souches fongiques (IR109, IR408, IR406 et ORSXM002).

	AaBF					AaSN				
	Témoin NM*	IR109	IR406	IR408	ORS XM002	Témoin NM*	IR109	IR406	IR408	ORS XM002
DM (%)	0	21,7	20,7	32	32	0	0	8	10	22,2

DM = dépendance mycorhizienne. NM = non mycorhizé

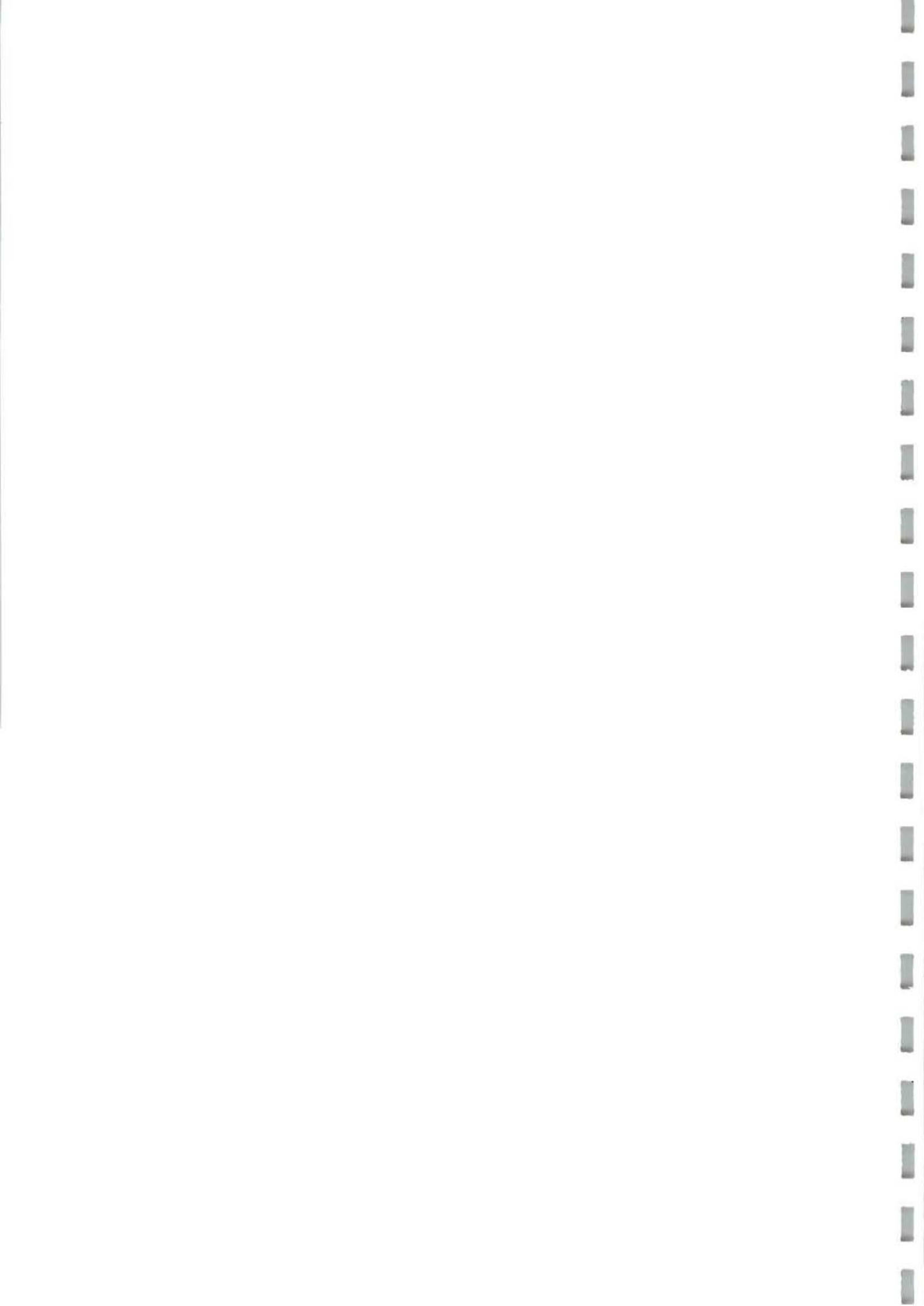
**Tableau 5.5.** Concentration en N, P, K, Ca et Mg (%) des feuilles

	N (%)	P (%)	Ca (%)	K (%)	Mg (%)
<b>AaBF</b>					
Témoin NM*	2,024 b	0,108 b	2,008 b	1,021 c	0,507 b
IR109	1,960 b	0,115 b	2,136 b	1,414 b	0,653 a
IR406	2,337 a	0,099 b	2,658 a	2,129 a	0,655 a
IR408	1,944 b	0,145 a	1,776 b	1,661 b	0,565 ab
ORSXM002	1,854 b	0,108 b	1,996 b	1,455 b	0,586 ab
<b>AaSN</b>					
Témoin NM*	1,900 c	0,100 b	2,204 b	1,135 c	0,537 b
IR109	2,035 c	0,132 a	1,828 b	1,552 b	0,552 b
IR406	2,281 b	0,101 b	2,838 a	2,052 a	0,622 ab
IR408	2,540 a	0,114 ab	3,093 a	2,111 a	0,646 a
ORSXM002	2,087 bc	0,122 ab	1,764 b	1,807 ab	0,572 ab

Chaque valeur est la moyenne de 10 répétitions par traitement. Dans la même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de Bonferroni).

NM = non mycorhizé

AaSN. Par contre, la concentration en P est plus importante pour la provenance AaBF et aucune différence significative n'existe entre les deux provenances pour la concentration en Mg (tableau 5.3).



## 5.4. Discussion

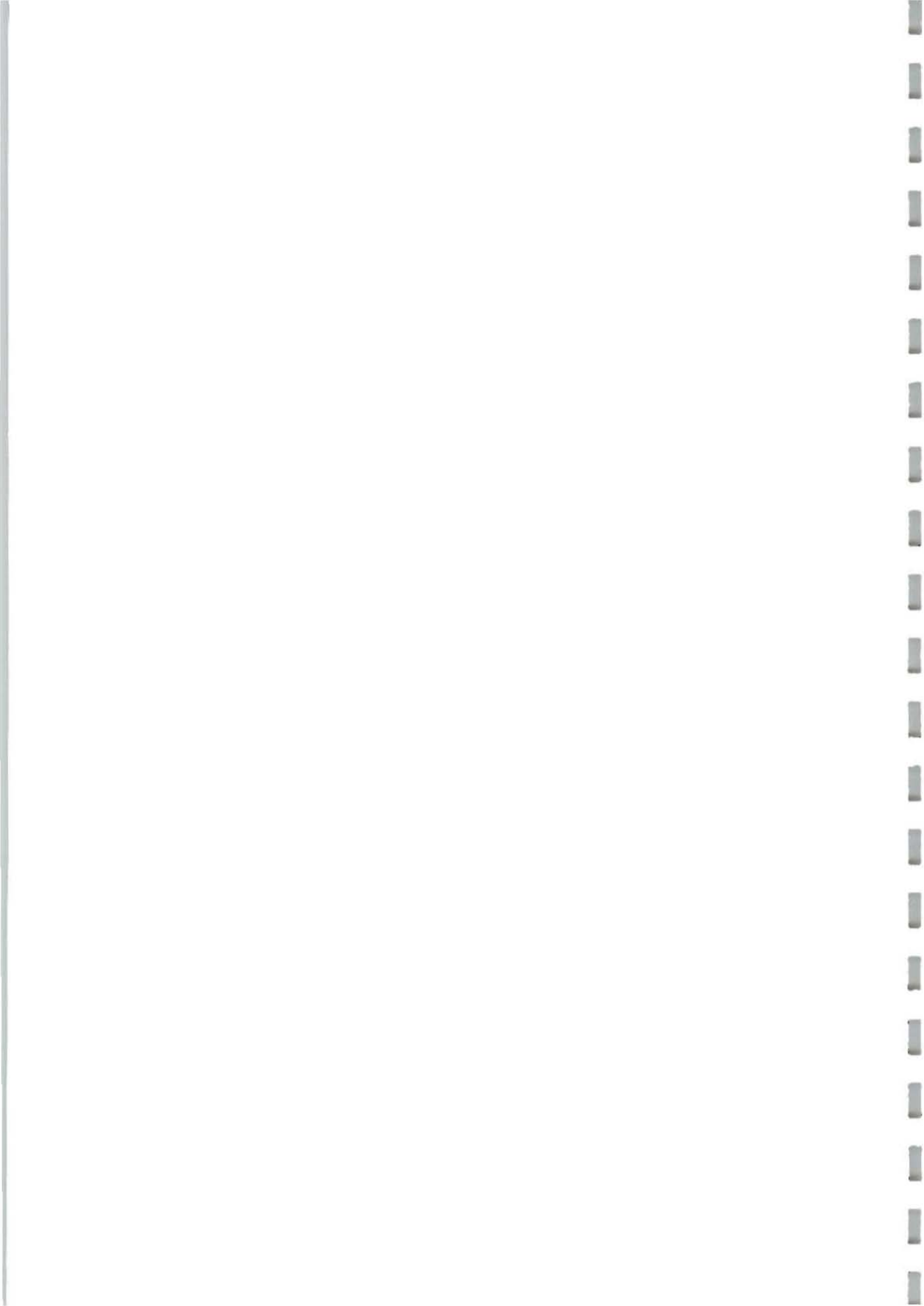
L'inoculation contrôlée des deux provenances d'*A. africana* avec les quatre souches fongiques sélectionnées s'est traduite par une accumulation de biomasse de 0,17% à 47,9%, avec des taux de mycorhization variant de 22% à 69%. Cependant, les souches présentant les plus forts taux de mycorhization n'induisent pas toujours les meilleurs gains de croissance. Nous avons obtenu, au bout de 4 mois, un gain de biomasse des plants de la provenance d'*A. africana* du Burkina Faso (47,9%) inoculés par la souche ORSXM002 plus important que celui obtenu au bout de 5 mois avec une autre provenance du Sénégal (39%) également sur sol non désinfecté (Bâ, 1990). Par contre, dans notre étude, la croissance de la provenance sénégalaise est faiblement stimulée par la mycorhization (10,9%). Ces différences pourraient être liées à l'effet provenance et/ou aux conditions expérimentales. En effet, Bâ (1990) a utilisé au cours de son expérience une autre provenance sénégalaise (Bayottes). De plus, cette expérience a été réalisée dans des conditions de serre.

La provenance d'*A. africana* du Burkina Faso apparaît plus sensible à l'inoculation ectomycorhizienne (25% à 48% de gain de biomasse) que celle du Sénégal (0,17% à 29,24%). Cependant les plants d'AaSN inoculés ou non présentent une croissance en hauteur plus importante que ceux de la provenance burkinabé (tableau 5.3). Ceci se traduit par une différence significative entre les deux provenances pour la hauteur des plants.

La mycorhization semble avoir très peu d'effet sur la croissance en hauteur des plants d'*A. africana* par rapport à la masse de matière sèche racinaire qui est significativement stimulée par la souche ORSXM002 chez les deux provenances malgré un taux de mycorhization peu élevé pour la provenance du Burkina Faso. Ceci est probablement dû au type de mycorhizes formées par la souche ORSXM002. Bâ (1990) a également obtenu la biomasse racinaire la plus importante avec cette souche fongique indéterminée comparée à un isolat de *Scleroderma dictyosporum* (ORS7731).

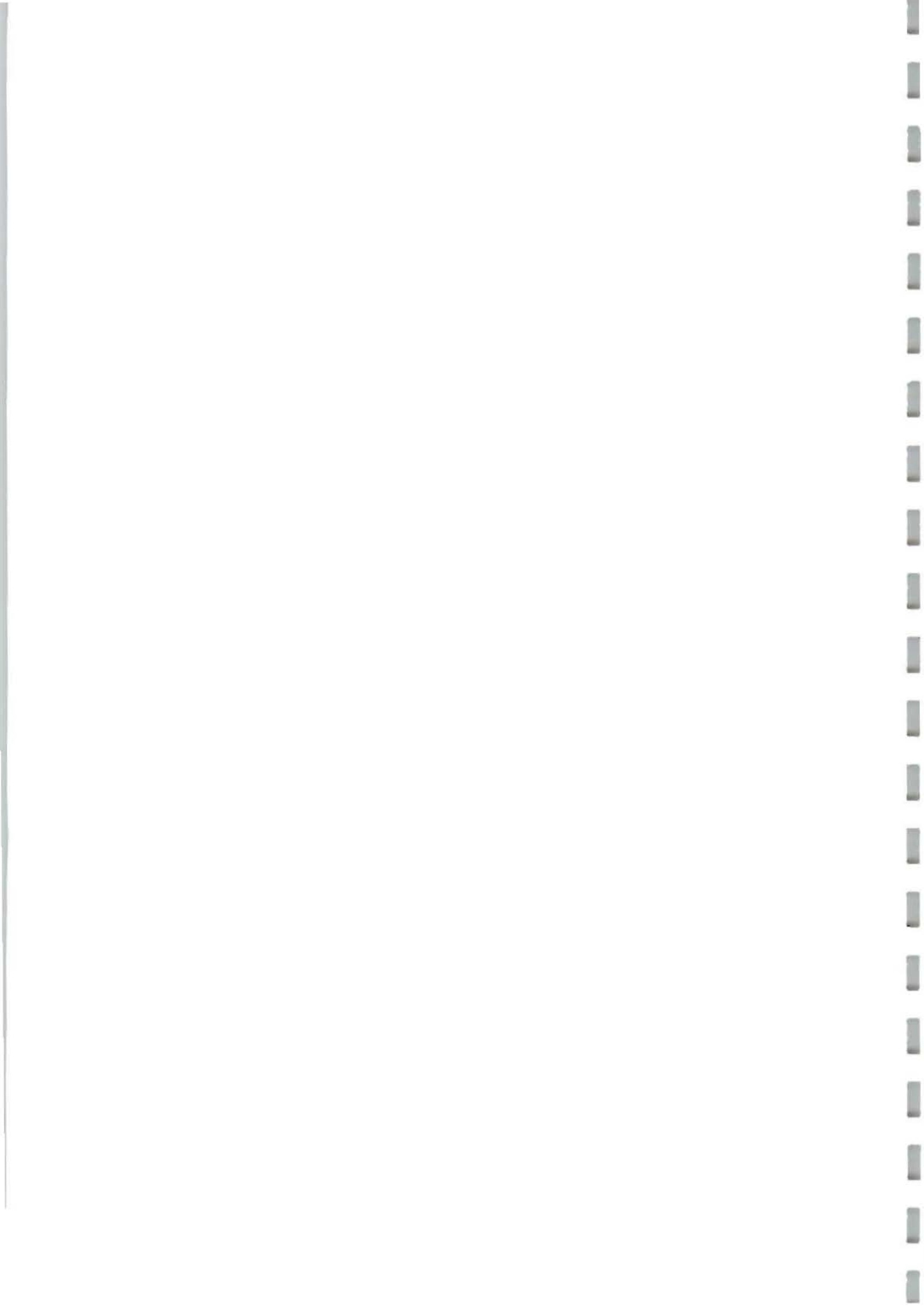
L'efficacité d'une souche fongique a été corrélée par d'autres auteurs avec l'importance du réseau extramatriciel développé dans le sol (Jones *et al*, 1990 ; Hamel *et al*, 1990 ; Colpaert *et al*, 1992). Par contre dans notre étude, aucune différence significative de la longueur du mycélium extramatriciel n'a été décelée entre les différentes souches.





Nous avons obtenu une variabilité importante entre les souches dans la concentration en éléments minéraux des feuilles qui n'est pas corrélée avec le taux de mycorhization (résultats non présentés). Ces résultats (concentration en P et N) vont dans le sens de ceux qui sont obtenus par différents auteurs (Burgess *et al*, 1993 ; Thomson *et al*, 1994). Les souches IR109 et IR408 améliorent respectivement la nutrition phosphatée des plants d'AaSN et AaBF. Pour les autres éléments minéraux, IR406 et/ou IR408 apparaissent plus efficaces.

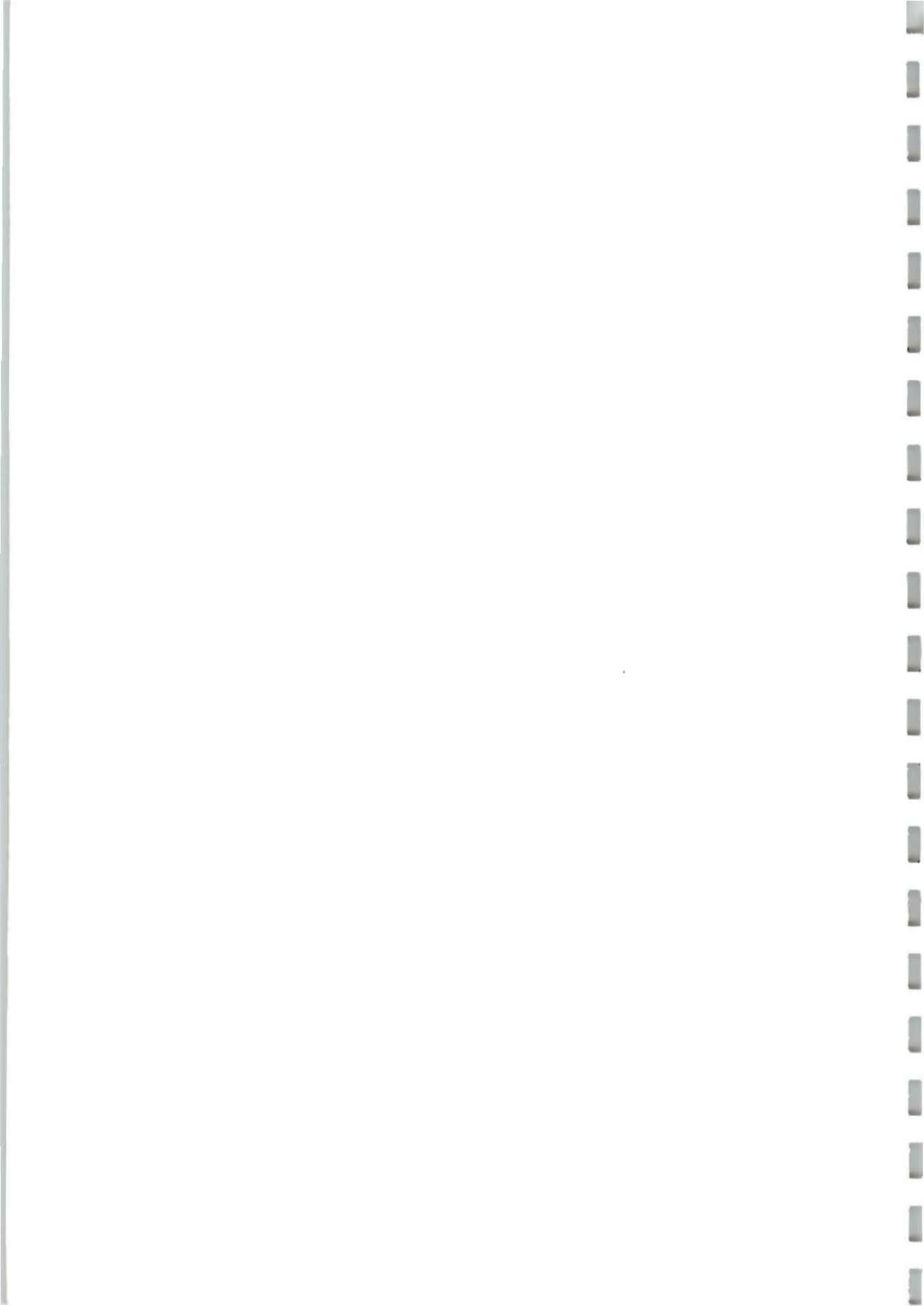
Nos résultats montrent que la croissance d'*A. africana* en pépinière est stimulée par certaines souches locales de Sclérodermes et l'isolat indéterminé ORSXM002. Ce dernier résultat confirme les données acquises par Bâ (1990) en conditions de serre sur un sol non issu de l'aire de forêts à *A. africana*. Nous avons obtenu une variabilité importante entre les deux provenances d'*A. africana* dans la réponse à l'inoculation mycorhizienne qui pourrait s'expliquer par la différence de croissance initiale et la dépendance mycorhizienne. L'utilisation de souches fongiques, suffisamment efficaces pour que leur présence sur le système racinaire induise un gain de la croissance des deux provenances d'*A. africana*, devra s'orienter vers ORSXM002 et IR408. Cependant, notre étude a été effectuée sur un sol non représentatif des conditions naturelles de sol des forêts à *A. africana* ; il serait donc intéressant de réaliser ces essais dans des conditions variées afin d'évaluer l'adaptabilité et la compétitivité des souches fongiques. La technique de mycorhization utilisée permet d'obtenir des plants d'*A. africana* bien mycorhizés. Cette technique pourrait être utilisée pour la production des plants d'*Azelia* pour le reboisement en Afrique tropicale après évaluation de gain de croissance induit par les champignons inoculés en plantation.



## *Conclusion Générale et Perspectives*



Kessler et Geerling (1994)



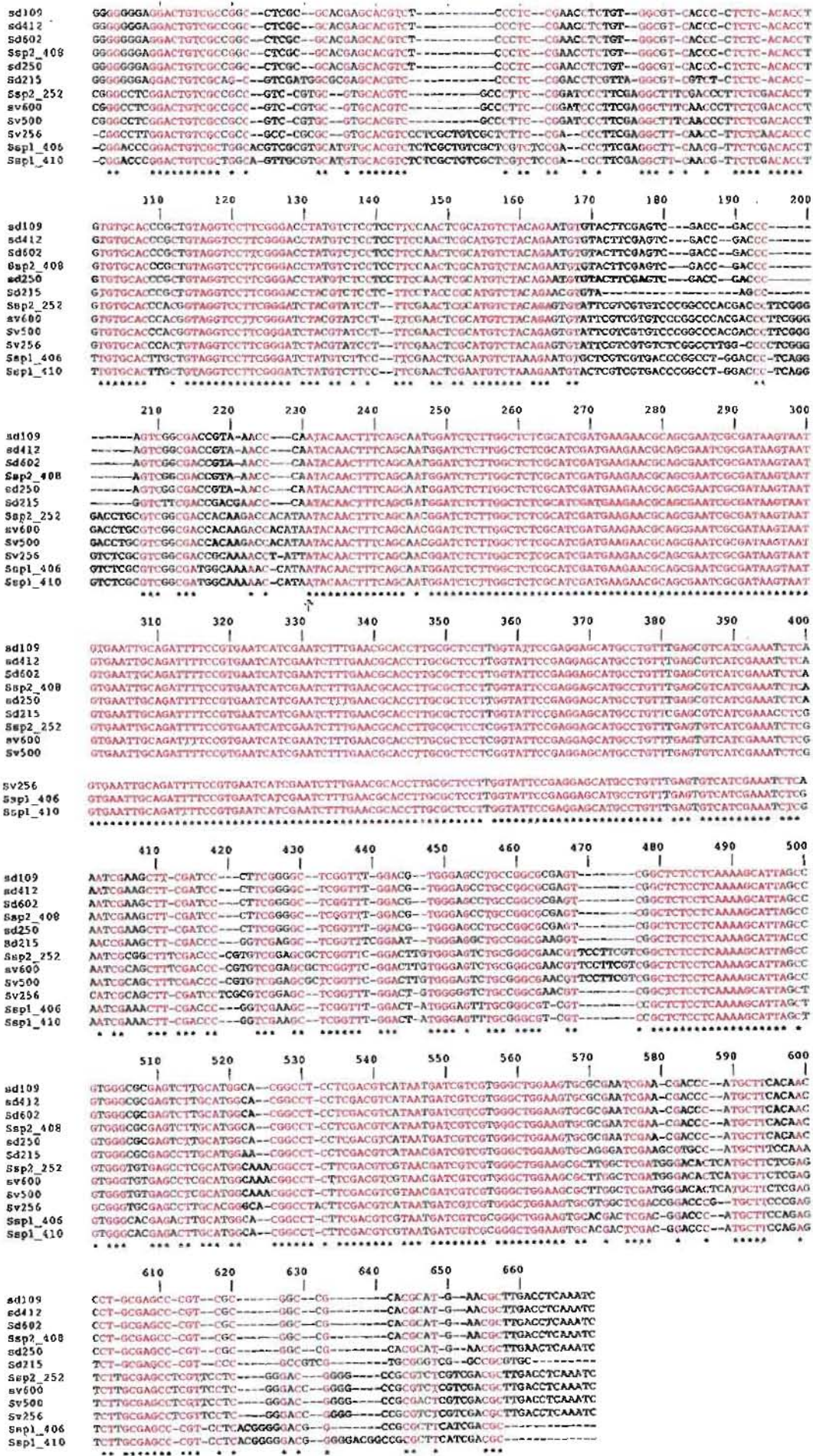


Figure 1. Alignement multiple des séquences de l'ITS de l'ADNr nucléaire des Sclérodermes par ClustalW.

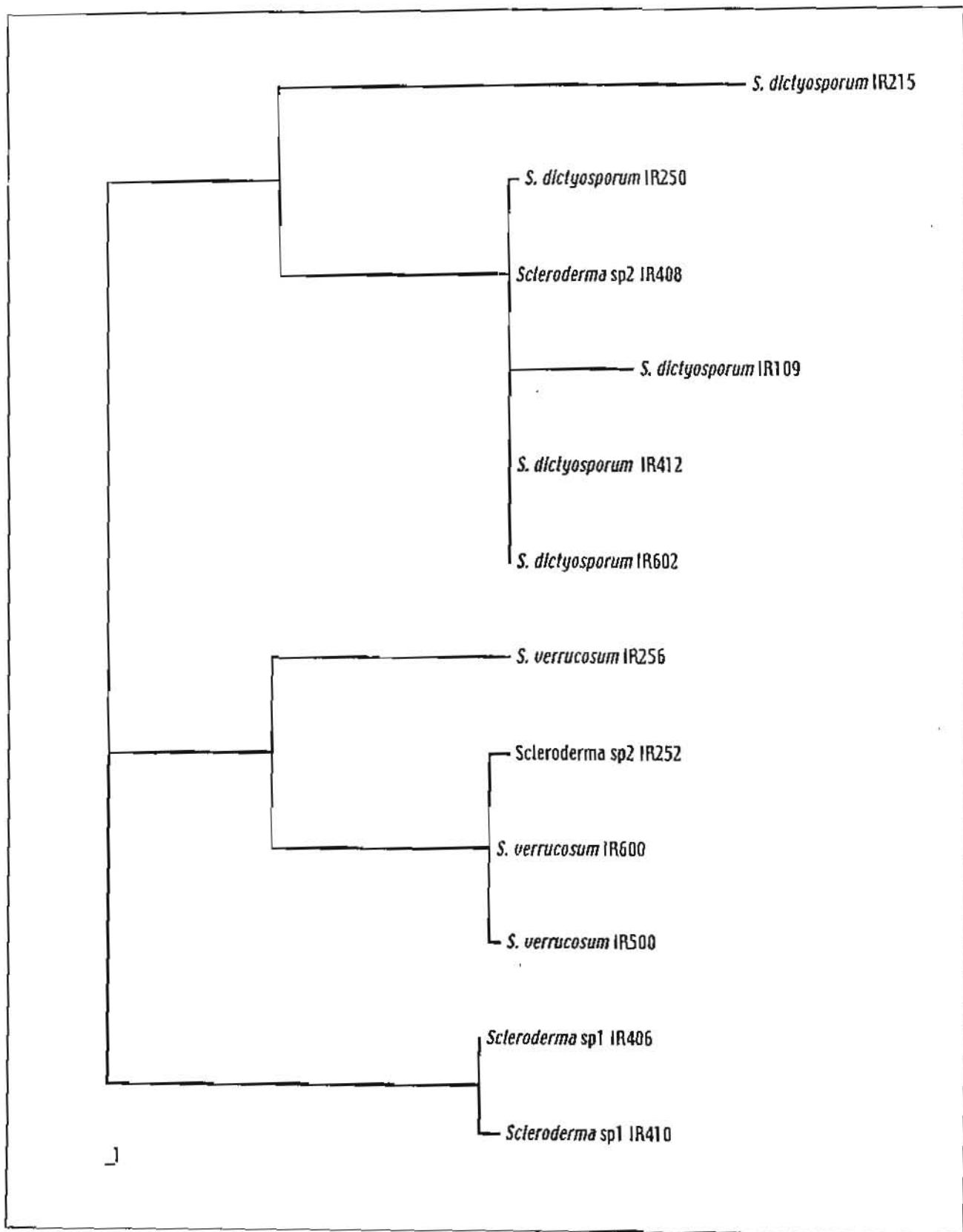


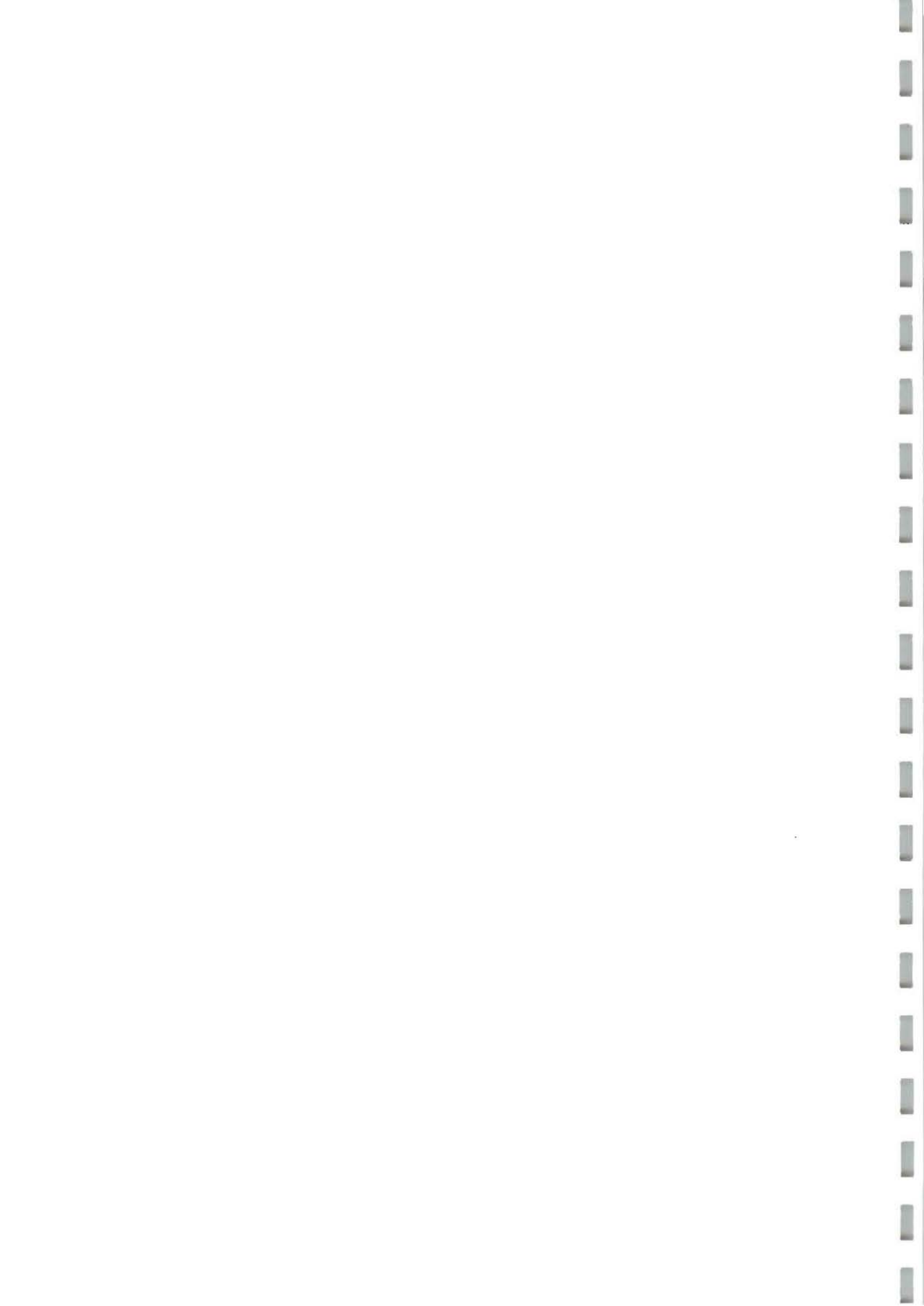
Figure 2. Phylogramme des ITS de l'ADNr nucléaire des Sclérodermes. Méthode heuristique de parcimonie (PAUP 3.1.1). L'alignement a été réalisé par ClustalW.

Au cours de ce travail, nous avons identifié pour la première fois les champignons ectomycorhiziens associés à six plantes-hôtes au Sud-Ouest du Burkina Faso. Tous les champignons récoltés appartiennent à des genres ectomycorhiziens déjà identifiés et certains ont été identifiés au niveau spécifique par rapport à un herbier de référence au Sénégal. Une trentaine d'espèces fongiques constituent notre collection et sont maintenues dans un herbier au Laboratoire de Microbiologie de l'INERA/DPF au Burkina Faso. Nous avons observé une faible diversité spécifique des champignons récoltés par rapport à d'autres régions de l'Afrique de l'Ouest (Sud du Sénégal, Fouta-Djalou) malgré la durée de prospection (3 saisons de fructification). Cette faible diversité pourrait être liée aux conditions géoclimatiques différentes de ces régions et aussi à la fluctuation de la fructification des champignons ectomycorhiziens d'une année à l'autre en zone peu humide.

Notre inventaire a révélé une abondance relative des espèces du genre *Scleroderma* par rapport aux autres (6 espèces morphologiques, *Scleroderma dictyosporum*, *S. verrucosum*, *Scleroderma* sp1, *Scleroderma* sp2, *Scleroderma* sp4, *Scleroderma* sp5). Aussi, ce sont principalement ces espèces que nous avons pu maintenir en culture (17 isolats). Elles sont peu spécifiques car elles ont été fréquemment rencontrées sous pratiquement toutes les plantes-hôtes. Seule l'espèce indéterminée, *Scleroderma* sp1, n'a été identifiée que sous *Uapaca guineensis*. Leur facilité d'isolement en culture pure fait d'eux des candidats potentiels pour des tests de mycorhization contrôlée. Par conséquent, notre travail s'est orienté sur ces Sclérodermes dont nous avons étudié l'anatomie et la morphologie des mycorhizes formées avec *Afzelia africana*. Nous avons ensuite comparé ces mycorhizes de Sclérodermes à celles obtenues par cultures pièges. La diversité génétique des Sclérodermes a été estimée dans le but d'un suivi écologique après plantation. L'effet de certaines souches sur la croissance d'*Afzelia africana* en pépinière, une espèce très appréciée et utilisée dans les reboisements a été évalué.

La capacité mycorhizogène des isolats représentatifs des espèces identifiées a été mise en évidence vis-à-vis de certaines plantes-hôtes (*A. africana*, *A. quanzensis*, *Isobertinia doka*, *I. dalziellii* et *Brachystegia speciformis*). Ces résultats montrent que les

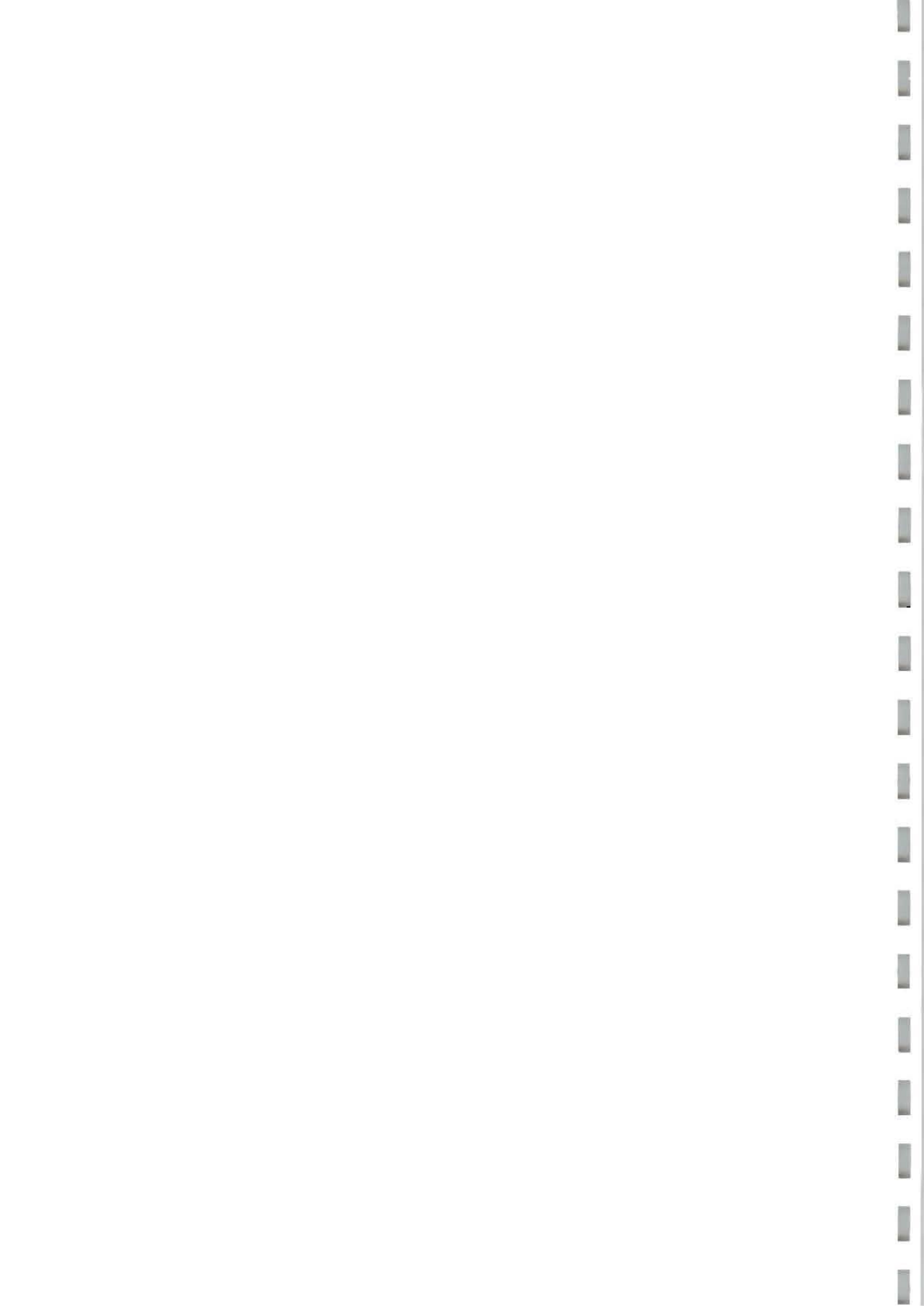




Sclérodermes sont peu spécifiques et peuvent être considérés comme des champignons précoces capables de mycorhizer les jeunes plants d'une large gamme d'hôtes et de se maintenir sur les pieds adultes. Nous avons ensuite effectué des expériences de piégeage sur des sols de 8 sites expérimentaux afin d'identifier les champignons précoces, qui incluraient les Sclérodermes, susceptibles de s'associer aux jeunes plants d'*A. africana* dans les forêts du Sud-Ouest du Burkina Faso. Deux principaux morphotypes de mycorhizes, blanc et brun ont été identifiés soit simultanément sur le même site soit séparément. Nous avons supposé que le morphotype blanc était induit par des Sclérodermes car ce morphotype est voisin des mycorhizes de synthèse obtenues entre *A. africana* et des isolats de Sclérodermes. Cependant les études anatomiques montrent que certains morphotypes blancs (BL7, BL10, et BL12) et bruns (BR3) présentent une organisation anatomique proche de celle des mycorhizes de synthèse avec les isolats de *S. dictyosporum* IR109, IR250 et IR408. La structure pseudoparenchymateuse uniforme du manteau des autres morphotypes blancs ne permet pas de les identifier aux mycorhizes formées par l'isolat IR406. L'ultrastructure des mycorhizes de synthèse et de certaines mycorhizes de piégeage a mis en évidence des zones physiologiquement actives (manteau, réseau de Hartig et cellules corticales de l'hôte vivants). Cependant, certaines sont dégénérantes avec des hyphes du manteau ou des cellules corticales mortes (BL9, BR8, IR109 et IR406). Compte tenu de l'âge des mycorhizes de synthèse, nous avons lié la dégénérescence des cellules corticales à la zone de coupe. Les observations faites sur les caractéristiques anatomo-morphologiques suggèrent que différentes espèces fongiques sont impliquées au niveau de ces mycorhizes et ces critères paraissent insuffisants pour les identifier avec certitude. Nous avons alors utilisé l'approche moléculaire (PCR/RFLP) à l'identification des champignons impliqués dans ces mycorhizes de piégeage, essentiellement les morphotypes blancs.

L'étude de la diversité génétique des différents isolats et des carpophores de Sclérodermes par amplification génique des régions ITS et IGS1 et leur digestion par les enzymes *HinfI* et *MboI* a permis d'identifier deux à quatre ribotypes caractéristiques (A, B, C et D) parmi les isolats de chaque espèce. Nous avons noté un plus grand nombre de ribotype B pour *S. dictyosporum* et A pour *S. verrucosum* représentés respectivement par 9 et 7 isolats et carpophores. Un profil RFLP particulier a été obtenu avec *Scleroderma* sp5 IR605.

Le séquençage de la région ITS de 13 isolats de Sclérodermes appartenant à *S. dictyosporum*, *S. verrucosum* et *Scleroderma* sp1 a confirmé les analyses RFLP. L'arbre phylogénétique construit à partir de ces séquences, répartit ces isolats en 2 branches regroupant d'une part les *S. verrucosum* et d'autre part les *S. dictyosporum*. *Scleroderma*



spl est génétiquement proche de *S. verrucosum*. Par contre le ribotype A de *Scleroderma* spl est génétiquement très éloigné des Sclérodermes examinés et serait probablement un champignon pathogène du genre *Bauveria*.

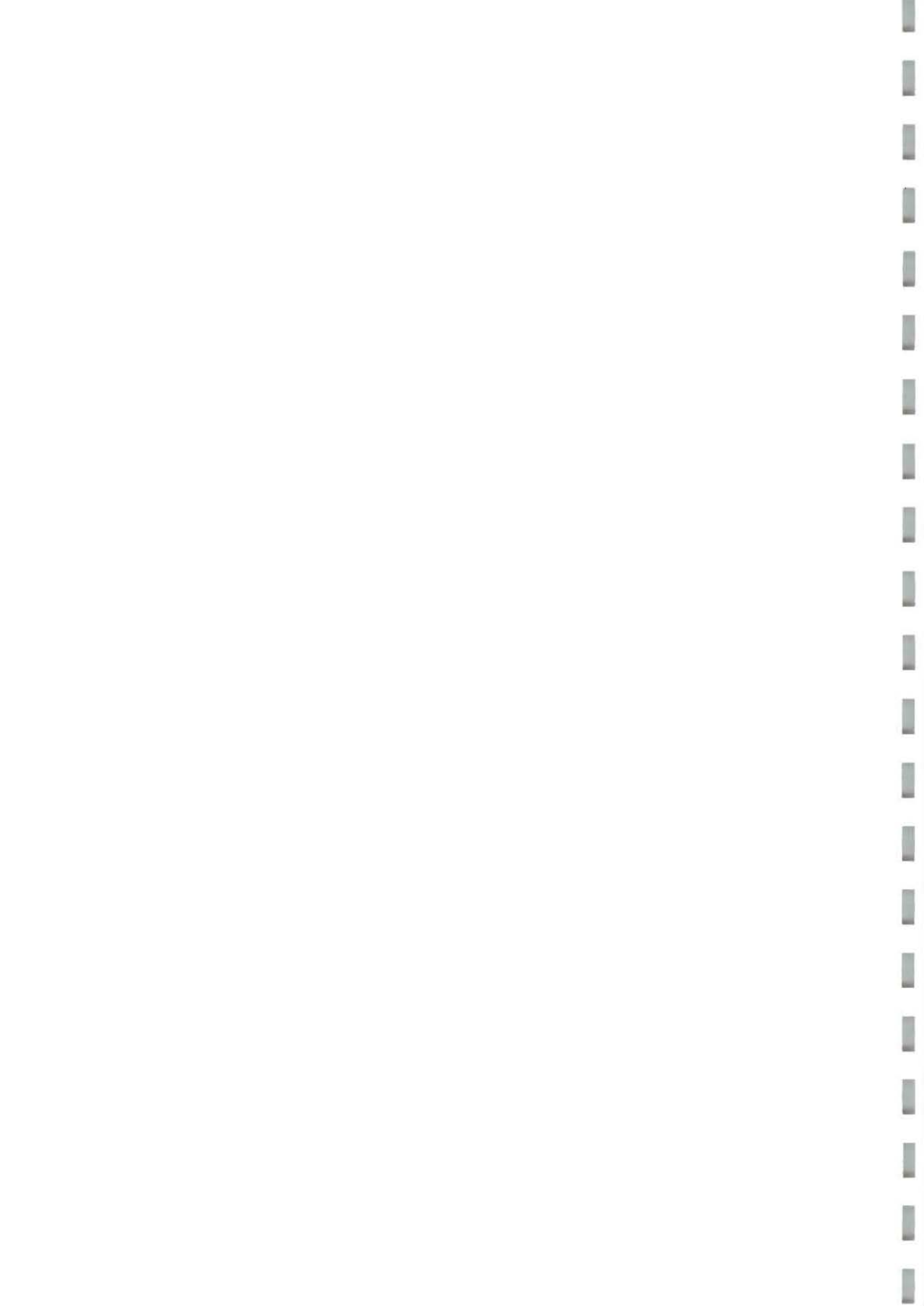
Nous avons également utilisé la RAPD avec les deux amorces 152C et 174 pour un examen du polymorphisme d'une plus large région du génome des Sclérodermes. Cette technique a confirmé les analyses RFLP et le séquençage et a permis d'identifier des marqueurs spécifiques de certains isolats tels que IR406, IR408 et ORS7731. La PRC/RFLP n'avait pas permis de les séparer des autres isolats très voisins.

Nous avons obtenu des profils RFLP identiques avec le ribotype B de *S. dictyosporum* du Burkina Faso et un isolat de *S. dictyosporum* du Sénégal suggérant que ce ribotype est largement répandu en Afrique de l'Ouest.

L'amplification des régions ITS et IGS1 des mycorhizes a montré un polymorphisme de longueur de ces régions au sein des morphotypes blancs. Par contre aucun polymorphisme n'est observé pour les morphotypes bruns (résultat non présenté). La digestion de l'IGS1 des morphotypes blancs par *Hinf*I et *Mbo*I indique que ceux-ci sont effectivement dus à des Sclérodermes, en particulier le ribotype B de *S. dictyosporum* (BL9, BL12 et BE12), les ribotypes A (BL10 et BL11) et B (BL7) de *S. verrucosum*. Ces données suggèrent que la PCR/RFLP peut être appliquée efficacement au suivi de la persistance de Sclérodermes associés à *A. africana* en pépinière et après plantation au niveau des mycorhizes.

Enfin nous avons testé l'efficacité de 4 isolats fongiques (3 Sclérodermes et le Telephoraceae ORSXM002) sur la croissance et la nutrition minérale de plants de deux provenances d'*A. africana* en pépinière. Nous avons montré que l'inoculation induisait une stimulation plus ou moins importante de la croissance des plants (0,17% à 48% de gain de biomasse) et une amélioration de la nutrition minérale, surtout en potassium. L'utilisation de deux provenances d'*A. africana* a permis de mettre en évidence l'influence forte du fond génétique de la plante-hôte sur l'effet bénéfique de la mycorhization. La dépendance mycorhizienne indique que la provenance sénégalaise est moins dépendante des mycorhizes pour sa croissance que la provenance burkinabé. L'utilisation de souche efficace pour l'amélioration de la croissance des plants d'*A. africana* peut être orientée vers les isolats IR406 et IR408 ainsi que ORSXM002 pour les deux provenances. Cependant, ces isolats devront être auparavant testés dans d'autres conditions édaphiques.

Notre étude a conduit à des avancées significatives dans le développement de nombreux outils moléculaires utilisables pour appréhender la diversité des populations et



analyser les événements sexuels qui conduisent à l'apparition de nouvelles souches. Elle nous aura permis d'apporter notre contribution à la connaissance des champignons ectomycorhiziens tropicaux et en particulier les Sclérodermes. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives pour d'autres études qui permettront une meilleure connaissance de la symbiose ectomycorhizienne en région tropicale :

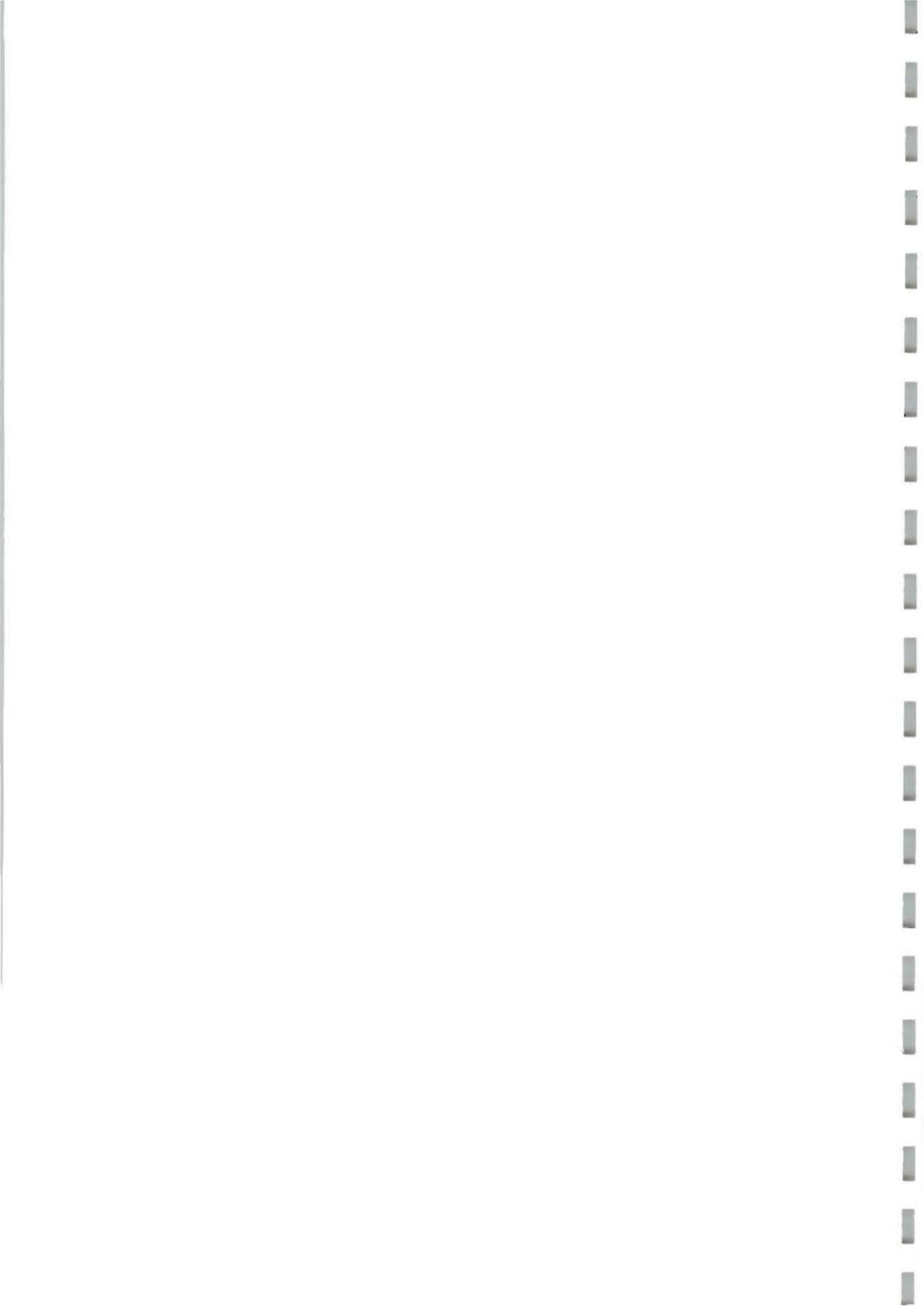
— Une meilleure appréciation de la diversité spécifique des champignons ectomycorhiziens du Sud-Ouest du Burkina Faso imposera des récoltes de carpophores étalées sur une plus longue période. En effet, en zone tropicale peu humide, les fluctuations saisonnières et la faiblesse des précipitations conduisent à une fructification erratique des champignons. Certains champignons, à fructification rare, n'ont probablement pas pu être observés au cours de nos prospections. Il serait également intéressant de prélever des mycorhizes sur le terrain et d'identifier les champignons qui y sont impliqués à l'aide de la PCR/RFLP afin de prendre en compte les champignons à fructifications indéterminées, tel que ORSXM002.

— L'étude de la diversité génétique des Sclérodermes a porté sur un échantillonnage faible d'isolats et de carpophores. Il est alors délicat de déterminer l'abondance relative des différents ribotypes/génotypes observés. Un échantillonnage plus important qui inclurait un plus grand nombre de carpophores et d'isolats devra être réalisé afin d'obtenir une image plus juste de cette diversité génétique des Sclérodermes en zone tropicale.

— L'étude de la structuration génétique des populations de *S. verrucosum* et *S. dictyosporum* et en particulier les rôles respectifs de la reproduction sexuée et végétative devront être poursuivis.

— La mycorhization contrôlée d'*A. africana* en pépinière a montré que les Sclérodermes étaient de bons candidats pour des programmes de mycorhization contrôlée. Notre expérimentation a été effectuée sur un sol sableux non représentatif des conditions de forêts à *A. africana* en Afrique de l'Ouest. Toute sélection de souche devra donc être complétée par des essais réalisés dans des conditions variées et respectant les conditions locales de plantations.

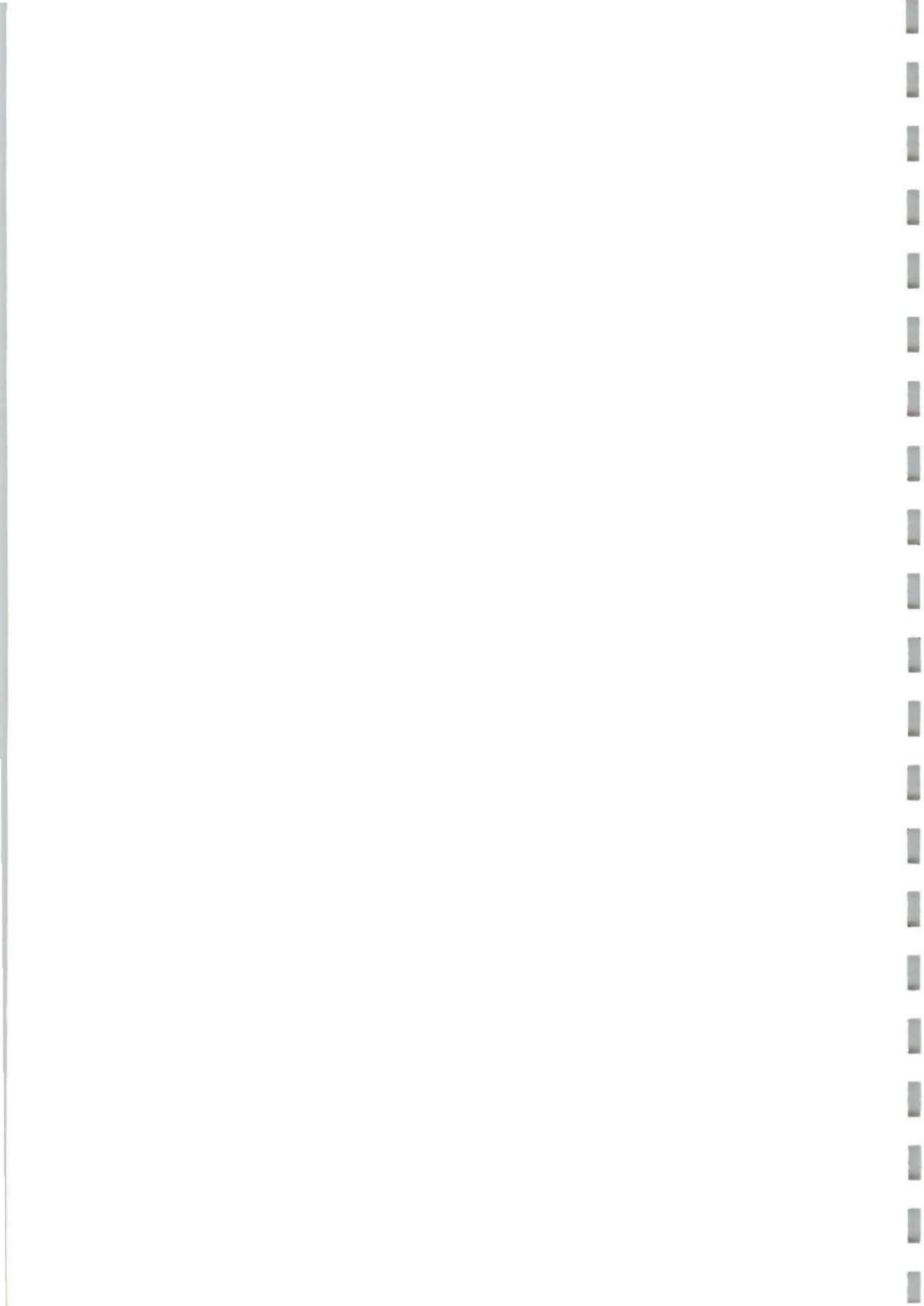
— Il conviendrait désormais d'étayer les hypothèses faites à partir de nos premiers résultats obtenus en matière de structuration génétique des populations, et d'évaluer et de hiérarchiser les différents facteurs qui limitent les échanges génétiques.



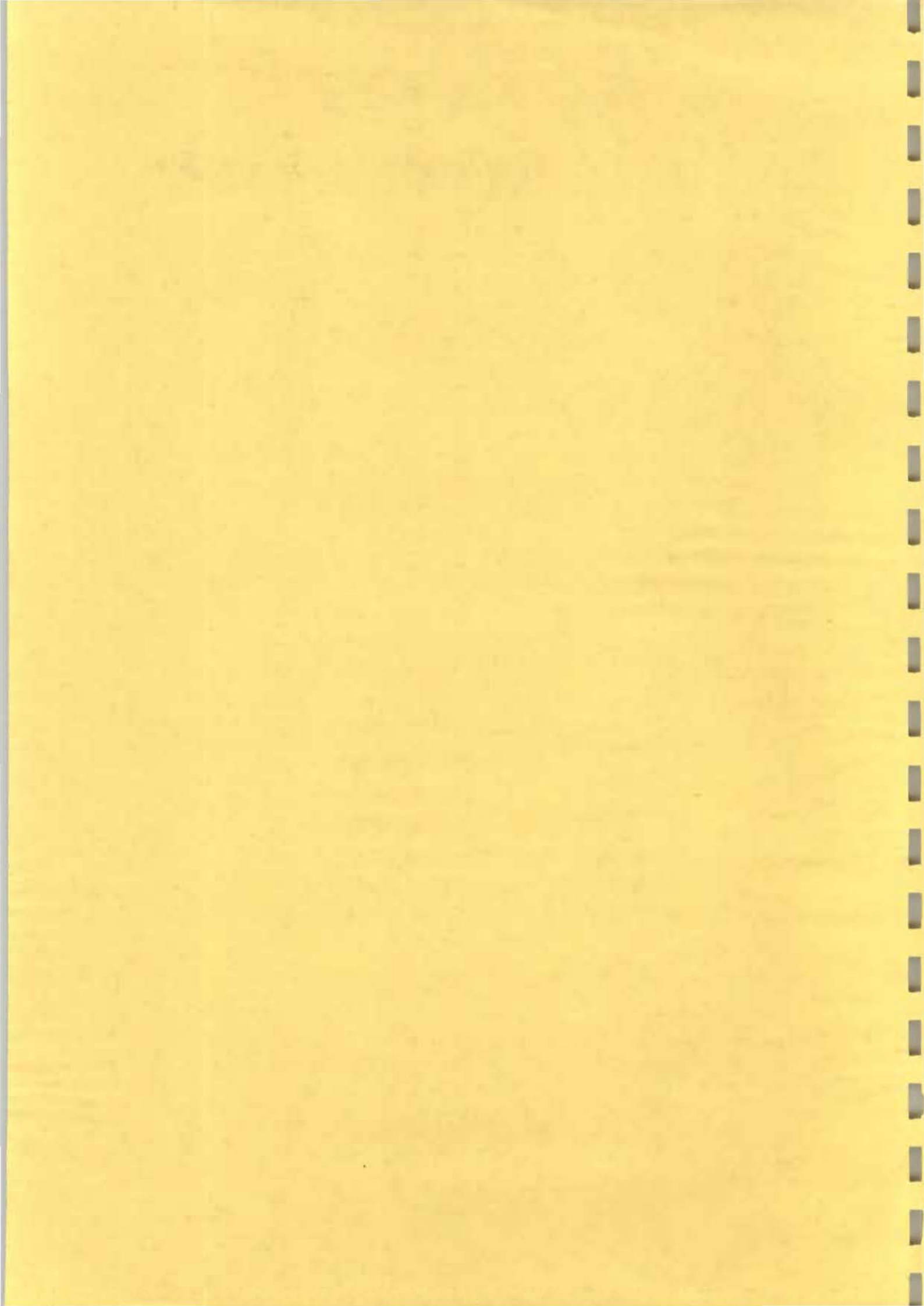
— Le suivi de la persistance et de la dissémination des souches de Sclérodermes introduites et leur impact sur les populations locales peut désormais être envisagé car nous disposons des outils moléculaires adéquats.

— Enfin, il restera à comparer le comportement génétique et écologique des Sclérodermes avec les autres champignons ectomycorhiziens utilisés dans ces régions (*Pisolithus*).

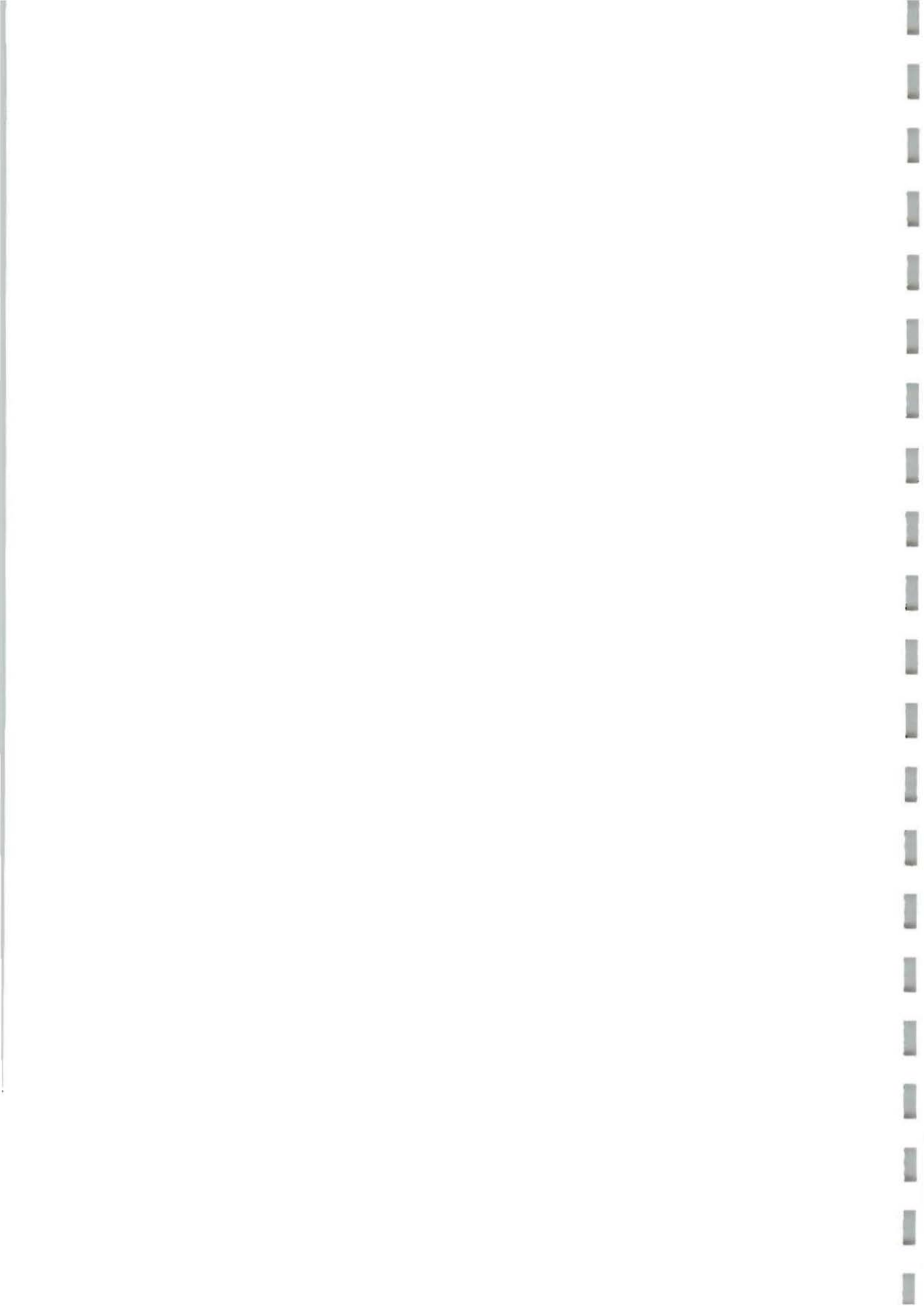




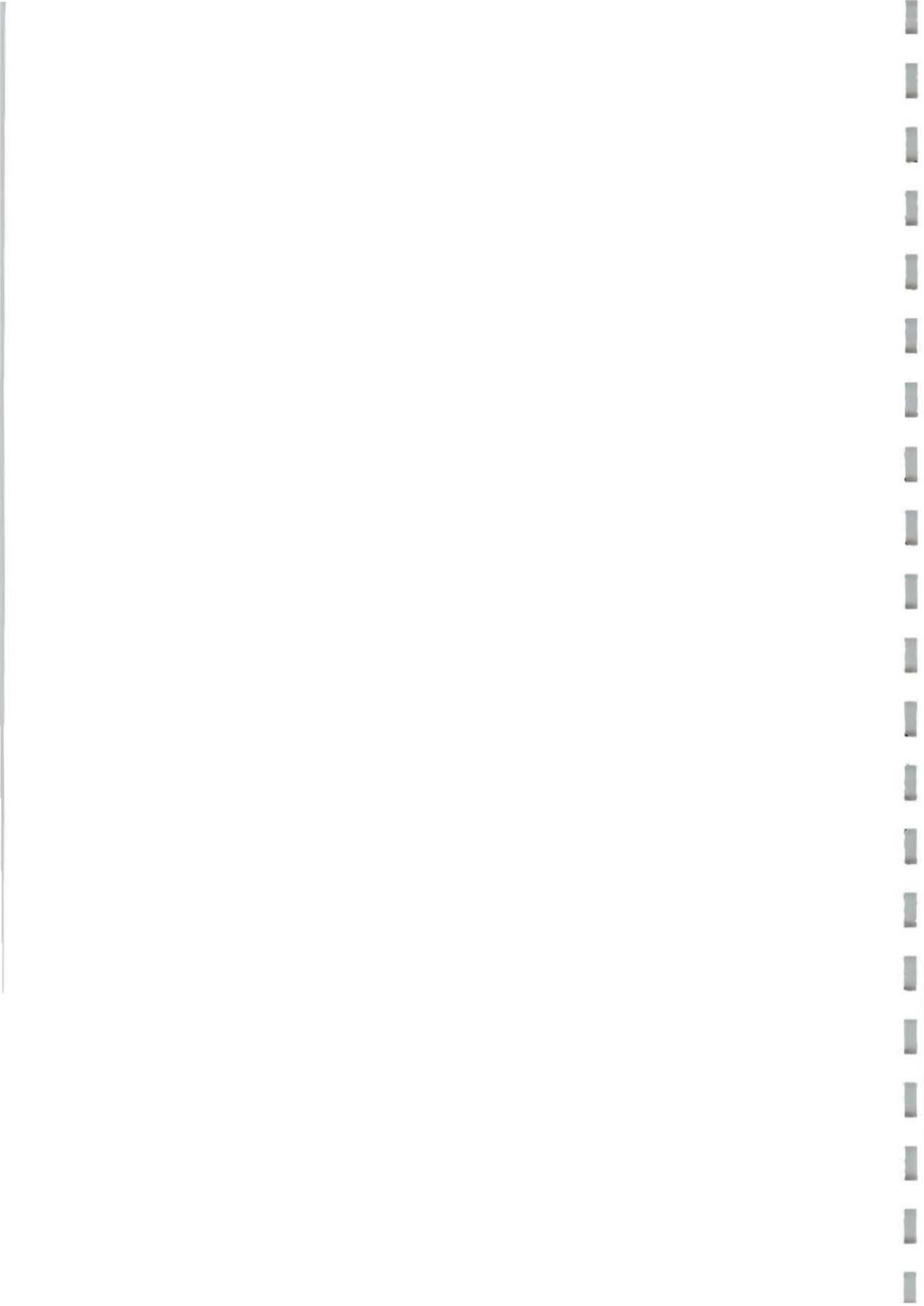
## *Références bibliographiques*



- Agerer R. 1987-1996. Color Atlas of ectomycorrhizae. With glossary. Agerer R ed. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger.
- Agerer R. 1995. Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas : an attempt towards a natural classification. In *Mycorrhiza*, Varma A and Hock B eds. Springer-Verlag Berlin heidelberg; pp.686-733.
- Ahouangonou S. 1997. *Afzelia africana* Sm. *Flamboyant* 42, pp. 7-10.
- Alexander IJ, Högberg P. 1986. Ectomycorrhizas of tropical Angiospermous trees. *New Phytologist* 102 : 541-549.
- Alexander IJ. 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.
- Altschul S F , Madden T L, Schaffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 : 3389-3402.
- Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG. 1998. Molecular determination of genetic variation in *Pisolithus* isolates from a defined region in New South Wales, Australia. *New Phytologist* 138 : 151-162.
- Armstrong JL, Fowles NL, Rygielwitz PT. 1989. Restriction fragment length polymorphisms distinguish ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 116 : 1-7.
- Aubréville A. 1959. La flore forestière de la Côte d'Ivoire. Tome II, deuxième édition révisée. Publication N° 15, CTFT.
- Bâ A M , Garbaye J and Dexheimer J 1994 The influence of culture conditions on mycorrhizal formation between the ectomycorrhiza fungus *Pisolithus* sp. and *Afzelia africana* Sm. seedlings. *Mycorrhiza* 5 : 283-287.
- Bâ A.M., Duponnois R. 1998. Ectomycorrhizal symbiosis of West Africa. *in press*
- Bâ AM, Garbaye J, Dexheimer J. 1991. Influence of fungal propagules during the early stage of the time sequence of ectomycorrhizal colonization on *Afzelia africana* Sm. seedlings. *Can. J. Bot.* 66 : 2442-2447.
- Bâ AM, Thoen D. 1990. First syntheses of ectomycorrhizas between *Afzelia africana* Sm. (Caesalpinioideae) and native fungi from West Africa. *New Phytol.* 103 : 441-448.

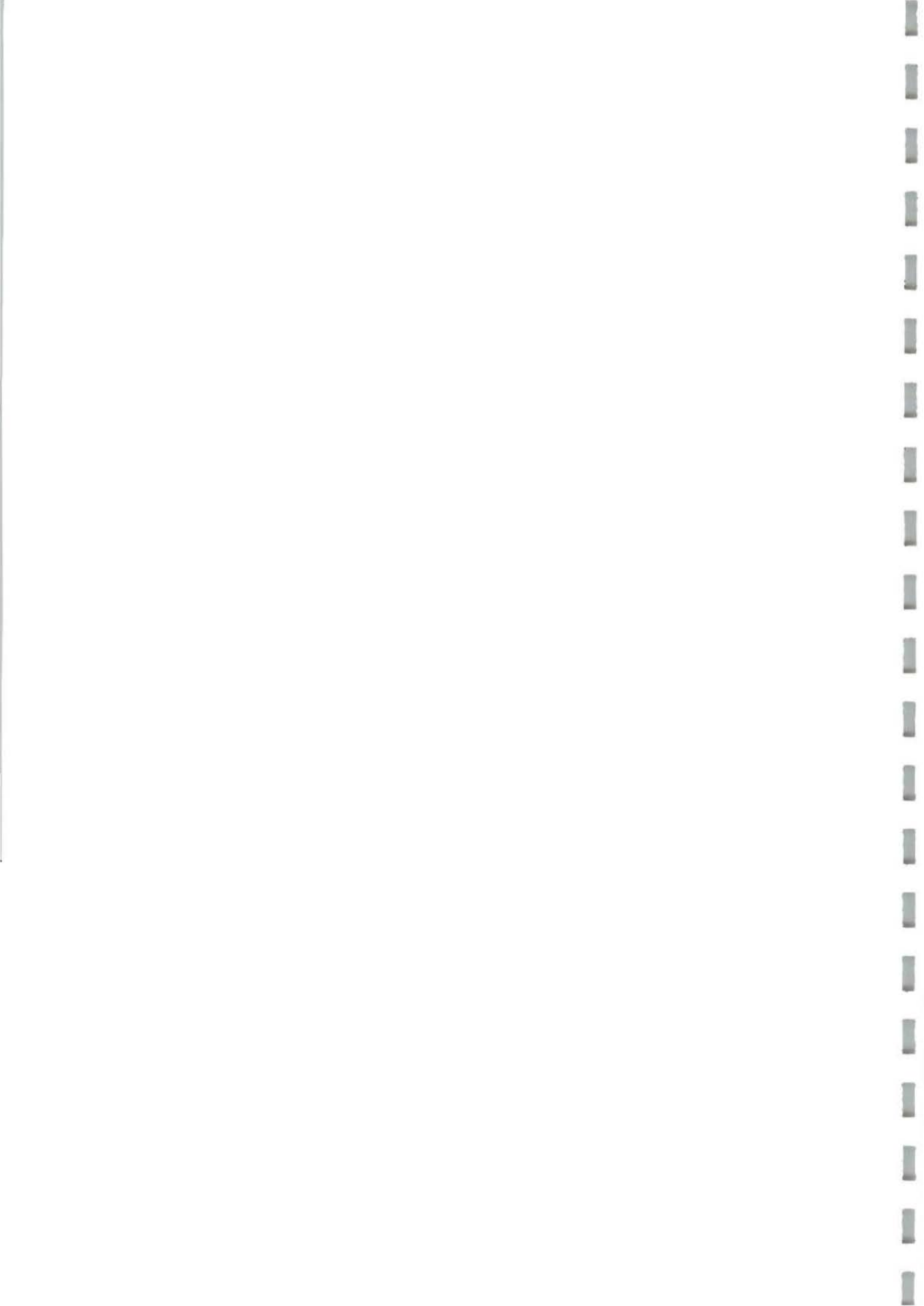


- Bâ AM. 1990. Contribution à l'étude de la symbiose ectomycorhizienne chez deux essences forestières d'Afrique intertropicale : *Azelia africana* Sm. et *Uapaca guineensis* Müll. Arg. Thèse d l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, p. 193.
- Bâ AM., Duponnois R. 1998. Les champignons ectomycorhiziens des arbres forestiers en Afrique de l'Ouest : diversité, écologie et utilisation en foresterie. Soumis pour publication aux Éditions de l'ORSTOM, p. 200.
- Béreau M, Garbaye J. 1994. First observations on the root morphology and symbioses of 21 major tree species in the primary tropical rain forest of French Guyana. *Ann. Sci. For.* 51 : 407-416.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32. 374 + xp.
- Bruns TD, Szaro TM, Gardes M, Cullings KW, Pan JJ, Taylor DL, Horton TR, Kretzer A, Garbelotto M, Li Y. 1998. A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology* 7 : 257-272.
- Burgess TI, Malajczuk N, Grove TS. 1993. The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake of *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. diversicolor* F. Muell. *Plant and Soil* 153 : 155-164.
- Buyck B, Thoen D, Watling R. 1996. Ectomycorrhizal fungi of Guinea-Congo Region. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 104B, 313-333.
- 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 Sylviculture, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.
- Chilvers GA, Douglas PA, Lapeyrie FF. 1986. A paper-sandwich technique for rapide synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytologist* 103 : 397-402.
- Colpaert JV, Van Assche JA, Luijstens K. 1992. The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist* 120 : 127-135.
- Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierachical clustering. *Nucleic Acids Research* 16 : 10881-10890.
- De La Bastide PY, Kropp BR, Piché Y; 1994; Spatial distribution and temporal persistence of discrete geneotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Marie) Orton. *New Phytologist* 127 : 547-556.
- de Alwis DP, ABeynayake K. 1980. A survey of mycorrhizae in some forest trees of Sri Lanka. In *Tropical Mycorrhiza Research* (Ed. by P. Mikola), pp. 146-153. Oxford University Press.

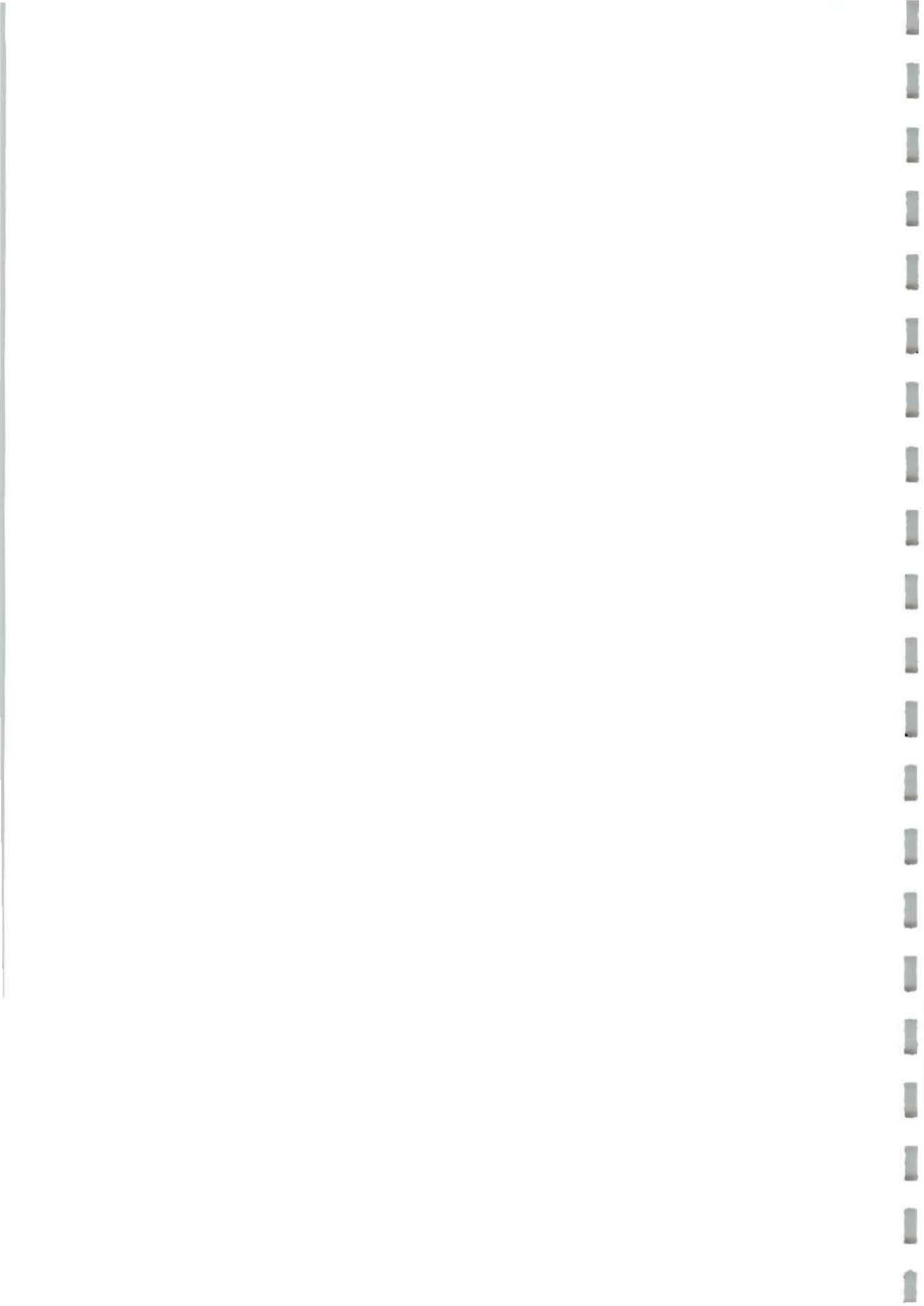


- Dell B, Malajczuk N. 1997. L'inoculation des eucalyptus introduits en Asie avec des champignons ectomycorhiziens Australiens en vue d'augmenter la productivité des plantations. *Revue Forestière Française*, n° spécial, pp. 174-184.
- Depommier D. 1996. Structure, dynamique et fonctionnement des parcs à *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. : caractérisation et incidence des facteurs biophysiques et anthropiques sur l'aménagement et le devenir des parcs de Dossi et Watinoma, Burkina Faso. Thèse de Doctorat, Université Paris VI.
- Dexheimer J, Gerard J, Genet P. 1994. Study of transformations of the root system of *Eucalyptus globulus* associated with *Pisolithus tinctorius*. I. Aptitude for mycorrhization of different kinds of roots. *Phytomorphology*, 44 : 235-245.
- Di Battista C, Sélosse M -A, Bouchard D, Stenström E, Le Tacon F. 1996. Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycol. Res.* 100 : 1315-1324.
- Di Battista C. 1997. Comportement en pépinière et en plantation d'un champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* S238N inoculé sur Epicéa (*Picea abies*) et Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Typage moléculaire de la souche introduite. Thèse de l'Université Henri Poincaré Nancy I, p.90.
- Dighton J, Mason PA. 1985. Development biology of higher fungi : Mycorrhizal dynamics during forest tree development. In *Symposium of the British Mycological Society* held at the University of Manchester. (Ed by D. Moore, L.A. Casseltom, D.A. Wood & J.C. Frankland), Cambridge University Press, pp. 117-139.
- Dominik T. 1969. Key to ectotrophic mycorrhizae. *Folia Forestalia Polonica* 15, serie A : 309-320.
- Duponnois R, Garbaye J. 1991. Techniques for controlled synthesis of the Douglas-fir-*Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Ann. Sci. For.* 48 : 641-650.
- Evy T. 1995. Principaux ligneux forestiers de la Guinée. Agro-zone de transition. *GTZ*, N° 253, p. 544.
- FAO 1987. Etude sur la contribution du secteur forestier à l'économie du Burkina Faso. Rapport de synthèse du projet préparé par le gouvernement du Burkina Faso et la FAO. Rome.
- Fassi B, Fontana A. 1962. Micorrize ectotrofiche di *Brachystegia Laurentii* et di alcune altre di *Caesalpiniceae* minori del Congo. *Allionia* 8 : 121-131.
- Fleming LV. 1983. Succession of mycorrhizal fungi on birch : infection of seedlings planted around mature trees. *Plant and Soil* 71 : 263-267.
- Fleming LV. 1985. Experimental study of sequences of ectomycorrhizal fungi on Birch (*Betula* sp.) seedling root systems. *Soil Biol. Biochem.* 17 : 591-600.

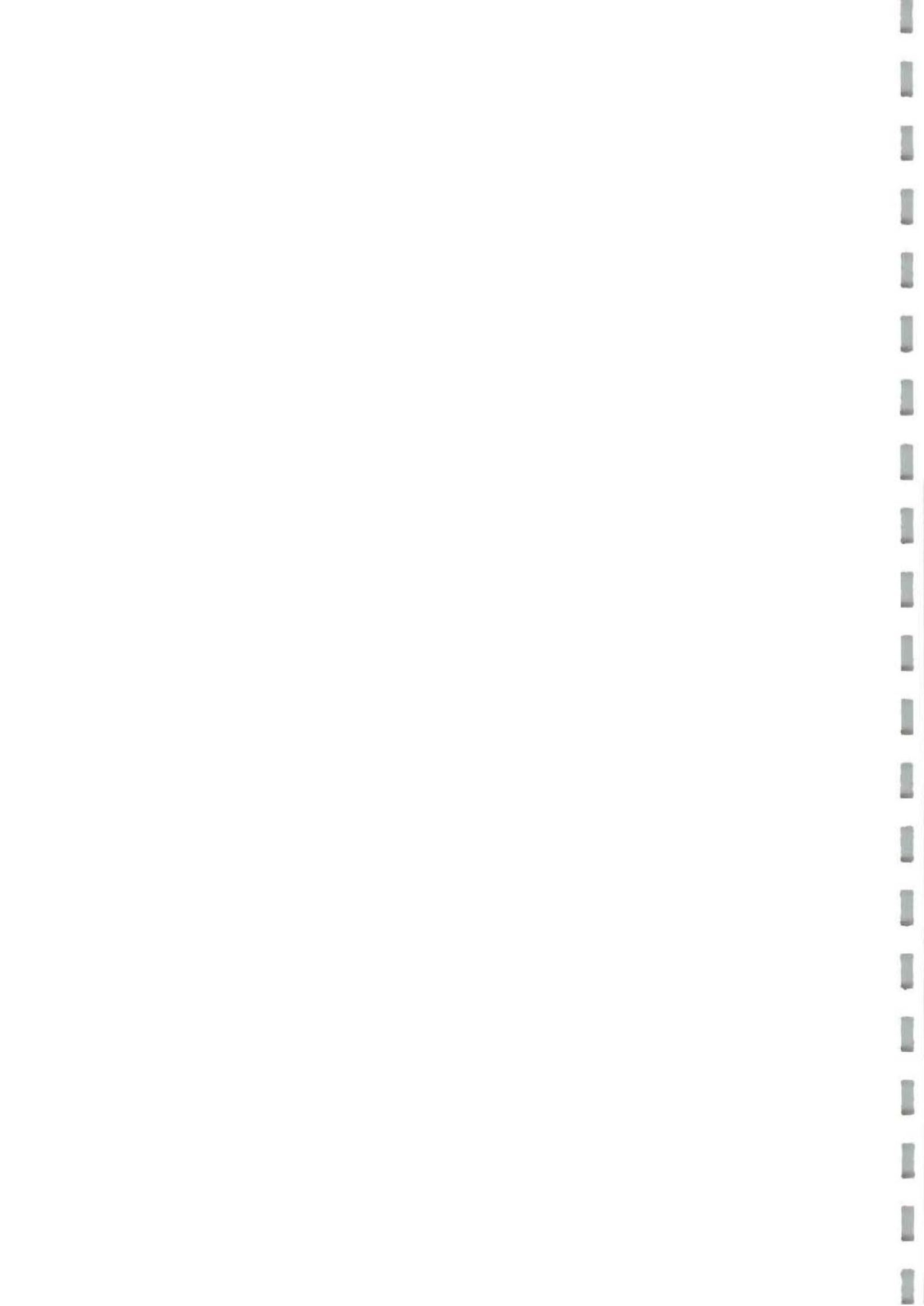




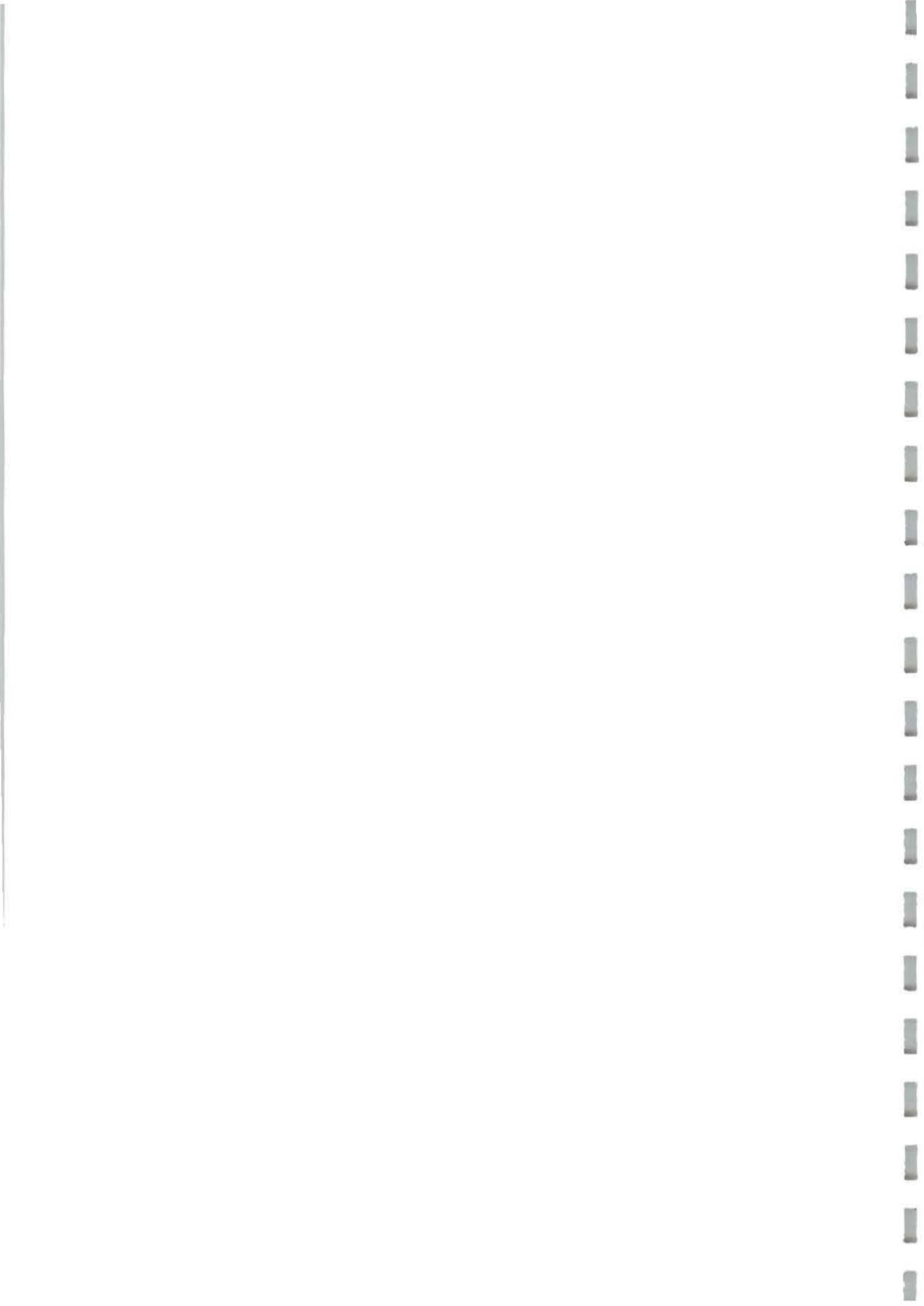
- Gandebœuf D, Henrion B, Dupre C, Drevet P, Nicolas P, Chevalier G, Martin F. 1995. Molecular identification of Tuber species and isolates by PCR-based techniques. In *Biotechnology of ectomycorrhizae : Molecular approaches*. (Ed. by V. Stocchi, P. Bonfante & M. Nuti), pp. 151-160.
- Garbaye J, Churin J-L. 1998. Growth stimulation of young oak plantations inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with special reference to summer drought. *Forest Ecology and Management*
- Garbaye J, Delwaulle JC, Diangana D. 1988. Growth response of eucalyptus in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and Management* 24 : 151-157.
- Garbaye J, Wilhelm ME. 1984. Influence de la mycorhization acquise en pépinière sur la mycorhization de jeunes plantations de chêne. *Acta Oecologica* 5 : 151-161.
- Garbaye J. 1990a. Les problèmes posés par la mycorhization contrôlée du chêne. *Rev. For. Fr.* XLII-2 : 233-239.
- Garbaye J. 1990b. Pourquoi et comment observer l'état mycorhizien des plants forestiers. *Rev. For. Fr.* XLII-1 : 35-47.
- Garbaye J. 1991. Utilisation des mycorhizes en sylviculture. In *Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées* D.G. Strullu. pp. 197-248.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2 : 113-118.
- Gardes M, Bruns TD. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Can. J. Bot.* 74 : 1572-1583.
- Gardes M, Dahlberg A. 1996. Mycorrhizal diversity in arctic and alpine tundra : an open question. *New Phytologist* 133 : 147-157.
- Gardes M, Mueller GM, Fortin JA, Kropp BR. 1991a. Mitochondrial DNA polymorphisms in *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. *Mycol. Res.* 95 : 206-216.
- Gardes M, White TJ, Fortin JA, Bruns TD, Taylor JW. 1991b. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69 : 180-190
- Génére B., Bouchard D., Amirault J.-M. 1997. Itinéraire technique en pépinière pour le Douglas de type 1 + 1 mycorhizé par *Laccaria bicolor* S238 N. *Revue Forestière Française*, n° spécial, pp. 155-162
- Grube M, Depriest PT, Gargas A, Hafellner J. 1995. DNA isolation from lichen ascomata. *Mycol. Res.* 99, 1321-1324.



- Gryta H, Debaud J-C, Effosse A, Gay G, Marmeisse R. 1997. Fine-scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. *Molecular Ecology* 6 : 353-364.
- Guinko S. 1984. Végétation de la Haute Volta. Tome I. Thèse de Doctorat es Sciences de l'Université de Bordeaux III, 394 p.
- Hamel C, Fyles H, Smith DL. 1990. Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three different vital strains. *New Phytologist* 115 : 297-302.
- Haras D, Amoros J-P. 1994 Réaction de polymérisation en chaîne, sondes froides et diagnostic clinique. *Cahiers Santé* 4 : 43-52.
- Harley JL, Smith SE. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London, p. 482.
- Heim R. 1970. Particularités remarquables des Russules tropicales pelliculariae lilliputiennes: les complexes annulata et radicans. *Bul. de la Soc. Mycol. de France* 86 : 59-77.
- Heinemann P. 1954. Boletineae. Flore iconographique des champignons du Congo. *Fasc. 3* : 50-80, pl. 9-12.
- Heinemann P. 1959. Cantharellineae. Flore iconographique des champignons du Congo. *Fasc. 8* : 153-165, pl. 26-28.
- Heinemann P. 1966. Hygrophoraceae, *Laccaria* et Boletineae II (compléments). Flore iconographique des champignons du Congo. *Fasc. 15* : 279-308, pl. 47-49.
- Henrion B, Chevalier G, Martin F. 1994a. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacer. *Mycol. Res.* 98 : 37-43.
- Henrion B, De Battista C, Bouchard D, Vairelles D, Thompson BD, Le Tacon F, Martin F. 1994b. Monitoring the persistence of *Laccaria bicolor* as an ectomycorrhizal symbiont of nursery-grown Douglas fir by PCR of the rDNA intergenic spacer. *Molecular Ecology* 3 : 571-580.
- Henrion B, Le Tacon F, Martin F. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist* 122 : 289-298.
- Högberg P, Nylund J-E. 1981. Ectomycorrhizae in coastal miombo woodland of Tanzania. *Plant and Soil* 63 : 283-289.
- Högberg P, Pearce GD. 1986. Mycorrhizas in Zambian trees in relation to host taxonomy, vegetation type and successional patterns. *Journal of Ecology* 74 : 775-785.
- Högberg P. 1982. Mycorrhizal associations in some woodlands and forest trees and shrubs in Tanzania. *New Phytol* 92 : 407-415.

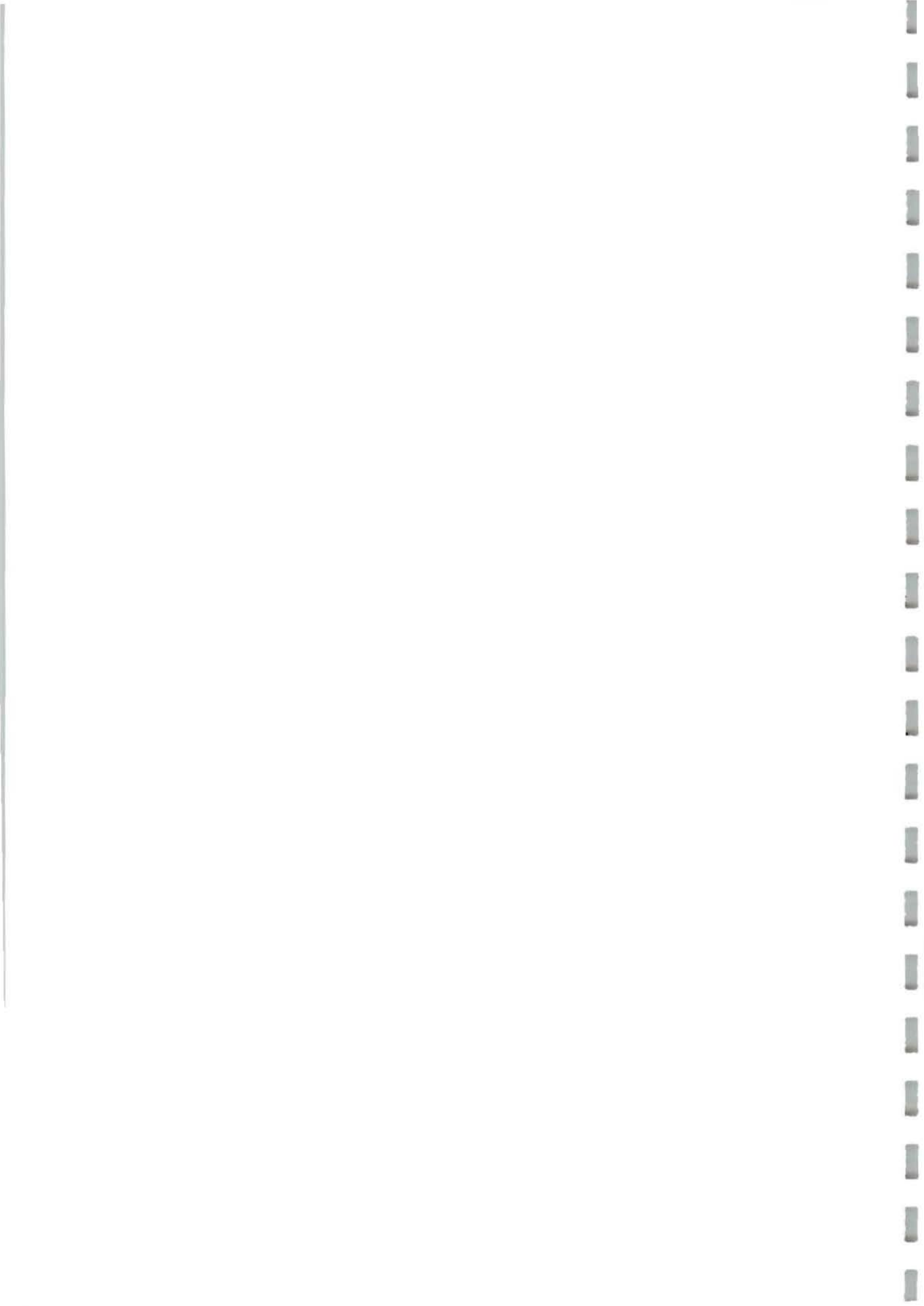


- Horton T R, Bruns TD. 1998. Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*). *New Phytologist* 139 : 331-339.
- Ivory MH, Honrubia M, Mburu BK, Mwangi LM. 1996. Putative ectomycorrhizal fungi from native and exotic forest in Kenya. In Azcon-Aguilar C, Barea JM, eds. *Mycorrhizas in Integrated Systems from Genes to Plant Development*. Brussels, Luxembourg : Office for official publications of the European Communities, COST Report, 125-127.
- Jacobson KM, Miller OK Jr, Turner BJ. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 9159-9163.
- Jenik J, Mensah KOA. 1967. Root system of tropical trees. I. Ectotrophic mycorrhizae of *Azalia africana* Sm. *Preslia* 39 : 59-65.
- Jones MD, Durall DM, Tinker PB. 1990. Phosphorus relationships and production of extramatrical hyphae by two types of willow ectomycorrhizas at different soil phosphorus levels. *New Phytologist* 115 : 259-267.
- Karen O, Högborg N, Dahlberg A, Jonsson L, Nylund JE. 1997. Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* 136 : 313-325.
- Kasha P, Furlan V, Lumande K. 1990. Symbioses racinaires chez quelques essences forestières importantes au Zaïre. *Bois et Forêts des Tropiques*, 224 : 27-33.
- Kessler JJ, Geerling C. 1994. Profil environnemental du Burkina Faso. Université Agronomique, Département de l'Aménagement de la Nature. Wageningen, les Pays Bas, p.63.
- Laclavère G. 1993. Atlas du Burkina Faso. (Eds Jeune Afrique). p. 53.
- Last FT, Mason PA, Ingleby K, Fleming LV. 1984. Succession of fruitbodies of sheathing mycorrhizal fungi associated with *Betula pendula*. *Forest Ecology and Management* 9 : 229-234.
- Last FT, Masson PA, Wilson J, Deacon JW. 1983. Fine roots and sheathing mycorrhizas : their formation, function and dynamics. *Plant and Soil* 71 : 9-12.
- Le Disquet I. 1997. Etude du rôle du partenaire fongique dans l'absorption, le transport et le stockage des cations chez les ectomycorhizes. Thèse de l'Université Henri Poincaré, Nancy I, p. 240.
- Le Tacon F, Alvarez IF, Bouchard D, Henrion B, Jackson RM, Luff S, Parlade JI, Pera J, Stenström E, Villeneuve N, Walker C. 1992. Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. In *Mycorrhizas in Ecosystems* (Ed. by D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter, & I.J. Alexander ). pp. 119-134.

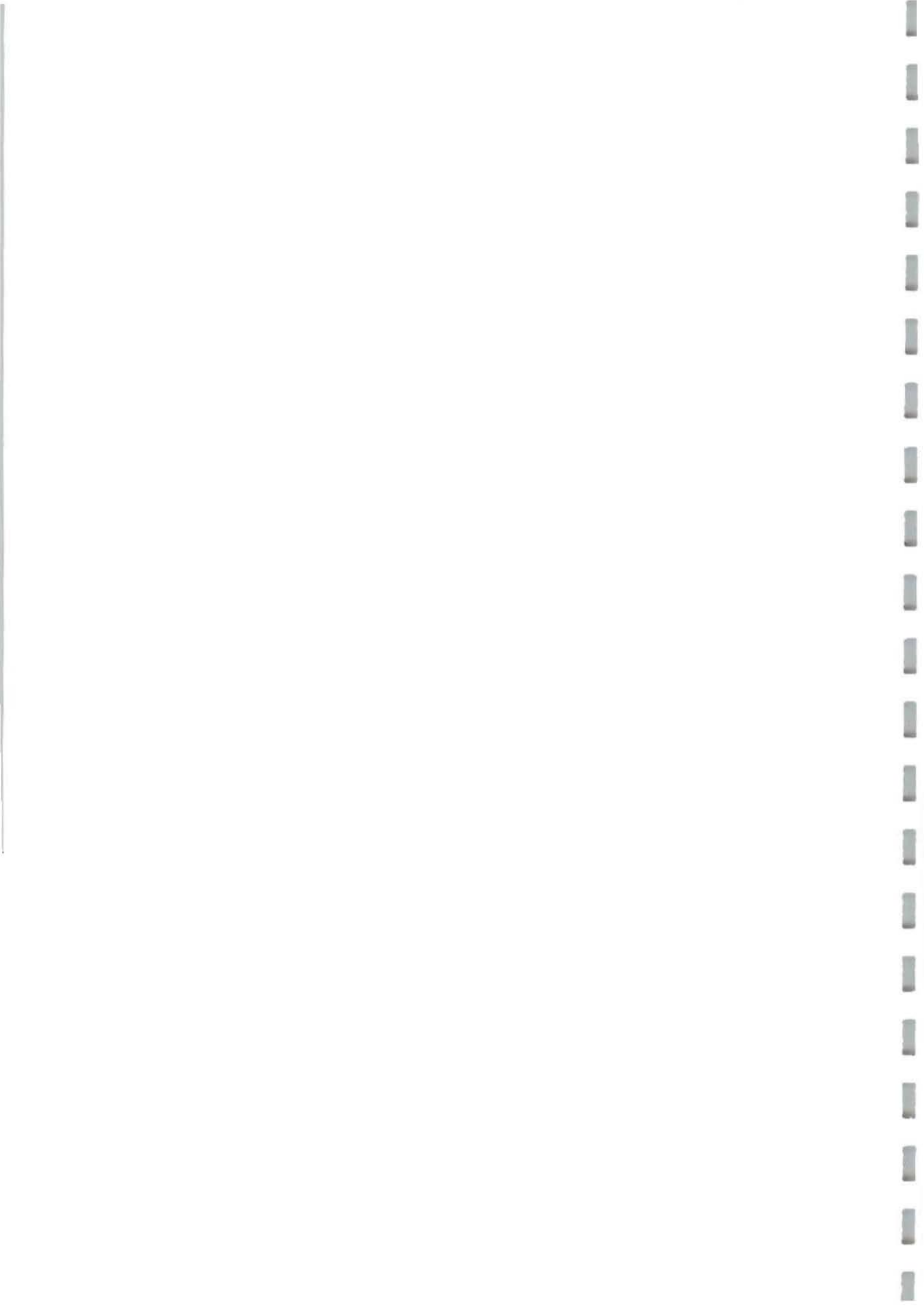


- Le Tacon F, Bouchard D. 1986. Effects of different ectomycorrhizal fungi on growth of Larch, Douglas fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soil. *Acta Oecologica, Oecologica applicata* 7 : 389-402.
- Le Tacon F, Garbaye J, Bouchard D, Chevalier G, Olivier J-M, Guinberteau J, Poitou N, Frochot H. 1988. Field results from ectomycorrhizal inoculation in France. In Canadian Workshop on mycorrhizae in forestry (Ed. by M. Lalonde & Y. Piché), Québec, Université Laval.
- Le Tacon F, Mousain D, Garbaye J, Bouchard D, Chûrin J-L, Argillier C, Amirault J-M, Généré B. 1997. Mycorrhizes, pépinières et plantations forestières en France. *Revue Forestière Française*, n° spécial, pp.131-154.
- Lei J. 1988. Etude expérimentale des systèmes symbiotiques mycorrhiziens de quelques essences ligneuses. Application pratique à la mycorrhization de vitroplants. Thèse de l'Université Henri Poincaré Nancy I, p. 204.
- Lei J., Lapeyrie F., Malajczuk N., Dexheimer J. 1990. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake in vitro. II. Ultrastructural and biochemical changes at the early stage of mycorrhiza formation. *New Phytologist*, 116, 115-122
- Les dossiers INRA. La gestion durable des forêts : contribution de la recherche. 1996. *INRA-Mensuel* 12.
- Malajczuk N, Lapeyrie F, Garbaye J. 1990. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. 1. Mycorrhiza formation in model systems. *New Phytologist* 114 : 627-631.
- Malajczuk N, Molina R, Trappe JM. 1984. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. The ultrastructure of compatible and incompatible mycorrhizal fungi associated roots. *New Phytologist* 96 : 43-53.
- Malloch DW, Pirozynski AK, Raven PH. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). In *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 77 : 2113-2118.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory, New York, USA.
- Martin F, Costa G, Delaruelle C, Diez J. 1998a. Genomic fingerprinting of ectomycorrhizal fungi by microsatellite-primed PCR. In *Mycorrhiza Manual*, (Ed. by A. Varma) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 463-474.

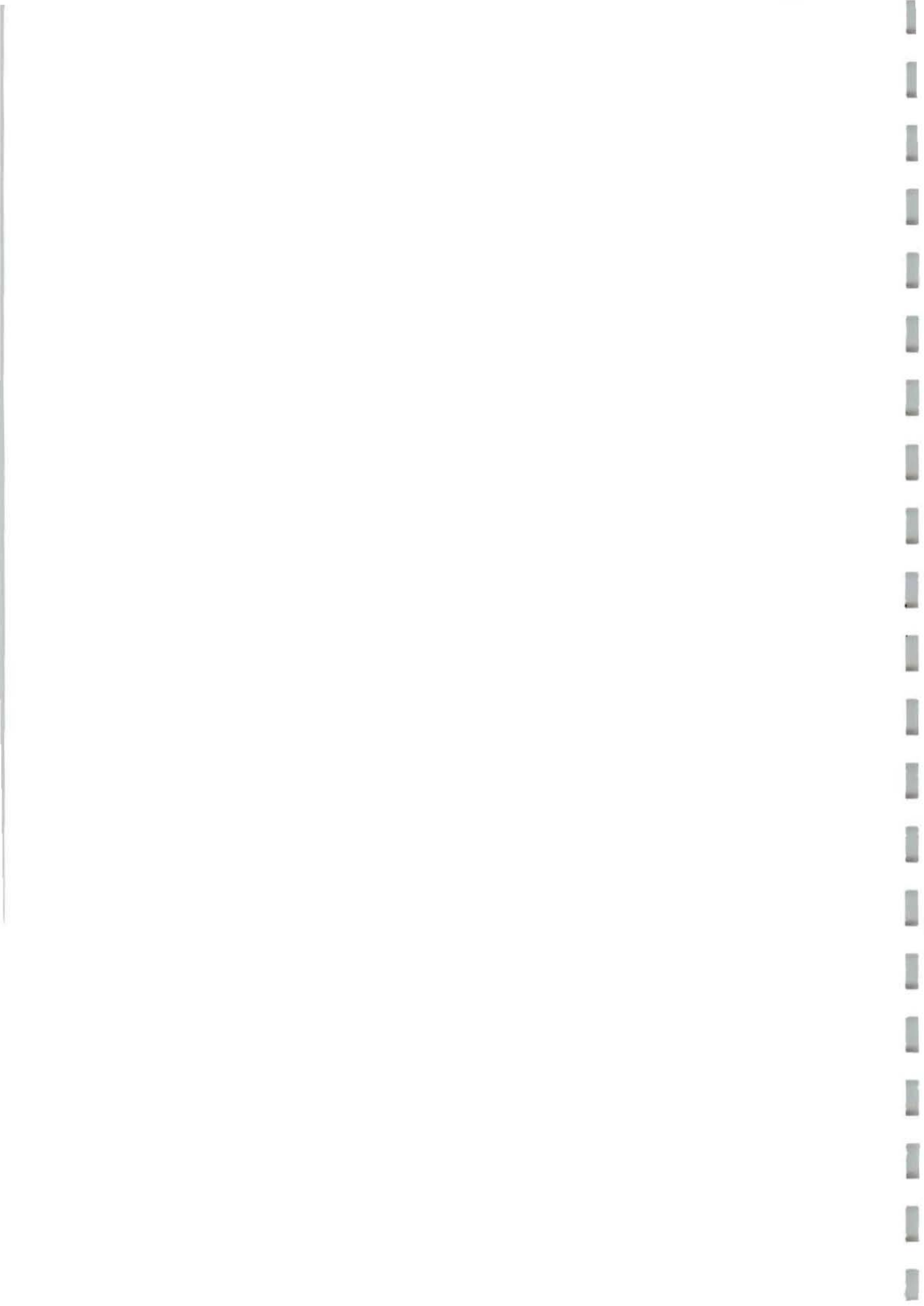




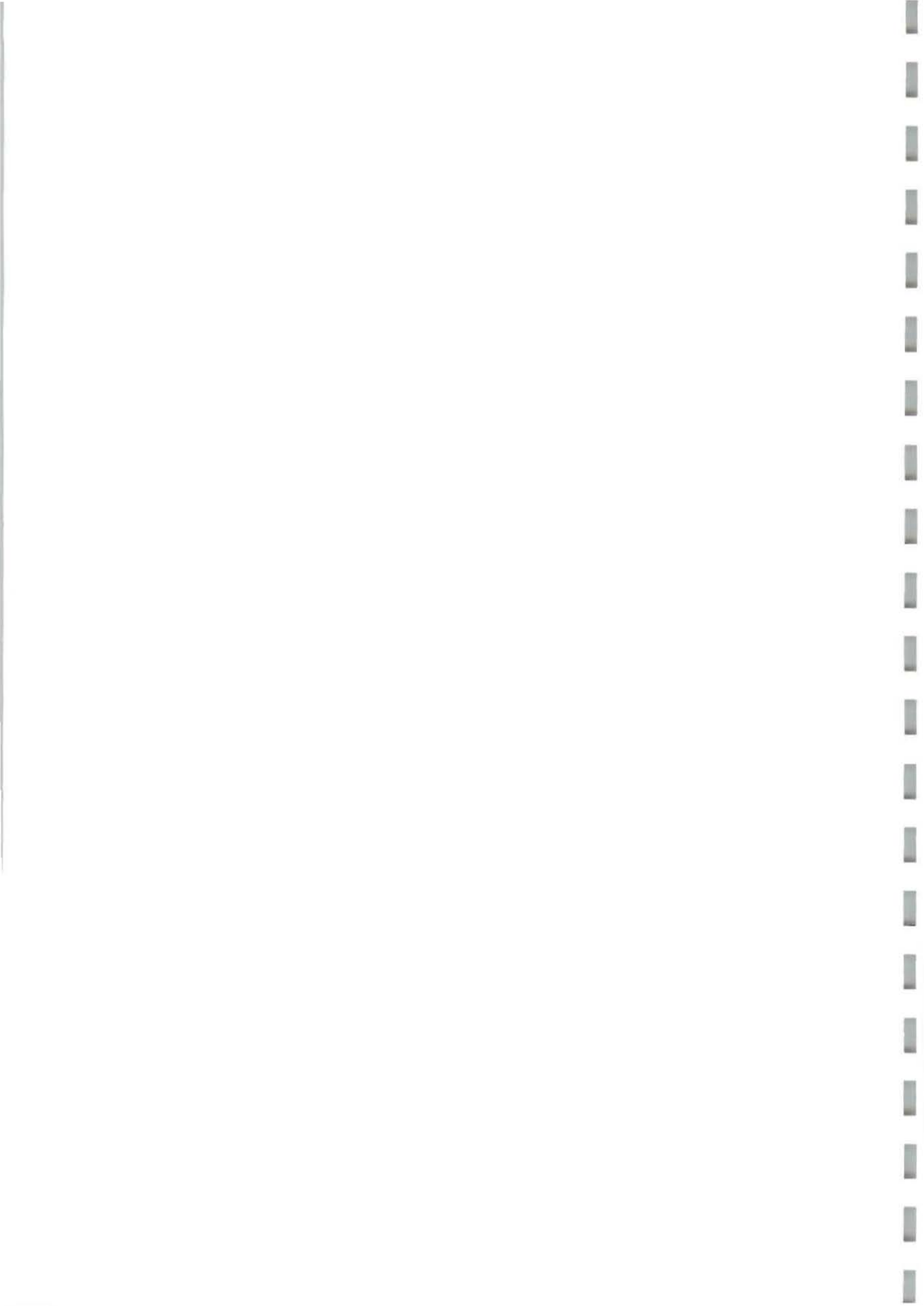
- Martin F, Delaruelle C, Ivory M. 1998b. Genetic variability in intergenic spacers of ribosomal DNA in *Pisolithus* isolates associated with pine, eucalyptus and *Azelia* in lowland Kenyan Forest. *New Phytologist* 139 : 341-352.
- Martin F, Sélosse M A, Di Battista C, Gherbi H, Delaruelle C, Vairalles D, Bouchard D, Le Tacon F. 1998c. Molecular markers in ecology of ectomycorrhizal fungi. *Genet. Sel. Evol.* 30 : S333-S355.
- Martin F, Voiblet C. 1998. Large-scale sequencing of anonymous ectomycorrhiza cDNA clones. In *Mycorrhiza Manual*, (Ed. by A. Vanna) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 475-493.
- Martin F, Zaiou M, LE Tacon F, Rygiiewicz P. 1991. Strain specific differences in ribosomal DNA from the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* (Maire) Orton and *Laccaria laccata* (Scop ex Fr) Br. *Ann. Sci. For.* 48 :
- Marx DH and Cordell CE. 1988. Specific ectomycorrhizae improve reforestation and reclamation in the eastern United States. In *Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry*, 1-4 May 1988. CRBF, Université Laval, Sainte Foy, Québec, G1K 7P4, (Ed. by M. Lalonde and Y. Piche). pp. 75-86.
- Marx DH, Ruehle JL, Kenney DS, Cordell CE, Riffle JW, Molina RJ, Pawuk WH, Navratil S, Tinus RW, Goodwin OC. 1982. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. *Forest Science* 28 : 373-400.
- Marx DH. 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 DH. 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 PA, Last FT, Pelham J, Ingleby K. 1982. Ecology of some fungi associated with ageing stand of birches (*Betula pendula* and *Betula pubescens*). *Forest Ecology and Management* 4 : 19-39.
- Mason PA, Wilson J, Last FT, 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* 7 : 247-256.
- Massicotte HB, Peterson RL, Ackerley CA, Ashford AE. 1987. Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. *Can. J. Bot.* 65 : 1940-1947.



- Masson PA, Last FT, Peibam J, Ingleby K. 1982. Ecology of some fungi associated with an ageing stand of birches (*Betula pendula* and *Betula pubescens*). *Forest Ecology and Management* 4 : 19-39.
- Mehmann B, Egli S, Braus GH, Brunner I. 1995. Coincidence between molecularly or morphologically classified ectomycorrhizal morphotypes and fruitbodies in a spruce forest. In : Stocchi V, Bonfante P, Nuti M eds. *Biotechnology of Ectomycorrhizae : Molecular Approaches*. New York : Plenum Press, 41-52.
- Mikola P. 1970. Mycorrhizal inoculation in afforestation. In *International Review of forestry Research* (Ed. by J.A. Romberger & P. Mikola) 3, 123-196. Academic Press, New York and London.
- Munyanziza E, Kuyper TW. 1995. Ectomycorrhizal synthesis on seedlings of *Azelia quanzensis* Welw. using various types of inoculum. *Mycorrhiza* 5 : 283-287.
- Munyanziza E. 1996. Ecology of miombo woodlands and silviculture of the main tree species. In *Supporting Capacity Building in Forestry Research in Africa*, (Ed. by A. Ngény-Mengech), the AAS and IFS.
- Newberry DM, Alexander LJ, Thomas DW, Gartlan JS. 1988. Ectomycorrhizal rain-forest legumes and soil phosphorus in Korup National Park, Cameroon. *New Phytol.* 109 : 433-455.
- Newman EI. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *J. appl. Ecol.* 3 : 139-145.
- Onana J. 1998. L'arbre à palabre sur l'utilisation et la régénération naturelle de *Azelia africana* Sm. *Flamboyant* 46, p. 33.
- Pargney J-C, Leduc JP. 1990. Etude ultrastructurale de l'association mycorrhizienne Noisetier/Truffe (*Corylus avellana*/Tuber melanosporum). *Bull. Soc. Bot. Fr.* 137 : 21-34.
- Parladé J., Pera J., Alvarez I.F. 1997. La mycorrhization contrôlée du Douglas dans le Nord de l'Espagne. Premiers résultats en plantation. *Revue Forestière Française*, n° spécial, pp.163-173.
- Pegler DN. 1977. A preliminary Agaric Flora of East Africa. Kew Bulletin Additional series VI. HMSO, London, pp. 1-668, pl. 1-27, figs 1-129.
- Perrin R. 1991. Mycorrhizes et protection phytosanitaire. In *Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées* D.G. Strullu. pp. 93-130.
- Peyronnel B, Fassi B. 1960. Nuevo casi de symbiosi ectomicorrizici in Leguminose della famiglia delle Caesalpinaceae. *Atti della Accademia delle Scienze di Torino* 94 : 36-38.
- Plan Stratégique de la Recherche au Burkina Faso, 1996. Programme productions forestières, INREA/DPF 52p.

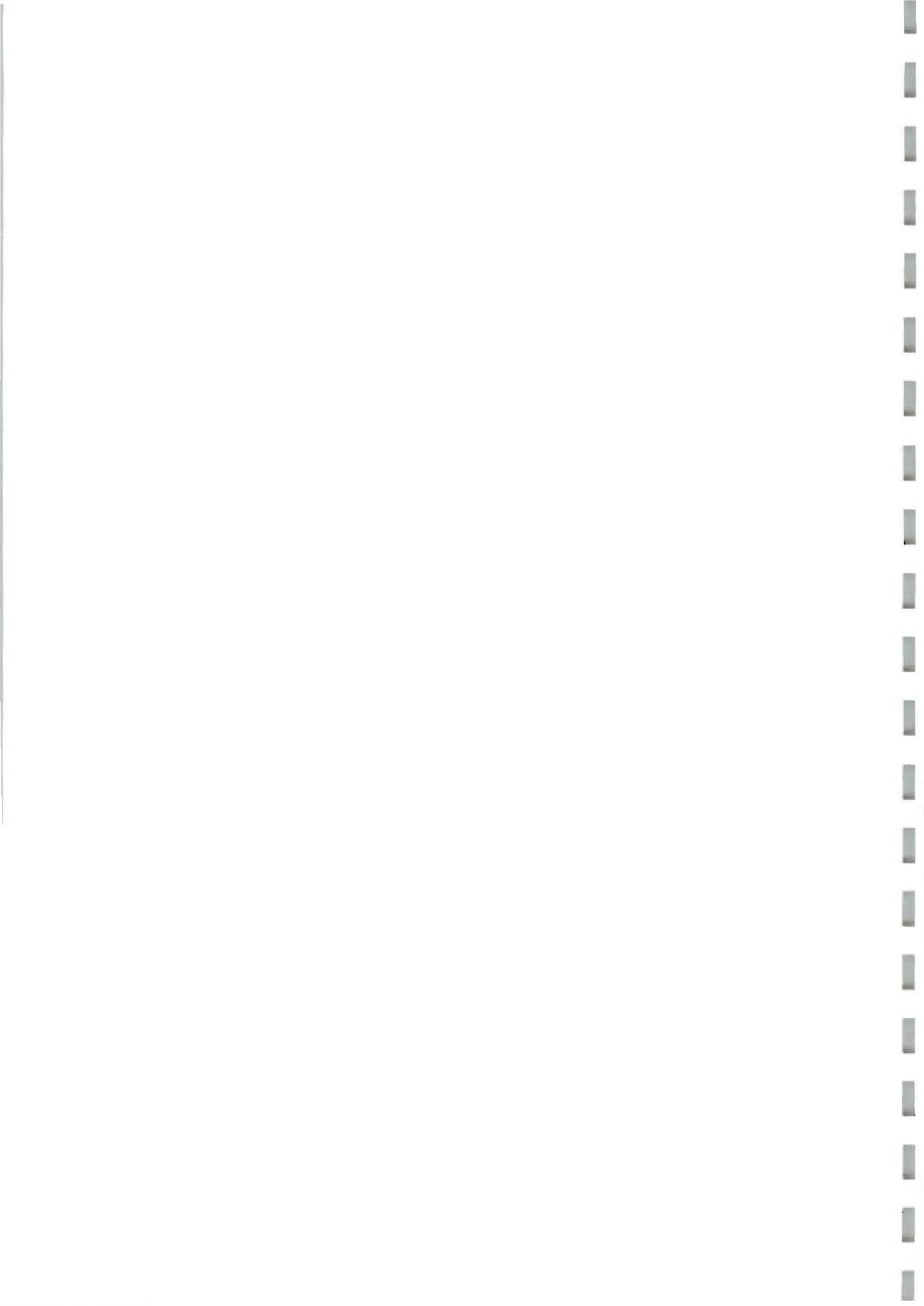


- Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. 1983. Growth response of several plant species in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant and Soil* 70 : 199-209.
- Pritsch K., Boyle H., Munch J.C., Buscot F. 1997. Characterisation and identification of black alder ectomycorrhizas by PCR/RFLP analyses of the rDNA internal transcrit spacer (ITS). *New Phytologist* 137, 357-369.
- Read D J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47, 376-390
- Redhead JF. 1968. Mycorrhizal associations in some Nigerian forest trees. *Transactions of the British Mycological Society* 51 : 377-387.
- Redhead JF. 1980. Mycorrhiza in natural tropical forest. In : *Tropical Mycorrhiza Research* (Ed. by P. Mikola), Clarendon Press, Oxford, pp. 127-142.
- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17 : 208-212.
- Rieddacker A. 1974. Un nouvel outil pour l'étude des racines de la rhizosphère : le mini-rhizotron. *Ann. Sci. For.* 31 (2) : 129-134.
- Saiki RK, Gelfan DH, Stoffel S, Scharp SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487-491.
- Sambrook J, Fritsch FE, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning : A laboratory manual*, 2ème eds. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanon KB, Bâ AM, Dexheimer J. 1997. Mycorrhizal status of some fungi fruiting beneath indigenous trees in Burkina Faso. *Forest Ecology and Management* 98 : 61-69.
- Sary H. 1989. Essai de mycorrhization de *Azelia africana* avec *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch. In *Trees for development in Sub-Saharan Africa*, Proceedings of a regional seminar held by the International Foundation for Science (IFS), ICRAF House, Nairobi, Kenya, February 20-25, 1989.
- Sélosse M-A, Jacquot D, Bouchard D, Martin F, Le Tacon F. 1998a. Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. *Moleucular Ecology* 7 : 561-573.
- Sélosse M-A, Martin F, Le Tacon F. 1998b. Survival of an introduced *Laccaria bicolor* strain in a European forest plantation monitored by mitochondrial ribosomal DNA analysis. *New Phytologist* 140 : sous presse.

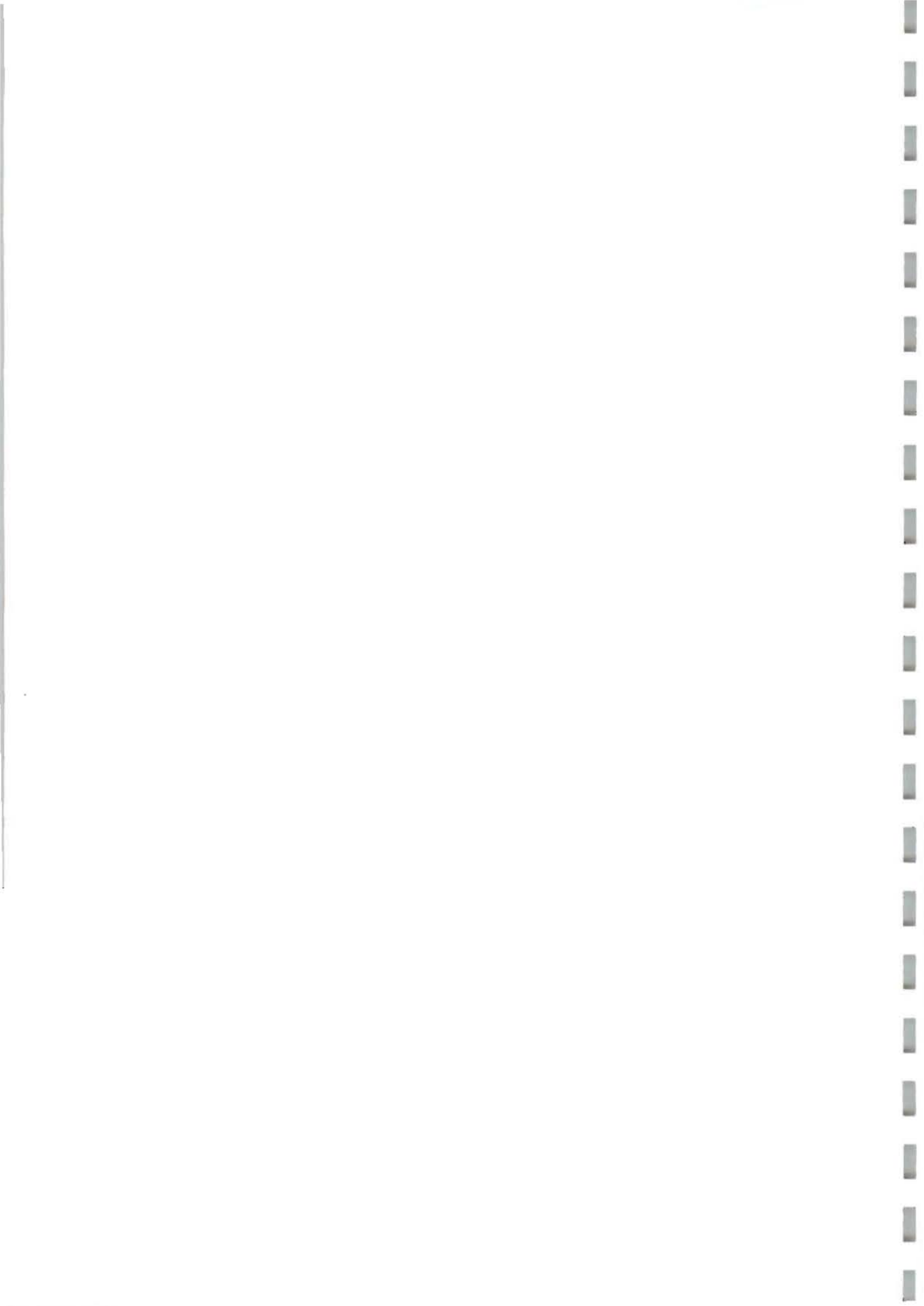


- Sélosse M-A. 1998. Etude de populations de champignons Basidiomycètes ectomycorhiziens du genre *Laccaria*, introduits ou spontanés sous Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Thèse de l'Université de Paris-Sud, 150 p.
- Sélosse MA, Costa G, Di Battista C, Le Tacon F, Martin F. 1996. Meiotic segregation and recombination of the intergenic spacer of the ribosomal DNA in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Curr. Genet.* 30, 332-337.
- Sims K, Watling R, De LA Cruz R, Jeffries P. 1997. Ectomycorrhizal fungi of the Philippines : a preliminary survey and notes on the geographic biodiversity of the Sclerodermatales. *Biodiversity and Conservation* 6 : 45-58.
- Smith SE., Read DJ. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd Edition, Academic Press. p.605.
- Strullu DG. 1991. Les relations entre les plantes et les champignons. In " *Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées*" D.G. Strullu. pp. 9-49.
- Swofford DL. 1993. PAUP, version 3.1.1. User manual. Illinois Natural History Survey (Champaign, USA).
- Tagliavini J, Bolchi A, Percudani R, Petrucco S, Rossi GL, Ottonello S. 1995. Testing a selected region of *Tuber* mitochondrial small subunit rDNA as a molecular marker for evolutionary and bio-diversity studies. In *Biotechnology of ectomycorrhizae : Molecular approaches*. (Ed. by V. Stocchi, P. Bonfante & M. Nuti), pp. 205-227.
- Taylor DL, Bruns TD. 1997. Independant, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (9), 4510-4515.
- Thapar HS, Khan SN. 1973. Studies on endomycorrhiza in some forest species. In *Proceedings of Indian National Science of Academy*, Forest Reseach Institute, Dehra Dun.
- Thoen D, Bâ AM. 1989. Ectomycorrhizas and putative ectomycorrhizal fungi of *Azelia africana* Sm. and *Uapaca guineensis* Müll. Arg. in southern Senegal. *New Phytologist* 113 : 549-559.
- Thoen D, Ducouso M. 1989. Champignons et ectomycorhizes du Fouta Djallon. *Bois et Forêts des tropiques* 221 : 45-63.
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Thomson BD, Grove TS, Malajczuk N, Hardy GE StJ. 1994. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyotus globulus* Labill. in relation to root colonisation and hyphal development in soil. *New Phytologist* 126 : 517-524.





- Trappe JM, Jumpponen . 1995. Taxonomy of ectomycorrhizal fungi : A starting point for their biotechnology. In : Stocchi V, Bonfante P, Nuti M eds. *Biotechnology of Ectomycorrhizae : Molecular Approaches*. New York : Plenum Press, 25-33.
- Tupas GL, Sajise PE. 1976. Mycorrhizal associations in some savanna reforestation trees. *Kalikasan* 5 : 235-340.
- Valentines RC. 1961. Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. *Advance of the viruse Research* 8 : p. 287.
- Villeneuve N, Le Tacon F, Bouchard D. 1991. Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglas-fir seedlings. *Plant and Soil* 135 : 95-107.
- Voiry H. 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.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, Academic Press Inc., 315-322
- Yazid SM, Lee SS, Lapeyrie F. 1994. Growth stimulation of *Hopea* spp (Dipterocarpaceae) seedlings following ectomycorrhizal inoculation with an exotic strain of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Ecology and Management* 67 : 339-343.
- Zak B. 1969. Characterisation and classification of ectomycorrhizae of Douglas fir. I. *Pseudotsuga menziesii* + *Poria terrestry* (blue and orange staining strains). *Canadian Journal of Botany* 47 : 1833-1840.
- Zak B. 1973. Classification of ectomycorrhizae. In *Ectomycorrhizae* (Ed. by G.C. Marks & T.T. Kozlowski), Academic Press, New York & London, pp. 43-78.

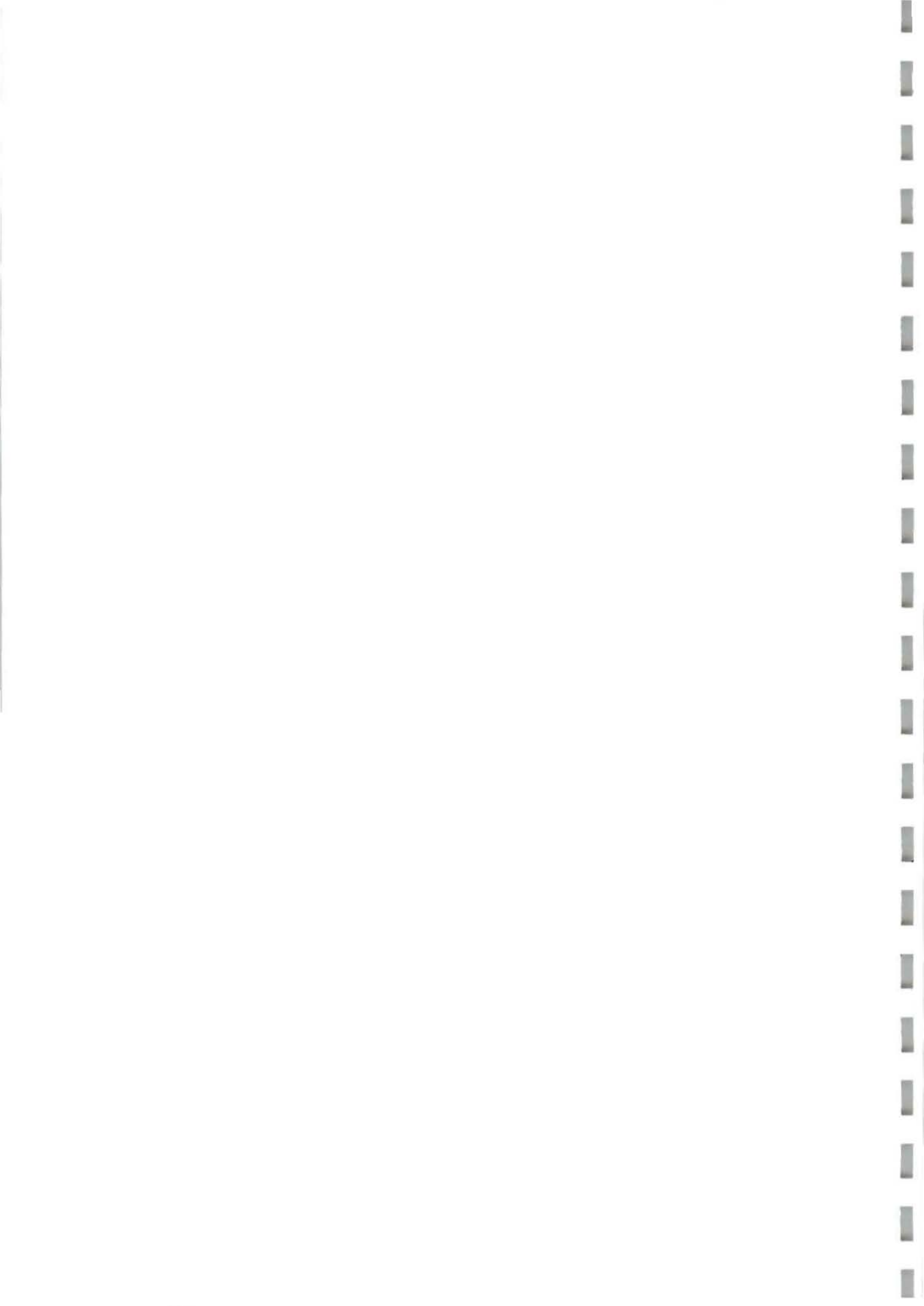


*Annexe 1*

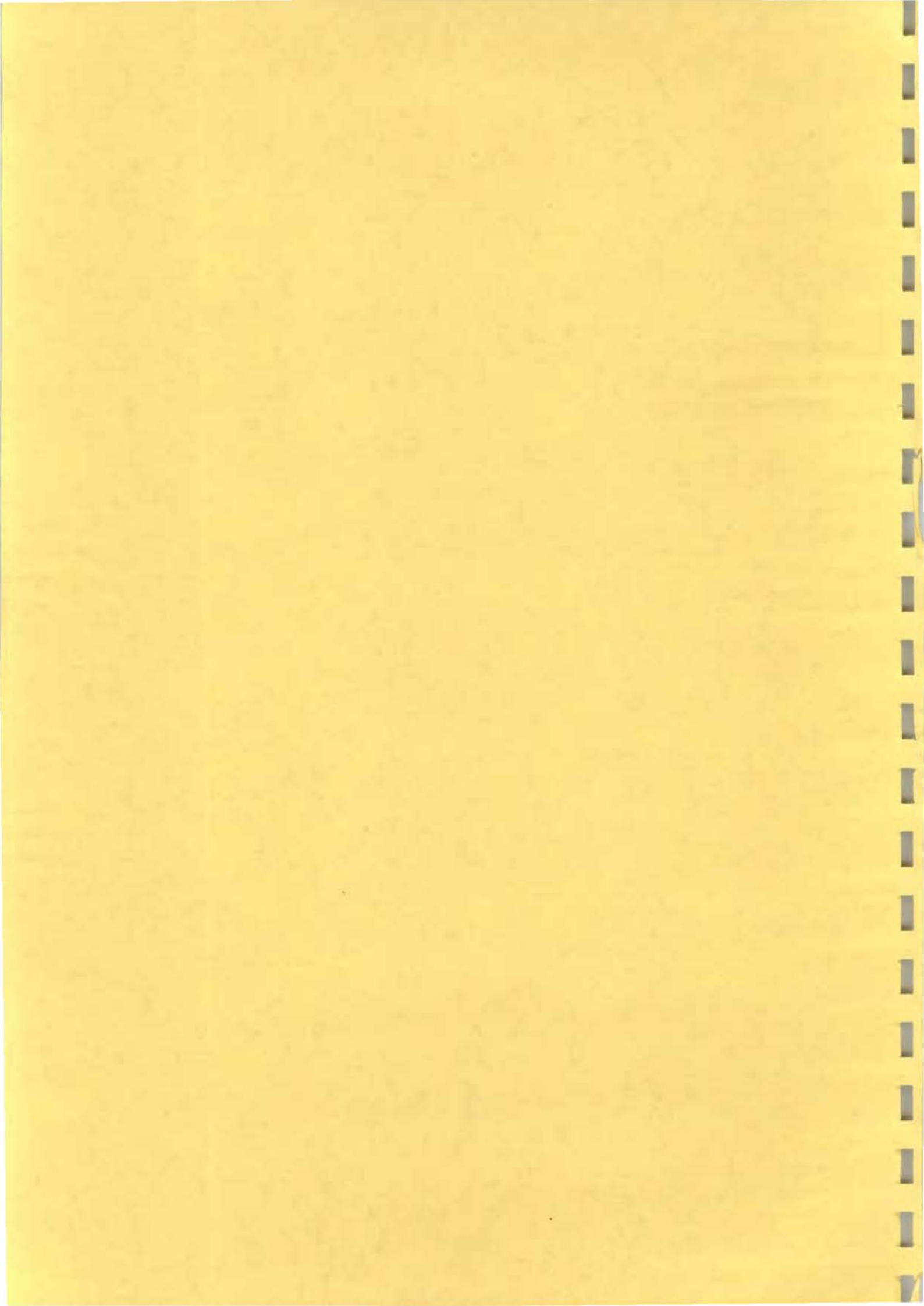
## Composition du milieu MNM (Marx, 1969)

CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,05 g
NaCl	0,025 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,15 g
Citrate ferrique 1%	1,2 ml
Thiamine-HCl 1 mg/ml	1 ml
Extrait de Malt	3 g
Glucose	10 g
Agar	20 g
H <sub>2</sub> O	qsp 1 l

Le pH est ajusté à 5,5 avant autoclavage.



*Annexes*



**Annexe 2**

Composition du tampon isothiocyanate de guanidine (Maniatis *et al.*, 1982)

Isothiocyanate de guanidine	50 g
H <sub>2</sub> O	50 ml
Tris-HCl 1M pH 7,6	5,3 ml
EDTA 0,2 M	5,3 ml
Laisser dissoudre à température ambiante et ajouter	
Sarkosyl 20%	10,6 ml
β-mercaptoéthanol	1,05 ml
H <sub>2</sub> O	qsp 106 ml

Conserver à 4°C à l'abri de la lumière.



*Annexe 3*

*Annexe 4*



ELSEVIER

Forest Ecology and Management 98 (1997) 61–69

Forest Ecology  
and  
Management

## Mycorrhizal status of some fungi fruiting beneath indigenous trees in Burkina Faso

Kadidia B. Sanon<sup>a</sup>, Amadou M. Bâ<sup>a,\*</sup>, Jean Dexheimer<sup>b,2</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Microbiologie Forestière, Institut de Recherche en Biologie et Ecologie Tropicale (IRBET), Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique (CNRST), BP 7047, Ouagadougou 03, Burkina Faso

<sup>b</sup> Laboratoire de Biologie Forestière, Associé INRA, BP 239, Université Henri Poincaré, Nancy I, Faculté des Sciences, 54506 Vandoeuvre-Les-Nancy Cedex, France

Accepted 10 March 1997

### Abstract

During the rainy season, putative ectomycorrhizal fungi were observed under three species of Caesalpinioideae *Azelia africana* Sm., *Isobertinia doka* Craib. and Stapf. and *Isobertinia dalzielii* Craib. and Stapf., one species of Diptero-carpaceae *Monotes kerstingii* Gilg. and two species of Euphorbiaceae *Uapaca guineensis* Müll. Arg. and *Uapaca somon* Aub. and Lean. The fungi belong to the orders of Agaricales, Aphyllophorales, Boletales, Cantharellales, Gautieriales, Hymenogastrales, Russulales and Sclerodermatales. Some of these fungal species e.g. *Lactarius gymnocarpus* Heim., *Cantharellus pseudofriesii* Heinem., *Scleroderma dictyosporum* Pat., *Scleroderma verrucosum* Pers., *Scleroderma* sp2 and *Russula* sp1, are common to the tropical tree families known to form ectomycorrhizas. A few species of these fungi e.g. *Amanita hemibapha* (Berk. and Br.) Sacc., *Inocybe* sp1, *Boletellus* sp3, *Lactarius* sp2 and *Xerocomus subspinulosus* Heinem. are observed only under mycorrhizal trees belonging to the group of Caesalpinioideae legumes. However, seven fungal species *Coltricia cinnamomea* (Pers.) Murr., *Boletellus* sp5, *Austrogautiera* sp. (hypogeous), *Lactarius* sp1, *Russula annulata* Heim., *Russula* sp2 and *Scleroderma* sp1 seem more specific to the *Uapaca* species. In all, twenty-seven putative ectomycorrhizal fungi were recovered and only five fungal species were isolated from sporocarps and maintained in pure culture. Four *Scleroderma* species were confirmed as mycorrhizal fungi on *A. africana*, *Isobertinia* spp. and two East African trees, *Brachystegia speciformis* Benth. and *Azelia quanzensis* Welw. The two *Uapaca* species, *B. speciformis* and *M. kerstingii* possess both arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. © 1997 Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Tropical trees; Ectomycorrhizal fungi; Arbuscular mycorrhizas; Trapping culture; Ectomycorrhizal synthesis; Specificity

### 1. Introduction

In tropical ecosystems, most tree species are associated with endomycorrhizal and/or ectomycorrhizal fungi that contribute to their mineral nutrition and growth (Harley and Smith, 1983). Endomycorrhizal symbiosis is widespread and present in 90% of plants, whereas ectomycorrhizal species are found in only

\* Corresponding author. Present address: ISRA, URA-Forêt, BP 2312, route de Hann, Dakar, Sénégal. Tel.: +221-323219/321638; fax: +221-329617.

<sup>1</sup> Tel.: +226-334098; fax: +226-307617.

<sup>2</sup> Tel.: +33-83-912223; fax: +33-83-903277.

5% of forest trees (Redhead, 1968; Gianinazzi-Pearson and Diem, 1982; Kasha et al., 1990). However, the woodlands represent approximately 12% of the area in Africa and are dominated by ectomycorrhizal tree species which play a major role in the local economy (Malaisse, 1973).

The data concerning the ectomycorrhizal fungi of most tropical trees of Africa are increasing (Redhead, 1968; Alexander, 1985; Thoen and Bâ, 1987; Thoen and Bâ, 1989; Thoen and Ducouso, 1989). Some putative ectomycorrhizal fungi have been identified in the subfamily Caesalpinioideae (*Anthonotha*, *Afzelia*, *Brachystegia* and *Paramacrolobium*) and in the family Euphorbiaceae (*Uapaca*) (Högberg, 1982; Thoen and Bâ, 1989; Thoen and Ducouso, 1989). Although the ectomycorrhizal status of the family Dipterocarpaceae (*Monotes* and *Marquesia*) and some genera belonging to Caesalpinioideae (e.g. *Isobertinia*) has already been reported (Newberry et al., 1988), no available data regarding the ectomycorrhizal fungi of these trees is known. However, in Guinea and Senegal, putative ectomycorrhizal fungi have been collected under *A. africana*, *A. bracteata*, *U. guineensis* and *U. chevaleri* (Thoen and Bâ, 1989; Thoen and Ducouso, 1989) and some of them have been isolated and maintained in pure culture (Bâ and Thoen, 1990). Among the fungi isolated from sporocarps, *Scleroderma dictyosporum* and *Scleroderma verrucosum* have confirmed their ectomycorrhizal status as early stage fungi (Bâ and Thoen, 1990; Bâ et al., 1991).

In this paper, we report (1) the putative ectomycorrhizal fungi of *Afzelia africana*, *Isobertinia doka*, *Isobertinia dalziellii*, *Monotes kerstingii*, *Uapaca guineensis* and *Uapaca somon*, (2) the mycorrhizal status of these local tree species, (3) the in vitro symbiotic character of some putative ectomycorrhizal fungi isolated from sporocarps and their specificity on two East African trees *Afzelia quanzensis* and *Brachystegia speciformis*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Site description

Eleven forests in Burkina Faso were visited during the rainy season of 1994 and 1995 in order to collect ectomycorrhizal fungi fruiting under local

trees (Fig. 1). The forests are located in southwestern Burkina Faso (9°45'N–12°15'N and 3°10'W–5°25'W), and ranged from Guinean to Sudano-Guinean vegetation. The vegetation sampled included savanna and open, semideciduous and riverine forests. The mean annual rainfall varies from 1000 to 1200 mm, with a long dry season from October to May. The rainfall is very unevenly distributed over the year and appears to be declining by 100 to 200 mm since 1970 (Kessler and Geerling, 1994).

The Sudano-Guinean trees such as *A. africana*, *I. doka*, *I. dalziellii*, and *M. kerstingii*, are the most common tree genera in semideciduous lowland forests, sometimes dominating the canopy. The gregarious species, *I. doka*, is often associated with *I. dalziellii* in moist zones, or with species such as *Anogeissus leiocarpus*, *Prosopis africana*, *Burkea africana*, *Pterocarpus erinaceus*, *Parkia biglobosa*, *Khaya senegalensis*, *Butyrospermum parkii* and *U. somon* (Guinko, 1984). The northern limit of *I. doka* is 12°N latitude (Terrible, 1984). *M. kerstingii* is confined to southern Burkina Faso. It is the only Dipterocarp occurring in West Africa associated with *Butyrospermum parkii*, *Entada africana*, *Gardenia ternifolia*, *Lannea velutina*, *Parkia biglobosa* and *Terminalia avicennoides* (Terrible, 1984). As in southern Senegal (Thoen and Bâ, 1989), *A. africana* has a wide range of habitats from savanna to open forest or riverine forest. *U. guineensis* is a relict of Guinean vegetation found scattered in riverine forest, with stilt roots adapted to waterlogging in hydromorphic soils. *U. somon* is a savanna tree found scattered on dry plateaus or marshland (Aubreville, 1959).

Among the eleven sites, three are dominated by *Isobertinia* spp (sites I, VIII and IX), two by *A. africana* (sites IV and VII), three by *U. guineensis* (sites III, VI and X), two by *M. kerstingii* (sites II and V) and one by *U. somon* (site XI). The main characteristics of the upper soil layer (0–20 cm) of these sites are shown in Table 1. In general, the soil pH ranged from strongly acid to neutral with low organic matter and available phosphorus contents.

### 2.2. Sampling

Soil samples were collected from the eleven sites during prospection in the rainy season. Seeds of

indigenous trees were harvested in southwestern Burkina Faso. Seeds of *A. quanzensis* and *B. speciformis* were obtained from Kenya Forestry Seed Centre (Nairobi).

Superficial roots of *Isobertinia* spp., *Uapaca* spp., *A. africana* and *M. kerstingii* were excavated starting at the trunks of the trees. 10–20 g of fine root material were extracted and fixed in formalin, acetic acid and water (1:1:1, v/v/v). The whole root system of regenerating seedlings was also fixed. In

the laboratory, fine roots were stained for arbuscular mycorrhizas (AM) according to the procedure of Phillips and Hayman (1970) and examined with light microscopy. Roots were colonized by AM when they showed appressoria, vesicles, endocellular hyphal coils and arbuscules.

Sporocarps of putative ectomycorrhizal fungi were collected from under *A. africana*, *Isobertinia* spp., *M. kerstingii*, and *Uapaca* spp. photographed, oven-dried at 50°C, identified in the laboratory and

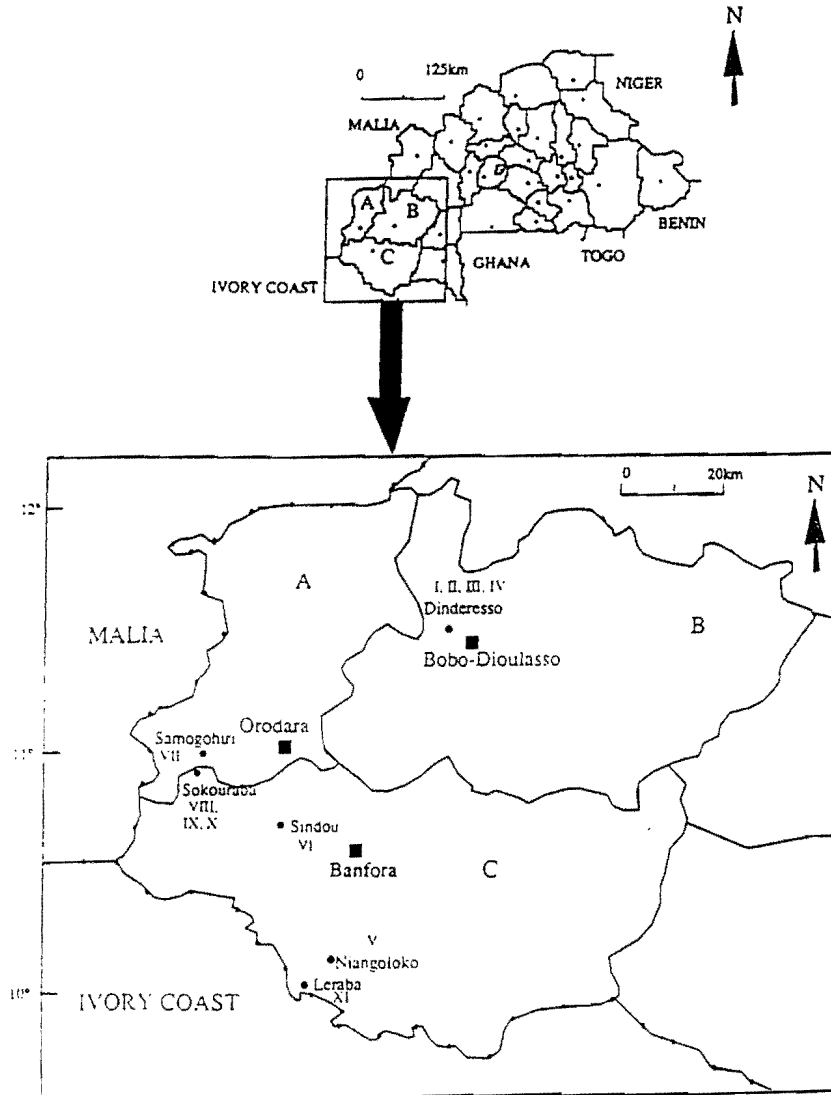


Fig. 1. Localization of the samples sites. A = Province of Kenedougou; B = Province of Houet; C = Province of Comoé. (■) County of Province. (●) Village. (—) Province limit, (---) Border; I, VIII, IX = *Isobertinia doka* & *I. dalziellii*; IV, VII = *Afzelia africana*; III, VI, X = *Uapaca guineensis*; II, V = *Monotes kerstingii*; XI = *Uapaca soman*.

deposited in the herbarium at IRBET (Burkina Faso). Fungi were isolated at the collection sites from fresh sporocarps and maintained on MMN agar medium (Marx, 1969).

### 2.3. Trapping culture

Seeds of *A. africana* and *A. quanzensis* were scarified in 95% sulfuric acid for 2 h and rinsed with sterile distilled water. Seeds of *I. doka*, *I. dalziellii* and *B. specififormis* were disinfected in 1% calcium hypochlorite, rinsed and soaked in sterile distilled water for 48 h. Then, seeds were sowed in plastic bags containing a mixture of sampled soils and sand (1:3, v/v). *A. africana* seedlings were raised on the eleven sampled soils, whereas those of *A. quanzensis* and *B. specififormis* were raised on soil of site IV and those of *Isobertinia* spp. on soil of sites I, VIII and IX. Plants were maintained in natural climatic conditions in Ouagadougou (Burkina Faso) and watered regularly with tap water. They were carefully uprooted and their mycorrhizal status was assessed after six months.

The *U. somon* and *U. guineensis* seeds germinated as soon as they reached the soil in the field and often were not available for nursery studies. Seeds of *M. kerstingii* were harvested but failed to germinate, probably due to the collection, drying and storage conditions. In general, the seeds of Dipterocarps are extremely recalcitrant, becoming nonviable when

they dry below moisture limits from 12% to 30% (Krishnapillay, 1994).

### 2.4. Ectomycorrhizal synthesis

Seeds of tree species were surface disinfected as indicated above. Pregerminated seeds were raised in minirhizotrons containing a mixture of vermiculite and peat moss (4:1, v/v) and moistened with distilled water (Bâ and Thoen, 1990). The conditions of growth cabinet were 35°C day/27°C night, daylength 16 h, relative humidity 60–70% and light intensity 60 W/m<sup>2</sup>. For inoculum preparation, the mycorrhizal fungi were grown at 30°C on absorbent paper cards laid on MMN medium (Chilvers et al., 1986). We tested four isolates of *Scleroderma* species, one isolate of *T. brunneosetosa* and, thus, one isolate of *Scleroderma dictyosporum* Pat. (ORS. 7731) fruiting beneath *A. africana* (Bâ and Thoen, 1990). After two weeks of seedling growth, inocula of the different fungi, in the form of colonized paper cards, were placed onto the root systems. Ten days after inoculation, the seedling root systems were examined for mycorrhizal formation. Lateral roots with a fungal sheath were collected under binocular microscope, and fixed in 2.5% gluteraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2). Then, freehand transverse sections were cleared in 12% sodium hypochlorite, rinsed with acidified water, stained with a mixture of Congo red, glycerol and water

Table 1  
Main physico-chemical characteristics of the upper soil layer (0–20 cm)

Site No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Clay (%)	7.8	9.8	7.8	1.9	5.8	17.6	5.8	17.6	21.5	23.5	5.8
Silt (%)	17.6	11.7	27.4	11.7	11.7	17.6	11.7	35.2	25.4	23.5	11.7
Sand (%)	74.5	78.4	64.7	86.2	82.3	64.7	82.3	47.0	52.9	52.9	82.3
pH (H <sub>2</sub> O)	7.0	5.8	6.5	6.9	6.2	6.5	5.6	6.6	5.4	5.0	6.1
pH (KCl)	5.9	4.4	5.3	5.5	4.8	5.5	4.8	5.1	4.3	3.6	4.5
Total C (%)	1.5	0.6	1.1	0.3	0.8	1.3	0.6	1.6	2.0	1.1	0.5
Total N (%)	0.2	0.04	0.07	0.01	0.07	0.10	0.05	0.11	0.10	0.07	0.02
Total organic matter (%)	2.7	1.1	1.9	0.6	1.4	2.3	1.1	2.7	3.4	1.9	0.9
C/N	7	16	16	28	12	14	14	14	20	16	22
Total P (mg/g)	65	65	22	43	324	32	259	259	97	22	43
Available P (mg/g)	5.5	2.2	4.9	2.7	1.2	2.4	3.0	5.2	2.6	4.7	12.1
V (%) <sup>a</sup>	64	49	103	32	54	51	35	72	109	11	17

<sup>a</sup> Metallic cations percentage saturation of soil.

Table 2

Putative ectomycorrhizal fungi collected under *Azelia africana*, *Isberlinia doka*, *Isberlinia dalziellii*, *Monotes kerstingii*, *Uapaca guineensis* and *Uapaca somon*

Orders, Species	Host trees <sup>a</sup>						Isolation	N° of voucher material (IR)
	<i>I.do.</i>	<i>I.da.</i>	<i>A.a.</i>	<i>M.k.</i>	<i>U.g.</i>	<i>U.s.</i>		
Aphylophorales								
<i>Coltricia cinnamomea</i> (Pers.) Murr.	+	+	+	-	-	-	-	41
Agaricales								
<i>Ananita hemibapha</i> (Brek. and Br.) Sacc.	+	+	+	-	-	+	-	25, 43
<i>Amanita</i> sp1 (brown)	+	+	+	+	-	-	-	67, 42
<i>Amanita</i> sp2 (rose)	-	-	+	+	-	-	-	26, 50
<i>Inocybe</i> sp1	+	+	+	-	-	-	-	10, 39
<i>Inocybe</i> sp2	+	+	-	-	-	+	-	11, 12, 38
Boletales								
<i>Boletellus</i> sp1 (brown)	+	+	+	-	+	+	-	19, 46, 13, 90
<i>Boletellus</i> sp2 (yellow)	+	+	+	-	-	+	-	48, 60
<i>Boletellus</i> sp3 (yellow-green)	+	+	-	-	-	-	-	52
<i>Boletellus</i> sp4 (blue)	-	-	+	-	-	-	-	53
<i>Boletellus</i> sp5 (orange)	-	-	-	-	+	-	-	65
<i>Strobilomyces</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	40
<i>Tubosaeta brunneosetosa</i> (Siz.) Horak.	+	+	-	-	+	-	+	17a, 17b
<i>Xerocomus subspinulosus</i> Heinem.	+	+	+	-	-	-	-	66
Cantharellales								
<i>Cantharellus pseudofriesii</i> Heinem.	+	+	+	+	+	+	-	28, 33, 37, 77, 80, 81
Gautierales								
<i>Austrogautiera</i> sp. (hypogeous)	-	-	-	-	+	-	-	29
Hymenogastrales								
<i>Sclerogaster</i> sp. (hypogeous)	+	+	+	+	+	-	-	34, 104, 61, 72
Russulales								
<i>Lactarius gymnocarpus</i> Heinem.	+	+	+	+	+	+	-	23, 24, 27, 36, 45, 47
<i>Lactarius</i> sp1 (brown-orange)	-	-	-	-	+	-	-	64
<i>Lactarius</i> sp2 (yellowish)	+	-	-	-	-	-	-	68
<i>Russula annulata</i> Heinem.	-	-	-	-	+	-	-	46
<i>Russula</i> sp1 (pinkish red)	+	+	+	+	+	+	-	14, 49, 54, 58, 69, 70
<i>Russula</i> sp2 (brown)	-	-	-	-	-	+	-	62
Sclerodermatales								
<i>Scleroderma</i>	+	+	+	+	+	+	+	215, 401
<i>dicryosporum</i> Pat.								300, 103, 104, 304, 304, 205
(mean diameter $8 \pm 1 \mu\text{m}$ )								
<i>Scleroderma verrucosum</i> Pers.	+	+	+	+	+	+	+	501, 601, 400, 102, 105, 200,
(mean diameter $7 \pm 2 \mu\text{m}$ )								305, 500, 503
<i>Scleroderma</i> sp1	-	-	-	-	+	-	+	406, 407, 409
(mean diameter $11 \pm 2 \mu\text{m}$ )								
<i>Scleroderma</i> sp2	+	+	+	+	+	+	+	100, 208, 408
(mean diameter $6 \pm 1 \mu\text{m}$ )								
Number of species (total = 27)	17	16	15	10	14	11	5	

<sup>a</sup> *I.do.* = *Isberlinia doka*, *I.da.* = *Isberlinia dalziellii*, *A.a.* = *Azelia africana*, *M.k.* = *Monotes kerstingii*, *U.g.* = *Uapaca guineensis*, *U.s.* = *Uapaca somon*.

(0.5:1:1, w/v/v) and examined with a light microscope.

### 3. Results

#### 3.1. Ectomycorrhizal fungi and isolation

Table 2 shows the putative ectomycorrhizal fungi collected under the six host trees. These fungi were distributed through eight orders belonging to Agaricales, Aphyllophorales, Boletales, Cantharellales, Gautieriales, Hymenogastres, Russulales and Sclerodermatales, and twenty-four fungal species. The most occurred orders were Boletales, Russulales, Agaricales and Sclerodermatales, with 8, 6, 5 and 4 fungal species, respectively. Seventeen fungal species were collected under *I. doka*, sixteen under *I. dalziellii*, fifteen under *A. africana*, ten under *M. kerstingii* and *U. somon* and fourteen under *U. guineensis*. The fungal species *Cantharellus pseudofriesii*, *Lactarius gymnocarpus*, *Scleroderma dictyosporum*, *Scleroderma verrucosum*, *Scleroderma* sp2 and *Russula* sp1 were found to be common to all six host trees. Two *Amanita* species whose *Amanita* sp1 and *Amanita* sp2 were common to the Caesalpinoideae subfamily and Dipterocarpaceae family. The sporocarps of *Coltricia cinnamomea*, *Boletellus* sp5, *Lactarius* sp1, *Russula annulata*, *Russula* sp2, *Scleroderma* sp1 and one hypogeous species, *Austrogautiera* sp, seemed more specific to the *Uapaca* species. The five fungal species, *A. hemibapha*, *Inocybe* sp1, *Boletellus* sp3, *X. subspinulosus* and *Lactarius* sp2, occurred only under host trees belonging to the Caesalpinoideae subfamily. Four species of *Scleroderma* were found in Burkina Faso, including *S. dictyosporum* and *S. verrucosum*. Sporocarps of *Scleroderma* sp1 were pinkish and their spores differed from those of both identified *Scleroderma* by the presence of long spines from 2 to 3  $\mu\text{m}$ . The spore diameters of this *Scleroderma* species ranged from 10 to 12  $\mu\text{m}$ . Sporocarps of *Scleroderma* sp2 were yellow and their spore diameters ranged from 5 to 6  $\mu\text{m}$  without peridial ornamentations. The average diameter of *S. dictyosporum* spores was 8.5  $\mu\text{m}$ . The hypogeous fungal species *Sclerogaster* sp. was common to five

trees, whereas *Austrogautiera* sp. were found specifically under *Uapaca* spp.

Three isolates of *S. dictyosporum* (IR104, IR109 and IR215) and *Scleroderma* sp2 (IR208, IR408 and IR100), two isolates of *Scleroderma* sp1 (IR406 and IR409) and *Tubosaeta brunneosetosa* (IR17a and IR17b), and one isolate of *S. verrucosum* (IR500) were maintained in pure culture.

#### 3.2. In situ mycorrhizal status of trees

Roots of adult trees and regenerating plants were examined for their mycorrhizal status (Table 3). The ectomycorrhizal status of all adult tree species was confirmed. Connections have been established be-

Table 3  
Mycorrhizal status of host trees

Host trees	Mycorrhizal status	
	ectomycorrhizas	endomycorrhizas
<i>Afzelia africana</i>		
Adult tree	+	-
Regeneration	+	-
Seedlings	+	-
<i>Isoblerlinia doka</i>		
Adult tree	+	-
Regeneration	+	-
Seedlings	+	-
<i>Isoblerlinia dalziellii</i>		
Adult tree	+	-
Regeneration	+	-
Seedlings	+	-
<i>Monotes kerstingii</i>		
Adult tree	+	+
Regeneration	+	+
<i>Uapaca guineensis</i>		
Adult tree	+	+
Regeneration	+	+
<i>Uapaca somon</i>		
Adult tree	+	+
Regeneration	+	+
<i>Afzelia quanzensis</i>		
Seedlings	+	-
<i>Brachystegia speciformis</i>		
Seedlings	+	+

+ = presence, - = absence.



Table 4

Fungal isolates and their ectomycorrhizal status on *Afzelia africana* (A.a.), *Afzelia quanzensis* (A.q.), *Isoblerlinia doka* (I.do.), *Isoblerlinia dalziellii* (I.da.) and *Brachystegia speciformis* (B.s.)

Culture No. and fungi	Host trees	Origin	Infectivity				
			A.a.	A.q.	I.do.	I.da.	B.s.
IR109 <i>S. dictyosporum</i>	<i>A. africana</i>	Burkina Faso	+	+	+	+	+
IR304 <i>S. dictyosporum</i>	<i>M. kerstingii</i>	Burkina Faso	+	+	+	+	+
IR406 <i>Scleroderma</i> sp1	<i>U. guineensis</i>	Burkina Faso	+	+	+	+	+
IR408 <i>Scleroderma</i> sp2	<i>U. guineensis</i>	Burkina Faso	+	+	+	+	+
IR500 <i>S. verrucosum</i>	<i>U. somon</i>	Burkina Faso	+	+	+	+	+
IR17 <i>Tubosaeta brunneosetosa</i>	<i>Isoblerlinia</i> spp. and <i>U. guineensis</i>	Burkina Faso	–	–	–	–	–
ORS 7731 <i>S. dictyosporum</i>	<i>A. africana</i>	Senegal	+	+	+	+	+

+ = presence of mantle and Hartig net, – = absence of mantle and Hartig net.

tween white, yellow, beige and brown bristly ectomycorrhizas of *Uapaca* spp. and sporocarps of *Scleroderma* sp1, *Austrogautiera* sp., *L. gymnocarpus* and *C. cinnamomea*, respectively. In general, white ectomycorrhizas were collected under sporocarps of *Scleroderma* spp. collected under *A. africana*, *Isoblerlinia* spp. and *M. kerstingii*. No ectomycorrhizas were clearly observed under other sporocarps collected around these trees. In the nursery, we found two types of mycorrhizas on *A. africana* root seedlings. White ectomycorrhizas were found only in three soil samples (V, VIII and X). The second type of ectomycorrhizas had a beige color and were present in all other soil samples. Both of these types of ectomycorrhizas were comparable with those observed on *A. quanzensis* and *B. speciformis* roots on soil of site IV.

AM were present on the roots of adult trees and regenerating plants of *M. kerstingii* and *Uapaca* spp. (Table 3). They were also present on baiting plants of *B. speciformis*. However, no AM were found on *A. africana*, *A. quanzensis* and *Isoblerlinia* spp. root systems (Table 3).

### 3.3. *In vitro* ectomycorrhizal status of seedlings

Among the thirty fungal species collected, only *T. brunneosetosa*, and *Scleroderma* spp. were isolated, maintained in MMN medium and tested for their ability to form ectomycorrhizas (Table 4). *X. sub-spinulosus*, *Sclerogaster* sp. and *Boletellus* sp3 were also isolated but died during successive subcultures. All *Scleroderma* spp. were able to form ecto-

mycorrhizas on *Afzelia* spp., *Isoblerlinia* spp. and *B. speciformis*. Their morphology varied from simple to branched and hyphal strands were often present. In transverse section, hyphae colonized roots by forming fungal sheath and penetrating as a Hartig net which did not exceed the epidermal cells.

## 4. Discussion

Where host trees were present, the ectomycorrhizal fungi were present too, suggesting a high dependence of these fungi on the host trees. All fungal species collected in Burkina Faso belonged to the genera usually reported as putative ectomycorrhizal fungi in Africa (Heinemann, 1954, 1959, 1966; Heim, 1970; Pegler, 1977; Thoen and Bâ, 1987; Thoen and Bâ, 1989; Thoen and Ducouso, 1989). The identified fungal species have already been collected in southern Senegal (Thoen and Bâ, 1989). However, there was a great diversity of species occurring in both Senegal and Burkina Faso. Twenty-seven species were found under six host trees in Burkina Faso, whereas forty-three under *A. africana* and *U. guineensis*, in Senegal (Thoen and Bâ, 1989; Bâ, 1990). This discrepancy was probably due to the several common ectomycorrhizal fungi fruiting beneath host trees during the rainy season in Burkina Faso. The hypogeous fungus *Austrogautiera* sp. occurring only under *Uapaca* spp., may be the same species found under *U. guineensis* in Senegal, as indicated by their spores and yellow color of ectomycorrhizas formed (Thoen and Bâ, 1989). Four

species of *Scleroderma* were collected in Burkina Faso including *Scleroderma verrucosum* and *Scleroderma dictyosporum*. The sporocarps of the two identified *Scleroderma* have already been observed in Senegal (Thoen and Bâ, 1989) and Guinea (Thoen and Ducouso, 1989). All *Scleroderma* species were able to form ectomycorrhizas on the five host trees including the East African trees, *A. quanzensis* and *B. speciformis*. This suggests that these fungi have a widespread and broad host range.

Nevertheless, several genera of fungi e.g. *Lactarius*, *Russula*, *Inocybe* and *Boletellus* failed to be isolated or to be maintained in pure culture. Therefore, their in vitro symbiotic character was not verified. Hence, *T. brunneosetosa* was isolated but failed to colonize, even if their sporocarps were collected regularly from under *Isobertinia* spp. This indicates that fungal cultures isolated from putative ectomycorrhizal fungi did not necessarily infect the young seedlings. In other circumstances, Bâ and Thoen (1990) also isolated eleven fungi from thirty-one sporocarps beneath *A. africana*, whereas only two isolates were able to form ectomycorrhizas on the young seedlings. In addition, Bâ et al. (1994a) also showed that one isolate of *Pisolithus* sp. formed a pseudoparenchymatic tissue over lateral roots of *A. africana* seedlings under varied in vitro conditions after 15 days of contact. This superficial colonization by the fungus induces a hypersensitive reaction on *A. africana* cell wall. However, this fungus was able to form typical ectomycorrhizas on 6 month old *A. africana* seedlings. Similar observations were made on 8 month old *A. quanzensis* seedlings inoculated with basidiospores of one isolate of *Pisolithus* (Munyanziza and Kuyper, 1995). These data suggest that the mycorrhizal synthesis are not conclusive to establish the symbiotic character of putative ectomycorrhizal fungi. The isolates which did not show early colonization of seedlings, may later form ectomycorrhizas, depending on the degree of plant maturity (Mason et al., 1983). This succession may be explained by the variation of root soluble carbohydrate contents which increased with plant growth (Mason et al., 1983; Gibson and Deacon, 1990). In this respect, Bâ et al. (1994a,b) establish that the time sequence of ectomycorrhizal colonization of *A. africana* seedlings reflected changes in root carbohydrate level. Therefore, several genera of fungi

collected in the field could be mid- or late-stage fungi in the sense of Mason et al. (1983).

Most tree species formed only one type of mycorrhiza, but some have been found to possess both arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. Our observations confirmed the ectomycorrhizal status of the six local trees and the two East African trees, as has already been shown (Alexander and Högberg, 1986; Newberry et al., 1988; Thoen and Bâ, 1989; Thoen and Ducouso, 1989). *A. africana*, *A. quanzensis* and *Isobertinia* spp. were not colonized by AM fungi, whereas *B. speciformis* and *Uapaca* spp. were. Our observations are consistent with those of Bâ (1990) on *A. africana*. However, there is a discrepancy with those of Thoen and Ducouso (1989) on this plant species.

In conclusion, our results show a high diversity of putative ectomycorrhizal fungi fruiting beneath six indigenous trees. The in vitro ectomycorrhizal status of four *Scleroderma* species is confirmed on *Cesalpinioideae*. Some of the fungi are, through their mycelial strand, linked with ectomycorrhizas of *Uapaca* spp. in the field. However, further studies are necessary to elucidate the ectomycorrhizal status of other fungi.

#### Acknowledgements

This work was sponsored by the International Foundation for Science (Stockholm). We thank Dr. Helen Tomlinson (University of Wales, Bangor) for the English correcting of the manuscript.

#### References

- Alexander, I.J., Högberg, P., 1986. Ectomycorrhizas of tropical angiospermous trees. *New Phytol.* 102, 541–549.
- Alexander, I.J., 1985. Mycorrhizas of West African forest trees. In: Molina R. (Ed.), *Proc. of the 6th North American Conf. on Mycorrhizae*. Forest Research Laboratory, Bend, OR, pp. 447.
- Aubreville, A., 1959. *La flore forestière de la Côte d'Ivoire*. Tome II, 2ème ed. rev. Publ. No. 15, CTFT.
- Bâ, A.M., 1990. Contribution to the study of ectomycorrhizal symbiosis of two tropical trees: *Afzelia africana* Sm. and *Uapaca guineensis* Müll. Arg. Ph.D. thesis, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 193 pp.
- Bâ, A.M., Thoen, D., 1990. First syntheses of ectomycorrhizas between *Afzelia africana* Sm. (Caesalpinioideae) and native fungi from West Africa. *New Phytol.* 103, 441–448.

- Bâ, A.M., Garbaye, J., Dexheimer, J., 1991. Influence of fungal propagules during the early stage of the time sequence of ectomycorrhizal colonization on *Afzelia africana* Sm. seedlings. *Can. J. Bot.* 66, 2442–2447.
- Bâ, A.M., Garbaye, J., Dexheimer, J., 1994a. The influence of culture conditions on mycorrhizal formation between the ectomycorrhiza fungus *Pisolithus* sp. and *Afzelia africana* Sm. seedlings. *Mycorrhiza* 5, 283–287.
- Bâ, A.M., Garbaye, J., Martin, F., Dexheimer, J., 1994b. Root soluble carbohydrates of *Afzelia africana* Sm. seedlings and modifications of mycorrhiza establishment in response to the excision of cotyledons. *Mycorrhiza* 4, 269–275.
- Chilvers, G.A., Douglas, P.A., Lapeyrie, F.F., 1986. A paper sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytol.* 103, 397–402.
- Gibson, F., Deacon, J.W., 1990. Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture: effects of glucose, nitrogen and phosphorus in relation to successions. *Mycol. Res.* 94, 166–172.
- Gianinazzi-Pearson, V., Diem, H.G., 1982. Endomycorrhizae in the tropics. In: Dommergues Y.R., Diem, H.G. (Eds.), *Microbiology of tropical soils and plant productivity*. Nijhoff, Junk, The Hague, pp. 209–251.
- Guinko, S., 1984. *Végétation de la Haute Volta*. Tome I. Thèse de Doctorat des Sciences. Université de Bordeaux III, 394 pp.
- Harley, J.L., Smith, S.E., 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, 482 pp.
- Heim, R., 1970. Particularités remarquables des Russules tropicales pelliculariae lilliputiennes: Les complexes annulata et radicans. *Bull. Soc. Mycol. France* 86, 59–77.
- Heinemann, P., 1954. Boletineae. *Flore iconographique des champignons du Congo*. Fasc., 3, pp. 50–80, pl. 9–12.
- Heinemann, P., 1959. Cantharellineae. *Flore iconographique des champignons du Congo*. Fasc. 8, pp. 153–165, pl. 26–28.
- Heinemann, P., 1966. Hygrophoraceae, *Laccaria* et Boletineae II (compléments). *Flore iconographique des champignons du Congo*. Fasc. 15, pp. 279–308, pl. 47–49.
- Högberg, P., 1982. Mycorrhizal associations in some woodlands and forest trees and shrubs in Tanzania. *New Phytol.* 92, 407–415.
- Kasha, P., Furlan, V., Lumande, K., 1990. Symbioses racinaires chez quelques essences forestières importantes au Zaïre. *Bois For. Trop.* 224, 27–33.
- Kessler, J.J., Geerling, C., 1994. *Profil environnemental du Burkina Faso*. Université Agronomique, Département de l'Aménagement de la Nature. Wageningen, 63 pp.
- Krishnapillay, B., 1994. Seed biology and handling. In: Appanah, S., Cossalter, C. (Eds.), *State of Knowledge and Priorities and Needs for Future Research*, 5th Roundtable Conf. on Dipterocarps held at Chiangmai, Thailand, Rep. 4, pp. 2–3.
- Malaisse, F., 1973. Contribution à l'étude de l'écosystème forêt claire (Miombo), le projet Miombo. Note 8. *Ann. Univ. Abidjan* 6, 227–250.
- Marx, D.H., 1969. The influence of ectotropic mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59, 153–163.
- 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 Soil* 7, 247–256.
- Munyanziza, E., Kuyper, T.W., 1995. Ectomycorrhizal synthesis on seedlings of *Afzelia quanzensis* Welw. using various types of inoculum. *Mycorrhiza* 5, 283–287.
- Newberry, 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 Phytol.* 109, 433–455.
- Pegler, D.N., 1977. A preliminary Agaric Flora of East Africa. *Kew Bull., Addit. ser. VI*. HMSO, London, pp. 1–668, pl. 1–27, figs. 1–129.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infections. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158–161.
- Redhead, J.F., 1968. Mycorrhizal associations in some Nigerian forest trees. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 51, 377–387.
- Terrible, M.P.B., 1984. *Essai sur l'écologie et la sociologie des arbres et arbustes de Haute-Volta*. Librairie de la Savane, Bobo Dioulasso, Burkina Faso.
- Thoen, D., Bâ, A.M., 1987. Observation in the fungi and the ectomycorrhizae of *Afzelia africana* and *Uapaca guineensis* in southern Senegal. In: Sylvia, D.M., Hung, L.L., Graham, J.H. (Eds.), *Mycorrhizae in the Next Decade, Practical Applications and Research Priorities*, Proc. of the 7th NACOM meeting, Gainesville, FL, p. 132.
- Thoen, D., Bâ, A.M., 1989. Ectomycorrhizas and putative ectomycorrhizal fungi of *Afzelia africana* Sm. and *Uapaca guineensis* Müll. Arg. in southern Senegal. *New Phytol.* 113, 549–559.
- Thoen, D., Ducousso, M., 1989. Champignons et ectomycorhizes du Fouta Djallon. *Bois For. Trop.* 221, 45–63.

Mademoiselle SANON Bibata Kadidia

DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY-I  
en BIOLOGIE VÉGÉTALE & FORESTIÈRE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 22 février 1999 n° 164

Le Président de l'Université

