

Pr 6103 B

# CRYPTOGAMIE

## MYCOLOGIE

TOME 12    Fascicule 1    1991

6 MAI 1991

LABORATOIRE DE CRYPTOLOGAMIE  
MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE  
12, RUE BUFFON, 75005 PARIS

## SOMMAIRE

M. CONTU. - Studi sulle <i>Lepiotaceae</i> - I Alcune note sul genere <i>Sericomyces</i> Heinem. in Sardegna .....	1
T.T.T. PHAM, A.-M. SLEZEC and E. ODIER - Fruiting in <i>Dichomitus squalens</i> (Karst) Reid .....	13
A. BOUTEKRABT et J.C. PARGNEY - Etude ultrastructurale de <i>Tuber melanosporum</i> Vitt. en culture isolée et en association avec des vitroplants de <i>Quercus</i> ( <i>Q. robur</i> et <i>Q. pubescens</i> ). .....	25
J.C. PARGNEY - Cytochimie ultrastructurale des interfaces présentes dans l'association ectomycorhizienne <i>Tuber melanosporum</i> Vitt./ <i>Corylus avellana</i> L. ....	47
M.M.K. BAGY and A.Y. ABDEL-MALLEK - Fungi on the hair of small mammals in Egypt .....	63
B.S. SHARMA, V.N. PATHAK and K. BHATNAGAR - Morphological, cultural and pathogenic variations in <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. causing root rot of sugarbeet .....	71
Analyses bibliographiques .....	81
Instructions aux auteurs .....	85

## CONTENTS

M. CONTU - Study of <i>Lepiotaceae</i> - I Some note about genus <i>Sericomyces</i> Heinem. in Sardinia (in Italian) .....	1
T.T.T. PHAM, A.-M. SLEZEC and E. ODIER - Fruiting in <i>Dichomitus squalens</i> (Karst) Reid .....	13
A. BOUTEKRABT et J.C. PARGNEY - Ultrastructural study of <i>Tuber melanosporum</i> Vitt. in pure culture associated with <i>Quercus</i> ( <i>Q. robur</i> and <i>Q. pubescens</i> ) vitroplants (In French) .....	25
J.C. PARGNEY - Ultrastructural cytochemistry of different interfaces in the ectomycorrhizian association <i>Tuber melanosporum</i> Vitt./ <i>Corylus avellana</i> L. (In French) .....	47
M.M.K. BAGY and A.Y. ABDEL-MALLEK - Fungi on the hair of small mammals in Egypt .....	63
B.S. SHARMA, V.N. PATHAK and K. BHATNAGAR - Morphological, cultural and pathogenic variations in <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. causing root rot of sugarbeet .....	71
Bibliography .....	81
Instructions to the authors .....	85

310103B

# CRYPTOGAMIE

## MYCOLOGIE

**TOME 12    Fascicule 1    1991**

Ancienne Revue de Mycologie. Dirigée par Roger HEIM

DIRECTEUR SCIENTIFIQUE : Madame J. NICOT  
SECRÉTAIRE DE RÉDACTION : Mme M.-C. BOISSELIER. ÉDITEUR : A.D.A.C.

Publié avec le concours du Muséum National d'Histoire Naturelle

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE est indexé par : *Biological Abstracts, Current Contents,*

Publications bibliographiques du CDST (Pascal).

Copyright © 1991. CRYPTOLOGAMIE, Mycologie



Bibliothèque Centrale Muséum



3 3001 00226868 7

Source : MNHN, Paris



## STUDI SULLE *LEPIOTACEAE* - I ALCUNE NOTE SUL GENERE *SERICEOMYCES* HEINEM. IN SARDEGNA

Marco CONTU

via A. Manzoni, 33. 09128, Cagliari. Italia

**ABSTRACT** - Nine species of *Sericeomyces* are reported from Sardinia: *S. cylindrosporus* Contu spec. nov. ad int., *S. erioderma* (Mal.) Contu comb. nov., *S. medioflavoides* (Bon) Contu comb. nov., *S. menieri* (Sacc.) Contu comb. nov., *S. serenus* (Fr.) Heinem., *S. sericatellus* (Mal.) Bon, *S. sericeus* (Cool) Contu comb. nov., *S. subglobisporus* Contu spec. nov. and *S. subvolvatus* (Mal. & Bert.) Contu comb. nov. An emendation of the genus is proposed and a key to the species occurring in Sardinia is given.

**RÉSUMÉ** - Neuf espèces de *Sericeomyces* sont signalées de Sardaigne: *S. cylindrosporus* Contu spec. nov. ad int., *S. erioderma* (Mal.) Contu comb. nov., *S. medioflavoides* (Bon) Contu comb. nov., *S. menieri* (Sacc.) Contu comb. nov., *S. serenus* (Fr.) Heinem., *S. sericatellus* (Mal.) Bon, *S. sericeus* (Cool) Contu comb. nov., *S. subglobisporus* Contu spec. nov. et *S. subvolvatus* (Mal. & Bert.) Contu comb. nov. Un amendement du genre est proposé et une clé pour les espèces croissant en Sardaigne est fournie.

**MOTS CLÉS** : *Basidiomycetidae*, *Agaricales*, *Lepiotaceae*, *Sericeomyces*, taxonomic, Sardaigne.

### INTRODUZIONE

Prima di essere riunite nel nuovo genere *Sericeomyces* Heinem. (1978: 401) le piccole lepiote gravitanti attorno a "*Lepiota serena* (Fr.) Sacc." avevano vissuto un intenso travaglio tassonomico. Infatti Fries (1821) le pose in una sezione *Annulosae* Fr. della suddivisione infragenerica *Lepiota* Pers. mentre Kühner (1936) propose per esse la nuova sezione *Sericellae*, poi abbandonata a profitto della sezione *Annulosae* (Kühner & Romagnesi, 1953). Il collocamento nel genere *Lepiota* sensu largo delle *Sericellae* non fu avallato da Locquin (1952) il quale, anche sulla scorta di alcune considerazioni di Singer (1951), preferì assegnare queste specie all'emendato genere *Pseudobaeospora* Sing., soluzione subito accolta, fra gli altri, da Singer (1975) e Moser (1978) ma respinta da Horak (1964) e Bon & Boiffard (1974). Ad avviso di questi due ultimi Autori *L. serena* e specie vicine sarebbero meglio collocate nel genere *Leucoagaricus* Locq. ex Sing. Per risolvere questo intricato problema sistematico, i cui termini sono stati

diffusamente esposti, fra gli altri, da Kühner (1980), Heinemann (1978, cit.) ha proposto l'istituzione del nuovo genere *Sericeomyces*, il quale ha incontrato il favore di Singer (1986) e Moser (1983), oltre che di diversi altri Autori, mentre Bon (1981) ha preferito riconoscerli il rango di mero sottogenere di *Leucoagaricus*. A me pare, tenuto conto anche di quanto sostenuto da Kühner (1980) a proposito dell'inserimento di *Lepiota serena* in *Pseudobaeospora* Sing., che la scelta sistematica di quegli Autori che vogliono le *Sericellae* separate in un apposito raggruppamento sia, allo stato attuale delle conoscenze sulla sistematica degli imenomiceti lepiotoidi, accettabile senza troppe difficoltà. E' chiaro che, a questo punto, il problema consiste soprattutto nella scelta del rango tassonomico più naturale (sezione, sottogenere o genere). A giudicare dai caratteri macro e micromorfologici sembra indubbio che il complesso in esame sia più vicino a *Leucoagaricus* piuttosto che a *Lepiota* stricto sensu, se la sistematica di AA come Singer (1975) e Bon (1981) è accettata. Tuttavia il genere *Leucoagaricus* comprende, almeno per la maggior parte, specie dotate di un rivestimento pileico a struttura manifestamente tricodermica fino a subpalissadica mentre è noto che la cuticola di *Lepiota serena* e specie vicine è una cutis di ife subparallele o intrecciate (solo in alcune entità essa può essere d'aspetto subtricodermico, vedi, in proposito, infra), non di rado sormontata da una ixocutis di ife molto gracili. Questo carattere è molto atipico per i *Leucoagaricus* e sembra raro anche fra le rimanenti entità appartenenti al vasto complesso degli imenomiceti lepiotoidi. Esso sembra ben giustificare una separazione al rango generico, specie se unito ad altri caratteri peculiari come habitus dei carpofori, metacromasia dell'endosporio sporale, etc. Va però sottolineato che quest'ultimo particolare non va sopravvalutato, in quanto presente anche in diversi altri generi come *Lepiota* sez. *Lepiota* (= *Macrolepiota*), *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus*, principalmente. La combinazione dei caratteri indicata da Heinemann (1978) mi pare quindi giustificati il riconoscimento del complesso *Sericellae* nel nuovo genere *Sericeomyces*, il quale ha come specie-typus la *Lepiota serena* sensu Kühner (1936: 213) ed ha il pregio di dare uniformità al genere *Leucoagaricus* il quale deve essere ristretto a specie dotate, dal punto di vista strutturale, di una cuticola realmente tricodermica o subpalissadica.

La presente nota costituisce una studio preliminare sull'ecologia e la tassonomia delle specie del genere *Sericeomyces* Heinem. in Sardegna. Le notizie sulla diffusione nell'Isola degli imenomiceti lepiotoidi in genere sono, allo stato attuale, ancora troppo scarse e, nel caso del genere in oggetto, quasi del tutto assenti. E' di tutta evidenza, pertanto, la necessità di studi floristici specifici, da condurre sulla base delle risultanze della moderna letteratura. La chiave per la determinazione delle specie studiate, che di seguito viene proposta, va considerata come ancora provvisoria poichè la possibilità di reperimento di ulteriori membri del genere non può essere del tutto esclusa.

Il materiale studiato, per la quasi totalità raccolto dall'autore della presente nota, si trova conservato nell'Herbarium Mycologicum Caralitanum, Istituto ed Orto Botanico dell'Università di Cagliari (CAG). La nomenclatura utilizzata segue Heinemann (1978) e Bon (1981).

## PARTE TASSONOMICA

**SERICEOMYCES** Heinemann, *Bull. Jard. Bot. Natl. Belgique* 48: 401, 1978.

*Lepiota* sez. *Sericellae* Kühner ex Wasser, *Ukrajn. Bot. Zurn.* 35: 517, 1978  
 - *Leucoagaricus* sez. *Sericelli* (Kühner) Bon & Boiffard, *Doc. Mycol. (Lille)*  
 24: 44, 1976 (nom. inv.) - *Pseudobaeospora* Singer emend. Locquin, *Bull. Soc.*  
*Mycol. France* 68: 169, 1952 - *Leucoagaricus* subgen. *Sericomyces* (Heinem.)  
 Bon, *Doc. Mycol. (Lille)* 43: 51, 1981.

Imenomiceti lepiotoidi a portamento gracile o medio, colorazioni biancastre, con anello, senza volva, spore bianche, destrinoidi o amiloidi, metacromatiche in Bleu di Cresile, lisce, rivestimento pileico composto da ife parallele, subintrecciate o leggermente rialzate, senza sferociti, sovente con ixocutis; giunti a fibbia assenti.

Species-typus: *Lepiota serena* (Fr.) Sacc. sensu Kühner non J. Lange.

Chiave delle specie osservate in Sardegna:

- 1a basidi 2 sporigi, spore subfusiformi lunghe oltre 10 $\mu$ m..... *S. sericatellus*  
 1b basidi 4 sporigi, spore raramente lunghe oltre 10 $\mu$ m.....2  
 2a rivestimento pileico ad ife confuse e parzialmente erette.....3  
 2b rivestimento pileico ad ife coricate, parallele o intrecciate.....4  
 3a nelle dune sabbiose, spore 7-9 x 4.5-5 $\mu$ m, cheilocistidi fusiformi.....  
 .....*S. menieri*  
 3b in località erbose, spore 6.5-8 x 4.5-5 $\mu$ m, cheilocistidi clavati.....  
 .....*S. erioderma*  
 4a spore da amigdaliformi a subconiche.....5  
 4b spore da ellipsoidi a ellisso-ovoidi.....7  
 5a cheilocistidi fusiformi o lageniformi, spore 7-9 x 3.5-4.5 $\mu$ m .... *S. sericeus*  
 5b cheilocistidi clavati a sommità sovente incrostata di cristalli.....6  
 6a cappello bianco con centro giallo, spore 6-7.5 x 4-4.5 $\mu$ m, cheilocistidi a  
 sommità non incrostata..... *S. medioflavoides*  
 6b cappello bianco puro o con centro un poco ocraceo, spore 6-8.5 x  
 3.5-4.5 $\mu$ m, cheilocistidi incrostati alla sommità..... *S. serenus*  
 7a spore subglobose 6.7-9 x 6-6.7 $\mu$ m, cheilocistidi lageniformi.....  
 .....*S. subglobisporus*  
 7b spore allungate, da ellipsoidi a ellisso-ovoidi.....8  
 8a spore 7-9 x 4.5-6.5 $\mu$ m, ellisso-ovoidi, specie robusta e slanciata, con  
 gambo a base bulbosa marginata..... *S. subvolvatus*  
 8b spore 8-12 x 4-7 $\mu$ m, ellisso-subcilindriche, specie media a gambo corto  
 a base ingrossata..... *S. cylindrosporus*

1. *Sericomyces sericatellus* (Malençon apud Malençon & Bertault) Bon, *Doc. Mycol. (Lille)* 75: 58, 1989.

= *Lepiota sericatella* Mal. apud Mal. & Bert., *Fl. Champ. Sup. Maroc*  
 1: 150, 1970 - *Sericomyces sericatus* var. *sericatellus* (Mal.) Heinem., *Bull.*

*Jard. Bot. Natl. Belgique* 48: 404, 1978 - *Leucoagaricus sericatellus* (Mal.) Bon, *Doc. Mycol. (Lille)* 35: 40, 1979 - *Pseudobacopora sericatella* (Mal.) Moser apud Gams.

Materiale studiato: Sardegna meridionale, prov. Cagliari, Mostra micologica della Società Micologica Sarda, 3.xii.1989, S.M.S.

Questa entità si riconosce agevolmente, dal punto di vista micromorfologico in quanto sembra l'unica del genere, in Sardegna, a possedere basidi bisporici. Malençon (1970, cit.) e Bon (1981: 51-52) ne fanno un'entità autonoma (e con loro, fra gli altri, Moser, 1986) mentre Heinemann (1978: 404) sostiene che si tratta di una forma bisporica del suo "*S. sericatus*" (= *S. sericeus* nella presente trattazione). Sembra che, ad avviso di Bon (1981: 52), l'elemento discriminante fra le due specie sia dato dalla morfologia delle ife della trama lamellare, apprezzabilmente più larghe in *S. sericatellus*. Si tratta di una specie rara in Sardegna, tipica di località erbose al di fuori dai boschi.

## 2. *Sericeomyces menieri* (Sacc.) Contu, comb. nov.

Basionimo: *Lepiota menieri* Saccardo, *Syll. Fung.* 9: 4, 1891.

= *Lepiota arenicola* Menier. *Bull. Soc. Mycol. France* 5: 174, 1889 non *L. arenicola* Peck 1888 - *Leucoagaricus arenicola* (Menier) Bon & Boiffard, *Bull. Soc. Mycol. France* 88: 21, 1972 (nom. inv.) - *Leucoagaricus menieri* (Sacc.) Sing., *Mycopathol. Mycol. Appl.* 34: 431, 1968 sensu Auct. pl. non Singer.

Specie classica, riconoscibile facilmente, oltre che per l'habitat, anche per i cheilocistidi fusiformi. Bon & Boiffard (1972) e Bon (1981) utilizzano per essa il binomio "*Leucoagaricus arenicola*" ma, purtroppo, lo stesso è invalido poiché basato sull'illegittimo "*Lepiota arenicola*" Menier 1889 non Peck 1888. Dovrebbe dunque essere adottato il nuovo nome proposto a suo tempo da Saccardo (1891: 4), che Singer ha trasferito a *Leucoagaricus* (cfr. sopra) ma, secondo i dati in mio possesso, basandosi su una specie che pare differente da quella originariamente intesa da Menier. Nella mia raccolta le spore avevano un profilo meno ovoidale di quello evidenziato da Bon & Boiffard (1972, fig. 2, in basso).

## 3. *Sericeomyces erioderma* (Malençon apud Malençon & Bertault) Contu, comb. nov.

Basionimo: *Lepiota serena* var. *erioderma* Mal. apud Mal. & Bert., *Fl. Champ. Sup. Maroc* 1: 147, 1970.

= *Sericeomyces serenus* var. "*eriodermis*" (Mal.) Heinem., *Bull. Jard. Bot. Natl. Belgique* 48: 403, 1978 - *Leucoagaricus erioderma* (Mal.) Bon, *Doc. Mycol. (Lille)* 43: 53, 1981.

Materiale studiato: Sardegna meridionale, prov. Cagliari, Cagliari-città, Orto Botanico dell'Università, in un'aiuola, su terreno erboso, 5.xii.1989, M. Contu.

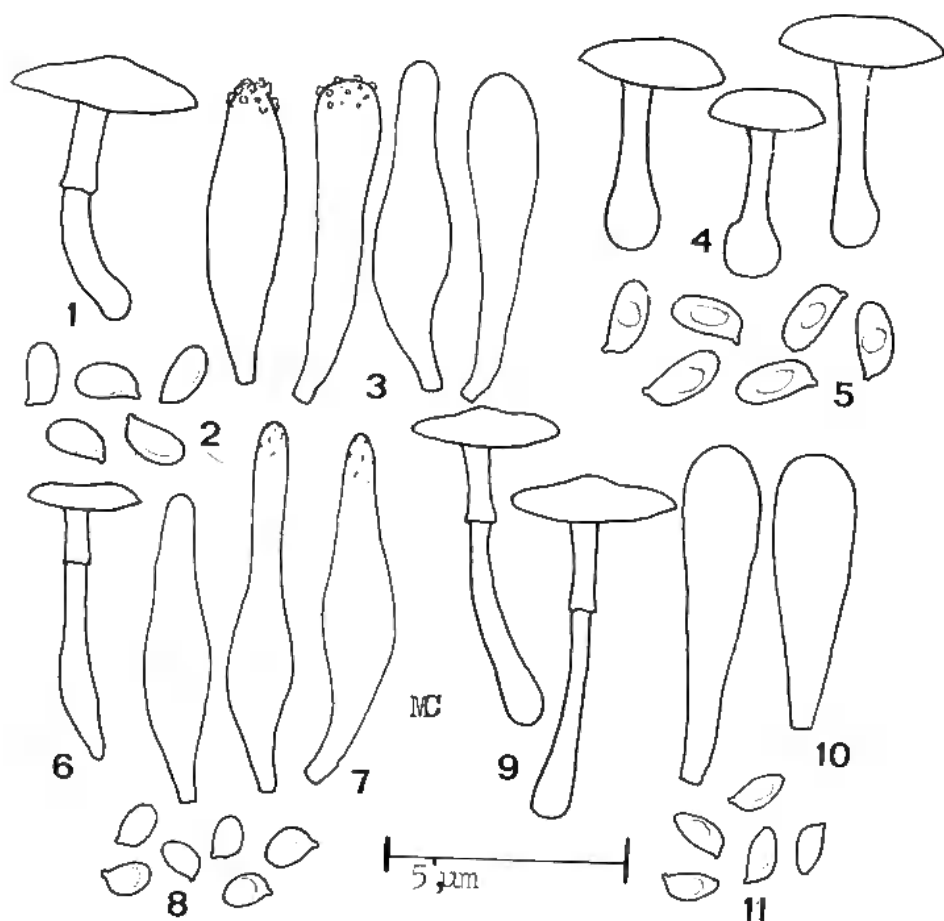


Fig. 1-3: *S. erioderma*, 1: carpoforo, 2: spore, 3: cheilocistidi. Fig. 4-5: *S. cylindrosporus*, 4: carpofori, 5: spore. Fig. 6-8: *S. subglobisporus* sp. nov., 6: carpoforo, 7: cheilocistidi, 8: spore. Fig. 9-11: *S. medioflavoides*, 9: carpofori, 10: cheilocistidi, 11: spore. Disegni di M. Contu.

Dopo aver studiato attentamente alcuni esemplari di questa entità, originariamente descritta da Malençon come varietà di "*Lepiota serena*" (Malençon apud Malençon & Bertault, 1970, cit.), convergo con Bon (1981, cit.) sull'opportunità di elevarla al rango specifico. In effetti *S. erioderma* si caratterizza per la taglia gracile, il cappello bianco con centro tipicamente grigio-cenere e per l'anello ampio e persistente. Microscopicamente ho potuto osservare delle spore ellissoidi a membrana molto rigonfiabile in  $NH_3$  ed a parete congofila in modo accentuato, caratteri che coincidono perfettamente con quelli indicati da Bon (1981: 53). L'unica differenza di rilievo era data dalla presenza di incrostazioni alla sommità di diversi cheilocistidi ma questo carattere, secondo la mia opinione, non può essere giudicato eccessivamente importante dato che non risulta costante neppure

nelle specie per le quali viene indicato come tale. La presenza di un rivestimento pileico a struttura subtricodermica sembrerebbe un'ostacolo ad una completa assimilazione di *S. erioderma* al genere *Sericeomyces* ma dovrebbe essere osservato che la disposizione delle ife della cuticola di *S. erioderma* non sembra assimilabile al vero e proprio tricoderma che caratterizza i tipici *Leucoagaricus* (ad es.: *L. carneifolius*, *pilatinus*, etc.). Lo stesso Heinemann del resto (Heinemann, 1978: 403) considera questa specie come un vero *Sericeomyces*, considerandola, tuttavia, come Malençon, una varietà di *S. serenus*.

#### 4. *Sericeomyces sericeus* (Cool) Contu, comb. nov.

Basionimo: *Lepiota cristata* var. *sericea* Cool, *Meded. Ned. Mycol. Vereines* 12: 24, 1923.

= *Lepiota sericea* (Cool) Huijsman, *Meded. Ned. Mycol. Vereines* 28: 46, 1943 non *L. sericea* Massée 1912 - *Pseudohaespora sericifera* Locquin, *Bull. Soc. Mycol. France* 68: 169, 1952 - *Lepiota sericifera* (Locq.) Locquin, *Friesia* 5: 294, 1956 - *Lepiota sericata* Kühner & Romagnesi, *Fl. Anal. Champ. Sup.*: 405 (nom. inv.) - *Sericeomyces sericatus* (Kühn. & Romagn.) Heinem., *Bull. Jard. Bot. Natl. Belgique* 48: 404, 1978 (nom. inv.) - *Leucoagaricus sericeus* (Cool) Bon & Boiffard, *Doc. Mycol. (Lille)* 35: 40, 1979.

Materiale studiato: Sardegna meridionale, prov. Cagliari, dintorni di Capoterra, 3.xii.1989, M. Contu 89:446.

La situazione nomenclaturale di questo taxon è, come potrà notarsi dalla congerie di nomi riportata in sinonimia, piuttosto complessa. Il binomio scelto è, comunque, quello adottato da Bon & Boiffard (1979, cit.) i quali hanno studiato materiale olandese. *S. sericeus* è il capostipite di un gruppo di piccole specie bianche caratterizzate dai cheilocistidi a profilo lageniforme. All'interno di questo gruppo esso risulta abbastanza comodamente determinabile a causa delle spore subfusiformi. In Sardegna si raccoglie, ma raramente, in località erbose aperte, a volte anche nella radure erbose delle pinete litorali.

#### 5. *Sericeomyces medioflavoides* (Bon) Contu, comb. nov.

Basionimo: *Leucoagaricus medioflavoides* Bon, *Doc. Mycol. (Lille)* 24: 44, 1976.

Materiale studiato: Sardegna centro-meridionale, prov. Cagliari, dintorni di S. Sperate, in un prato, M. Contu, 4.xii.1988.

Bon ha descritto questa specie sulla base di raccolte fatte in Germania. *S. medioflavoides* si riconosce per la taglia gracile, il cappello e la base del gambo con toni giallastri, le piccole spore amigdaliformi ed i cheilocistidi clavati. Recentemente Grilli (1990: 3-10) ha descritto un "*Leucoagaricus medioflavoides* var. *deceptivus* Grilli" differente dal tipo per la taglia più slanciata, il rivestimento pileico viscido, le lamelle subcollariate e le spore maggiori (fino a 8.8 x 4.2µm). A mio avviso questa potrebbe essere addirittura una buona specie ma, fino ad ora, nessuna raccolta dalla

Sardegna mi è nota. Gli esemplari da me studiati differivano dal tipo solo per le spore di taglia maggiore ma nel resto erano macro e micromorfologicamente identici. Come buona parte delle entità congeneri *S. medioflavoides* vegeta, in Sardegna, in località erbose e fuori dai boschi, habitat differente da quello indicato nella descrizione originale, ma non inusuale per una specie del genere.

6. *Sericeomyces serenus* (Fr.) Heinem., *Bull. Jard. Bot. Natl. Belgique* 48: 403, 1978.

= *Agaricus serenus* Fries, *Hymenomyc. Eur.*: 38, 1874 - *Lepiota serena* (Fr.) Sacc., *Syll. Fung.* 5: 52, 1887 - *Pseudohaespora serena* (Fr.) Locquin, *Bull. Soc. Mycol. France* 68: 169, 1952 - *Leucoagaricus serenus* (Fr.) Bon & Boiffard, *Bull. Soc. Mycol. France* 90: 301, 1974.

Materiale studiato: Sardegna centrale, prov. Oristano, Monte Arci, loc. "Acquafredda", in un prato, l.x.1989, M. Contu 89/157.

L'elemento caratterizzante questa specie è dato dalla forma clavata dei cheilocistidi i quali, nelle mie raccolte, presentavano la sommità incrostata di cristalli amorfi. Le forme a centro del cappello giallastro possono facilmente essere confuse con *S. medioflavoides* il quale, tuttavia, ha spore usualmente minori e cheilocistidi a sommità priva di incrostazioni. *S. serenus* sembra essere solo il capostipite di un complesso di specie che sono state studiate, nelle regioni mediterranee, principalmente da Malençon & Bertault (1970).

7. *Sericeomyces subglobisporus* Contu, spec. nov.

*Pileus* 1.3-2.5cm latus, haud carnosus, explanatus, in medio depressus, haud umbonatus, sericeus, albus, ad medium leviter flavus, striis destitutus. Lamellae confertae, tenues, libero-collariatae, haud ventricosae, albae et immutabiles, acies concolor. Stipes 3-4.5 x 0.3-0.5cm, cylindraceus vel subclavatus, glaber, pileo concolor, sericeus. Annulus persistens, superus, albus, exstriatus. Caro fragilis, inconspicua, alba; inodora et insapora. Sporarium pulvis alba. Sporae 6.7-9 x 6-6.7µm, hyalinae, dextrinoideae, endosporium in azureo cresylico metachromaticum, globosae vel subglobosae vel late ovoideae, apiculatae, leves, mono-guttatae, poro destitutis. Basidia 22.5-33 x 9.7-11.2µm, tetraspora, clavata, sine fibula basalis. Subhymenium cellularis. Pleurocystidia nulla. Cheilocystidia 20.2-46.5 x 9-12.7µm, lageniformia vel subfusiformia, pedunculata, ad apicem saepe levissime incrustatae. Pilei cutis ex hyphis cylindraceis intertextis constituta, suprapellis in ixocute efformata. Fibulae nullae. Habitatio in herbidis locis pinetorum litoraneis, sat rara. Autumno. Typus: Sardinia meridionalis, prov. Caralis, ad locum vulgo dictum "Villasimius", 27.xi.1989.M. Contu 89/362 (CAG).

Cappello 1.3-2.5cm, poco carnoso, spianato, depresso al centro, non umbonato, margine non striato, non cannellato e privo di resti di velo; cuticola secca, glabra, nuda, sericea, bianca, verso il centro con lievi sfumature giallastre. Lamelle sottili, strette, piuttosto fitte, libere, con evidente collarium, bianche, immutabili. Gambo 3-4.5 x 0.3-0.5cm, cilindrico o subclavato, talora sfinato verso la base, glabro, liscio, sericeo, concolore al

cappello; farcito. Carne esigua, fragile, bianca, immutabile; odore e sapore nulli.

Sporata bianca.

Spore 6.7-9 x 6-6.7 $\mu$ m, ialine, destrinoidi, metacromatiche, globose o subglobose, alcune largamente ovoidali, con una grande goccia oleosa centrale, apicolo evidente, lisce. Basidi 22.5-33 x 9.7-11.2 $\mu$ m, tetrasporici, clavati, senza fibbia basale. Subimenio cellulare. Pleurocistidi assenti. Cheilocistidi 20.2-46.5 x 9-12.7 $\mu$ m, lageniformi o subfusiformi, pedunculati, a parete sottile, sommità leggermente incrostata di cristalli (forse sabbia?). Rivestimento pileico composto da ife intrecciate, cilindriche o clavate, suprapellis una ixocutis di ife molto gracili. Giunti a fibbia assenti.

Habitat: in località erbose nelle pinete litorali, piuttosto rara. Autunno. Finno ad ora conosciuta solamente dalla Sardegna.

Materiale studiato: Sardegna meridionale, prov. Cagliari, loc. "Villasimius", in una radura erbosa di una pineta del litorale, in terreno calcareo e sabbioso, 27.xi.1989, M. Contu 89 362 (typus, CAG).

La presenza di cheilocistidi lageniformi fino a subfusiformi indica l'appartenenza di questo nuovo taxon alla stirpe di *S. sericeus* ma nessuna specie citata da Bon (1981), Heinemann (1978), Moser (1986), etc. le corrisponde. *S. subglobisporus* è ben caratterizzato dalla forma globosa o subglobosa delle sue spore ma anche dalla taglia gracile, l'anello persistente ed infine dal cappello dotato di sfumature giallastre al centro. Quest'ultimo carattere potrebbe favorire confusioni con *S. medioflavoides* (e taxa vicini) ma questo, tuttavia, ha spore amigdaliformi e cheilocistidi clavati. Fra le specie a cheilocistidi lageniformi *S. sericatellus* possiede basidi bisporici e spore lungamente amigdaliformi mentre *S. sericeus* ha spore subfusiformi, di maggiori dimensioni, ben diverse.

### 8. *Sericeomyces cylindrosporus* Contu, spec. nov. ad int.

= *Leucoagaricus menieri* sensu Singer, *Mycopathol. Mycol. Appl.* 34: 431, 1968, non Auct. pl. (Menier, Bon & Boiffard, etc.).

Materiale studiato: Sardegna meridionale, prov. Cagliari, loc. "Poggio dei Pini", 4.xii.1989, leg. V. Mendolia (erb. Mendolia).

Alcuni esemplari di questa entità, corrispondenti al *Leucoagaricus menieri* sensu Singer non Auct. pl. (basato su raccolte sudamericane), sono stati da me studiati grazie alla cortesia di V. Mendolia il quale è solito raccogliere questa specie da diversi anni. L'esame microscopico ha posto in luce delle grandi spore subcilindriche paragonabili a quelle di *Amanita curtipes* Gilbert, completamente diverse da quelle del taxon di Menier. Sembra, quindi, che il fungo descritto dall'Uruguay da Singer sia una specie diversa ma ben distinta meritevole di un nuovo nome; questo è qui proposto solo provvisoriamente, in attesa di raccolte personali. Nessuna specie del genere *Sericeomyces* possiede simili spore e, pertanto, l'identificazione di *S. cylindrosporus* non dovrebbe essere troppo difficile, tenuto anche conto dell'aspetto degli esemplari sardi, abbastanza facilmente scambiabili, sul

terreno, per una piccola amanita del complesso *curtipes* (della quale, evidentemente, non hanno le spore amiloidi e la trama lamellare bilaterale ne' la volva, etc.).

### 9. *Sericeomyces subvolvatus* (Malençon & Bertault) Contu, comb. nov.

Basionimo: *Lepiota subvolvata* Malençon & Bertault, *Acta Phytotax. Barc.* 8: 37, 1971.

= *Leucoagaricus subvolvatus* (Mal. & Bert.) Bon, *Doc. Mycol. (Lille)* 27:28: 22, 1977.

Questa rimarchevole entità, da me non ancora vista con certezza nell'Isola, è stata segnalata per la stessa dal dr. Alessio sulla base di raccolte fatte nell'Oristanese, nella Sardegna centrale (dune di "Is Arenas", cfr. Alessio, 1981: 16-19). Essa è caratterizzata soprattutto dalla presenza di una pseudovolva alla base del gambo, che si presenta marcatamente bulboso, come posto in risalto dalle fotografie pubblicate dallo stesso Alessio. Bon (1981: 53) colloca *S. subvolvatus* nel suo sottogenere *Sericeomyces* di *Leucoagaricus* affermando, nel contempo, che esso presenta notevoli affinità con *L. medullatus* (Fr.) Bon sensu Boudier, che egli ha studiato dall'erbario Boudier (Bon, 1977). Recentemente, sulla terra nuda costituita da calcare del triassico è stata raccolta un'entità (M. Contu 89 461, 22.xii.1989, Orto Botanico di Cagliari) paragonabile al taxon di Malençon & Bertault ma differente per l'anello molto più spesso e persistente, i cheilocistidi largamente clavati e la carne un poco arrossante.

## CONCLUSIONE

Come potrà notarsi dall'esposizione precedente in questa trattazione, da considerarsi, come già detto, ancora provvisoria, è stato adottato un concetto generico di *Sericeomyces* leggermente più ampio di quello originariamente proposto da Heinemann (1978, cit.) Infatti vengono considerate come appartenenti a *Sericeomyces* anche alcune specie provviste di un rivestimento pileico ad ife un poco rialzate, non esattamente arrangiate in cutis. Questo emendamento non sembra, tuttavia, in contrasto con l'originaria concezione di Heinemann poichè lo studioso belga, già nella trattazione originale, ammetteva nel genere, oltre a specie dotate di rivestimento pileico ad ife parallele o intrecciate, anche alcune altre entità aventi lo stesso subtricodermico (cfr. *S. serenus* var. *erioderma* e *S. gauguei*, fra le altre) ma molto prossime, per molti caratteri, a *S. serenus*. Sembra, dunque, che sia necessario un'emendamento dei limiti generici di *Sericeomyces*, nel senso che a tale genere vadano ascritte anche alcune specie presentanti un'epicute subtricodermica, sia pure a struttura differente dal vero e proprio tricoderma che caratterizza i *Leucoagaricus* e molte *Lepiota*. Una tale concezione, lo si ripete, non può considerarsi del tutto nuova perchè essa si deduce agevolmente dal contesto dell'originaria comunicazione del prof. Heinemann (1978, più volte cit.) ad avviso del quale potrebbe essere inclusa nel suo genere addirittura la *Lepiota cygnea* sensu Huijsman (1943) la quale sarebbe caratterizzata da un rivestimento

pileico con diversi sferociti e dalle ife provviste di giunti a fibbia, due caratteri che contrastano con i limiti del suo genere specificati nella diagnosi originale. In attesa di un amendamento ufficiale di *Sericeomyces* ad opera del prof. Heinemann e di una sistemazione in sezioni delle varie entità riterrei opportuno proporre uno provvisorio che è così concepito:

*Sericeomyces* Heinem. emend. Contu

Rivestimento pileico ad ife parallele, intrecciate o leggermente rialzate.  
Typus emendationis: *Sericeomyces erioderma* (Mal.) Contu

Sezione 1- *Sericeomyces*

= *Lepiota sectio Sericellae* Kühner ex Wasser - *Leucogaricus sectio Sericelli* (Kühner) Bon & Boiffard (nom. inv., basionimo invalido).

Rivestimento pileico una cutis di ife subparallele o intrecciate, distese.  
Typus: *S. serenus* (Fr.) Heinem.

Species incluse: *S. sericeus* (Cool) Contu, *S. sericatellus* (Mal.) Bon, *S. medioflavoides* (Bon) Contu, *S. subglobisporus* Contu, *S. subvolvatus* (Mal. & Bert.) Contu nonché diverse specie extraeuropee come *S. viscidulus* Heinem., ed altre.

Sezione 2- *Eriocutis* Contu, sect. nov. ad int.

Rivestimento pileico ad ife parzialmente erette al disco. Typus: *S. erioderma* (Mal.) Contu.

Specie incluse: *S. menieri* (Sacc.) Contu, forse anche *A. amyloporus* (Mal.) Heinem., *S. gauquei* (Bon & Boiff.) Heinem.

Il sezionamento proposto dovrebbe essere strutturato meglio tenendo conto di alcuni altri caratteri micromorfologici (struttura dell'ipoderma e della trama lamellare). Come potrà notarsi di, alcune specie menzionate da Heinemann nella trattazione originaria di *Sericeomyces* non si è dato qui alcun conto. La loro posizione tassonomica sembra complessa e l'assimilazione al genere in oggetto ancora dubbia. Fra queste sembrano non entrare nei limiti generici di *Sericeomyces* soprattutto "*S. violaceus*" Heinem. (1978: 406) a causa delle spore colorate ("brunneo-purpureae"), *Lepiota parvannulata* (Lasch) C. Gill., per le spore non metacromatiche in Bleu di Cresile e *Lepiota cygnea* sensu Huijsman (1943) la quale possiede giunti a fibbia e sferociti nel rivestimento pileico (caratteri tipici del genere *Cystolepiota* Sing., nel quale la colloca, ad es. Moser (1986: 252). D'altra parte la specie descritta da Huijsman sembra differente da quella correntemente intesa dagli AA (cfr. per tutti Bon, 1981: 66) i quali ne fanno un *Leucocoprinus* della sezione *Leucocoprinus* (spore dotate di poro germinativo). Invece sembrano entrare nel genere alcune entità a me non ancora ben note come *S. cygneoaffinis* (Pilát) Heinem. e *S. amyloporus* (Mal.) Heinem. In ogni caso, comunque, sarebbe a mio avviso poco opportuno considerare come appartenenti al genere di Heinemann anche specie con spore non metacromatiche o con ife fibbiate poichè in tal modo si finirebbe per trasformare *Sericeomyces* in un genere dai limiti confusi ed

incerti, come a suo tempo si fece per *Pseudobaeospora* Sing. (emend. Locquin), vanificandone così l'istituzione.

## RINGRAZIAMENTI

Per i preziosi suggerimenti e per la revisione del manoscritto ringrazio vivamente i sigg. profs M. Bon e P. Heinemann.

## LETTERATURA

- ALESSIO C.L., 1981 - Specie nuova per la Sardegna: *Leucoagaricus subvolvatus* (Malençon et Bertault) Bon. *Natura e Funghi* 6: 16-19.
- BON M., 1977 - Les lépiotes de l'herbier Boudier au Muséum national d'Histoire Naturelle de Paris. *Doc. Mycol. (Lille)* 27:28: 11-22.
- BON M., 1981 - Clé monographique des "Lépiotes" d'Europe. *Doc. Mycol. (Lille)* 43: 1-77.
- BON M. et BOIFFARD J., 1972 - Lépiotes des dunes vendéennes. *Bull. Soc. Mycol. France* 88: 15-28.
- BON M. et BOIFFARD J., 1974 - Lépiotes de Vendée et de la Côte atlantique française (I). *Bull. Soc. Mycol. France* 90: 287-306.
- BON M. et BOIFFARD J., 1979 - Novitates. *Doc. Mycol. (Lille)* 35: 40.
- FRIES E.M., 1821 - *Systema mycologicum*. Lundae, 520p.
- GRILLI E., 1990 (1989) - Agaricales nuove o interessanti dell'Italia centrale. *Leucoagaricus medioflavoides* var. *deceptivus* Grilli var. nov. *Mic. Veg. Medit.* 4: 3-10.
- HEINEMANN P., 1978 - *Sericomyces*, genre nouveau de *Leucocoprineae* (*Agaricaceae*). *Bull. Jard. Bot. Natl. Belgique* 48: 399-407.
- HORAK E., 1964 - Notes sur *Pseudobaeospora* Sing. (1942) excl. *Lepiota* sect. *Sericellae*. *Rev. Mycol. (Paris)* 29: 72-81.
- HUIJSMAN H.S.C., 1943 - Observations sur le "genre" *Lepiota*. *Meded. Ned. Myc. Vereniging* 28: 1-60.
- KUHNER R., 1936 - Recherches sur le genre *Lepiota*. *Bull. Soc. Mycol. France* 52: 175-238.
- KUHNER R. et ROMAGNESI H., 1953 - *Flore Analytique des champignons supérieurs*. Paris, 554p.
- KUHNER R., 1980 - Les Hyménomycètes agaricoïdes (*Agaricales*, *Tricholomatales*, *Pluteales*, *Russulales*). *Bull. Soc. Linn. Lyon*, num. spéc. 44.
- LOCQUIN M., 1952 - Sur la non-validité de quelques genres d'*Agaricales*. *Bull. Soc. Mycol. France* 68: 165-169.
- MALENÇON G. et BERTAULT R., 1970 - *Flore des champignons supérieurs du Maroc*. I. Rabat, 601p.
- MOSER M., 1978 - *Die Röhrlinge und Blätterpilze*. In: GAMS W., *Kleine Krypt. Flora*, Bd IIb/2. 4° Auflage. Stuttgart, 532p.
- MOSER M., 1983 - *Die Röhrlinge und Blätterpilze*. In: GAMS W., *Kleine Krypt. Flora*, Bd IIb/2. 5° Auflage. Stuttgart, 533p.
- MOSER M., 1986 - *Guida alla determinazione dei funghi*. I. 2° Ed. Trento, 565p.

- SINGER R., 1951 (1949) - *The Agaricales in modern taxonomy*. 1° Ed. Lilloa 22: 1-832.
- SINGER R., 1975 - *The Agaricales in modern taxonomy*. 3° Ed. Vaduz, 912 p.
- SINGER R., 1986 - *The Agaricales in modern taxonomy*. 4°Ed. Koenigstein, 981 p.

## FRUITING IN *DICHOMITUS SQUALENS* (KARST) REID

T.T.T. PHAM\*, A.-M. SLEZEC\*\* and E. ODIER\*(<sup>1</sup>)

\* Laboratoire de Microbiologie, Centre de  
Biotechnologies Agro-Industrielles, INRA, 78850  
Thiverval-Grignon, France

\*\* Laboratoire de Cryptogamie, C.N.R.S., Muséum  
d'Histoire Naturelle, 12 rue Buffon, 75005 Paris,  
France

(<sup>1</sup>) present address: 8 chemin Scribe, 92190 Meudon,  
France

**ABSTRACT** - *Dichomitus squalens* (Karst) Reid (Syn.: *Polyporus anceps* Peck) produces fruiting bodies on malt extract agar or on wood blocks at 28°C in controlled conditions of humidity and light. The life cycle of this fungus is of the haploid dicaryotic type with a bifactorial (tetrapolar) interfertility system. Meiosis takes place according to the classical schemes in homobasidiomycetes resulting in the formation of four basidiospores per basidia. Basidiospores are predominantly uninucleate and germinate to produce uninucleate mycelium which is unable to fruit. Compatible pairings result in dicaryons with clamp-connections at every septum.

**RÉSUMÉ** - *Dichomitus squalens* (Karst) Reid (Syn.: *Polyporus anceps* Peck) fructifie en milieu gélosé à l'extrait de malt en boîte de Pétri ou sur éprouvettes de bois en conditions stériles à 28°C dans des conditions contrôlées d'humidité et de lumière. Le cycle de ce champignon est du type haploïde/dicaryotique avec un système d'interfertilité bifactoriel (tétrapolaire). La méiose a lieu conformément aux schémas classiquement observés chez les homobasidiomycètes avec formation de quatre basidiospores par baside. Les basidiospores sont majoritairement uninucléées et germent pour former un mycélium uninucléé incapable de fructifier. Les confrontations compatibles produisent des dicaryons comportant des anses d'anastomose à chaque article.

**KEY WORDS** : *Dichomitus squalens* - interfertility system - fruiting.

### INTRODUCTION

*Dichomitus squalens* (Karst) Reid (Syn = *Polyporus anceps* Peck) belongs to Homobasidiomycetes, Polyporaceae. This fungus has been studied for its ability to degrade lignin in wood (Chang et al., 1980; Blanchette et al., 1988) and in straws (Zadrazil & Brunnert, 1982). Among the white rot fungi, this species degrades lignin relatively fast with somehow limited degradation of cellulose and hemicellulose when grown in suitable conditions (Agosin & Odier, 1985). *D. squalens* produces a laccase presumably involved

in lignin degradation (Petrovski et al., 1980). No lignin peroxidase has been detected in this species (Agosin, unpublished). Several extracellular enzymes involved in the degradation of cellulose and xylans by this fungus have been purified and characterised; they include endoglucanases (Rouau & Foglietti, 1985), cellobiohydrolases (Rouau & Odier, 1986), xylanases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (Brillouet & Moulin, 1985) and the pattern of xylan degradation has been characterised (Agosin et al., 1988).

The first description of this species was by Peck in 1895 who observed fruiting bodies growing on stump of *Tsuga canadensis* Carr. In 1929, Mounce reported the mating system of *D. squalens* to be unifactorial. In 1939, Baxter & Manis defined more precisely the taxonomic position of *Polyporus anceps* compared to *Polyporus ellisianus* (Murr.) Sacc. and Trott. Fruiting was described by Long & Harsch (1918), Baxter & Manis (1939), Badcock (1944) and Nobles (1948). Nobles et al. (1957) reported that the mating system in *P. anceps* is bifactorial. This species was renamed *Trametes squalens* then *D. squalens* in relation with the high degree of branching of the hyphae.

Basic research concerning *D. squalens* requires better information concerning its life cycle and its interfertility system. Accurate determination of fruiting conditions is necessary for the development of a laboratory method for fruiting in sterile conditions. In this study the life cycle of *D. squalens* is characterised and different conditions allowing fruiting are evaluated for their possible use in classical genetics in this species.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Microbial strain

*D. squalens* (Karst) Reid (Syn.: *Polyporus anceps* Peck) was obtained from the Centraalbureau Voor Schimmelcultures (Baarn, Netherlands) (CBS 432-34).

### 2. Cultivation methods

Culture media include: 1/ Liquid medium with malt extract 2% (w/v) (unless stated otherwise) with 0.2% (w/v) yeast extract, pH 5 (designated liquid malt extract); 2/ Malt extract agar 1.5% containing 3% malt extract. Media for fruiting include in addition to malt extract agar: 1. malt extract (5%) agar (1.5%) on the surface of which is deposited a wood block (*Pinus* sp.) (Lucas & Fougereousse, 1982); 2. A wood meal supplemented medium (*Picea sitchensis* (Bong) Carr.) as described by Holt et al. (1983).

All media containing malt extract were sterilised by autoclaving for 20 min at 120°C. The wood meal medium was autoclaved 25 min at 120°C. Wood blocks (10 x 2.5 x 2.5 cm) were streaked then autoclaved for 40 min at 120°C.

Media for fruiting experiments were inoculated with a mycelium freshly grown in liquid malt extract (not longer than 1 week at 34°C). Cultures were incubated at 34°C in the dark until colonisation was complete.

Cultures on microscope slides were run as follows: a drop of liquid malt extract was deposited aseptically on a sterile slide, then inoculated with a small amount of mycelium. Incubation took place in a humid sterile chamber at 28°C for 65-68 h. Mycelium was stained by Giemsa (see below).

The three basic procedures for fruiting using malt extract agar, wood blocks and the wood meal media were as follows: malt extract agar: the malt extract agar medium was poured (30 ml) in Petri dishes (9 cm diameter) and inoculated with a mycelium fragment in the centre. Light when used was obtained with Sylvania GroLux lamps (210-270 lux at the level of cultures). Incubation was at 18-24°C (laboratory temperature). Humidity was maintained by addition of liquid malt extract at regular intervals. Wood blocks: the method used was according to Lucas & Fougerousse (1982), 250 ml of 5 % malt extract 1.5 % agar media was poured in 1 litre flasks. After inoculation and colonisation of the whole surface of the agar (1 week), a wood block was deposited onto the agar and incubation proceeded for another 15 days after which mycelium had colonised the wood block. Wood blocks were removed and mycelium on the surface was scrapped off. Wood blocks were introduced into a wood box (90 cm x 50 cm x 40 cm, 40 blocks per box) containing vermiculite. The wood box was covered by a transparent plastic film. Incubation was at ambient temperature with light (9 h light and 15 h darkness) or darkness as specified. Moisture was maintained by addition of water to the vermiculite. Boxes were opened 30 min for aeration every day. Wood meal (*Picea sitchensis*): the wood meal medium (medium 1 according to Holt et al., 1983) was distributed in 250 ml conical flasks (50 ml per flask). After inoculation and colonisation of the culture (around 15 days), water was added to compensate for evaporation. Incubation proceeded at ambient temperature as specified: either with light (9h / 15 h) or with light (12 h / 12 h) or in darkness. Cultures were aerated every week with a stream of water-saturated sterile air and 2 ml water was added in order to compensate for evaporation.

Lyophilisation of basidiospores was done in milk with 10 % inositol (w/v) as a protective agent.

### 3. Interfertility experiments

Mono-basidiospore isolates were obtained by allowing basidiospores to germinate on malt extract agar at 16°C for 24h. Germlings were picked with a steel nib and transferred on malt extract agar. After 2-3 weeks incubation, the absence of clamp-connections in hyphae was verified by microscopic observation. Pairings were subcultured on malt extract agar and incubation proceeded at 34°C during 2-4 weeks. Any formation of dicaryons with clamp-connections was observed under the microscope.

### 4. Cytological observations

Routine microscopic observations were in Congo red (1 g Congo red; 100 ml concentrated ammonia, Kühner, 1938). Nuclei were stained according to Giemsa using the following procedure adapted from Kühner (1949). Mycelium was grown on a microscope slide as described above. It was fixed

in absolute ethanol (20 min), rinsed with water (20 min), hydrolysed with HCl 1 N for 10 min and rinsed in running water (10 min) followed by successive immersion in absolute ethanol (60 min), ethyl ether (5 min), absolute ethanol (5 min) then rinsed in water (5 min), Giemsa R solution (35 drops Giemsa R, 30 ml distilled water). For staining of basidiospores, basidiospores suspensions were spread on a microscope slide, then dried. The Giemsa stain procedure was applied starting with hydrolysis with HCl.

Hymenium was stained according to Lu (1962) as modified by Zickler (1973).

Table 1: Main characteristics of Fruiting in *Dichomitus squalens*<sup>1</sup>.  
Tableau 1: Principales caractéristiques des fructifications de *Dichomitus squalens*.

Fruiting characteristics	Fruiting method <sup>2</sup>		
	malt extract agar	Wood block	Wood meal
delay (weeks) before fruiting <sup>3</sup>	3.5 ± 0.5	11.5 ± 2.5	11 ± 4
nb fruiting cult./ total nb of cult.	30/45	6/40	49/50
fruiting bodies per cult.	4.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5
fruiting body diam.	1.5 ± 0.5	3 ± 0.5	1.5 ± 0.5
nb basidiospores per cult. and per 24 h	1.5 10 <sup>7</sup> ± 0.5	1.6 10 <sup>6</sup> ± 1.4	7.5 10 <sup>5</sup> ± 0.25

1: data are mean and standard deviation.

2: culture conditions are as described in Materials and methods; photoperiod is 9h light and 15h darkness.

3: delay for fruiting is defined as the time between inoculation and formation of fruiting bodies with visible pores.

## RESULTS

### 1. Fruiting conditions experiments

Fruiting was examined in mycelia grown on malt extract agar, wood blocks and wood meal. All three conditions allowed fruiting in suitable conditions of humidity and light (see below).

The primordium appears as white thick callus. Adult fruiting bodies show pores visible to the naked eye more or less regularly on the surface. Characteristics of the fruiting bodies are shown in table 1. The frequency of cultures giving rise to fruiting bodies was variable according to the methods, the wood block method being less efficient than malt extract agar and the wood meal method. The malt extract agar method was the fastest (3.5 weeks) and resulted in the formation of significantly more basidiospores than the two other methods.

The effects of culture medium composition and light on fruiting were investigated in experiments using the three basic fruiting procedures.

No fruiting bodies developed in absence of light in any fruiting method (Tab. 2). The characteristics of fruiting bodies (as described in tab. 1) were the same whether the photoperiod was 9 h or 12 h light.

Table 2: Effect of light on fruiting in *Dichotomus squalens*.

Tableau 2: Effet de la lumière sur la fructification chez *Dichotomus squalens*.

Fruiting method	Fruiting bodies formation		
	darkness	9h light	12h light
malt extract agar	0	+	ND
Wood blocks	0	+	ND
Wood meal	0	+	+

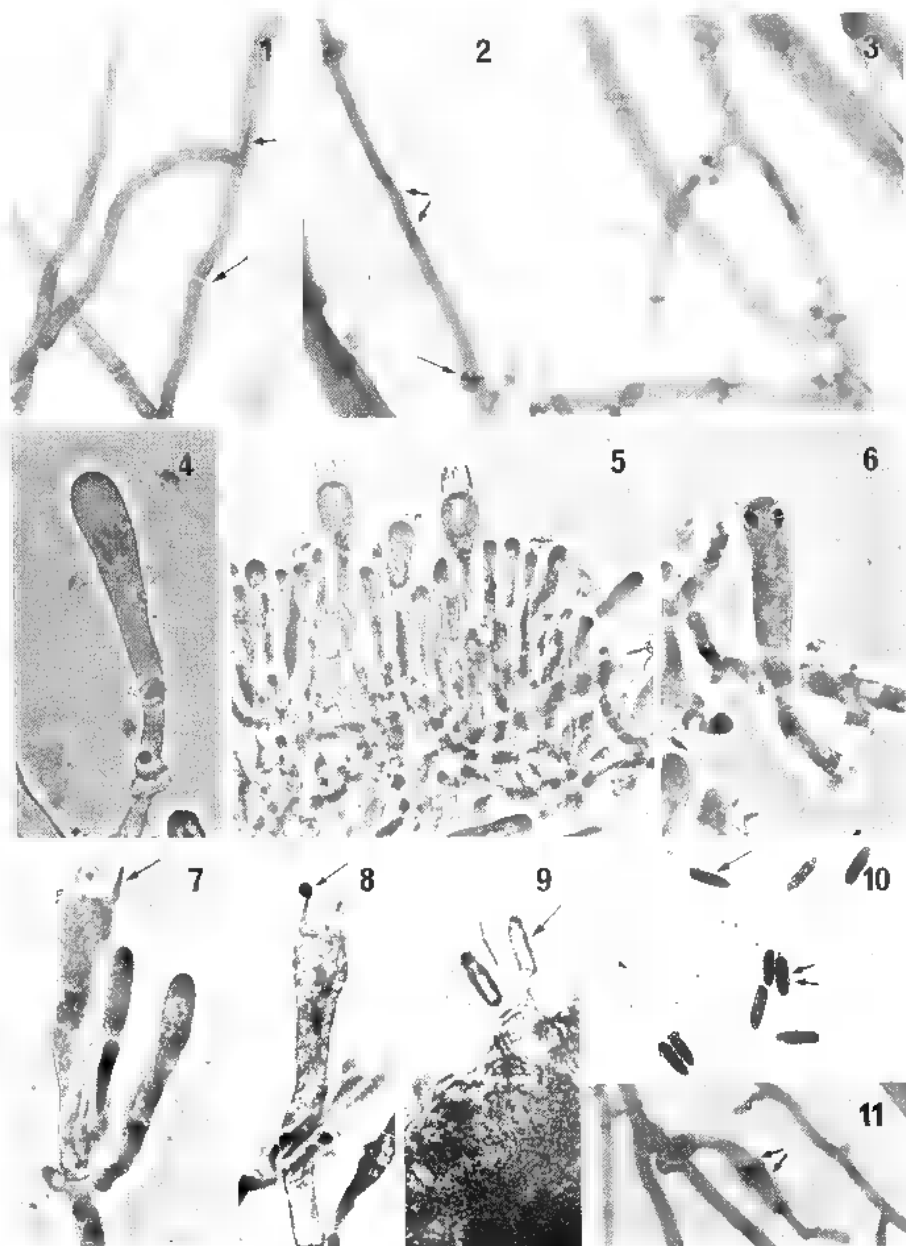
0 = vegetative mycelium, + = formation of fruiting body with visible pores, ND = not determined.

## 2. Life cycle, cytological observations, interfertility system

The dicaryotic strain CBS 432-34 showed cells of 15  $\mu\text{m}$  and 35  $\mu\text{m}$  in length and 0.9  $\mu\text{m}$  and 1.3  $\mu\text{m}$  in diameter. The two nuclei were at an equal distance from the septa and close to each other (Fig. 2) with the exception of apex cells in which nuclei were near the apex. Binucleate chlamydospores were also observed (Fig. 11). Branching of mycelium was observed with anastomosis (Fig. 3). In the hymenium, apical cells differentiated into binucleated basidia. Caryogamy was immediately followed by meiosis (Fig. 4,5,6). At the end of the second meiotic division, the number of nuclei was four and the extremity of basidia developed sterigmata (Fig. 7). Haploid nuclei migrated toward the four basidiospores formed at the extremity of sterigmata (Fig. 8,9). The size of basidia was 6-8  $\mu\text{m}$  while basidiospores were 2-3  $\mu\text{m}$  x 7-10  $\mu\text{m}$ . Giemsa staining established that 90% of basidiospores were mononucleate, the rest being binucleate or empty (Fig. 10).

Twenty monobasidiospore isolates were examined by Giemsa staining (Fig. 1): all isolates were uninucleate and showed septa with a septal pore (dolipore). No clamps were observed in monobasidiospore isolates (homocaryons). Certain hyphal cells swelled considerably in comparison with adjacent cells, the protoplast contracted and a thick cell wall developed resulting in the formation of an asexual spore (chlamydospore).

Monobasidiospore isolates were combined with one another in all possible combinations. The formation of dicaryons showing clamp connections was examined in crossings. Results (Tab. 3) establish the existence of four classes of homocaryons in the progeny of the original dicaryon. Formation of dicaryons showing clamp connections showed no deviation from a tetrapolar mating system: a given homocaryon was able to form a dicaryon with clamp connections with all homocaryons of the compatible class and with no homocaryon of non compatible classes. However not all dicaryons were able to form fruiting bodies able to generate viable basidiospores (data not shown).



	1	19	3	4	6	7	10	15	16	2	8	9	11	12	13	14	17	18	20	5	12	13	
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	8
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	9
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	11
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	12
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	14
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	17
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	18
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	20
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13

Table 3: Results of crossing experiments with homocaryons of *Dichomitius squalens*. + : presence of clamp connections, - : absence of clamp connections.  
 Tableau 3: Résultat des croisements entre homocaryons de *Dichomitius squalens*. + : présence d'anses d'anastomose, - : absence d'anses d'anastomose.

*Dichomitius squalens* at different states of its cycle: 1. Uninucleate homocaryotic cell with unclamped septa (Giemsa); 2. Binucleate dicaryotic cell with clamp connections (Giemsa); 3. Acute-angled branching of dicaryotic hyphae (Giemsa); 4. Basidium in prophase I (Lu stain). 5. Hymenium (Lu stain); 6. Basidium in metaphase II (Lu stain); 7. Last stage of the second division of meiosis, the basidium contains four nuclei, sterigmata are apparent (Lu stain); 8. Basidiospore initiation at the apex of sterigmata (Lu stain); 9. Basidium showing four basidiospores (Congo red stain); 10. Uninucleate basidiospores with one binucleate basidiospore (Giemsa); 11. Binucleate chlamydospore in formation (Giemsa).

Cycle de reproduction de *Dichomitius squalens*. 1: Cellule uninucléée, sans anse d'anastomose aux cloisons (coloration au Giemsa); 2: Cellule binucléée avec anses d'anastomoses (coloration au Giemsa); 3: Ramification à angle aigu d'une hyphe dicaryotique; 4: Baside en Prophase I de méiose (coloration de Lu); 5: Hyménium (coloration de Lu); 6: Baside en Métaphase II de méiose; 7: Fin de méiose II, la baside contient quatre noyaux, les stérigmates sont en place (coloration de Lu); 8: Différenciation de la basidiospore à l'apex du stérigmate (coloration de Lu); 9: La baside porte les quatre basidiospores (coloration au rouge Congo). 10: Basidiospores uninucléées (coloration au Giemsa); 11: Formation de chlamydospore binucléée (coloration au Giemsa).



Microscopic observation failed to reveal heterocaryons in incompatible pairings in which the clamps could not fuse with the subterminal cell of the hypha.

Microscopic examination verified the presence of two nuclei in all mycelia in pairings forming connection clamps (Fig. 2,3).

Up to 88 % of fresh basidiospores could germinate in liquid malt extract as shown by microscope examination (Tab. 4). The germination rate was only around 5% in the same medium with agar. Because of asynchronous germination and clumping of mycelia, initiation of germination in liquid medium followed by inclusion in a solid medium was not reliable for the generation of mono-basidiospore isolates.

Basidiospores could be stored in a dry state at 4°C or lyophilised with constant germination rate while storing in a liquid medium at low temperature resulted in a decrease of germination rate.

Table 4: Germination of basidiospores of *D. squalens* in different cultivation conditions.

Tableau 4: Germination de basidiospores de *D. squalens* suivant différentes méthodes.

Cultivation condition	Germination rate (24°C)	Incubation time
3% malt extract (liquid medium)		
fresh basidiospores	88.3 ± 1.8	3 days
lyophilized basidiospores <sup>1</sup>	72.6 ± 7.2	4 days
3% malt extract agar	2.9 ± 0.4	6 days

1. lyophilization as described in Materials and Methods; lyophilization in sucrose instead of inositol yielded only 8.2 germination rate.

## DISCUSSION

The life cycle of *D. squalens* is of the haplodicycaryophasic type with a tetrapolar interfertility system (Burnett, 1975; Fincham et al., 1979). Our results are in accord with previous report by Nobles et al. (1957) and in contradiction with Mounce (1929). In this system two loci designated A and B need to be present as different alleles for the morphogenetic sequence characterising a dicaryon to take place. In our study no hemicompatible pairings ( $B = , A \neq$  or  $B \neq , A =$ ) could be recognised. In several species including *Schizophyllum commune*, common B heterocaryons can be observed in which apical cells contain paired nuclei and at cell division a clamp cell is formed and the two nuclei undergo conjugate division. However because septum dissolution cannot take place, the clamp cell fails to fuse with the subapical cell and the daughter cell. Such hemicompatible pairings were not observed in our study and common B crossings were not identified.

The presence of a single nucleus in the vast majority of basidiospores and in all mono-basidiospore isolates establish that mono-basidiospore iso-

lates are homocaryons. Meiosis takes place according to the classical scheme described in other basidiomycetes with the formation of 4 mononucleate basidiospores per basidium (Kühner, 1977). No post-meiotic division was observed in this study, but the existence of a few dinucleate basidiospores could be explained either by a post-meiotic division or by mitosis of a nucleus after migration into the basidiospore (Slezec, 1980). Empty basidiospores could be explained by failure of a nucleus to migrate into the basidiospore or by an loss of the nucleus during staining.

Fruiting within an hymenium is not synchronous as in several *Pleurotus* species from Unbellifers (Slezec, 1986). This is in contrast to *Coprinus* species (Lu, 1967; Manachère & Bastouill-Descollonges, 1982).

Fruiting is best obtained in the malt extract agar method. Baxter & Manis (1939) and Nobles (1948) previously reported fruiting in malt extract agar cultures in *D. squalens*. The cultivation conditions were however not entirely defined. The requirement for light is established in this study in accordance with Baxter & Manis (1939). Fruiting of *D. squalens* on wood meal medium was reported by Badcock (1944) with no quantification of the result. No fruiting on wood blocks was reported according to Baxter & Manis (1939) and Badcock (1944). The results in this study establish that *D. squalens* is able to fruit on wood in controlled conditions with light. The malt agar method is however far more rapid and results in much more basidiospores than conventional fruiting methods using wood blocks or wood meal as a substrate. The malt agar method is simple and asepsis is better ensured than in cultures with wood. This method can be used without problems in genetic studies.

The present study establishes *D. squalens* as a white-rot fungus with a simple life cycle in which all events take place according to classical schemes. In *D. squalens* basidiospores are homocaryons and, in dicaryons, the cells contain constantly two nuclei. This allows genetic studies to be carried out and interpreted simply. This is in contrast with the well studied *Phanerochaete chrysosporium* in which the life cycle is not entirely understood and agreed on.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The Spruce wood meal was provided by G. Janin, C.N.R.F., Nancy. The technical assistance of H. Drouet is gratefully acknowledged.

#### LITERATURE

- AGOSIN E. and ODIER E., 1985 - Solid-phase fermentation, lignin degradation and resulting digestibility of wheat straw fermented by selected white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 397-403.
- AGOSIN E., ROUAU X. and BRILLOUET J.M., 1988 - Fermentation of wheat straw xylan by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Canad. J. Microbiol.* 33: 1050-1063.

- BADCOCK E.C., 1944 - Methods for obtaining fructifications of wood-rotting fungi in culture. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 26: 127-132.
- BAXTER D.W. and MANIS W.S., 1939 - *Polyporus ellisianus* (Murr.) Sacc. & Trott and *Polyporus anceps* PK. in culture: a study of isolates from widely separated forest regions. *Pap. Michigan Acad. Sci. Arts and Letters* 24: 189-195.
- BLANCHETTE R.A., BURNES T.A., LEATMAN G.F. and EFFLAND M.J., 1988 - Selection of white-rot fungi for biopulping. *Biomass* 15: 93-101.
- BRILLOUET J.M. and MOULIN J.C., 1985 - Production, purification, and properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Dichomitus squadens*. *Carbohydrate Res.* 144: 113-126.
- BURNETT J.H., 1975 - *Mycogenetics*. London, John Wiley and sons, 354 p.
- CHANG H.M., CHEN C.L. and KIRK T.K., 1980 - The chemistry of lignin degradation by white-rot fungi (*Polyporus anceps*, *Coriolus versicolor*). In: KIRK T.K., HIGUCHI T. & CHANG H.M., *Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and applications*. Boca Raton, 1: 215-230.
- FINCHAM J.R.S., DAY P.R. and RADFORD A., 1979 - *Fungal Genetics*. Berkeley, Blackwell Scientific Publ., vol. 4, 525 p.
- HOLT C.E., GOCKEL H. and HUTTERMANN A., 1983 - The mating system of *Fomes annosus* (*Heterobasidion annosum*). *Eur. J. Forest Pathol.* 13: 174-181.
- KÜHNER R., 1938 - *Le genre Mycena (Fries), étude cytologique et systématique des espèces d'Europe et d'Amérique du Nord*. Paris, Encyclopédie mycologique, Lechevalier, 710 p.
- KÜHNER R., 1949 - Nouveaux modes d'emploi en mycologie de deux réactifs permettant la coloration en masse des noyaux cellulaires : le carmin acétique et le mélange de Giemsa. *Bull. Soc. Linn. Lyon* 7: 132-136.
- KÜHNER R., 1977 - Variation of nuclear behaviour in the homobasidiomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 68: 1-16.
- LONG W.H. and HARSCH R.M., 1918 - Pure cultures of wood-rotting fungi on artificial media. *J. Agric. Res.* 12: 33-82.
- LU B.C., 1962 - A new fixative and improved propionocarmine squash technique for staining fungus nuclei. *Canad. J. Bot.* 40: 843-847.
- LU B.C., 1967 - Meiosis in *Coprinus lagopus*: a comparative study with light and electron microscopy. *J. Cell Sci.* 2: 529-536.
- LUCAS S. and FOUGEROUSSE M., 1982 - Catalogue des cultures de champignons Basidiomycetes de pourriture du bois. Centre Technique Forestier Tropical, Nancy 873: 32-95.
- MANACHERE G. et BASTOUILL-DESCOLLONGES Y., 1982 - Recherches cyto-physiologiques sur la sporogénèse de *Coprinus congregatus* Bull. ex Fr. ; Introduction à l'étude du déroulement de la méiose en rapport avec les conditions lumineuses et thermiques. *Cryptogamie, Mycol.* 3: 391-408.
- MOUNCE I., 1929 - Notes on sexuality in *Fomes pinicola* (Sw) Cooke, *Fomes roseus* (Fr) Cooke, *Polyporus Tuckahoe* (Gussow) Sacc. et Trott.; *P. resinus* (Schrad) Fr.; *P. anceps* Peck, *Lenzites saepiaria* Fr.; *Trametes protacta* Fr.; *T. suavolens* (L.) Fr. *Canad. Phytopathol. Soc.* 27-28.
- NOBLES M.K., 1948 - Studies in forest pathology. VI Identification of cultures of wood rotting fungi. *Canad. J. Res.* 26: 281-431.
- NOBLES M.K., MACRAE R. and TOMLIN B.P., 1957 - Results of interfertility tests on some species of hymenomycetes. *Canad. J. Bot.* 35: 377-387.

- PECK C.H., 1895 - New species of fungi. *Bull. Torrey Bot. Club* 22: 198.
- PETROSKI R.J., PECZYNSKA-CROCH W. and ROSAZZA J.P., 1980 - Analysis, Production, and Isolation of an Extracellular Laccase from *Polyporus anceps*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1003-1006.
- ROUAU X. and FOGLIETTI M.J., 1985 - Purification and partial characterization of three endo-glucanases from *Dichomitus squalens*. *Carbohydrate Res.* 142: 299-314.
- ROUAU X. and ODIER E., 1986 - Production of extracellular enzyme by the white-rot fungus *Dichomitus squalens* in cellulose containing liquid culture. *Enzyme Microbiol. Technol.* 8: 22-26.
- SLEZEC A.M., 1980 - Introduction à l'étude cytologique du cycle de reproduction de l'Agaricale *Pleurotus eryngii* (DC ex Fr.) Quéf. en culture pure. Thèse 3ème cycle, Lyon, France.
- SLEZEC A.M., 1986 - Les étapes de la méiose chez les Pleurotes des Ombellifères. *Cryptogamie. Mycol.* 7: 235-265.
- ZADRAZIL F. and BRUNNERT H., 1982 - Solid-state fermentation of lignocellulose containing residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. and *Dichomitus squalens* (Karst) Reid. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16: 45-51.
- ZICKLER D., 1973 - La méiose et les mitoses au cours du cycle de quelques Ascomycètes. Thèse Doct. Etat, Orsay, France.



**ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE *TUBER  
MELANOSPORUM* VITT. EN CULTURE ISOLEE ET EN  
ASSOCIATION AVEC DES VITROPLANTS DE *QUERCUS*  
(*Q. ROBUR* ET *Q. PUBESCENS*).**

Ammar BOUTEKRABT et Jean Claude PARGNEY

Laboratoire de Biologie des Ligneux  
Université des Sciences de Nancy I. B.P. 239  
54506 Vandœuvre les Nancy Cedex.

**RÉSUMÉ** - Le mycélium de *Tuber melanosporum* et les mycorhizes qu'il forme avec *Quercus robur* et *Q. pubescens* ont fait l'objet d'une étude cytologique en microscopie électronique à balayage et à transmission. L'étude ultrastructurale des parois du champignon isolé et associé montre l'implication de la couche externe dans la constitution du ciment interhyphal. Des composés pariétaux issus des cellules corticales peuvent également s'incorporer au ciment qui sépare les deux symbiotes au niveau du réseau de Hartig. Les premiers stades de la mycorhization sont décrits. Des substances tanifères sont alors abondamment produites et les cellules corticales semblent réagir comme dans le cas d'attaque parasitaire. Les bactéries associées au mycélium auraient un rôle favorable dans la mycorhization. La symbiose entre les deux partenaires est limitée dans le temps car les cellules dégénèrent rapidement; la mort des cellules corticales précède celle des hyphes. La mycorhization est assurée par la production d'hyphes libres à la surface des racines et par l'extension du système racinaire.

**ABSTRACT** - *T. melanosporum* mycelia and their mycorrhizae formed with *Quercus robur* and *Q. pubescens* were cytologically studied by both transmission and scanning electron microscopy. The ultrastructural study of the fungus walls when isolated or associated in mycorrhizae demonstrated that the outer layer was implicated in interhyphal matrix building. Wall components from cortical cells might also be incorporated in the matrix which separates the two symbionts in the Hartig net. The first stages of mycorrhization are described. Tannic substances were found to be produced in abundance and cortical cells seemed to react as in the case of a parasitic attack. The fact that bacteria are associated with the mycelium could suggest that they are beneficial for mycorrhization. Symbiosis between the two symbionts is time limited since cells rapidly degenerate; cortical cells die before the hyphae. Mycorrhization is ensured by free hyphae production on root surface and by root system extension.

**MOTS CLÉS** : *Tuber melanosporum*, vitroplants, *Quercus robur*, *Quercus pubescens*, tanins, bactéries, mycorhizes.

## INTRODUCTION

Les travaux sur les associations ectomycorhiziennes, chez les Angiospermes, ont fait l'objet d'études cytologiques approfondies, réalisées en microscopie électronique à transmission (Chilvers, 1968; Strullu, 1974; Strullu & Gerault, 1977; Debaud et al., 1981; Dexheimer et al., 1985; Edwards & Gessner, 1984; Malajczuk et al., 1984; Leduc et al., 1986; Lei, 1988; Pargney & Leduc, 1990) et en microscopie électronique à balayage (Seviour et al., 1978; Malajczuk et al., 1984; Massicotte et al., 1986). Les premiers résultats publiés sur l'ultrastructure des mycorhizes ont été obtenus sur du matériel récolté dans la nature ou en pépinière. Une meilleure connaissance des techniques a permis de réaliser des synthèses mycorhiziennes en conditions contrôlées et de travailler sur des couples symbiotiques bien déterminés (Debaud et al., 1981; Fusconi, 1982; Duddridge & Read, 1984 a,b,c; Dexheimer et al., 1985; Duddridge, 1986 a, b; Kottke & Oberwinkler, 1986; Leduc et al., 1986; Massicotte et al., 1986; Lei, 1988; Boutekrabort et al., 1990).

Diverses espèces du genre *Tuber* sont utilisées expérimentalement pour la formation d'associations ectomycorhiziennes: *T. aestivus*, *T. albidum*, *T. brumale*, *T. melanosporum*, *T. mesentericum*, *T. rufum*, *T. uncinatum* (Scannerini, 1968b; Fontana & Palenzona, 1969; Fontana & Fasolo-Bonfante, 1971; Palenzona et al., 1972; Chevalier, 1973; Chevalier & Desmas, 1977; Delmas & Poitou, 1978; Dupré et al., 1982; Fusconi, 1982; Giovanetti & Fontana, 1982; Boutekrabort et al., 1990). Les partenaires végétaux, qui s'associent avec le genre *Tuber*, appartiennent à des genres très différents: *Fagus*, *Corylus*, *Carpinus*, *Populus*, *Betula*, *Quercus*, *Tilia*, *Picea*, *Cistus* etc... Plusieurs auteurs ont montré que le genre *Quercus*, en particulier *Quercus pubescens* et *Q. robur* ainsi que *Corylus avellana* présentent de bonnes aptitudes à former des mycorhizes avec les espèces du genre *Tuber* (Malençon, 1938; Fontana & Centrella, 1967; Palenzona, 1969; Chevalier, 1972; Chevalier et al., 1973; Delmas & Poitou, 1978; Dupré et al., 1982; Olivier & Mamoun, 1988). Pour son intérêt économique, la symbiose avec *Tuber melanosporum* a fait l'objet de recherches plus approfondies et les techniques de mycorhization sont actuellement parfaitement maîtrisées (Chevalier & Grente, 1978; Dupré et al., 1982; Olivier & Mamoun, 1988; Boutekrabort et al., 1990).

Cependant, les renseignements sur la cytologie et l'ultrastructure du mycélium manquent. Seuls les aspects physiologiques (Matruchot, 1903 a,b; Malençon, 1938; Ceruti, 1968; Fontana, 1968; Fontana & Fasolo-Bonfante, 1971; Grente et al., 1972; Vrot, 1977; Kulifaj, 1984) et la structure fine des carpophores et les ascospores matures (Parguey-Leduc et al., 1985 et 1987) sont bien connus. Il nous est paru intéressant d'entreprendre l'étude en microscopie électronique à balayage et à transmission du mycélium isolé et en association avec des vitroplants de chênes obtenue en conditions contrôlées.

## MATERIEL ET METHIODES

## TECHNIQUES D'OBTENTION DES MYCORRHIZES

Le mycélium de la souche Mel 24, de *Tuber melanosporum* Vitt., isolé à partir de gléba, est cultivé en milieu liquide, sur milieu de référence utilisé à l'INRA de Clermont-Ferrand.

Deux espèces de chênes: *Quercus robur* et *Q. pubescens*, sont cultivés *in vitro*, par micropropagation de boutures issues de semis de glands sur milieu de culture de Favre & Juncker (1986) dérivant du milieu de Murashige & Skoog (1962). Les vitroplants sont cultivés sur milieu de multiplication pendant 6 semaines puis, après induction de la rhizogenèse, sont transférés sur milieu solide (tourbe et vermiculite: 1:3 T, 2:3 V), imbibé de solution de synthèse, où ils subissent une phase d'acclimatation en mini-serre avant d'être inoculés selon la technique de Chevalier & Grente (1978) et de Boutekrabt et al. (1990). En fonction de la technique adoptée, plusieurs inoculum sont utilisés (spores provenant de broyat de carpophores, racines excisées inséminatrices ou mycélium cultivé sur milieu gélosé et plaqué contre les racines). L'apparition de la mycorrhization diffère, suivant le système et l'inoculum utilisé, de 30 à 60 jours. Les mycorrhizes obtenues sont de couleur claire, en forme de petites massues et correspondent à celles obtenues dans la nature ou en conditions contrôlées. Les mycorrhizes sont prélevées en fonction de leur morphologie: les jeunes mycorrhizes sont de couleur claire et en forme de petites boules ou légèrement allongées, matures elles sont brun-clair et de forme plus allongée.

## TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

**- Microscopie électronique à balayage:**

Les objets sont fixés par le glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,2 pendant 1 h. Ils sont ensuite rincés par le tampon cacodylate 0,2 M à pH 7,2 puis déshydratés dans des bains d'acétone de concentrations croissantes et immergés dans l'hexaméthylidizilazan (réf: 804324 Merck) pendant 10 mn.

Pour l'étude du mycélium, l'utilisation de la technique du point critique est indispensable, compte tenu de sa fragilité. Dans un premier temps, l'acétone est substitué par du CO<sub>2</sub> liquide puis est éliminé par la chaleur pour ne conserver que l'échantillon sec. Enfin les objets sont métallisés à l'or et observés à l'Autoscan réglé à 20 Kv.

**- Microscopie électronique à transmission:**

Le mycélium et les sections de mycorrhizes de 0,5 mm proches de l'apex sont fixés par le glutaraldéhyde à 2,5 % dans le tampon cacodylate à pH 7,2 pendant 5 à 7 h. Après lavage par le tampon, les objets sont postfixés 1 h par le tétr oxyde d'osmium à 2 % dans le tampon cacodylate à température de la glace fondante. Ils sont ensuite lavés, déshydratés par l'acétone et inclus dans la résine.

Pour un contrôle de la mycorhization, des coupes semi-fines (20 à 30 $\mu\text{m}$ ) sont effectuées. Elles sont recueillies sur lame de verre, colorées à chaud par le bleu de toluidine à pH alcalin puis observées au microscope photonique.

Les coupes ultra-minces (6 à 10 $\mu\text{m}$ ), sont contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Reynolds, 1963) ou par le test PATAg de mise en évidence des polysaccharides (Thiery, 1967)

## RESULTATS

### LE MYCELIUM

Les hyphes issues de la germination des spores sont sinucuses et de couleur jaune clair. Leur diamètre varie de 2 à 3 $\mu\text{m}$ . Les ramifications sont simples, peu fréquentes et naissent à angle droit. L'utilisation de la microscopie électronique à balayage permet d'observer une septation assez régulière et la présence de renflements de 4 à 6 $\mu\text{m}$  de diamètre alors que le point d'étranglement est d'environ 1,5 $\mu\text{m}$  (Fig. 1). L'extrémité de l'hyphe se termine parfois par un renflement (Fig. 2). La paroi, de 0,5 $\mu\text{m}$  d'épaisseur, montre une surface rugueuse sur laquelle se trouvent des bactéries en forme de batonnets (Fig. 2). La détermination des souches de bactéries a montré qu'elles appartiennent à l'espèce *Bacillus polymixa*. Il convient de signaler que le mycélium de *Tuber melanosporum* est toujours associé à des bactéries. La présence de bactéries semble favorable à la croissance du mycélium, comme le montre le développement limité en culture pure. En effet, en présence de chloramphénicol (1‰), dont l'action est anti-bactérienne, le développement du mycélium est très réduit: le diamètre représentant la croissance du mycélium en culture mixte pendant 30 jours est le double de celui de la culture pure.

La paroi apparaît, en microscopie électronique à transmission, pluristratifiée, quel que soit le contrastant utilisé: acétate d'uranyle - citrate de plomb (Fig. 3) et test PATAg (Fig. 4 et 5). Entre les articles, les cloisons perforées sont bordées de part et d'autre de corps de Woronin (Fig. 4). La surface est irrégulière et la couche externe, d'aspect mucilagineux, est impliquée dans les liaisons interhyphales (Fig. 5). Entre les articles, les cloisons sont perforées (Fig. 4). Les bactéries sont présentes aux abords immédiats du mycélium (Fig. 6). Dans les hyphes, les septa sont réguliers et les perforations sont bordées de grains de Woronin en nombre régulier (Fig. 4). Le cytoplasme vacuolisé renferme de nombreux organites (mitochondries, réticulum endoplasmique) et des grains de glycogène (Fig. 3, 4, 5) et des noyaux (Fig. 3).

### LES MYCORHIZES

L'observation à la loupe binoculaire montre que les mycorhizes sont de petites massues plus ou moins trapues. Jeunes, elles sont de couleur claire mais en vieillissant, elles virent au brun clair puis au brun foncé. Elles sont ornementées de spinules perpendiculaires à la surface (Fig. 7), bien visibles

lorsqu'elles sont observées immergées dans l'eau. De même couleur que celle des hyphes, elles ont l'aspect de poils rigides avec une partie basale élargie qui s'insère à la surface de la mycorhize. La mycorhize est d'abord trapue puis elle s'allonge; de nouvelles mycorhizes apparaissent alors au niveau de la partie basale puis médiane. L'allongement dure plus longtemps que l'apparition de nouvelles mycorhizes (4 à 6 semaines pour l'allongement et 2 semaines seulement pour les autres). La mycorhize principale atteint 3 à 4 mm de longueur et les ramifications dépassent rarement 2mm.

En microscopie électronique à balayage, les jeunes mycorhizes sont recouvertes d'un manteau constitué d'hyphes agglomérées en plaques (Fig. 8) entre lesquelles prolifèrent des bactéries. Elles présentent également des hyphes libres (Fig. 8), parfois regroupées en amas (Fig. 9) qui longent la surface de la mycorhize et celle de la racine longue sous jacente (Fig. 8). En coupe, le manteau montre plusieurs couches d'hyphes (3 à 5) mais le réseau de Hartig n'est pas formé (Fig.10). Dans les mycorhizes plus âgées, la surface externe présente le même aspect mais les hyphes libres sont moins nombreuses (Fig. 11). En coupe, les hyphes du manteau sont de sections variées. Cette structure apparaît constante tout le long de la mycorhize. Le réseau de Hartig est présent (Fig. 12). Parfois, à l'apex des mycorhizes âgées, on observe un redémarrage de la croissance par écartement du manteau et allongement de la racine. Celle-ci est aussitôt recouverte d'hyphes (Fig. 11).

L'utilisation du microscope électronique à transmission permet de distinguer les phases successives de la formation de la mycorhize. Celle-ci débute par l'installation progressive des hyphes autour des racines courtes et aboutissent à l'établissement de la mycorhize mature.

### I - Installation des hyphes

Les très jeunes racines courtes sont recouvertes progressivement d'hyphes qui se regroupent et s'accolent entre elles et à la surface racinaire par des fibrilles réactives au test PATAg (Fig. 13). Le mycélium ne forme pas encore un véritable manteau. Des bactéries et des dépôts denses aux électrons sont présents dans les espaces interhyphaux (Fig. 14). Le cytoplasme fongique est vacuolisé et il renferme un ou parfois plusieurs noyaux et quelques organites (mitochondries, réticulum endoplasmique) et surtout des ribosomes. Les cellules racinaires périphériques montrent une vacuole très développée dans laquelle s'accumulent, le long du tonoplaste, des dépôts denses correspondant à des tanins (Fig. 15); leur cytoplasme occupe une position pariétale et il présente de nombreux organites: les travées de réticulum endoplasmique et les ribosomes sont particulièrement abondants.

Dans les jeunes mycorhizes, seul le manteau est présent. Il est constitué de trois ou quatre couches d'hyphes (Fig. 16). Elles sont reliées entre elles par un ciment interhyphal dense aux électrons et qui, lorsque les hyphes sont légèrement séparées, apparaît plus lâche et d'aspect fibrillaire. Le manteau est limité intérieurement par des dépôts tanifères allongés qui bordent les cellules racinaires (Fig. 16). Cependant, des hyphes peuvent être parfois directement en relation avec la surface de la racine (Fig. 15).

Au stade suivant, les hyphes internes du manteau s'insinuent entre les dépôts tanifères (Fig. 17), pour former sous les tanins des files de cellules fongiques qui longent les cellules corticales (Fig. 18). Elles diffèrent des hyphes externes par leur section moins allongée et par un cytoplasme plus dense et riche en organites: elles sont peu vacuolisées et renferment notamment beaucoup de ribosomes (Fig. 18). Les cellules corticales sont par contre très vacuolisées et leur cytoplasme est plus contrasté que précédemment (Fig. 17).

Les mycorhizes montrent ensuite un début de formation du réseau de Hartig (Fig. 19). Les parois des cellules corticales voisines sont écartées par la pénétration des hyphes. La lamelle moyenne est alors altérée et ne subsiste plus que sous forme de fibrilles lâches reliant les deux parois séparées (Fig. 20). La paroi fongique émet dans l'espace ainsi créé des excroissances contrastées par le test PATAg (Fig. 19 et 20). La juxtaposition des deux partenaires conduit à la formation d'une interface au niveau de laquelle les parois fongique et racinaire sont parfaitement distinctes l'une de l'autre; la paroi des hyphes, notamment la zone externe, est plus marquée par le test PATAg que celle de la cellule corticale.

## 2- Ultrastructure de la mycorhize mature

Dans la mycorhize mature, le réseau de Hartig s'étend plus profondément sans atteindre le cylindre central. Il n'est toutefois pas présent dans la zone apicale où seul le manteau existe (Fig. 21). Les cellules racinaires adjacentes au manteau sont mortes et allongées par déformation; elles ne renferment que des tanins. Les cellules sous jacentes montrent par contre un cytoplasme pariétal très contrasté et une grande vacuole dans laquelle de nombreuses granulations denses sont présentes (Fig. 21).

Au niveau de la zone sous apicale, le réseau de Hartig est bien développé (Fig. 22). Il est formé d'hyphes vivantes intimement accolées aux cellules corticales. Entre les deux symbiotes, il existe une fine couche dense aux électrons et qui devient plus importante aux angles des cellules fongiques; elle constitue un ciment liant les deux partenaires. Le cytoplasme des hyphes est peu vacuolisé; les cellules corticales adjacentes sont dégénérantes (Fig. 22, 23). Dans la région basale, les cellules corticales et fongiques sont totalement dégénérées (Fig. 24).

## DISCUSSION - CONCLUSION

*Tuber melanosporum* Vitt. montre les caractéristiques ultrastructurales des Ascomycètes: parois perforées, corps de Woronin, cloisons incomplètes (Scannerini, 1968 a; Debaud et al., 1981; Dexheimer et al., 1985; Kottke & Oberwinkler, 1986); toutefois, la formation de vésicules et de dilatations ne constitue pas un critère spécifique (Chevalier, 1973). Les caractères morphologiques du champignon isolé (structure, ornementation, couleur) sont déterminants pour la jeune mycorhize (Foster & Marks, 1966; Garbaye, 1990). La paroi des hyphes, de nature polysaccharidique est limitée extérieurement par une zone mucilagineuse qui assure, lors de la

mycorrhization, la cohésion des différents articles qui constituent le manteau. Le rapprochement des hyphes autour de la racine et leur accolement à la surface racinaire sont liés à la production de fibrilles polysaccharidiques (Lei, 1988; Thomson et al., 1989; Ba, 1990). La couche externe de la paroi fongique contribue donc à la formation d'un ciment interhyphal qui permet l'édification du manteau: lors de la mise en place du réseau de Hartig dans la jeune mycorhize, elle se trouve directement en contact avec la paroi des cellules corticales. Cette interface évolue puisque dans les mycorhizes matures, il apparaît, au niveau de la zone de contact entre les deux partenaires, un ciment. Celui-ci est marqué quel que soit le contrastant utilisé comme chez les mycorhizes à Ascomycètes (Scannerini, 1968b; Strullu & Gourret, 1980; Dexheimer et al., 1985; Pargney & Leduc, 1990). L'emploi du test PATAg permet la mise en évidence de sa nature polysaccharidique. La couche externe de la paroi fongique semble contribuer à sa formation; toutefois, les résidus de la lamelle moyenne visibles lors de l'installation du réseau de Hartig sous forme de fibrilles sont également impliqués. Ces diverses origines ont été mises en évidence par des techniques de cytochimie ultrastructurale (Pargney, 1990).

De par leur organisation générale, les mycorhizes obtenues en conditions contrôlées avec les vitroplants sont comparables à celles de la nature. Toutefois, des différences peuvent exister. L'une concerne l'évolution de l'interface au niveau du réseau de Hartig: si dans nos conditions de synthèse, le ciment qui sépare les deux partenaires s'installe rapidement, il est moins épais que dans les mycorhizes matures de *Tuber melanosporum* / *Corylus avellana* (Pargney & Leduc, 1990). La composition du milieu, la nature et l'âge des symbiotes seraient à l'origine de ces différences. La transformation de la morphologie des mycorhizes, (virement rapide de la couleur du clair au brun), est le reflet d'une évolution rapide de la mycorhize qui se traduit au niveau du réseau de Hartig par une dégénérescence précoce de cellules corticales puis des hyphes. De ce fait, l'évolution des interfaces et le développement du ciment sont en relation avec l'état physiologique des cellules adjacentes. Lorsque celles-ci dégèrent rapidement, le ciment est peu développé. Une autre différence par rapport aux mycorhizes de la nature concerne l'évolution du manteau: contrairement à ce qui est décrit dans certaines mycorhizes (Strullu & Gourret, 1973; Strullu & Gerault, 1977; Debaud et al., 1981) et notamment dans les mycorhizes formées avec les espèces du genre *Tuber* (Scannerini, 1968 b; Pargney & Leduc, 1990), nous n'observons pas la formation, dans le manteau des mycorhizes matures, de deux zones, l'une externe et morte, l'autre interne et vivante. Dans notre matériel, la mort des hyphes est simultanée dans toutes les cellules du manteau et elle correspond à la dégénérescence de la mycorhize.

Au cours de l'établissement de la mycorhize, les hyphes ne présentent pas toutes la même ultrastructure: celles directement en contact avec les cellules corticales montrent un cytoplasme plus dense, moins vacuolisé et plus riche en ribosomes que les hyphes de la zone externe du manteau. L'accroissement du nombre de ribosomes laisse supposer une augmentation de l'activité physiologique. On sait que les polysomes sont impliqués dans la synthèse des polypeptides et que certains sont spécifiques de la

mycorhization (Hilbert & Martin, 1988). La morphologie du cytoplasme et notamment des ribosomes, traduisent une activité fongique intense qui se poursuit jusqu'à la mort des cellules corticales; celle-ci précède toujours celle des hyphes. Elle est l'aboutissement d'une dégénérescence qui se manifeste par une accentuation progressive du contraste cytoplasmique. Si la mycorhize ne dégénère pas à la suite d'asphyxie ou de déséquilibre nutritionnel, elle peut avoir deux évolutions possibles: soit elle reprend sa croissance par l'apparition de nouvelles mycorhizes sur la partie basale et médiane de la mycorhize, soit l'apex perce le manteau et continue son évolution. Dans le cas où les conditions de milieu sont favorables à la croissance du champignon, la mycorhize se développe et continue d'accomplir la fonction définie dans le cadre de l'association ectomycorhizienne à savoir les échanges mutualistes. La propagation de la mycorhization paraît assurée par la présence des hyphes libres liées au manteau. Dans nos conditions de synthèse, elle s'effectue par l'installation du manteau puis par la formation du réseau, comme dans d'autres mycorhizes (Harley, 1969; Strullu & Gourret, 1980). Toutefois, dans certains cas, les hyphes du réseau peuvent assurer la formation du manteau et participer à l'extension de la mycorhization (Nylund, 1981; Fusconi, 1982); tout dépend de l'abondance du mycélium et de sa virulence.

Au cours de la formation de la mycorhize, nous avons noté l'importance des composés taninifères qui se développent dans les vacuoles des cellules de la plante-hôte et s'accumulent en de larges bandes autour de la racine; la progression des hyphes paraît ainsi freinée. La formation de tanins dans les cellules des jeunes mycorhizes traduit une réaction de la plante comparable aux réactions de défense décrites lors des attaques parasitaires (Biehn et al., 1968; Heath & Heath, 1971; Ravisé & Tanguay, 1973; Littlefield & Bracker, 1972; El Khatib et al., 1974; Coffey, 1975; Steinkamp et al., 1979; Beakes et al., 1982). Divers auteurs ont remarqué la production de composés phénoliques dans les ectomycorhizes (Foster & Marks, 1966; Chilvers, 1968; Scannerini, 1968 b; Marks & Foster, 1973; Carrasco et al., 1977, 1978; Piche et al., 1983; Malajczuk et al., 1984; Duddridge & Read, 1984; Kottke & Oberwinkler, 1986); leur présence a été signalée soit dans les vacuoles des cellules corticales (Bonfante-Fasolo & Scannerini, 1977; Ling-Lee et al., 1977; Debaud et al., 1981; Nylund & Unestam, 1982; Duddridge & Read, 1984 c; Malajczuk et al., 1984), soit entre le manteau et la surface racinaire (Scannerini & Bonfante-Fasolo, 1982). Ils peuvent constituer, dans les mycorhizes matures, une véritable couche à tanins (Foster & Marks, 1966; Hofsten, 1969; Warmbrodt & Eschrich, 1985). Le genre *Quercus* est très riche en substances phénoliques. En culture *in vitro*, les substances phénoliques sont rapidement libérées dans le milieu de culture lors du rafraichissement de la base de la bouture. Ces substances sont toxiques car les boutures non transférées après la sécrétion des phénols ont un développement réduit voire nul si l'envahissement du milieu est total.

L'association des bactéries avec le genre *Tuber* a déjà été signalée par plusieurs auteurs (Vrot, 1977; Kulifaj, 1984; Mamoun et al., 1986). Elles peuvent stimuler l'établissement de la mycorhization (Bowen & Theodorou, 1979; Garbaye & Bowen, 1989; Meyer & Linderman, 1986). Chez les

endomycorhizes, elles induiraient des modifications au niveau des structures pariétales de la racine qui faciliteraient la pénétration du champignon (Mosse, 1962). Mamoun et al. (1986) constatent un antagonisme entre *Pseudomonas* et mycélium de *Tuber* cultivé *in vitro*. Olivier & Mamoun (1988) et Mamoun & Olivier (1989) dans une étude sur la dynamique des populations fongiques de la rhizosphère des noisetiers truffiers (relation avec le statut hydrique du sol puis chélation du fer et répartition taxonomique chez les *Pseudomonas* fluorescents), décrivent un antagonisme direct et une compétition en relation avec le potentiel hydrique. Ils observent en outre une corrélation étroite entre les effectifs de *Pseudomonas* fluorescents et la teneur en eau au niveau du rhizoplan de noisetiers truffiers alors qu'elle n'existe pas dans le sol nu.

Ainsi, *Tuber melanosporum* forme avec des vitroplants de *Quercus robur* et *Q. pubescens* des ectomycorhizes typiques qui dans nos conditions de synthèse évoluent rapidement. La cohésion des hyphes constituant le manteau est assurée par la zone externe de la paroi fongique. Celle-ci participe aussi à la formation du ciment qui sépare les deux partenaires dans le réseau de Hartig; d'autres constituants, tels des résidus de la lamelle moyenne séparant les cellules corticales, sont également impliqués. Au début de la mycorhization, les tanins produits par la racine servent probablement de réaction de défense des racines courtes avant la symbiose et correspondent à une couche d'isolement comme étant l'expression de la cellule-hôte à la pénétration du champignon. Les bactéries interviendraient dans la mycorhization par la stimulation du mycélium. La symbiose qui s'établit entre les deux partenaires est momentanée et se fait tant que les cellules sont vivantes. De par son cytoplasme dense et riche en ribosomes, le champignon semble particulièrement actif. La dégénérescence de celles-ci est rapide et entraîne la mort des éléments fongiques adjacents. Les échanges entre les deux symbiontes sont donc limités dans le temps et dans l'espace. Cependant, la propagation de la mycorhization semble assurée par des hyphes externes libres et la production de nouvelles racines courtes.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Monsieur Gerard Chevalier de l'INRA de Clermont-Ferrand, de leur avoir donné l'inoculum pour la mycorhization de vitroplants de chênes.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BA A.M., 1990 - Contribution à l'étude de la symbiose ectomycorhizienne chez deux essences forestières d'Afrique intertropicale: *Azela africana* Sm. et *Uapaca guineensis* Müll. Arg. Thèse Univ. Sci. Techn. Languedoc.
- BEAKES G.W., SINGH H. and DICKINSON C.H., 1982 - Ultrastructure of the host-pathogen interface of *Peronospora viciae* in cultivars of pea which show different susceptibilities. *Pl. Pathol.* 31: 343-354.
- BIEHN W.L., KUC J. and WILLIAMS E.B., 1968 - Accumulation of phenols in resistant Plant-Fungi. *Phytopathology* 58: 1255-1260.

- BONFANTE-FOSALO P. and SCANNERINI S., 1977 - Cytological observations on the mycorrhiza *Endogone flamicorona* Pinus *strobis*. *Allionia* 22: 23-34.
- BOUTEKRABT A., CHEVALIER G., PARGNEY J.C. et DEXHEIMER J., 1990 - Mycorrhization par *Tuber melanosporum* Vitt. de vitroplants de *Quercus robur* L. et *Q. pubescens* Willd. *Agronomie* 10: 127-132.
- BOWEN G.D. and THEDOROU C., 1979 - Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 11: 119-126.
- CARRASCO A., MARIGO G. and BOUDET A.M., 1977 - Induction d'une résistance à la fusariose par augmentation du contenu phénolique chez *Lycopersicon esculentum*. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., sér. D*, 298: 1801-1804.
- CARRASCO A., BOUDET A.M. and MARIGO G., 1978 - Enhanced resistance of tomato plants to *Fusarium* by controlled stimulation of their natural phenolic production. *Physiol. Pl. Pathol.* 12: 225-232.
- CERUTI A., 1968 - Biologia e possibilita di coltivazione dei Tarrtuffi. Atti Cong. Int. Tartufo (Spoleto), 1-17.
- CHEVALIER G., 1972 - Obtention de culture de mycélium de truffe à partir de carpophore et des mycorhizes. *Compt. Rend. Séances Acad. Agric. France* 12: 981-989.
- CHEVALIER G., 1973 - Synthèse axénique des mycorhizes *Tuber brumale* Vitt. à partir de cultures pures du champignon. *Ann. Phytopathol.* 5: 163-182.
- CHEVALIER G., GRENTE J. et POLLACSEK A., 1973 - Obtention de mycorhizes de différents *Tuber* par synthèse à partir de spores en conditions gnotoxéniques et à partir de cultures pures de mycélium en conditions axéniques et gnotoxéniques. *Ibidem* 5: 107-108.
- CHEVALIER G. et DESMAS C., 1977 - Mycorrhization de *Tuber melanosporum* de plants de *Quercus pubescens* en culture hydroponique sensu stricto. *Ibidem* 9: 532.
- CHEVALIER G. et GRENTE J., 1978 - Application pratique de la symbiose ectomycorrhizienne: production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). *Mushroom Sci.* X: 483-505.
- CHILVERS G.A., 1968 - Low-power electron microscopy of the root cap region of Eucalypt mycorrhizas. *New Phytol.* 67: 663-665. Some distinct types of Eucalypt mycorrhizas. *Austral. J. Bot.* 16: 49-70.
- COFFEY M.D., 1975 - Ultrastructure features of the haustorial apparatus of the white blister fungus *Albugo candida*. *Canad. J. Bot.* 55: 1285-1299.
- DEBAUD J.C., PEPIN R. et BRUCHET R., 1981 - Ultrastructure des ectomycorhizes synthétiques à *Hebeloma alinum* et *Hebeloma marginatum* des *Dryas octopetala*. *Canad. J. Bot.* 59: 2160-2166.
- DELMAS J. et POITOU N., 1978 - La mycorrhization de *Quercus pubescens* par *Tuber melanosporum* en conditions contrôlées: influence de quelques facteurs du milieu. *Mushroom Sci.* X: 995-1006.
- DEXHEIMER J., GERARD J., LEDUC J. P. et CHEVALIER G., 1985 - Etude ultrastructurale comparée des associations symbiotiques mycorhiziennes *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia claveryi* et *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia leptoderma*. *Canad. J. Bot.* 63: 582-591.
- DUDDRIDGE J.A. and READ D.J., 1984 a - The development and ultrastructure of mycorrhizas. I. Ectomycorrhizal development on pine in the field. *New Phytol.* 96: 565-573.

- DUDDRIDGE J.A. and READ D.J., 1984 b - The development and ultrastructure of mycorrhizas. II. Ectomycorrhizal development on pine *in vitro*. *Ibidem* 96: 575-582.
- DUDDRIDGE J.A. and READ D.J., 1984 c - Modifications of the host-fungus interface in mycorrhizas synthesized between *Suillus bovis* (Fr.) O. Fontz and *Pinus sylvestris* L. *Ibidem* 96: 583-588.
- DUDDRIDGE J. A., 1986 a - The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. III. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. and 11 species of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the absence of exogenous carbonate. *Ibidem* 103: 457-464.
- DUDDRIDGE J.A., 1986 b - The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. IV. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. and a number of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the presence of exogenous carbohydrate. *Ibidem* 103: 465-471.
- DUPRE C., CHEVALIER G., MORIZET J. et LEBLEVENEC L., 1982 - Influence de l'azote et du phosphore sur la mycorhization de *Quercus pubescens* Willd. par *Tuber melanosporum* Vitt. en conditions contrôlées. *Les colloques de l'INRA* 13: 147-153.
- EDWARDS H.H. and GESSNER V.R., 1984 - Light and transmission electron microscopy of English oak ectomycorrhizal short roots. *Canad. J. Bot.* 62: 1327-1335.
- EL KHATIB A., ARAMOUNI A., HASSAN A. et RAVISE A., 1974 - Accumulation de composés phénoliques et de phytoalexines par des variétés de tomate cultivées sur des sols infectés au Liban. *Phytopathol. Z.* 81: 23-37.
- HAVRE J.M. and JUNCKER J., 1986 - *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8: 49-60.
- FONTANA A. e CENTRELLA E., 1967 - Ectomycorrizze prodotte de funghi ipogei. *Allione* 13: 149-176.
- FONTANA A., 1968 - Miceli di funghi ipogei in coltura pura. Atti Congr. Int. Tartufo (Spoleto), 127-133.
- FONTANA A. e PALENZANO M., 1969 - Sintesi micorrizica di *Tuber albidum* in coltura pura, con *Pinus strobus* e pioppo euromericano. *Allione* 15: 99-104.
- FONTANA A. e FASOLO-BONFANTE P., 1971 - Sintesi micorrizica di *Tuber brumale* Vitt. con *Pinus nigra* Arnold. *Ibidem* 17: 15-18.
- FOSTER R.C. and MARKS G.C., 1966 - The fine structure of the mycorrhizas of *Pinus radiata* D. Don. *Austral. J. Bot.* 19: 1027-1038.
- FUSCONI A., 1982 - Formation of the mantle and Hartig net in ectomycorrhizae of "*Cistus incanus*" x *Tuber melanosporum*. *Caryologia* 35: 374-375.
- GARBAYE J. and BOWEN G.D., 1989 - Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytol.* 112: 383-388.
- GARBAYE J., 1990. Pourquoi et comment observer l'état mycorrhizien des plants forestiers. *Rev. Forest. France* 42: 35-47.
- GIOVANETTI G. and FONTANA A., 1982 - Mycorrhizal synthesis between Cystaceae and Tuberaceae. *New Phytol.* 92: 533-537.
- GREUTE J., CHEVALIER G. et POLLASCEK A., 1972 - La germination de l'ascospore de *Tuber melanosporum* et la synthèse sporale des mycorrhizes. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Sér. D.* 275: 743-746.

- HARLEY J.L., 1969 - *The biology of mycorrhiza*. London, Leonard Hill., 334 p.
- HEATH M.C. and HEATH I.B., 1971 - Ultrastructure of an immune and a susceptible reaction of crowpea leaves to rust infection. *Physiol. Pl. Pathol.* 1: 277-287.
- HILBERT J.L. and MARTIN F., 1988 - Regulation of gene expression in ectomycorrhizas. I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides. *New Phytol.* 110: 339-346.
- HOFSTEN., 1969 - The ultrastructure of mycorrhiza. I. Ectotrophic and endotrophic mycorrhiza of *Pinus sylvestris*. *Svensk. Bot. Tidskr.* 63: 455-463.
- KOTTKE I. and OBERWINKLER F., 1986 - Roots-fungus interactions observed on initial stages of mantle formation and Hartig net establishment in mycorrhizas of *Amanita muscaria* on *Picea abies* in pure culture. *Canad. J. Bot.* 64: 2348-2354.
- KULIFAJ M., 1984 - *Tuber melanosporum* Vitt. Contribution à l'étude de la morphogénèse et de la Physiologie de l'ascocarpe. Doct. 3ème cycle. Univ. Sci. Paul Sabatier, Toulouse.
- LEDUC J.P., DEXHEIMER J. et CHEVALIER G., 1986 - Etude ultrastructurale comparée des associations de *Terfezia leptoderma* avec *Helianthemum salicifolium*, *Cistus albidus* et *Cistus salviaefolius*. In: Aspects physiologiques et génétiques des mycorrhizes. Actes du 1er symposium européen sur les mycorrhizes (Dijon, 1-5.7.85). Paris, I.N.R.A., 291-295.
- LEI J., 1988 - Etude expérimentale des systèmes symbiotes mycorrhiziens de quelques espèces ligneuses. Application pratique à la mycorrhization de vitroplants. Thèse Doct. Univ. Nancy I.
- LING-LEE M., ASHFORD A.E. and CHILVERS G.A., 1977 - A histochemical study of polysaccharide distribution in eucalypt mycorrhizas. *New Phytol.* 75: 551-554.
- LITTLEFIELD L.J. and BRACKER C.E., 1972 - Ultrastructural specialization at the host-pathogen interface in the rust-infected flax. *Protoplasma* 74: 271-305.
- MALENÇON M.G., 1938 - Les truffes européennes. *Rev. Mycol. (Paris) Mém. H.S.* n°1: 92p.
- MALAJCZUK N., MOLINA R. and TRAPPE J.M., 1984 - Ectomycorrhiza formation in Eucalyptus. II. The ultrastructure of compatible and incompatible mycorrhizal fungi and associated roots. *New Phytol.* 96:43-53.
- MAMOUN M., POITOU N. et OLIVIER J.M., 1986 - Etude des interactions entre *Tuber melanosporum* Vitt. et son environnement biotique. In: Aspects physiologiques et génétiques des mycorrhizes. Actes du 1er symposium européen sur les mycorrhizes, (Dijon, 1-5.7.85), Paris, I.N.R.A., 761-765.
- MAMOUN M. et OLIVIER J.M., 1989 - Dynamique des populations fongiques et bactériennes de la rhizosphère des noisetiers truffiers. II. Chélation du fer et répartition taxonomique chez les *Pseudonomas* fluorescents. *Agronomie* 9: 345-351.
- MARKS G.C. and FOSTER R.C., 1973 - Structure, morphogenesis and ultrastructure of mycorrhizae. In: G.C. MARKS & T.T. KOZLOWSKI, *Ectomycorrhizae*. Academic Press: 1-41.
- MASSICOTTE H.B., PETERSON R.L., ACKERLEY C.A. and PICHEN Y., 1986 - Structure and ontogeny of *Alnus crispa*-*Alpova diplophloeus* ectomycorrhizae. *Canad. J. Bot.* 64: 177-192.

- MATRUCHOT L., 1903 a- Germination des spores de truffes; culture et caractère du mycélium truffier. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 136: 1099-1101.
- MATRUCHOT L. 1903 b- Sur les caractères botaniques du mycélium truffier. *Ibidem* 136: 1337-1338.
- MEYER J.M and LINDERMAN R.G., 1986 - Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular fungi and plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 185-190.
- MOSSE B., 1962 - The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J. Gen. Microbiol.* 27: 509-520.
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962 - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Pl.* 15: 473-497.
- NYLUND J. E., 1981 - The formation of ectomycorrhiza in conifers: Structural and physiological studies with special reference to the mycobiont, *Piloderma croceum* (Erikss. and Hjortst.). *Acta Univ. Uppsala* 615: 3-34.
- NYLUND J. E. and UNESTAM T., 1982 - Structure and physiology of mycorrhizae. I. The process of mycorrhiza formation in Norway spruce *in vitro*. *New Phytol.* 53: 253-283.
- OLIVIER J. M et MAMOUN M., 1988 - Dynamique des populations fongiques et bactériennes de la rhizosphère des noisetiers truffiers. I. Relation avec le statut hydrique du sol. *Agronomie* 8: 711-717.
- PALENZONA M., 1969 - Sintesi micorrizica tra *Tuber aestivum*, *T. brumale*, *T. melanosporum* e semenzali di *Corylus avellana*. *Allione* 15: 121-131.
- PALENZONA M., CHEVALIER G. e FONTANA A., 1972 - Sintesi micorrizica tra *Tuber brumale* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt., *T. rufum* Pico, in colture di micelio, e semenzali di conifere e latifoglie. *Ibidem* 18: 41-52.
- PARGNEY J.C. et LEDUC J.P., 1990 - Etude ultrastructurale de l'association mycorrhizienne Noisetier-Truffe. (*Corylus avellana* ; *Tuber melanosporum*). *Bull. Soc. Bot. France, Lettres Bot.*, 137: 21-34.
- PARGNEY J.C., 1990 - Essais de caractérisation cytochimique des structures de l'interface au niveau du réseau de Hartig dans l'association ectomycorrhizienne entre la Truffe (*Tuber melanosporum*) et le Noisetier (*Corylus avellana*). *Canad. J. Bot.* 68 (sous presse).
- PARGUEY-LEDUC A., MONTANT C. et KULIFAJ M., 1985 - Le stade apothécioïde de l'ascocarpe du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., sér. III*, 301: 143-145.
- PARGUEY-LEDUC A., MONTANT C. et KULIFAJ M., 1987 - Morphologie et structure de l'ascocarpe adulte de *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord, Discomycètes). *Cryptogamie, Mycol.* 8: 173-202.
- PICHE Y., PETERSON R.L., HOWARTH M.J. et FORTIN J.A., 1983 - A structural study of the interaction between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and *Pinus strobus* roots. *Canad. J. Bot.* 61: 1185-1193.
- RAVISE A. et TANGUEY J., 1973 - Etude des réactions phénoliques de plantules de *Nicotiana* inoculées par des souches de *Phytophthora* de By. *Phytopathol. Z.* 76: 253-264.
- REYNOLDS E.S., 1963 - The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- SCANNERINI S., 1968 a - Setti con "corpi di woronin" in *Tuber magnatum* Pico. *Allione* 14: 63-76.

- SCANNERINI S., 1968 b - Sull'ultrastruttura delle ectomicorrizze. II. Ultrastruttura di una micorrizza di Ascomicete: *Tuber albidum* x *Pinus strobus*. *Ibidem* 14: 77-95.
- SCANNERINI S. et BONFANTE-FASOLO P., 1982 - Données actuelles sur la cytologie des mycorhizes. *Les colloques de l'INRA* 13: 25-40.
- SEVIOUR R.J., HAMILTON D. and SCHILVERS G.A., 1978 - Scanning electron microscopy of surface features of Eucalypt mycorrhizas. *New Phytol.* 80: 153-156.
- STEINKAMP M.P., MARTIN S.S., HOEFERT L.L. and RUPPELL E. G., 1979 - Ultrastructure of lesions produced by *Cercospora beticola* in the leaves of *Beta vulgaris*. *Physiol. Pl. Pathol.* 15: 13-26.
- STRULLU D.G. et GOURRET J.P., 1973 - Etude des mycorhizes ectotrophes de *Pinus brutia* T. en microscopie électronique à balayage et à transmission. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., sér. D.* 277: 1757-1760.
- STRULLU D.G., 1974 - Etude ultrastructurale du réseau de Hartig d'une ectomycorrhize à Ascomycètes de *Pseudotsuga menziesii* Mirb. *Ibidem* 278: 2139-2142.
- STRULLU D.G. et GERAULT A., 1977 - Etude des ectomycorhizes à Basidiomycètes et à Ascomycètes du *Betula pubescens* (Ehrh.) en microscopie électronique. *Ibidem* 284: 2243-2244.
- STRULLU D.G. et GOURRET J.P., 1980 - Données ultrastructurales sur l'intégration cellulaire de quelques parasites ou symbiotes de plantes. II. Champignons mycorrhiziens. *Bull. Soc. Bot. France, Actual. Bot.*, 127: 97-106.
- THIERY J.P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6: 987-1017.
- THOMSON J., MELVILLE H. R. and PETERSON L., 1989 - Interaction between the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and root hairs of *Picea mariana* (Pinaceae). *Amer. J. Bot.* 76: 632-636.
- VROT F., 1977 - Influence de certains facteurs sur la croissance du mycélium truffier cultivé *in vitro*. Doct. 3ème cycle. Univ. Sci. Nancy I.
- WARMBRODT D. D. and ESCHRICH W., 1985 - Studies on the mycorrhizas of *Pinus sylvestris* L. produced *in vitro* with the basidiomycète *Suillus variegatus* (SW. ex Fr.) O. Kuntze. I. Ultrastructure of the mycorrhizal rootlets. *New Phytol.* 100: 215-223.

### LÉGENDE DES PLANCHES

Fig. 1: Vue d'ensemble d'hyphes en microscopie électronique à balayage. Noter la présence de renflements (\*). Echelle: 1µm. Fig. 1: Hyphal over view in scanning electron microscopy. Notice the presence of swellings (\*). Scale: 1µm.

Fig. 2: Détail d'une hyphe présentant un apex renflé. Echelle: 1µm. Fig. 2: Detail of an hypha showing a swollen apex. Scale: 1µm.

Fig. 3: Coupe transversale d'une hyphe en microscopie électronique à transmission: la paroi est formée de plusieurs strates. Acétate d'uranyle - citrate de plomb. Echelle: 1µm. Fig. 3: Cross sectional area of an hypha in transmission electron microscope: the wall is composed of several layers. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale: 1µm.

Fig. 4: Coupe d'hyphe montrant une cloison perforée entourée de part et d'autre de corps de Woronin (W). Test PATAg. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 4: Cross section area showing a perforated wall surrounded with a Woronin body (W). PATAg test. Scale:  $1\mu\text{m}$ .

Fig. 5: L'association entre deux hyphes se fait par accolement des parois externes sous forme de mucilage. Test PATAg. Echelle:  $0,7\mu\text{m}$ . Fig. 5: Two hyphae are combined by mucusing of the external walls. PATAg test. Scale:  $0.7\mu\text{m}$ .

Fig. 6: Des bactéries en forme de bâtonnets sont très abondantes aux abords immédiats des hyphes. Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 6: Bacillus bacteria are very abundant in the immediate surroundings of the hyphae. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale:  $1\mu\text{m}$ .

Fig. 7: Vue macroscopique de mycorhizes obtenues en conditions contrôlées. La présence de spinules (Flèche) perpendiculaires à la surface de la racine constitue le caractère spécifique des mycorhizes de *Tuber melanosporum*. Fig. 7: Macroscopic view of mycorrhizae produced in controlled environment. The presence of spinulae (arrow) normal to the root surface is specific to the *Tuber melanosporum*.

Fig. 8: Vue d'ensemble d'une jeune mycorhize en microscopie électronique à balayage. Les hyphes du manteau sont agglomérées entre elles en plaques. Des hyphes libres sont présentes sur la surface du manteau et longent la racine longue adjacente. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 8: Overview of a young mycorrhiza through a scanning electron microscope. The hyphae of the mantle are gathered in the form of tablets. The free hyphae are present on the surface of the mantle and along the adjacent long root. Scale:  $1\mu\text{m}$ .

Fig. 9: Les hyphes libres se présentent parfois en amas sur la surface du manteau. Echelle:  $0,5\mu\text{m}$ . Fig. 9: The free hyphae are sometimes clustered on the mantle surface. Scale:  $0.5\mu\text{m}$ .

Fig. 10: Coupe transversale d'une jeune mycorhize en microscopie électronique à balayage. Le manteau (M) est peu épais et le réseau de Hartig n'est pas présent. Echelle:  $0,5\mu\text{m}$ . Fig. 10: Cross sectional area of a young mycorrhiza through scanning electron microscope. The mantle (M) is thin; the Hartig net is not present. Scale:  $0.5\mu\text{m}$ .

Fig. 11: Détail d'une mycorhize âgée présentant un redémarrage de l'apex (\*) par écartement du manteau. Des hyphes libres (flèche) sont peu abondantes sur la surface du manteau. Echelle:  $0,25\mu\text{m}$ . Fig. 11: Detail of an aged mycorrhiza showing a resumption of the apex (\*) through the mantle. The free hyphae are not very abundant on the surface of the mantle (arrow). Scale:  $0.25\mu\text{m}$ .

Fig. 12: Coupe transversale d'une mycorhize mature. Les hyphes du manteau (M) sont de sections variées. Le réseau de Hartig (RH) est présent. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 12: Cross section of an adult mycorrhiza. The mantle hyphae have various sections (M). The Hartig net is found (HR). Scale:  $1\mu\text{m}$ .

Fig. 13: Lors du début de la synthèse, les hyphes s'accrochent entre elles et à la surface de la racine par l'émission de fibrilles. Les bactéries (b) sont déjà présentes. Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 13: At the beginning of a synthesis, the hyphae stick together and on the surface of the root by emission of fibrils. A bacteria (b) are already present. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale:  $1\mu\text{m}$ .

Fig. 14: Vue d'ensemble d'un jeune manteau où les hyphes sont de différentes sections et renferment de nombreux organites. Les bactéries (b) sont présentes dès le début d'infection. Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 14: Overview of a young mantle where the hyphae have various cross sections and contain numerous organelles. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale:  $1\mu\text{m}$ .

Fig. 15: Lors du début de la mycorrhization, le contact entre les hyphes et les cellules corticales (Cc) est intime. Les hyphes émettent des fibrilles à l'approche des cellules corticales (Cc) qui présentent de nombreuses travées de réticulum endoplasmique et des tanins dans les vacuoles. Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle: 1 $\mu$ m. Fig. 15: At the beginning of a mycorrhization, the contact between the hyphae and the cortical cells (Cc) is close. The hyphae emit fibrils when approaching the cortical cells (Cc) which present a large number of endoplasmic reticulum and tannins in the vacuoles. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale: 1 $\mu$ m.

Fig. 16: L'évolution de la mycorrhization est souvent freinée par des bandes à tanins (T). Le contact entre les hyphes du manteau et les cellules corticales (Cc) est alors indirect. Les hyphes présentent un cytoplasme vacuolisé avec de nombreux organites. Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle: 1 $\mu$ m. Fig. 16: Mycorrhization is often slowed down by tannic bands (T). The contact between the mantle hyphae and the cortical cells is then indirect. The hyphae are composed of a vacuolized cytoplasm and a large number of organelles. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale: 1 $\mu$ m.

Fig. 17: Lors du développement de la mycorrhization, l'hyphe s'insinue entre les bandes à tanins (T) et progresse vers les cellules corticales (Cc) pour la formation du réseau de Hartig. Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle: 1 $\mu$ m. Fig. 17: During a mycorrhization, a hypha worm its ways between the tannic bands (T) and move towards the cortical cells (Cc) to constitute the Hartig net. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale: 1 $\mu$ m.

Fig. 18: L'insinuation de l'hyphe sous les bandes à tanins (T) entraîne la formation d'un manteau interne (Mi) dont les hyphes sont en file et de section peu allongée. Elles sont moins vacuolisées et ont un cytoplasme plus dense que celles du manteau externe (Me). Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle: 1 $\mu$ m. Fig. 18: The introduction of the hypha through the tannic bands (T) leads to the building of an inner mantle (Mi) whose hyphae are aligned and have short cross sections. They are less vacuolated and their cytoplasm is denser than that of outer mantle. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale: 1 $\mu$ m.

Fig. 19: Durant la formation du réseau de Hartig, la lamelle moyenne est écartée. L'interface se caractérise par l'absence de ciment. La couche externe de la paroi fongique est réactive au test PATAg et émet des excroissances dans les espaces interhyphaux. Echelle: 1 $\mu$ m. Fig. 19: During the formation of the Hartig net, the middle lamella is moved away, the interface is characterized by the absence of matrix. The external layer of the fungal wall is reactive to the PATAg test and produces out growths in the interhyphal spaces. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale: 1 $\mu$ m.

Fig. 20: L'installation du réseau de Hartig provoque la séparation des cellules corticales; dans l'espace ainsi créé, des résidus de la lamelle moyenne sont présents sous forme de fibrilles (flèche). Test PATAg. Echelle: 1 $\mu$ m. Fig. 20: The installation of Hartig net produces the separation of the cortical cells; fibrils that are found in these intercellular spaces are the remnants of middle lamella (arrow). PATAg test. Scale: 1 $\mu$ m.

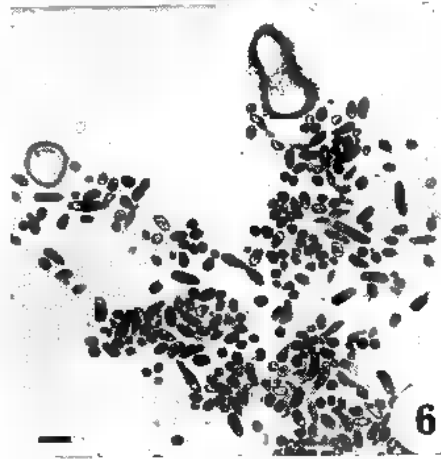
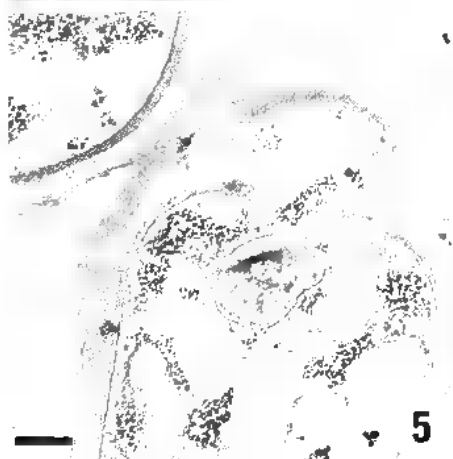
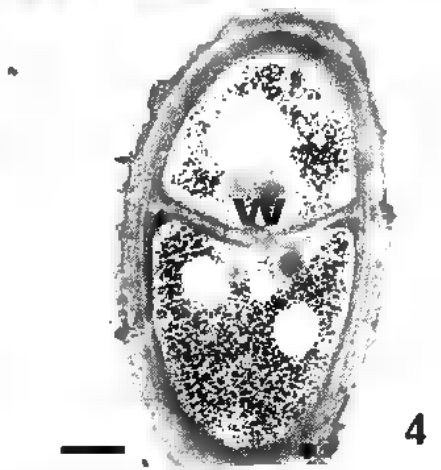
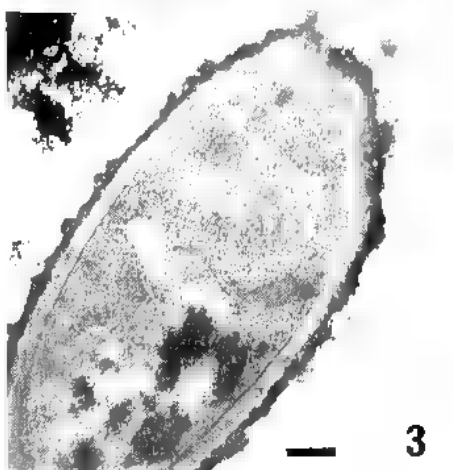
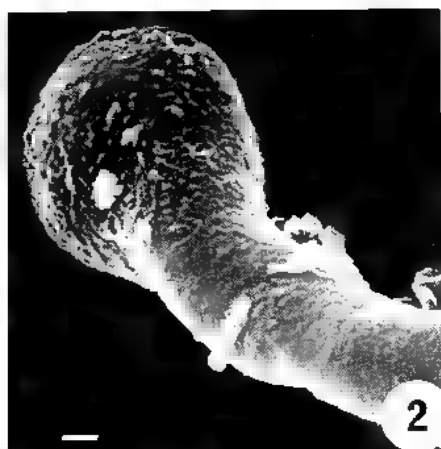
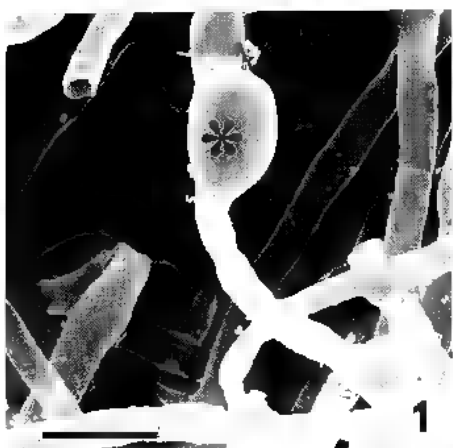
Fig. 21: Chez les mycorrhizes matures, l'apex est recouvert d'un manteau formé de plusieurs couches mais le réseau n'est pas toujours installé. Les cellules corticales ne renferment que des tanins. Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle: 0,5 $\mu$ m. Fig. 21: In the mature mycorrhizae, the apex is covered with a multi-layered mantle but the Hartig net is not always developed and the cortical cells contain only tannins. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale: 0.5 $\mu$ m.

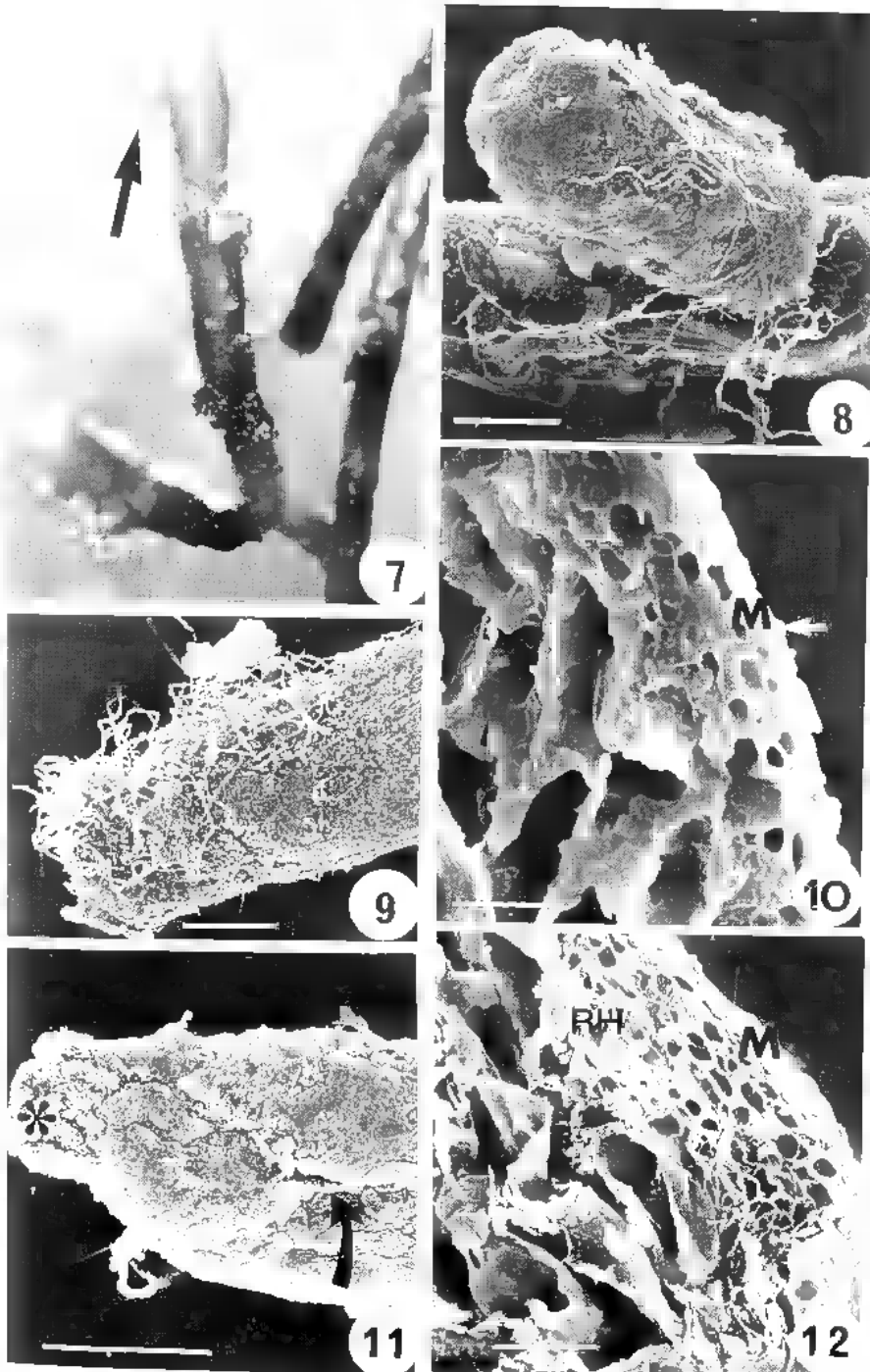
Fig. 22: Au niveau de la zone sous apicale, le réseau de Hartig est bien développé. L'interface se caractérise par un ciment de plus en plus abondant. Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle: 1 $\mu$ m. Fig. 22: In the subapical zone,

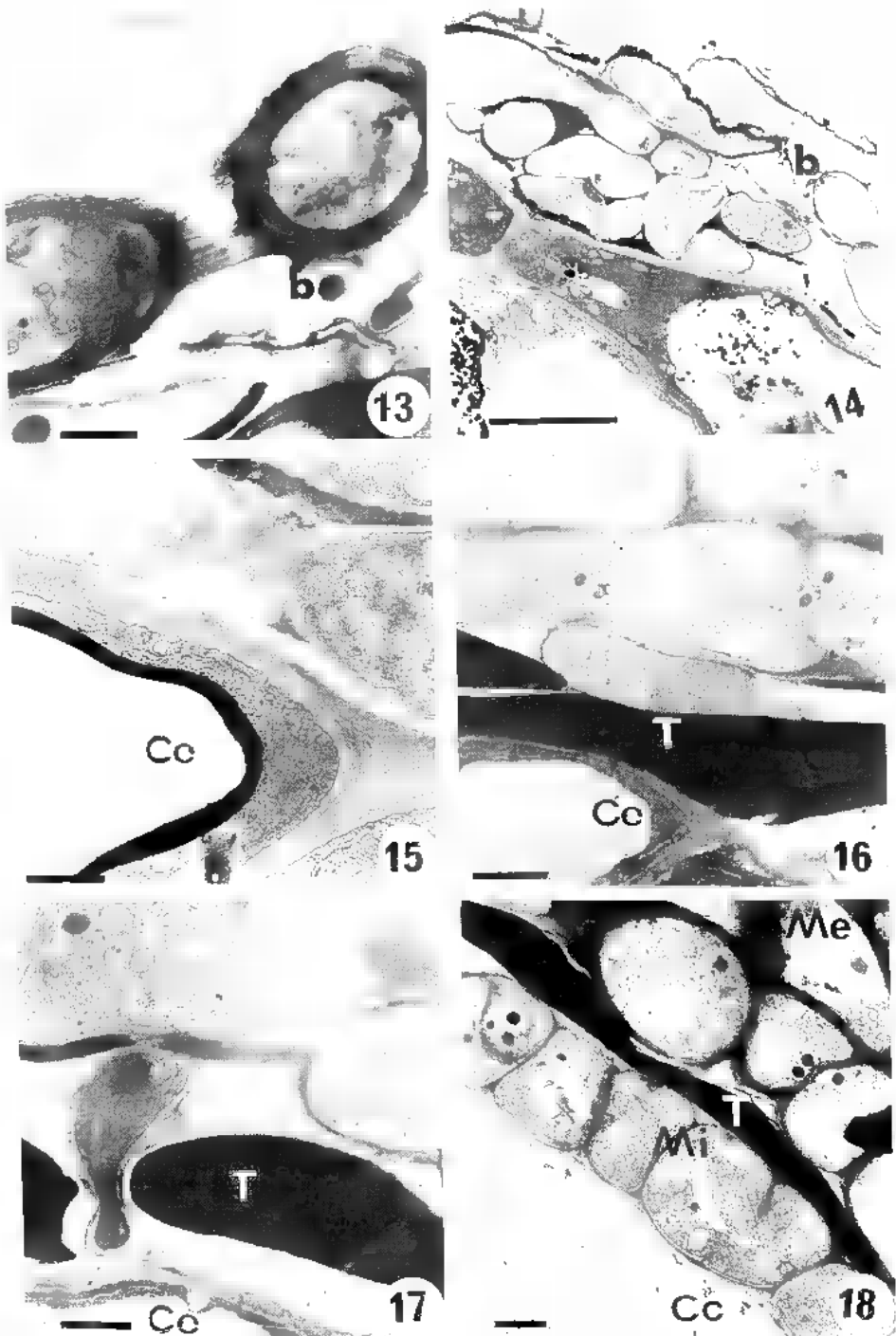
the Hartig net is well developed. Matrix is more and more abundant in the interface. Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale:  $1\mu\text{m}$ .

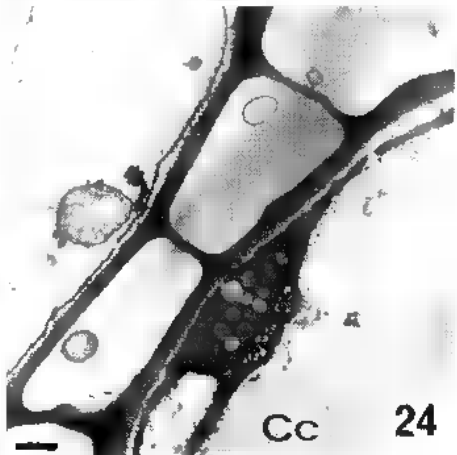
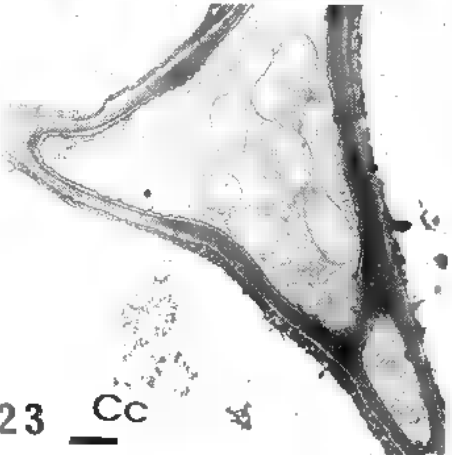
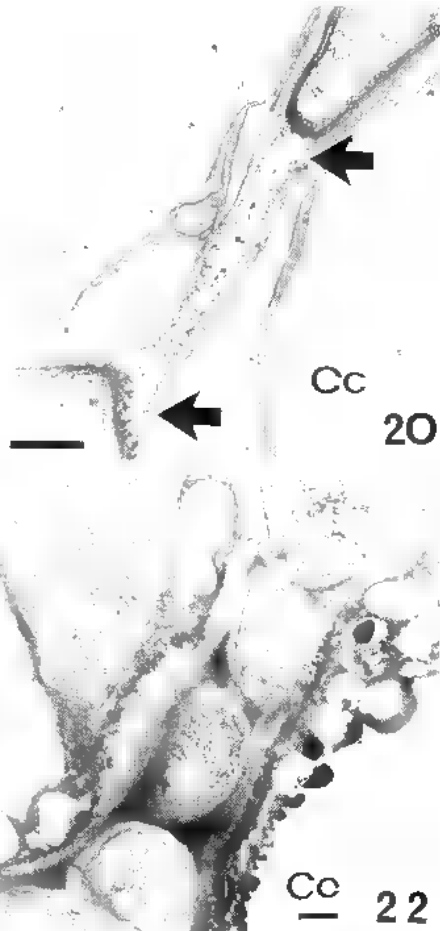
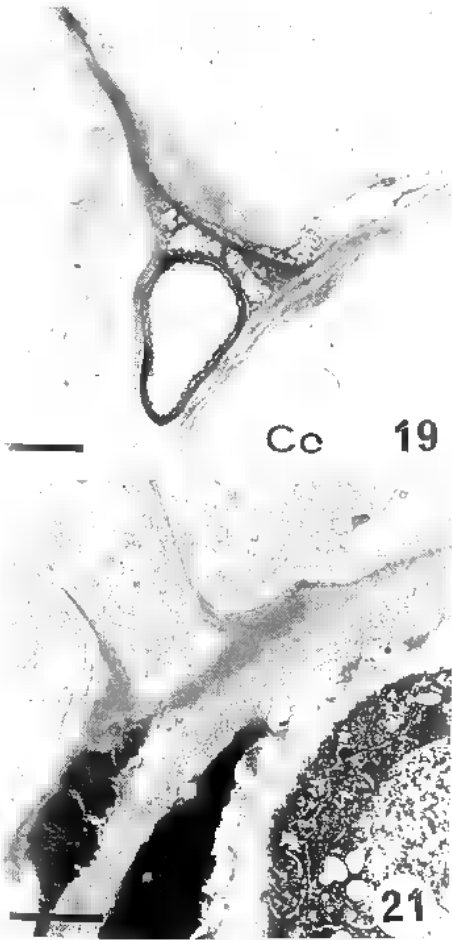
Fig. 23: Au stade plus avancé de la mycorrhization, les hyphes du réseau de Hartig sont peu vacuolisées alors que les cellules corticales (Cc) présentent un cytoplasme dégénéré. Test PATAg. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 23: In a more advanced stage of mycorrhization, the hyphae of Hartig net are not very vacuolized while the cortical cells (Cc) show a degenerated cytoplasm. PATAg test. Scale:  $1\mu\text{m}$ .

Fig. 24: Les cellules corticales et fongiques présentent un cytoplasme dégénéré dans la zone basale de la mycorrhize mature. Test PATAg. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 24: The cortical cells as well as the fungal cells present a degenerated cytoplasm in the basal zone of the mature mycorrhiza. PATAg test. Scale:  $1\mu\text{m}$ .











## CYTOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE DES INTERFACES PRÉSENTES DANS L'ASSOCIATION ECTOMYCORRHIZIENNE *TUBER MELANOSPORUM* VITT./ *CORYLUS AVELLANA* L.

Jean-Claude PARGNEY

Laboratoire de Biologie des Ligneux, B.P. n° 239,  
Université de Nancy I, 54506 Vandœuvre-les-Nancy  
Cedex, France.

**RÉSUMÉ** - L'association ectomycorhizienne *Tuber melanosporum* *Corylus avellana* est utilisée pour caractériser cytochimiquement les structures des différentes interfaces qui s'établissent à la suite de la symbiose. Les techniques employées sont, d'une part, des tests d'identification (test PATAg, complexe WGA-or colloïdal) et d'autre part, des digestions enzymatiques (pectinase, cytohélicase) et des extractions par l'EDTA, le DMSO et la MeNH<sub>2</sub>. Entre les hyphes, l'interface est créée par l'accrolement des parois fongiques et la formation d'un ciment interhyphal; elle est modifiée lors de la mort des cellules (manteau externe). Au niveau des zones de contact entre les deux partenaires, d'autres éléments interviennent dans la constitution du ciment comme les composés pectiques issus de la lamelle moyenne des cellules racinaires, entre les hyphes et les composés tanifères présents dans le manteau interne, des résidus pariétaux, provenant de cellules dans lesquelles se sont formés les tanins, sont incorporés au ciment.

**ABSTRACT** - The ectomycorrhizian association *Tuber melanosporum* *Corylus avellana* was used in order to determine the cytochemical characters of the different interfaces created by such symbiosis. This investigation was made by identification tests (test of PATAg, WGA-gold colloidal complex), enzymatic digestions (pectinase, cytohelicase) as well as chemical extractions (EDTA, DMSO and MeNH<sub>2</sub>). The observed interface between hypha is built by an adherence of the fungal walls followed by the formation of an interhyphal matrix and is modified by cell death (external coat). At the areas of contact between the two partners, matrix composition includes several other elements such as pectic components originating from the medial layer of root cells. Wall elements of tannic cells are incorporated into the matrix seen between the hypha and tannins present in the internal coat.

**MOTS CLÉS** : ectomycorhize, *Tuber melanosporum*, cytochimie.

### INTRODUCTION

*Tuber melanosporum* établit avec *Corylus avellana* des ectomycorhizes constituées d'un manteau bien développé et d'un réseau de Hartig (Pargney & Leduc, 1987, 1990). Les hyphes externes du manteau forment un tissu

mort périphérique. Les éléments fongiques vivants (manteau interne et réseau de Hartig) s'organisent autour des cellules corticales, en un ensemble fonctionnel remarquable, impliqué dans les échanges entre la plante et le champignon.

Dans les différentes zones de la mycorhize, il s'établit entre les cellules, des interfaces diverses. Dans le manteau, l'interface est constituée des plasmalemmes et des parois fongiques séparées par un ciment; lorsque les hyphes sont mortes comme dans le manteau externe, les plasmalemmes n'existent plus (Pargney & Leduc, 1990). Au niveau des jonctions entre les deux partenaires, tous deux participent à la constitution de l'interface; les contacts s'effectuent parfois directement par juxtaposition des parois (Foster & Marks, 1966; Duddridge & Read, 1984; Kottke & Oberwinkler, 1986), mais, le plus souvent, il s'établit entre les parois un ciment, appelé selon les auteurs, couche d'enrobage (Scannerini, 1968), matrice (Scannerini & Bonfante-Fasolo, 1983) ou zone d'apposition (Strullu, 1974; Strullu & Gerault, 1977; Nylund, 1981; Duddridge, 1986a,b).

Le ciment se distingue des parois par son contraste: dans les mycorhizes à Ascomycètes, il est dense aux électrons (Scannerini, 1968; Strullu & Gerault, 1977; Strullu & Gourret, 1980; Dexheimer et al., 1985), alors qu'il apparaît clair dans les mycorhizes à Basidiomycètes (Strullu, 1976a,b; Strullu & Gerault, 1977; Scannerini & Bonfante-Fasolo, 1983). Toutefois cette propriété pourrait dépendre du stade de développement de la mycorhize et de la souche fongique concernée (Kottke & Oberwinkler, 1986). Des études cytochimiques ont permis de confirmer la nature glycoprotéique du ciment (Pargney & Leduc, 1990) et de préciser l'origine de certains constituants (Pargney, 1990); au niveau du réseau de Hartig, il ne présente pas les mêmes caractéristiques cytochimiques que l'une ou l'autre des parois adjacentes (Pargney, 1990). Les essais de caractérisation cytochimique effectués sur les structures de l'interface au niveau du réseau de Hartig dans l'association Truffe Noisetier (Pargney, 1990) peuvent être généralisés aux autres interfaces afin de comparer et d'analyser les structures impliquées dans leur formation.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### MATERIEL

Des plants de *Corylus avellana* sont mycorhizés selon la technique de Chevalier & Grente (1978) par *Tuber melanosporum*. Après trois mois de culture en motte Melfert, les mycorhizes matures (de couleur brun clair) sont prélevées et débitées en courts fragments (0,5 à 1 mm de longueur); seules les zones apicales et subapicales sont fixées pour la microscopie électronique.

### TECHNIQUES DE CYTOCHIMIE ULTRASTRUCTURALE

Les échantillons sont fixés par le glutaraldéhyde à 2,5%, tamponné à pH 7,2 par le tampon cacodylate de sodium (à 4°C et pendant 6h). Après la-

vage, ils sont post-fixés au tétroxyde d'osmium à 1% dans le même tampon (à la température de la glace fondante et pendant 1h). Ils sont ensuite déshydratés, inclus dans de l'épon 812, puis coupés.

#### - Techniques de localisations

Les polysaccharides sont mis en évidence par le test PATAg (Thiery, 1967). Les coupes ainsi traitées servent également de référence pour apprécier les résultats obtenus après les digestions enzymatiques et les extractions chimiques subies par d'autres échantillons. La chitine est localisée sur coupe par utilisation du complexe WGA-or colloïdal permettant de détecter les résidus de N-acétylglucosamine qu'elle renferme (Roberts et al., 1983).

#### - Techniques de digestions enzymatiques

Après fixation par le glutaraldéhyde et rinçage dans le tampon cacodylate, les fragments de mycorhizes sont lavés dans une solution de sorbitol à 2%, puis incubés dans de la pectinase (Sigma), en solution à 5% dans du sorbitol à 2% et à pH 3,5, ou dans de la cytohélicase (IBF) en solution à 5% dans du sorbitol à 2% et à pH 5,8. Les digestions enzymatiques s'effectuent à 37°C pendant 48 et 72h. Les échantillons sont ensuite soigneusement lavés, post-osmiés, déshydratés et enrobés comme précédemment. Les coupes sont contrastées par le test PATAg.

#### Traitements chimiques

Les fragments de mycorhizes sont fixés au glutaraldéhyde, puis lavés dans le tampon cacodylate. Ils sont ensuite incubés dans un solvant chimique: acide éthylènediamine tétracétique (EDTA) en solution aqueuse à 1%, diméthylsulfoxyde pur (DMSO) ou méthylamine (MeNH<sub>2</sub>) en solution aqueuse à 40% (Reis & Roland, 1974; Reis, 1981). Les traitements s'effectuent à 25°C pendant 48 et 72h. Après lavage et post-fixation, les échantillons sont déshydratés et inclus dans l'Epon. Les coupes sont soumises au test PATAg.

## RÉSULTATS

L'étude ultrastructurale de la mycorhize, présentée dans d'autres publications (Pargney & Leduc, 1987, 1990; Pargney, 1990), a permis de définir trois zones: le manteau externe, le manteau interne et le réseau de Hartig (Fig. 1). Elles sont utilisées comme référence pour la présente étude.

### LOCALISATIONS ULTRASTRUCTURALES

Après application du test PATAg de localisation des polysaccharides, toutes les interfaces montrent un marquage important. Dans le manteau externe (Fig. 2), la paroi fongique et le ciment interhyphal sont très contrastés et la limite entre les différentes structures est souvent difficile à définir. Dans le manteau interne (Fig. 3), la paroi fongique apparaît pluristratifiée et la couche périphérique fortement marquée permet de mieux localiser le ci-

ment; les composés tanifères sont parfaitement distincts des structures pariétales. Au niveau du réseau de Hartig (Fig. 4), le ciment, la paroi des cellules racinaires et la couche externe de la paroi fongique présentent des densités électroniques voisines et leurs limites sont difficiles à discerner; la couche interne de la paroi fongique, moins dense, est par contre de délimitation plus aisée.

L'utilisation de la WGA associée à l'or colloïdal permet le marquage de la paroi fongique quelque soit la zone considérée (Fig. 5, 6, 7). Les grains d'or, isolés ou groupés, ne présentent pas de répartition préférentielle. Ils sont plus rares dans le ciment du manteau externe (Fig. 5) et quasiment absents de celui du manteau interne (Fig. 6) et du réseau (Fig. 7). Les composés tanifères (Fig. 6) et la paroi des cellules racinaires (Fig. 7) en sont dépourvus.

### **DIGESTIONS ENZYMATIQUES**

Après utilisation de la pectinase, les interfaces ont subi quelques modifications. On note un affaiblissement de l'intensité du test PATAg au niveau du ciment et ceci quelque soit la zone considérée (Fig. 8, 9, 10). Dans le manteau externe (Fig. 8), le ciment, moins dense, permet une meilleure appréciation des limites de la paroi fongique. Des zones d'altération sont particulièrement visibles au niveau des composés tanifères (Fig. 9) et dans le ciment du réseau de Hartig (Fig. 10). Les parois des hyphes et des cellules racinaires ne sont que faiblement modifiées même après des incubations prolongées (72h).

La cytohélécise a une action plus efficace. Dans le manteau externe (Fig. 11), le ciment et les parois fongiques sont partiellement attaqués. Au niveau du manteau interne (Fig. 12), le ciment est fortement altéré; les parois fongiques présentent une dégradation différentielle de leurs strates: la couche interne est fortement lysée alors que la couche périphérique reste bien marquée par le test PATAg. Dans le réseau (Fig. 13), les dégradations sont tout aussi remarquables: la couche interne de la paroi fongique et les parois des cellules racinaires sont très sensibles au traitement, le ciment est partiellement lysé et la couche externe de la paroi fongique demeure fortement réactive au test PATAg.

### **TRAITEMENTS CHIMIQUES**

Le traitement par l'EDTA entraîne un éclaircissement du ciment et des parois fongiques du manteau externe (Fig. 14). Dans le manteau interne (Fig. 15), le ciment montre une plus grande sensibilité au solvant; l'attaque est particulièrement importante au voisinage des composés tanifères. Dans le réseau de Hartig (Fig. 16), on observe également un éclaircissement du ciment et des structures pariétales des deux partenaires. Dans certains cas, on assiste, après utilisation de l'EDTA, à un gonflement des interfaces (Fig. 16).

Le traitement par la MeNH<sub>2</sub> provoque une altération partielle du ciment du manteau externe (Fig. 17); par contre, les parois fongiques semblent peu dégradées. Au niveau du manteau interne (Fig. 18), l'attaque est plus importante: le ciment et les composés tanifères sont fortement altérés ce qui

entraîne la séparation des hyphes les unes des autres. Dans le réseau de Hartig (Fig. 19), le ciment est également dissout. Les parois fongiques sont partiellement dégradées aussi bien dans le manteau interne (Fig. 18) que dans le réseau (Fig. 19).

Le traitement par le DMSO entraîne un éclaircissement des interfaces du manteau externe (Fig. 20) et du manteau interne (Fig. 21). Les composés tanifères sont particulièrement sensibles à ce traitement: les dégradations peuvent être périphériques (Fig. 22) ou plus profondes (Fig. 23). Dans le réseau (Fig. 24), le ciment est également altéré et les parois fongiques paraissent plus attaquées que dans le manteau. Sur des coupes favorables (Fig. 23), on peut observer la présence de restes de parois entre deux masses tanifères.

### DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans l'association ectomycorhizienne *Tuber melanosporum*/*Corylus avellana*, les interfaces qui s'établissent sont donc variées et dépendent, d'une part, des cellules mises en jeu et, d'autre part, de leur état physiologique. Elles sont construites sur le même modèle et sont constituées du plasmalemme et de la paroi d'une cellule, d'un ciment, de la paroi et du plasmalemme de la cellule adjacente; cependant, lorsque les cellules sont mortes, les plasmalemms n'interviennent plus.

La couche pariétale périphérique des hyphes est largement impliquée dans la formation des interfaces: elle crée entre les cellules fongiques, une zone d'accrolement et de contact, le ciment, qui permet leur aggrégation et l'édification du manteau (Boutekrabt & Pargney, 1990). Bien que d'origine fongique, le ciment ne renferme toutefois pas de chitine. Les rares grains d'or observés dans les parois des cellules corticales et dans le ciment ne permettent pas de conclure à la présence de chitine dans ces structures. Classicotte et al. (1987) ont également noté, lors d'une étude immuno-cytochimique de l'association ectomycorhizienne *Albus crispus*/*Alpova hplophloeus*, la présence d'un marquage dans les parois des cellules acinaires; celui-ci ne serait pas dû à la chitine, mais à la fraction glycoprotéique pariétale qui renferme de la N-acétylglucosamine (Harder et al., 1986).

Le ciment du manteau interne et celui du manteau externe ne présentent pas la même sensibilité aux différents traitements. A la suite de la dégénérescence des hyphes et de leur mort, le ciment est difficilement altérable. Les résultats obtenus avec la MeNH<sub>2</sub> sont particulièrement spectaculaires puisqu'ils montrent la dislocation des hyphes du manteau interne alors que l'altération est peu importante dans le manteau externe. Les causes de cette diversité de réponses pourraient provenir d'une variation dans la composition du ciment, mais aussi d'une différence de polymérisation. Dans le manteau interne, le ciment interhyphal présenterait une structure beaucoup moins stable que dans le manteau externe, vraisemblablement due à une différence de liaisons entre les polymères: ceux-ci sont difficilement déplaçables dans le manteau externe du fait d'une bonne cohésion, alors

qu'ils sont aisément extraits dans le manteau interne où les liaisons seraient moins nombreuses ou plus labiles. La dégénérescence puis la mort des hyphes entraînent donc une transformation profonde de l'interface aboutissant à la formation d'une structure stable et plus résistante aux solvants et aux enzymes. Diverses modifications y contribuent: modification de la structure de la paroi fongique dans laquelle les strates ne sont plus visibles, modification de celle du ciment qui devient peu sensible aux extractions et aux digestions enzymatiques, enfin, acquisition d'une plus grande homogénéité de l'interface qui se traduit par une uniformité de contraste des parois fongiques et du ciment.

Les composés tanifères sont sensibles à certaines extractions (pectinase, EDTA, DMSO et surtout MeNH<sub>2</sub>); les dégradations peuvent être périphériques ou plus profondes. Dans certains cas (après traitement par l'EDTA notamment), le ciment qui borde ces composés tanifères montre des altérations locales, plus prononcées que celles observées entre les hyphes, et qui traduisent une hétérogénéité de composition. A ce niveau, les polymères impliqués dans la constitution du ciment apparaissent donc de nature différente de ceux situés entre les hyphes. Le traitement par l'EDTA, classiquement utilisé pour caractériser certaines zones préférentielles, comme la lamelle moyenne des cellules (Reis, 1981), agit sur les structures riches en composés pectiques (Thibault, 1980); sa spécificité, testée au niveau de la lamelle moyenne des cellules corticales de ces mycorhizes (Pargney, 1990), permet de conclure à la présence le long des composés tanifères de constituants pectiques dont l'origine est à chercher dans les structures pariétales préexistantes qui les entouraient. Les composés tanifères sont issus de cellules racinaires devenues tanifères et dont les parois sont lysées lors de la mise en place du champignon (Boutekrabi & Pargney, 1990); des éléments pariétaux peuvent ainsi s'incorporer au ciment avoisinant. La figure 24 montre notamment des restes de structures pariétales entre des composés tanifères. Le ciment qui borde ces composés présente donc deux fractions d'origine différente: l'une est fongique comme dans les autres parties du manteau; l'autre est constituée de polymères issus de la lyse pariétale des cellules tanifères et qui n'ont pu être mobilisés par le champignon. L'édification de ce type d'interface nécessite une réorganisation entre les polymères fongiques et ceux issus des cellules tanifères, qui aboutit à la formation d'une nouvelle structure.

Dans le réseau de Hartig, le ciment qui s'établit entre les deux partenaires peut avoir plusieurs origines. La fraction glycoprotéique, détectée d'une part par le test PATAg, et d'autre part, par la réaction de Gomori (Pargney, 1990), proviendrait des parois des deux organismes (Debaud et al., 1981). L'utilisation des techniques de cytochimie ultrastructurale montre que des parentés existent entre les composés pariétaux des deux partenaires et les constituants du ciment qui les unit (Pargney, 1990). Certains constituants du ciment pourraient avoir une origine fongique, comme, par exemple, les polysaccharides non extraits par la cytohélicase abondants dans la couche externe de la paroi du champignon et qui sont également présents, en quantité plus réduite, dans le ciment. Enfin, d'autres constituants ont une origine racinaire: les extractions par la pectinase et l'EDTA révèlent une fai-

ble quantité de composés pectiques qui pourraient correspondre à des résidus de la lamelle moyenne des cellules corticales, libérés lors de la mise en place du réseau de Hartig (Debaud et al., 1981; Massicotte et al., 1986; Pargney, 1990; Boutekrabt & Pargney, 1990). Ces résidus détectés ne représentent que la partie des constituants de la lamelle moyenne non mobilisés par le champignon. L'édification du ciment au niveau du réseau de Hartig est donc le résultat de la transformation locale des structures pariétales et d'une réorganisation de polymères issus des deux partenaires conduisant à la mise en place d'une nouvelle structure.

Ainsi le ciment, qu'il soit interhyphal ou situé entre les deux partenaires, apparaît comme une structure d'accrochage, moins stable que les parois adjacentes et dont l'évolution semble cependant liée à celle des cellules qu'il unit: dans le manteau, lorsque les hyphes meurent, le ciment et les parois se transforment en une structure stable, cytologiquement homogène et difficilement altérable. Dans le réseau, d'autres composés peuvent être incorporés à ce ciment lors de la mise en contact du champignon entre les cellules de la plante-hôte; ils sont issus de la lyse partielle et de la transformation de certaines assises pariétales (lamelle moyenne et, peut-être, zone externe de la paroi). Lorsque les conditions de culture provoquent une dégénérescence rapide des cellules racinaires et des hyphes, le ciment se développe peu (Boutekrabt & Pargney, 1990). Par contre, lorsque les cellules restent fonctionnelles, il devient important. Il pourrait constituer une zone de l'interface dans laquelle les métabolites, qui migrent entre les deux partenaires, pourraient momentanément s'accumuler en fonction des besoins des symbiotes.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BOUTEKRABT A. et PARGNEY J.C., 1990 - Etude ultrastructurale de *Tuber melanosporum* en culture isolée et en association avec des vitroplants de *Quercus robur* et *Q. pubescens*. *Cryptogamic, Mycol.* 12: 25-45.
- CHEVALIER G. et GRENTE J., 1978 - Application pratique de la symbiose ectomycorrhizienne: production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe (*Tuber melanosporum* Vitt.). *Mushroom Sci.* X: 483-505.
- DEBAUD J.C., PEPIN R. et BRUCHET R., 1981 - Ultrastructure des ectomycorrhizes synthétiques à *Hebeloma alinum* et *Hebeloma marginatum* de *Dryas octopetala*. *Canad. J. Bot.* 59: 2160-2166.
- DEXHEIMER J., GERARD J., LEDUC J. P. et CHEVALIER G., 1985 - Etude ultrastructurale comparée des associations symbiotiques mycorrhiziennes *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia claveryi* et *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia leptoderma*. *Ibidem* 63: 582-591.
- DUDDRIDGE J. A. and READ D. J., 1984 - The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. I. Ectomycorrhizal development on pine in the field. *New Phytol.* 96: 565-573.
- DUDDRIDGE J. A., 1986 a - The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. III. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. and 11 species of ectomycorrhizal hosts in vitro in the absence of exogenous carbonate. *Ibidem* 103: 457-464.
- DUDDRIDGE J. A., 1986 b - The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. IV. Compatible and incompatible interactions between *Suillus*

- grevillei* (Klotzsch) Sing. and a number of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the presence of exogenous carbohydrate. *Ibidem* 103: 465-471.
- FOSTER R.C. and MARKS G. C., 1966 - Observations on the mycorrhizas of forest trees. I. The fine structure of the mycorrhizas of *Pinus radiata* D. Don. *Austral. J. Bot.* 19: 1027-1038.
- HARDER DE, CHONG J., RHORINGER R. and KIM W.K., 1986 - Structure and cytochemistry of the walls of urediospores, germ tubes, and appressoria of *Puccinia graminis tritici*. *Canad. J. Bot.* 64: 476-485.
- KOTTKE I. and OBERWINKLER F., 1986 - Mycorrhiza of forest trees - structure and function. *Trees* 1: 1-24.
- MASSICOTIE H. B., PETERSON R. L., ACKERLEY C. A. and PICHEN Y., 1986 - Structure and ontogeny of *Ahuss crispa*-*Alpova diplophloeus* ectomycorrhizae. *Canad. J. Bot.* 64: 177-192.
- MASSICOTTE H.B., ACKERLEY C.A. and PETERSON R.L., 1987 - Localization of three sugar residues in the interface of ectomycorrhiza synthesized between *Ahuss crispa* and *Alpova diplophloeus* as demonstrated by lectin binding. *Ibidem* 65: 1127-1132.
- NYLUND J.E., 1981 - The formation of ectomycorrhiza in conifers: Structural and physiological studies with special reference to the mycobiont *Piloderma croceum* (Erikss. and Hjortst.). *Acta Univ. Uppsala* 615: 3-34.
- PARGNEY J.C. et LEDUC J.P., 1987 - Etude ultrastructurale de la symbiose ectomycorrhizienne entre le Noisetier (*Corylus avellana*) et la Truffe (*Tuber melanosporum*). *Biol. Cell* 60: 13a.
- PARGNEY J.C., 1990 - Essais de caractérisation cytochimique des structures de l'interface au niveau du réseau de Hartig dans l'association ectomycorrhizienne entre la Truffe (*Tuber melanosporum*) et le Noisetier (*Corylus avellana*). *Canad. J. Bot.* 68 (sous presse).
- PARGNEY J. C. et LEDUC J. P., 1990 - Etude ultrastructurale de l'association mycorrhizienne Noisetier Truffe. (*Corylus avellana* / *Tuber melanosporum*). *Bull. Soc. Bot. France, Lettres Bot.* 137: 21-34.
- REIS D. et ROLAND J.C., 1974 - Mise en évidence de l'organisation des parois des cellules végétales en croissance par extractions ménagées des polysaccharides associés à la cytochimie ultrastructurale. *J. Microscop.* 20: 271-284.
- REIS D., 1981 - Cytochimie ultrastructurale des parois en croissance par extractions ménagées. Effets comparés du diméthylsulfoxyde et de la méthylamine sur le démasquage de la texture. *Ann. Sci. Nat., Bot.* 13: 121-136.
- ROBERTS R.L., BOWERS B., SLATER M.L. and CABIB E., 1983 - Chitin synthesis and localization in cell division cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cell. Biol.* 3: 922-930.
- SCANNERINI S., 1968 - Sull'ultrastruttura delle ectomicorrize. II. Ultrastruttura di una micorrizza di Ascomicete: *Tuber albidum* x *Pinus strobus*. *Allionia* 14: 77-95.
- SCANNERINI S. and BONFANTE-FASOLO P., 1983 - Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. *Canad. J. Bot.* 61: 917-943.
- STRUELLU D. G., 1974 - Etude ultrastructurale du réseau de Hartig d'une ectomycorhize à Ascomycètes de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Sér. D.* 278: 2139-2142.

- STRULLU D.G., 1976a - Etude des relations nutrition-développement et cytologie des mycorhizes chez le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) et les Abiétacées. Thèse Doct. Etat, Rennes.
- STRULLU D.G., 1976b - Contribution à l'étude ultrastructurale des ectomycorhizes à Basidiomycètes de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.). *Bull. Soc. Bot. France* 123: 5-16.
- STRULLU D. G. et GERAULT A., 1977 - Etude des ectomycorhizes à Basidiomycètes et à Ascomycètes du *Betula pubescens* (Ehrh.) en microscopie électronique. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Sér. D*, 284: 2243-2244.
- STRULLU D. G. et GOURRET J. P., 1980 - Données ultrastructurales sur l'intégration cellulaire de quelques parasites ou symbiotes de plantes. II. Champignons mycorrhiziens. *Bull. Soc. Bot. France, Actual. Bot.*, 127: 97-106.
- THIERY J.P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.*, 6: 987-1017.
- THIBAUT J.F., 1980 - Les substances pectiques. In: B. Monties, *Les polymères végétaux*. Coll. Biochimie appliquée. Paris, Gauthier-Villars: 232-251.

### LEGENDES DES PLANCHES

Fig. 1 - Détail d'une coupe transversale de la mycorhize montrant le manteau externe (ME), le manteau interne (MI) avec les composés tanifères (t) et le réseau de Hartig (RH) entre les cellules racinaires (C). Acétate d'uranyle-citrate de plomb. Echelle: 5 $\mu$ m.

Fig. 1 - Portion of a cross section of the mycorrhizae showing the outer sheath (ME), the inner sheath (MI) with the tannic substances (t) and the Hartig net (RH) between the root cells (C). Uranyl acetate-lead citrate staining. Scale: 5 $\mu$ m.

Fig. 2 à 4 - Test PATAg (échelle: 1 $\mu$ m). Fig. 2 - Manteau externe. Fig. 3 - Manteau interne. Fig. 4 - Réseau de Hartig. Les parois fongiques (h), celles des cellules racinaires (p) et le ciment (c) sont fortement marqués. La paroi des hyphes (h) montre une zone externe plus dense que la strate interne.

Fig. 2 to 4 - PATAg test (scale: 1 $\mu$ m). Fig. 2 - Outer sheath. Fig. 3 - Inner sheath. Fig. 4 - Hartig net. The fungal walls (h), the walls of the root cells (p) and the matrix (c) are electron dense. The fungal wall (h) shows an outer layer more electron dense than the inner layer.

Fig. 5 à 7 - Marquage par le complexe WGA-or colloïdal. Fig. 5 - Manteau externe. Echelle: 1 $\mu$ m. Fig. 6 - Manteau interne. Echelle: 1 $\mu$ m. Fig. 7 - Réseau de Hartig. Echelle: 0,5 $\mu$ m. Les résidus de N-acétylglucosamine sont localisés essentiellement dans les parois fongiques (h), mais rarement dans le ciment (c), les composés tanifères (t) et la paroi des cellules racinaires (p).

Fig. 5 to 7 - WGA-gold labelling. Fig. 5 - Outer sheath. Scale: 1 $\mu$ m. Fig. 6 - Inner sheath. Scale: 1 $\mu$ m. Fig. 7 - Hartig net. Scale: 0,5 $\mu$ m. Residues of N-acetylglucosamine are principally detected on the fungal walls (h), but rarely on the matrix (c), the tannic substances (t) or the wall of the root cells (p).

Fig. 8 à 10 - Digestion par la pectinase. Test PATAg (échelle  $1\mu\text{m}$ ). Fig. 8 - Manteau externe. Fig. 9 - Manteau interne. Fig. 10 - Réseau de Hartig. Le ciment (c) et la zone périphérique (flèches) des composés tanifères (t) sont partiellement altérés. Les parois des hyphes (h) et des cellules racinaires (p) ne sont que faiblement modifiées.

Fig. 8 to 10 - Action of pectinase. PATAg test (scale:  $1\mu\text{m}$ ). Fig. 8 - Outer sheath. Fig. 9 - Inner sheath. Fig. 10 - Hartig net. The matrix (c) and the periphery (arrows) of tannic substances (t) are partially damaged. The fungal walls (h) and the walls of the root cells (p) are slightly modified.

Fig. 11 à 13 - Digestion par la cytohelicase. Test PATAg. Fig. 11 - Manteau externe. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 12 - Manteau interne. Echelle:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 13 - Réseau de Hartig. Echelle:  $2\mu\text{m}$ . Les parois des hyphes (h), celles des cellules racinaires (p) et le ciment (c) sont plus ou moins attaqués.

Fig. 11 to 13 - Action of cytohelicase. PATAg test. Fig. 11 - Outer sheath. Scale:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 12 - Inner sheath. Scale:  $1\mu\text{m}$ . Fig. 13 - Hartig net. Scale:  $2\mu\text{m}$ . The fungal walls (h), the walls of the root cells (p) and the matrix (c) are more or less degraded.

Fig. 14 à 16 - Extraction par l'EDTA. Test PATAg (échelle:  $1\mu\text{m}$ ). Fig. 14 - Manteau externe. Fig. 15 - Manteau interne. Fig. 16 - Réseau de Hartig. Les parois des hyphes (h) et des cellules racinaires (p) sont peu altérées. Le ciment (c) est partiellement dégradé surtout le long des composés tanifères (t) du manteau interne (flèches) et au niveau du réseau de Hartig.

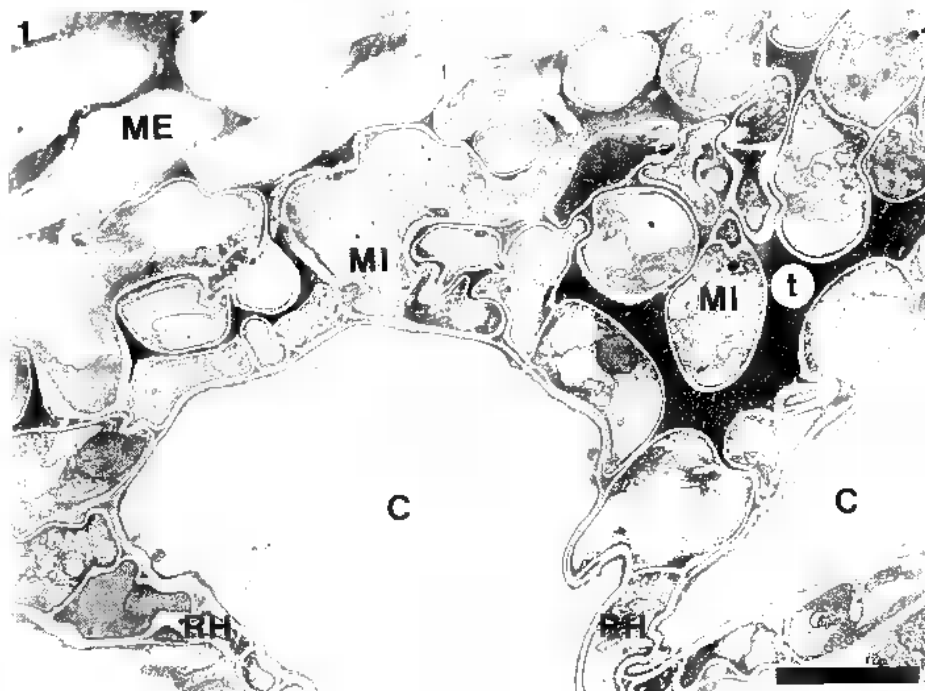
Fig. 14 to 16 - EDTA extraction. PATAg test (scale:  $1\mu\text{m}$ ). Fig. 14 - Outer sheath. Fig. 15 - Inner sheath. Fig. 16 - Hartig net. The fungal walls (h) and the walls of the root cells (p) are slightly modified. The matrix (c) is partially damaged essentially along tannic substances (t) inside the inner sheath (arrows) and in the Hartig net.

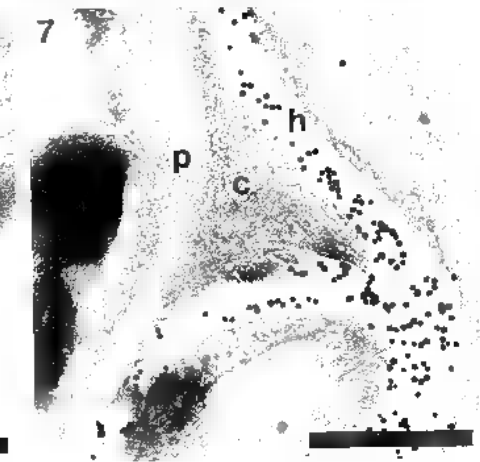
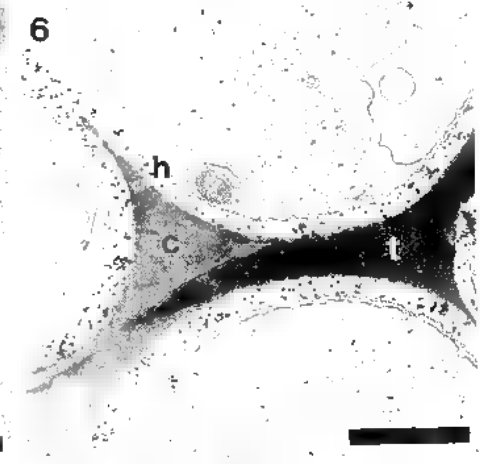
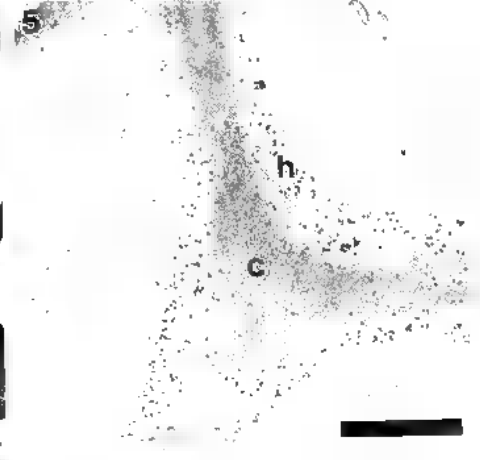
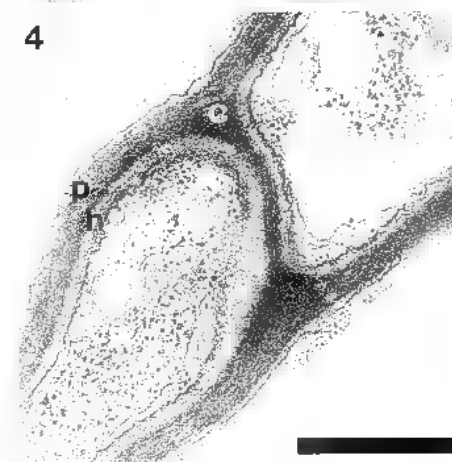
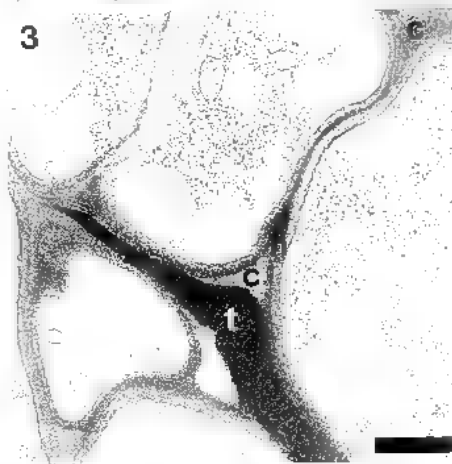
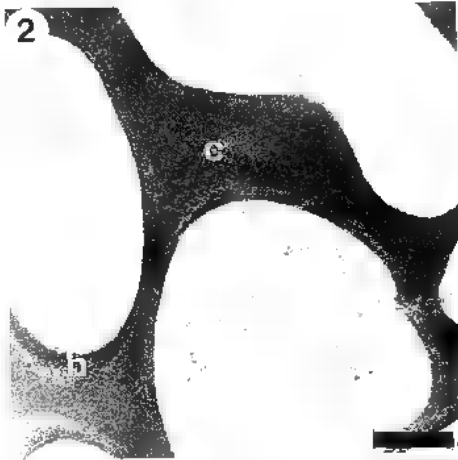
Fig. 17 à 19 - Extraction par la  $\text{MeNH}_2$ . Test PATAg (échelle:  $1\mu\text{m}$ ). Fig. 17 - Manteau externe. Fig. 18 - Manteau interne. Fig. 19 - Réseau de Hartig. Le ciment (c) et les composés tanifères (t) sont très dégradés. Les parois (h et p) sont également attaquées.

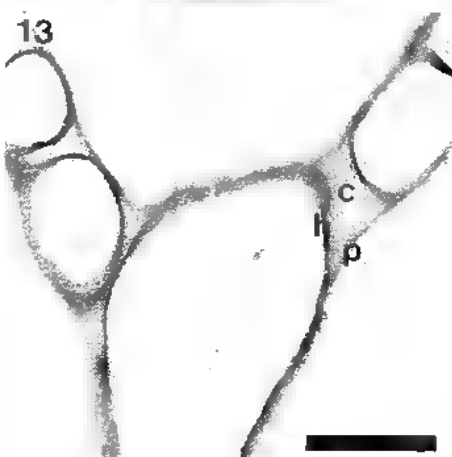
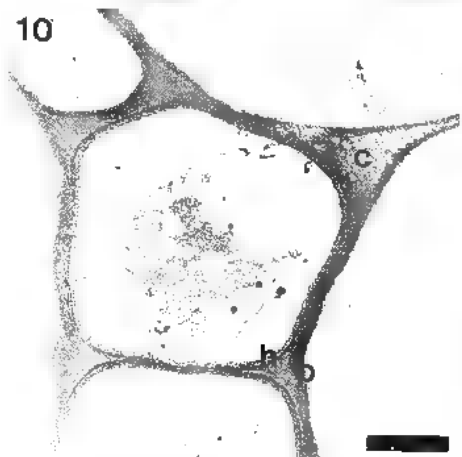
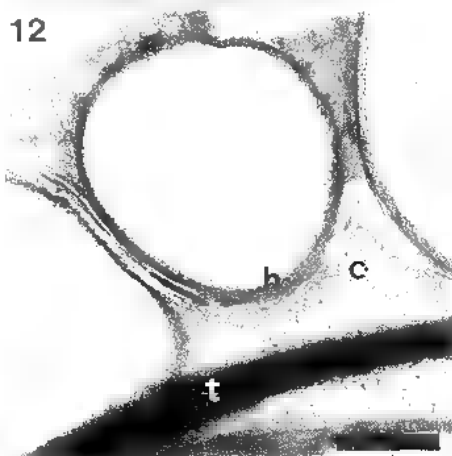
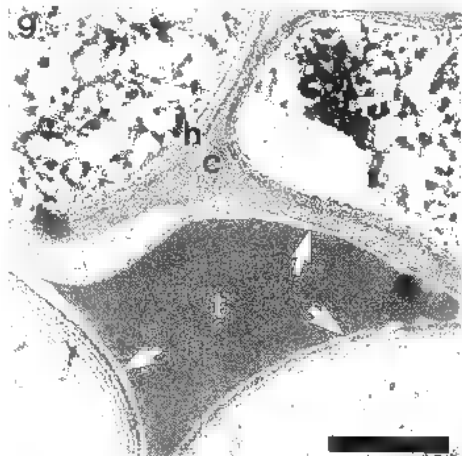
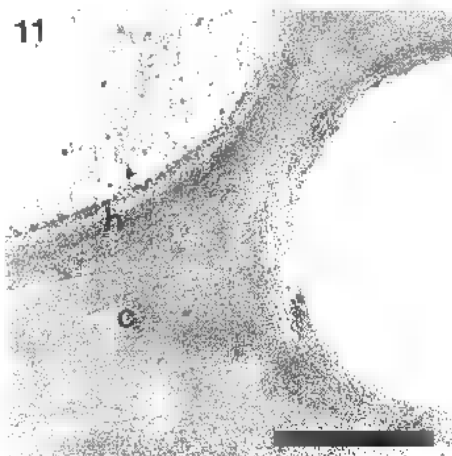
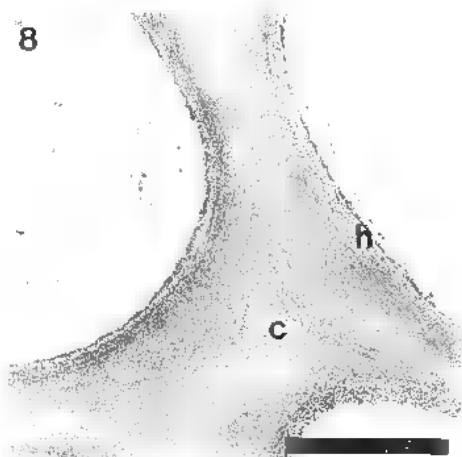
Fig. 17 to 19 -  $\text{MeNH}_2$  extraction. PATAg test (scale:  $1\mu\text{m}$ ). Fig. 17 - Outer sheath. Fig. 18 - Inner sheath. Fig. 19 - Hartig net. The matrix (c) and the tannic substances are highly degraded. The walls (h and p) are also modified.

Fig. 20 à 24 - Extraction par le DMSO. Test PATAg (échelle:  $1\mu\text{m}$ ). Fig. 20 - Manteau externe. Fig. 21 à 23 - Manteau interne. Fig. 24 - Réseau de Hartig. Les parois (h et p) et le ciment (c) sont plus ou moins altérés. Noter la dégradation partielle des composés tanifères (t) et la présence de structures pariétales entre deux masses tanifères (Fig. 23, flèches).

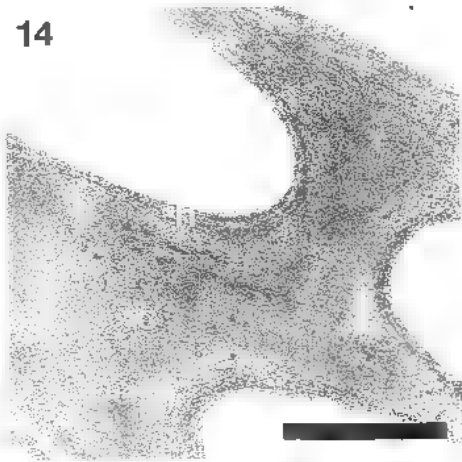
Fig. 20 to 24 - DMSO extraction. PATAg test (scale:  $1\mu\text{m}$ ). Fig. 20 - Outer sheath. Fig. 21 to 23 - Inner sheath. Fig. 24 - Hartig net. The walls (h and p) and the matrix are more or less degraded. Note a modification of tannic substances (t) and the presence of walls between two tannic areas (Fig. 23, arrows).



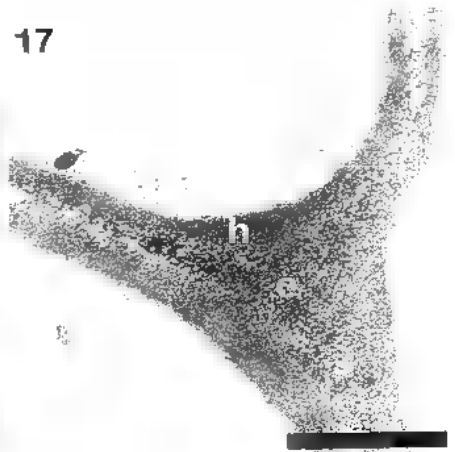




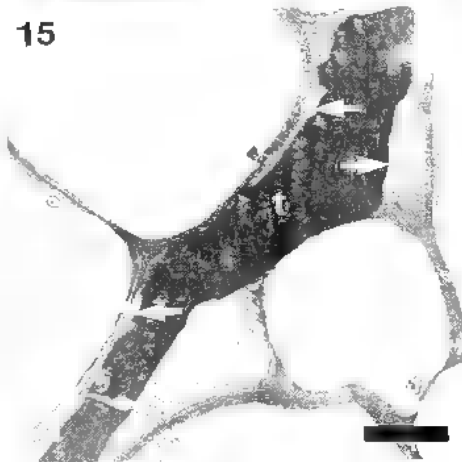
14



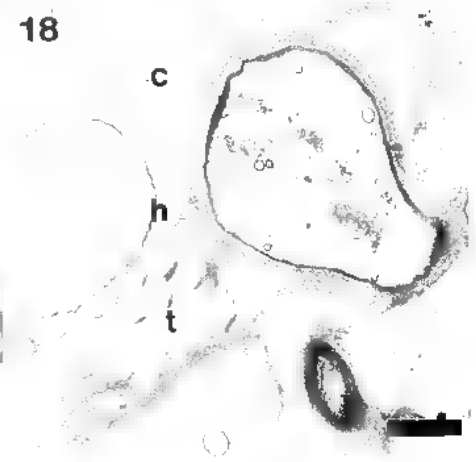
17



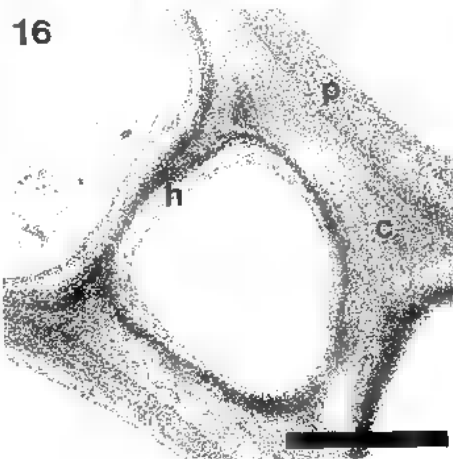
15



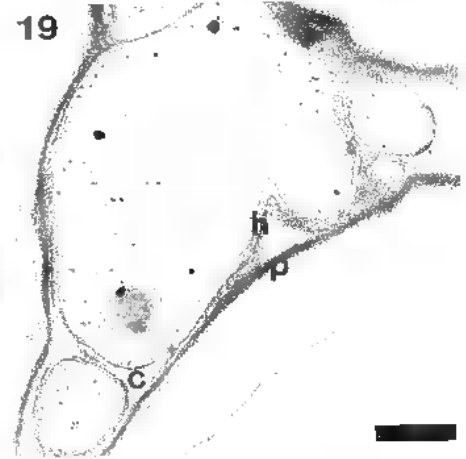
18



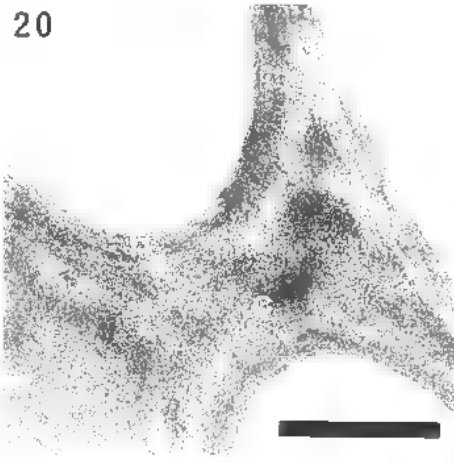
16



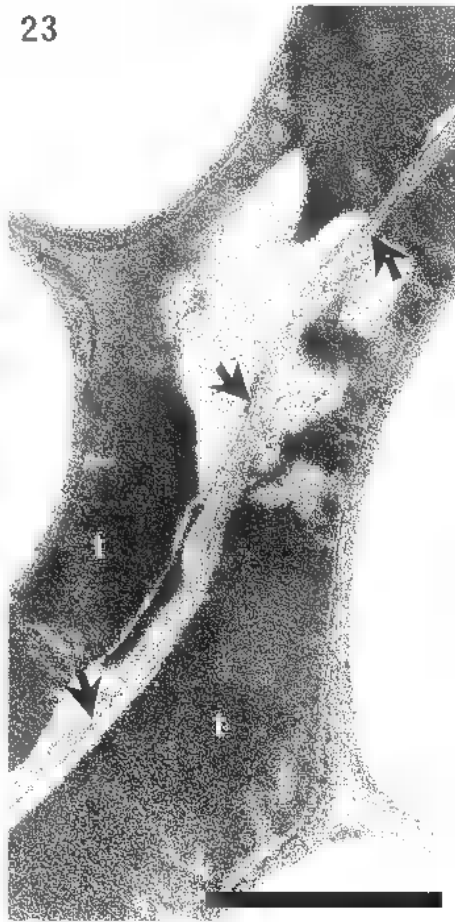
19



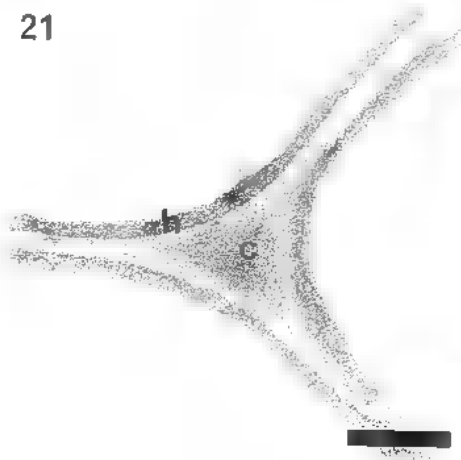
20



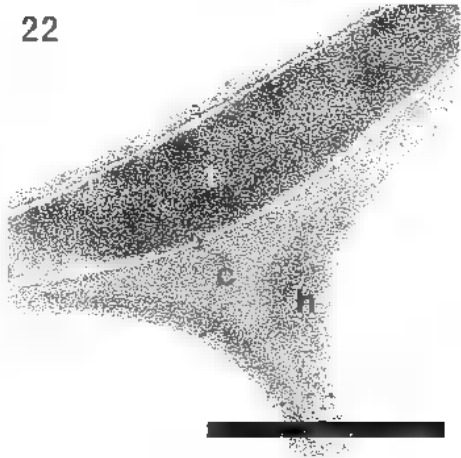
23



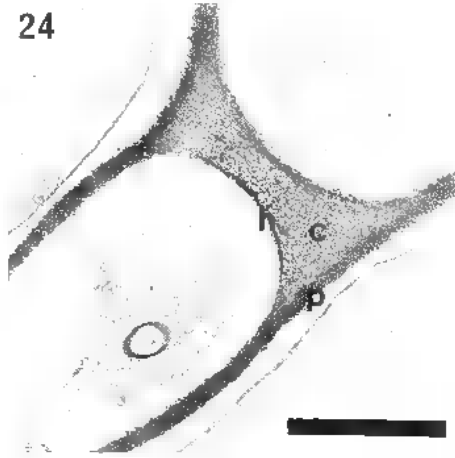
21



22



24





## FUNGI ON THE HAIR OF SMALL MAMMALS IN EGYPT

M.M.K. BAGY and A.Y. ABDEL-MALLEK

Botany Department, Faculty of Science, Assiut  
University, Assiut, Egypt.

**ABSTRACT** - Hair samples from small mammals were examined for the presence of keratinophilic and saprophytic fungi. 119 specimens were examined of which 58 were from rabbits, 25 from guinea pigs, 20 from mice, 14 from cats and 2 from rats. 23 genera and 53 species were isolated. The commonest in order of frequency were members of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. In low frequency, several dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporium* and *Arthroderma*) were recovered as well as some other fungal species pathogenic to man and animals (*Myceliophthora*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Circinella*, *Cylindrocarpon*, *Arthrotrrys*, *Drechslera*, *Trichoderma*, *Humicola* and *Acremonium*).

**RÉSUMÉ** - 23 genres et 53 espèces de champignons kératinophiles et saprophytes ont été isolés à partir de 119 échantillons de poils de petits mammifères (lapins, cobayes, souris, chats, rats). Les champignons les plus communs appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. En faible fréquence, plusieurs dermatophytes furent isolés (*Trichophyton*, *Microsporium* et *Arthroderma*), ainsi que quelques autres espèces pathogènes de l'homme et d'animaux (*Myceliophthora*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*, *Botryotrichum*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Scopulariopsis*, *Circinella*, *Cylindrocarpon*, *Arthrotrrys*, *Drechslera*, *Trichoderma*, *Humicola* and *Acremonium*).

**KEY WORDS** : Keratinophilic fungi, dermatophytes, Egypt.

### INTRODUCTION

Small free living mammals have been recognized as a source of both human and animal dermatophytes caused by the fungi (Ajello, 1959; Otcenasek & Dvorak 1962; Rees, 1967; Gugnani et al., 1975; Hubalek et al., 1979; Otcenasek et al., 1980; Aho 1983), and the isolations of dermatophytes and other keratinolytic fungi from the hair of mammals has been reviewed by several authors (Ajello, 1959; Marples, 1961, 1967; Otcenasek & Dvorak, 1962; Varsavsky & Ajello, 1964; Alteras et al., 1966; Smith et al., 1969; Hoffmann et al., 1970; Knudston & Roberstad, 1970; Mantovani & Morganti, 1971; Houin et al., 1972; Gugnani et al., 1975).

In Egypt, Bagy (1986) studied the frequency of fungi on the hair samples from dog, donkey and cow. Also, Bagy & Abdel-Hafez (1985) studied

Table 1: The occurrence of fungi on hair samples from Rabbits, Guinea pigs, Mice, Cats and Rats.  
 Tableau 1: Champignons isolés à partir d'échantillons de poils.

Genera and species	Rabbit (58)		Guinea pig (25)		Mice (20)		Cat (14)		Rat (2)		Total (112)	
	NCI	%	NCI	%	NCI	%	NCI	%	NCI	%	NCI	%
<i>Aspergillus</i>	58	100	20	80	14	70	11	78	2	100	105	88
<i>A. fumigatus</i> Fresenius	22	27	12	48	7	35	5	35	2	100	48	40
<i>A. flavus</i> Link	18	31	3	12	4	20	2	14	-	-	27	22
<i>A. niger</i> van Tieghem	14	24	5	20	3	15	3	21	-	-	25	21
<i>A. terreus</i> Thom	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
<i>A. sydowii</i> (Bain. & Sart.) Thom & Church	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
<i>A. nidulans</i> (Eidam) Winter	-	-	-	-	-	-	1	7	-	-	1	0.8
<i>Penicillium</i>	58	100	7	28	15	75	8	57	2	100	90	75
<i>P. chrysogenum</i> Thom	36	62	4	16	10	50	6	42	2	100	58	48
<i>P. martensii</i> Biourge	4	6	1	4	5	25	2	14	-	-	12	10
<i>P. funiculosum</i> Thom	6	10	1	4	-	-	-	-	-	-	7	6
<i>P. purpurogenum</i> Stoll	6	10	-	-	-	-	-	-	-	-	6	5
<i>P. corylophilum</i> Dierckx	2	3	1	4	-	-	-	-	-	-	3	2
<i>P. brevicompactum</i> Dierckx	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
<i>P. variabile</i> Sopp	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
<i>Chrysosporium</i>	58	100	9	36	2	10	8	57	2	100	79	66
<i>C. indicum</i> (Rand. & Sand.) Garg	24	41	3	12	-	-	3	21	-	-	30	25
<i>C. tepidum</i> Carmichael	16	27	3	12	-	-	2	14	-	-	21	17
<i>C. keratinophilum</i> (Frey) Carmichael	12	20	-	-	2	10	2	14	2	100	18	15
<i>C. parvum</i> (Emmons & Ashburn)	2	3	2	8	-	-	-	-	-	-	4	3
<i>C. pannorum</i> (Link) Hugh.	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
<i>C. sporophilum</i> Pipitt	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
<i>C. dermatitidis</i> (Gilchrist & Stokes) Carmichael	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	1	0.8
<i>P. queenslandicum</i> Apinis & Rees	-	-	-	-	-	-	1	7	-	-	1	0.8
<i>Mycetophthora</i>	18	31	8	32	4	20	2	14	1	50	33	27
<i>M. anamorph of Corynascus sepedonium</i> Emmons	18	31	8	32	4	20	1	7	1	50	32	26
<i>M. anamorph of Corynascus novoguineensis</i> Udagawa & Horie	-	-	-	-	-	-	1	7	-	-	1	0.8

FUNGI ON MAMMALS HAIR IN EGYPT

Genera and species	Rabbit (58)		Guinea pig (25)		Mice (20)		Cat (14)		Rat (2)		Total (119)	
	NCI	%	NCI	%	NCI	%	NCI	%	NCI	%	NCI	%
<i>Trichophyton</i>	21	36	10	40	2	10	6	42	-	-	39	33
<i>T. equinum</i> (Matruchot & Dassonville)	7	12	10	40	2	10	4	28	-	-	23	19
<i>T. mentagrophytes</i> (Robin) Blanchard	14	24	-	-	-	-	2	14	-	-	16	13
<i>Microsporum</i>	24	41	5	20	-	-	-	-	-	-	29	24
<i>M. boullardii</i> Dominik & Majchrowicz	20	34	3	12	-	-	-	-	-	-	23	19
<i>M. raemense</i> Borelli	4	6	2	8	-	-	-	-	-	-	6	5
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fries	8	13	13	52	2	10	2	14	1	50	26	21
<i>Micon</i>	18	31	2	8	1	5	2	14	-	-	23	19
<i>M. hiemalis</i> Mehner.	18	31	4	16	1	5	1	7	-	-	21	17
<i>M. raemense</i> Fresenius	-	-	1	4	-	-	1	7	-	-	2	1
<i>Fusarium</i>	8	13	5	20	2	10	1	7	1	50	17	14
<i>F. equiseti</i> (Corda) Saccardo	2	3	3	12	-	-	-	-	1	50	6	5
<i>F. moniliforme</i> Sheldon	6	10	-	-	-	-	-	-	-	-	6	5
<i>F. solani</i> (Martius) Saccardo	-	-	2	8	1	5	-	-	-	-	3	2
<i>F. oxysporum</i> Schlechtendahl	-	-	-	-	1	5	1	7	-	-	2	1
<i>Rhizopus</i>	10	17	3	12	1	5	1	7	-	-	15	12
<i>R. oryzae</i> Went & Geerligs	8	13	3	12	1	5	1	7	-	-	13	10
<i>R. stolonifer</i> (Ehrenb. ex. Fries) Lind.	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1
<i>Syncephalastrum raemense</i> Cohn ex. Schoret.	8	13	2	8	1	5	-	-	1	50	12	10
<i>Botryotrichum piluliferum</i> Saccardo & Marchal	8	13	-	-	1	5	1	7	-	-	10	8
<i>Chaetospirium chaetospirales</i> (Fres.) de Vries	6	10	3	12	-	-	-	-	-	-	9	7
<i>Altmania alternata</i> (Fr.) Keissler.	6	10	-	-	1	5	1	7	-	-	8	6
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bain.	2	3	2	8	2	10	2	14	-	-	8	6
<i>Circinella muscae</i> (Sorok) Berl. & Detoni	6	10	1	4	-	-	-	-	-	-	6	5
<i>Cylindrocarpon ellipticoides</i> Wollen	4	6	1	4	1	5	-	-	-	-	6	5
<i>Arthroderma nigropone</i> Corda	4	6	1	4	-	-	-	-	-	-	6	5
<i>Arthroderma spicifera</i> (Bain.) Van Arx	-	-	2	8	1	5	-	-	1	50	4	3
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex. Fr.	2	3	1	4	-	-	-	-	-	-	3	2
<i>Sporotrichum fuscicola</i> Traaen	-	-	2	8	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>Acremonium strictum</i> W. Gams	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	1	0.8

NCI = Number of cases of isolation. % = percentage count of occurrence.

the mycoflora of camel and goat hairs. The present investigation was undertaken to examine the occurrence of fungi on hair samples taken from rabbit, guinea pig, mice, cat and rat.

### MATERIAL AND METHODS

119 hair samples from rabbit, guinea pig, mice, cat and rat were collected from faculty of Agriculture and animal house of Faculty of Science, Assiut University. These samples were placed in a clean plastic bag and transferred immediately to the laboratory. The hair samples were placed on sterile soil moistened with sterile distilled water, remoistened whenever necessary, and incubated at room temperature for up to 10 weeks. The moulds which appeared on the baits were transferred to the surface of Sabouraud's dextrose agar medium (Moss & McQuown, 1969) which was supplemented with 20 units/ml of sodium penicillin and 40 µg/ml of dihydrostreptomycin. The plates were incubated at 28°C for 3-4 weeks and the developing colonies were examined and identified.

### RESULTS AND DISCUSSION

53 species which belong to 23 genera were recovered from rabbit, guinea pig, mice, cat and rat hairs (Table 1). *Aspergillus* was the most common genus on the hair of rabbit, guinea pig, mice, cat and rat and was encountered in 100, 80, 70, 78 and 100% of the samples respectively. Six species of *Aspergillus* were isolated from the five types of hair and these were *A. fumigatus* (40%), *A. flavus* (22%), *A. niger* (21%), *A. terreus* (1%), *A. sydowii* (1%) and *A. nidulans* (0.8%). Bagy (1986) isolated *A. flavus*, *A. sydowii*, *A. nidulans* and *A. fumigatus* from the hair of dog, donkey and cow and they were occurred in 4.6, 2.7, 2.3 and 0.8% of the samples respectively. Bagy & Abdel-Hafez (1985) also isolated *A. niger* (19.2%), *A. flavus* (13.3%), *A. sydowii* (10%), *A. nidulans* (9.2%), *A. fumigatus* (2.5%), *A. tamarii* (2.5%), *A. ustus* (2.5%) and *A. ochraceus* (1.7%) from the hair of camel and goat.

*Penicillium* was the second most frequent genus on the hair of rabbit, guinea pig, mice, cat and rat and emerged in 100, 28, 75, 57 and 100% of the samples respectively. It was represented by seven species of which *P. chrysogenum* was the most common species on the hair of the five animals. Bagy & Abdel-Hafez (1985) isolated *P. chrysogenum* (5%), *P. verruculosum* (3.3%), *P. funiculosum* (1.7%) and *P. islandicum* (0.8%) from the hair of camel and goat.

*Chrysosporium* came in third position. It was recorded in 100, 36, 10, 57 and 100% of rabbit, guinea pig, mice, cat and rat hair, respectively. Eight species of *Chrysosporium* were isolated from the five types of hair. *C. indicum* and *C. tropicum* occurred in 41, 12 and 21%, and 27, 12 and 14% of rabbit, guinea pig and cat hair respectively. Bagy & Abdel-Hafez (1985) isolated *C. indicum* from the hair of camel and goat which emerged in 8.3 and 20% of the samples respectively. *C. tropicum* was isolated from mammals in

Australia by Rees (1967), in Venezuela by Moraes et al. (1967), in India by Gugnani et al. (1975) and in Egypt by Bagy (1986).

*C. keratinophilum* was encountered in 20, 10, 14 and 100% of rabbit, mice, cat and rat hair respectively. It was isolated from mammals in Czechoslovakia (Otcenasek & Dvorak, 1962), Germany (Hoffmann et al., 1970), India (Gugnani et al., 1975) and Egypt (Bagy, 1986; Bagy & Abdel-Hafez, 1985). Bagy (1986) reported that *C. keratinophilum* was the most common species on the hair of dog, donkey and cow and was represented in 15.3, 32.9 and 22.1% of the samples respectively.

Five species of *Chrysosporium* were of less frequencies and these were *C. parvum* (rabbit, guinea pig), *C. pannorum* (rabbit), *C. xerophilum* (rabbit), *C. dermatitidis* (guinea pig) and *C. queenslandicum* (cat). Bagy & Abdel-Hafez (1985) isolated *C. pannorum*, *C. parvum* and *C. dermatitidis* less frequently from camel and goat hair (4.2, 1.7 and 0.8% of mammals examined respectively).

*Myceliophthora* occupied the fourth place and was represented by two species namely, *M.* anamorph of *Corynascus sepedonium* and *M.* anamorph of *Corynascus novoguineensis*. *M.* anamorph of *C. sepedonium* was isolated from the five types of hair comprising 26% of mammals examined. *M.* anamorph of *C. novoguineensis* was recorded only in cat hair constituting 0.8% of mammals examined. Bagy & Abdel-Hafez (1985) isolated *Myceliophthora vellerea* in low frequency from camel and goat hair (0.8% of mammals examined).

*Trichophyton* occupied the fifth place and was encountered in 36, 40, 10 and 42% of rabbit, guinea pig, mice and cat hair respectively. It was represented by two species namely, *T. equinum* and *T. mentagrophytes*.

*Microsporium* occupied the sixth place and was represented by two species namely, *M. boullardii* and *M. racemosum*. They were isolated only from rabbit and guinea pig hair. The isolation of dermatophytes and other keratinophilic fungi (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. phaeoforme*, *T. ajelloi*, *T. simii*, *T. terrestre*, *Microsporium racemosum*, *M. gypseum*, *M. persicolor*, *Arthroderma ciferri* and *A. insigulare*) from the hair of small free living mammals have been recorded by many workers (Ajello, 1959; Otcenasek & Dvorak, 1962; Varsavsky & Ajello, 1964; Borelli, 1965; Borelli & Feo, 1966; Houin et al., 1972 and Hubalek et al., 1979).

*Chaetomium globosum*, *Mucor hiemalis*, *Fusarium* spp., *Rhizopus oryzae*, *Syncephalastrum racemosum*, *Arthroderma* sp., *Botryotrichum piluliferum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata* and *Scopulariopsis brevicaudis* were isolated in low frequency from the five types of hair tested and were represented in 6-21% of the samples.

*Circinella muscae*, *Cylindrocarpon cylindroides*, *Arthrotrichum oligospora*, *Drechslera spicifera*, *Trichoderma viride*, *Hemicola fuscoatra* and *Acremonium strictum* were less common and emerged in 0.8-5% of the samples of mammals tested (Table I).

Most of the preceding genera and species were isolated previously from the hairs of dog, donkey, cow, camel and goat as recommended by Bagy (1986) and Bagy & Abdel-Hafez (1985).

## REFERENCES

- AHO R., 1983 - Saprophytic fungi isolated from the hair of domestic and laboratory animals with suspected dermatophytosis. *Mycopathologia* 83: 65-73.
- AJELLO L., 1959 - A new *Microsporium* and its occurrence in soil and on animals. *Mycologia* 51: 69-76.
- ALIERAS I., NESTEROV V. and CIOLOFAN I., 1966 - The occurrence of dermatophytes in wild animals from Romania. *Sabouraudia* 4: 215-218.
- BAGY M.M.K. and ABDEL-HAFEZ A.I.I., 1985 - Mycoflora of camel and goat hairs from Al-Arish, Egypt. *Mycopathologia* 92: 125-128.
- BAGY M.M.K., 1986 - Fungi on the hair of large mammals in Egypt. *Mycopathologia* 93: 73-75.
- BORELLI D., 1965 - *Microsporium vacemosum* nova species. *Acta Med. Venezuelana* 12: 148-151.
- BORELLI D. and FEO M., 1966 - *Trichophyton phaseoliforme* nova species. *Med. Cutan.* 1: 165-172.
- GUGNANI H.C., WATTAL B.L. and SANDHU R.S., 1975 - Dermatophytes and other keratinophilic fungi recovered from small mammals in India. *Mykosen* 18: 529-538.
- HOFFMANN R., KOLIPP D. and KOCH H.A., 1970 - Die Bedeutung von Mäusen und andern Kleinsäugetern für die Verbreitung von Dermatophyten und andern keratinophilen Pilzen. *Mykosen* 13: 383-387.
- HOUIN R., ROUGET-CAMPANA Y., LE FICHOUX Y., LANCASTRE F., BAZIN J.C., DENIAU M. et BOLOGNINI J., 1972 - Isolement de *Trichophyton mentagrophytes* (Rohin) Blanchard 1896, *Nannizzia persicolor* Stockdale 1967 et *Trichophyton terrestre* Durie et Frey 1957, du pelage de rongeur. *Ann. Parasitol. Humaine Comp.* 47: 421-429.
- HUBALEK Z., ROSICKY B. and OTCENASEK M., 1979 - Fungi on the hair of small wild mammals in Czechoslovakia and Yugoslavia. *Ceská Mykol.* 33: 81-93.
- KNUDSTON W.U. and ROBERTSTAD G.W., 1970 - The isolation of keratinophilic fungi from soil and wild animals in south Dakota. *Mycopathologia* 40: 309-323.
- MANTOVANI A. and MORGANTI L., 1971 - Ricerche sui dermatofiti die mammiferi in Italia. *Vet. Ital.* 22: 460-471.
- MARPLES M.J., 1961 - Some extra-human reservoirs of pathogenic fungi in New Zealand. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.* 55: 216-220.
- MARPLES M.J., 1967 - Non-domestic animals in New Zealand and in Rarotonga as a reservoir of the agents of ringworm. *New Zealand. Med. J.* 66: 299-302.
- MORAES M., BORELLI D. and FEO M., 1967 - *Microsporium amazonicum* nova species. *Med. Cutan.* 2: 281-286.
- MOSS E.S. and McQUOWN A.L., 1969 - *Atlas of Medical Mycology*. 3rd ed. Baltimore, Williams & Wilkins Comp.

- OTCENASEK M. and DVORAK J., 1962 - The isolation of *Trichophyton terrestre* and other keratinophilic fungi from small mammals of south eastern Moravia. *Sabouraudia* 2: 111-113.
- OTCENASEK M., HUBALEK Z. and SIXL W., 1980 - Survey of dermatophytes in the hair of small mammals from Austria. *Folia Parasitol. (Praha)* 27: 83-87.
- REES R.G., 1967 - Keratinophilic fungi from Queensland. I. Isolations from animal hair and scales. *Sabouraudia* 5: 165-172.
- SMITH J.M.B., RUSH-MUNRA F. and McCARTHY M., 1969 - Animals as a reservoir of human ringworm in New Zealand. *Austral. J. Dermatol.* 10: 169-182.
- VARSAVSKY E. and AJELLO L., 1964 - The perfect and imperfect forms of a new keratinophilic fungus *Arthroderma cijerrii* sp. nov. *Trichophyton georgii* sp. nov. *Rivista Patol. Veg.*, Ser. 3, 4: 351-364.



## MORPHOLOGICAL, CULTURAL AND PATHOGENIC VARIATIONS IN *SCLEROTIUM ROLFSSII* SACC. CAUSING ROOT ROT OF SUGARBEET

Bhim Sen SHARMA, V.N. PATHAK and Kalpna BHATNAGAR

Plant Pathology Section, Agricultural Research Station, Rajasthan Agricultural University, Durgapura, Jaipur - 302001, India.

**ABSTRACT** - Variability in the *Sclerotium* root rot of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) pathogen (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) was studied in 5 isolates collected from different sugarbeet-growing areas in Sriganganagar, Rajasthan State. Isolate Sr. 1 displayed significantly higher growth together with maximum number, size and weight of sclerotia than rest of the isolates. Oat meal agar and potato dextrose agar proved to be the best media for growth and formation of sclerotia, respectively. Isolate Sr. 1 proved most aggressive and caused higher incidence of seedling blight and root rot.

**RÉSUMÉ** - La variabilité de *Sclerotium rolfsii*, agent de la pourriture de racine de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* L.), est étudiée pour 5 isolements provenant de différents champs de betterave à Sriganganagan, Etat du Rajasthan. L'isolat Sr. 1 montre une croissance significativement plus importante, ainsi qu'un nombre, une taille et un poids de sclérotés maximaux. Il est également le plus agressif. Le milieu PDA est le meilleur pour la formation des sclérotés tandis que le milieu gélosé à la farine d'avoine donne une meilleure croissance.

**KEY WORDS** : Sugarbeet, *Beta vulgaris*, root rot, *Sclerotium rolfsii*, variability.

Root rot of sugarbeet incited by *Sclerotium rolfsii* Sacc. is a very destructive disease in various countries including India. Since no disease management strategy can be perfect without understanding variability in pathogen, the present investigation was aimed to find out morphological, cultural, pathogenic and physiological variations in *S. rolfsii* causing root rot of sugarbeet in Rajasthan.

### MATERIALS AND METHODS

**Preparation of isolates:** The fungus was isolated, purified and single-hyphal-tip cultures of 5 isolates collected from 5 distant areas of Sriganganagar designated as Sr. 1, Sr. 2, Sr. 3, Sr. 4, Sr. 5 were maintained on potato dextrose agar at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Cultural and morphological variations:** Variation in growth and production of sclerotia (shape, size, colour and weight of sclerotia) were recorded by growing the isolates on 7 agar media viz., Asthana & Hawker's, Brown's, Czapek's, Oat Meal, Potato dextrose, Richards' and Sabouraud's medium. The amount of growth was recorded 4 days after inoculation by measuring radial growth along 2 diameters at right angle to each other from each of the 5 replicates. Number of sclerotia formed were counted 15 days after inoculation.

**Morphology of sclerotia produced in culture:** For each 15-day-old culture medium, 25 sclerotia were randomly picked up and observed visually for shape and colour. To record the size, each sclerotium was measured with the help of a calibrated microscope. To record weight, sclerotia of all the 4 replications were mixed (with a total of 100 sclerotia) and weighed on an analytical balance.

**Morphology of sclerotia produced on host:** Sugarbeet plants of cv. Ramonskaya raised under aseptic conditions in 30cm earthen pots were inoculated 4 months after sowing by placing 5 sclerotia (1.0-1.1mm dia) of each isolate in the root zone of each plant. Sclerotia were collected from 20-day-old culture grown in sterilized soil (100g) amended with 8% wheat bran. Eight plants were inoculated with each of the 5 isolates. At the time of harvesting (175-day-old crop), 4 roots infected with each isolate were selected. From each root, 25 sclerotia were randomly collected and their morphological observations were recorded.

**Pathogenic variations:** 2 types of symptom incited by *S. rolfii* are seedling blight and root rot. Attempts were made to detect pathogenic variability amongst the isolates in both phases of the disease.

**Seedling blight:** Plants of sugarbeet cv. Ramonskaya were raised in 30cm earthen pots and inoculated in the manner as described above. Uninoculated plants served as check. The seedlings were accommodated in a green house where maximum and minimum temperatures fluctuated from 24 to 38°C and 10 to 26°C, respectively and relative humidity ranged from 21 to 94%. There were 5 replications with 3 pots (15 seedling in each pot) under each replication. The disease incidence was recorded 20 days after inoculation using the formula,

$$\text{Disease incidence} = \frac{\text{Number of infected plants}}{\text{Number of plants inoculated}} \times 100$$

**Root rot:** The plants of cv. Ramonskaya raised as described above were inoculated in the second week of February, 1982 when they were 4-month-old. The plants were accommodated in a green house where maximum and minimum temperatures fluctuated from 18 to 39°C and 6 to 26°C, respectively and relative humidity ranged from 21 to 97%. There were 6 replications with 10 pots in each replication. Observations of disease incidence were recorded at the time of harvest.

## OBSERVATIONS

**Cultural variation:** Isolate Sr. 1 displayed significantly ( $p=0.05$ ) higher growth (Tab. 1) than rest of the isolates. The other 4 isolates did not differ significantly amongst themselves. All the media differed significantly ( $p=0.05$ ) from each other in favouring growth of the fungus except that the growth supported by Brown's agar, Sabouraud's agar and Czapek's agar was statistically at par ( $p=0.01$ ). Oat meal agar proved to be the best medium and Asthana & Hawker's agar the poorest. The isolates x media interactions were not significant.

Table 1: Radial growth (recorded 4 days after inoculation) of 5 isolates of *S. rolfssii* on different culture media at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Data are mean of 5 replications.

Tableau 1: Croissance (4 jours après l'inoculation) des 5 isolats de *S. rolfssii* sur différents milieux à  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  (moyenne de 5 expériences).

		Radial growth (mm)					
Medium	Isolates	Sr. 1	Sr. 2	Sr. 3	Sr. 4	Sr. 5	Mean of media
P.D.A.		78.8	75.2	75.0	75.2	74.8	76.00
Oat Meal Agar		88.8	86.0	87.6	87.8	84.8	87.00
Brown's Agar		53.4	51.2	50.2	49.2	49.8	50.76
Richards' Agar		64.0	60.8	62.4	60.8	62.2	62.04
Sabouraud's Agar		50.0	51.4	51.6	51.6	50.2	50.96
Asthana & Hawker's Agar		45.8	43.4	48.2	47.8	41.2	45.28
Czapek's Agar		56.0	53.6	48.6	47.2	52.6	51.60
Mean of Isolate		62.4	60.23	60.51	60.08	59.37	
		C.D. at 5%			C.D. at 1%		
Isolate (I)		1.77			N.S.		
Media (M)		2.09			2.75		
Interaction (I x M)		N.S.			N.S.		

Maximum number of sclerotia were formed by isolates Sr. 1. This number was significantly ( $p=0.05$ ) more than that formed by any other isolate. There was no significant difference ( $p=0.05$ ) in number of sclerotia formed by Sr. 2, Sr. 3 and Sr. 4 (Tab. 2). Potato Dextrose Agar was most favourable medium for formation of sclerotia. The number of sclerotia formed on this medium was significantly ( $p=0.01$ ) more than that on any other medium. Richards' agar medium supported minimum number of sclerotia. Media x isolates interactions were not significant for number of sclerotia.

Table 2: Number of sclerotia (recorded 4 days after inoculation) formed by the 5 isolates of *S. rolfsii* on different culture media at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Data are mean of 5 replications.

Tableau 2: Nombre de sclérotés formés (4 jours après l'inoculation) pour les 5 isolats de *S. rolfsii* sur différents milieux à  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  (moyenne de 5 expériences).

Medium	Isolates	Number of sclerotia					Mean of media
		Sr. 1	Sr. 2	Sr. 3	Sr. 4	Sr. 5	
P.D.A.		173.6	167.4	156.2	153.4	143.2	158.76
Oat Meal Agar		150.8	145.6	142.8	153.2	137.4	145.96
Brown's Agar		60.4	50.0	49.8	48.2	57.6	55.20
Richards' Agar		36.6	38.0	35.2	35.6	36.6	36.40
Sabouraud's Agar		110.4	106.6	98.6	105.0	100.0	104.24
Asthana & Hawker's Agar		84.2	70.2	72.8	62.8	65.4	71.08
Czapek's Agar		52.8	54.0	52.8	57.8	53.8	54.24
Mean of Isolate		95.54	90.26	86.88	89.43	84.94	
		C.D. at 5%			C.D. at 1%		
Isolate (I)		4.49			5.90		
Media (M)		5.31			6.98		
Interaction (I x M)		N.S.			N.S.		

### Morphological and physiological variations:

- On culture media: the size of sclerotia varied significantly ( $p = 0.01$ ) with the isolate as well as with the type of media used. Isolate Sr. 1 produced largest sized sclerotia (mean dia: 1.375mm). Sr. 3, Sr. 4 and Sr. 5 did not differ significantly ( $p = 0.01$ ) in respect of sclerotial size. Sclerotia produced on Sabouraud's agar were the largest (mean dia: 1.423mm) (Tab. 3), however, in size they were statistically at par ( $p = 0.01$ ) with those produced on Asthana & Hawker's medium. Size of sclerotia was significantly ( $p = 0.01$ ) smaller on Brown's agar (mean dia: 1.111mm) than on rest of the media. Isolates x media interactions were significant ( $p = 0.01$ ) for the size of sclerotia. Shape of sclerotia was spherical to sub-spherical and it was similar in all the isolates on different media. The colour of sclerotia of all the isolates was white at first later turning to reddish-brown and finally to dark-brown. The type of medium neither influenced the colour nor the shape of sclerotia formed. On different culture media, maximum weight of 100 sclerotia was recorded in Sr. 1 (86.86 mg, Tab. 4) followed by Sr. 4, Sr. 2 and Sr. 3. Out of 7 media, Sabouraud's medium supported highest sclerotial weight (93.80mg) while the lowest sclerotial weight (77.6mg) was recorded on Potato Dextrose Agar.

Medium	Isolates	Size - dia (mm)					Mean of media
		Sr. 1	Sr. 2	Sr. 3	Sr. 4	Sr. 5	
Potato Dextrose Agar	1.309 (.77-1.68)	1.274 (.875-1.75)	1.211 (.875-1.75)	1.221 (.875-1.575)	1.204 (.875-1.575)	1.244	
Oat Meal Agar	1.384 (.875-2.1)	1.360 (.98-2.1)	1.346 (.875-1.925)	1.306 (.875-2.1)	1.285 (.91-2.1)	1.337	
Brown's Agar	1.188 (.77-1.575)	1.115 (.77-1.575)	1.100 (.63-1.575)	1.047 (.77-1.575)	1.104 (.77-1.575)	1.111	
Richards' Agar	1.422 (.455-2.66)	1.373 (.77-2.32)	1.099 (.595-1.75)	1.087 (.525-1.75)	1.054 (.56-1.75)	1.207	
Sabouraud's Agar	1.509 (.7-2.485)	1.499 (.735-2.8)	1.273 (.63-2.73)	1.467 (.56-2.835)	1.363 (.45-2.66)	1.423	
Asthana & Hawker's Agar	1.408 (.7-2.275)	1.342 (.7-2.275)	1.341 (.875-2.135)	1.363 (.805-2.135)	1.320 (.77-2.1)	1.355	
Czapek's agar	1.407 (.77-2.45)	1.347 (.77-2.1)	1.376 (.77-2.275)	1.251 (.63-2.135)	1.335 (.7-2.135)	1.343	
Media (M)		C.D. at 5%					
Isolate (I)		0.052					
Interaction (I x M)		0.044					
		0.115					
		C.D. at 1%					
		0.068					
		0.058					
		0.153					

Table 3: Size of the sclerotia of *S. rolfssii* on different culture media. Data are mean of 4 replications (in parentheses are ranges of size).

Tableau 3: Taille des sclérotés des 5 isolats de *S. rolfssii* sur différents milieux (moyennes de 4 expériences).

Table 4: 100-sclerotia-weight of 5 isolates of *S. rolfsii* on different media.Tableau 4: Poids de 100 sclérotés pour les 5 isolats de *S. rolfsii* sur différents milieux.

Medium	Isolates	Weight (mg)					Mean of media
		Sr. 1	Sr. 2	Sr. 3	Sr. 4	Sr. 5	
P.D.A.		85	79	75	75	74	77.6
Oat Meal Agar		85	76	78	86	75	80.6
Brown's Agar		79	87	79	88	73	81.2
Richards' Agar		90	81	78	80	79	81.6
Sabouraud's Agar		100	94	94	91	90	93.8
Asthana & Hawker's Agar		80	79	79	88	81	81.4
Czapek's Agar		89	79	88	79	78	82.6
Mean of isolate		86.86	82.14	81.57	83.85	78.57	

- On sugarbeet plant: significantly ( $p=0.01$ ) larger sclerotia were observed in Sr. 1 (mean dia: 1.595mm). Isolate Sr. 2 produced smallest (mean dia: 1.305mm) sclerotia (Tab. 5).

The weight of sclerotia also varied with the isolate. The sclerotia of isolate Sr. 1 had maximum weight (121mg 100 sclerotia) whereas sclerotia of Sr. 5 had minimum weight (74mg 100 sclerotia) (Tab. 5). No differences in shape and colour of sclerotia were observed amongst different isolates.

Table 5: Variation in diameter and weight of sclerotia of the 5 isolates of *S. rolfsii* formed on sugar beet cv. Ramonskaya. Data on size are mean of 4 replications (25 sclerotia per replication).Tableau 5 - Variation du diamètre et du poids des sclérotés des 5 isolats de *S. rolfsii*, sur betterave à sucre cv. Ramonskaya (4 exp., 25 sclérotés par exp.).

Isolates	Size of sclerotia (dia in mm)		Weight of 100 sclerotia (mg)
	Mean	Range	
Sr. 1	1.595	0.35 - 2.8	121
Sr. 2	1.305	0.49 - 2.45	113
Sr. 3	1.558	0.91 - 2.73	84
Sr. 4	1.445	0.77 - 2.45	117
Sr. 5	1.425	0.49 - 2.62	74
C.D. at 5%		0.12	
C.D. at 1%		0.17	

**Pathological variability (pathogenic variations):** Isolate Sr. 1 caused significantly ( $p=0.01$ ) higher incidences of seedling blight (97.33%) as well as root rot (91.66%) than rest of the isolates (Tab. 6). Isolates Sr. 2, Sr. 3, Sr. 4 and Sr. 5 did not exhibit significant ( $p=0.01$ ) difference among themselves in causing incidences of seedling blight as well as root rot.

Table 6: Pathogenic variability amongst the 5 isolates of *S. rolfsii* in causing seedling blight (mean of 5 replications) and root rot (mean of 6 replications) phases of *Sclerotium* root rot of sugar beet (in parentheses are angular values).

Tableau 6: Pathogénicité des 5 isolats de *S. rolfsii* vis-à-vis de la betterave à sucre.

Isolates	Disease incidence (%)	
	Seedling blight phase	Root rot phase
Sr. 1	97.33 (81.61)	91.66 (76.36)
Sr. 2	70.22 (56.92)	68.33 (55.89)
Sr. 3	68.44 (55.84)	70.00 (56.89)
Sr. 4	67.09 (55.05)	68.33 (55.89)
Sr. 5	67.99 (55.55)	70.00 (56.89)
C.D. at 5% <sup>a</sup>	4.18	7.49
C.D. at 1% <sup>a</sup>	5.70	10.13

## DISCUSSION

Allison (1952), Higgins (1927) and Weber (1931) compared the morphology of isolates of *S. rolfsii* and concluded that the difference in the cultures studied were relatively small. In the present investigations, the 5 isolates were found indistinguishable in respect of colour and topography of mycelial growth. Isolate Sr. 1 displayed significantly higher radial growth and formed significantly more number of sclerotia as compared to other isolates. This indicates that isolates of the pathogen can vary in cultural characters.

In the present studies, maximum growth of all the isolates was recorded on Oat Meal Agar followed by PDA. Growth on rest of the media such as Brown's agar, Richards' agar, Sabouraud's agar, Asthana & Hawker's agar and Czapek's agar was comparatively poorer. These findings are in agreement with the results obtained by Takahashi (1927), Higgins (1927), Endo (1940) and Grover & Chona (1960). Sharma & Kaushal (1979) reported that *S. rolfsii* produced highest number of sclerotia on PDA. Similar observations were recorded in the present investigations. As observed by Indulkar (1962), Mathur & Sarbhoy (1976) and Sharma & Kaushal (1979), Richards' medium was found to be less suitable for sclerotial production.

Davey & Leach (1941) observed that sclerotia produced on sugarbeet were larger than those produced in pure culture. Similar observations were recorded in the present investigations. The size of sclerotia varied significantly with the isolates of pathogen as well as with the type of artificial medium used. The isolates x media interactions were significant for the size of sclerotia but not for number of sclerotia and radial growth. It is likely that the formation of sclerotia is more profoundly influenced by the nature and synthesis of the morphogenic factor of the fungus as reported in case of *Corticium rolfsii* by Goujon (1969, 1970) while the size of sclerotia may not be so rigidly controlled by the fungal genetic make-up. This possibility remains to be critically examined through systematically planned experiments.

Of the 5 isolates studied, one isolate (Sr. 1) differed contrastingly from the rest in radial growth and sclerotial characters. This indicates that the pathogen is highly variable physiologically.

Some investigators could not detect pathogenic variability in isolates from various sources (Taubenhaus, 1919; Weber, 1931; Allison, 1952). Epps et al. (1951) comparing pathogenicity of 4 isolates on several hosts demonstrated differences in rate of pathogenesis but no difference in total number of plants killed. Matheswaran (1979) recorded a range of variation in seedling mortality of sugarbeet cv. Ramonskaya inoculated with 9 isolates of *S. rolfsii*. In the present investigations, isolate Sr. 1 caused significantly higher incidence of seedling blight as well as root rot than rest of the isolates. This indicates that the pathogen can be variable pathogenically. The fact that the pathogen can be variable pathogenically should get due importance in programmes for resistance breeding.

Of all the isolates tested, Sr. 1 proving most aggressive displayed maximum growth on culture media. If highly aggressive isolates are always found displaying more growth on a culture medium and vice-versa then the aggressive races could be identified easily on culture medium obviating the necessity of inoculation of host plants for the purpose.

ACKNOWLEDGEMENT. - We are thankful to the Director of Research for providing facilities.

#### REFERENCES

- ALLISON J.L., 1952 - *Sclerotium rolfsii*, a destructive pathogen of alfalfa and ladino clover. *Phytopathology* 42: 1.
- DAVEY A.E. and LEACH L.D., 1941 - Experiments with fungicides for use against *Sclerotium rolfsii* on soils. *Hilgardia* 13: 523-547.
- ENDO S., 1940 - Physiological studies on the causal fungi of *Sclerotium* diseases of the rice plants, with special reference to some factors controlling the occurrence of the disease. *Bull. Miyazaki Coll. Agric.* 11: 55-218.
- EPPS W.M., PATTERSON J.C. and FREEMAN I.E., 1951 - Physiology and parasitism of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 41: 245-256.
- GOUJON M., 1969 - Nature et synthèse du facteur morphogène responsable de l'apparition des sclérotés chez le *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Ser. D*, 269: 2195-2198.
- GOUJON M., 1970 - Physiological mechanisms in the formation of sclerotia in *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi. *Physiol. Vég.* 8: 349-360.
- GROVER R.K. and CHONA B.L., 1960 - Comparative studies on *Sclerotium rolfsii* Sacc. and *Ozonium taxanum* Neal & Wester var. *parasiticum* Thirumalachar. *Indian Phytopathol.* 13: 118-129.
- HIGGINS B.B., 1927 - Physiology and parasitism of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Phytopathology* 17: 53.
- INDULKAR A.S., 1962 - M. Sc. Thesis, Vikram University, Ujjain.
- MATHESWARAN C., 1979 - Variation among the sugarbeet isolates of *Sclerotium rolfsii* Sacc. M. Sc. (Ag.) Thesis, G.B. Pant Univ. of Agric. & Tech., Pantnagar, 77p.

- MATHUR S.B. and SARBHOY A.K., 1976 - Physiological studies on *Sclerotium rolfsii* causing root rot of sugarbeet. *Indian Phytopathol.* 29: 454-455.
- SHARMA S.L. and KAUSHAL B.R., 1979 - Cultural and physiological studies with sunflower isolate of *Sclerotium rolfsii*. *Indian J. Mycol. Pl. Pathol.* 9: 105-107.
- TAKAHASHI T., 1927 - A *Sclerotium* disease of Larkspur. *Phytopathology* 17: 239-245.
- TAUBENHAUS J.J., 1919 - Recent studies on *Sclerotium rolfsii* Sacc. *J. Agric. Res.* 18: 127-138.
- WEBER G.F., 1931 - Blight of carrots caused by *Sclerotium rolfsii* with geographic distribution and host range of the fungus. *Phytopathology* 21: 1129-1140.



## ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUES

HESS W.M., SING R.S., SING U.S. and D.J. WEBER, 1988 - Experimental and conceptual plant pathology. 1: 1-136 and I-V p. S 50. ISBN 2-88124-198-0. 2: 139-456 and I-V p. S 80. ISBN 2-88124-199-9. 3: 460-599 and I-Vp. S 50. ISBN 2-88124-202-2. New York, Gordon and Breach.

Il ne s'agit pas d'un "traité" de phytopathologie, mais d'une série d'une trentaine de monographies originales, traitant chacune d'un point précis. Elles se partagent entre trois grandes rubriques: techniques, pathogenèse et spécificité parasitaire, résistance.

Ainsi tous les domaines de la phytopathologie ne sont-ils pas couverts, il n'est pas question par exemple d'épidémiologie. En revanche les interactions cellulaires et moléculaires sont traitées sous de multiples aspects, comme l'utilisation des anticorps-monoclonaux, les problèmes de reconnaissance hôte-parasite, l'ultrastructure des phénomènes de réaction, la spécificité parasitaire chez divers groupes, la résistance induite... L'étude des phénomènes d'interaction concerne aussi bien les principaux types de pathogènes fongiques, que les bactéries, les viroïdes, les nématodes et de plus déborde du strict domaine de la phytopathologie puisque des chapitres sont consacrés aux lichens, aux Rhizobium et à l'incompatibilité pollinique des Angiospermes.

Dans l'ensemble il s'agit de toute une série de mise au point de grand intérêt même, et peut être surtout pour le non spécialiste.

G. Durrieu

WASSER S.P., 1989 - Tribe Agariceae Pat. of the Soviet Union. Koenigstein, Koeltz Scientific Books. DM 180. ISBN 3-87429-292-4.

S.P. WASSER, professeur à l'Institut de Botanique de l'Université de Kiev, membre de l'Académie des Sciences d'Ukraine, est un mycologue bien connu par de nombreuses publications et ouvrages divers, la plupart en langue russe. Avec ce livre en langue anglaise, il signe l'une des rares monographies qui soit le fruit d'investigations conduites en faisant appel aux méthodes et techniques modernes.

Les réflexions de l'auteur sur cette tribu, = partie de la grande famille des Agaricaceae, sont exprimées ici dans 118 pages de texte (dont 6 de références bibliographiques: 150 titres environ), 22 planches en couleurs reproduisant des peintures de l'auteur pour 40 espèces dont les carpophores sont vus entiers à différents stades de leur développement (c'est si important pour expliciter l'aspect des voiles, écailles et anneau), ainsi qu'en coupe longitudinale, 6 planches (un peu chargées!...) en noir et blanc, regroupant des dessins au trait de carpophores et des spores, basides, cellules remarquables, etc..., et pour 36 des 55 espèces étudiées, 6 planches de spores vues au microscope à balayage. Les pages de texte sont consacrées à la description classique des espèces, et pour chacune d'elles, des données fort appréciables sur leur répartition en URSS et dans le monde.

La présentation de l'ouvrage est claire, l'impression de qualité. On regrettera le manque d'index récapitulatif pour les espèces, au moins celles décrites, ainsi que le manque d'échelle dans les illustrations de spores: il faut se reporter au texte pour les dimensions des spores et aux légendes pour les grossissements au microscope électronique.

Les systématiciens intéressés par la fam. des Agaricaceae trouveront une présentation succincte du système adopté par WASSER, pour la tribu Agariceae,

une description-définition des genres retenus, et pour chaque espèce, des données sur ses tribulations d'un genre à l'autre au gré des conceptions de tel ou tel auteur... ou des règles de nomenclature. Ils seront sûrement "accrochés" par la position adoptée par WASSER qui place le genre *Melanophyllum* à voile universel de structure celluleuse dans cette tribu, donc loin des Lépiotes. Le bien-fondé de l'existence de ce genre ne fait pas de doute, mais qu'il soit considéré comme plus proche des "Psalliotes" que des Lépiotes donnera sûrement sujet à discussion entre spécialistes.

D. Lamoure

HANLIN R.T., 1990 - Illustrated genera of Ascomycetes. St. Paul, Minnesota. A.P.S. Press. 263p. dont 105 pl., \$ 40. ISBN 0-89054-099-3.

Cet ouvrage, qui regroupe cent genres d'Ascomycètes parmi les plus fréquents en phytopathologie, s'adresse à un public de non spécialistes cherchant à identifier ces champignons par référence à des schémas et à des descriptions.

La description de chaque taxon comprend: le nom, suivi de celui de l'auteur, une description morphologique de l'anamorphe, de l'habitat, d'une espèce représentative, et quelques commentaires brefs sur les genres voisins.

Chaque genre est associé à une planche au trait illustrant une espèce représentative et comprenant un dessin du champignon sur son hôte, des asques, des ascospores et d'une coupe dans l'ascome. Bien qu'assez schématiques, les dessins sont clairs et précis.

Le système de détermination repose sur une clef dichotomique et, dans le corps du livre, les genres sont cités selon l'appartenance des ascospores aux types de Saccardo: hyalosporées, allantosporées, hyalodidymiées, etc.

Dans l'introduction, l'auteur effectue une mise en garde sur l'exploitation des clefs dichotomiques n'impliquant aucune relation phylogénétique entre genres voisins "sur le papier", sur le recours obligatoire à la description du genre pour confirmation du résultat obtenu par la clef, sur la nécessité d'observer plusieurs spores pour avoir une idée de la morphologie dominante, etc. Autant de conseils pratiques qui précisent les limites d'utilisation du livre. Celui-ci n'étant pas destiné aux spécialistes des Ascomycètes, il manque à notre avis quelques schémas ou un glossaire précisant le sens des termes utilisés concernant surtout la morphologie des spores ou des ascomes. Un index alphabétique où sont regroupés les noms de genres et d'espèces illustrés ainsi que des plantes hôtes spécifiques succède à une bibliographie (environ 200 réf.), surtout centrée sur les articles contenant des clefs ou des descriptions d'espèces.

Expérience faite, ce livre qui se veut être un outil d'identification des Ascomycètes les plus communs remplit bien sa fonction.

M.F. Roquebert

HENNEBERT, BOULENGER & BALON, 1990 - La Mèrulle. Science, Technique et Droit. Bruxelles, Editions Ciaco, 196 p.

Ce livre, consacré aux champignons lignivores et, en particulier à la Mèrulle, agent de pourriture cubique sévissant dans les habitations paraît bien à propos, alors qu'un regain de développement de ce champignon est constaté en Europe et particulièrement dans certaines capitales comme Bruxelles et Paris.

Méconnu du grand public, ce champignon, qui peut s'étendre de manière spectaculaire en détruisant tous les éléments en bois au fur et à mesure de sa progression, laisse celui qui le découvre à la fois effrayé et déçotancé. Ce manuel apporte tout ce qu'il faut connaître sur ce champignon dont l'action destructrice est déjà relatée dans la bible; il donne tous les éléments qu'il faut savoir pour l'éviter et le combattre.

Sa lecture très agréable, car les chapitres sont bien structurés et comportent chacun un court résumé, donne tous les renseignements sur les conditions de développement de la Mèrulle, sa biologie particulière, son adaptation à l'environ-

nement par ses possibilités de transporter l'eau et aussi, d'étendre son champ d'action en passant même à travers les murs et les maçonneries.

Un diagnostic devient à la portée des non mycologues grâce à la description de la forme typique d'altération du bois (pourriture cubique) ainsi que celle des organes variés du champignon: diverses manifestations végétatives, fructifications chargées de milliards de spores brun rouille assurant la pérennité de l'espèce, cordonnets qui sont de véritables "tuyaux transportant l'eau". Ces descriptions sont abondamment illustrées de prises de vues magnifiques de développements abondants et spectaculaires du champignon.

Le chapitre des solutions à apporter est d'un grand intérêt, celles-ci sont décrites avec précision et tout particulièrement le traitement curatif. Celui-ci doit commencer par l'élimination des sources d'humidité et la suppression du bois dégradé ainsi que de tout élément fongique sur le bois et les murs; le traitement chimique par un produit fongicide pourra être appliqué. Les différents procédés visant à faire pénétrer le produit pour atteindre tout élément fongique en profondeur sont décrits. Une liste des matières actives actuellement sur le marché de la Préservation est donnée. Ces produits ont fait preuve de leur efficacité par des tests en laboratoire et ont reçu l'homologation de l'Association belge pour la Protection du Bois.

Enfin, le dernier chapitre consacré au "DROIT" est fort intéressant car cet aspect des conséquences de la dégradation du bois en oeuvre par la Mèrulle n'est pas souvent abordé dans les ouvrages scientifiques. Des experts parfois pris au dépourvus, apportent peu de solutions. Ce chapitre valable sur le plan de la législation belge fait toutefois réfléchir tous ceux qui, en tant qu'experts, maîtres d'oeuvres, architectes, assureurs sont confrontés au problème.

Sans aucun doute, l'ensemble de cet ouvrage intéresse non seulement les mycologues curieux du caractère original du champignon mais également tout expert et technicien du bâtiment ayant à régler des problèmes de non respect des "REGLES DE L'ART" entraînant l'apparition du "champignon des maisons".

D. Dirol

MOËNNE-LOCCOZ P. et REUMAUX P., 1989 - Cortinaires récents, nouveaux ou fantômes. *Fungorum Rariorum Icones Coloratae*. Pars XVIII. Berlin, J. Cramer, 59p. DM 48. ISBN 3-443-69004-1

Une vingtaine de cortinaires, très rares, réhabilités ou nouveaux, sont étudiés, la plupart représentés pour la première fois en couleurs; les planches sont dues au talent de P. Moënné-Loccoz, dans un style pour le moins rare en mycologie puisqu'il s'agit d'icônes effectuées au crayon de couleur et, de plus, absolument "époustouflantes de vérité... avec un relief qui donne envie de cueillir les exemplaires!". Le texte est (en grande partie) issu d'un autre talent, celui de Patrick Reumaux, aussi littéraire que scientifique et qui, de ce fait, peut rendre relativement agréable la lecture de ces lignes normalement ingrates (parfois avec quelques tonalités humoristiques... ou plus ou moins moqueuses, mais le titre lui-même ne l'est-il pas un tantinet?). Seuls quelques discussions et découpages systématiques sembleraient devoir être critiqués par certains cortinariologues... mais ce serait une révolution dans le genre s'il en était autrement!

M. Bon

MOËNNE-LOCCOZ P., POIRIER J. et REUMAUX P., 1990 - Inocybes critiquables et critiqués. *Fungorum Rariorum Icones coloratae*. Pars XIX. Berlin, J. Cramer, 55p. DM 58. ISBN 3-443-69005-X.

18 espèces sont représentées de la même manière que dans l'ouvrage précédent, avec un troisième auteur à qui on doit la plupart des études microscopiques, dessins au trait et nombreuses observations, les commentaires étant, dans la plupart des cas, réservés à P. Reumaux, dans le style particulier évoqué ci-dessus. Les planches sont tout aussi séduisantes, même dans un genre que l'on qualifie souvent d'ingrat. Du

point de vue taxonomie signalons que la plupart des synonymies "oedémateuses" de quelques auteurs modernes n'ont pas été suivies et que de nombreux taxons connus des anciens ont été conservés: *I. gausapata* Kühn., *I. subtigrida* Kühn., *I. sororia* Kauffm., *I. perlata* (Cke.) Sacc., *I. subnudipes* Kühn., etc. avec deux nouvelles espèces: *I. sulcata* et *I. suboreina* ainsi qu'une interprétation moderne de *I. asinina* de Kalchbrenner, le tout émaillé de démonstrations relativement convaincantes; mais, comme il a été dit à propos des cortinaires du numéro précédent, le genre *Inocybe* n'est pas non plus réputé pour sa simplicité et les avis sont et resteront encore longtemps partagés.

M. Bon

LARPENT J.P. et SANGLIER J.J., 1989 - Biotechnologie des antibiotiques. Coll. Biotechnologies. Paris, Masson, 496p.

S'il est un domaine où l'apport de biotechnologies nouvelles laisse entrevoir des progrès considérables, c'est bien celui des antibiotiques. Cet ouvrage de référence est une synthèse des connaissances actuelles, réalisé par une vingtaine de spécialistes de nationalités diverses. Il comporte dix chapitres.

Il nous est rappelé que, sur 10.000 antibiotiques naturels, 1.200 sont d'origine fongique, les principaux étant les  $\beta$  lactamines (pénicillines et céphalosporines). Neuf espèces de champignons seulement sont actuellement exploitées industriellement pour la production d'antibiotiques: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Cephalosporium acremonium* (= *Acremonium strictum* W. Gams ou *A. chrysogenum* (Thurum, et Sukap.) W. Gams), *C. caerulens* (*Fusarium?*), *Fusidium coccineum* (= *Acremonium fusidioides* (Nicot) W. Gams), *Helminthosporium siccans* (= *Drechslera siccans* (Drechs.) Shoemaker), *Paecilomyces variotii*, *Penicillium chrysogenum* et *P. griseofulvum*.

Les problèmes posés par la sélection des souches, la caractérisation physico-chimique et le dosage des molécules actives sont abordés; la biosynthèse et la physiologie de la production des antibiotiques constituent des chapitres importants. Ils introduisent le sujet d'actualité qui, à notre avis, constitue la clef de voûte de cet ouvrage: l'amélioration génétique des souches. Déjà, les techniques classiques de traitement mutagénique suivi d'un criblage des organismes survivants ont permis d'augmenter considérablement le rendement des productions. L'amélioration des souches et l'optimisation de la production peuvent passer par les recombinaisons génétiques intervenant au cours du cycle parasexuel. Mais si le développement de nouvelles méthodes relevant de la génétique moléculaire ont déjà permis d'importants progrès, ce sont des voies de recherches dont l'exploration est loin d'être terminée. La dimension industrielle n'est pas négligée: elle est développée dans deux chapitres traitant de la production, de l'extraction et de la purification des molécules actives.

En conclusion, une réflexion est proposée sur l'utilisation des antibiotiques en thérapeutique humaine et en zootechnie (13% du marché pharmaceutique mondial). Bien des progrès sont encore attendus et espérés dans ce domaine: l'élimination des effets secondaires indésirables, l'augmentation de l'efficacité du traitement (la thérapeutique antifongique par exemple, reste souvent décevante). Il serait souhaitable que de tels traitements n'amointrissent pas les défenses naturelles immunitaires de l'organisme qu'on soigne. C'est là un sage conseil qui se dégage de ce livre et qui nous invite à poursuivre inlassablement l'exploration du monde microbien.

C. Moreau

## INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

D'une façon générale, la revue peut publier tous les travaux apportant une information fondamentale nouvelle, au plan de la systématique ou de la Biologie des Champignons. Le Comité de Lecture pourra susciter la rédaction d'articles de synthèse sur un sujet donné, ainsi que des mises au point bibliographiques périodiques.

Les manuscrits proposés à **CRYPTOGAMIE, Mycologie**, doivent être fournis en double exemplaire, dactylographiés à double interligne, sans rature ni surcharge. Outre la langue française, la revue accepte les articles rédigés en langue anglaise, allemande, espagnole. Chaque manuscrit devra comporter:

- le titre de l'article, dans la langue du manuscrit, et sa traduction en anglais;
- le titre courant (haut-de-page) de 50 signes au maximum;
- le nom et les prénoms des auteurs et leurs adresses;
- deux résumés, l'un dans la langue du manuscrit, l'autre en français ou en anglais, d'environ 180 mots ou 15 lignes, faisant ressortir les résultats essentiels exposés dans l'article;
- des mots-clés qui seront sélectionnés par le Comité de Lecture;
- des légendes explicites des figures, planches et tableaux dans la langue du manuscrit et en anglais (ou français);
- une liste bibliographique par ordre alphabétique des auteurs et chronologique par auteurs sans tenir compte des auteurs secondaires. Les titres des périodiques devront être abrégés suivant le B-P-H (Botanico-Periodicum-Huntianum, Pittsburg: Hunt Botanical Library, 1968), les ouvrages cités selon F.A. Stafleu & R.S. Cowan, 1976-... Taxonomic literature. Ed. 2 Utrecht/Antwerpen: Bohn, Scheltema & Holkema (*Regnum vegetabile* 94, 98, 105, 110...). Les références suivront les modèles suivants:

PATOUILLARD N., 1881 - Sur l'appareil conidial de *Pleurotus ostreatus*. *Bull. Soc. Bot. France* 27: 125.

HEIM R., 1957 - *Les champignons d'Europe*. Paris, Boubée et Cie, 2: 571 p.

MANDELS G.P., 1965 - Kinetics of fungal growth. In : G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN, *The fungi*. N.Y. & London, Academic Press, I: 599-612.

**TEXTE.** - La présentation du texte devra faire apparaître clairement ses subdivisions et leur hiérarchie, ainsi que le début des paragraphes (- insérer une ligne blanche *avant* les titres et sous-titres; - faire un alinéa de plus de 3 caractères au début de chaque paragraphe; - supprimer toute ligne blanche *entre* deux paragraphes et *après* les titres et sous-titres). Les renvois à la liste bibliographique se feront par le nom de l'auteur et l'année de publication (utiliser "et al." lorsque l'article est signé par plus de deux auteurs) et non par les renvois numériques. Les notes infrapaginales sont à éviter. La place des illustrations devra être indiquée dans la marge.

**ILLUSTRATIONS.** - Toutes les illustrations, y compris les tableaux, doivent être des originaux de qualité suffisante pour la reproduction directe en offset. Elles devront comporter les échelles (les grandissements x ... sont prohibés), les symboles nécessaires à leur compréhension, et être numérotées dans l'ordre d'appel dans le texte. Les tableaux devront être dactylographiés clairement, sans rature ni surcharge, en s'assurant de la qualité de la frappe. Les documents photographiques doivent être montés par planches. Les dimensions des originaux ne devront pas excéder le triple de celle de leur reproduction définitive (justification de la revue: 11,5 x 17,5cm) et les auteurs choisiront l'épaisseur des traits et la taille des caractères en fonction de la réduction éventuelle.

**CRYPTOGAMIE, Mycologie** souhaite vivement que les auteurs envoient leurs textes en mode ASCII sur disquettes 3"1/2 ou 5" 1/4 de micro-ordinateur (IBM, IBM compatible et MacIntosh). Ils doivent être **impérativement** conformes aux instructions suivantes:

- ne pas utiliser de codes spéciaux de mise en page ou de format (gras, italiques, centrage, etc.);
- ne pas couper les mots;
- ne pas justifier à droite;
- les mots (ou les groupes de mots) qui doivent apparaître en italiques lors de l'impression devront être encadrés par un des caractères suivants: #, £, \$.
- ne pas insérer de code de fin de page;

Les disquettes, accompagnées d'une copie sur papier comportant le texte final corrigé selon les avis du Comité de Lecture, seront adressées à la Rédaction.

Tirages à part: limités à 150, dont 25 gratuits.

Conformément à la règle, les auteurs décrivant une espèce nouvelle doivent déposer le matériel type (échantillon sec ou culture) dans un herbier officiel: P.C. (Paris, Cryptogamie), CAB-IMI (Kew, Surrey) ou une collection de souches: L.C.P. (Lab. Cryptogamie, Paris), CAB-IMI, C.B.S. (Baarn, Hollande), etc.



Commission paritaire n° 58611  
 Dépôt légal n° 15500 - Imprimerie de Montligeon  
 Sortie des presses le 30 mars 1991  
 Imprimé en France  
 Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)  
 Président : R. Baudoin; Secrétaire : D. Lamy  
 Trésorier : J. Dupont; Directeur de la publication : H. Causse

# CRYPTOGAMIE – MYCOLOGIE

## BUREAU DE RÉDACTION

- MM. DURRIEU G., pour les articles traitant d'Écologie et de Phytopathologie  
Laboratoire de Botanique, Faculté des Sciences,  
Allées Jules Guesde, 31 000 Toulouse (France).
- JOLY P., pour les articles traitant de Systématique  
Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle  
12, rue de Buffon, 75005 Paris (France).
- MANACHERE G., pour les articles traitant de Physiologie  
Laboratoire de Mycologie, Université de Lyon I,  
43, Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex (France).
- Mmes ZICKLER D., pour les articles traitant de Cytologie  
Laboratoire de Génétique, Université de Paris Sud,  
Bât. 400, Centre d'Orsay, 91405 Orsay (France).
- ROQUEBERT M.F., s'occupera des autres spécialités.  
Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle  
12, rue Buffon, 75005 Paris (France).

## COMITÉ DE LECTURE

- |   |                                    |
|---|------------------------------------|
| BOIDIN J., Lyon (France)                  | MONTANT Ch., Toulouse (France)     |
| CHEVAUGEON J., Orsay (France)             | MOREAU Cl., Brest (France)         |
| GAMS W., Baarn (Hollande)                 | PEGLER D.N., Kew (Grande-Bretagne) |
| HENNEBERT G., Louvain-la-Neuve (Belgique) | SUTTON B., Kew (Grande-Bretagne)   |
| LACOSTE L., Paris (France)                | TURIAN G., Genève (Suisse)         |

Les manuscrits doivent être adressés (en 2 exemplaires) directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Le Bureau peut demander l'avis d'un lecteur choisi pour sa spécialité, même s'il n'appartient pas au Comité de lecture.

Bien qu'étant avant tout une revue de langue française, les articles rédigés en Anglais, Allemand et Espagnol sont acceptés.

Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le 1er fascicule de chaque tome.

## ABONNEMENTS A CRYPTOGAMIE

L'année 12, 1991

### CRYPTOGAMIE comprend trois Sections

Botanique - Zoologie - Fichologie - Lichnologie - Mycologie

abonnement annuel (en France) Section pour 1991

France 1991 F. net 327,00 F. (cc)

Etranger 1991 F. net 357,00 F.

abonnement annuel (en France) Section pour 1991

France 1991 F. net 947,28 F. (cc)

Etranger 1991 F. net 1000,00 F.

Les abonnements à l'ensemble des périodes de la REVUE DE MYCOLOGIE et de CRYPTOLOGIE-MYCOPHILIE sont toujours disponibles.

### MEMOIRES HORS SERIE

- N° 1 - 1942 - **Les matières colorantes des champignons**, par J. Pasta: 88 pages - 15 F.
- N° 2 - 1943 - **Les constituants de la membrane chez les champignons**, par R. Ulrich: 44 pages - 15 F.
- N° 3 - 1958 - **Essai biotaxonomique sur les Hydnes résupinés et les Corticiés**, par J. Boudin: 390 pages, pl. et fig. - 120 F.
- N° 4 - 1959 - **Les champignons et nous** (Chroniques - II) par G. Becker: 94 pages - 25 F.
- N° 5 - 1960 - **Catalogue de la Mycorrhéque de la Chaire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle - I. Micromycètes, Macroscopiques**, première partie: 68 pages - 25 F.
- N° 6 - 1967 - **Table des Matières 1936-1965**: 85 pages - 20 F.
- N° 7 - 1966-1975 - 30 pages - 10 F.

### FLORE MYCOLOGIQUE DE MADAGASCAR ET DÉPENDANCES publiée sous la direction de M. Roger HEIM

- L'année I - Les Lactario Russulés, par Roger Heim (1938): 9 pages.
- L'année II - Les Rhodophyllés, par Henri Romagnesi (1941): 164 pages - 46 fig. - 90 F.
- L'année III - Les Mycènes, par Georges Method (1949): 144 pages - 88 fig. - 90 F.
- L'année IV - Les Discomycètes de Madagascar - par Marcelle Le Gal (1953): 465 pages - 172 fig. - 150 F.
- L'année V - Les Uredinales, par Gilbert Bouriquet et J.P. Bassac (1965): 180 pages, 97 fig., 4 pl. hors texte - 90 F.

### Règlements

par chèque postal au nom de C. D. A. C. - CRYPTOLOGIE

12 rue Buffon - 75005 Paris - C. C. P. La Source 31 764 035

ou chèque bancaire établi au même ordre.