

1.1 Les spores comme inoculants ectomycorhiziens

L'inoculation avec les spores constitue la méthode la plus simple et la plus efficace, praticable à un moindre coût. Les espèces les plus commodes à utiliser sont celles qui appartiennent aux gastéromycètes, comme les pisolithes et les rhizopogons. Les fructifications de ces espèces, plus ou moins sphériques, produisent leurs spores en très grandes quantités à l'intérieur d'une enveloppe qui ne s'ouvre qu'à pleine maturité.

S'il s'agit d'une culture traditionnelle, sans irrigation et fertilisation, on peut simplement mélanger les sporocarpes fragmentés au substrat de culture, à raison de quelques grammes par mètre carré (Fortin et *al.*, 2008).

1.2 Les inoculums mycéliens

Bien que l'utilisation des inoculums sous forme de spores soit simple et efficace, elle ne convient pas à toutes les situations. On peut avoir besoin d'espèces fongiques qui ne se prêtent pas à l'inoculation sporale, parce que les quantités de sporocarpes à récolter seraient trop grandes, compte tenu de la petite quantité de spores produites par fructification. Ou encore, lorsqu'on doit utiliser des souches génétiquement définies d'une espèce donnée de champignon.

Pour mettre en culture une souche, deux avenues se présentent ; l'utilisation de la chair d'une fructification ou l'utilisation des spores (Fortin et *al.*, 2008).

Chapitre III

Matériel et Méthodes

I. Présentation de la zone et des sites d'étude

1. Présentation de la zone d'étude

1.1 Situation géographique et administrative

Notre zone d'étude est située dans la région d'El-Kala. Cette région fait partie, du complexe humide de la Numidie Orientale (Samraoui et De Belair, 1998).

Elle est située dans l'extrémité Nord-est de l'Algérie sur une bande côtière comprise entre les plaines de la Mafragh (Annaba) à l'Ouest, le bassin du Tonga à l'Est (près de la frontière Algéro- Tunisienne). Elle est limitée au Nord par la mer Méditerranée et au Sud par les monts de la Medjerda (Djebel Ghorra).

Cette région, incluse administrativement dans la Wilaya de Tarf, abrite le parc National d'El – Kala qui est l'un des plus grands parcs Nationaux d'Algérie et qui figure parmi les zones protégées les plus importantes et les plus riches de la méditerranée occidentale.

Par ailleurs, cette région est caractérisée par une hétérogénéité écosystémique concrétisée dans la grande diversité géomorphologique, édaphique et climatique (De Belair, 1990).

1.2 Climat

La région d'El-Kala est caractérisée par un climat de type méditerranéen (Emberger, 1971).

Selon Settzer (1946) in Beddiar (2003) la moyenne des maxima des températures se situe autour de 18°C avec une moyenne des minima comprise entre 12 et 24°C. Quant à la pluviosité, elle a tendance à augmenter d'Ouest en Est (568 mm à Annaba les salines, 634 mm à Bouteldja et 910 mm à El-Kala) selon les données météorologiques de l'année 2004.

L'humidité de l'air joue un rôle important dans le conditionnement et l'évaporation, elle atténue la sécheresse et par conséquent, elle influence les conditions de développement de la végétation. L'humidité de la région varie de 72 % à 78.9 % (Benyacoub *et al.*, 1998).

Enfin, Les vents dominants sont marins ; leur direction est Nord-Ouest de novembre à avril et Nord-Ouest-Nord- Est de mai à octobre (ANF, 1992).

1.3 Pédologie et sol

Les Grès numidiens constituent le substrat géologique de la région (ANF, 1992).

La décomposition facile de ces Grès sous l'action des agents atmosphériques donne naissance à des complexes Argilo-Siliceux très perméables. La transformation de ce substrat a donné

naissance à une formation pédologique très favorable à la végétation caractérisée par des sols podzoliques (ANF, 1992).

1.4 Végétation

L'essence principale est le chêne-liège, le sous-bois est assez dense composé d'espèces accompagnatrices de cette essence telles que :

Phylleria angustifolia, *Erica arborea*, *Calycotome villosa*, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*, *Cytisus triflorus*, *Cistus salviaefolius*, *Arbutus unedo*, *Olea Europea*, *Lavandula stoechas*, *Mentha pulegium*, *Thymus vulgaris*...

On note la présence par endroit, du chêne-kermès (*Quercus coccifera*).

2. Présentation des sites d'étude

Site 1 : la forêt de chêne-liège de « **Brabtia** » (Fig. 12), qui est une subéraie pure avec sous bois, sur sol rocailleux, néanmoins dégradée. Dont les coordonnées géographiques sont : 36°52'09.27'' Nord et 8°20'16.58'' Est (cercle 1 sur la carte de la figure 14)



Adouane M.

Figure 12 : la forêt de Brabtia.

Site 2 : Il fait partie du canton « **Boumalek** » qui est situé administrativement dans la partie Est de la forêt domaniale d'El-Kala.

Ce site est dénommé communément « **El Djer El Ouassaa** » expression qui serait la déformation populaire de l'expression « **El Hadjar El Ouassaa** » laquelle exprime la distance qui séparait les Eucalyptus lors du reboisement de **1972**.

On y accède par la route départementale N° 109.

Ces coordonnées géographiques sont : 36°53'48.54'' Nord et 8°21'51.57'' Est (cercle 2 sur la carte de la figure 14).

Le relief est caractérisé physiquement par une surélévation côtière parallèle à la mer qui diminue d'altitude selon la progression Nord-Sud, jusqu'à devenir pratiquement plate au niveau de Lac-Oubeira.

Originellement, ce site était une subéraie naturelle plus ou moins dégradée. En 1972, les services des forêts de la wilaya ont réalisé au niveau de cette subéraie des reboisements à base d'*Eucalyptus camaldulensis* en mélange à 20 % avec l'*Acacia decurrens*.

L'évolution de ce reboisement et de la végétation naturelle sous les contraintes environnementales (incendies notamment) a favorisé le développement exorbitant de l'acacia (Fig. 13), si bien qu'on peut noter deux peuplements différents :

Un peuplement de chêne-liège en mélange avec l'Acacia

Un peuplement d'Eucalyptus avec prédominance d'Acacia avec quelques reliques de chêne-liège.



Figure 13: Vue générale du site 2.

Sites explorés pour la recherche des champignons:

1. une subéraie incendiée située au bord de la route nationale 109 juste après le village de Berrihene (à quelques kilomètres d'« El Gantra El Hamra »), dont les coordonnées géographiques sont : 36°5'39.42.21'' Nord et 7°57'39.67'' Est (cercle 3 sur la carte de la figure 14)
2. un peuplement de chêne-liège en mélange avec l'acacia, situé à droite de la route nationale menant à Oum Tboul juste après les locaux administratifs du Parc National

- d'El-Kala. Dont les coordonnées géographiques sont : $36^{\circ}53'16.06''$ Nord et $8^{\circ}26'47.60''$ Est (cercle 4 sur la carte de la figure 14)
3. La station du Nord-Ouest du Tonga, un transect allant de la subéraie pure à la subéraie en mélange avec l'acacia. Dont les coordonnées géographiques sont : $36^{\circ}52'57.93''$ Nord et $8^{\circ}31'04.13''$ Est (cercle 5 sur la carte de la figure 14)
 4. Station à 1 km d'El Djer El Ouassaâ qui a subi un assainissement (coupe de tous les acacias) en 2009, où ne persistent que l'eucalyptus et les régénérations d'acacia. Dont les coordonnées géographiques sont : $36^{\circ}52'31.77''$ Nord et $8^{\circ}22'44.29''$ Est (cercle 6 sur la carte de la figure 14)
 5. La station d'El Haddada : la zone de Haddada est située au Nord-est algérien du chef lieu de la commune de Souarekh à proximité de la frontière tunisienne, dont les coordonnées géographiques sont : $36^{\circ}53'42.45''$ Nord et $8^{\circ}37'04.43''$ Est (cercle 7 sur la carte de la figure 14).



Figure 14 : Carte géographique représentant la zone et sites d'étude (source : Plan de Gestion du PNEK, 2007).

II. Les méthodes de prélèvement, d'observation et d'estimation de la colonisation mycorhizienne

1. Analyses physico-chimiques du sol :

1.1 pH eau

Pour déterminer le pH du sol nous avons procédé comme suit :

- Tamiser le sol à 2 mm.
- Peser 5g de chaque sol dans des piluliers à agitation, on ajoute à chacun 25ml d'eau distillée.
- Agiter avec agitateur culbuteur pendant 2h de temps.
- Laisser reposer la solution 24h ensuite mesurer le pH eau au moyen d'un pH mètre.

1.2 pH KCl

De la même manière que le pH eau, sauf qu'à la place de l'eau distillée on ajoute le chlorure de potassium KCl à 1N.

1.3 Conductivité électrique :

La conductivité électrique (CE) a été mesurée de la même manière que le pH.
Au moyen d'un conductimètre.

1.4 Matière organique

Pour déterminer la teneur du sol en matière organique (MO), nous avons utilisé la méthode d'Anne :

- Peser de 0.25 à 1g de sol broyé et tamisé à 2mm dans un Erlen-meyer.
- Y ajouter 10ml de bichromate de potassium ($K_2 Cr_2 O_7$) à 8 % et 15ml d'acide sulfurique pure ($H_2 SO_4$).
- Porter à ébullition pendant 5mn à partir de la première goutte condensée, puis laisser refroidir.
- Transvaser dans une éprouvette et ajuster à 100ml avec les eaux de rinçage de l'Erlene
- En prélever 20ml et diluer à 100ml avec de l'eau distillée.
- Ajouter 1g de FNa et 3 à 4 gouttes de diphénylamine.

- Titrer avec la solution de sel de Mohr 0.2N, la solution de couleur brun noirâtre, virera au vert. On en obtient alors X ml.
- Préparer un témoin en suivant les mêmes étapes sans mettre le sol.

Pour calculer le pourcentage du carbone nous avons utilisé la relation suivante :

$$C\% = (Y-X) \times 0.615 \times (100/20) \times (100/P) \times (1/100)$$

Y : correspond à la quantité de sel de Mohr utilisée lors du titrage du témoin (ml)

P : poids du sol (0.25g)

La teneur en matière organique est obtenue par la relation suivante :

$$MO \% = C \% \times 1.72$$

1.5 Calcaire total

Pour déterminer la teneur du sol en calcaire total ($CaCO_3$), nous avons utilisé la technique de titrimétrie qui consiste à :

- Mettre dans un Erlen-meyer 5g de sol tamisé à 2mm.
- Ajouter 50ml d'Hcl à 0.5 N et couvrir l'Erlen.
- Laisser refroidir après une ébullition de 5mn à partir de la première goutte condensée.
- Filtrer la solution et laver le filtrat avec l'eau distillée pour lessiver l'Hcl.
- Déterminer la quantité d'Hcl qui ne réagit pas avec le $CaCO_3$ en ajoutant quelques gouttes de phénolftaline.
- Titrer la solution avec le NaOH à 0.2 N.

On utilise la relation suivante pour déterminer la teneur de sol en $CaCO_3$:

$$CaCO_3 = 5 \times ((50 \times \text{normalité de Hcl}) - (\text{quantité de NaOH utilisé} \times \text{normalité de NaOH})) / 5g (\text{poids du sol})$$

1.6 Texture

Pour déterminer la texture du sol, nous avons utilisé la méthode par saturation qui consiste à mesurer le pourcentage d'humidité du sol (Y) et à le comparer à une échelle qui détermine la texture qui lui correspond.

Nous avons tout d'abord pris une petite quantité de sol (entre 50 et 100g) que nous avons imbibé d'eau au goutte à goutte en mélangeant jusqu'à ce que la pâte devienne luisante et glisse doucement lorsqu'on incline la capsule.

Ensuite nous avons suivi les étapes suivantes :

- Peser une capsule vide (P_1).
- Prendre une petite quantité de pâte (sol mouillé), la mettre dans la capsule puis repeser (P_2).
- Mettre à l'étuve pendant 24h à 105°C.
- Peser une troisième fois la capsule à la sortie de l'étuve (P_3). Le poids correspond donc au poids de la capsule vide + le poids du sol sec.
- Puis calculer :

$$X_1 = P_2 - P_3 \quad (\text{poids de l'humidité})$$

$$X_2 = P_3 - P_1 \quad (\text{poids du sol sec})$$

- Ensuite appliquer la règle de trois pour calculer le pourcentage d'humidité :

$$X_1 \longrightarrow X_2 \text{ g de sol sec}$$

$$Y \longrightarrow 100 \text{ g de sol sec}$$

- Enfin comparer Y au tableau suivant pour déterminer la texture

Tableau 03 : Echelle de texture.

Pourcentage d'humidité (%)	Texture
<12	<i>Sableuse</i>
12 – 24	<i>Sablo-limoneuse</i>
24 – 37.5	<i>Limono-sableuse</i>
37.5 – 45	<i>Limono-argileuse</i>
45 – 75	<i>Argilo-limoneuse</i>
>75	<i>Argileuse</i>

2. Les méthodes de prélèvement

Nos investigations ont été effectuées du mois de décembre 2009 au mois de janvier 2011.

2.1 Inventaire des macromycètes

2.1.1 Récolte des champignons

Dans les sites d'étude, des relevés des macromycètes poussant autour des arbres sur un rayon de 10 à 15 mètre ont été effectués.

Chaque carpophore a été soit déterminé sur place, soit prélevé en vue d'une identification ultérieure. La détermination étant longue et difficile, il est nécessaire de noter tous les renseignements possibles sur l'espèce avant de la récolter et de la photographier.

La récolte des carpophores est réalisée en tenant compte de certaines précautions indispensables en vue d'assurer la continuité et la performance de l'espèce d'une part, et la conservation des échantillons dans les meilleures conditions pour faciliter leur identification d'autre part.

2.1.2 Identification des champignons

Une fois au laboratoire, une description de chaque champignon appuyée par des photos est effectuée.

Cette description est basée sur les critères suivants :

1. La forme, la taille, la couleur et la texture du chapeau.
2. La forme de la marge.
3. La forme, la surface et les ornements du pied.
4. Le dessous du champignon : la surface fertile ou hyménium (des lames, des plis, des tubes ou des aiguillons)
5. Insertion des lames sur le pied.
6. Pour les champignons à hyménium peu différencié, s'ils sont : En massue, globuleux ou en coupe.

Les critères retenus sont ceux définis par Courtecuisse et Duhem, 2000.

2.2 Expérience de piégeage (Préparation au laboratoire des plantes pièges)

Cette technique de piégeage a été réalisée dans le but de :

- vérifier l'existence des champignons mycorhiziens dans les sites d'étude et définir le statut mycorhizien du chêne-liège
- comparer la croissance du chêne-liège et sa mycorhization en fonction de la provenance des sols.

La préparation des plants pièges passe par les étapes suivantes :

2.2.1 Germination aseptique des glands

Avant leur mise en germination, les glands issus du même arbre du parc animalier de Brabtia ont subi une sélection par trempage dans de l'eau tiède. Ceux qui ont flotté ont été écartés, et ceux jugés sains ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

Les glands préalablement lavés avec une goutte de détergent et rincés abondamment à l'eau du robinet, sont désinfectés par trempage durant 15 mn dans une solution d'eau oxygénée (H₂O₂) à 30 V. Ils sont ensuite lavés plusieurs fois à l'eau distillée stérile pour éliminer l'H₂O₂. Enfin, ils sont mis à prégermer pendant une dizaine de jours dans de la terre humide, préalablement autoclavée à 121°C pendant 20 mn.

2.2.2 Mise en sachets des semis

Le sol prélevé de l'horizon A₁ de S₁ et S₂ préalablement tamisé à 1cm (pour le débarrasser des débris de litière) est mis dans des sacs de culture de 2 kg en polyéthylène et à forme plate. Un troisième substrat S₃ est préparé à partir d'un mélange de 1/3 de litière d'acacia et 2/3 du sol du site S₁.

Les glands prégermés semi-axéniquement sont semés (Février 2010) à raison d'un gland par sac. Cette opération est répétée 20 fois pour chaque substrat.

Les plants pièges ainsi préparés, sont cultivés à l'air libre pendant une année et irrigués un jour sur deux à l'eau du robinet.

2.2.3 Paramètres mesurés

Après un an de croissance, les plants sont débarrassés de leur substrat d'élevage et rincés à l'eau du robinet.

Les parties souterraines de ces plantules, sont lavées délicatement afin de préserver les racines fines. Une partie de ces racines a servi à l'observation des ectomycorhizes et l'autre a subi une attaque à la potasse et une coloration au bleu Trypan selon la méthode de Phillips et Hayman (1970).

Ce traitement permet de déceler les endomycorhizes arbusculaires dans les fragments racinaires.

Nous avons observé les mycorhizes de ces jeunes semis avec des techniques que nous évoquons dans les parties à venir.

La croissance en hauteur est mesurée pour chaque plant du collet jusqu'au bourgeon terminal. Les parties aériennes sont mises à sécher 72 h à l'étuve à 60°C dans des sacs en papier pesés préalablement dans le but d'évaluer la matière sèche en fonction des sites.

Le poids du système racinaire frais est obtenu pour chaque plant avant d'être utilisé pour l'observation des mycorhizes.

2.3 Les méthodes d'observation et d'estimation de la colonisation mycorhizienne

2.3.1 Etude morphologique et anatomique des ectomycorhizes

Les ectomycorhizes ont une structure permettant de les distinguer facilement des racines non colonisées, par leur aspect, leur couleur et leur structure microscopique (Al Abras, 1985)

La liste de ces différents critères a été détaillée par plusieurs auteurs. Pour ce qui nous concerne, nous nous sommes appuyés sur la classification des ectomycorhizes établie par Agerer (1987 – 2006) et qui est fondée sur plusieurs caractères dont les principaux sont les suivants :

Fiche Descriptive Des Ectomycorhizes

Les caractères morphologiques de l'ensemble de la mycorhize

Ils sont observés à l'œil nu ou sous une loupe binoculaire

Morphologie du système mycorhizien

- Couleur
- Longueur
- Type de ramifications présentes (Fig. 15)
- Abondance des ramifications
- Présence des rhizomorphes
- Fréquence des rhizomorphes

Morphologie des extrémités non ramifiées

- Forme (Fig.16)
- La forme de l'extrémité distale (Fig. 17)
- Couleur
- Visibilité des cellules corticales
- Transparence du manteau
- Surface du manteau en général
- Surface du manteau dans le détail (Fig. 18)
- Présence des hyphes émanantes
- Abondance des hyphes émanantes

Morphologie du rhizomorphe

- Forme de la section
- Couleur
- Type de connexion au manteau (Fig. 19)
- Localisation

Les caractères anatomiques de l'ensemble de la mycorhize

Anatomie du manteau en section transversale

- Type de manteau (Fig. 20)

Anatomie des cellules à tanin en section transversale

- Présence
- Nombre de lignes
- forme

Anatomie du réseau de Hartig en section transversale

- Type (Fig. 21)
- Profondeur

Anatomie des éléments issus en général

Anatomie de la ramification des hyphes émanant

- Nature
- Type de ramification

Anatomie du rhizomorphe

- Type (Fig. 22)

Remarque : il est à noter que la définition exacte des couleurs des ectomycorhizes est difficile du fait que les couleurs changent et du fait que la désignation de certaines couleurs soit subjective.

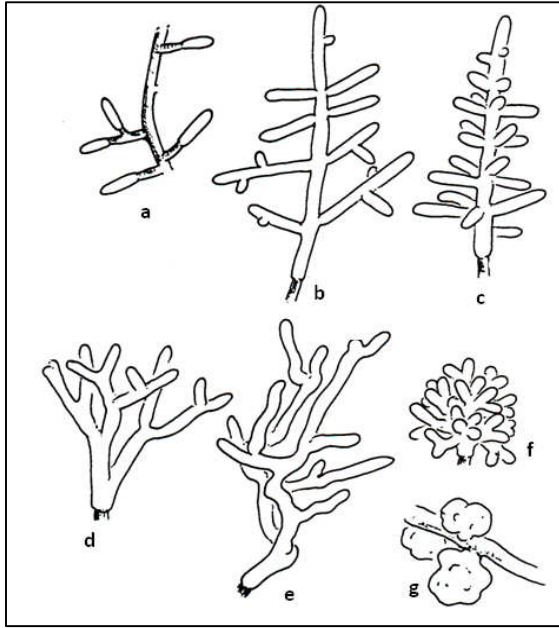


Figure 15: Types des ramifications. a- simple = non ramifiée. b- monopodiale pennée. c- monopodiale pyramidale. d- dichotomique. e- irrégulièrement pennée. f- coralloïde. g- tuberculée. D'après Agerer (1987 – 2006).

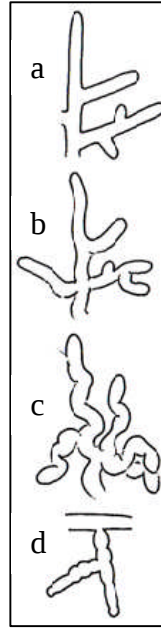


Figure 16: Formes des extrémités non ramifiées. a- droite (linéaire). b- sinueuse (courbée). c- tortueuse. d- perlée. D'après Agerer (1987 – 2006).

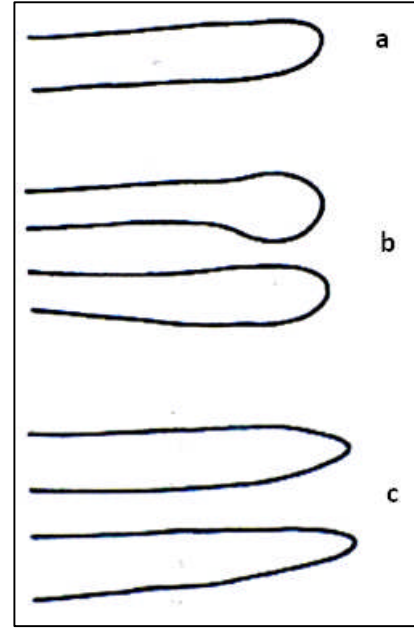


Figure 17: Formes des extrémités distales. a- cylindrique (non gonflée). b- gonflée. c- fuselée (pointue, élancée). D'après Agerer (1987–2006).

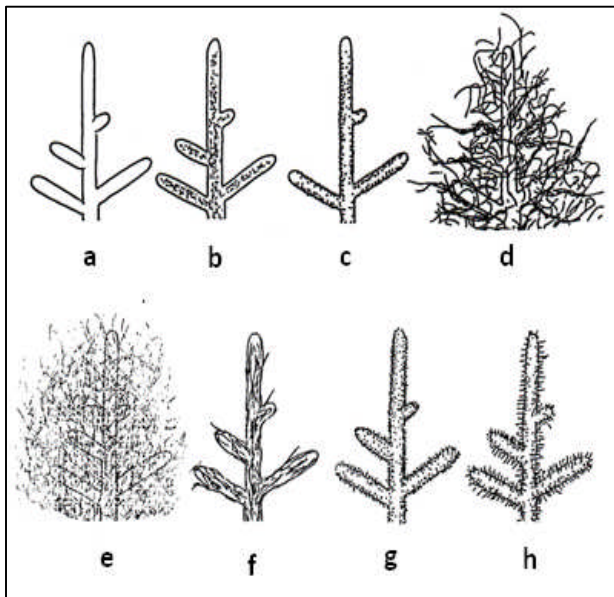


Figure 18: Aspects de la surface du manteau. a- lisse. b- réticulée (verruqueuse). c- grenue. d- laineuse. e- cotonneuse. f- filandreuse ou filamenteuse (remplie de fibres ou de cordons). g- courtes épines. h- longues épines. D'après Agerer (1987 – 2006).

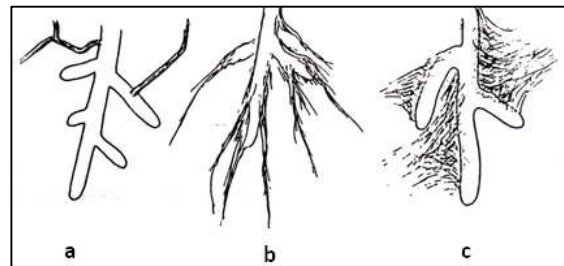


Figure 19: Points de connexion des rhizomorphes au manteau. a- point distinct. b- oblique. c- en éventail. D'après Agerer (1987 – 2006).

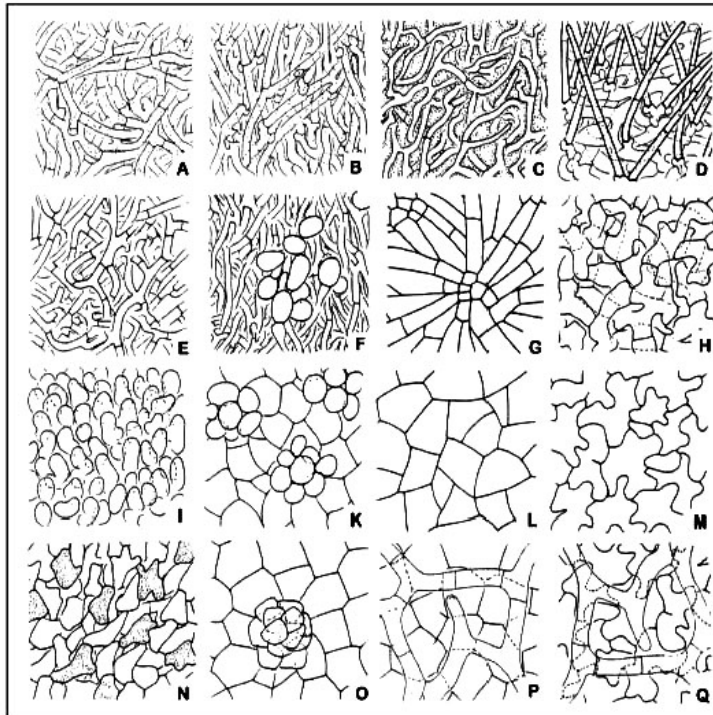


Figure 20: Types d'organisations du manteau. A- plectenchyme, avec des arrangements des faisceaux d'hyphes en anneaux. B- plectenchyme, hyphes irrégulièrement arrangées. C- plectenchyme, avec une gélatineuse matrice entre les hyphes. D- plectenchyme, les hyphes arrangés en réseau avec des cystides saillants. E- plectenchyme, hyphes arrangées en réseau, ramifiées régulièrement. F- plectenchyme, avec des cellules rondes occasionnelles. G- plectenchyme, hyphes arrangées en étoile et étroitement collées. H- type transitionnel entre le plectenchyme et le pseudoparenchyme, hyphes en formes irrégulières formant un gros réseau. I- plectenchyme, manteaux avec hymeniformes, perpendiculairement saillants, cellules finales des hyphes grosses et souvent légèrement incurvées. K- pseudoparenchyme, composé par des cellules angulaires et avec des cellules rondes comme des mamelons. L- pseudoparenchyme, manteaux avec des cellules angulaires. M- pseudoparenchyme, avec des cellules épidermiques. N- pseudoparenchyme, manteaux avec quelques cellules contenant des gouttelettes, colorées avec la sulfo-vanilline, formes variables. O- pseudoparenchyme, manteaux avec des cellules angulaires et des buttes de cellules. P- pseudoparenchyme, avec des cellules angulaires maintenues par un réseau d'hyphes délicat. Q- pseudoparenchyme, avec des cellules épidermiques maintenues par un réseau d'hyphes délicat. D'après Agerer (1987 – 2006).

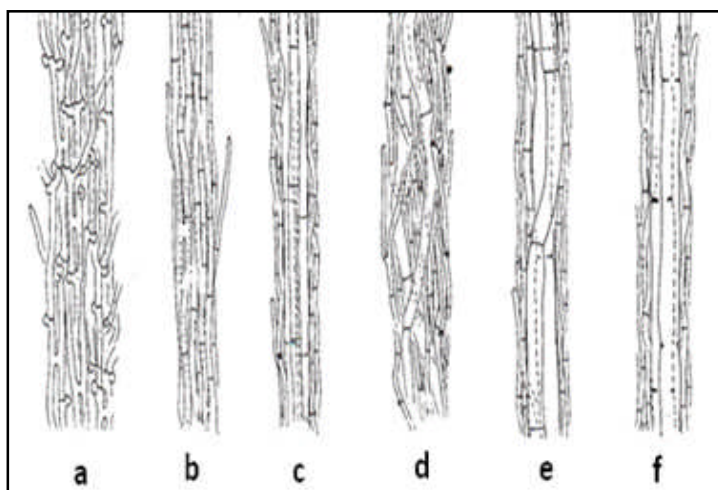


Figure 22: différents types d'organisation de rhizomorphes. a- indifférenciée, plutôt lâchement arrangées et isodiamétriques, plusieurs hyphes croît vers l'extérieur (la marge). b- indifférenciée, marge plutôt lisse, hyphes densément arrangées et isodiamétriques. c- légèrement différenciée, les hyphes centrales assez élargies. d- différenciées, certaines hyphes sont très épaisses et apparaissent distribuées au hasard. e- différenciée, les hyphes épaisses formant la partie centrale. f- fortement différenciée, hyphes épaisses formant le centre, septations souvent partiellement ou entièrement dissoutes, parfois les résidus (restes) des septations peuvent être détectés.

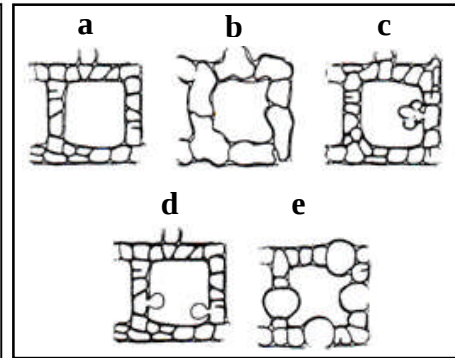


Figure 21: Types de réseau de Hartig. a- ordinaire et largement distribué, avec une seule rangée d'hyphes. b- réseau de Hartig gros (gras) avec de larges lobes peu fréquents. c- comme type a, mais présente des « haustoria » lobés et ramifiés. d- comme type a, mais présente des structures comme les « haustoria », petites et globulaires. e- réseau de Hartig perlé avec des épaississements. D'après Agerer (1987 – 2006).

2.3.2 Préparation et observation des ectomycorhizes

La totalité du système racinaire des plants pièges est lavé délicatement à l'eau du robinet pour le débarrasser des particules de sol. Selon Grand et Harvey (1982) in Abourouh (1998), L'expérience montre que plus les échantillons sont propres plus l'évaluation est rapide et précise.

Une partie des racines fines récupérée (environ 2g) est réservée pour la recherche d'endomycorhizes arbusculaires, le reste est étalé dans des boîtes de Pétri quadrillées (1cm de côté) contenant de l'eau. Elles sont observées au stéréomicroscope en 3 étapes :

- La 1^{ère} étape consiste à déterminer le taux de mycorhization.
- La 2^{ème} étape consiste à distinguer et regrouper les différents morphotypes ectomycorhiziens.
- La 3^{ème} étape consiste à décrire chaque morphotype et à réaliser des coupes.

La colonisation ectomycorhizienne a été estimée par la méthode des intersections des lignes et des colonnes (Giovannetti et Mosse, 1980 in Abourouh (site web 5) adoptée par Brundrett, 1996). Elle consiste à noter, au niveau d'une centaine de points d'intersection des segments racinaires et des lignes d'une grille formée de carreaux de 1cm de côté, la présence ou l'absence de la colonisation. La lecture se fait dans le sens de la flèche représentée sur le schéma de la figure 23.

- Les différents morphotypes observés sont photographiés, décrits et fixés dans un mélange fixateur dénommé FAA composé de Formol – Acide acétique – Alcool 50 ou 70% (90 – 5 – 5) (Johansen, 1940 in Abourouh, 2000) et conservés à la température ambiante.
- Les coupes fines sont réalisées à main levée à l'aide d'une lame de rasoir. Les coupes obtenues sont montées entre une lame porte-objet et une lamelle après avoir été colorées avec une goutte de bleu coton ou de bleu trypan (0,05 % de bleu trypan dans du lactoglycerol (1 : 1 : 1 acide lactique, glycérol, eau distillée) d'après Brundrett et *al.*, 1996).

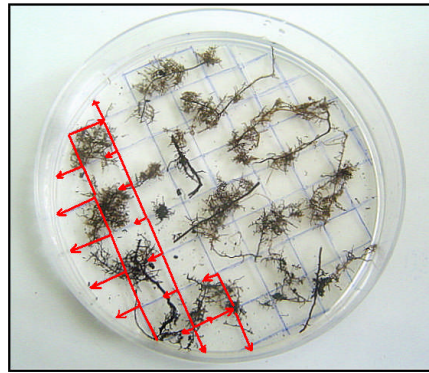


Figure 23: représentation schématique de la méthode des intersections des lignes et des colonnes, flèches rouges (sens de lecture).

2.3.3 Coloration et observation des endomycorhizes arbusculaires

Contrairement à la colonisation ectomycorhizienne, la colonisation endomycorizienne ne peut être observée qu'après coloration des racines. Pour cela, on a eu recours à la technique de Phillips et Hayman (1970).

Afin d'obtenir de bons résultats, il est indispensable de laver méticuleusement les racines fraîchement récoltées afin de les débarrasser des particules de sol.

Un échantillon d'environ 1g de racines excisées (fragments de 2 cm de longueur) est mis dans un tube en matière plastique muni d'une grille en acier inoxydable à sa partie inférieure. Les tubes ainsi préparés sont rangés dans un panier.

La coloration de racines ne se fait que par immersion successive du panier dans différentes solutions comme suit :

- Plonger le panier dans une solution de potasse (KOH à 10 %) chauffé au Bain-marie à 90°C pendant 30mn pour vider les cellules de leur contenu, ce qui permet une meilleure observation des champignons intracellulaires.
- Rincer les tubes à l'eau du robinet pour éliminer la potasse.
- Plonger le panier successivement pendant 10 à 20 mn dans du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 10 vol) puis dans de l'acide chlorhydrique (HCl à 2 %). Les racines devenues blanchâtres sont de nouveau rincées.
- Enfin, les racines sont colorées par immersion du panier dans du noir de chlorazol à 0.2 % (0.1g de chlorazol + 100 ml d'acide lactique + 100 ml de glycérol + 100 ml d'eau distillée) chauffé à 90°C au bain-marie pendant 40 mn
- Les racines ainsi colorées, sont conservées dans des piluliers contenant du glycérol.