

Croissance et assimilation des nitrates chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*

Rabaa AOUADJ¹, Abbes ES-SGAOURI¹ & Mohamed ABOUROUH²

(Reçu le 25/07/1996 ; Révisé le 12/06/1996 ; Accepté le 18/12/1997)

نمو وتحويل النترات عند الفط *Pisolithus tinctorius*

استعملت ثمان أصناف من الفطر بيزولتيس تنكتوريوس (*Pisolithus tinctorius*) لدراسة مدى قدرتهم على تحويل الأزوت نيتريك. تبين النتائج المحصل عليها أن امتصاص النترات يختلف مع اختلاف الأصناف. ويصل معدل النمو القطري إلى ما بين 7 و 8.66 سم بالنسبة للأصناف 7.5.2.1 لكنه لا يتعدى 6.76 سم بالنسبة للأصناف 10. 6. 4. 3. وقد يتناسب معدل النمو القطري مع معدل التخليق الحيوي ما عدا بالنسبة للصنف 7 الذي لا يتعدى نموه 143 مغ. إن نشاط النترات رديكتاز يختلف مع اختلاف السن، مدة الحضانة، الملوحة، الحرارة وتركيز النترات.

الكلمات المفتاحية : بيزولتيس تنكتوريوس - نشاط النترات رديكتاز - أوكالبتوس - أزوط نيتريك - نمو - مشيجة

Croissance et assimilation des nitrates chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*

Huit variétés de champignon ectomycorhizien *P. tinctorius* ont été utilisées pour l'étude de l'assimilation de l'azote nitrique. Les résultats obtenus montrent que l'absorption des nitrates est différente en fonction de la variété utilisée. L'étude de la croissance des huit variétés montre que le diamètre moyen de Pt1, Pt2, Pt5 et Pt7 atteint des valeurs comprises entre 7 et 8,66 cm alors que celui de Pt3, Pt4, Pt6 et Pt10 ne dépasse pas 6,76 cm. La production de biomasse coïncide généralement avec la croissance radiale à l'exception de Pt7 dont l'intensité (faible) et la nature (fine) des filaments ne permettent pas une production mycéliale à l'image de la croissance radiale. En effet, la biomasse de cette variété obtenue après un mois de culture n'excède pas 143 mg de mycélium frais, ce qui correspond à 35,5 % seulement de la moyenne des quantités produites par les autres variétés. L'activité nitrate réductase a été mesurée *in vivo* sur des thalles cultivés sur milieu MNM(NO₃). L'évolution de l'ANR en fonction de l'âge du champignon, de la durée d'incubation, du pH, de la température et de la concentration en nitrates du milieu a permis de définir les conditions expérimentales qui améliorent très nettement l'activité de la nitrate réductase.

Mots clés : *Pisolithus tinctorius* - Activité nitrate réductase - *Eucalyptus* - Azote nitrique - Croissance - Mycélium - Biomasse

Growth and nitrate assimilation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*

Eight varieties of ectomycorrhizal fungus *P. tinctorius* were used for nitric nitrogen assimilation study. The results obtained show that nitrate absorption is different in function of the variety used. The study of the growth of eight varieties demonstrated that the diameter mean of Pt1, Pt2, Pt5 and Pt7 arise the values included between 7 and 8.66 cm, while the one of Pt3, Pt4, Pt6 and Pt10 not exceed 6.76 cm. Generally, the biomass production coincide with radial growth except for Pt7 whose the intensity (deficient) and the nature (thin) of thread not permit a mycelia production at the likeness of the radial growth. In deed, the biomass of this variety obtained after one month of culture not exceed 143 mg of fresh mycelium, that correspond to 35.5% of the mean of the produced quantities by the others varieties. The nitrate reductase activity was measured *in vivo* using cultivated thalls on the medium MNM (NO₃). The evolution of NRA in function of mycelium age, incubation time, pH, temperature and the nitrate concentration of the medium permitted to allowed the experimental conditions that improve very clearly the NRA.

Key words : *Pisolithus tinctorius* - Nitrate reductase activity - *Eucalyptus* - Nitric nitrogen - Growth - Mycelia - Biomass

¹ Laboratoire de Biologie et Physiologie végétales, Faculté des sciences, B.P. 5366, route d'El-Jadida, Casablanca

² Division de recherches et d'expérimentation forestières, 10050 Agdal, Rabat

□ Auteur correspondant

INTRODUCTION

L'association entre filaments de certains champignons et les racines de végétaux supérieurs conduit à la formation d'un organe mixte appelé mycorhize. Celle-ci réunit une plante autotrophe pour le carbone et un champignon hétérotrophe vis-à-vis de cet élément. Les relations entre les deux partenaires sont symbiotiques et dans les conditions naturelles, 90% des taxons végétaux sont mycorhizés. Seuls les crucifères, chénopodiacées, saxifragacées et plantes aquatiques sont, pour la plupart, dépourvus de mycorhizes. Les champignons mycorhiziens appartiennent à des classes différentes et forment des structures qui ont été classées en trois groupes sur la base des critères anatomiques et morphologiques (Peyronel *et al.*, 1969) : les ectomycorhizes, les endomycorhizes et les endo-ectomycorhizes qui présentent à la fois des caractères d'ecto et d'endomycorhizes. Différents processus physiologiques et écologiques sont susceptibles d'être améliorés par l'infection mycorhizienne. Ainsi les champignons mycorhiziens peuvent intervenir à différents niveaux du cycle de l'azote pour améliorer le métabolisme de la plante-hôte: minéralisation de l'azote organique, absorption et assimilation des différentes formes d'azote disponible dans le sol et translocation vers l'hôte.

Pisolithus tinctorius, symbiote naturel d'*Eucalyptus* Van der westhuizen (1989) est particulièrement intéressant car il se développe aussi bien en présence de nitrate que d'ammonium (Plassard, 1989 ; Adnane, 1993 ; Fawzi, 1994).

Un des éléments indispensables à la croissance et à la synthèse cellulaire des champignons est l'azote, dont les différentes sources ne sont pas toutes assimilables par tous les champignons. Les données concernant la nutrition azotée et en particulier la nutrition nitrique, facteur important de productivité, sont nombreuses chez les plantes herbacées (Peyronel *et al.*, 1969). Au contraire pour les espèces forestières et les champignons ectomycorhiziens, les données sont plus rares et traitent presque exclusivement la nutrition ammoniacale (Botton & Dell 1994 ; Chalot *et al.*, 1991 ; Brun *et al.*, 1993).

La nitrate réductase (EC1.6.6.1), première enzyme intervenant dans l'assimilation de l'azote minéral, catalyse la réduction des nitrates en nitrites (Guerrero & Gutierrez, 1977). Plusieurs auteurs ont étudié ce système enzymatique chez

les champignons dont l'activité est déterminante pour l'assimilation de l'azote nitrique (Nason & Evans 1953 ; Lewis & Fincham 1970 ; Thiery, 1975).

Ce travail contribue à l'étude de la croissance et de l'assimilation de l'azote nitrique chez plusieurs variétés marocaines de *Pisolithus tinctorius*.

MATÉRIEL & MÉTHODES

Le matériel biologique utilisé est le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*, basidiomycète de la famille des *Sclérodermataceae*, qui forme une symbiose avec l'*Eucalyptus*.

Huit stations ont été choisies dans le reboisement d'*Eucalyptus* de Sidi Yahia qui se caractérise par un sol sableux, peuplé d'*Eucalyptus camaldulensis*, permettant d'effectuer des collectes de carpophores. Les échantillons sont ensemencés aseptiquement dans des tubes à essais contenant un milieu de culture gélosé. L'obtention du mycélium se fait sans phase de latence. Le mycélium ainsi obtenu est conservé à 4°C et des repiquages sont effectués 3 fois par an pour l'entretien de la souche.

Le milieu de culture utilisé est celui de Melin & Norkrans modifié par Marx (MNM). Sa composition en g/l sans la source d'azote est la suivante :

CaCl_2 : 0,05 ; NaCl : 0,025 ; KH_2PO_4 : 0,5 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,15 ; FeCl_2 : 0,012 Thiamine : 10^{-4} ; Extrait de malt : 3 ; Glucose : 10

L'azote est ajouté à la dose constante de 0,38g/l sous forme nitrique apporté par KNO_3 . Le milieu de culture est stérilisé à 121°C pendant 30 minutes, son pH après autoclavage est de 5,5.

Pour l'étude de la croissance radiale, des boîtes de pétri de 9 cm renfermant 25 ml de milieu de culture gélosé sont ensemencées chacune avec un disque de 1,2 cm de diamètre prélevé à partir de la zone marginale d'une jeune culture. L'incubation du champignon est effectuée à 28°C, à l'obscurité. Cinq boîtes de Pétri sont utilisées pour chaque variété et des mesures de diamètres sont effectuées tous les 5 jours.

Des erlenmeyers de 100 ml renfermant 40 ml de milieu sont ensemencés avec des disques du jeune mycélium prélevé à la périphérie de la préculture. Les disques ayant le même diamètre (1,2 cm) sont déposés délicatement à la surface du milieu sur

lequel ils flottent. La production de biomasse est menée en statique, à 28°C à l'obscurité. Des prélèvements sont effectués tous les 5 jours pendant 1 mois. À chaque prélèvement, le mycélium est séparé du milieu de culture par filtration.

Pour l'étude de l'activité enzymatique *in vivo*, le mycélium est mis en incubation dans 4 ml de tampon phosphate de potassium 100 mM pH 7,5 en présence de nitrate de sodium. L'incubation est effectuée à l'obscurité et la quantité de nitrites apparue dans le milieu réactionnel traduit l'activité de la nitrate réductase. Les nitrites sont dosés selon la technique de Nicholas & Nason (1957) qui consiste à ajouter à 1 ml de milieu réactionnel, 1 ml de sulfanilamide (10 g/l dans HCl 3N) et 1 ml de dichlorhydrate de N-1 naphthyléthylènediamine (0,02%). La lecture de l'absorbance est réalisée à 540 nm après 20 mn à la température du laboratoire. L'activité de la nitrate réductase a été étudiée en fonction de l'âge du mycélium, du temps d'incubation, de la température, du pH et de la concentration du substrat.

RÉSULTATS & DISCUSSION

Huit variétés du champignon *Pisolithus tinctorius* ont été utilisées pour l'étude de l'assimilation de l'azote nitrique. La présence du fer et du magnésium dans le milieu de culture augmente la croissance mycéliale, et de ce fait on observe de nombreuses connections dans le mycélium à partir de 5j.

Les résultats obtenus montrent que la croissance est différente selon la variété utilisée. C'est ainsi que l'étude de la croissance radiale en milieu gélosé (Figure 1) montre que le diamètre moyen obtenu après 30 jours de culture des variétés Pt1, Pt2, Pt5 et Pt7 atteint des valeurs comprises entre 7 et 8,66 cm, alors que celui des variétés Pt3, Pt4, Pt6 et Pt10 ne dépasse pas 6,76 cm.

Les biomasses exprimées en grammes (Figure 2), obtenues après un mois de culture sur milieu liquide des variétés Pt1, Pt2, Pt4, Pt5 et Pt6 qui sont respectivement de 0,479 ; 0,461 ; 0,405 ; 0,422 et 0,400 confirment les variations obtenues pendant l'étude de la croissance radiale (cm) respectivement de 8,20 ; 8 ; 6,62 ; 7 et 6,30.

La production mycéliale des variétés Pt3 (0,256) et Pt10 (0,251) est sensiblement inférieure à celle des autres variétés. Ce résultat peut être expliqué à la

fois par la faible activité de la nitrate réductase et vraisemblablement (surtout pour la Pt3) par l'accumulation des nitrites dans le milieu de culture. Des dosages de la nitrite réductase ont confirmé effectivement que l'activité de cette enzyme était faible.

La variété Pt7 (8,66 cm) se caractérise par une densité des filaments nettement plus faible, ne lui permettant pas une production mycéliale à l'image de la croissance radiale. En effet, la biomasse de cette variété n'excède pas 143 mg de mycélium frais, ce qui correspond à 35,5% seulement de la moyenne des quantités produites par les autres variétés. L'étude présentée a permis donc de révéler que certaines variétés ont été en mesure d'utiliser avec plus d'efficacité que d'autres l'ion NO_3^- comme source unique d'azote.

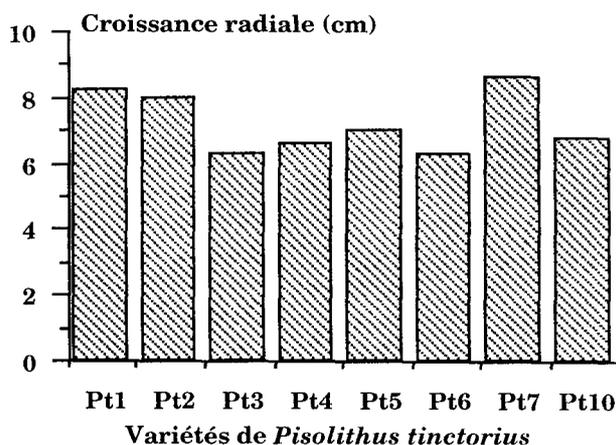


Figure 1. Croissance radiale des variétés de *Pisolithus tinctorius* cultivé sur milieu MNM

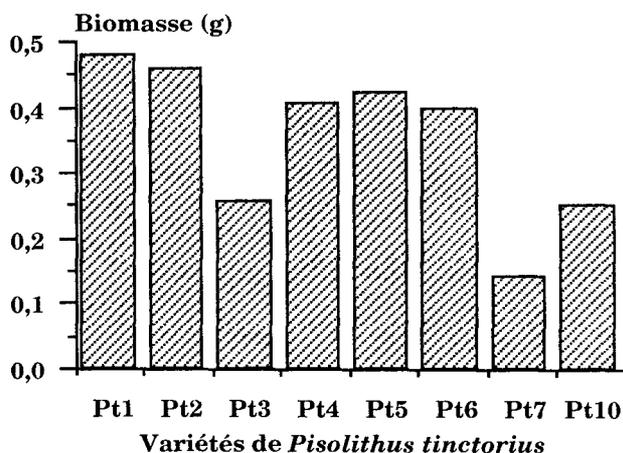


Figure 2. Production de biomasse des différentes variétés de *Pisolithus tinctorius* cultivé sur milieu MNM.

La forte pigmentation du milieu de culture est causée par un phénomène d'autolyse qui est dû au fait qu'en présence d'azote nitrique une dégradation des filaments se produit. Cette étape du développement qui marque l'arrêt de la croissance dépend à la fois de la durée de développement et de la variété utilisée. Les courbes d'accroissement du poids du mycélium (Figure 2) montrent que les variétés étudiées sont capables dans une certaine mesure et au cours d'une période d'incubation déterminée d'assimiler l'azote nitrique; par cette réaction différente se traduit la spécificité physiologique des variétés.

En ce qui concerne les variations morphologiques, l'intensité de la couleur est spécifique à chaque variété, on remarque d'après les photographies prises après 30 jours de culture que le champignon présente les caractéristiques d'une croissance végétative (développement de mycélium aérien très visible ressemblant à du coton avec une apparence terne sur le bord de la jeune culture). Les colonies changent de couleur après 15 jours vers le tanné. Des résultats analogues ont été trouvés chez différentes souches de *Pisolithus* d'origine australienne (Burgess, 1995), ainsi que chez *P. tinctorius* dont les carpophores ont été collectés aux États-Unis (Tennessee) (Hile, 1969). Alors que le mycélium des variétés Pt1, Pt2, Pt4 et Pt5 se compose d'hyphes, légèrement colorés, très compacts, celui des variétés Pt3, Pt6 et Pt10 est constitué d'hyphes bruns foncés.

La Pt7 s'est distinguée des autres par sa morphologie très homogène et originale. En effet, son mycélium est blanc et lâche. Des résultats similaires ont été obtenus par Rykowski (1976) chez l'Armillaire ce qui explique l'hétérogénéité des différentes variétés étudiées. Il est donc à noter la spécificité morphologique des différentes variétés dont l'origine est due à la faculté de constituer des hyphes de nature différente en présence d'azote minéral.

Le métabolisme azoté est possible grâce à l'activité de la nitrate réductase dont l'action aboutit à la formation des nitrites. L'évolution de l'activité nitrate réductase en fonction de l'âge du mycélium, de la durée d'incubation, du pH, de la température et de la concentration en nitrate du milieu a permis de définir les conditions expérimentales qui améliorent très nettement l'activité de ce système enzymatique. Une incubation de 10 minutes suffit à mettre en évidence l'ANR (Tableau 1). Cependant, les nitrites continuent à être excrétés

lentement dans le milieu d'incubation. Pour toutes les variétés, le temps d'incubation a été fixé à 1 heure. Le tableau 2 montre que l'ANR est maximale lorsque la variété 7 est âgée de 10 jours alors qu'il faut attendre 15 jours pour les autres variétés, ce qui confirme la rapidité de croissance de cette variété. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Es-sgaouri (1984) chez l'ascomycète *Sphaerostilbe repens*. Le pH optimum du milieu d'incubation est de 7,5 (Tableau 3) pour les variétés 4, 5, 6 et 7, il est de 8,5 pour les variétés 1, 2, 3 et 10. Ces dernières ont également une intense activité nitrate réductase à pH 4,5. La présence de deux valeurs de pH favorable à l'ANR chez ces variétés plaide en faveur de l'existence de deux isoenzymes. La température optimale pour l'activité nitrate réductase est de 25°C pour toutes les variétés (Tableau 4), cette température est voisine de celle du milieu de culture du champignon (28°C), qui procure au mycélium la meilleure croissance (Saule, 1995). L'ANR croît progressivement avec l'augmentation de la

Tableau 1. Activité nitrate réductase (mgNO₃/g.M.F.) in vivo chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* en fonction du temps d'incubation

T.*	Variétés de <i>Pisolithus tinctorius</i>							
	Pt SY1	Pt SY2	Pt SY3	Pt SY4	Pt SY5	Pt SY6	Pt SY7	Pt SY10
10'	17,00	08,47	21,85	16,00	0,09	10,36	0,10	04,73
20'	20,12	12,04	24,96	19,50	0,22	10,18	0,20	04,28
30'	27,24	16,29	34,12	27,80	0,27	16,04	0,55	06,97
1 h	28,37	17,92	41,80	30,30	0,60	13,93	0,83	07,55
2 h	41,12	21,42	48,87	45,73	0,47	20,96	0,81	11,92
3 h	42,62	24,35	55,00	46,10	0,44	21,94	0,98	13,71
5 h	54,74	22,40	65,82	56,90	0,47	24,90	1,21	15,16

*T: Temps d'incubation: minute; h: heure

Tableau 2. Activité nitrate réductase (mgNO₃/g.M.F./h) in vivo chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* en fonction de l'âge du mycélium

Age (j)*	Variétés de <i>Pisolithus tinctorius</i>							
	Pt SY1	Pt SY2	Pt SY3	Pt SY4	Pt SY5	Pt SY6	Pt SY7	Pt SY10
5	05,17	08,31	01,80	20,00	03,36	07,00	22,40	08,30
10	12,60	09,25	06,72	23,43	20,00	03,66	27,85	20,00
15	29,00	11,00	21,01	13,47	30,00	12,00	15,64	17,32
20	05,42	04,40	17,11	06,00	13,80	06,14	16,80	12,00
25	03,08	03,65	13,15	04,00	10,00	03,90	15,25	11,00
30	00,53	03,00	12,95	00,34	04,00	01,80	14,64	03,47

*: âge en jour

concentration en substrat dans le milieu d'incubation et atteint des valeurs significatives avec une concentration 10 fois plus importante que celle du milieu de culture du champignon, soit 3,2 g/l de nitrate de sodium (Tableau 5). Ceci est en accord avec le fait que la nitrate réductase est inductible par son substrat. Des résultats analogues ont été signalés chez d'autres champignons par différents auteurs (Es-sgaouri & Botton 1990 ; Kurt *et al.*, 1991 ; Caba, 1995).

Tableau 3. Activité nitrate réductase (mgNO₂/g.M.F./h) *in vivo* chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* en fonction du pH du milieu réactionnel

pH	Variétés de <i>Pisolithus tinctorius</i>								
	Pt SY1	PtSY2	PtSY3	PtSY4	PtSY5	PtSY6	PtSY7	PtSY10	
04,5	20,40	9,00	15,40	18,02	02,07	07,00	0,92	10,00	
05,5	2,80	4,00	7,00	27,74	05,42	04,16	1,91	4,16	
06,5	7,05	7,40	5,11	19,00	02,15	12,00	4,33	5,00	
07,5	16,80	12,00	18,00	58,62	08,72	14,00	9,46	26,00	
08,5	263,00	138,40	125,17	29,88	06,11	173,00	4,91	164,00	
09,5	127,00	66,00	80,28	22,35	04,13	161,00	3,76	115,00	
10,5	125,00	57,00	70,00	17,25	06,07	118,00	3,44	110,00	

Tableau 4. Activité nitrate réductase (mgNO₂/g.M.F./h) *in vivo* chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* en fonction de la température du milieu réactionnel

T(°C)	Variétés de <i>Pisolithus tinctorius</i>								
	Pt SY1	PtSY2	PtSY3	PtSY4	PtSY5	PtSY6	PtSY7	PtSY10	
15	27,61	10,60	09,75	28,57	0,69	11,68	0,11	17,53	
20	16,90	10,43	14,80	33,40	5,00	20,00	0,33	12,64	
25	23,53	23,75	16,70	34,21	5,50	23,00	0,35	23,10	
30	24,98	19,66	13,74	28,14	3,40	12,08	0,30	15,88	
35	27,61	11,30	12,18	22,95	4,47	21,60	0,19	11,12	
40	02,77	15,17	10,34	13,91	3,17	26,90	0,03	10,93	

Tableau 5. Activité nitrate réductase (mgNO₂/g.M.F./h) *in vivo* chez le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius* en fonction de la concentration en nitrates

[NO ₃] (g/l)	Variétés de <i>Pisolithus tinctorius</i>								
	Pt SY1	PtSY2	PtSY3	PtSY4	PtSY5	PtSY6	PtSY7	PtSY10	
0,032	15,96	9,75	5,17	10,45	0,90	13,17	0,67	27,31	
0,32	20,81	13,15	9,9	12,16	0,21	14,07	2,17	36,24	
3,2	25,34	26,95	9,38	34,00	4,37	20,35	3,22	41,83	
32	95,90	109,5	80,27	30,00	11,25	99,75	4,99	96,84	
320	202,20	75,60	217,60	32,00	20,30	141,32	15,30	187,76	

L'exploitation de l'ensemble de ces résultats pendant la culture du mycélium dans le but de produire des mycorhizes permettrait d'améliorer la croissance du champignon et apparemment un gain de productivité des plants d'*Eucalyptus* mycorhizés.

CONCLUSION

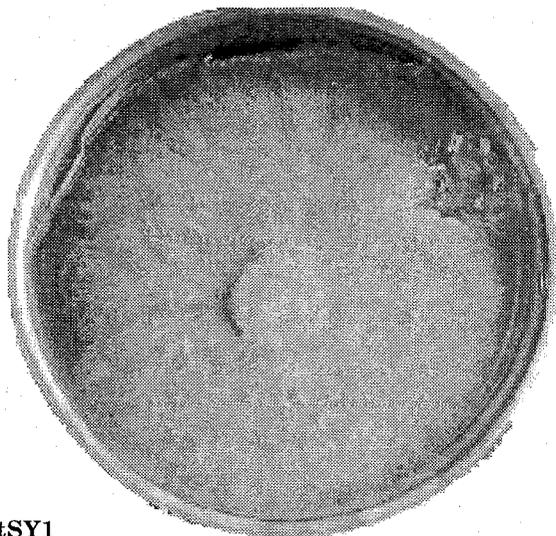
L'azote est un élément fondamental qui conditionne l'activité physiologique des champignons. Ces expériences ont permis de mettre en évidence la grande spécificité physiologique tant interspécifiques, que des formes biologiques des variétés étudiées.

Pendant la croissance, les différentes variétés de *Pisolithus tinctorius* ont été classées en trois groupes :

- Le groupe I est composé de la Pt1, Pt2, Pt4 et Pt5 qui se caractérisent par un mycélium dense et une activité nitrate réductase importante (Figure 3).
- Les variétés Pt3, Pt6 et Pt10 qui constituent le groupe II ont un mycélium brun foncé. Dans ce groupe, on observe une forte pigmentation du milieu due à un phénomène d'autolyse du mycélium (Figure 3).
- Le groupe III représenté par la variété 7 est caractérisée par un mycélium fin, blanc et lâche. Les variétés des groupes II et III ont une activité nitrate réductase plus faible par rapport à celles du groupe I (Figure 3).

L'étude de l'activité nitrate réductase *in vivo* a permis de déterminer les conditions optimales de dosage de ce système enzymatique. À la lumière de nos résultats, on peut dire que les différentes variétés marocaines de *Pisolithus* âgées de 15 jours mises en incubation pendant 1 heure à pH 7,5 et à 25°C ont une activité nitrate réductase maximale. Ce résultat est conforme aux résultats obtenus par Plassard (1989), et va à l'encontre de ceux publiés par Littke (1982).

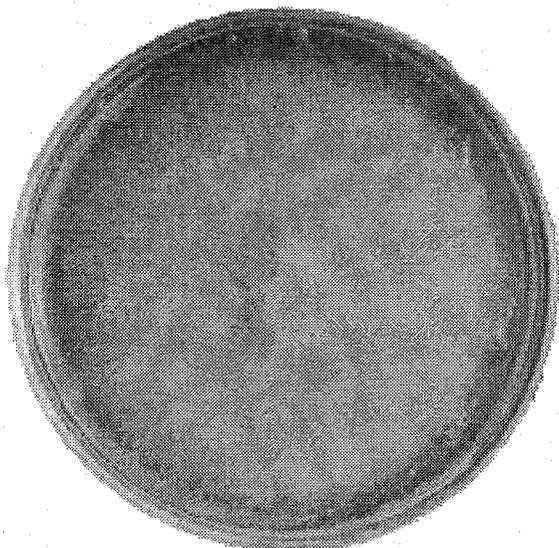
Le test proposé est facile à mettre en œuvre. Il ne nécessite pas d'équipement indispensable à l'extraction enzymatique, pour laquelle certaines opérations doivent être effectuées à basse température pour éviter la dégradation du système enzymatique connu pour son instabilité thermique (Es-sgaouri & Botton, 1990). Il présente l'avantage d'apprécier l'utilisation de l'azote nitrique absorbé au niveau de la première étape du métabolisme de l'azote.



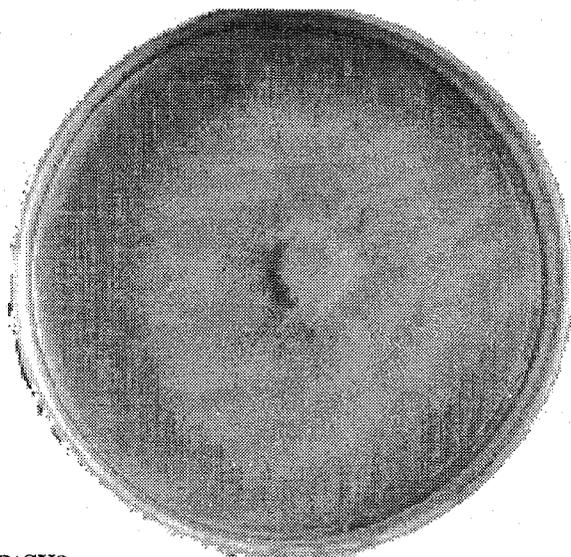
PtSY1



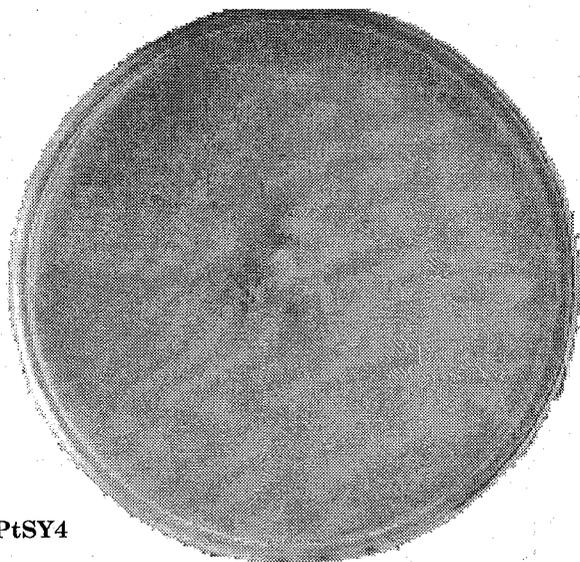
PtSY5



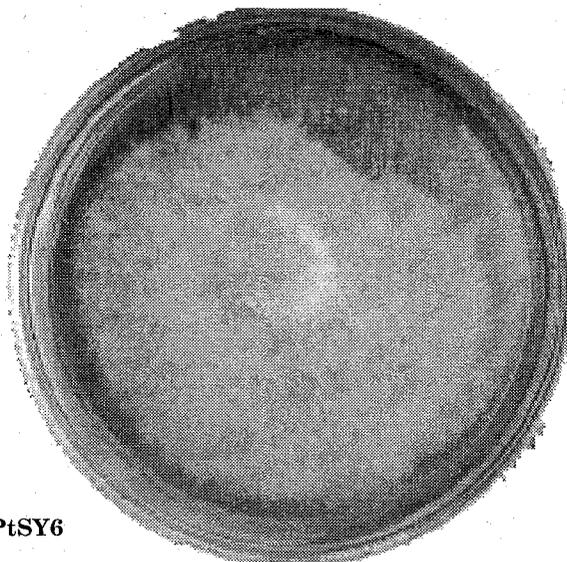
PtSY2



PtSY3

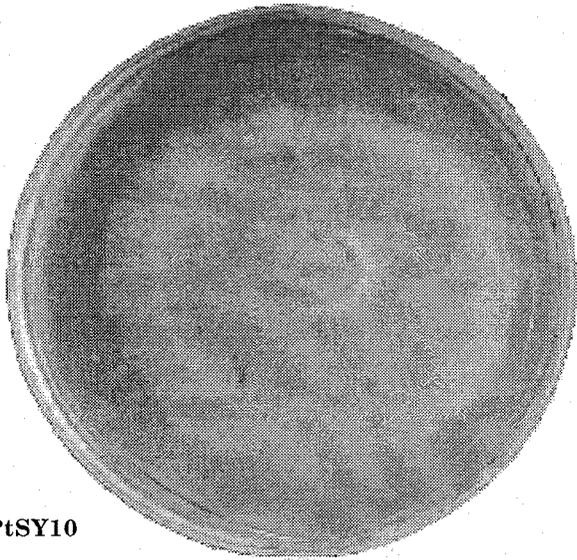


PtSY4



PtSY6

PtSY10



PtSY7

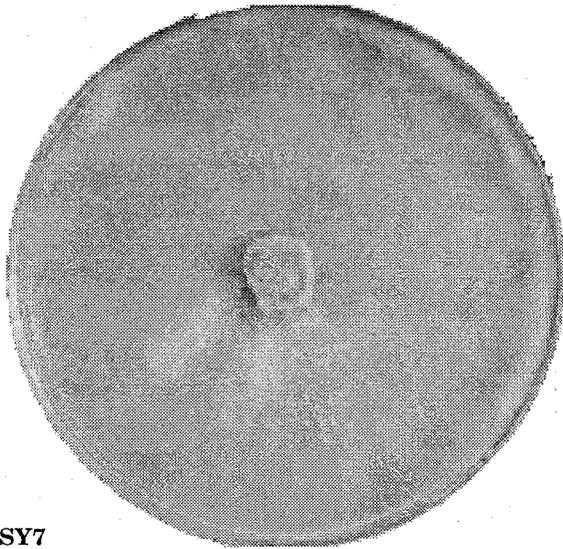


Figure 3. Croissance de *Pisolithus tinctorius* (PtSY) sur milieu MNM (nitrate)
Groupe I : PtSY1, PtSY2, PtSY4, PtSY5
Groupe II : PtSY3, PtSY6, PtSY10
Groupe III : PtSY7

RÉFÉRENCES CITÉES

Adnane N. (1993) Étude de l'assimilation de l'azote ammoniacal par le champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. C.E.A., Université Hassan II, Ain chock, Casablanca

Botton B. & Dell B. (1994) Expression of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in Eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytol.* 126 : 249-257

Botton B. & Es-sgaouri A. (1985) Morphogenesis and free amino acid composition of the ascomycete *Sphaerostilbe repens* as influenced by nitrogen and calcium. *FEMS Microbiol. Let.* 28 : 145-150

Brun A., Chalot M. & Botton B. (1993) Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*: occurrence and immunogold localization in the free living mycelium. *Plant. Physiol. Life Sci. Adv.* 12 : 53-60

Burgess T., Malajczukn. & Dell B. (1995) Variation in *Pisolithus* based on basidiome and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. *Mycol. Res.* 99 (1) : 1-13

Caba M.J. (1995) Distribution of nitrate reductase activity in *Vicia faba* : Effect of nitrate and plant genotype. *Physiol. Plant.* 93 : 667-672

Chalot M., Stewart G.R., Brun A., Martin F. & Botton B. (1991) Ammonium assimilation by *spruce-Hebeloma* sp. ectomycorrhizas. *New Phytol.* 119 : 541-550

Es-sgaouri A. (1984) Absorption et assimilation de l'azote minéral chez *Sphaerostilbe repens*. Propriétés et régulation de la nitrate réductase. Thèse de doctorat de 3ème cycle, Université de Nancy I, France

Es-sgaouri A. & Botton B. (1990) *In vitro* stability and functional properties of nitrate reductase from the ascomycète *Sphaerostilbe repens*. *Mycol. Res.* 94 (7): 985-992

Fawzi B. (1994) Contribution à l'étude de la croissance et du métabolisme azoté du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. C.E.A., Université Hassan II Ain chock, Casablanca

Guerrero M.G. & Guttierrez M. (1977) Purification and properties of the NAD(P)H: Nitrate réductase of the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Biochim. Biophys. Acta* 482 : 272-285

Hile N. & Hennen J.F. (1969) *In vitro* culture of *Pisolithus tinctorius* mycelium. *Mycol.* 61 : 195-198

Kurt H.J., Bruce C.B. & Lindsay R.B. (1991) Effect of nitrate on *in vivo* nitrate reductase activity of seedlings from three-pollinated families of *Robinia pseudoacacia*. *Tree Physiol.* 8 : 381-389

Lewis C.M. & Fincham J.R.S. (1970) Regulation of nitrate reductase in the Basidiomycete *Ustilago maydis*. *J. Bact.* 103 : 55-61

Littke W.R. (1982) Nitrogen uptake by mycorrhizal fungi and mycorrhizal douglas-fir. Philos. Doct. Diss., Univ. of Washington

- Marx D.H. (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic and soil bacteria. *Phytopatol.* 59 : 153-163
- Nason A. & Evans H.J. (1953) Triphosphopyridine nucleotide nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 202 : 655-673
- Nicholas D.J.D. & Nason A. (1957) Determination of nitrate and nitrite. In: Methods in enzymology, vol. III, 981-984, S.P. Colowick & N.O. Kaplan, Eds. Academic Press, New-York
- Plassard C. (1989) Données sur la nutrition azotée de symbiotes ectomycorhiziens: *Pinus pinaster*, *Hebeloma cylindrosporum* et *Pisolithus tinctorius*. Doctorat ès sciences, Université des sciences et polytechniques du Languedoc, France
- Peyronel B., Fassi B., Fontana A. & Trappe M. (1969) Terminology of mycorrhizae. *Mycologia*, 61 : 410-411
- Rykowsky K. (1976) Recherche sur la nutrition azotée de plusieurs souches de *Armillaria mella*. *Eur. J. For. Path.* 6 : 211-221
- Saule K. & Rakova N. (1995) Multiple forms of nitrate reductase and their role in nitrate assimilation in roots of wheat at low temperature or high salinity. *Physiol. Plant.* 93 : 249-252
- Thiery G.A. (1975) Contribution à l'étude de la nitrate réductase chez *Aspergillus niger*. Thèse de Doctorat d'État, Université de Nancy I
- Van Der Westhuizen G.C.A. & Eicker A. (1989) The morphology and cultural characteristics of *Pisolithus tinctorius* (Gasteromycetes) in South Africa. *South African journal of Botany* 55 : 17-21