

F0000049

FT 810003
D3U2
X0.20
DIA

1286
114.5.101.30

D. E. A.
Sciences Naturelles

INTERACTION FERTILISATION-NODULATION-MYCORHIZATION
CHEZ L'AULNE
(Alnus incana (L). MOENCH)

Ousmane DIAGNE

AVANT - PROPOS

Le travail que je présente ici a bénéficié de l'aide de plusieurs personnes que je voudrais remercier.

A Monsieur BARDIN qui a bien voulu m'accepter dans son Département de l'Université de Lyon.

A Monsieur BONNEAU, Directeur de la Station de Recherches sur les Sols forestiers et la Fertilisation, qui m'a accueilli à sa Station.

A Monsieur LE TACON à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour son aide depuis la proposition du sujet jusqu'au terme de ce travail.

A Monsieur GARBAYE pour l'aide et l'attention qu'il a portées à mes travaux.

A Monsieur MAUDINAS avec qui nous avons effectué une partie de nos manipulations au Laboratoire de Botanique de l'université de Nancy.

Je présente mes vifs remerciements à D. BOUCHARD, F. BOURGEOIS, M. ADRIAN, Melle BITSCH, Mme PERRIN pour leur collaboration technique et à Melle BELGRAND qui s'est intéressée de près à mes travaux.

PLAN DU MEMOIRE

	Pages
I - <u>INTRODUCTION</u>	1
II - <u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	2
2.1 - <u>Etude morphologique et anatomique</u>	2
- <u>Caractères généraux des principales espèces d'Aulne</u>	2
- <u>Morphologie et anatomie des Ectomycorhizes de l'Aulne</u>	4
- <u>Structure des Endomycorhizes</u>	5
- <u>Morphologie et structure des nodules de l'Aulne</u>	6
2.2 - <u>Etude physiologique</u>	7
- <u>Mycorhization</u>	7
- <u>Physiologie de la nodulation</u>	a
- <u>Etude comparative entre mycorhization et nodulation</u>	10
2.3 - <u>Ecologie de l'Aulne</u>	11
- <u>Intérêt écologique de l'Aulne</u>	11
- <u>Influence de facteurs externes,</u>	12
2.4 - <u>Importance pratique de l'Aulne</u>	13
- <u>Fertilisation des sols</u>	13
- <u>Lutte contre les pathogènes</u>	13
- <u>Utilisation directe en sylviculture</u>	14
III - <u>OBSERVATIONS DES RACINES D'AULNE DANS LA NATURE</u>	14
IV - <u>ESSAIS DE SYNTHÈSE AXENIQUE</u>	15
4.1 - <u>Inoculation ectomycorhizienne</u>	15
- <u>Matériel et méthodes de mise en place des essais</u>	15
- <u>Résultat de l'inoculation</u>	17
4.2 - <u>Inoculation de l'actinomycète</u>	17
- <u>Méthode de synthèse in vitro</u>	17
- <u>Résultats</u>	18
V - <u>ETUDE EXPERIMENTALE EN SERRE</u>	18
5.1 - <u>Matériel et méthodes</u>	18
- <u>Matériel d'étude</u>	18
- <u>Protocole expérimental</u>	19
5.2 - <u>Résultats</u>	21
5.2.1 - <u>Influence des traitements sur la croissance en hauteur</u>	21
5.2.2 - <u>Interaction nodulation-mycorhization-disponibilité du sol en azote et en phosphore</u>	28
VI - <u>CONCLUSION</u>	28

I - INTRODUCTION

L'installation et le maintien des plants mycorhizés dans des conditions écologiques souvent exceptionnelles ont été à plusieurs reprises **soulignés**. Cependant il est à noter qu'un développement optimal exige que tous les facteurs physico-chimiques intervenant dans la croissance des plants soient **réunis** et en particulier l'interaction fertilisation-mycorhization.

Nous pouvons considérer une mycorhize comme le résultat d'une **symbiose** entre un champignon et les **racines** d'une plante supérieure. Mais cette union intime doit être différenciée des simples associations **rhizosphériques** où un mycelium fongique coexiste avec les racines des végétaux environnants.

Il existe, selon la terminologie de PEYRONEL et al. (1969), trois groupes de mycorhizes :

- les Ectomycorhizes, caractérisées par l'existence d'un manteau fongique enveloppant la racine et d'où partent des filaments mycéliens, libres vers l'extérieur et s'insinuant entre les cellules du parenchyme cortical vers l'intérieur (réseau de Hartig).
- les Endomycorhizes, caractérisées par l'absence de manteau et par la pénétration des hyphes mycéliens à l'intérieur des **cellules** racinaires, ce qui exclut la présence de réseau de Hartig.
- les Ectendomycorhizes, dont l'existence est quelquefois contestée, se caractérisent par la présence d'un réseau de Hartig et par la pénétration d'hyphes mycéliens à l'intérieur des cellules.

Les Ectomycorhizes affectent quelques plantes herbacées, mais surtout la plupart des essences forestières : chez les Gymnospermes, toute la famille des Pinaceae ; chez les Angiospermes, elles se rencontrent surtout chez les dicotylédones amentifères : Fagaceae, Betulaceae, mais également chez les Cesalpiniaceae, Myrtaceae, Tiliaceae.

Les champignons ectomycorhiziens sont surtout des Basidiomycètes (Hyménomycètes ou Gastéromycètes) ou des Ascomycètes mais peuvent également être des Phycomycètes.

Les Endomycorhizes se rencontrent chez **plus** de **80** % de taxons végétaux. Les arbres intéressés sont des Préphanérogames, des Gymnospermes autres que les Pinaceae, des Angiospermes particulièrement les arbres fruitiers. Chez les herbacées nous retrouvons des Gramineae, des Légumineuses, des Solanaceae, des Rosaceae...

L'associé fongique est ici soit à hyphes **septés** : Basidiomycètes (Rhizoctonia, Clitocybe...), soit à hyphes non **septés** : Zygomycètes (Endogone, Glomus...).

Les Ectendomycorhizes sont signalées chez des espèces ligneuses **habituellement** porteuses d'Ectomycorhizes : Pins, Epicéas, Sapins.

Si plusieurs auteurs se sont intéressés depuis le siècle dernier aux problèmes de fertilisation et de mycorhization, peu d'études ont été faites sur la mycorhization de l'Aulne. Cette essence, pourtant connue depuis

plusieurs centaines d'années, a été souvent considérée comme un type biologique caractéristique des sites humides et de peu de valeur. Mais depuis le début de ce siècle des auteurs comme HILTNER (1896), puis plus tard SCHAEDE (1933), BJORKMAN (1942), BOND et QUISPÉL (1954) se sont penchés sur l'emploi de l'Aulne dans l'économie forestière, dans le même sens que les légumineuses pour l'agriculture. Leurs études et de multiples expériences actuelles indiquent que l'Aulne contribue efficacement à l'amélioration de notre écosystème.

Pour notre part nous donnons dans la première partie de cette étude un aperçu des connaissances actuelles sur la symbiose mycorhizienne, la nodulation et l'écologie de l'Aulne. Dans la deuxième partie, nous dressons le bilan de nos études expérimentales en laboratoire, concernant les problèmes de mycorhization et de nodulation, mais également en serre où des essais de fertilisation ont été en plus menés.

Le choix des espèces d'Aulne utilisées dans nos expériences a porté sur Alnus glutinosa (L.) GAERTN et Alnus incana (L.) MOENCH, toutes deux de provenance italienne.

Parallèlement, des observations en laboratoire ont été faites, portant sur des racines des espèces précitées dans la nature, d'une part en forêt de Haye sur le terroir Solvay et d'autre part autour de l'étang de Brin à Champenoux.

1.1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 - Etude morphologique et anatomique

• Caractères généraux des principales espèces d'Aulne

Les Aulnes ont une grande répartition géographique qui couvre généralement les régions froides et tempérées, depuis le continent américain jusqu'en Asie orientale. On en trouve également au centre de l'Asie et en Amérique du Sud. Il existe aussi bien en plaine qu'en montagne, mais leur biotope de prédilection reste les endroits humides. Contrairement aux autres genres de la famille des Betulaceae à laquelle ils appartiennent, les Aulnes ont un système racinaire pourvu de formations noduleuses qui leur confèrent la capacité de fixer l'azote atmosphérique de l'air.

Nous signalons principalement ici certains caractères des espèces d'Aulne que l'on rencontre sur le continent européen.

• Alnus glutinosa (L.) GAERTN

L'Aulne glutineux, ou encore Aulne noir, le plus connu, est l'objet de nombreux travaux peut-être du fait de sa croissance particulièrement rapide, du moins au début de sa période végétative. C'est un arbre pouvant atteindre 30 m de hauteur, qui a peu d'exigences écologiques et ainsi se retrouve dans plusieurs habitats naturels. Mais ses exigences en lumière font qu'on le rencontre surtout le long des ruisseaux, des étangs et des vallées. Il peut coloniser aussi d'anciennes terres cultivées pas trop acides ou s'associer en forêt à diverses essences locales.

Les graines de l'Aulne glutineux très petites (1 à 2 mm de diamètre) et pourvues d'excroissances latérales tubéreuses sont généralement dormantes au moment de leur dissémination (DETHIOUX, 1974). Un traitement approprié est alors nécessaire pour améliorer leur taux de germination.

Grâce à sa forte résistance à l'humidité, le bois de cette essence est très apprécié dans les travaux hydrauliques, mais il s'altère rapidement sous les influences conjuguées de la sécheresse et de l'humidité.

* Alnus incana (L.) MOENCH

Encore appelé Aulne de montagne, l'Aulne blanc est reconnaissable par ses petits poils qui recouvrent la face inférieure des feuilles. Moins longévif et de taille inférieure à celle de l'Aulne glutineux, il peut atteindre néanmoins une vingtaine de mètres de hauteur. Caractéristique des régions subarctiques ou montagnardes, il peut également occuper des espaces de faible altitude. Nous avons pu remarquer lors de nos prélèvements de racines les groupements phytosociologiques qu'il forme avec d'autres essences dans d'anciennes vallées argilo-calcaires. Selon BOULLARD (1969), sa capacité à s'établir et à se maintenir rapidement en sols variés est liée à ses possibilités de drageonnement et de rejet de souche. Aussi son installation est indispensable pour fixer les sols squelettiques des terrils.

* Alnus viridis (CHAIX) D.C.

L'Aulne vert est un arbuste buissonnant ne dépassant pas 4 m et pouvant constituer des fourrés denses. On le trouve généralement dans les pays nordiques et sur les pentes des montagnes bien alimentées en eau. Il recherche en outre les sols bien aérés, sans calcaire actif. Selon RICHARD (1968), les aulnaies vertes s'établissent sur des sols présentant une gamme étendue de pH, depuis les sols très acides d'origine cristalline jusqu'aux sols neutres provenant de la décomposition des sédiments marno-calcaires. Par son port buissonnant, il est apte à fixer les sols squelettiques et à contribuer ainsi à freiner l'érosion en montagne.

* Alnus cordata (Lois) DESF.

Encore désigné sous le nom d'Alnus cordifolia TEN. du fait de la forme du limbe des feuilles, cette espèce a une répartition surtout méditerranéenne. Cependant il a été introduit avec succès plus au Nord, en Lorraine et en Champagne du fait de sa grande plasticité (BOULLARD, 1969). Il peut atteindre plus de 20 m de hauteur et avoir une grande résistance à certains fléaux naturels.

Signalons maintenant l'existence d'autres espèces d'Aulne qui ont fait l'objet de nombreuses études :

* Alnus rubra BONG. ou Aulne rouge, très étudié aux U.S.A. où il est souvent en peuplements mixtes avec certains résineux, s'il n'est pas le long des cours d'eau. Il peut atteindre 30 m de hauteur pour un diamètre de plus d'un mètre.

* Alnus crispa, petit arbrisseau des pentes sèches des montagnes du Canada.

* Alnus inokumae, caractéristique des sols agricoles japonais.

D'une façon générale, le jeune plant d'Aulne a une croissance racinaire très rapide. Sa grande capacité de former des racines verticales solidement fixées au sol lui permet de résister à certaines intempéries. Il joue un rôle important dans la stabilisation des sols squelettiques, délaissés des cours d'eau et sujets à l'action érosive de certains agents naturels. Par ses propriétés fixatrices d'azote, il contribue à l'amélioration des qualités de sols. Aussi est-il souvent cultivé en taillis en association

avec d'autres essences (Epicéas, Peupliers, Douglas, Pins...) même si la qualité de son bois est très faible à l'exception peut-être d'Alnus rubra.

- Morphologie et anatomie des Ectomycorhizes de l'Aulne

Les Ectomycorhizes intéressent seulement 3.0 % des plantes vasculaires. Parmi les Angiospermes, nous retrouvons surtout des dicotylédones dans cette forme d'association. Les Ectomycorhizes des Betulaceae sont largement représentées en particulier dans le genre Alnus. D'un point de vue morphologique, les Ectomycorhizes sont facilement reconnaissables grâce à l'homogénéité des différents éléments qui entrent dans l'association.

Macromorphologie

Nature de l'associé fongique

A l'heure actuelle il est très difficile dans les conditions naturelles d'identifier avec certitude le champignon impliqué dans les associations mycorhiziennes. Plusieurs méthodes sont proposées pour identifier les mycorhizes, dont les cultures axéniques et semi-axéniques (ZAK, 1971 ; K. FERR, 1974), la chromatographie (THOEN, 1970) et l'immunofluorescence.

Chez l'Aulne, certains auteurs ont tenté la synthèse d'ectomycorhizes. De leurs travaux il découle que les champignons ectomycorhiziens de cette essence sont surtout des Basidiomycètes. Il s'agit de Lactarius obscuratus qui s'associe à Alnus rubra (FROIDEVAUX, 1973) ; Astraeus pteridis, Alpova diphloneus, Scleroderma hypogaeum qui s'associent à Alnus rubra (MOLINA, 1979) ; Paxillus involutus mycorhizien d'Alnus rubra, d'Alnus incana, d'Alnus glutinosa et d'Alnus viridis (LAIHO, 1970).

D'autres champignons de la famille des Cortinariaceae (Alnicoia, Inocybe, Hydrocybe, Phlegmacium) et des Russulaceae (Russula) ont été également décrits comme ectomycorhiziens d'Alnus viridis par HORAK (1963) cité par MEJSTRIK et BENECKE (1969) qui rapportent en outre les travaux de TRAPPE (1962) sur Gyrodon (Boletaceae) et Cenococcum (Champignon imparfait) associés à d'autres espèces d'Aulne.

Eléments mis en jeu dans l'association

Comme il a été déjà prouvé, l'infection mycorhizienne affecte uniquement chez l'Aulne les racines courtes ou moyennes. Le champignon met en jeu ses filaments mycéliens qui forment dans le cas des associations avec Paxillus involutus un cordon entourant les parties mycorhiziées et les rhizomorphes. Autour de cet ensemble peuvent émerger aussi des sclérotés.

Caractéristiques macroscopiques des Ectomycorhizes

Chez l'Aulne les racines courtes et partant les mycorhizes sont réparties irrégulièrement de part et d'autre des racines longues. Le champignon ectomycorhizien semble contrôler la couleur et l'aspect des mycorhizes alors que leur taille et leur distribution sont liées à la configuration des racines. Toutefois l'environnement immédiat des racines peut modifier certains de ces caractères.

D'après les travaux de MEJSTRIK et BENECKE (1969), les jeunes racines courtes mycorhiziées (racines de 3e ordre) d'Alnus viridis ont une couleur blanc

ocre, alors que les racines Les plus **âgées** tirent sur le brun. **Toujours** selon ces auteurs, les plus **jeunes** parties des racines courtes portent **souvent de** longues racines fines mais non **mycorhizées**, bien qu'occasionnellement les premiers stades de développement d'un manteau **mycélien** soient observés. Par endroit ces racines courtes forment des éléments coraloïdes similaires a ceux observés généralement chez le genre **Pinus**. Enfin, ces auteurs classent les ectomycorhizes d'Alnus viridis en 3 **sous-types**, selon la classification de DOMINIK (1955), qui sont les sous-types B, F et K.

• Structure des Ectomycorhizes

La structure des Ectomycorhizes est liée au processus d'infection de l'associé fongique. Les études de LAIHO (1970) sur Paxillus involutus nous permettent de faire une brève description de la structure des Ectomycorhizes formées par ce champignon avec l'Aulne.

- Manteau fongique : bien développé en général épais de couleur brun-jaune ; les hyphes très lâches forment une structure prosenchymateuse.
- Réseau de Hartig : les hyphes pénètrent "timidement" dans la première couche des cellules corticales, deviennent rares dans la partie la plus interne des couches et n'atteignent pas en général l'endoderme.

Nous retrouvons ainsi la structure d'ensemble des mycorhizes en général. Il faut noter aussi que la capacité des champignons précités a **mycorhizer** l'Aulne varie probablement d'un hôte à un autre. Paxillus involutus, selon les connaissances actuelles, ne forme pas d'Ectomycorhizes avec l'Aulne dans la nature ; en plus on n'a pas encore trouvé de sporocarpes de ce champignon dans des peuplements d'Aulne purs. Selon LAIHO (1970), dans les peuplements mixtes ces sporocarpes se retrouvent **régulièrement** autour des racines d'Aulne contiguës à celles du Bouleau. Cependant, d'après cet auteur, HOHAK (1963) a trouvé Paxillus involutus sous forme de sporocarpes sous Alnus viridis et occasionnellement ses fruits sous Alnus rubra. Ce champignon est également souvent décrit comme Paxillus filamentosus, un autre associé commun aux aulnes.

• Structure des Endomycorhizes

La parfaite symbiose qui existe chez les Endomycorhizes augmente les difficultés de: caractérisation de l'endophyte. Chez l'Aulne, très peu de travaux ont été faits sur la **symbiose** endomycorhizienne.

D'après DAFT et al. (1975), Alnus glutinosa peut être infecté par deux champignons endophytes de la famille **des Endogonaceae** : Gigaspora gigantea et Glomus sp. MEJSTRIK (1974) décrit l'existence d'Ectomycorhizes, d'Endomycorhizes et d'Ectendomycorhizes chez l'Aulne. Il observe chez Alnus glutinosa la présence d'hyphes pénétrant les cellules du parenchyme cortical.

Le champignon endomycorhizien pénètre aussi bien par les racines courtes que **directement** par les autres parties de l'épiderme. Les hyphes passent d'une cellule à une autre à travers les cloisons intercellulaires et engendrent des vésicules, **des** arbuscules ou d'autres formations endocellulaires. Ainsi se propage l'infection des racines courtes.

- Morphologie et structure des nodules de l'Aulne

. Présentation des nodosités

Formation

Le système racinaire des Aulnes porte généralement, selon une repartition irrégulière, des formations pelotonnées appelées nodosités qui peuvent avoir un diamètre d'une dizaine de centimètres. A l'origine il s'agit d'une multitude de racines courtes de quelques millimètres de long, qui se ramifient dichotomiquement, se pelotonnent pour devenir une masse plus ou moins compacte.

Ces nodosités peuvent se former sur les racines principales ou secondaires, mais aussi sur les très jeunes racines.

Morphologie

Les sujets jeunes présentent de simples nodules ayant les caractères d'une racine courte dont la croissance est interrompue et dont l'apex, dépourvu de coiffe, est hypertrophié. En outre les nodules ne portent pas de poils absorbants. Au cours de leur évolution les nodules se divisent en plusieurs lobes, avec à leur sommet de petites dépressions. Ils se subérifient, prennent une teinte brune qui devient de plus en plus noire avec l'âge.

. Etude structurale des nodules

Isolement et nature de l'endophyte

Il est maintenant admis par pratiquement tous les auteurs que l'endophyte des nodules d'Aulne est un actinomycète du genre Frankia. Mais l'étude détaillée de ce symbiote a rencontré de nombreuses difficultés inhérentes aux problèmes de son isolement. En effet, la vulnérabilité de l'endophyte qui limite la désinfection des nodules, la présence d'une microflore nodulaire endogène et les difficultés de recréer les conditions de milieu propices au développement du symbiote sont autant de barrières qui s'opposent à cet isolement.

Structure des nodules

Certains auteurs sont néanmoins parvenus à isoler l'actinomycète. Parmi eux citons LALONDE et FORTIN (1972), dont les travaux ont porté en culture pure sur une méthode microbiologique de suspension-dilution. L'observation anatomique et histologique des jeunes nodules d'Ainus crispa a permis à ces auteurs de distinguer trois formes prises par l'endophyte dans les cellules de l'hôte :

- l'hyphe, forme primaire de l'endophyte, dans les cellules jeunes
- les vésicules résultant de la dilatation du sommet de l'hyphe
- les corps bactériiformes qui dériveraient de la fragmentation de l'hyphe dans les parties vieilles du nodule.

Signalons aussi que ces trois formes se retrouvent chez les autres espèces ci'Alnus et que l'endophyte est situé uniquement dans le parenchyme cortical des nodules racinaires. Sa localisation permet de distinguer, du sommet à la base, les régions suivantes (VAN DIJK et MEHKUS, 1976) :

- une région apicale de cellules méristématiques, indemne d'infection
- une région **juvénile** dont les cellules sont envahies par des hyphes fines et des hyphes plus épaisses
- une région de développement important de l'endophyte, comportant de nombreux vésicules et corps granuliformes
- enfin une région **basale** caractérisée par une densité importante de restes de vésicules et d'hyphes.

Ultrastructure

La microscopie électronique a permis de décrire en détail la structure de l'endophyte nodulaire et de préciser ses rapports avec la cellule-hôte. **Mous** pouvons observer ainsi, en plus du cloisonnement et de la ramification **des** hyphes, des organites cellulaires (nucléoïdes, **mésosome** et une capsule qui sépare l'**hyphe** du cytoplasme de l'hôte.

Les corps granuliformes se transforment après maturation en véritables **granules** qui, d'après VAN DIJK et MERKUS (1976), sont des formes de résistance au même titre que les spores observées chez les astinomycètes libres. Du fait des ressemblances ultrastructurales et fonctionnelles entre granules et spores, ces auteurs proposent de nommer les granules sous le terme de spores et les corps granuliformes sous le terme de sporanges.

Spécificité de l'endophyte

L'endophyte des nodules d'un plant d'Aulne peut servir en général comme inoculum pour noduler d'autres plants du **même** genre. Ainsi CAPELLANO et MOIROUD (1979) ont réussi à induire la formation de nodules sur de jeunes plants d'Alnus viridis à partir de broyat de nodules d'Alnus glutinosa. Mais l'efficacité de l'inoculum varie avec les espèces utilisées.

Si l'actinomycète des nodules d'Alnus glutinosa peut s'associer aux espèces Alnus incana, A. viridis ou A. cordata, il n'en est pas de même avec Alnus rubra, l'espèce nord-américaine. Ceci a conduit BOULLAHD (1969) à parler de "spécialisation géographique des associés".

2.2 - Etude physiologique

Il existe une certaine relation entre la morphologie et la structure **des** mycorhizes et le développement des plantes. En effet, plusieurs travaux ont confirmé les effets physiologiques **bénéfiques** des mycorhizes sur la vigueur et l'importance de la biomasse des plants.

Ces effets sont liés à la potentialité d'absorption d'eau et d'autres substances, comme le phosphore mais également à la nutrition azotée facilitée par le complexe mycorhize-nodule.

▪ Mycorhization

Processus

L'Aulne constitue un exemple intéressant dans l'évolution de la **symbiose** mycorhizienne. Il peut former à la fois des Ectomycorhizes et **des** Endomycorhizes. Mais si ces dernières sont considérées comme primitives (TRAPPE, 1979), le type de symbiose intéresse la grande majorité des hôtes les plus évolués dans la classification.

Le processus de pénétration du partenaire fongique débute par l'envoi d'hyphes par les points d'infection des racines courtes. Ces hyphes se ramifient et colonisent progressivement les espaces intercellulaires du parenchyme cortical ou les cellules elles-mêmes suivant le type de mycorhize.

Chez les Endomycorhizes, l'infection des cellules commence par les poils absorbants s'ils existent. Dans le cas contraire, l'hyphe peut pénétrer à partir de cellules de passage (BOULLARD, 1968). Selon TRAPPE (1979), les champignons ectomycorhiziens empêchent la formation de jeunes racines fines ; ils pénètrent entre les cellules épidermiques et corticales.

• Relations mycorhization-nutrition

Il est généralement admis que les racines longues sont exploratrices, alors que les racines courtes, appelées encore racines nourricières, sont spécialisées dans l'absorption nutritionnelle. C'est justement ces racines courtes qui sont mycorhizées.

La mycorhization, grâce aux cordons mycéliens formés, augmente la surface rhizosphérique exploitée, d'où une activité biologique plus importante, ainsi que le diamètre racinaire. En outre, le champignon associé, par ses propres qualités physiologiques, assure une meilleure absorption des éléments non assimilables par la plante seule. Tout ceci a pour conséquence de faciliter l'utilisation des aliments mis à la disposition de la plante-hôte. C'est ainsi que MEJSTRIK et BENECKE (1969) ont remarqué chez Alnus viridis que les racines mycorhizées absorbaient le phosphore 5 fois plus rapidement que les racines non mycorhizées.

• Physiologie de la nodulation

• Etapas de la nodulation

La formation des nodules est un processus complexe comprenant plusieurs phases qui sont, d'après les travaux de QUISPÉL (1958) :

- formation de foyers d'infection au niveau des racines
- contact fortuit entre les cellules infectées et ces foyers préformés
- initiation nodulaire
- croissance des nodules

La nodulation peut être très précoce chez la jeune plante et être influencée par les facteurs environnants. La pénétration de l'endophyte entraîne des réactions de la part de l'hôte et des effets morphogènes sur ce dernier, comme l'étranglement du noyau, l'augmentation de mitochondries, l'épaississement de la paroi cellulaire, la réduction du nombre des mésosomes et l'accroissement de la densité du cytoplasme.

• Fixation symbiotique de l'azote

La fixation biologique de l'azote atmosphérique ou azote libre dans le sol est le fait de plusieurs microorganismes actifs dont les actinomycètes colonisateurs des nodules d'Aulne. La plante trouve ainsi directement dans ses nodules l'azote atmosphérique dont elle a besoin tout en fournissant en échange un milieu nutritif bénéfique à l'endophyte.

Ajoutons que ces associations synergiques fixatrices peuvent s'établir à l'intérieur même des nodules et en particulier l'actinomycète peut s'associer à des bactéries spécialisées dans la fixation.

Dynamique de l'azote

L'azote est impliqué dans un cycle biologique régulier depuis sa fixation par les germes symbiotiques jusqu'à son entrée dans l'architecture des acides aminés de l'hôte.

. Preuves de la fixation symbiotique : plusieurs auteurs ont essayé de rapprocher l'aptitude des Aulnes à s'établir sur des sols pauvres et leur qualité améliorante de notre écosystème. En effet, ces plantes pionnières, lorsqu'elles sont nodulées, arrivent à se développer dans des endroits dépourvus d'azote. Depuis les travaux de BOND (1955), plusieurs expériences sont venues confirmer la teneur en N plus élevée dans les feuilles d'Aulne par rapport à celles des autres espèces ligneuses. Cultivé dans un endroit dépourvu d'N combine l'Aulne nodulé se développe normalement, alors que les autres plantes non nodulées accusent les symptômes typiques d'une carence en N. L'emploi de la méthode isotopique à ^{15}N dans les nodules excisés a montré que ces derniers fixent facilement l'azote alors que les autres organes ne présentent aucun enrichissement (DOMMERMUES et MANGENOT, 1970). Ces derniers auteurs ont montré que certaines souches d'Actinomycètes isolées des nodosités, et qui représenteraient l'endophyte, ont une activité fixatrice en culture pure. TARRANT (1959) a constaté qu'avec l'introduction d'Alnus sinuata (REG.) RYDB, dans les plantations d'arbustes et d'arbres préalablement chétifs, ces dernières ont acquis une croissance forte et bien verticale. Cette augmentation de vigueur est attribuée à l'augmentation d'azote due à la fixation nodulaire des racines d'Aulne.

. Organes impliqués dans la dynamique de l'azote : les méthodes d'étude du pouvoir fixateur d'azote ont permis de montrer que la fixation a bien lieu au sein des nodules racinaires. PIZELLE et THIERY (1977) citant les travaux d'AKKERMANS (1971) considèrent les vésicules jeunes de l'endophyte comme le siège présumé de la fixation d'azote. Des nodules, la majeure partie de l'azote passe sous diverses formes dans le circuit intérieur de la plante, par les racines et arrive dans l'appareil aérien. En effet, des analyses foliaires effectuées sur plusieurs espèces d'Aulne ont confirmé l'apport supplémentaire d'azote dans les feuilles, provenant de la fixation symbiotique. Selon BOULLARD (1969), il suffit de quelques heures pour que cet azote atmosphérique se retrouve dans les composés protidiques des feuilles des plants nodulés.

. Mécanisme de la fixation : l'azote moléculaire peut être introduit dans le cycle du métabolisme général des cellules végétales en passant par plusieurs étapes qui nécessitent l'intervention de facteurs intérieurs ou extérieurs à la plante. D'abord des substances réductrices nées de l'activité photosynthétique de la plante ; une source d'énergie et enfin un complexe enzymatique formé par une hydrogénase et une nitrogénase. Ce mécanisme global de fixation chez les Légumineuses présenterait de grandes analogies avec celui des non-légumineuses, en particulier avec celui de l'Aulne (DOMMERMUES et MANGENOT, 1970).

. Variations de l'activité fixatrice : l'activité fixatrice des nodules racinaires varie suivant les stades du cycle végétatif de la plante. Ainsi plusieurs auteurs ont constaté une fixation plus importante au cours des premières années de développement. Elle est plus intense aussi en été qu'en hiver et pour les nodules jeunes que pour les nodules âgés. Cette activité demande également une certaine intégrité des nodosités. En effet, les nodules excisés arrivent à fixer l'azote mais pour une durée limitée. En plus tous ces organes ne sont pas aptes à la fixation. C'est pourquoi la littérature utilise les termes d'efficace et d'inefficace pour caractériser l'aptitude des nodules à fixer l'azote atmosphérique.

Métabolisme azoté

Au cours de son cycle de transformation, l'azote sous forme de nitrates, subit pour l'essentiel une série de réduction en acides aminés qui rentrent dans la constitution des protéines de la plante. Cette réduction des nitrates débute dans les racines et les nodules, mais une partie est également localisée dans les feuilles.

Nutrition azotée : l'Aulne glutineux est considéré comme étant capable d'utiliser à la fois la forme nitrique et la forme gazeuse de l'azote dans son alimentation. L'assimilation de ces formes azotées exige la présence de deux enzymes : la nitrogénase qui réduit l'azote moléculaire en NH_4^+ et la nitrate réductase qui transforme les ions NO_3^- en NO_2^- .

D'après AKKERMANS (1971), dans, PIZELLE et THIERY (1977), l'activité nitrogénase de l'Aulne glutineux est localisée dans la partie apicale des lobes nodulaires, alors que l'activité nitrate-réductase est présente aussi bien dans les organes souterrains que dans les feuilles.

L'activité nitrate-réductase est plus tributaire de l'alimentation azotée dans le cas des racines que dans le cas des feuilles. Quant à l'activité nitrogénase, elle est stimulée par la période de végétation active et varie au cours des saisons. En outre, les travaux des auteurs précités ont montré qu'il n'y a pas de relation étroite entre les activités des deux enzymes. PIZELLE (1978), comparant les activités nitrogénase potentielles d'Alnus glutinosa, d'Alnus incana et d'Alnus cordata, a remarqué des différences au point de vue quantitatif selon les sujets testés.

. Activité nitrogénase et photosynthèse : de nombreuses études ont souligné l'absence d'activité nitrogénase en hiver, son apparition au printemps et sa diminution au moment de la chute des feuilles. Ceci pourrait faire penser à une relation entre les activités nitrogénase et photosynthétique. Cependant les travaux de PIZELLE et THIERY (1976) ont prouvé qu'il y a une certaine autonomie entre les deux activités, du moins chez les Aulnes adultes. D'ailleurs ces auteurs ont constaté une reprise temporaire d'une activité nitrogénase chez les nodules d'Alnus incana après le repos hivernal, au moment où les feuilles ne sont pas encore apparues. En plus plusieurs baisses d'activité nitrogénase ont été observées au maximum du développement des feuilles.

Etude comparative entre mycorhization et nodulation

Les racines des plantes à nodules fixateurs d'azote sont généralement mycorhizées dans leur habitat naturel. Ces plantes forment plus de nodules et ont un pouvoir fixateur plus élevé que les plantes non mycorhizées. Mais, si certains caractères rapprochent les mycorhizes des nodules,

plusieurs distinctions sont à faire entre ces deux types de symbiose.

. Caractères communs

Les nodules se rapprochent plus des endomycorhizes que des ectomycorhizes. Dans les deux premiers cas, l'infection racinaire est endogène. Le degré élevé de symbiose fait que l'endophyte est très difficile à isoler et à cultiver sur milieu artificiel.

Les processus de colonisation qui intéressent les cellules corticales des racines sont parallèles, de même que les effets morphogènes des endophytes sur celles-ci.

Le rôle trophique des deux endophytes rapprochent également les deux types de symbiose, ainsi que leurs réactions vis-à-vis des facteurs écologiques.

. Caractères distinctifs

Les endophytes des mycorhizes sont des champignons tandis que ceux des nodules sont des actinomycètes souvent associés à des bactéries. Ce qui implique déjà des différences dans la structure et la formation des deux types d'association.

Les mycorhizes sont en effet spécialisées dans l'absorption de fluide et d'ions, alors que les nodules permettent surtout les échanges gazeux.

D'autre part, Les besoins minéraux des champignons mycorhiziens sont satisfaits directement à partir du sol, alors que les endophytes nodulaires puisent sur les tissus mêmes de l'hôte leur source de minéraux (MEJSTRIK et BENECKE, 1969).

Dans le cas de la nodulation les racines courtes se déforment à l'approche de la pénétration de l'endophyte, tandis que dans le cas de la mycorhization, il n'y a pas de véritables déformations.

Il demeure, après cette étude comparative, que plusieurs questions restent à résoudre quant aux interactions éventuelles entre mycorhization et nodulation, ainsi qu'aux modalités de réactions de l'hôte vis-à-vis des deux types d'association. TRAPPE (1979) souligne, qu'à l'heure actuelle, aucun antagonisme direct entre les endophytes nodulaire et mycorhizien n'a été rapporté.

2.3 - Ecologie de l'Aulne

L'installation des différents types de symbiose chez l'Aulne fait de lui une essence très plastique. Ses qualités améliorantes liées à son caractère de plante pionnière augmentent son importance écologique. Néanmoins son développement est influencé par plusieurs facteurs externes.

• Intérêt écologique de l'Aulne

L'Aulne joue un rôle dans la régulation des activités des microorganismes du sol. La décomposition des feuilles tombées et des racines mortes favorise la pullulation des microorganismes minéralisateurs, qui trouvent sous les aulnaies un milieu stable et enrichi en azote. L'excrétion de substances racinaires azotées contribue également à la multiplication de ces microorganismes.

La structure du sol est également influencée par l'installation de l'Aulne. Selon RICHARD (1968), la structure grumeleuse souvent observée dans l'horizon Al de sols d'aulnaies vertes semble liée à la qualité et à l'abondance de la litière de l'Aulne. La colonisation progressive des sols dénudés par l'Aulne augmente la valeur de leur capacité d'échange et donc l'amélioration des qualités du sol.

Enfin, l'abondance de litière, rapidement restituée au sol, et l'apport d'azote atmosphérique tendent à favoriser l'installation de nouvelles espèces végétales.

Tous ces effets de l'Aulne sur un milieu préalablement délaissé contribuent à la création d'un nouveau biotope favorable au développement de nombreux êtres vivants.

▪ Influence de facteurs externes

Les facteurs qui jouent un rôle sur le développement des Aulnes sont des plus variés. Nous citerons les plus importants :

• Facteurs édaphiques

pH

La nodulation et la mycorhization se font généralement autour des pH proches de la neutralité. A l'intérieur de cette gamme de pH il n'y a pas tellement de différences d'intensité de ces deux phénomènes physiologiques. Par contre, les pH très acides (au-dessous de 4) inhibent la nodulation.

L'influence du pH est négligeable dans les milieux sans nitrate ; elle semble s'exercer sur l'endophyte plutôt que sur l'hôte (DOMMERGUES et MANGENOT, 1970).

Azote combiné

L'inhibition de la nodulation par les substances azotées a attiré l'attention de plusieurs auteurs. QUISPÉL (1958) a prouvé que les différentes phases de la nodulation sont influencées par les nitrates et plus encore par les sels d'ammonium. PIZELLE (1966) a montré que l'action défavorable de l'N minéral est essentiellement localisée mais d'une façon générale, elle est liée à la grande richesse de la plante en azote.

Eléments minéraux

L'importance du phosphore sur la nodulation est capitale. Non seulement il favorise la phase d'initiation nodulaire, mais en plus il augmente le nombre des nodules. D'autre part ses effets combinés avec ceux de l'azote peuvent redresser l'effet inhibiteur de ce dernier. La majorité des oligoéléments rentrant dans les processus physiologiques de la plante jouent un rôle dans les phénomènes de nodulation. En particulier les carences en Ca, Co et Cu peuvent entraver ces phénomènes.

• Autres facteurs

Lumière

La lumière constitue un facteur essentiel dans les processus de mycorhization et de nodulation. En effet, plusieurs travaux ont confirmé

que le développement des mycorhizes et des nodules est généralement sous la dépendance de la lumière. C'est ainsi que de bonnes conditions d'éclairage peuvent augmenter non seulement le nombre des nodules et leur taille, mais également leur capacité fixatrice. D'où l'importance d'une photosynthèse active dans ces phénomènes physiologiques.

Oxygène

Ce gaz est nécessaire aux systèmes fixateurs mais à fortes doses il devient inhibiteur.

H₂ et CO

L'assimilation de l'azote atmosphérique est réduite en présence d'hydrogène et peut être inhibée à un certain taux par ce dernier. De même l'oxyde de carbone arrive à inhiber **complètement** la fixation.

L'importance propre à chacun de ces facteurs a été certes démontrée, mais il est à noter que souvent leurs effets agissent en même temps et peuvent influencer d'une manière ou d'une autre **la** physiologie de l'arbre.

2.4 - Importance pratique de l'Aulne

Après avoir dressé ce bilan des propriétés physiologiques et écologiques de l'Aulne, nous donnons maintenant un aperçu de quelques unes des utilisations de cette essence en sylviculture.

- Fertilisation des sols

Nous avons déjà souligné la grande teneur en azote des organes aériens de l'Aulne. Cette richesse en azote fait que le rapport C/N de cette plante est très réduit. Ce qui lui confère la qualité d'essence améliorante, puisque sa litière foliaire peut augmenter la teneur en composés azotés du sol sur lequel il se développe au même titre que les engrais artificiels.

Aussi l'Aulne peut restituer selon les espèces plusieurs dizaines de kg d'azote par hectare par an au sol. Ainsi, plusieurs pays ont encouragé le reboisement d'anciens terrils par de l'Aulne afin de fertiliser ces derniers.

Lutte contre les pathogènes

D'une façon générale, les Ectomycorhizes contribuent à la détoxification des sols par la sécrétion de substances destructives de toxines rhizosphériques. La défense phytosanitaire est également assurée par les champignons ectomycorhiziens qui protègent les racines de leur hôte contre certains pathogènes.

TARRANT et TRAPPE (1971) ont montré qu'Alnus rubra en association avec le champignon Lactarius obscuratus peut jouer un rôle dans l'inhibition de l'activité de Poria weirrii (MURR.), un virulent pathogène racinaire qui attaque le Sapin-Douglas (Pseudotsuga menziesii). D'autre part, FROIDEVAUX (1974) après l'isolement de Aureobasidium pullulans (de BARY) ARNAUD, des mycorhizes de A. rubra + Lactarius obscuratus a montré que ce champignon exerce une action antibiotique sur Fusarium oxysporum, un parasite des racines de l'Aulne rouge.

- Utilisation directe en sylviculture

. Inoculations

La capacité des nodules racinaires d'Aulne à fixer l'azote atmosphérique autorise à introduire des plants nodulés dans les sites stériles à reboiser. Dans les jeunes aulnaies, il est possible d'apporter des broyats de nodules seuls, dilués ou mélangés à de la terre, au contact des racines d'Aulne pour induire la nodulation.

. Associations avec d'autres essences

Grâce aux multiples ramifications de ses racines l'Aulne peut s'installer à l'intérieur de plusieurs groupements végétaux. Le pouvoir pérennant de ses nodosités fait qu'il est souvent utilisé en culture mixte pour augmenter la production de plusieurs essences. C'est ainsi que des plants de Sapin-Douglas cultivés avec de l'Aulne rouge ont montré une croissance et une vigueur supérieures à celles des sujets témoins (TARRANT, 1959). De nombreuses autres plantes ont pu de même bénéficier de l'association avec l'Aulne. Parmi les arbres forestiers, citons Fraxinus, Picea, Pinus, Populus, Robinia... et comme arbre fruitier le pommier (Malus communis).

III - OBSERVATIONS DES RACINES D'AULNE DANS LA NATURE

Nous avons observé des racines d'Aulne dans deux types de milieu, près de Nancy. Des racines d'Alnus incana d'une quarantaine d'années installées sur le teruil de Solvay à Maxéville et des racines d'Alnus glutinosa naturel adulte en forêt domaniale d'Amance.

Dans le premier cas il s'agit d'un substrat artificiel constitué de débris calcaires à très faible teneur en éléments minéraux, à pH élevé (8,1 à 8,3) et à très faible teneur en matière organique (2 %).

Dans le second cas il s'agit d'un sol lessivé hydromorphe développé sur limons et argile du lias. L'humus est un mull mésotrophe à taux de saturation voisin de 50 % et à pH de 5,5.

Sur le teruil Solvay de Maxéville nous avons observé les deux types de mycorhizes : ecto et endomycorhizes.

Les ectomycorhizes semblent d'un seul type avec un manteau épais présentant 3 zones concentriques distinctes et un réseau de Hartig pénétrant profondément dans l'endoderme.

Les endomycorhizes sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules. Nous n'avons pas observé d'arbuscules.

En forêt d'Amance nous avons également observé les deux types de mycorhizes. Les ectomycorhizes présentent un manteau fongique homogène, lisse, de "type lactaire". Le réseau de Hartig pénètre profondément dans le cortex et semble former des appresoria intracellulaires, ce qui rapprocherait ce type de mycorhizes des ectendomycorhizes.

Les endomycorhizes présentent de nombreux hyphes intercellulaires, mais nous n'avons pu observer ni vésicules, ni arbuscules.

IV - ESSAIS DE SYNTHÈSES AXENIQUES

4.1 - Inoculation ectomycorhizienne

- Matériel et méthodes de mise en place des essais

. Matériel végétal

Stérilisation des graines

Les plantations d'Aulne proviennent de la germination soit de graines d'Alnus glutinosa (L.) GAERTN, soit de graines d'Alnus incana (L.) MOENCH, stérilisées selon la méthode suivante, inspirée de celle de NEAL et al. (1967) :

- immersion des graines, dans de l'eau déminéralisée, à l'aide d'une boule à thé, pendant une heure ;
- vide effectué au contact des graines pendant les 15 dernières minutes ;
- immersion des graines dans de l'eau oxygénée (H_2O_2 à 30 %) pendant 10 à 30 minutes ;
- rinçage des graines plusieurs fois à l'eau stérile.

Les graines sont ensuite mises à germer dans des boîtes de Pétri sur du milieu de Pachlewski (tableau 1). Ce milieu est au préalable stérilisé à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

Après 3 à 4 jours d'incubation dans une étuve à 25°C, les graines contaminées sont soustraites aseptiquement du milieu de culture, alors que les germinations non infectées (radicules de 7 à 10 mm) sont mises en culture dans des tubes de verre contenant du milieu de Melin-Norkrans modifié Marx (1969) (MNM) (tableau 1). Il est à noter que ce milieu est dilué 10 fois.

Remarque :

Le taux de réussite de désinfection, qui est de l'ordre de 30 %, est faible comparativement à celui des graines de Pin que nous avons stérilisées parallèlement et qui est de 100 %.

Matériel fongique

Deux champignons Basidiomycètes de l'ordre des Eugaricales sont utilisés comme origine de l'inoculum employé. Il s'agit de Paxillus involutus FR. ex BATSCH et de Gyrodon lividus FR. ex BUL.

Pour conserver du matériel jeune nous avons, à partir de souches en culture dans du milieu de Pachlewski, prélevé des rondelles de gélose avec du mycélium que nous avons repiquées dans des boîtes aseptiques contenant le même milieu.

Les deux espèces ont uniformément colonisé les boîtes en quelques semaines, mais le développement de Paxillus a été plus rapide.

. Matériel accessoire

Les tubes synthétiques de 25 cm de long sur 2,5 cm de diamètre (petits tubes) ou de 25 cm sur 4 cm (gros tubes) sont remplis au tiers de leur volume et divisés en deux lots selon la nature du substrat :

- lot A : tubes + MNM/10 gélosé
- lot B : tubes + vermiculite + tourbe + MNM/10 - Le mélange tourbe-vermiculite est fait dans la proportion de 2/3 de vermiculite pour 1/3 de tourbe.

COMPOSES	MELIN-NORKRANS modifié MARX	PACHLEWSKI
<u>Sels minéraux</u>		
Chlorure de calcium CaCl_2	0,05 g	
Chlorure de sodium NaCl	0,025 g	
Phosphate de potassium KH_2PO_4	0,5 g	1 g
Phosphate di-ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,25 g	0,5 g
Sulfate de magnésium $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15 g	
Tartrate di-ammonium $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6(\text{NH}_4)_2$		0,5 g
Citrate ferrique à 1 %	1 ml	0,5 ml
<u>Vitamine</u>		
Thiamine hydrochloride	100 g	50 g
<u>Glucides</u>		
Glucose anhydre		20 g
Saccharose	10 g	
Maltose monohydraté		5 g
<u>Composés organiques</u>		
Extrait de malt	3 g	
Gélose	20 g	20 g
Eau distillée	1000 ml	1000 ml

TABLEAU 1 - MILIEUX NUTRITIFS UTILISES POUR LES SYNTHESSES
AXENIQUES ECTOMYCORHIZIENNES

(le milieu de **Melin-Norkrans** modifié Marx a été utilisé dilué 10 fois pour les synthèses axéniques ; le milieu de Pachlewski a été utilisé uniquement pour les cultures pures de champignon).

Les tubes ont été stérilisés à l'autoclave comme pour le milieu de Pachlewski avant le repiquage du matériel végétal.
Les cultures sont ensuite placées sous des lampes à fluorescence-incandescence de 20 000 lux environ, avec une photopériode de 16 h sous une température de 25°C environ.

. Inoculations

Ces opérations sont effectuées 5 semaines après le début de germination des graines, durée correspondant au développement des racines courtes.

Des rondelles de gélose, envahies par du mycelium des champignons utilisés, sont déposées au fond des tubes et près des racines dans le cas des tubes A, et à la surface du substrat dans le cas des tubes B.

* Résultat de l'inoculation

Paxillus involutus et Gyrodon lividus se sont d'abord lentement développés sur la gélose. Après deux mois le mycelium de Paxillus involutus a brusquement envahi l'ensemble du tube. Le développement du mycelium a coïncidé avec la formation des premières mycorhizes. L'association du champignon avec la racine de L'hôte a entraîné une stimulation très nette de la croissance du mycelium.

Des observations au microscope optique ont permis de confirmer le début de mycorhization avec Paxillus involutus, en condition totalement axénique. Ces mycorhizes sont caractérisées par un manteau épais de couleur brun fauve. De ce manteau part un abondant feutrage mycélien externe. Cependant, nous n'avons pas observé la formation de cordon mycélien (rhizomorphes), ni de réseau de Hartig très net : les filaments mycéliens du manteau n'ont pas bien pénétré l'espace intercellulaire.

Avec Gyrodon lividus, la mycorhization a été très lente. A la fin de l'expérience nous avons pu observer un manteau mycorhizien autour des racines courtes, de couleur blanche, ainsi qu'un mycelium très touffu colonisant les autres racines.

Ces deux types de mycorhizes n'ont pu être observés que sur milieu gélosé de Melin-Norkrans modifié Marx dilué 10 fois.

Sur mélange tourbe-vermiculite nous n'avons obtenu aucune mycorhize bien que le milieu nutritif ait été identique au milieu utilisé sur gélose.

4.2 - Inoculation de l'actinomycète

- Méthode de synthèse in vitro

. Matériel de base

Nous avons opéré comme dans le cas de la synthèse mycorhizienne sur de jeunes plantules d'Alnus glutinosa et d'Alnus incana, âgées de 6 semaines et cultivées soit sur du milieu gélosé MNM/10, soit sur un milieu spécifique gélosé, carencé en azote.

. Composition du milieu spécifique

KH_2PO_4 : 1mM ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 2,5 mM ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 mM ;
 K_2SO_4 : 1,25 mM ; Fe(EDTA) : 36 μM ; BO_3H_3 : 46 μM ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 9 μM ;
 ZnCl_2 : 0,7 μM ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,3 μM ; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2 μM ; pH ajusté à
 6,2 avec KOH; Urée 0,5 mM.

. Inoculation

Deux lots de souches de Frankia ont été utilisés :

- un lot provenant de souches isolées par B. MAUDINAS
- un lot résultant de cultures en milieu liquide, à partir de colonies de souches isolées par M. LALONDE.

Il s'agit des souches suivantes :

AGN ₁ g)		BM)	MAUDINAS
ARB ₄ b)	LALONDE	BMO)	
AGN ₁ AG.AC)			

Un volume de quelques cm³ d'inoculum pouvant immerger les terminaisons des racines longues a été introduit dans chaque tube expérimental, sous une atmosphère stérile.

Le matériel est ensuite incubé dans une chambre de culture où règne une température de 25°C sous des lampes dont l'éclairage avoisine les 20 000 lux avec une photopériode de 16 h.

. Résultats

Que ce soit sur milieu MNM/10 ou sur milieu spécifique carencé en azote nous n'avons pu obtenir de nodulation.

V - ETUDE EXPERIMENTALE EN SEKRE

5.1 - Matériel et Méthodes

- Matériel d'étude

. Préparation du sol expérimental

Il s'agit de sol provenant d'une rendzine grise, pauvre en phosphore, prélevé en forêt domaniale de Vauhalaise à Sompuis (Marne). Le prélèvement a été fait sur les 15 premiers cm (horizon Al). Recouvert de toile en plastique, le sol est au préalable désinfecté au bromure de méthyle. Débâché au bout de 3 jours et laissé à l'air libre pendant une semaine, il est ensuite mis dans des pots en plastique de 5 l, à raison de 5 kg de terre sèche par pot. Les pots sont percés à leur fond et l'arrosage se fait régulièrement à l'eau osmosée. Un volume de 200 cm³ d'un mélange de tourbe et de vermiculite, dans les proportions décrites précédemment, est ajouté à chaque pot, mélangé aux 5 premiers cm du sol.

, Matériel végétal

Matériel fongique

Champignon ectomycorhizien : Paxillus involutus

Des bocaux de verre de 1,6 l sont remplis aux 3/4 du mélange tourbe-vermiculite. Ce substrat est inhibé de 750 cm³ de milieu nutritif de Pachlewski et les bocaux sont fermés par un couvercle muni d'une ouverture par où passe un tube de verre (8 x 1 cm) bouché par du coton cardé permettant les échanges gazeux.

L'ensemble est stérilisé à l'autoclave, après refroidissement des morceaux de gélose envahis par du mycelium de Paxillus involutus sont déposés sous atmosphère stérile, à la surface du substrat.

Une semaine après repiquage le champignon a commencé à pousser et à coloniser progressivement quelques bocaux qui seront utilisés comme source d'inoculum au bout de 3 mois.

Champignon endomycorhizien : Glomus mosseae

Nous avons prélevé des racines de Ray Grass infectées par Glomus mosseae et soustraites de tous corps étrangers (sable, débris végétaux..). Ce matériel est utilisé comme inoculum dans certains traitements.

Actinomycète : Frankia

Ce matériel est obtenu à partir de broyats de nodules d'Alnus incana âgés de 4 ans et prélevés à la pépinière du C.N.R.F.

Une autre inoculation a été effectuée plus tard à partir de broyats de nodules de la même espèce, prélevés en forêt.

Semence utilisée

Il s'agit de graines d'Alnus incana de provenance italienne.

• Protocole expérimental

Nous avons introduit; dans cette expérience 5 groupes de traitements désignés par les lettres A, B, C, D et E avec dans chaque groupe 10 traitements secondaires dus à un apport d'engrais minéraux, à raison de 4 répétitions par traitement (tableau 2).

Nous àonnons ici certaines précisions sur les traitements :

A = sot désinfecté + différents niveaux de phosphore (P) et d'azote (N)

Le phosphore est apporté sous forme de phosphate monocalcique ($\text{Ca}(\text{PO}_4\text{H}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) et l'azote sous forme de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3).

Le phosphate est mélangé au sol avant sa mise en pot. Quant au nitrate d'ammonium, très soluble, il est dissous dans de l'eau osmosée et apporté une fois le sol mis en pot, selon les stades de germination suivants :

- 10 ppm, un mois après levée, dans tous les pots avec N
- 50 ppm, 2 mois après levée, dans tous les pots avec N100 ou N
- 100 ppm, 3 mois après levée, dans tous les pots avec N200

Traitements	Témoins	Apports d'engrais (en ppm)		
A	T	P25 N50 P25 N50	P50 N100 P50 N100	P E00 N200 P100 N200
B Paxillus	T Pax.	P25 N50 P25 N50	P50 N100 P50 N100	P100 N200 P100 N200
C Glomus	T Gl.	P25 N50 P25 N50	P50 N100 P50 N100	P100 N200 P100 N200
D Frankia	T Fr.	P25 N50 P25 N50	P50 N100 P50 N100	P100 N200 P100 N200
E Glomus + Frankia	T Gl. + Fr.	P25 N50 P25 N50	P50 N100 P50 N100	P100 N200 P100 N200

TABLEAU 2 - LES TRAITEMENTS

B = A + Ectomycorhize (Paxillus involutus)

L'inoculum est apporté sous forme de mycelium mélangé au substrat tourbe + vermiculite, rincé à l'eau osmosée. Un volume de 200 cm³ d'inoculum est mélangé aux dix premiers cm supérieurs du sol.

C = A + Endomycorhize (Glomus mosseae)

Les racines de Ray-Grass infectées par Glomus mosseae sont introduites directement dans les trous où sont semées les graines, à raison de 1 g environ de racines fraîches par pot.

D = A + Frankia

Les broyats des nodules sont mélangés aux dix premiers cm supérieurs du sol avant les semis. De l'inoculum a été également apporté au contact des racines 3 mois après la levée.

E = A + Glomus + Frankia

Dans ce traitement, les inoculums ont été apportés comme précédemment.

5.2 - Résultats

5.2.1 - Influence des traitements sur la croissance en hauteur

La levée a été assez irrégulière, ce qui nous a conduit à resemé certains pots.

Dans les pots où la levée a été très bonne nous avons ramené progressivement le nombre de semis à 7 au maximum. Le nombre de semis par pot en fin d'expérience a cependant varié de 1 à 7, ce qui évidemment introduit une variation non contrôlée nuisant à la précision de l'essai.

Les résultats sont présentés sans calcul statistique en raison du manque de temps. Ils seront bien évidemment effectués ultérieurement.

L'inoculation par Paxillus involutus a totalement échoué. Aucune mycorhize n'a été obtenue et aucun effet n'a été observé sur la croissance. Nous ne présenterons donc pas de résultats relatifs à l'influence éventuelle des champignons ectomycorhiziens.

L'inoculation par Frankia a été excellente, mais l'effet de cette inoculation ne s'est fait sentir qu'après la deuxième quinzaine d'août. Nous ne donnerons donc les résultats de cette inoculation que pour les mesures du 14.9.

L'inoculation par Glomus mosseae a été excellente. Nous n'aurons cependant pas les résultats des mesures du taux d'infection, car ces mesures demandent un travail de plusieurs mois.

Les témoins non inoculés par Frankia ou les traitements inoculés par Glomus mosseae sont restés libres de contamination par Frankia jusqu'au 14 août.. A partir de fin août un certain nombre de pots a commencé à se contaminer, ce qui évidemment a introduit des perturbations. Ces perturbations sont restées assez limitées, mais nous préférons raisonner pour ces deux traitements sur les résultats du 14 août et non sur ceux du 11 septembre.

Au 14 août, la croissance était arrêtée pour l'ensemble des pots de ces deux traitements. Si elle a repris ultérieurement dans certains pots,

c'est uniquement en raison de l'effet des contaminations par Frankia. Par contre dans les traitements où nous avons inoculé Frankia, la croissance n'était pas terminée au 11 septembre. Il est donc probable que si nous avions attendu un mois de plus les effets dus à l'inoculation par Frankia auraient été plus importants.

. Croissance en hauteur en l'absence d'inoculation (fig. 1) -
Résultats au 14 août 1981

La fertilisation azotée n'a aucun effet sur la croissance de l'Aulne blanc. L'effet d'un apport de phosphore est proportionnel à la dose de phosphore apporté. L'effet d'un apport combiné phosphore-azote se traduit par un léger effet positif de l'azote. Ces résultats sont parfaitement classiques. Le phosphore étant probablement limitant dans le sol, l'azote seul ne peut avoir aucun effet. Lorsque la disponibilité en phosphore augmente, c'est l'azote qui devient limitant, d'où un effet de l'azote lorsqu'il est combiné à un apport de phosphore.

. Croissance en hauteur avec inoculation par Glomus mosseae
(fig. 2) - Résultats au 14 août 1981

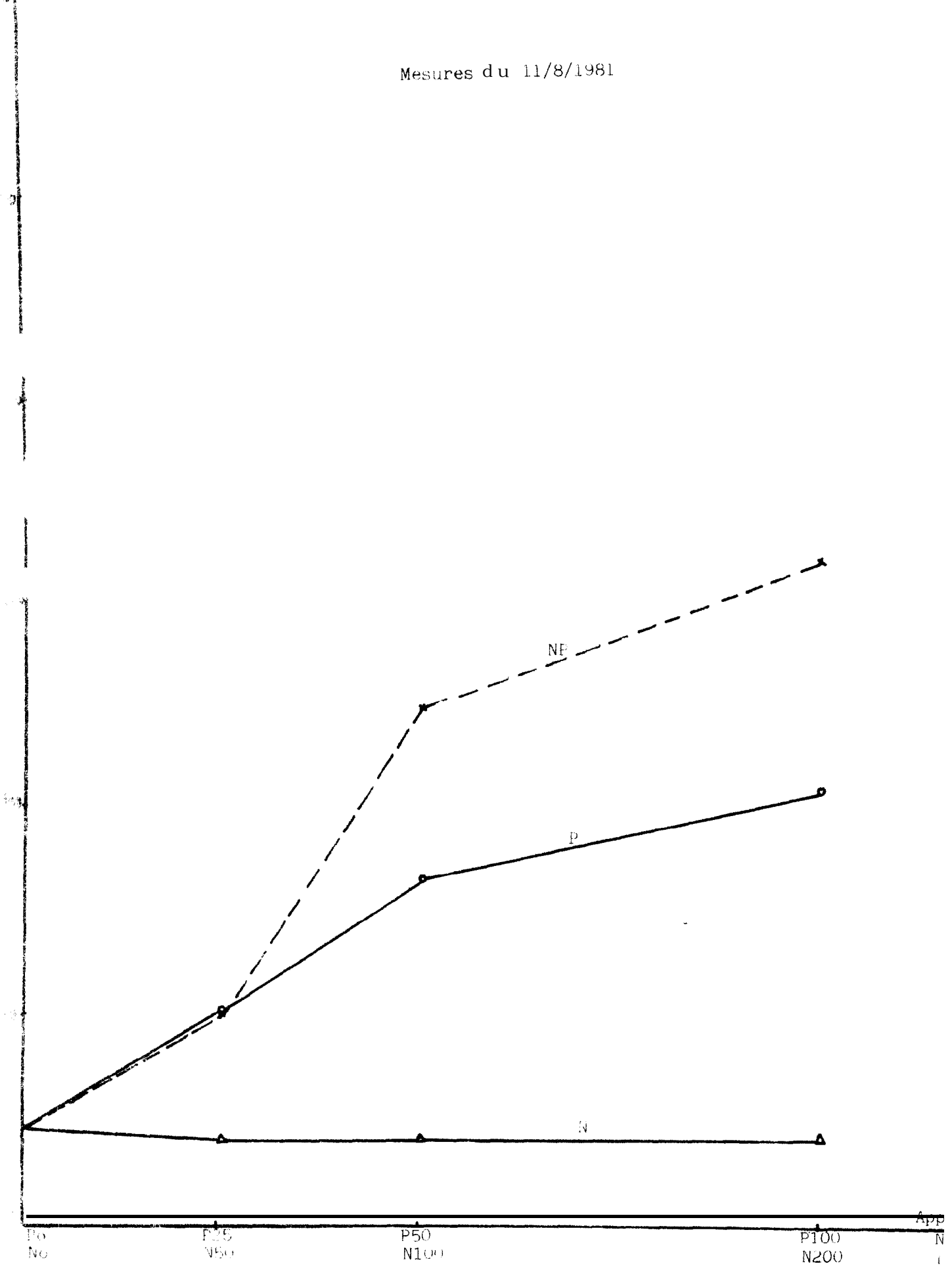
L'inoculation par Glomus mosseae se traduit par une modification totale de la réponse de l'Aulne à des apports croissants de phosphore et d'azote. L'augmentation de la disponibilité en phosphore du sol n'a plus aucun effet. La croissance est maximale dès le niveau 0, c'est-à-dire en l'absence de tout apport de phosphore. Un apport combiné azote-phosphore améliore nettement la croissance de l'Aulne. Cet effet de l'azote est obtenu même avec l'apport le plus faible (25 ppm). L'azote seul a un effet extrêmement marqué dès la dose de 25 ppm. L'effet de l'endophyte est considérablement amélioré par un faible apport d'azote seul. Il est difficile d'expliquer les différences d'effets entre un apport combiné d'azote (NP) et un apport d'azote seul.

. Croissance en hauteur avec inoculation par Frankia (fig. 3) -
Résultats au 11 septembre 1981

L'inoculation par Frankia n'a pas d'effet à faible niveau de phosphore (pas d'apport ou apport de 25 ppm). A partir de 50 ppm il y a manifestement effet de l'inoculation. Ces résultats sont logiques. La fixation symbiotique exige des quantités importantes de phosphore que l'arbre seul ne peut fournir à l'actinomycète à faible niveau de fertilité ou en l'absence d'endophyte endomycorhizien. Un apport d'azote seul ne peut évidemment avoir d'effet. Un apport combiné d'azote (NP) semble avoir un effet dépressif à niveau élevé.

Hauteur moyenne
par tot (mm)

Mesures du 11/8/1981



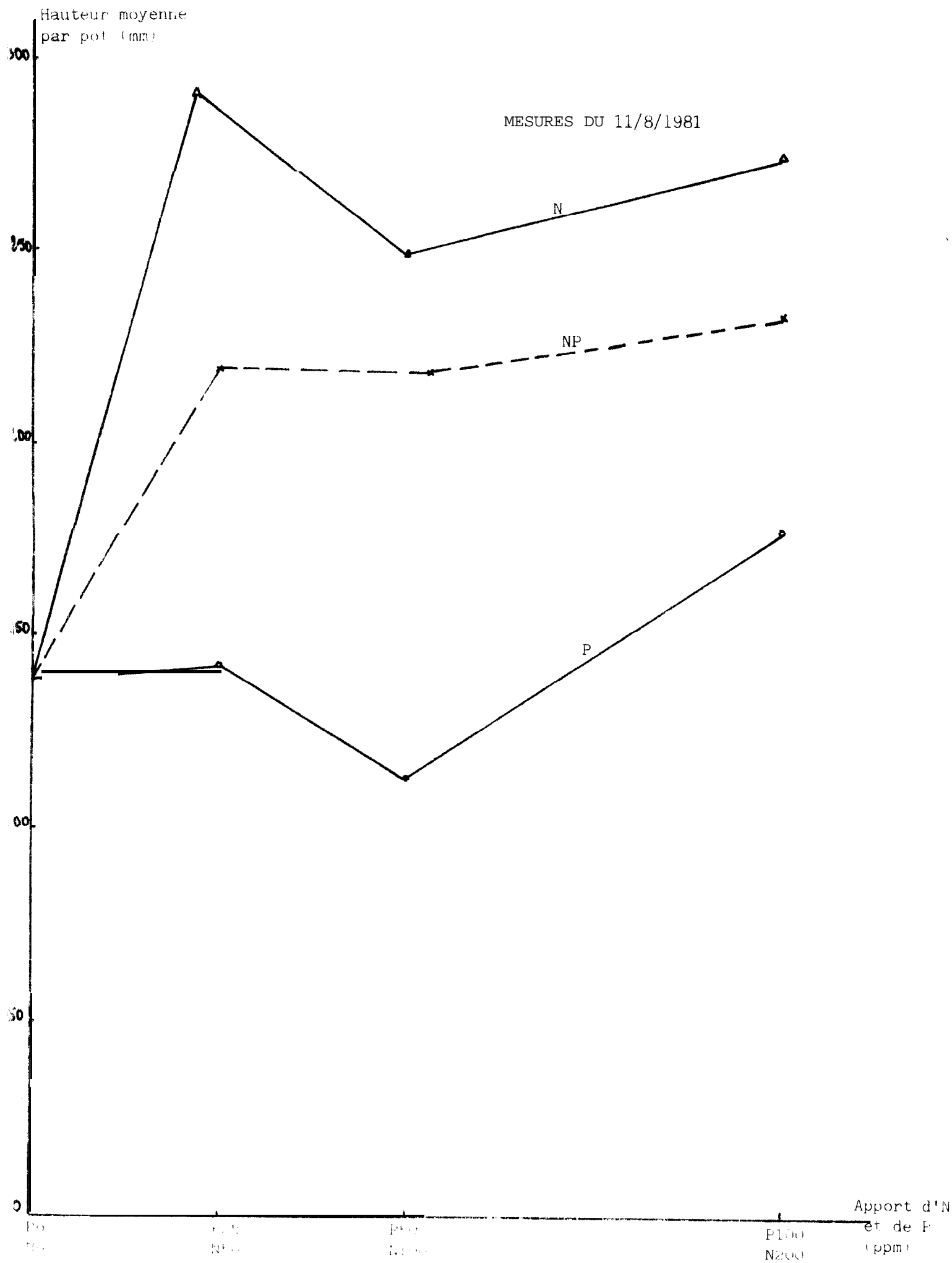
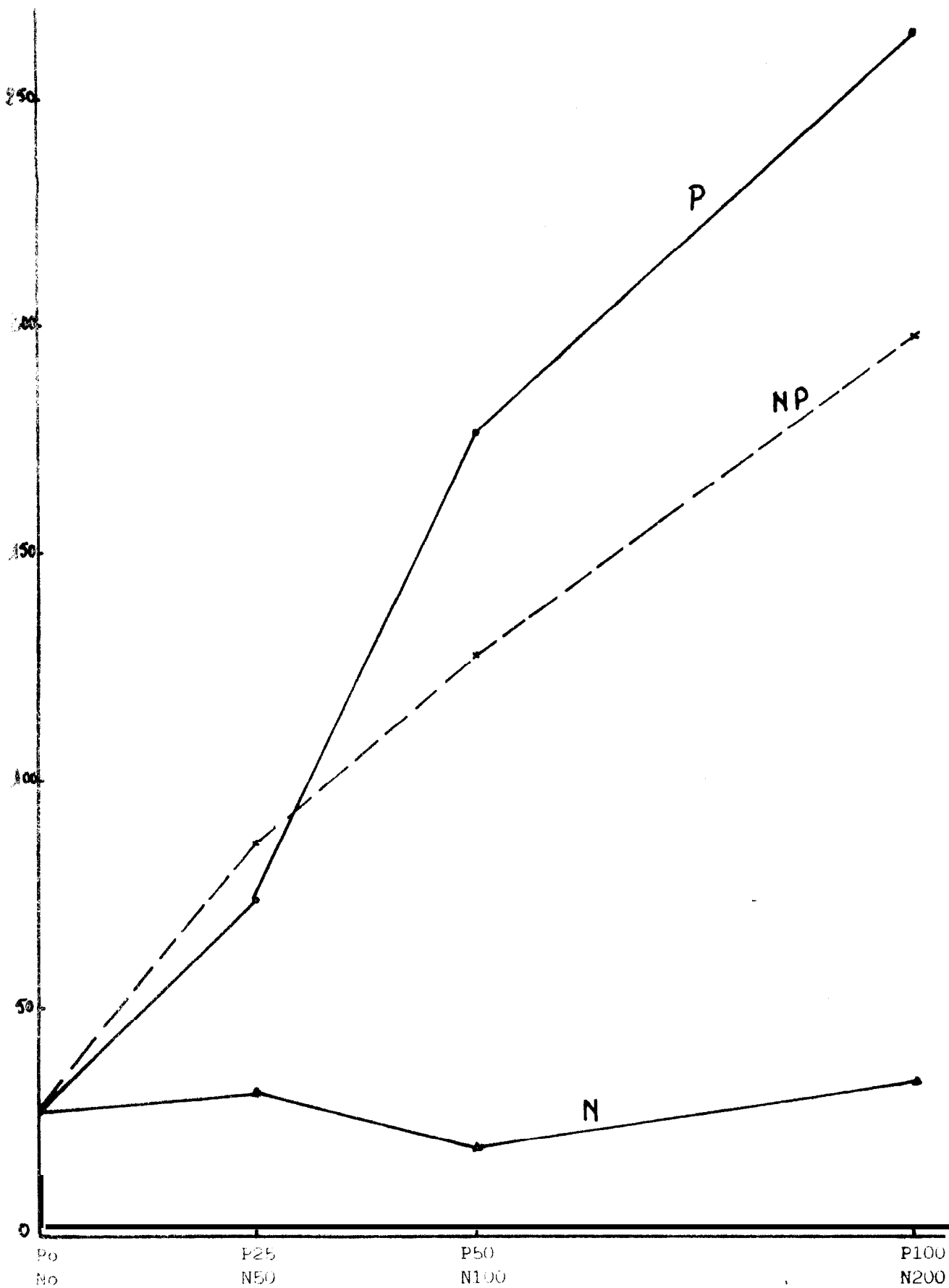


Figure 9 - Effet de doses croissantes d'azote (N) et de phosphore (P) sur la hauteur d'*A. incana* récoltée par DOMINIQUE MOSSEFAE

Hauteur moyenne
par pot. (mm)

Mesures au 14/9/1981



Apport d'a
zote et de
phosphore
(ppm)

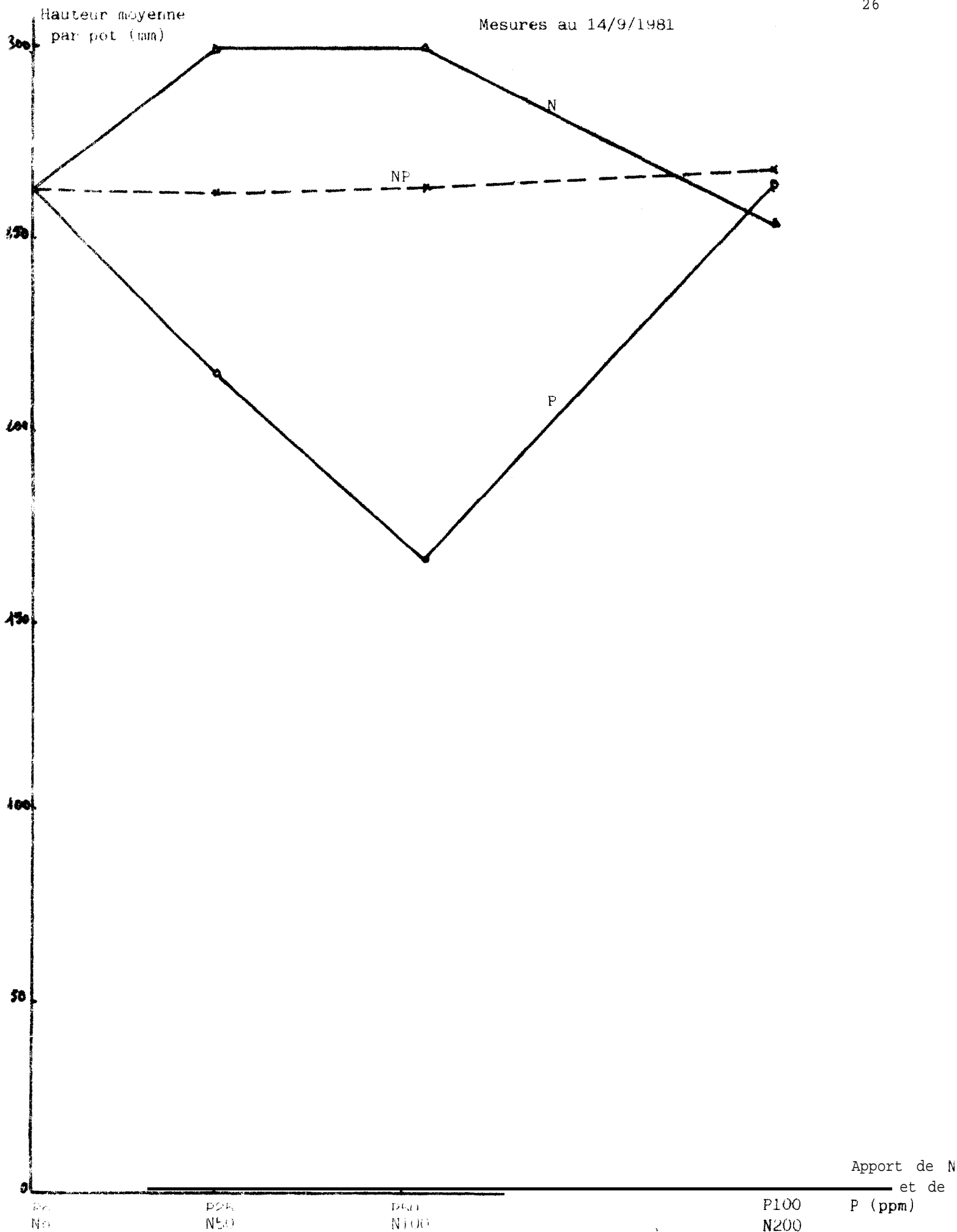


Figure 4 - Effet de doses croissantes d'azote (N) et de phosphore (P)

Modèle d'inoculation	T	P25 ppm	P50 ppm	P100 ppm	N50 ppm	N100 ppm	N200 ppm	P25 ppm N50 ppm	P50 ppm N100 ppm	P100 ppm N200 ppm
Frankia	0	3,1	6,8	4,8	1,3	0,26	1,9	1,9	4,6	2
Frankia + L. musseae	3,35	2,77	6,17	28	6,16	7,8	7,8	8,1	8,9	7,75

TABLEAU 3 - NOMBRE DE NODULES PAR PLANT (11 septembre 1981)

. Croissance en hauteur avec double inoculation actinomycète-
champignon endomycorhizien (fig. 4) - Résultats au 11 sept. 1981

Par double inoculation il n'y a plus aucun effet de la fertilisation. A niveau très faible de phosphore et d'azote dans le sol l'endophyte mycorhizien permet seul une alimentation optimale en phosphore et l'actinomycète une alimentation optimale en azote.

5.2.2 = Interaction nodulation-mycorhization-disponibilité du sol en azote et en phosphore (tableau 3)

Nous avons estimé la nodulation par comptage du nombre de nodules par plant. Nous aurions pu également prendre en compte le poids de nodule ; mais par manque de moyens nous avons adopté la première solution.

En l'absence d'endomycorhize, il n'y a pas nodulation s'il n'y a pas d'apport de phosphore. L'apport d'azote seul induit une légère nodulation. Un apport de phosphore améliore nettement la nodulation quelle que soit la dose. Un apport d'azote combiné à un apport de phosphore semble légèrement diminuer la nodulation.

En présence d'un champignon endomycorhizien, il y a nodulation sans apport de phosphore. Avec apport de phosphore seul, la nodulation ne semble pas améliorée, si on excepte les résultats obtenus avec 100 ppm de P que l'on peut considérer comme aberrants. Un apport d'azote seul ou combiné au phosphore améliore très nettement la nodulation comparativement à ce que l'on observe sans endomycorhize.

VI = CONCLUSION

L'Aulne est une des rares essences forestières capables de fixer l'azote atmosphérique en région tempérée.

Sa capacité de fixation est élevée et semble, d'après la littérature, osciller entre 100 et 300 kg d'azote à l'hectare.

Cette caractéristique tout à fait remarquable n'est pas exploitée actuellement. Le coût de plus en plus élevé des engrais azotés de synthèse et l'intérêt manifesté depuis peu pour la production de biomasse forestière justifient les travaux qui sont actuellement développés sur l'Aulne dans différents pays.

D'autre part, d'un point de vue scientifique l'Aulne est une espèce tout à fait remarquable puisqu'elle est associée à trois types d'organismes symbiotiques :

- . des champignons ectomycorhiziens
- . des champignons endomycorhiziens
- . un actinomycète

L'étude des interrelations entre ces trois organismes symbiotiques et leur hôte constitue un sujet de choix.

Les résultats obtenus au cours de ce travail, bien qu'incomplètement dépouillés et exploités apportent une certaine lumière sur ces interactions symbiotiques.

Dans NOS conditions d'expérience, il apparaît difficile de maintenir l'Aulne exempt de Frankia au-delà de 4 à 5 mois. Pour la poursuite d'expériences ultérieures, il serait particulièrement intéressant de déterminer l'origine de ces contaminations (eau d'arrosage, air, insectes, mauvaise désinfection...!).

Nous avons échoué dans l'inoculation d'un champignon ectomycorhizien, Paxillus involutus, en conditions de serre alors que nous avons réussi cette synthèse en conditions axéniques.

Nous avons montré expérimentalement qu'Alnus incana était endomycorhizien.

En l'absence de symbiote, la réponse d'Alnus incana à une fertilisation azotée et phosphatée est tout à fait classique. Seul l'azote n'a aucun effet en raison de la faible disponibilité du sol en phosphore. Le phosphore est le facteur limitant principal.

L'amélioration de la croissance de l'Aulne est proportionnelle à la dose de phosphore apportée. Lorsque le phosphore n'est plus le facteur limitant, c'est l'azote qui le devient d'où un effet d'un apport d'azote combiné à un apport de phosphore.

Avec l'endophyte mycorhizien la réponse de l'Aulne est complètement modifiée.

Le phosphore n'est plus limitant ; sans apport de phosphore la croissance de l'Aulne est maximale et elle n'est pas améliorée par des apports croissants de phosphore.

L'effet de l'endophyte mycorhizien est très nettement amélioré par fertilisation azotée, même à niveau faible (25 ppm).

Il est difficile d'expliquer pourquoi l'effet de N seul est supérieur à celui de N combiné à P.

L'endophyte améliore considérablement l'efficacité de la fertilisation azotée sans que l'on puisse dire si cet effet est dû à une amélioration de l'absorption de l'azote minéral ou à une intervention dans le métabolisme azoté.

L'inoculation par Frankia seul ne modifie pas fondamentalement la réponse de l'Aulne. Il n'y a aucun effet de l'azote seul. L'effet du phosphore semble nul jusqu'à 25 ppm: environ. Au-delà de cette dose, l'alimentation en phosphore de l'Aulne devient suffisante.

L'actinomycète peut commencer à fixer l'azote puis à le transférer à l'arbre, d'où une amélioration de la croissance.

La double inoculation Frankia-endophyte permet une croissance maximale, sans apport azoté ou phosphaté.

Nous avons pu mettre en évidence une interaction nodule-endomycorhize-fertilisation. Globalement la nodulation est meilleure lorsqu'il y a présence du champignon endomycorhizien. Cette amélioration de la nodulation sous l'effet de l'endophyte mycorhizien est surtout perceptible en présence d'azote, que l'azote soit apporté seul ou en combinaison avec le phosphore.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BONI G., 1955 - An isotopic study of the fixation of **nitrogen** associated with nodulated plants of Alnus Myrica and Hippophaë. J. exp. Bot. (6), 17, p. 303-311
- BOULLARD B., 1968 - Les mycorhizes (monographie 2). Masson et Cie, 135 p.
- BOULLARD B., 1969 - A propos des Aunes. Forêt privée (65), p. 65-73
- CAPELLANO A., MOIROUD A., 1978 - Etude de la dynamique de l'azote à haute altitude. Fixation (réduction de C₂H₂) par Alnus viridis CHAIX et étude ultrastructurale des nodules. Symposium : Physiologie des racines et symbioses, Nancy 11-15 sept. 1978, p. 365-371
- DAFT M.J. et al., 1975 - Arbuscular mycorrhizas in plants colonising coal spoils in Scotland and Pennsylvania. Endomycorrhizas (ed. SANDERS et al.), p. 561-580
- DETHIOUX M., 1974 - Quelques aspects de l'écologie de l'Aulne glutineux. Parcs Nationaux (2), vol. XXIV, fasc. 3, p. 118-129
- DOMINIJK T., 1969 - Key to ectotrophic mycorrhizae. Fol. Forest. Polon. S.A., Z 15, p. 309-321
- DOMMERGUES Y., MANGENOT F., 1970 - Ecologie microbienne du sol. Masson, Paris. 796 p.
- FROIDEVAUX L., 1973 - The ectomycorrhizal association, Alnus rubra + Lactarius obscuratus. Can. J. of Forest Research, vol. 3 (4), p. 601-603
- FROIDEVAUX L., 1974 - Aureobasidium pullulans (de BARY) ARNAUD an associate of Alnus rubra and Lactarius obscuratus mycorrhizae. European J. of Forest Path., Band 5, Heft 2, p. 124-127 (1975)
- KIFFER E., 1974 - Etude des champignons mycorrhiziens et de quelques autres souches associées à l'Epicéa en Lorraine. Thèse de spécialité, Nancy 1.
- LAIHO O., 1970 - Paxillus involutus as a mycorrhizal symbiont of forest trees. Acta Forestalia Fen., vol. 106
- LALONDE M., FORTIN J.A., 1972 - Formation de nodules racinaires axéniques chez Alnus crispa var. mollis. Can. J. Bot. (50), p. 2597-2600

- MESJTRIK V., 1974 - Ecology of mycorrhizae of tree species applied in reclamation of lignite spoil banks. Nov. Hed. Abstract
- MESJTRIK V., BENECKE U., 1969 - The ectotrophic mycorrhizas of Alnus viridis (CHAIX) D.C. and their significance in respect to uptake New Phytol. (68), p. 141-149
- MOLINA H., 1979 - Pure culture synthesis and host specificity of red alder mycorrhizae. Can. J. Bot., vol. 57 (11), p. 1223-1228
- NEAL J.L. et al., 1967 - Sterilization of red alder seedcoats with hydrogen peroxide. Forest Sc., vol. 13 (1), p. 104-105
- PEYRONEL B. et al., 1969 - Terminology of mycorrhizae. Myc., Vol. LXI (2) p. 410-411
- PIZELLE G., 1966 - L'azote minéral et la nodulation de l'Aune glutineux (Alnus glutinosa). II: observations sur l'action inhibitrice de l'azote minéral à l'égard de la nodulation. Ann. Inst. Pasteur (111), suppl., p. 259-264
- PIZELLE G., 1978 - Activité nitrogénase potentielle des nodules d'Alnus glutinosa, d'A. incana et d'A. condata : modalités des variations saisonnières et comparaison entre espèces. Symposium : Physiologie des racines et symbioses. Nancy, 11-15 sept. 1978, p. 346-371.
- PIZELLE G., THIERY G., 1976 - Observations sur l'aptitude des feuilles et des racines de jeunes aunes glutineux (A. glutinosa L. GAERTN) à réduire le nitrate en fonction de l'alimentation azotée. Bull. ENSAIA, Nancy (18), p. 45-49
- QUISPEL A., 1958 - Symbiotic nitrogen fixation in non-Leguminous plants. IV: the influence of some environmental conditions on different phases of the nodulation process in Alnus glutinosa. Acta Bot. Neerl. (7), p. 191-204
- RICHARD L., 1968 - Ecologie de l'aune vert (Alnus viridis CHAIX). Documents pour la végétation des Alpes, VI, p. 107-108
- TARRANT H., 1959 - Stand development and soil fertility in a Douglas-Fir Hed alder plantation. Forest Sc., vol. 7 (3), 1961, p. 238-246
- TARRANT H., TRAPPE J., 1971 - The role of Alnus in improving the forest environment. Plant and Soil, special volume, p. 335-34
- THOEN D., 1970 - Une nouvelle technique d'identification des mycorhizes ectotrophes par chromatographie sur couche mince. Rev. de Mycol., t. XXXV, fasc. 4, p. 258-264
- TRAPPE J., 1979 - Mycorrhiza nodule-host interrelationships in symbiotic nitrogen fixation : a quest in need of questers. Forest Sc p. 276-284

- JAN DIJK, MERKUS E., 1976 - A microscopical study of the development of a spore-like stage in the **life**, cycle of the root-nodule endophyte of Alnus glutinosa. New Phytol. (77), p. 73-91
- ZAK B., 1969 - Characterization and classification of mycorrhizae of Douglas-Fir ; Pseudotsuga menziesii + Poria terrestris (blue and orange staining strains). Can. J. Bot., 47, p. 1833-1840

000000