

THESE  
POUR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ANGERS  
EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES

Par

Tahir dit Abdoulaye DIOP

ECOPHYSIOLOGIE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A VESICULES ET  
ARBUSCULES ASSOCIES A *ACACIA ALBIDA* DANS LES ZONES SAHELIENNE ET  
SOUDANO-GUINEENNE DU SENEGAL

Soutenu le 12 Mai 1995  
devant la Commission d'Examen

M.	D.G. STRULLU	Professeur à l'Université d'Angers	Directeur de thèse
M.	G. BECARD	Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse	Rapporteur
M.	B.L. DREYFUS	Directeur de Recherche à l'ORSTOM de Dakar	Rapporteur
M.	C. PLENCHETTE	Directeur de Recherche à l'INRA de Dijon	Examineur
Mme	Y. DALPE	Chercheur à Agriculture Canada à Ottawa	Examineur
M.	M. GUEYE	Chercheur à l'ISRA de Dakar	Membre invité

**A MON PERE et A MA MERE**

**A MA FEMME ROKHAYA**

**A MON FILS EL HADJI MALICK DIOP**

**A MES FRERES et SOEURS**

## RESUME

Des prélèvements de sols autour des racines d'*Acacia albida* ont montré que la mycorhization de l'arbre pouvait se dérouler des horizons superficiels jusqu'aux niveaux des nappes phréatiques. Des mycorhizes à vésicules et arbuscules ont été récoltées jusqu'à 1,5 et 4,5 m de profondeur dans les régions soudano-guinéennes et jusqu'à 16 et 34 m dans les régions sahéliennes. Les effets des champignons mycorhiziens à vésicules (MVA) et arbuscules ont été évalués en serre sur la croissance et la nutrition des semis d'*A. albida*.

La culture *in vitro* de *Glomus* par la forme intraracinaire seule ou en association avec des racines excisées de tomate et de carotte a montré un important potentiel de production de propagules MVA et révélé différents aspects du mode de vie biotrophique des *Glomus*. Un schéma de cycle de culture des isolats des zones tropicales et un autre sur le cycle vie des *Glomus* ont été proposés. Par des subcultures régulières en conditions axéniques, les champignons MVA d'*A. albida* sont maintenus en culture continue, permettant de créer des banques de champignons.

L'identification par des critères morphologiques a montré une diversité des souches mycorhiziennes associées à *A. albida*. En complément de cette taxonomie, des fragments d'ADN correspondant aux régions de l'espace transcrit interne (ITS) ont été amplifiés à partir des spores. Les produits d'amplification ont été clonés et leurs séquences étudiées.

**Mots clés :** *Acacia albida*, mycorhizes, profondeur, *in vitro*, culture continue, taxonomie,

Sénégal

## ABSTRACT

Soil samplings around *Acacia albida* roots showed that mycorrhizal symbiosis of the tree occurred from the topsoils to the water table. Vesicular-arbuscular mycorrhizae have been collected in depth from 1.5 to 4.5 m in the Sudano-Guinean zone and from 16 to 34 m in the Sahelian zone. Effectiveness of these vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi on growth and nutrition of *A. albida* seedlings was tested under greenhouse conditions.

*In vitro* cultures of the intraradical form alone or in association with isolated roots of tomato or carrot produced an important inoculum potential and revealed different aspects of their biotrophic status. Models for culture of tropical strains and for life cycle of *Glomus* were proposed. Regular axenic subcultures allowed continuous culture of VAM fungi associated with *A. albida* and establishment of a fungal library.

Morphological identification showed a diversity of mycorrhizal strains associated with *A. albida*. In addition, DNA fragments of internal transcribed spacer (ITS) regions from VAM spores have been amplified. Amplification products were cloned and their sequences studied.

**Key words:** *Acacia albida*, mycorrhizae, depth, *in vitro*, continuous culture, taxonomy,

Senegal

## REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire LIPM de l'Université d'Angers, la Station d'Agronomie de Dijon, les laboratoires de Microbiologie des Sols de l'ORSTOM et de l'ISRA/MIRCEN de Dakar. Je remercie vivement les responsables et tout le personnel de ces organismes de Recherche.

Le Professeur Désiré G. STRULLU, directeur du laboratoire de LIPM, a dirigé cette thèse avec enthousiasme et compétence scientifique. Je lui en suis très reconnaissant. Je n'oublierai tout ce qu'il a fait pour faciliter mon intégration dans son laboratoire. Toute ma sympathie va aussi à sa femme et ses enfants qui m'ont souvent accueilli dans leur foyer avec enthousiasme.

Toute ma gratitude va à Monsieur Christian PLENCHETTE, mon codirecteur. Je le remercie d'avoir consenti beaucoup d'efforts pour réaliser ce projet. Je n'oublierai pas ses critiques constructives et sa rigueur scientifique. Je remercie le directeur de la Station d'Agronomie de Dijon, Monsieur Claude DUTHION, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens à remercier, Madame Josiane MORTIER pour sa franche collaboration et Madame Claudine CHOTEL pour sa gentillesse et sa disponibilité à l'égard de ma famille.

Je suis très redevable à Monsieur Bernard DREYFUS, directeur du laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM de Dakar, d'avoir accepté de juger ce travail. Je lui suis très reconnaissant d'être le promoteur de cette thèse dans un domaine qui n'est pas directement lié à son axe de recherche, ce qui témoigne d'une grande ouverture scientifique.

Je remercie vivement, le Professeur Guillaume BECARD, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, d'avoir accepté de juger ce travail. Depuis notre rencontre à Québec, il m'a toujours fait bénéficier de ses connaissances scientifiques dans l'étude des mycorhizes.

Mademoiselle Yolande DALPE, a aidé par sa compétence à la caractérisation des souches mycorhiziennes du Sahel. Je la remercie pour sa disponibilité et pour sa participation au Jury.

Monsieur Mamadou GUEYE, responsable du MIRCEN à Dakar, est plus qu'un collaborateur. Une grande complicité s'est établie entre nous dès les premiers jours de notre rencontre. Je le remercie pour ses conseils et ses critiques judicieux et pour son esprit d'équipe. Mes remerciements vont à tous les membres de sa sympathique équipe et surtout à mon ami Adama DIOUF.

Je tiens à remercier tout particulièrement, Monsieur Phillipe SIMONEAU, Maître de Conférence à l'Université d'Angers, de m'avoir initié aux techniques de la biologie moléculaire avec beaucoup de pertinence et de rigueur. J'ai beaucoup apprécié sa volonté constante d'accomplir un travail bien fait. Je lui suis très reconnaissant d'avoir sacrifié ses rares vacances pour mener à bien l'étude génétique des champignons MVA du Sahel.

Toute ma reconnaissance va à Mademoiselle Laurence FEUGEY pour sa gentillesse et son soutien sans faille dans la dernière ligne droite. Elle s'est occupée, avec beaucoup de cœur, des pénibles tâches de correction et de mise en page de cette thèse. Je n'oublierai pas Jean Christophe MOREAU par sa disponibilité et sa gentillesse. Stéphane DECLERCK a été un compagnon de tous les jours et je le remercie de sa collaboration.

Ce projet de recherche a pu être réalisé grâce à une importante subvention de l'ORSTOM de le cadre du Programme de Formation Insertion. Je remercie Monsieur Phillipe MATHIEU, représentant de l'ORSTOM à Dakar, Monsieur Henri POUPON et Mademoiselle Monique MALLOCHET au Service de Relations Extérieures de l'ORSTOM, Monsieur Pape SALL, directeur de la DRPF et Monsieur Ousmane DIAGNE, chercheur à l'ISRA d'avoir soutenu avec un intérêt particulier ce projet.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et à tous mes amis et collègues qui m'ont soutenu tout au long de ce travail. Je pense particulièrement à mes frères Moustapha DIOP Mamadou DIOP et Assane DIOP et à mes amis de toujours Momar MBAYE et Insa DIEYE.

# **SOMMAIRE**

	Pages
RESUME .....	ii
ABSTRACT .....	iii
REMERCIEMENTS .....	iv
SOMMAIRE .....	vi
LISTE DES TABLEAUX .....	xiii
LISTE DES FIGURES .....	xv
INTRODUCTION GENERALE .....	1
I. But poursuivi .....	2
II. Généralités .....	5
1. <i>Acacia albida</i> .....	5
1.1. Aspects morphologiques .....	5
1.2. Ecologie de l'espèce .....	5
1.3. Particularités et propriétés agrosylvo-pastorale de l'espèce .....	6
1.4. Microorganismes symbiotiques de l' <i>A. albida</i> .....	9
2. Les mycorhizes .....	9
2.1. Concept général .....	9
2.2. Les types de mycorhizes .....	13
3. Les mycorhizes à vésicules et arbuscules .....	16
3.1. Taxonomie des champignons MVA .....	16
3.2. Méthodes de culture .....	16
3.3. Facteurs contrôlant la mycorhization .....	18
3.4. Rôle dans le développement et dans l'alimentation hydrominérale des plantes .....	19
3.5. Nécessité de gérer les mycorhizes à vésicules et arbuscules en zones sahéliennes .....	20

## CHAPITRE I : ECOLOGIE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS

### A VESICULES ET ARBUSCULES D'*ACACIA ALBIDA*.....21

#### I. Les champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules

d' <i>A. albida</i> dans différentes régions du Sénégal .....	22
1. Résumé.....	23
2. Abstract .....	23
3. Sampling procedures .....	25
4. Assessment of AM propagules.....	25
5. Data analysis.....	26
6. Number of spores recovered .....	29
7. Viability of spores recovered .....	30
8. Colonization of <i>A. albida</i> roots.....	33

#### II. Les champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules

##### dans les horizons de sols profonds des régions

##### sahéliennes du Sénégal .....

35

#### III. Conclusion.....

36

## CHAPITRE II : REPOSE DE L'*ACACIA ALBIDA*

### A L'INOCULATION MYCORHIZIENNE EN SERRE.....37

#### Growth and nutrient mineral status of two provenances of

#### *Acacia albida* Seedlings as influenced by phosphorus applications,

#### *Bradyrhizobium* and *Glomus mosseae* strains

#### in sterile and non-sterile soils .....

38

1. Résumé..... 38

2. Abstract .....

39

3. Introduction.....

39

4. Materials and methods.....

40

5. Results .....	42
5.1 Plant biomass.....	42
5.2 Nutrient contents.....	43
6. Discussion .....	47

**CHAPITRE III : CULTURE *IN VITRO* DE *GLOMUS INTRARADICES*  
ET DE *GLOMUS VERSIFORME* .....**

**49**

<b>I. Culture <i>in vitro</i> de fragments mycorhiziens .....</b>	<b>50</b>
1. Résumé.....	51
2. Abstract .....	51
3. Introduction .....	52
4. Materials and methods.....	53
4.1 Fungal material.....	53
4.2 Tomato root culture.....	53
4.3 Assesment of fungal development .....	54
5. Results .....	55
5.1 Denaturing root process.....	55
5.2 Hyphal growth from sheared-roots of VAM fungi .....	55
5.3 Morphological features of the extraradical phase.....	55
5.4 Viability of produced spores.....	56
6. Discussion .....	61
<b>II. Culture <i>in vitro</i> de fragments mycorhiziens et de racines excisées de tomate.....</b>	<b>63</b>
1. Résumé.....	64
2. Abstract .....	64
3. Introduction.....	65

4. Materials and methods.....	66
4.1 Sheared-root inocula of VAM fungi.....	66
4.2 Root culture.....	66
4.3 Dual culture.....	67
4.4 Reinfection of VAM propagules produced.....	67
4.5 Assessment of variables.....	68
5. Results.....	70
5.1 Growth of tomato root.....	70
5.2 Establishment of dual cultures.....	70
5.3 <i>In vitro</i> fungal development.....	70
5.4 Viability and reinfection of VAM propagules.....	73
6. Discussion.....	75

### III. Constitution de collection *in vitro* de *Glomus* par culture

<b>continue de la forme intraracinaire.....</b>	<b>77</b>
1. Résumé.....	77
2. Summary.....	77
3. Abridged english version.....	78
4. Introduction.....	79
5. Materiel et Methodes.....	80
5.1 Obtention de la forme intraracinaire du symbiote.....	80
5.2 Mycorhization des racines transformées.....	81
6. Résultats.....	81
6.1 Mise en culture du champignon.....	81
6.2 Subcultures.....	82
7. Discussion et conclusion.....	85
7.1 Importance de l'inoculum fongique.....	85
7.2 Cycle des <i>Glomus</i> .....	86

## CHAPITRE IV : EFFICACITE *IN VIVO* DES PROPAGULES

### MVA OBTENUES EN CULTURE *IN VITRO* ..... 89

<i>In vivo</i> evaluation of inoculum potentials of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus produced in <i>in vitro</i> conditions .....	90
1. Résumé.....	90
2. Abstract .....	90
3. Introduction.....	91
4. Materials and methods.....	92
4.1 Axenic continuous culture of <i>Glomus versiforme</i> .....	92
4.2 Preparation of inoculum dilution.....	92
4.3. Measurements .....	93
5. Results and Discussion.....	96

## CHAPITRE V : CULTURE ET CARACTERISATION DES

### CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A VESICULES

### ET ARBUSCULES D'*ACACIA ALBIDA* ..... 99

I. Culture des isolats MVA d' <i>Acacia albida</i> .....	100
II. Identification par des critères morphologiques.....	102
III. Culture <i>in vitro</i> des isolats MVA d' <i>Acacia albida</i> .....	109
1. Préparation de l'inoculum fongique .....	109
2. Plantes hôtes.....	109
3. Mycorhization .....	109

<b>IV. Identification par les outils de la biologie moléculaire.....</b>	<b>120</b>
1. Préparation de l'ADN fongique.....	120
2. Amplification <i>in vitro</i> .....	121
3. Analyse des produits d'amplification.....	122
4. Résultats et discussion .....	124
4.1 Amplification des régions de l'ADN ribosomal à partir d'ADN extrait de suspensions de spores de champignons MVA.....	124
4.2 Analyse RFL des régions ITS amplifiées.....	125
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>135</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>140</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>153</b>

## LISTE DES TABLEAUX

### INTRODUCTION

Tableau 1 : Caractères généraux des mycorhizes et modèle unifié de fonctionnement .....	11
--	----

### CHAPITRE I

Table 1 : General characteristics of the sample site soil and climate .....	27
Table 2 : Deep sampling soil composition in the Sudano-Guinean zone.....	28
Table 3 : Density of AM propagules associated with acacia roots at various depths in the Sudano-Guinean zone of Senegal (Djinaki and Kabrousse, 1992) .....	32

### CHAPITRE II

Table 1 : Analysis of variance of growth parameters and shoot mineral content of <i>A. albida</i> seedlings provenances.....	44
Table 2 : Comparative effects of 10 treatments on shoot dry weight of <i>Acacia albida</i> seedlings in sterilized and non sterilized soils .....	45
Table 3 : Comparative effects of 10 treatments on shoot mineral mass of <i>Acacia albida</i> seedlings.....	46

## CHAPITRE III

### I. Culture *in vitro* de fragments mycorhizien

Table 1 : <i>In vitro</i> production of spores from sheared roots of <i>Glomus spp</i> in two different media .....	60
--	----

### II : Culture *in vitro* de fragments mycorhiziens et de racines excisées de tomate

Table 1 : Reinfection of <i>Acacia albida</i> seedlings under greenhouse conditions by axenically produced propagules .....	74
--	----

## CHAPITRE IV

Table 1 : Root colonization and <i>in vitro</i> germination of two generations <i>G. versiforme</i> after 3 months.....	95
Table 2 : Most probable number (MPN) estimates of axenic inoculum of <i>G. versiforme</i> .....	97

## CHAPITRE V

Tableau 1 : Fiche descriptive et localisation des champignons MVA du Sahel.....	104
Tableau 2 : Principales souches MVA mises en collection <i>in vivo</i> .....	105
Tableau 3 : Principales souches MVA mises en collection <i>in vitro</i> .....	118
Tableau 4 : Caractéristiques des régions ITS amplifiées à partir des différents champignons MVA.....	130

## LISTE DES FIGURES

## INTRODUCTION

Figure 1 : Aire de répartition de <i>Faidherbia albida</i> .....	7
Figure 2 : <i>Acacia albida</i> en saison sèche (Kabrousse, 1992).....	8
Figure 3 : Culture de mil à Louga sous <i>Acacia albida</i> .....	8
Figure 4 : Mycorhizes et nutrition minérale des plantes :	
un modèle unifié de fonctionnement .....	12
Figure 5 : Représentation schématique des principaux groupes de mycorhizes.....	15

## CHAPITRE I

Figure 1 : Numbers of total spores and viable spores recovered around <i>A. albida</i> in different localities, in different seasons and at different ages of trees .....	32
Figure 2 : Percentages of root colonization of <i>A. albida</i> in different localities, in different seasons and at different ages of trees .....	33

## CHAPITRE III

I. Culture *in vitro* de fragments mycorhiziens

Figure 1 : Hyphal growth (cm) from germinating sheared roots of <i>Glomus spp</i> during seven days of cultivation on water agar (A) and minimal M (B) media .....	57
Figure 2 : <i>In vitro</i> sporulation of sheared roots of <i>G. intraradices</i> on water agar medium .....	58
Figure 3 : Extraradical phase of <i>G. intraradices</i> on water agar medium showing dense mycelia .....	58
Figure 4 : Magnification of spores of <i>G. intraradices</i> formed on M medium. ....	58

Figure 5 : Extraradical phase from sheared root of <i>G. versiforme</i> on water agar medium .....	59
Figure 6 : Portion of tomato root colonized <i>in vitro</i> by newly produced spores of <i>G. intraradices</i> after 1 month .....	59

## II : Culture *in vitro* de fragments mycorhiziens et de racines excisées de tomate

Figure 1 : Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) root piece showing vesicles (arrow), which form an excellent starting inoculum for establishment of VAM symbiosis .....	69
Figure 2 : Culture of tomato roots in modified White's medium .....	69
Figure 3 : Change in the length of hyphae from germinating sheared-root inocula of <i>Glomus spp.</i> associated with excised tomato root during 7 days of dual culture .....	71
Figures 4-13 : Morphological features of sheared-root inocula of <i>Glomus spp</i> in tomato root culture.....	72

## III : Constitution de collections *in vitro* de *Glomus* par culture continue de la forme intraracinaire

Figure 1 : Germination d'un fragment mycorhizien .....	83
Figure 2 : Disposition des spores de <i>G. intraradices</i> sur un hyphe principal .....	83
Figure 3 : Détail des thalles de <i>G. intraradices</i> . .....	83
Figure 4 : Développement mycélien et sporulation de <i>G. versiforme</i> après deux mois de culture en association avec des racines transformées de carotte.....	84
Figure 5 : Disposition des spores de <i>G. versiforme</i> . .....	84
Figure 6 : Détail des spores de <i>G. versiforme</i> . .....	84
Figure 7 : Cycle de développement des <i>Glomus</i> . .....	87

## CHAPITRE IV

Figure 1 : Subculture of <i>G. versiforme</i> . .....	94
---	----

## CHAPITRE V

Figure 1 : Localisation des sites de prélèvement des champignons MVA.....	101
Figure 2 : Caractères morphologiques de <i>Glomus mosseae</i> .....	106
Figure 3 : spore intacte de <i>G.fasciculatum</i> .....	107
Figure 4 : Caractères morphologiques de <i>Gigaspora margarita</i> . ....	107
Figure 5 : Caractères morphologiques de <i>Glomus caledonium</i> . ....	108
Figure 6 : Développement <i>in vitro</i> de <i>Glomus mosseae</i> (UAORS SR 103).....	113
Figure 7 : Développement <i>in vitro</i> de <i>Gigaspora margarita</i> (UAORS 109).....	114
Figure 8 : Développement <i>in vitro</i> de <i>Glomus caledonium</i> (UAORS 110).....	115
Figure 9 : Développement <i>in vitro</i> de <i>Glomus aggregatum</i> (UAORS SR 108).....	116
Figure 10 : Développement <i>in vitro</i> de <i>Glomus fasciculatum</i> (UAORS SR 106).....	117
Figure 11 : Protocole d'isolement, de purification, de culture et de conservation retenue pour les souches MVA du Sahel.....	119
Figure 12 : Localisation des amorces sur les gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) des champignons.....	123
Figure 13 : Effet du traitement au 2-butoxyéthanol sur l'amplification.....	127
Figure 14 : Amplification de la région ITS à partir d'ADN extrait de suspensions de spores.....	127
Figure 15 : Analyse des produits de digestion <i>Hae</i> III des régions ITS amplifiées à partir de suspensions de spores.....	128
Figure 16 : Analyse des produits de digestion <i>Hinf</i> I des régions ITS amplifiées à partir de suspensions de spores sur gel d'agarose Nusieve (A) ou Metaphor (B).....	128
Figure 17 : Analyse de produits de restriction <i>Hinf</i> I des régions ITS clonées.....	129
Figure 18 : Comparaison des séquences des régions ITS-A de <i>G. mosseae</i> UAORS SR 103 et à <i>G. caledonium</i> UAORS 130 et ITS-E de <i>G. caledonium</i> UAORS 113 avec les régions correspondantes du génôme <i>Paxillus involutus</i> .....	133
Figure 19 : Comparaison des séquences ITS-A de <i>G. mosseae</i> UAORS SR 103 et à <i>G. caledonium</i> UAORS 130 .....	134

# **INTRODUCTION GENERALE**

## 1. BUT POURSUIVI

Les mycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA) constituent une association entre les racines des plantes supérieures et les champignons zygomycètes. Le caractère de symbiote obligatoire des champignons MVA leur confère un large spectre d'hôtes et ceci dans des sites écologiques aussi contrastés que les zones humides et les zones désertiques. On trouve les champignons MVA chez certaines essences forestières et dans tous les types de culture : les formations à Graminées et Légumineuses des prairies, les cultures en serre et en plein champ, les productions ornementales, fruitières et légumières. Seules quelques Cruciféracées (choux, radis), les Chénopodiacées agricoles et les gymnospermes de la famille des Pinacées ne seraient pas régulièrement associées à des champignons MVA. La dépendance mycorhizienne des plantes supérieures est liée en grande partie à leur architecture racinaire; les plantes à système racinaire graminéoïde étant moins dépendantes des champignons MVA que celles à système racinaire pivotant (Sieverding, 1991). L'importance des MVA dans la fertilité, la restauration de la végétation des sols dégradés, la protection contre certains pathogènes telluriques et la nutrition minérale des plantes, est démontrée (Sieverding, 1991; Strullu et al. 1991a). Cependant, le statut de biotrophe obligatoire des champignons MVA, limite la technologie de l'inoculum et par conséquent leur utilisation massive dans l'agroenvironnement.

Toutefois, au cours de la dernière décennie, après de nombreuses et diverses tentatives, la culture *in vitro* des champignons MVA en présence de racines isolées, a donné d'importants renseignements sur leur développement et leur cycle de vie (Strullu et Romand, 1986, 1987; Bécard et Fortin, 1988; Diop et al., 1992 a,b). Les rares cultures continues axéniques de MVA, permettant une multiplication de l'espèce avec un gain de biomasse sont réalisées sur des souches d'origines tempérées. A ce jour, aucun résultat n'a été publié sur la culture axénique de souches MVA d'origines sahéliennes, bien que leur rôle bénéfique dans ces sols souvent déficients en éléments minéraux soit évident (Sieverding, 1991).

Nous avons étudié les champignons MVA associés à *A. albida*, arbre "miracle" du Sahel, en raison de ses multiples usages, pour comprendre leur écophysiologie dans différentes zones climatiques du Sénégal. Pour atteindre notre objectif, des études ont été réalisées en serre

et *in vitro*. Des souches mycorhiziennes et rhizobiennes de référence sont utilisées dans le but de mieux exploiter le potentiel des champignons MVA associés à *A. albida*. La culture axénique continue des souches efficaces en présence de racines transformées de carotte ou non transformées de tomate, peut permettre à court terme l'intégration des mycorhizes dans l'agriculture. Pour atteindre ce but, notre étude a comporté plusieurs étapes présentées sous différents chapitres.

Le **chapitre I** porte sur la distribution des champignons MVA dans les zones sahéliennes et soudano-guinéennes du Sénégal. Des prélèvements de sols en surface et en profondeur dans la rhizosphère d'*A. albida* ont permis d'évaluer le nombre et la viabilité des propagules mycorhiziennes en fonction de l'âge physiologique de l'arbre, des saisons et des caractères pédologiques des sols.

Le genre *Acacia* renferme plus de 1200 espèces au sein desquelles on note une grande variabilité génétique intraspécifique. Dans le **chapitre II**, l'objectif est d'évaluer la réponse de deux provenances d'*A. albida* en serre sur sols stérile et non stérile. Une étude comparative est réalisée en présence de souches symbiotiques de référence (*Glomus mosseae* (fourni par Rothamsted Experimental Station, U.K.) et *Bradyrhizobium* ORS 136) et différentes doses de phosphore pour trouver les combinaisons d'inoculation les plus performantes.

Le **chapitre III** porte sur la productivité de système *in vitro* de *Glomus Spp.* Cette étude, faite avec des souches de références [*Glomus versiforme* (UAORS-SR 101) et *Glomus intraradices* (UAORS-SR 102)] a permis de comprendre la biologie des champignons MVA afin d'envisager l'application des techniques mises au point sur des souches sahéliennes identifiées. Le grand potentiel inoculant de la forme intraracinaire des mycorhizes est exploité. La culture à long terme d'un fragment mycorhizien seul, ou en association avec une racine isolée a permis de mieux cerner le caractère de symbiote obligatoire des champignons MVA. La culture continue des *Glomus* a permis de comprendre leur cycle de vie et les problèmes liés aux repiquages multiples de collections de souches *in vitro*.

La capacité des propagules produites *in vitro* de synthétiser de nouvelles mycorhizes *in vitro* est prouvée (Strullu et Romand, 1986, 1987; Bécard et Fortin, 1988). Cependant peu d'études ont signalé la réintroduction de ces propagules axéniques en conditions de serre (Bécard et Piché, 1992; Diop et al. 1994a). L'objectif du **chapitre IV** est d'évaluer en serre le potentiel infectieux des propagules produites *in vitro*, par la méthode du "Most Probable Number".

Dans le **chapitre V**, les méthodes de cultures axéniques mises au point pour la production de souches de références sont appliquées sur les souches MVA d'*A. albida*. L'établissement d'une collection de souches *in vitro* est réalisée à partir de fragments mycorhiziens issus d'inoculations monosporales et des vésicules et spores isolées. La biodiversité des champignons MVA de surface et de profondeur d'*A. albida* est aussi étudiée. Les souches sont d'abord classées suivant les critères en vigueur dans la taxonomie morphologique. L'étude des fragments d'ADN correspondant aux régions ITS amplifiées à partir de spores, apporte d'autres compléments sur la variabilité génétique des souches MVA identifiées du Sahel.

Ces différents résultats ont permis une nouvelle avancée des biotechnologies de l'inoculum MVA. Des perspectives pour l'utilisation des mycorhizes VA à grande échelle sont dégagées dans la conclusion générale.

## II. GENERALITES

### 1. ACACIA ALBIDA DEL.

#### 1.1. Aspects morphologiques

*A. albida* Del. [synonyme *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev.] est une Légumineuse *mimosoidae* pouvant atteindre une hauteur de plus de 30 m et un diamètre de 1 à 3 m (CTFT, 1988). Les arbres adultes sont reconnaissables à leur large cime hémisphérique tandis que les jeunes développent une architecture de type pyramide inversée. Les sujets âgés sont également caractérisés par une écorce écailleuse et fissurée, plus ou moins liégeuse, contrastant avec l'écorce lisse et de couleur brune à gris mat ou blanchâtre des jeunes sujets.

Les feuilles sont composées, alternes et bipennées avec des pennes foliolées. Les folioles au nombre de 6 à 22 paires sur chaque penne sont glabres et pubescentes. Les épines fortes et droites sont insérées à la base des feuilles. Les inflorescences en épis axillaires denses sont composées de fleurs sessiles. La floraison est assez tardive et elle débute souvent vers la septième année. Le fruit est une gousse indéhiscente présentant un polymorphisme important. La gousse plus ou moins spiralée peut contenir jusqu'à trente graines ovoïdes protégées par une cuticule.

#### 1.2. Ecologie de l'espèce

*A. albida* est essentiellement rencontré sur le continent africain (Figure 1) et est signalé plus rarement sur le continent asiatique (CTFT, 1988). Si l'origine de l'espèce est inconnue, sa dissémination est particulièrement favorisée par le déplacement des éleveurs nomades et de leurs troupeaux (Trochain, 1969). L'arbre se développe dans des zones écologiques fort contrastées; la seule constante étant la présence d'une saison sèche bien tranchée. Il s'accommode aussi bien des saisons sèches extrêmes des régions sahéliennes avec des températures pouvant s'élever à plus de 40 °C qu'à des certaines gelées nocturnes descendant jusqu'à -6 °C (Halevy, 1971; Galabert, 1972). *A. albida* se rencontre sous divers types de sols même si les sols légers sableux ferrugineux (sols Diors), caractérisés par une pauvreté en colloïdes minéraux et organiques et par des réserves minérales réduites, notamment en phosphore, sont plus favorables à son développement (Giffard, 1971).

*A. albida* est une espèce phréatophyte dont la présence est conditionnée par la présence d'une nappe d'eau. Il est particulièrement adapté au climat sec des régions sahéliennes tropicales. Il y développe alors un système racinaire pivotant pouvant atteindre 40 m de profondeur à certains endroits (CTFT, 1988). Dans les régions soudano-guinéennes plus humides, les racines de l'arbre s'établissent dans les horizons plus superficiels, probablement à cause de la nappe phréatique peu profonde (< 5 m). Nous avons noté un spécimen de plus de 3 m de diamètre à Kabrousse, au sud Sénégal, là où la nappe d'eau ne dépasse pas 1.5 m en saison sèche (Figure 2).

### 1.3. Particularité et propriétés agro-sylvo-pastorales de l'espèce

Un phénomène encore mal expliqué est la phénologie inversée d'*A. albida*. L'arbre perd ses feuilles pendant la saison des pluies et les conserve pendant la saison sèche. Le début de la feuillaison est très variable selon les arbres et ceci indépendamment de leur âge physiologique et des propriétés physico-chimiques des sols.

Depuis longtemps, les paysans africains ont exploité l'action fertilisante de l'arbre sur les cultures vivrières associées sans pour autant en comprendre le mécanisme. Les rendements des cultures sous la canopée de l'arbre sont toujours plus importants que ceux des cultures hors abri (Figure 3). Les débris organiques (feuilles, gousses et brindilles) tombés pendant la saison sèche sont facilement décomposés, libérant un pourcentage de cendres solubles riches en phosphore, potassium et azote total (Giffard, 1971). Cette minéralisation importante est favorable à l'établissement de bonnes cultures.

L'arbre est aussi très utilisé dans les campagnes de reboisement. Il s'adapte très bien aux zones dégradées et la croissance rapide de son système racinaire pivotant le rend indépendant des maigres ressources minérales et hydriques des horizons superficiels des sols. Le bois d'*A. albida* est aussi utilisé comme bois de chauffe et pour la confection de certains objets artisanaux. L'écorce et les racines servent à de nombreuses préparations médicinales. Sur le plan pastoral, l'arbre participe à l'alimentation de base des troupeaux. Les feuilles et les fruits constituent dans les régions à fort peuplement, la nourriture des animaux domestiques pendant la saison sèche.

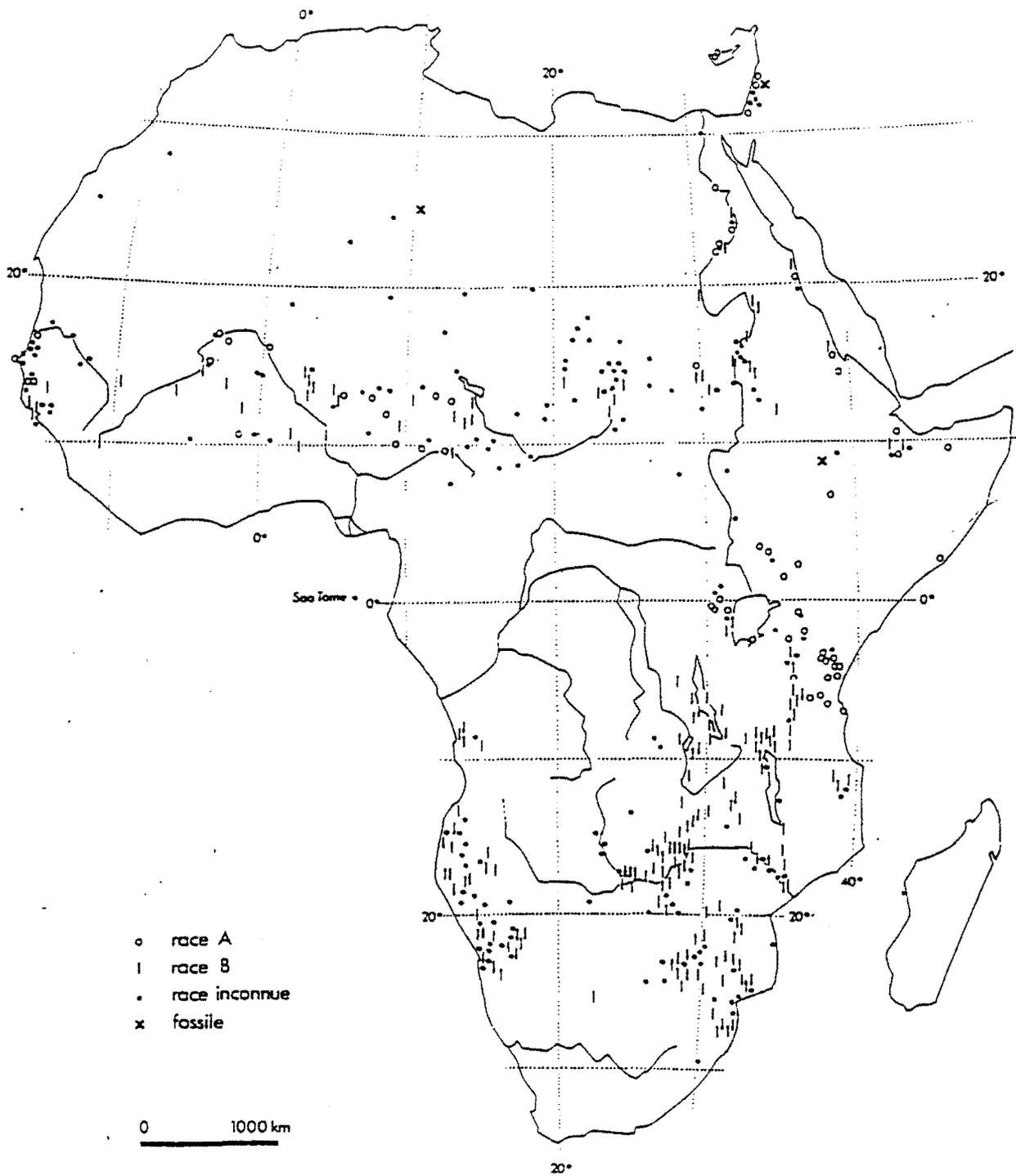


Figure 1 : Aire de répartition de *Faidherbia albida* (Vassal et al., 1977)





#### 1.4. Microorganismes symbiotiques de l'*A. albida*

Comme chez la plupart des Légumineuses, les racines d'*A. albida* sont naturellement associées à la fois à des bactéries fixatrices d'azote et des champignons mycorhiziens. L'aptitude des rhizobiums à former des nodules avec les acacias a même été utilisée pour classer certains acacias africains et exotiques (Dreyfus et Dommergues, 1981). Seuls les rhizobiums à croissance lente (*Bradyrhizobium*) peuvent noduler *A. albida*. Si la nodulation des semis d'*A. albida* s'effectue aisément, elle est souvent inexistante au champ chez les arbres adultes des régions sahéliennes arides. Cependant dans ces régions, de fortes densités de *Bradyrhizobium* à l'état libre sont signalés dans la rhizosphère de l'arbre et jusqu'à 35 m de profondeur (Dupuy et al. 1991; Dupuy et Dreyfus, 1992).

Les champignons mycorhiziens qui colonisent *A. albida* sont dits à vésicules et arbuscules (Diem et al. 1981; Ducouso, 1991). La mycorhization d'*A. albida* intéresse tous les âges physiologiques de l'arbre (drageons, jeunes, adultes) et ceci depuis les horizons superficiels des sols jusqu'au niveau des nappes phréatiques (Gueye et al. 1992; Diop et al. 1994 b, c).

## 2. LES MYCORHIZES

### 2.1. Concept général

Les mycorhizes sont des associations durables entre les racines des végétaux et le mycélium filamenteux de champignons telluriques. Le terme "mycorhize" a été utilisé pour la première fois en 1885 par le phytopathologiste allemand Frank. Cette association symbiotique est le résultat d'une longue évolution datant de l'apparition des plantes terrestres (Pirozynski et Malloch, 1975). La symbiose mycorhizienne est cosmopolite et se rencontre des pôles aux tropiques. Elle intéresse la majorité des plantes si bien que dans le règne végétal, l'état de mycorhization est la règle.

La mycorhize est une union mutualiste basée sur des échanges réciproques actifs entre deux partenaires (Harley, 1989). Les champignons aident leurs partenaires à améliorer leur nutrition hydrominérale et bénéficient en retour des métabolites photosynthétisés par ces derniers pour accomplir leurs cycles biologiques.

Ainsi, la symbiose mycorhizienne constitue-elle des interactions dynamiques avec une complémentarité fonctionnelle des deux partenaires eucaryotes. Strullu (1986) souligne que toutes les mycorhizes correspondent à un modèle unifié de fonctionnement. Le tableau 1 résume les caractères communs et différentiels des ectomycorhizes et des endomycorhizes. Le modèle coordonné par l'environnement, est basé sur l'existence d'un processus d'accumulation de polyanions et sur la différenciation d'un apoplaste mixte (Figure 4). L'organisation au niveau cellulaire avec constitution d'apoplaste mixte est une situation à la fois banale (deux cellules en contact par leurs parois apoplastiques) et originale car les deux organes sont très éloignés systématiquement; ce qui implique des mécanismes particuliers de reconnaissance (Figure 4). En raison de cette disposition, les cellules des deux partenaires sont séparées par une structure pariétale de composition hétérogène et remplissant de multiples fonctions, en particulier celle de filtrage sélectif. Au cours de ces dernières années, de nombreuses données ont été rassemblées aux niveaux biochimiques et moléculaires. La synthèse de nouvelles protéines (SR protéines) a été signalée aussi bien chez les mycorhizes MVA (Simoneau et al., 1994a) que chez les ectomycorhizes (Hilbert et al., 1991; Arines et al., 1993; Simoneau et al., 1993). De même, une stimulation de l'activité des Chitinases (Sauter et Hager, 1989; Dumas-Gaudot et al., 1992), des peroxydases et de la phénylalanine ammonia-lyase (Ronald et Soderhäll, 1985; Ahonen et al., 1990; Simoneau et al., 1994c) a été observée chez les deux types de mycorhizes.

**Tableau 1: Caractères généraux des mycorhizes et modèle unifié de  
fonctionnement  
(Cours Strullu DG, 1995)**

Types de mycorhizes	ectomycorhizes	endomycorhizes
<b>Position systématique des hôtes</b>		
Gymnospermes	(1)	(2)
Angiospermes	(3)	(4)
<b>Forme biologique des hôtes</b>		
Arbres	(1) (3)	(2) (4)
Arbustes		(5)
Autres		(6)
<b>Position systématique des champignons</b>		
Zygomycètes	(7)	(8)
Ascomycètes	(9)	(10)
Basidiomycètes	(11)	(12)
<b>Anatomie du complexe</b>		
Réseau extramatriciel	+	+
Manteau	+	-
Réseau de Hartig	+	-
Pelotons	-	+
Arbuscules et vésicules	-	+
<b>Physiologie de la symbiose</b>		
Extension de la surface d'absorption	+	+
Accumulation de polyphosphates	+	+
Apoplaste mixte polysaccharidique	+	+
Séparation et filtrage moléculaire	+	+
<b>Données biochimiques et moléculaires</b>		
SR protéines	+	+
Chitinase	+	+
Peroxydase	+	+
PAL	+	+
Lignification	+	+

(1) dont *Pinus*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Cedrus* ; (2) dont *Taxus*, *Sequoia*

(3) dont chêne, hêtre, châtaignier, eucalyptus; (4) dont merisier, pommier, frêne

(5) dont *Rhododendron*, *Erica*; (6) dont blé, pomme de terre, soja, pois, haricot, poireau, oignon, asperge, fraisier (80% des espèces végétales)

(7) Endogone; (8) dont *Glomus*, *Gigaspora*

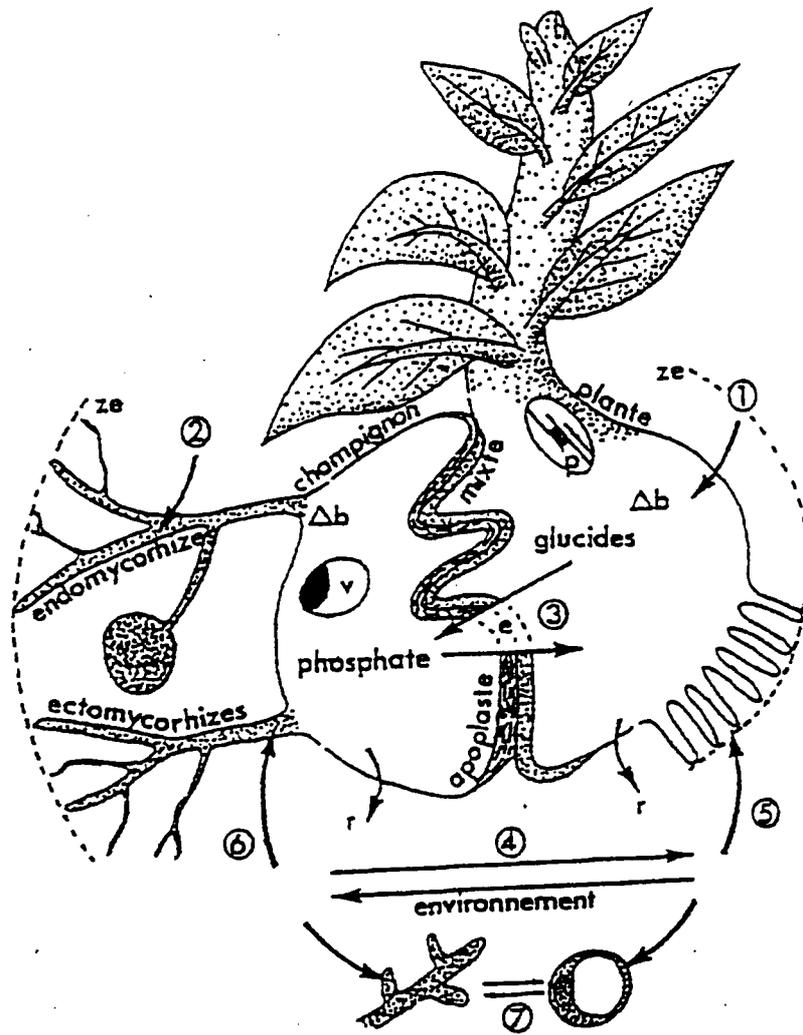
(9) dont *Tuber*, *Geopora*

(10) dont *Pezizella*

(11) dont bolet, lactaire, pisolithe, paxille

(12) dont *Rhizoctonia*





## 2.2. Les types de mycorhizes

Peyronnel et al. (1969) définissent sur des critères morphologiques, trois grands groupes de mycorhizes.

Les **ectomycorhizes** intéressent la majorité des plantes ligneuses forestières des climats tempérés. Les champignons sont des Ascomycètes, des Basidiomycètes et des Zygomycètes. Du point de vue anatomique, le champignon développe dans le sol des hyphes mycéliens qui entourent complètement les racines latérales pour former un manteau fongique (Figure 5). Après la formation du manteau, se différencient des hyphes intercellulaires (réseau de Hartig). Les racines colonisées sont courtes et ramifiées mais les cellules racinaires gardent leur organisation classique. Le parenchyme cortical est souvent non infecté et le cylindre central, jamais colonisé.

Les **endomycorhizes** sont les plus répandues et touchent les plantes des grandes cultures, les plantes horticoles, agricoles et aussi sylvicoles (80 à 90 % des plantes terrestres). Les hyphes externes ne forment pas de manteau mais pénètrent entre et dans les cellules du cortex racinaire, sans jamais atteindre cependant le cylindre central (Figure 5). Ce type de mycorhizes se subdivise en trois groupes:

- les mycorhizes éricoïdes à pelotons constituent une union entre les Ascomycètes et les racines des Ericacées,
- les mycorhizes orchidoïdes à pelotons unissent les Basidiomycètes et les racines des Orchidées,
- les mycorhizes à vésicules et arbuscules formées par les Zygomycètes, ne sont pas spécifiques à un groupe végétal même si on parle de spécificité écologique. Selon Pirozynski et Dalpé (1989), l'origine de cette symbiose remonte à plus de 450 millions d'années. Des structures comparables à celles des mycorhizes à vésicules et arbuscules ont été retrouvées dans des plantes fossiles de *Rhynia* et d'*Asteroxylon*.

Le développement du champignon peut se subdiviser en deux grandes phases:

- une phase extramatricielle composée de filaments mycéliens de diamètre variable portant des unités reproductrices ou spores (chlamydospores ou azygospores) et des cellules axillaires,
- une phase intraracinaire composée d'hyphes intercellulaires, de vésicules (organes reproducteurs et de réserve) et d'arbuscules, sites d'échanges entre les partenaires.

Les **ectendomycorhizes** montrent les caractères des ectomycorhizes (réseau de Hartig et manteau fongique) et des endomycorhizes (pénétration des hyphes dans les cellules racinaires corticales). Elles sont inféodées à quelques espèces des familles des Monotropacées et Arbutacées.

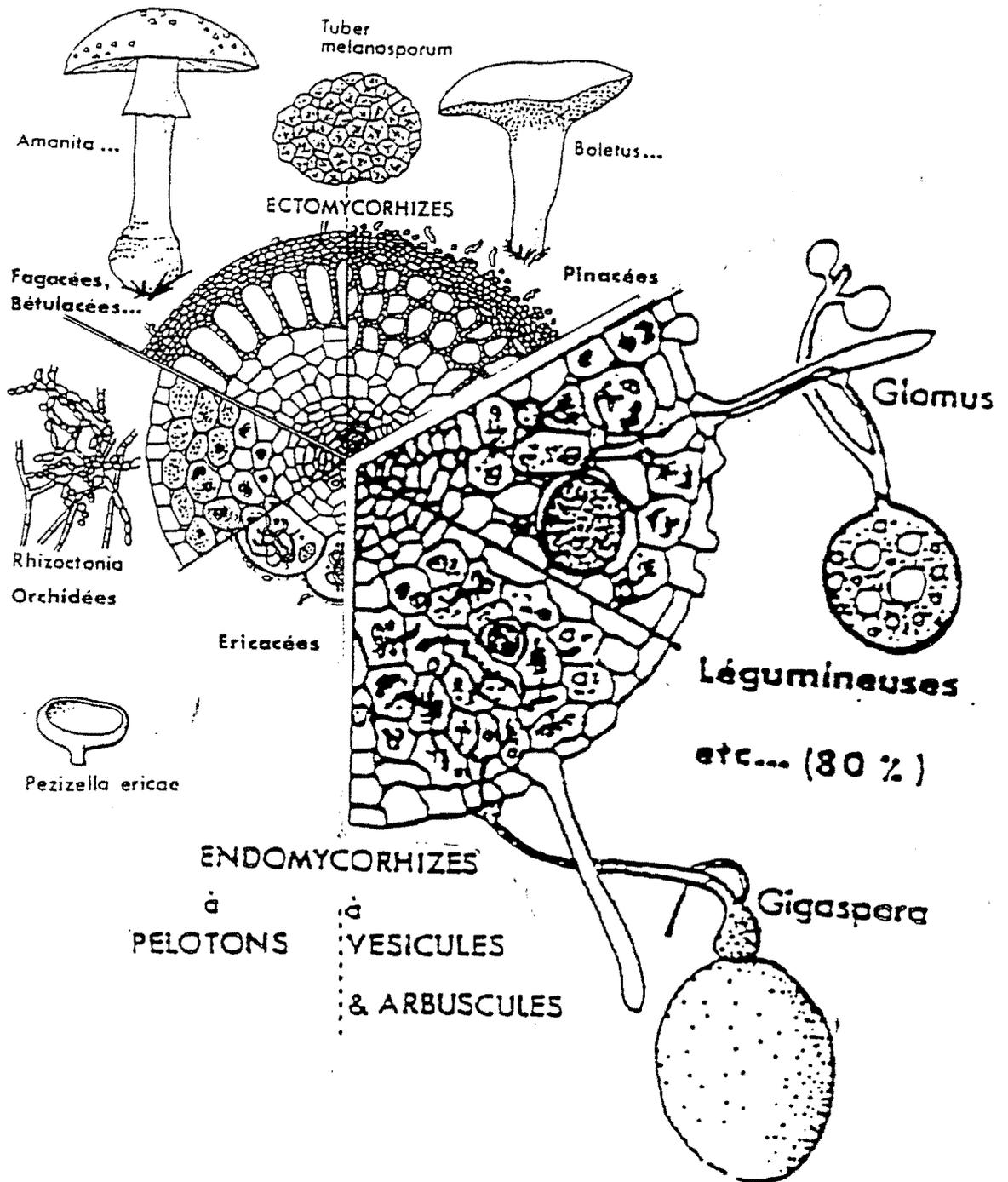


Figure 5 : Représentation des principaux groupes de mycorhizes

(Strullu, 1989)

### 3. LES MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES

#### 3.1. Taxonomie des champignons MVA

L'impossibilité de réaliser des cultures pures de champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules constitue une difficulté pour la classification de ces symbiotes obligatoires. Cependant, depuis la classification historique de Thaxter (1922), beaucoup de progrès ont été accomplis aboutissant à la définition de plusieurs espèces d'Endogonacées. Les critères utilisés actuellement dans la taxonomie sont essentiellement morphologiques (couleur des spores ou sporocarpes, taille, nombre de membranes des spores, rattachement de l'hyphes, etc.). Aujourd'hui, environ plus de 150 espèces de champignons MVA ont été décrites comme appartenant à l'ordre des Glomales. D'après Morton et Benny (1990), l'ordre des Glomales serait subdivisé en deux sous-ordres; celui des *Glominae* (avec les familles des *Glomaceae* et des *Acaulosporaceae*) et celui des *Gigasporinae* (avec la famille des *Gigasporaceae*).

L'utilisation récente d'outils de la biologie moléculaire (PCR, RFLP, RAPD...) dans la taxonomie des champignons MVA, est prometteuse pour une redéfinition des relations phylogénétiques entre les souches (Simon et al., 1992; Zézé et al., 1994).

#### 3.2. Méthodes de culture

Dans l'état actuel des connaissances, les champignons MVA ne peuvent être produits massivement en fermenteurs. Les propagules des champignons MVA (spores ou vésicules isolées, fragments mycorhiziens) sélectionnées au champ sont multipliées en présence d'un partenaire végétal et d'un milieu approprié dans des conditions de serre ou *in vitro*.

##### 3.2.1. Cultures en serre

Les méthodes de production d'inoculum MVA présentent plusieurs variantes allant des systèmes simples à plus ou moins complexes. Toutes ces méthodes requièrent un suivi continu pour maintenir le complexe mycorhizien dans des conditions minimales de reproduction (arrosages au besoin, éclairage et température adéquats). Les plantes mycotrophes couramment utilisées sont le poireau, le maïs et l'haricot. Ces types de culture en systèmes ouverts peuvent être classés en deux groupes.

### **Cultures en pots**

Dans ce type de culture, le plus répandu, le champignon MVA est maintenu et multiplié de façon routinière sur substrat souvent tamisé et préalablement désinfecté. Dans un but de standardisation de la production d'inoculum, minimisant les variations dues au facteur sol, des substrats plus ou moins inertes comme l'argile calcinée (le Turface ou le Terragreen) ou l'argile expansée sous l'action de la lumière (LECA) sont recommandés (Dehne et Backaus, 1986; Plenchette et Perrin, 1992).

### **Cultures sur solutions circulantes**

Dans ce type de culture, les racines de plantes mycorhizées, baignent dans une mince couche de solution nutritive périodiquement renouvelée (Ojala et Jarell, 1980; Mosse et Hepper, 1984; Elmes et Mosse, 1984). La culture aéroponique consiste en une vaporisation constante et mécanique de la solution nutritive qui fournit aux racines une humidité et une aération appropriée. La culture hydroponique comprend deux variantes avec le même principe de renouvellement de la solution nutritive: la culture hydroponique classique et la culture sur film nutritif sur des plateaux inclinés.

### **3.2.2. Cultures axéniques**

L'impossibilité de cultiver le champignon MVA sans la plante et le souci d'avoir des complexes mycorhiziens exempts de contaminants, montrent l'intérêt de ces types de cultures. En outre, les cultures aseptiques sont indispensables pour la compréhension de la biologie et de la physiologie des champignons MVA biotrophes obligatoires. Ces systèmes nécessitent une maîtrise complète de besoins nutritifs des partenaires symbiotiques. White (1943), développe un milieu composé de macro et microéléments, de vitamines et de saccharose, permettant la croissance des racines de tomate sans la partie aérienne. Ce milieu a ensuite été modifié par plusieurs chercheurs pour cultiver des racines isolées de différentes espèces végétales.

L'aptitude de croissance continue des racines isolées a été utilisée pour la première fois par Mosse et Hepper (1975), pour la synthèse de mycorhizes axéniques. Il s'est vite avéré que la coculture des partenaires symbiotiques dépendait de plusieurs facteurs abiotiques. L'établissement de la symbiose dans un milieu synthétique, est conditionné par la présence de faibles quantités de

phosphore, de certains acides aminés et de l'absence de certains composés inhibiteurs comme le sulfate de sodium et certains oligoéléments (Hepper et Smith, 1976; Hepper, 1979; Hepper et Jacobsen, 1983). Miller-Wideman et Watrub, (1984), ont relaté pour la première fois l'obtention de quelques spores néoformées en conditions *in vitro* en présence de racines excisées de tomate.

Depuis, différentes techniques plus reproductibles ont été proposées à partir de propagules désinfectées. Les spores MVA sont les plus utilisées. Les racines isolées et génétiquement transformées par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* (Mugnier et Mosse, 1987; Bécard et Fortin, 1988) offrent des possibilités intéressantes d'obtention de MVA. Ces racines transformées présentent des caractéristiques tumorales et ont une croissance homogène et plus rapide que les racines normales. Les racines transformées de carotte ont permis de suivre le développement à long terme du *Gigaspora margarita* et de *Glomus intraradices* (Diop et Piché, 1990; Chabot et al., 1992a).

Strullu et Romand (1986, 1987) ont, les premiers, exploité l'immense potentiel de la forme intraracinaire des *Glomus* pour synthétiser des mycorhizes typiques. La capacité de la forme intraracinaire du champignon semble être un outil prometteur d'établissement de cultures axéniques continues de *Glomus spp* en présence de racines transformées ou non (Strullu et al., 1995).

### 3.3. Facteurs contrôlant la mycorhization

Les facteurs qui régulent la symbiose MVA ont été décrits dans une récente analyse bibliographique (Koïde et Schreiner, 1992). La technologie de la culture *in vitro* a permis de connaître les mécanismes d'installation de la symbiose mycorhizienne. Deux étapes-clés dans le développement de l'organisme biotrophe (germination, première infection) sont régulées par des facteurs nutritionnels (Hepper, 1983), physico-chimiques (Carr et al., 1985; Bécard et Piché, 1989; Bécard et al., 1992, Chabot et al., 1992b) et génétiques (Burgraaf et Beringer, 1989; Bianciotto et Bonfante, 1993; Bécard et Pfeffer, 1993, Simoneau et al., 1994).

Les exsudation racinaires, les composés volatiles phénoliques et carboniques semblent déterminants pour le développement du champignon. D'autres facteurs, tels que les fluctuations saisonnières, la plante hôte, l'efficiencce du champignon conditionnent les complexes mycorhiziens.

### 3.4. Rôle dans le développement et dans l'alimentation hydrominérale des plantes

L'augmentation de biomasse produite des plantes mycorhizées, due à une croissance rapide, est visible à l'oeil nu. L'apport principal des champignons MVA dans la croissance des plantes est attribué à une meilleure alimentation hydrominérale, à une grande résistance aux pathogènes, à une meilleure adaptation aux chocs de transplantations (Strullu et al., 1991; Sieverding, 1991). La protection des plantes mycorhizées contre les pathogènes du sol est notamment due à une stimulation de la synthèse des phytoalexines et à une modification de la balance hormonale. (Allen et al., 1980, 1982; Morandi, 1989). Les plantes colonisées par les champignons MVA ont une bonne régulation de leur alimentation en eau, car elles maintiennent une continuité hydrique au niveau de l'interface sol-racine, ce qui leur confère une résistance au stress hydrique (Hardie et Leyton, 1981; Gianinazzi-Pearson et Diem, 1982).

L'utilisation des radioisotopes, la résonance magnétique nucléaire, la microanalyse et les techniques de la biologie moléculaire ont contribué à la connaissance de la nutrition des plantes mycorhizées. Le phosphore, le potassium, l'azote et les oligoéléments (cuivre, zinc, soufre) sont bien assimilés par les complexes mycorhiziens VA (Cooper et Tinker, 1978; Strullu et al., 1981; Francis et al., 1986, Declerck et al., 1994). Des interactions positives avec le *Rhizobium* ont été mentionnées dans l'amélioration de fixation de l'azote et la nodulation des plantes légumineuses (Barea et al., 1992).

L'amélioration de la nutrition phosphatée de la plante hôte retient le plus d'attention. Le phosphore joue un rôle important dans les réactions de transfert d'énergie, dans la physiologie de la floraison, de la fructification et du développement racinaire. L'absorption du phosphore, élément de faible mobilité, est facilitée par les champignons MVA, par une intense exploration du sol par les hyphes mycéliens.

### 3.5. Nécessité de gérer les mycorhizes à vésicules et arbuscules en zones sahéliennes

Différentes raisons attestent de la nécessité d'une bonne gestion du potentiel mycorhizien dans les régions sahéliennes. Malgré la grande répartition des champignons MVA dans les régions sahéliennes, leur distribution n'est pas homogène, et le nombre et la viabilité des propagules sont relativement faibles (Sieverding, 1991; Diop et al., 1994 b, c). La dégradation du couvert végétal pour des usages domestiques, affecte négativement l'importance des champignons MVA qui sont tributaires des assimilats photosynthétiques de leurs hôtes. De plus, l'introduction intensive de certains produits chimiques (pesticides, engrais) dans l'agriculture pour nourrir une population à forte croissance démographique, se fait le plus souvent en l'absence d'étude d'impact sur les microorganismes associés, particulièrement les champignons MVA (Sieverding, 1991). Curieusement, l'optimum de développement des MVA, se manifeste dans les sols déficients en phosphore, azote, potassium, conditions caractéristiques des régions sahéliennes.

**CHAPITRE I**  
**ECOLOGIE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS**  
**A VESICULES ET ARBUSCULES**  
***D'ACACIA ALBIDA***

# I. LES CHAMPIGNONS MYCORRHIZIENS A VESICULES ET ARBUSCULES D'*ACACIA ALBIDA* DANS DIFFERENTES REGIONS DU SENEGAL

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 1994, p. 3433-3436  
0099-2240/94/\$04.00+0  
Copyright © 1994, American Society for Microbiology

Vol. 60, No. 9

## Indigenous Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with *Acacia albida* Del. in Different Areas of Senegal

TAHIR A. DIOP,<sup>1\*</sup> MAMADOU GUEYE,<sup>2</sup> BERNARD L. DREYFUS,<sup>3</sup>  
CHRISTIAN PLENCHETTE,<sup>1</sup> AND DESIRE G. STRULLU<sup>4</sup>

*Station d'Agronomie, Institut National de la Recherche Agronomique, 21034 Dijon Cedex,<sup>1</sup> and Université d'Angers, 49045 Angers Cedex,<sup>4</sup> France, and ISRA/MIRCEN, Centre ISRA/Institut Française de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM),<sup>2</sup> and Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM,<sup>3</sup> Dakar, Sénégal*

Received 7 January 1994/Accepted 9 July 1994

Une partie de ce travail a été présentée dans la revue scientifique *La Recherche* (Diop, Planchette, Strullu, Gueye et Dreyfus, 1994b). Il a aussi fait l'objet d'une présentation orale à l'atelier sur les symbioses Acacias et le résumé de la présentation est publié dans la revue *Bois et Forêt des Tropiques* (Diop, Planchette et Strullu, 1993).

## 1. RESUME

Les influences des saisons, de l'âge de la plante et des propriétés physicochimiques du sol sur les champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules de surface et de profondeur d'*Acacia albida* ont été étudiées. Les localités de la zone Soudano-Guinéenne (Djinaki et Kabrousse) avaient plus de propagules mycorhiziennes que celles de la zone Sahélienne (Louga et Diokoul) et les espèces des genres *Glomus*, *Gigaspora* <sup>*Acaulospora*</sup> et *Sclerocystis* étaient prépondérantes. Les nombres des spores collectées et viables ont plus augmenté pendant la saison des pluies que pendant la saison sèche (environ 108% de plus pour le nombre total de spores et 262% de plus de spores viables). En outre, ces propagules étaient plus nombreuses dans la rhizosphère des jeunes acacias que celle des acacias âgés. Cependant, dans chaque zone écoclimatique, les pourcentages de colonisation racinaires étaient similaires.

## 2. ABSTRACT

The influence of seasons, plant age, and the physicochemical properties of the soil on surface and deep biological arbuscular mycorrhizal fungus parameters associated with *Acacia albida* were assessed in different areas of Senegal. More indigenous arbuscular mycorrhizal propagules were found in the localities of the Sudano-Guinean zone (Djinaki and Kabrousse) than in those of the sahelian zone (Louga and Diokoul), and species belonging to the genera *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora* and *Sclerocystis* prevailed. The numbers of total and viable spores increased more during the rainy season than during the dry season (about 108% more total spores and 262% more viable spores). Similarly, both total and viable spores were more prevalent around young *Acacia* trees than old trees. However, the intensity of root colonization did not differ in each ecoclimatic zone.

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are the most widespread symbiotic microorganisms associated with higher plants. Their ubiquitous distribution is related to their capacity for active and passive dispersal by many vectors (Hetrick, 1984). In natural ecosystems, the importance of AM fungi is related to soil disturbance (Jasper et al., 1991), to agricultural practices (Black and Tinker, 1979), to chemical properties of the soils, to the activities of other microorganisms (Azcon-Aguilar and Barea, 1985), and to the seasons (Hayman, 1970; Read et al., 1976). *Acacia albida* Del. is a leguminous tree with inverted phenology (leaves are born in dry season and abscise in the wet season) that is well adapted in the arid zones of tropical Africa. The effects of trees of this species of tree in the context of traditional agriculture and pasture give them a privileged status. In Senegal, *A. albida* is found mainly in two distinct areas: the Sahelian zone (north and central) and the Sudano-Guinean zone (southwest). In these semi-arid zones, most indigenous and exotic *Acacia* species are associated with rhizobia and with ectomycorrhizal and AM fungi (Diem et al., 1981; Gianinazzi-Pearson and Diem, 1982). But only AM fungi and slow-growing strains of rhizobia simultaneously colonize *A. albida* roots (Gianinazzi-Pearson and Diem, 1982; Dupuy and Dreyfus, 1992).

The objective of this study was to quantitatively assess AM fungi associated with roots of *A. albida* as influenced by tree age, seasons, and physico-chemical properties of the soils in Senegal. The experiments were conducted in the traditional sites of *A. albida* in Senegal. Physical and chemical analyses of soils with regard to the following parameters were completed: soil texture, by use of soil particle size (Ball, 1986); pH, by use of a water-to-fresh soil ratio of 2:1; available phosphorus, by the method of Olsen et al. (Olsen et al., 1954); nitrogen, by the macro-Kjeldahl method (Bremner and Mulvaney, 1982); and organic matter, by the Walkey-Black method (Walkey and Black, 1934). Exchangeable bases were extracted with ammonium acetate and determined by atomic absorption spectrophotometry (Ca and Mg) and by flame photometry (K). Table 1 and 2 list the general characteristics of surface and deep sampling soils.

### 3. SAMPLING PROCEDURES

Two stages of development of *A. albida* (young and adult) were assessed in all localities before and during the rainy season. The distinction between young and adult tree (over 20 years) is also often marked by the convex canopy of the latter. Young *A. albida* trees develop more thin lateral roots near the topsoils. Within each climatic zone, surface assesment of indigenous AM fungi was done on the 15 cm of topsoil profiles. Holes (width, 40 cm) were dug in the rhizosphere of each tree at 2 m away from the stem to sample soil and fresh roots. Otherwise, vertical distribution of indigenous AM fungi was assessed only in the Sudano-Guinean zone. In this region, *A. albida* roots are more superficial. Water penetrated to 4.5 m in Djinaki and to 1.5 m in Kabrousse during the dry season and to 1.5 and 1 m, respectively, during the rainy season (Table 2). We used a hand auger to investigate the root system of an adult tree in two localities of the Sudano-Guinean zone, i.e., Kabrousse and Djinaki. One drilling was made in each locality. Regular core samples were drawn until underground water was reached (Table 2). Holes were made 10 m from the adult tree.

### 4. ASSESSMENT OF AM PROPAGULES

For each soil sample, three biological parameters were evaluated before and during the growing seasons: number of spores, viability of spores, and percentage of root colonization. The number of spores in 100 g of wet-sieved soil (50 µm) was counted (Gerdmann and Nicolson, 1963) and examined using a stereomicroscope (magnification, x40). The viability of these spores was assessed by the vital stain MTT [3 - (4,5 - Dimethylthiazol - 2 - yl) - 2,5 diphenyltetrazolium bromide], by using the procedure of An and Hendrix, (1988). Roots of young and adult trees, freed from adhering soil, were cleared in 10% KOH at 90°C for 60 min and stained with trypan blue (Phillips and Hayman, 1970). For each sample, 50 stained root segments (1.5 to 2 cm) were mounted on slides and observed at a magnification of x100 for root colonization (Furlan and Fortin, 1973).

## 5. DATA ANALYSIS

To quantify surface indigenous AM fungi, 15 soil samples (one from each of 15 young and old trees) were assessed in each locality for recovery of total spores. Five of the samples of trees of each age were randomly selected for determining viability of the spores, and the roots from five samples were randomly selected for evaluating the percentage of root colonization. Statistical analysis was performed by using SAS (Statistical Analysis System; SAS Institute, Inc., Cary, N.C.). The percentage data were normalized by use of the square root of arcsine transformed values before analysis. In deepest soils, the numbers of total and viable spores in soil samples were expressed as the mean of four replicate 100-g soil samples. Because of the scarcity of acacia roots in deep soil layers, the presence or absence of AM fungi in roots was recorded without regard to the stage of symbiosis development. Correlations between total numbers of spores and organic matter content were calculated.

**Table 1 : General characteristics of the sample site soil and climate**

Location	Type of Climate	Mean annual rainfall (mm)	Soil description	Available P (ppm)	N (%)	Mg	K	Organic matter (%C)	Ca	pH
Louga	Sahelian	200-300	sandy	40.05	0.25	0.25	0.08	2.62	0.79	5.51
Diokoul	Sahelian	400-600	sandy	16.20	0.25	0.21	0.05	2.70	0.86	5.88
Djinaki	Sudano-guinean	800-1200	clay sandy	8.55	0.25	0.07	0.02	2.81	0.20	5.21
Kabrousse	Sudano-guinean	1000-1500	sandy	8.28	0.19	0.09	0.02	1.76	0.32	6.10

Table 2 : Deep sampling soil composition in the sudano-guinean zone

Soil composition at								
DJINAKI					KABROUSSE			
Depth (cm)	% clay	Available P (ppm)	pH	Organic matter (% C)	% clay	Available P (ppm)	pH	Organic matter (% C)
0 - 15	24.0	8.55	5.21	2.81	2.5	8.28	6.10	1.76
40 - 55	26.0	4.60	6.40	2.54	7.0	5.52	7.91	1.17
90 - 105	22.8	2.76	6.91	1.64	4.5	36.34	8.12	1.17
140 - 155	16.8	3.22	7.00	1.63	13	42.78	7.41	8.17
190 - 205	22.3	5.52	7.25	1.56				
240 - 255	21.3	4.60	7.11	1.41				
290 - 305	19.3	2.76	7.26	1.25				
340 - 355	22.3	9.20	7.32	1.09				
390 - 405	21.8	8.86	7.26	0.86				
440 - 455	20.0	27.60	7.02	0.74				

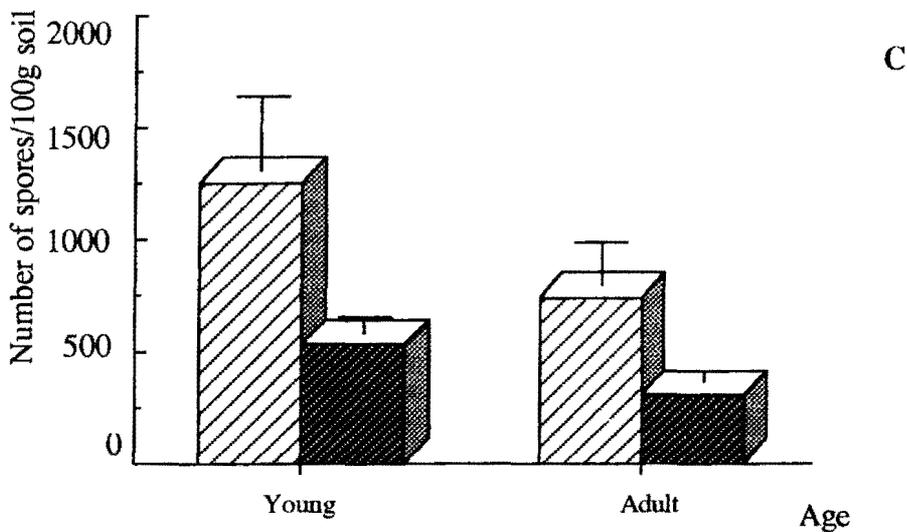
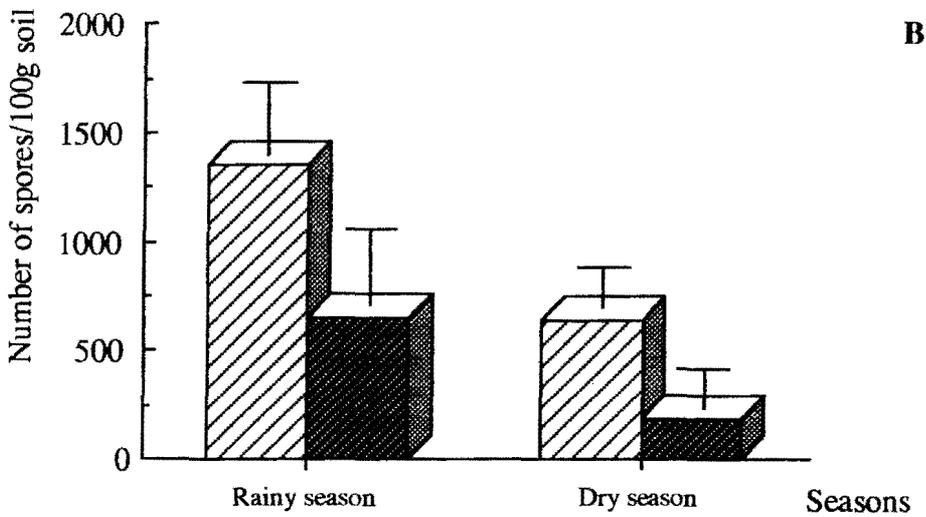
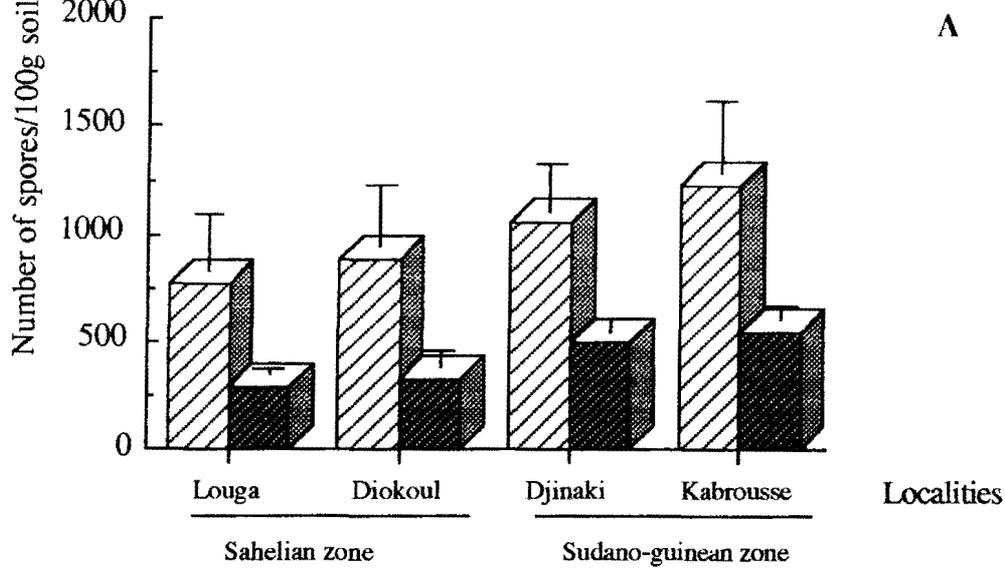
## 6. NUMBER OF SPORES RECOVERED

Indigenous AM spores were generally dark, white, brown, or reddish brown and belonged to genera *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora* and *Sclerocystis*. The genera *Glomus* and *Gigaspora* were more prevalent. On soil surface profiles, there were more spores associated with *A. albida* in the Sudano-Guinean zone than in the Sahelian zone. The number of spores per 100 g of soil ranged from 1,240 at Kabrousse to 775 at Louga (Fig. 1A). Diokoul and Louga had two- and fourfold more available phosphorus, respectively, than Djinaki and Kabrousse (Table 1). This higher level of phosphorus could explain the lower level of AM spores in the former zone. It has been amply demonstrated that high levels of available nutrients, especially phosphorus, have a negative effect on the propagation of AM fungi (Menge et al., 1981). About 108% more spores were found during the rainy season than during the dry season (Fig. 1B). Sporulation around young acacia trees was also greater than around the older ones (Fig. 1C). However, our findings did not support a clear relationship between sporulation of AM fungi and the physiological age of the trees.

In deep soil layers, AM spores were recovered from each sample core. The morphological diversity of spores was also obvious in deep soil layers where *Glomus spp.* and *Gigaspora spp.* again prevailed. Because of the difference in soil depths above the water table in the two localities and the upwelling of water during the rainy season, it was possible to compare the vertical distribution of AM fungi only to the depth of 105 cm (Table 3). Spore numbers rapidly decreased with soil depth. In both localities, the numbers of spores collected ranged from more than 700 spores at the surface to less than 15 spores with depth. Spore numbers were low at the greater soil depths (> 55 cm). A decrease in numbers of AM propagules with increasing soil depth has been documented by other investigators (Sutton and Baron, 1972). Our results confirmed this trend. We hypothesize that because of their obligate biotrophic status AM fungi follow the acacia taproots. The high organic matter in deepest soil of Kabrousse (140 to 155 cm) was probably due to accumulation of root biomass in the short soil profile of our study. In soil layers of Kabrousse (0 to 105 cm), the low production of AM spores might be related to the lower organic matter content. However, in Djinaki, the regular decrease of organic matter with depth (Table 2) was well correlated ( $r > 0.70$ ) with the number of recovered spores during both seasons.

## 7. VIABILITY OF SPORES RECOVERED

Detecting viability of AM spores is difficult because the methods used do not always identify all viable spores. Dormancy and physiology of spores remain serious problems for experimental work. The use of MTT as a rapid vital stain in our studies gave useful information. Mature viable spores had dense contents, with oil globules, and thin walls. The numbers of viable spores were higher in the Sudano-Guinean localities, i.e., Kabrousse and Djinaki (over 500) than in the Sahelian ones (Fig. 1A). However, the percentages of viable spores were quite equal between the localities of the Sahelian and the Sudano-Guinean regions : 45% at Kabrousse, 46% at Djinaki, 37% at Diokoul and Louga (Fig. 1A). The equal percentages of viability in Diokoul and Louga shows that spore viability is independent of total spore count. There were more viable spores in the wet season (over 262%) than in the dry season (Fig. 1B). More viable spores were also counted around young acacia trees (about 75%) than around old ones (Fig. 1C). In deep soil layers, viability was relatively high (Table 3). In the dry season, 32 and 34 % of spores were viable in the surface soils at Djinaki and Kabrousse, respectively, and to 67 and 37 % were viable at the groundwater depths of these soils. Similarly, the percentages of viable spores in these localities also fluctuated, from 43 % and 42 % to 54 and 40 %, respectively, during the rainy season (Table 3). The high levels of viable spores in deep layers could be due to their lower exposure to unfavorable environmental conditions.



**Figure 1 :** Numbers of total spores (▨) and viable spores (■) recovered around *A. albida* in different localities (A), in different seasons (B), and at different ages of trees (C).

Vertical bars indicate standard deviations. Counts of total spores are means of 60 samples for localities, 120 samples for seasons, and 120 samples for age of trees. Counts of viable spores are means of 20 samples for localities, 40 samples for seasons, and 40 samples for age of trees.

**Table 3 : Density of AM propagules associated with *Acacia* roots at various depths in the sudano-guinean zone of Senegal**

(Djinaki and Kabrousse, 1992)<sup>a</sup>

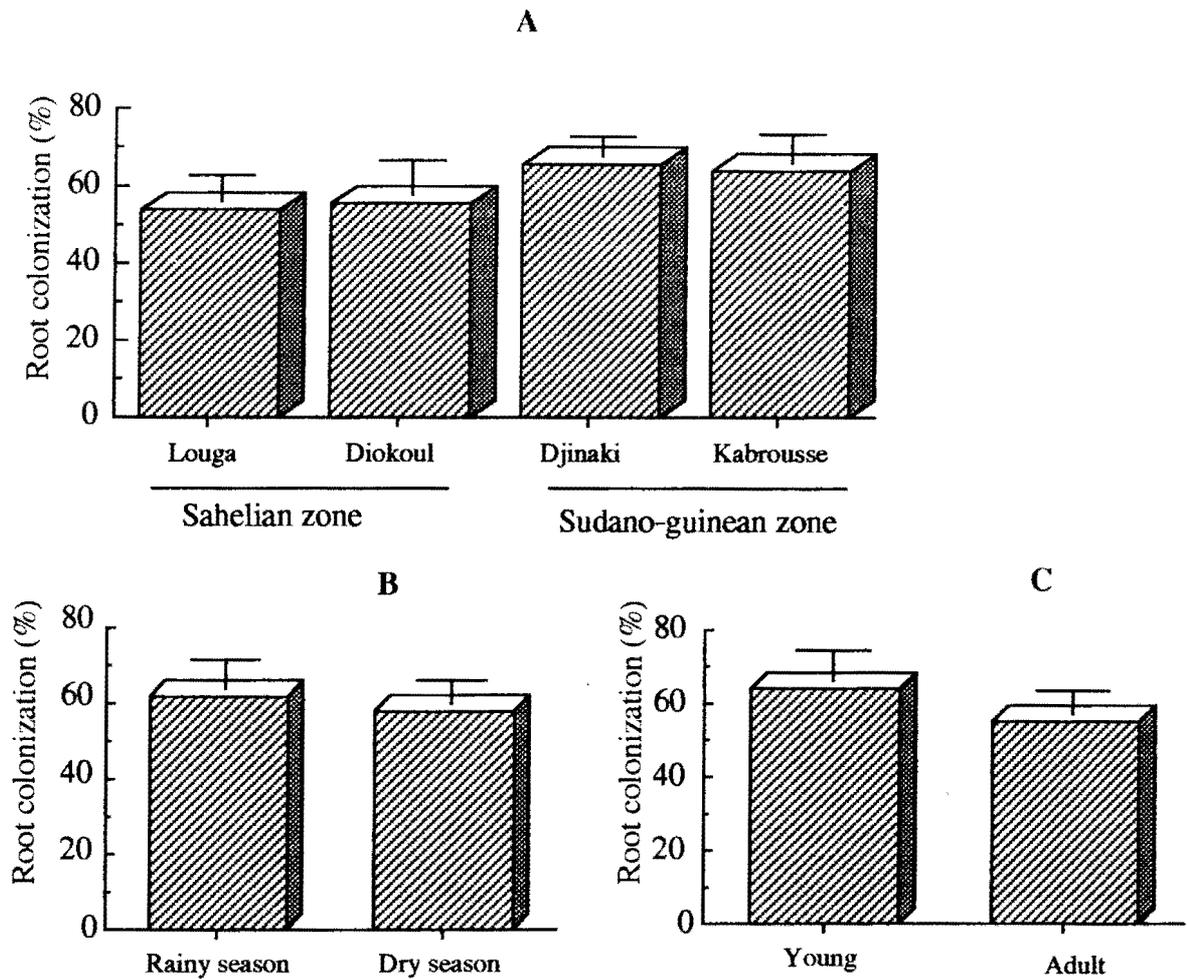
Depth (cm)	No of spores/100g soil at:				No of viable spores/100g soil at:				Presence of AM fungi in <i>A. albida</i> roots at			
	Djinaki		Kabrousse		Djinaki		Kabrousse		Djinaki		Kabrousse	
	DS	RS	DS	RS	DS	RS	DS	RS	DS	RS	DS	RS
0 - 15	734±85	1034±38	717±18	973±58	231±36 (32)	446±36 (43)	245±31 (34)	408±12 (42)	+	+	+	+
40 - 55	103±23	89 ±12	26 ±5	32 ±8	60 ±10 (58)	53 ±8 (59)	18 ±4 (69)	15 ±2 (47)	+	+	+	+
90 - 105	67 ±10	22 ±4	16 ±4	5 ±2	58 ±8 (86)	15 ±6 (68)	6 ±1 (37)	2 ±1 (40)	-	+	-	+
40 - 155	25 ±7	13 ±3	8 ±3		17 ±4 (68)	7 ±2 (54)	3 ±1 (37)		-	+	+	
90 - 205	16 ±7				10 ±3 (62)				-			
40 - 255	24 ±4				19 ±2 (79)				+			
90 - 305	21 ±5				17 ±4 (81)				-			
40 - 355	18 ±4				13 ±4 (72)				+			
90 - 405	11 ±3				8 ±3 (73)				+			
40 - 455	6 ±2				4 ±2 (67)				+			

Numbers are means ± standard deviations of four measurements; numbers in parenthesis are percentages of viable spores. +, presence, -, absence, DS, dry season; RS, rainy season.

## 8. COLONIZATION OF *A. ALBIDA* ROOTS

Histological examination of acacia roots indicated that colonization by the fungi was similar in each climatic zone. More than 50% of *Acacia* roots were colonized in each locality. The percentage of root colonization did not differ within each climatic zone (Fig. 2A). The observations suggest that chemical site properties do not influence invasion of the root cortex by indigenous AM fungi. The rainy season was slightly more favorable for the presence of fungi in acacia roots than the dry season (Fig. 2B). Young trees had 16% more mycorrhizal roots than older trees (Fig. 2C). The high density of more thin lateral roots on young acacia trees in the upper soil profiles could explain the more frequent occurrence of indigenous AM fungi in these roots. Otherwise, colonized roots were often encountered in deep sampling cores (Table 3). The presence of AM fungi in roots was characterized by typical internal structures such as vesicles or arbuscules, which appeared regularly in roots within the surface soil and the soils near the groundwater. The lack of infection of roots in some cores was attributed mainly to absence of thin acacia roots.

Our results show the mycorrhizal status of *A. albida* from the topsoil to the water table. The spatial distribution of endogonaceous spores in different soil types confirmed the non-occurrence of sites of prevalence for these symbiotic microorganisms in the tropics (Diem et al., 1981; Gianinazzi-Pearson and Diem, 1982). Since tropical soils are often deficient nutrients and hence favorable to degraded vegetation, AM fungi may improve these conditions. The occurrence of AM symbiosis in deep layers probably increases the number of transport paths of nutrients in the biochemical cycling process. For better use of indigenous AM fungi in the semi-arid zone of Senegal, large-scale production of the efficient strains and genetics studies are now being undertaken. The identification of these fungi with molecular markers will also allow the study of genetic variation of AM fungi within ecoclimatic zones and between surface and deep soil layers.



**Figure 2 :** Percentages of root colonization of *A. albida* in different localities (A) (mean of 20 samples), in different seasons (B) (mean of 40 samples), and at different age of trees (C) (mean of 40 samples).

Vertical bars indicate standard deviations.

## II. LES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A VESICULES ET ARBUSCULES DANS LES HORIZONS DES SOLS PROFONDS DES REGIONS SAHELIENNES DU SENEGAL

Ce travail a été réalisé sur les échantillons de sols fournis par N. Dupuy, allocataire de recherche à l'ORSTOM de Dakar. Il a étudié la biodiversité des Bradyrhizobiums d'*A. albida* par des prospections régulières effectuées depuis les horizons superficiels jusqu'aux niveaux des nappes phréatiques dans le cadre de sa thèse.

Dans les régions sahéliennes du Sénégal, de véritables parcs à *A. albida* existent au centre (Diokoul) et au nord (Louga). Grâce à des forages effectués à 10 m d'un pied adulte d'*A. albida* à Louga et à Diokoul, nous avons suivi le système racinaire de l'arbre. Des prélèvements de sols et de racines fraîches sont effectués. Le système racinaire pivotant de l'arbre descend jusqu'au niveau de la nappe phréatique située à 16.50 m à Diokoul et à 35 m à Louga.

Les échantillons de sols, bien protégés pour éviter des contaminations avec les horizons de surface, sont ramenés au laboratoire, où nous avons évalué le potentiel mycorhizien au niveau des nappes phréatiques. Aussi bien à Louga qu'à Diokoul, le nombre de spores par 100 g de sol est inférieur à 10 (5 à Diokoul et 7 à Louga). Ces spores sont toutes viables après 48 heures d'incubation à l'obscurité en présence d'un colorant vital, le MTT (An et Hendrix, 1988). Les coupes histologiques des racines colorées, montrent une présence de structures caractéristiques des champignons MVA. Comme au niveau des horizons des sols superficiels (Diop et al., 1994), les champignons des genres *Glomus* et *Gigaspora* sont dominants aux niveaux des nappes profondes dans les deux localités.

### III CONCLUSION

Cette étude montre que les racines de l'*A. albida* sont étroitement associées à différentes espèces de champignons MVA dans les zones Sahéliennes et Soudano-Guinéenne du Sénégal. Cette association se manifeste depuis les horizons superficiels des sols jusqu'au niveau de la nappe phréatique qui se trouve entre 1 et 4,5 m dans les régions soudano-guinéennes plus humides et entre 16 et 35 m dans les régions sahéliennes plus sèches.

Le potentiel mycorhizien (nombre et viabilité des spores, infection des racines) est présent dans les grands stades de développement de l'arbre (jeune et adulte) et indépendamment des saisons et des caractéristiques pédologiques des sols. Les champignons MVA suivent le système pivotant de l'arbre et sont donc capables de supporter à la fois des variations extrêmes de températures entre la surface et la profondeur des sols et des conditions à la limite de l'anaérobie. La diminution des propagules MVA en profondeur est donc liée en grande partie à la moindre quantité de matière organique.

**CHAPITRE II**  
**REPONSE DE L'*ACACIA ALBIDA* A L'INOCULATION**  
**MYCORHIZIENNE EN SERRE**

36

**GROWTH AND NUTRIENT MINERAL STATUS OF TWO PROVENANCES  
OF *ACACIA ALBIDA* SEEDLINGS AS INFLUENCED BY PHOSPHORUS  
APPLICATIONS, *BRADYRHIZOBIUM* AND *GLOMUS MOSSEAE* STRAINS  
IN STERILE AND NON-STERILE SOILS**

DIOP TA, GUEYE M, PLENCHETTE C, DREYFUS BL and STRULLU DG

Biology and Fertility of Soils, 1995, soumis

## 1. RESUME

Les effets de l'inoculation par des souches de *Bradyrhizobium* (MAO 226), de *Glomus mosseae* et du phosphore ont été évalués sur deux provenances d'*Acacia albida* cultivées sur sols stériles et non stériles. La provenance sud a montré une croissance plus rapide et plus homogène. Le *Bradyrhizobium* MAO 226 n'a pas montré d'effets significatifs sur les teneurs en P, K et Ca des acacias de la provenance nord. Les effets des traitements sur la nutrition minérale des parties aériennes ont été moins évidents à séparer pour les acacias de la provenance sud mais les acacias non inoculés avaient toujours les valeurs les plus faibles. Il n'y a pas eu d'interactions significatives entre les facteurs sols et provenances des acacias, probablement à cause de composés inhibiteurs des sols. Ces effets néfastes ont été supprimés, particulièrement sur la croissance et la teneur en Mg des parties aériennes, dans le cas d'une triple interaction des principaux facteurs.

## 2. ABSTRACT

The effects of *Bradyrhizobium* strain (MAO 226), *Glomus mosseae* and phosphorus nutrition on growth characteristics and mineral contents were assessed on two provenances of *Acacia albida* seedlings in sterile and non-sterile soils. Southern provenance of *A. albida* grew faster with more homogenous growth pattern. Single inoculation of the northern provenances of acacias with MAO 226 had no effects on P, K and Ca contents. For the southern acacia provenances, the effects of treatments on shoot mineral contents were less obvious to separate but uninoculated plants had always low values. There were no significant interactions between soil and acacias provenances on assessed variables, caused probably by inhibitory soil compounds. The deleterious effects were suppressed, especially on growth and shoot Mg content in triple interaction with main factors.

**Key words:** *Acacia albida* provenances, *Bradyrhizobium*, *Glomus mosseae*, phosphorus, sterile and non-sterile soils

## 3. INTRODUCTION

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and nitrogen-fixing bacteria live naturally in the rhizosphere or in roots of most leguminous trees. The coexistence of the two microsymbionts in legumes results in greater yields, better infection and nodulation, improvements of N fixation, P and N supply (Colonna et al., 1991; Gueye et al., 1992; Ikram et al., 1993; Ishac et al., 1994). The effects of AM fungi on nutrient uptake such as P may closely affect nodulation and N-fixation which are energy-expensive processes needing sufficient quantities of P (Barea et al., 1992). However, the magnitude of responses has also been found to vary with soil nutrients especially phosphorus, plants and the effectiveness of microsymbionts (Plenchette et al., 1982; Osunubi et al., 1992; Sun et al., 1992).

*Acacia albida* Del. [syn. *Faidherbia albida* (Del.) A.Chev.] has a good potential in reforestation programs and in agroforestry ecosystems. In Senegal, this tree with inverted phenology is mainly located in the sahelian and the soudano-guinean zone where the tap roots

respectively penetrated to 16 - 35 m and to 1,5 m - 4,5 m (Dupuy and Dreyfus, 1992; Diop et al., 1994b, c). This indicating a great variation on genotypes of this phreatophic leguminous tree even in a same ecoclimatic zone. It is argued that *A. albida* trees may be water-savers for the associated crops and improve their productivity in agroforestry practice (Osunubi et al., 1992; Diop et al., 1994b). The terms northern and southern provenances are often used to distinguish respectively *A. albida* trees from the sahelian and the soudano-guinean zone. The longer tap root system of both provenances until water table allow them to support water stress and to probably benefit more the deep occurrence of associated microsymbionts. Unlike southern provenance acacias, northern provenance are submitted to long dry summer, irregular rainfall and more anthropological factors. Large stem diameters and presence of more superficial roots of southern acacias on topsoil profiles are other distinctive criteria for provenances.

Up to now, no comparative trials have been achieved on the provenances of *A. albida* with regard to biological and mineral treatments. The purpose of this study was to assess the responses of two provenances of *A. albida* seedlings inoculated with a selected AM fungus and a *Bradyrhizobium* strain at different levels of phosphorus in sterile and non sterile soils. The use of non-sterile soils in greenhouse will allow a more realistic assessment of the best combinations of inocula for tropical forest nurseries.

#### 4. MATERIALS AND METHODS

For each provenance, seeds from one tree were collected, scarified in concentrated sulfuric acid for 20 min, rinsed in sterilized water and pregerminated in Petri dishes containing distilled water gelled with 0.8% Bacto agar. Two day old pregerminated seeds were transferred into plastic pots containing 1.2 kg of sieved sandy soils of Bambey sterilized or not. Selected properties of the non-sterilized soils from a depth of 0-20 cm were completed as mentioned by Diop et al. (1994b) as follows: a pH (H<sub>2</sub>O) of 7.60; 0.23% of total N; 2.66% of total C and 11.5 ppm of available P. Total native spores counts after decating and sieving were 3.7 g<sup>-1</sup> dry soil. The number of *Bradyrhizobia* estimated by the plant infection most probable number (Brockwell, 1980) was 113 g<sup>-1</sup> soil.

The factorial experiment consisted of a completely randomised blocks with 5 replicates per treatment and was carried out in a greenhouse under natural lighting. The first factor was "soils" (F1) divided into two levels : sterile and non sterile soils; the second factor was "provenances" (F2) divided into two levels north and south and the third controlled factor was "fertilizations" (F3) composed of 10 levels : (1) control, (2) 50 ppm P, (3) 100 ppm P, (4) *Bradyrhizobium* MAO 226, (5) MAO 226 + 50 ppm P, (6) MAO 226 + 100 ppm P, (7) *Glomus mosseae*, (8) *G. mosseae* + 50 ppm P, (9) *G. mosseae* + 100 ppm P, (10) *G. mosseae* + MAO 226.

The AM inoculum was surface sterilized for 20 min with chloramine T plus sulfate streptomycine and sulfate gentamycine before use. It consisted of a mixture of spores, mycelium and infected roots of *Vigna unguiculata* (L.) from 6 months old. Inoculum of *Glomus mosseae* was placed 5 cm below the surface at plantation. The *Bradyrhizobium* MAO 226 isolated from root nodules of *A. albida* seedlings was cultivated for 2 days by shaking in a liquid medium containing in g L<sup>-1</sup> : mannitol 10, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, L-glutamic acid 0.5, NaCl 0.05, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.1, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.04, FeCl<sub>3</sub> 0.004 and yeast extract 1. The pH of the medium was 6.8 before sterilization at 120° C during 20 min. A 2 ml suspension of MAO 226 containing 10<sup>9</sup> cells ml<sup>-1</sup> was applied at plantation. Phosphorus supplied as triple superphosphate at different levels (0, 50, 100 ppm), was well mixed with soil two days before planting. All plants were watered every 2 days with sterile distilled water to maintain soil moisture near field capacity.

After 4 months of growth, plant height was measured and shoots were separated from roots and dried at 65° C for 2 days. Shoot dry matter was then recorded for each plant. The shoot mineral content of each plant was also chemically analysed. N was determined by the micro Kjeldahl digestion method, P was determined colorimetrically after dry-ashing of samples in a muffle furnace (500° C). Ca and Mg were determined by atomic absorption spectrometry and K, by flame photometry. The AM root colonization was estimated by the grid-line intersect method (Giovanetti and Mosse, 1980) after clearing and staining with trypan blue (Phillips and Haymans, 1970). Analysis of variance procedures were performed on the measured parameters. The Newman-Keuls test (P < 0.05) was used to separate the means of treatments.

## 5. RESULTS

Histological examination of acacia roots indicated that colonization by *G.mosseae* was well established in single inoculation or in dual inoculation with *Bradyrhizobium* MAO 226 or with different levels of phosphorus. The percentage and intensity of root colonization were respectively up to 62.5 and 55%. We also observed a massive production of mycelia and spores of *G. mosseae* at the end of the experiment. Numerous nodules were also recorded in roots of *A. albida* inoculated with *Bradyrhizobium* sole or in a combined inoculation with P or AM fungus. The effective nodules were large with a pinkish tint. However, in non-sterile soils, poor nodulation due to a high proportion of small ineffective nodules and scarce mycorrhizal infection were observed in uninoculated acacias.

### 5.1 Plant biomass

Strongest effects of the main factors were generally observed on growth characteristics, except that provenances showed no influence on shoot dry mass (Table 1). In sterile soil, more fluctuations on plant biomass were recorded with treatments (Table 2). Single inoculation with MAO 226 stimulated only growth of acacias. All P doses improved growth and shoot dry weight respectively more than 2 and 3-fold increase. Dual inoculation with MAO 226 and *G. mosseae* increased growth and shoot dry yields by 3 and 4-fold.

In non-sterile soils, the effects of treatments on plant biomass were less pronounced. All of them induced less than a 2-fold increase over the uninoculated acacia seedlings. Growth parameters of inoculated plants were relatively higher and remained constant. Unlike in sterile soils, MAO 226 had strongest effects on both growth and shoot biomass.

Interaction between soil and treatments did not influence plant biomass (Table 1). However, a triple interaction between the main factors positively affected growth of acacias (Table 1). Southern acacias had an homogenous and vigorous growth pattern during the experiments.

## 5.2 Nutrient contents

Evident effects of the controlled factors were noted on shoot mineral mass composition of acacia seedlings (Table 1). Shoot Mg content was affected by all types of interactions, except those between soil and provenances. However, the shoot mineral content for other elements (N, P, K, Ca) was only influenced by interactions occurring between provenances and treatments (Table 3).

Greater variations were observed with the northern provenance of acacias. Uninoculated and inoculated plants with MAO 226 did not significantly differ for P, K and Ca uptake. All P doses or applied in combination with microsymbionts gave more than a 3-fold increase of nutrients over the uninoculated plants. Single inoculation with *Bradyrhizobium* enhanced more than a 2-fold N mineral content of northern provenances. Dual inoculation with both microsymbionts markedly improved all mineral concentrations. However, the strongest effect of this latter inoculation in the northern provenance, was observed on P uptake with more a 11-fold increase than the controls. For southern provenances, it was more difficult to separate the effect of each treatment. Only Ca was negatively affected by non-inoculation. All treatments produced less than a 2-fold increase of nutrient content of the southern acacias. As observed for the northern acacias, the lowest values were always noted for the uninoculated southern provenance seedlings.

**Table 1: Analysis of variance of growth parameters and shoot mineral content of *A. albida* seedlings provenances**

Independent variables	Dependent variables						
	Shoot dry weight	Height	N	P	K	Ca	Mg
F1: Soil	75.85**	97.83**	11.78**	3.05	7.74**	17.22**	58.61**
F2: Provenances	7.78	12.85**	63.31**	97.56**	67.66**	139.29**	85.06**
F3: Treatments	19.92**	39.08**	18.24**	22.05**	14.90**	14.75**	9.32**
F1 x F2	0.30	2.00	0.10	0.01	0.39	2.49	0.06
F1 x F3	6.40**	13.33**	0.80	0.84	1.57	1.91	5.35**
F2 x F3	0.53	3.25*	5.42**	9.12**	4.04**	8.91**	2.42**
F1 x F2 x F3	0.32	2.07*	0.42	1.71	0.81	0.86	4.26**
C.V %	20.30	11.70	21.10	27.90	25.90	24.20	26.50

Note: Numbers represent F values; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01

**Table 2 : Comparative effects of 10 treatments on shoot dry weight of *Acacia albida* seedlings in sterilized and non sterilized soils**

Values followed by the same letter are not significantly different at the 5 % level (Newman-Keuls test).

Treatments	Shoot dry weight (g/plant)	Height (cm)
Sterilized soil		
Control	0.75 e	18.00h
50 ppm P	2.59 d	46.00 f
100 ppm P	2.87 bcd	48.60 def
<i>Bradyrhizobium</i> (MAO 226)	1.25 e	31.90 g
MAO 226 + 50 ppm P	3.22 abcd	58.20 abc
MAO 226 + 100 ppm P	3.44 abcd	51.30 bcdef
<i>Glomus mosseae</i>	3.10 abcd	54.70 abcde
<i>G. mosseae</i> + 50 ppm P	3.54 abc	61.20 a
<i>G. mosseae</i> + 100 ppm P	3.21 abcd	57.10 abcd
<i>G.mosseae</i> + MAO 226	3.20 abc	50.00 cdef
Non-sterilized soil		
Control	2.69 cd	47.10 ef
50 ppm P	3.13 abc	55.60 ab
100 ppm P	3.40 abcd	53.00 bcdef
<i>Bradyrhizobium</i> (MAO 226)	3.46 abcd	54.70 abcde
MAO 226 + 50 ppm P	3.60 abc	57.50 abc
MAO 226 + 100 ppm P	3.73 ab	55.80 abcd
<i>Glomus mosseae</i>	3.53 abc	59.70 ab
<i>G. mosseae</i> + 50 ppm P	3.70 ab	61.20 a
<i>G. mosseae</i> + 100 ppm P	3.63 abc	58.70 abc
<i>G.mosseae</i> + MAO 226	4.05 a	58.40 abc

**Table 3 : Comparative effects of 10 treatments on shoot mineral mass of *Acacia albida* seedlings**

Values followed by the same letter are not significantly different at the 5 % level (Newman-Keuls test).

Treatments	N	P	K	Ca
	----- mg per plant			
Northern provenances				
Control	11.78 e	0.85 g	2.92 e	21.63 f
50 ppm P	46.47 c	5.45 cde	11.60 cd	77.61 e
100 ppm P	53.45 abc	5.57 cde	11.14 d	98.60 cde
<i>Bradyrhizobium</i> (MAO 226)	27.63 d	1.88 fg	5.18 e	34.74 f
MAO 226 + 50 ppm P	52.69 abc	3.43 ef	12.63 bcd	85.29 de
MAO 226 + 100 ppm P	59.48 abc	5.82 cde	13.43 abcd	92.56 cde
<i>Glomus mosseae</i>	56.04 abc	4.82 de	13.80 abcd	82.28 de
<i>G. mosseae</i> + 50 ppm P	66.89 ab	7.90 abc	15.92 abcd	103.43 cde
<i>G. mosseae</i> + 100 ppm P	62.40 abc	6.89 bcd	14.69 abcd	100.57 cde
<i>G. mosseae</i> + MAO 226	63.07 abc	9.75 a	17.57 ab	99.72 cde
Southern provenances				
Control	48.86 bc	5.31 cde	12.84 bcd	78.37 e
50 ppm P	58.79 abc	8.63 ab	14.73 abcd	113.12 bcd
100 ppm P	65.67 abc	7.87 abc	14.98 abcd	113.57 bcd
<i>Bradyrhizobium</i> (MAO 226)	62.78 abc	5.46 cde	15.08 abcd	139.22 ab
MAO 226 + 50 ppm P	64.73 ab	8.80 ab	17.04 abc	147.08 a
MAO 226 + 100 ppm P	65.13 ab	9.22 ab	15.53 abcd	151.30 a
<i>Glomus mosseae</i>	65.14 ab	6.82 bcd	17.08 abc	98.11 cde
<i>G. mosseae</i> + 50 ppm P	70.96 a	10.00 a	18.92 a	109.81 cde
<i>G. mosseae</i> + 100 ppm P	64.04 abc	9.53 a	16.03 abcd	102.96 cde
<i>G. mosseae</i> + MAO 226	68.74 a	6.02 cd	18.51 a	126.28 abc

## 6. DISCUSSION

The results clearly indicate the positive effects of microsymbionts and P fertilizer applied as triple superphosphate on provenances of *A. albida* seedlings. *Acacia* provenances nodulated or were well mycorrhizae in presence of *Bradyrhizobium* MAO 226 or *G. mosseae* irrespective of P applications. This suggests an absence of competition between introduced endophytes on responsiveness of *A. albida* even inoculated simultaneously. Similar results were already mentioned in *in vitro* conditions with *A. holosericea* (Bâ et al., 1994).

Several studies mentioned higher increase of growth and nutrient concentrations of AM mycorrhizal plants than in non mycorrhizal plants (Plenchette et al., 1982; Strullu et al., 1991a). These suggestions are supported by results found with *G. mosseae* whereby these effects were improved in dual culture with all P levels or *Bradyrhizobium* MAO 226. A general explanation of this enhancing yields of colonized plants, is the ability of AM mycelia to run outside the rooting zone and to translocate inorganic minerals with low mobility, to their hosts.

Growth parameters of acacia seedlings were more homogenous in non-sterile soils. Destruction of indigenous microsymbionts and other associated promoting growth microorganisms on sterile soils may explain this phenomenon (Colona et al., 1991; Duponnois and Garbaye, 1991). *Bradyrhizobium* MAO 226 had the least stimulating effects on growth. This could be due to the inability of MAO 226 to induce physiological stimuli for growth of acacias in sterile soils. Otherwise, in addition with both P and *G. mosseae*, MAO 226 gave marked effects on acacias. For this slow-growing bacterium, supplementation with P or AM fungus seemed to be a prerequisite for enhancing its ability to improve responses of acacias. Previous works related the needs of sufficient amounts of P, an integral part of the ATP molecule for nitrogen fixation (Barea et al., 1992). The effects of MAO 226 on plant biomass were more important in non-sterile soils confirming that this slow-growing bacterial strain need associated microorganisms or abiotic factors to express its potentialities.

As observed for plant biomass, no interactions between soils and provenances were noted on shoot mineral contents. Inhibiting soil factors or lower viability of indigenous AM fungi (Gueye et al., 1992; Diop et al., 1994b) could cause deleterious effects. Treatments suppressed inhibiting compounds, especially on growth and shoot Mg content.

The effect of different inocula on shoot mineral content of the southern acacias were less obvious to separate. A plausible explanation could be due by a dilution effect of nutrients within these well growing acacias. For northern acacias, strongest fluctuation was noted on P uptake after dual inoculation with both microorganisms. This higher P concentration in acacias could directly or indirectly promote a sustainable establishment of the tripartite symbiosis. It was advanced that high P in plants benefit the bacterial symbiont and the functioning of its nitrogenase, leading to successful nitrogen fixation which stimulates root and mycorrhizal development (Fitter and Garbaye, 1994).

It may be concluded from this study that growth parameters and mineral contents of both acacia provenances are improved by selected endophytes and P levels. However, this work did not show a clear discrimination in responsiveness of acacia provenances by inoculation whereby higher growth potential of southern acacias. The use of non sterile soils simulating field conditions gave useful informations on development of acacias. We think that inoculation of *A. albida* seedlings in sterile soil nurseries enhance the success of afforestation trials, probably by increasing the competitiveness of introduced endophytes observed in non sterile soils. However, in order to select performant inocula and *A. albida* genotypes, further studies are needed under adversal conditions prevailing in the usual habitat of this leguminous tree such as salinity, acidity or drought stress.

**CHAPITRE III**

***CULTURE IN VITRO DE GLOMUS  
INTRARADICES ET DE GLOMUS VERSIFORME***

## I. CULTURE IN VITRO DE FRAGMENTS MYCORRHIZIENS

*Symbiosis*, 17 (1994) 217-227  
Balaban, Philadelphia/Rehovot

### *In vitro* Culture of Sheared Mycorrhizal Roots

T.A. DIOP<sup>1,\*</sup>, C. PLENCHETTE<sup>1</sup> and D.G. STRULLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>INRA, Station d'Agronomie, B.V. 1540, 21034 Dijon cedex - France

Tel. (33) 80633032, Fax (33) 80633222

<sup>2</sup>Université d'Angers, 2 Boulevard Lavoisier, 49045 Angers cedex - France

Tel. (33) 41735356, Fax (33) 41735352

Received July 10, 1994; Accepted October 10, 1994

Une partie de ce travail a fait l'objet de la présentation d'un poster au 9<sup>e</sup>  
Congrès Nord Américain sur les Mycorhizes (NACOM) tenu en 1987 à Guelph,  
Ontario, Canada (Diop, Plenchette, Strullu, 1993)

## 1. RESUME

Des fragments mycorhiziens de *Glomus intraradices* (Schenk et Smith) et de *Glomus versiforme* (Karsten) Berch ont produit au bout de 3 mois en culture *in vitro* sans addition de partenaire végétal vivant, d'importantes structures extraradicales. La sporulation a été plus importante dans le milieu gélosé (Difco-bacto-agar) que dans le milieu minimal M où le mycélium a été plus abondant. En moyenne 60 spores matures de *Glomus intraradices* étaient produites dans chaque boîte de Petri et elles pouvaient accomplir leur cycle de vie en présence d'explants racinaires de tomate. Le développement à long terme de la phase extraradicale issue de fragments mycorhiziens de 0,5 cm de long est discuté en regard des différentes hypothèses avancées pour la culture pure des champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules.

## 2. ABSTRACT

Sheared-roots of two vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi, *Glomus intraradices* (Schenck et Smith) and *Glomus versiforme* (Karsten) Berch developed *in vitro* extensive extraradical phase in two media during three months without supplemented living host partner. The water agar medium (Difco bacto-agar) was more suitable to sporulation than minimal M medium where the mycelium was more profuse. An average of 60 mature spores of *Glomus intraradices* were produced in each Petri dish and were able to complete their life cycle in re-association with tomato root explants. The long-term behaviour of the extraradical phase from 0.5 cm of vesicular-arbuscular mycorrhizal root pieces is discussed regarding different hypotheses advanced for the achievement of pure cultures of VAM fungi.

### 3. INTRODUCTION

In recent years, there have been many attempts to cultivate the obligate vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi in pure culture. Resting spores were used as starter material in most studies (Mosse and Hepper, 1975; Mugnier and Mosse, 1987; Bécard and Fortin, 1988). Growth of VAM fungi is always ceased when the hyphal link to the root was broken. Factors such as nutrition (Hepper, 1983), chemical treatments (Gianninazzi-Pearson et al., 1989; Bécard and Piché, 1989), genetical factors (Burggraaf and Beringer, 1989; Bécard and Pfeffer, 1993; Bianciotto and Bonfante, 1993) have been studied to explain the lack of growth of the extraradical phase of VAM fungi. Commonly used culture media revealed the positive roles of low amounts of phosphorus, the detrimental action of sodium sulfate on symbiosis establishment (Hepper, 1979) and the inhibiting effect of zinc and manganese concentrations in many commercial agars on spore germination (Hepper and Smith, 1976). Low amounts of natural or synthesised flavonoids positively stimulated fungal development (Gianninazzi-Pearson et al., 1989; Morandi, 1989; Chabot et al., 1992a). Otherwise, certain amino acids (Hepper and Jakobsen, 1983), volatile compounds, particularly carbon dioxide, and root exudations, promote hyphal elongation (Carr et al., 1985; Elias and Safir, 1987; Bécard and Piché, 1989).

During the last decade, Strullu and Romand (1986, 1987) and Strullu et al. (1991b) reported the ability of intraradical forms of *Glomus spp.* to initiate a saprotrophic growth in *in vitro* culture. On agar medium, isolated vesicles and hyphae produced vegetative mycelium able to form new typical VAM infections. However, no observations have yet been published for the long-term *in vitro* behaviour of the extraradical phase from sheared VAM roots. Using 0.5 cm long segments of two VAM roots, we tested (1) the *in vitro* ability of their extraradical phase to grow on two solidified media without host plants or living roots; (2) the long-term outcome of the extraradical phase; and (3) the effectiveness of spores produced.

## 4. MATERIALS AND METHODS

### 4.1 Fungal materials

*Allium porrum* roots heavily colonized by *Glomus intraradices* and *Glomus versiforme* under greenhouse conditions were removed after six months. Selected VAM roots were delicately washed prior to surface disinfection. Surface sterilization was achieved in an ultrasonic apparatus under laminar flux by successive baths in ethanol 96 °C (10s), 6% calcium hypochlorite (1min), 2% chloramine T (10 min) and 0.2 % sulfate streptomycine plus 0.1% sulfate gentamycine (10 min). Then VAM roots were cut with scissors into 0.5 cm segments. The sheared-root inocula approximately contained 90 to 130 intraradical forms (chlamydospores or vesicles) of both fungi. The average diameter of intraradical chlamydospores of *G. intraradices* was 59 µm while that of intraradical vesicles of *G. versiforme* reached 43 µm. The experimental unit consisted of a culture of 0.5 cm leek roots colonized by *G. intraradices* or *G. versiforme* in a Petri dish (5.5 cm diameter) containing either 15 mL of distilled water gelled with 0.8% Bacto-agar or the minimal M medium (Bécard and Fortin, 1988) which contained in mgL<sup>-1</sup> distilled water: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 731; KNO<sub>3</sub>, 80; KCl, 65; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.8; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 288; NaFeEDTA, 8; KI, 0.75; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 6; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.65; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.5; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.13; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.0024; glycine, 3; thiamine, 0.1; pyrodoxine, 0.1; nicotinic acid, 0.5; myoinositol, 50; sucrose, 10000 and Bacto-agar 8000. The pH of the media was adjusted to 5.5 before sterilization at 121 °C for 15 min. Petri dishes were then placed in the dark at 27 °C.

### 4.2 Tomato root culture

Tomato seeds (*Solanum lycopersicon* Mill. Var Saint - Pierre) were surface-sterilized in hydrogen peroxyde (15 %) for 3 min. They were then rinsed in sterile distilled water before germinating on water agar in the dark at 27 °C. The tips (2 cm) of emerged radicles were transferred to SR medium (Strullu and Romand, 1986). The composition of this medium in mg L<sup>-1</sup> was as follows: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 368; KNO<sub>3</sub>, 303; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 44; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 2040;

NaFeEDTA, 65; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 2.23; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.29; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.86; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.24; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0.035; thiamine, 1; pyridoxine, 1; nicotinic acid, 1; cyanocobalamin, 0.5; calcium pantothenate, 1; sucrose, 15000 and Bacto-agar 8000. The pH of the medium was adjusted to 5.5 before sterilization at 121 °C for 15 min. Fast-growing tomato roots were cloned by regular subcultures on this medium in the dark at 27°C.

### **4.3 Assessment of fungal development**

Ten replications of the experimental unit were made for each fungus. Hyphal length, number and viability of newly formed spores were assessed for 90 days. The linear growth of main germinating hyphae was assessed for a week in eight random Petri dishes (four replicates per treatment by measuring four fast-growing hyphae daily). Hyphal growth (mm/per time unit) was estimated using a 2 mm grid in which the number of intersections between hyphae and the gridlines was converted to hyphal length according to the procedure of Bécard et al. (1992). The spores produced were counted directly in the Petri dishes (magnification 160x). Viability of the newly-produced spores was evaluated by testing their germinative capacity on water agar medium for 10 days. The spores were removed from the media using a sharp scalpel. To test their ability to regenerate VAM symbiosis, some germinating spores were associated with 7 cm segments of isolated tomato roots on minimal M medium. Both experiments on spore germination and on dual culture were also conducted at 27°C in the dark.

## 5. RESULTS

### 5.1 Denaturing root process

Both surface sterilization by chemical treatments and shearing process greatly reduced the metabolic activity of the VAM root pieces. The cutting of their apical tips stopped differentiation of root cells and consequently their growth.. However the intraradical forms of the VAM fungi did not loose their lipid contents.

### 5.2 Hyphal growth from sheared-roots of VAM fungi

All media were suitable for hyphal growth from sheared VAM roots (Fig. 1A and Fig. 1B). The growth curves were linear. *G. versiforme* grew faster than *G. intraradices* in all Petri dishes. Final growth on M medium was slightly higher than on water Bacto-agar : average length of hyphae of *G. versiforme* was over 9 cm in both media while that of *G. intraradices* fluctuated from 7.5 cm on Bacto-agar medium to 8.1 cm on M medium.

### 5.3 Morphological features of the extraradical phase

Regeneration of hyphae started from wounded VAM roots within three to six days after incubation (Fig. 2). Extraradical fungal structures showed many differences in their morphological features and directions. The average number of germinated hyphae per cut root ends varied with VAM fungus but often fluctuated from five on agar medium to over ten on M medium. Hyphae of *G. intraradices* regularly grew straight on agar medium compared to M medium where they were sometimes sinuous. Hyphae produced by sheared-roots colonized by *G. versiforme* were more prolific than those of sheared-roots colonized by *G. intraradices* . Both agar and M media showed similar growth patterns of the main hyphae of *G. versiforme*; the germinating hyphae were weak and often sinuous. According to their emergence zone, hyphal diameters varied greatly. For *G. intraradices* the main hyphae bearing arbuscule-like branches reached 16  $\mu\text{m}$  in diameter, the secondary branches, 8 to 10  $\mu\text{m}$ , and the tertiary ones, 4  $\mu\text{m}$ . The diameters of the main and ramified hyphae of *G. versiforme* were similar and

reached 10 and 6  $\mu\text{m}$  respectively. Hyphal biomass was also greater on M medium than on agar medium. However, extensive hyphal biomass covered each Petri dish three months after incubation for both VAM fungi.

Three days after germination, the VAM fungi often began to sporulate. First spores were seen on the lateral hyphae. The rate of spore formation was slow at the beginning. The maximum number of spores was 63 after three months on agar medium for *G. intraradices* (Figs. 2, 3). The sporulation of this fungus (Table 1) was much smaller on M medium despite the extensive hyphal network (less than 4 times on water agar medium at 90th day). The diameter of the hyaline globular vegetative spores of *G. intraradices* depended on their developmental status (Fig. 4). Mature spores with dense lipid oil droplets reached 65 to 80  $\mu\text{m}$  in diameter while detectable spores in formation attained 20-25  $\mu\text{m}$ . These differences linked to development were found every day of the experiment. Otherwise, the good mycelium growth of *G. versiforme* was accompanied by poor sporulation (Fig. 5). Only a few spores (60  $\mu\text{m}$ ) in diameter were observed in plates containing agar medium and none on M medium (Table 1). All newly-produced spores kept their cytoplasmic contents up to three months.

#### 5.4 Viability of produced spores

Newly-produced spores readily germinated after aseptic transfer on water agar medium. For both fungi, 85% of spores germinated between three to six days after transfer. At day 10, the germination reached to 95 %. Spores often produced a single germ tube which developed many lateral branches. The branches usually became septate and ceased to grow after a few days if they were not in the vicinity of a host partner. In association with tomato root explants, they exhibited profuse mycelium and formed typical mycorrhizal infections (Fig. 6).

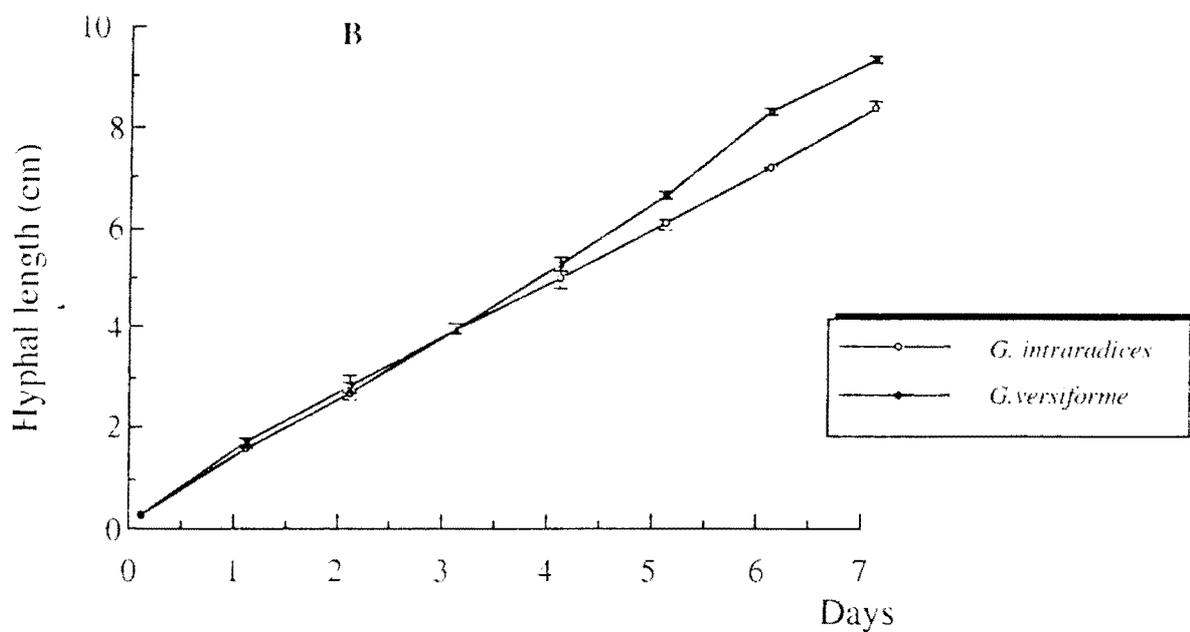
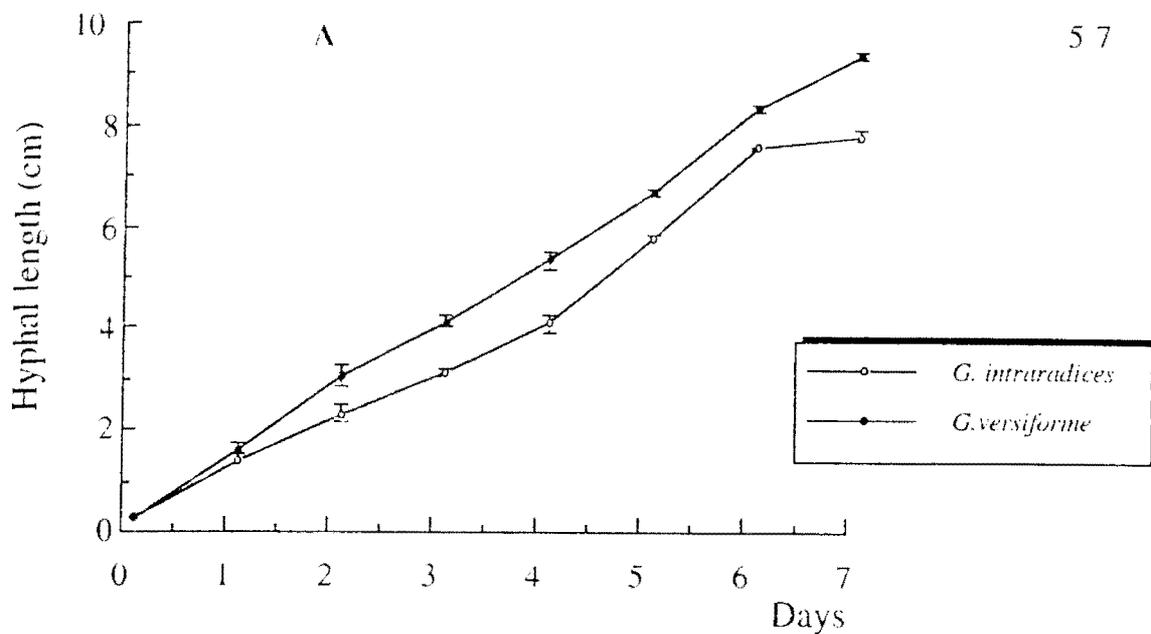


Figure 1 : Hyphal growth (cm) from germinating sheared roots of *Glomus* spp during seven days of cultivation on water agar (A) and minimal M (B) media.

Vertical bars indicate standard deviations.

Figure 2 : *In vitro* sporulation of sheared roots of *G. intraradices* on water agar medium. Note numerous spores formed on branching hyphae.

Scale bar = 0.7 mm.

Figure 3 : Extraradical phase of *G. intraradices* on water agar medium showing dense mycelia (arrow) and spores (double arrow).

Scale bar = 100  $\mu$ m.

Figure 4 : Magnification of spores of *G. intraradices* formed on M medium.

Note the young spore (arrow) and mature spore (double arrow) with dense contents.

Scale bar = 100  $\mu$ m.

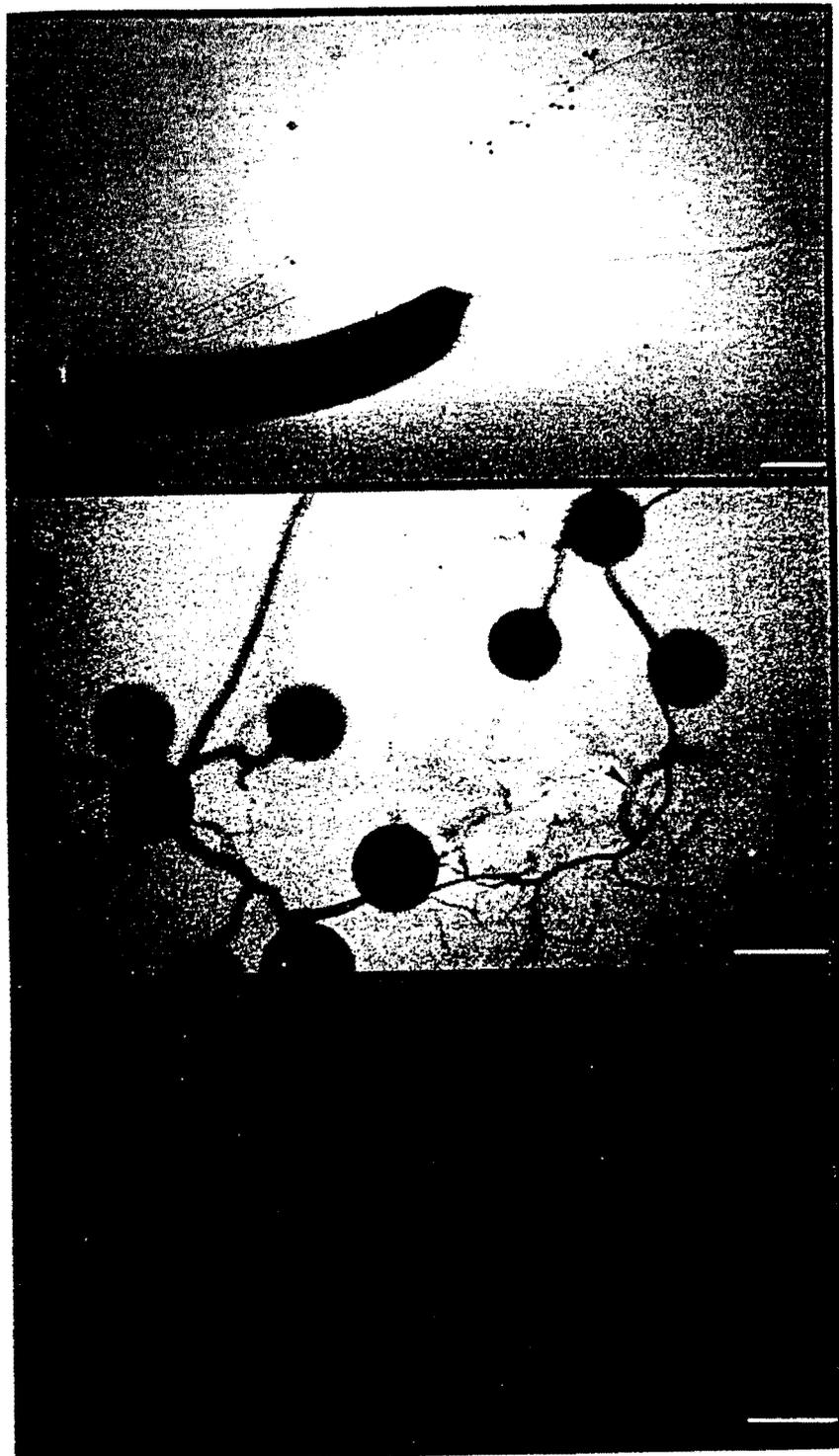


Figure 5 : Extraradical phase from sheared root of *G. versiforme* on water agar medium. Note the extensive biomass of regenerating hyphae and a few spores (arrow).

A similar pattern of germination without sporulation of *G. versiforme* was found on M medium.

Scale bar = 0.7 mm.

Figure 6 : Portion of tomato root colonized *in vitro* by newly produced spores of *G. intraradices* after 1 month.

Note vesicles and hyphae found inside the stained root. Scale bar = 100  $\mu$ m.

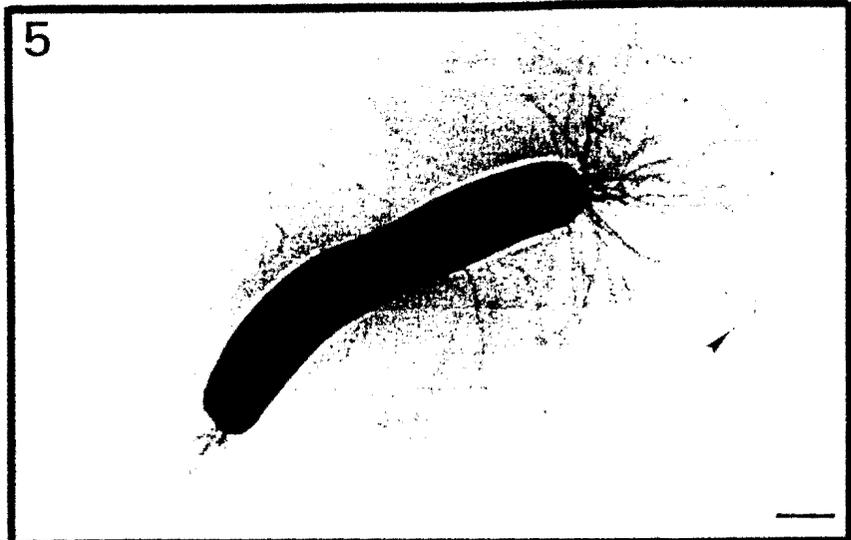


Table 1 : *In vitro* production of spores from sheared roots of *Glomus spp* in two different media

	Sheared roots of <i>Glomus versiforme</i>		Sheared root of <i>Glomus intraradices</i>	
	Water agar	Minimal M	Water agar	Minimal M
Months				
1	5 b	0 a	24 c	6 b
2	6 b	0 a	42 b	9 b
3	10 a	0 a	63 a	14 a

Values in each column followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$  Newman-Keuls test).

## 6. DISCUSSION

The present paper is the first report of sporulation of VAM fungi on water agar medium without supplemented nutrients in *in vitro* conditions. More than 60 mature spores were produced from sheared-roots of *G. intraradices*. Water agar medium was suitable for a sustainable growth of hyphae in presence of a decaying root. Vigorous regenerating hyphae predominantly originated from intraradical forms. The growth patterns of hyphae were similar to those obtained in dual root organ cultures. The results show that a relationship exists between hyphal development and the type of growth medium. The absence of a living host partner did not inhibit the *in vitro* ability of *Gigaspora margarita* to replicate DNA and undergo nuclear divisions (Bécard and Pfeffer, 1993; Bianciotto and Bonfante, 1993). This probably occurs in the case of *Glomus spp.* leading to extensive hyphal establishment in a nutrient-deficient medium such as water Bacto-agar.

The M medium was developed from White's medium after observing the detrimental effects of high concentrations of nitrogen, carbon and sucrose (Bécard and Fortin, 1988). This medium was previously found to be suitable to support the life cycle of VAM fungi (Chabot et al., 1992b; Diop et al., 1992a, 1994). Under the conditions we used, the best sporulation of sheared-roots was obtained with water agar. Different hypotheses were advanced to explain the sporulation of *Glomus spp.* on the media. Stresses observed in *in vitro* cultivation systems induced variable behaviour of the VAM fungi. Water Bacto-agar seemed to be more stressing than M medium and fast sporulation in the former medium was a survival adaptation of VAM fungi. *G. intraradices* was more sensitive to stressed environment than *G. versiforme*. Diop et al. (1992a, 1992b), reported that on M medium, *G. margarita* developed first an extensive hyphal biomass and later an abundant sporulation when growing conditions became limited.

The intraradical forms retained their lipid contents and germinated well irrespective of the decrease in metabolic activity of the root explants by both surface sterilization and the shearing process. This is not surprising as intraradical vesicles in dead and decaying infected

roots have been found to maintain their viability by germinating in a similar manner as extraradical spores; VAM fungi developed a saprotrophic phase in these roots (Tommerup and Abbott, 1981). The low level of exudates from surface-sterilized excised roots (with reduced metabolic activity) may have been sufficient to support development of VAM fungi. The results confirm suggestions that the quality rather than the quantity of root exudates is more involved in the stimulation of hyphal elongation (Carr et al., 1985; Elias and Safir, 1987), and also confirm some *in vitro* independent growth of the regenerated mycelium as already advanced (Strullu et al., 1991b; Williams, 1992). In our experiments, *G. intraradices* produced spores in all media. *In vitro* sporulation of *G. versiforme* obviously required a supplemented medium or a living partner (Diop et al., 1994a). We also hypothesized that most supplemented mineral elements in classical media could be toxic for VAM fungi. *G. versiforme* developed an extensive mycelium on both media and occasionally sporulated on water agar medium only. It would be interesting to test a large number of commercial agars on the behaviour of extraradical phase from sheared mycorrhizal roots. The *in vitro* methods of mycorrhizal syntheses exploited the ability of germinating hyphae for independent growth (Strullu and Romand, 1987). This is supported by the extensive growth obtained from the same material associated with a root partner; both *G. intraradices* and *G. versiforme* produced more than 25% of hyphal growth during 7 days of dual culture (Diop et al., 1994a)

In conclusion, the extensive mycelium and sporulation obtained from sheared VAM roots on poor media (water agar and M), show the importance of abiotic factors for the success in *in vitro* culture of the intraradical forms of the obligate biotrophic microorganisms. This type of culture without supplemented living host partner allows an easy non-destructive observation of fungal development and can be used to increase our knowledge of the biotrophic status of VAM fungi.

II. CULTURE IN VITRO DE FRAGMENTS MYCORRHIZIENS  
ET DE RACINES EXCISEES DE TOMATE.

Mycorrhiza (1994) 5:17-22

© Springer-Verlag 1994

**ORIGINAL PAPER**

T. A. Diop · C. Plenchette · D. G. Strullu

**Dual axenic culture of sheared-root inocula  
of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi  
associated with tomato roots**

## 1. RESUME

Des fragments mycorhiziens stérilisés (*Glomus intraradices* et *Glomus versiforme*) récoltés à partir des cultures en pots ont donné, en association avec des racines excisées de tomate, une importante production de spores et de biomasse mycélienne. Des centaines et des milliers de spores matures ont été observées dans les boîtes de Petri après 3 mois d'incubation à l'obscurité. Les propagules produites par les deux champignons pouvaient compléter leur cycle de vie *in vitro* et coloniser intensément les racines d'*Acacia albida* en conditions de serre. L'efficacité des fragments mycorhiziens de 0,5 cm de long a montré le grand potentiel inoculant des vésicules intraracinaires.

## 2. ABSTRACT

Surface-sterilized sheared-root inocula of two vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi (*Glomus intraradices* and *G. versiforme*) from pot culture in association with excised tomato root exhibited an important sporulation and production of extensive hyphal biomass. As many as  $10^2$ - $10^3$  axenic mature spores were recovered in Petri dishes during 3 months incubation in the dark. Propagules of both species were able to complete their vegetative life cycle *in vitro* and efficiently colonize *Acacia albida* roots after 1 month under greenhouse conditions. The effectiveness of 0.5-cm pieces of VAM roots as starter inocula indicate the high inoculum potential of intravesicle propagules.

### 3. INTRODUCTION

The beneficial roles of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi in the growth, nutrition and health of host plants have been amply demonstrated (Perrin 1991; Plenchette 1991). However, the large scale use of vesicular-arbuscular endophytes still presents a great challenge. Despite the proliferation of cultivation systems including various greenhouse and *in vitro* methods (Dehne and Bachaus, 1986; Strullu and Romand, 1986; Diop et al., 1992; Sylvia and Jarstfer, 1992), the obligate biotrophic status of VAM fungi reduces the inoculum potential of these ubiquitous microorganisms.

Contaminant-free culture of VAM should lead to a better understanding of the complex biology of VAM symbiosis. Many axenic cultures of VAM fungi with living roots both attached to and separate from shoots have been applied in the last two decades to investigate functional aspects of the symbiosis or to produce inocula (Mosse and Hepper, 1975; Mugnier and Mosse, 1987; Bécard and Fortin, 1988; Bécard and Piché, 1989). Spores are the preferred starting material in most studies even though these propagules require a lot of care to avoid contamination, dormancy and strain mutations under greenhouse conditions. The intraradical forms of VAM have been less used despite being potentially good inocula. Root pieces colonized by VAM fungi develop a high capacity of regrowth of hyphae (Magrou, 1946; Strullu and Romand, 1987) and establish typical mycorrhizae in association with host partners (Bierman and Linderman, 1983; Strullu and Romand, 1986). It has been proposed that the completion of the life cycle of VAM fungi is mainly achieved by natural destruction of infected root pieces, resulting in the liberation of intravesicles which then readily germinated (Strullu et al., unpublished work).

Recently Strullu and Romand (1986, 1987) described the reproducible *in vitro* production of VAM propagules using isolated vesicles, hyphae and endomycorrhizal roots as starting inoculum. The use of these inocula easily was facilitated by encapsulation of the intraradical forms of VAM fungi (Strullu et al., 1991b).

The aims of the present study were: (1) to assess the inoculum potential of sheared-root inocula of VAM fungi in association with excised tomato roots; (2) to study the capacity of regeneration of newly formed propagules (i.e spores, hyphae, colonized roots) in both *in vitro* and *in vivo* culture conditions; (3) to standardize the *in vitro* cultivation system of Strullu and Romand (1987). Sheared leek roots colonized by *Glomus intradices* (Schenck et Smith) and *G. versiforme* (Karten) Berch associated with excised tomato roots were cultivated in standard Petri dishes.

#### 4. MATERIALS AND METHODS

##### 4.1 Sheared-root inocula of VAM fungi

*G. intradices* and *G. versiforme* were routinely cultivated in association with *Allium porum* under greenhouse conditions. After 4 months, heavily colonized leek roots freed of soil particles were carefully washed and nondestructively selected under binocular microscope at x160 magnification. Sheared-roots of each inoculum were delicately washed prior to ultrasonic treatment (48 KHz) for 10 min (Strullu and Romand, 1986). Surface sterilization was carried out under a laminar-flow hood by successive washes with 96 °C ethanol (10 s), 6 % calcium hypochlorite (1 min), Chloramine T 2% plus two drops of Tween 20 (10 min) and rinsing for 10 min in an antibiotic solution containing 200 mg l<sup>-1</sup> streptomycin sulfate and 100 mg l<sup>-1</sup> gentamycin sulfate. Mycorrhizal roots were cut with scissors into 0.5 cm lengths and aseptically transferred to Petri dish (9 cm in diameter) containing distilled water solidified with 0.8% Bacto agar. VAM root pieces contained 3-160 intravesicles (Fig. 1). The dishes were incubated in the dark at 27 °C.

##### 4.2 Root culture

Tomato seeds (*Solanum lycopersicon* Mill. var Saint-Pierre) were surface disinfected in hydrogen peroxyde (15 % ) during 3 min., then washed in sterile distilled water. The seeds germinated after 48h at 27 °C in the dark on water agar. The tips (2 cm) of emerged radicles were transferred to a modified White's medium (MW) described by Bécard and Fortin (1988). The composition of this medium in mg l<sup>-1</sup> distilled water is as follow : MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 731;

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.10H<sub>2</sub>O, 453; KNO<sub>3</sub>, 80; KCl, 65; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 21.5; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 288; NaFeEDTA, 8; KI, 0.75; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 6; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.65; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.5; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.13; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.0024; glycine, 3; thiamine, 0.1; pyrodoxine, 0.1; nicotinic acid, 0.5; myo-inositol, 50; sucrose, 30 000 and bacto agar 8000. The pH of the medium was adjusted to 5.5 before sterilization at 121 °C for 15 min. Fast growing tomato roots were cloned by regular subcultures in this medium.

### 4.3 Dual culture

The 0.5-cm lengths of VAM roots readily began to grow on agar medium in 2-3 days. Using a 13-mm cork borer, inoculum was delicately transferred to the vicinity of a 7-cm lengths of tomato root explant on minimal M medium (Bécard and Fortin, 1988). This medium contains per mg l<sup>-1</sup> of distilled water : MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 731; KNO<sub>3</sub>, 80; KCl, 65; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.8; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 288; NaFeEDTA, 8; KI, 0.75; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 6; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.65; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.5; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.13; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.0024; glycine, 3; thiamine, 0.1; pyrodoxine, 0.1; nicotinic acid, 0.5; myo-inositol, 50; sucrose, 10 000 and Bacto agar 8000. The pH of the medium was adjusted to 5.5 before sterilization at 121 °C for 15 min.

The experimental unit consisted of a standard Petri dish (ø 9 cm) containing 40 ml M medium with one 0.5 cm VAM root piece and a 7 cm tomato root with a few branches. Eight replicates each of *G. intraradices* and *G. versiforme* in association with tomato roots were set up. Then Petri dishes were incubated horizontally at 27 °C in the dark.

### 4.4 Reinfection of VAM propagules produced

Newly formed VAM propagules i.e mature spores and isolated colonized roots, were re-associated with tomato root explants in axenic conditions. In addition, seeds of the leguminous tree *Acacia albida* were surface sterilized with sulfuric acid (30 min) and washed with sterile distilled water. After 48 h germination, *Acacia* seedlings were inoculated under greenhouse conditions with 50 *in vitro* -produced spores and a mixture of other propagules, i.e axenic colonized tomato roots plus hyphae from each fungus. Five replications were set up per treatment.

#### 4.5 Assessment of variables

The establishment of VAM symbiosis was regularly checked over 3 months. Non-destructive observation of extraradical forms, development of hyphae and multigermination of spores was carried out under the binocular at various magnifications. Viability and the ability of newly formed propagules to re-establish mycorrhizae, were assessed: (i) by observing their germination and morphology of the extraradical phase after association with tomato roots *in vitro*; (ii) by evaluating the root colonization of *Acacia albida* seedlings *in vivo*.

The gridline-intersect method (Giovannetti and Mosse, 1980) was used to follow the growth of hyphae of both fungi during the first week in dual culture. At the end of the experiments, the intensity and the percentage of root colonization were evaluated by the same procedure in six randomly chosen Petri dishes (three for each treatment). The roots were cleared with 10% KOH for 1 h at 90 °C and stained for 15 min with acid fushin (0.05% in lactoglycerol).

**Figure 1 : Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) root piece showing vesicles (arrow), which form an excellent starting inoculum for establishment of VAM symbiosis; bar = 1 mm.**

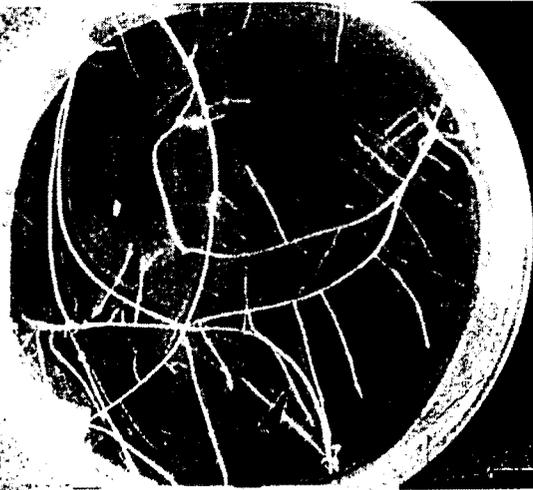
**Figure 2 : Culture of tomato roots in modified White's medium**

Note the numerous fine lateral roots (arrow) which are potential host partners when the apical tips are transferred to suitable medium; bar = 15 mm.

1



2



## 5. RESULTS

### 5.1 Growth of tomato roots

Root apices from germinating tomato seeds grew vigorously on solidified MW medium and developed many thin lateral ramifications after 5 days of incubation (Fig. 2). Subculturing of vigorous tomato root apices on minimal M medium did not alter their morphology and after 7 days they were ready for the establishment of dual cultures with germinating, sheared endomycorrhizal leek roots.

### 5.2 Establishment of dual cultures

Both types of sheared endomycorrhizal leek roots regenerated vigorous hyphae. Hyphae grew well in all Petri dishes and reached more than 10 cm length after 7 days (Fig. 3). Growth of *G. versiforme* was slightly faster than *G. intraradices*. Different germinating patterns were observed, with sheared-root inocula of *G. versiforme* often exhibiting more ramifications (Figs. 4-6). Hyphae emerged from the ends of the root cuttings or laterally when the root epidermis was damaged. Most of hyphae were born from germinating intravesicles. First contacts of hyphae and tomato roots occurred after 1 - 3 days of dual culture (Figs. 7, 8).

### 5.3 *In vitro* fungal development

The development of the extraradical mycelium was profuse and quickly covered the Petri dishes. Hyphae spread out in all directions and sometimes anastomosed into lateral branches. The main hyphae were often straight and bore numerous arbuscule-like branches. Sporulation of both fungi began 3 days after contact and spores were produced inside or outside the zone of tomato roots (Figs. 9, 10). No spores were formed inside the root organs.

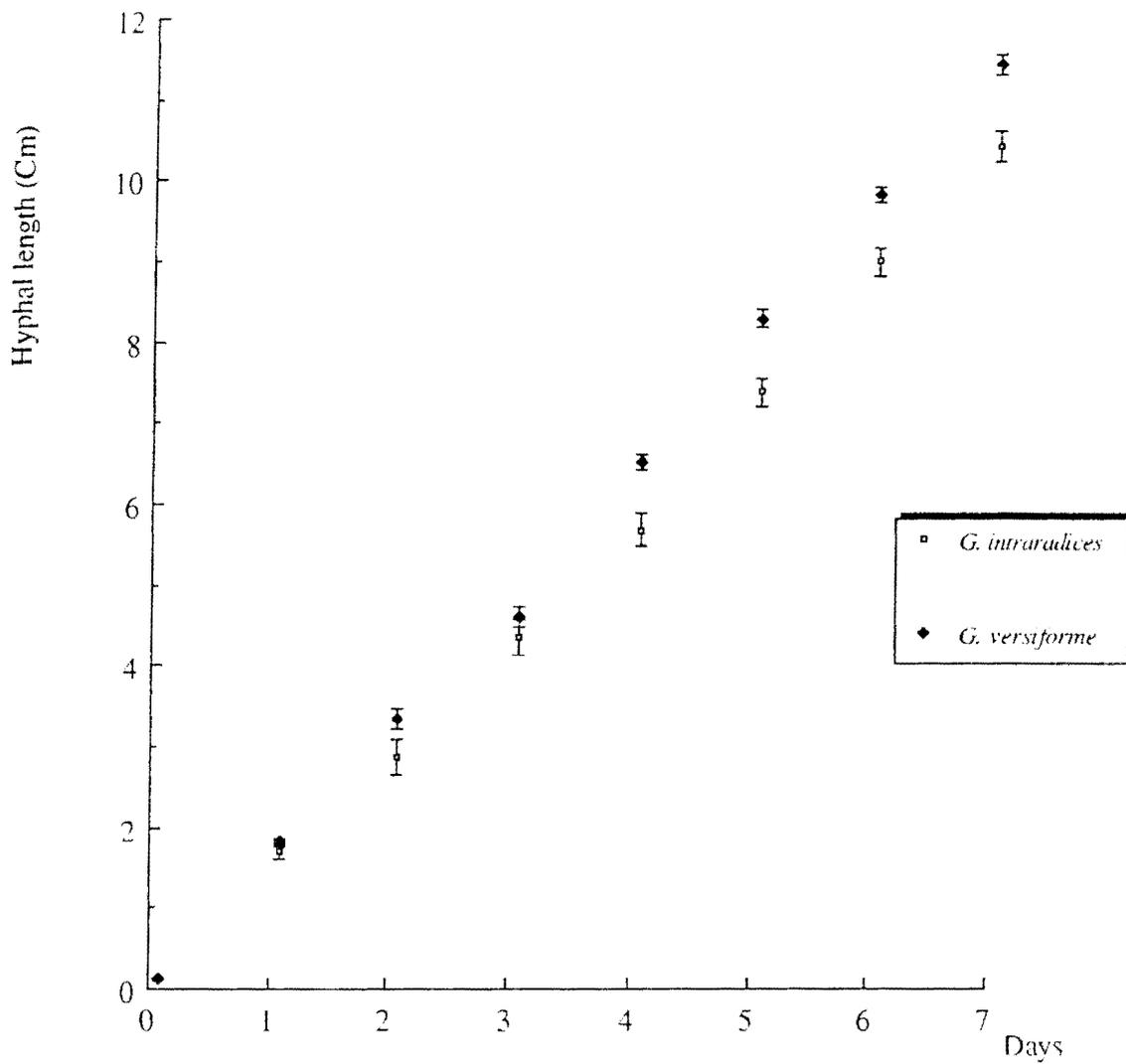


Figure 3 : Change in the length of hyphae from germinating sheared-root inocula of *Glomus* spp. associated with excised tomato root during 7 days of dual culture.

Vertical lines indicate standard deviations.

**Figures 4-13 : Morphological features of sheared-root inocula of *Glomus* spp in tomato root culture.**

**Figs. 4, 5 :** Germinating hyphae of *G. intraradices* arising from root cut ends or the damaged root epidermis; bar = 1 mm.

**Fig. 6 :** Sheared-root inocula of *G. versiforme* developed more profuse germinating hyphae than those of *G. intraradices*; bar = 1 mm.

**Figs. 7, 8 :** Contacts between sheared-root inocula of VAM fungi and tomato root explants. Germ tubes spread out in all directions and contacts occurred within 3 days of dual culture.

**Fig. 7. :** First events of inoculation of tomato root by leek root piece colonized by *G.intraradices*. I, inoculum; M, mycelium; T, tomato root; bar = 1 mm.

**Fig 8.** Appressorium (arrow) after inoculation of excised tomato root by leek root piece colonized by *G. versiforme*; bar = 400  $\mu$ m.

**Fig. 9 :** Newly-produced spores (arrow) of *G. versiforme* in a tomato root culture; bar = 200  $\mu$ m.

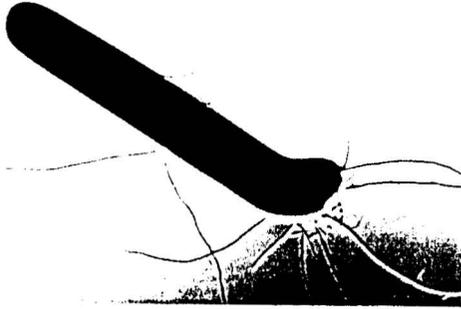
**Fig. 10 :** Extraradical phase of *G. versiforme* outside the zone of tomato root showing dense mycelium and spores (arrow); bar = 200  $\mu$ m.

**Fig. 11 :** Arbuscule-like branches and cluster of spores of *G. intraradices*. Spores are often in terminal (arrow) and intercalary (double arrow) positions of the ramifications of main hyphae; bar = 100  $\mu$ m.

**Fig. 12 :** High magnification showing clusters of mature spores of *G. versiforme*. Note also the dense contents of spores; bar = 200  $\mu$ m.

**Fig. 13 :** Tomato root stained with acid fuchsin showing typical infection of *G. versiforme*. Note the vesicles and hyphae inside tomato root; bar = 200  $\mu$ m.

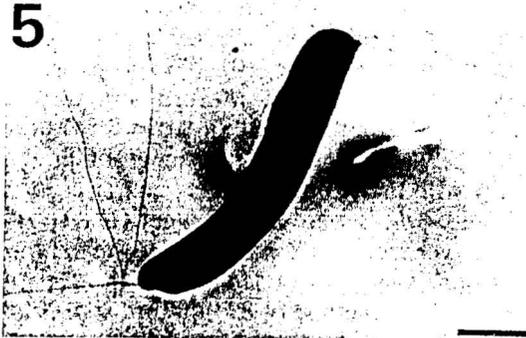
4



9



5



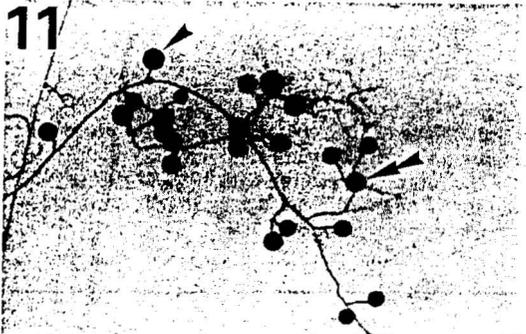
10



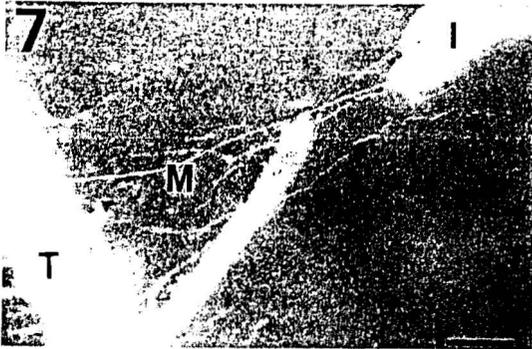
6



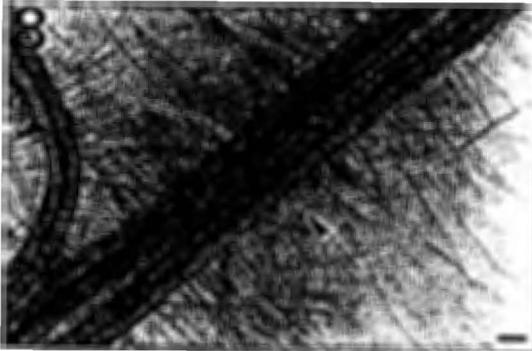
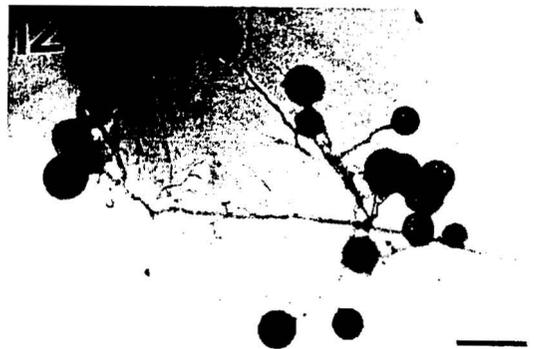
11



7



12



Mature and under developed spores were observed in all periods of the *in vitro* culture. New spores were uniform, globular and white, initially with many lipid droplets on maturation. Spores of *G. intraradices* were much bigger ( $\varnothing$  80  $\mu$ m) than those of *G. versiforme* ( $\varnothing$  65  $\mu$ m). However, the size of *G. intraradices* spores varied greatly at all periods of dual culture. An average of 893 mature spores of *G. intraradices* and 2065 mature spores of *G. versiforme* were recorded after 3 months incubation in the dark. All were formed terminally or were intercalary on hyphal branches. Spores were often grouped (Figs. 11, 12) and empty spores were sometimes detected, especially in cultures with sheared-root inocula of *G. versiforme* during aging of the dual culture.

At harvest, stained roots showed typical infections. Coiled hyphae and vesicles were observed inside roots (Fig. 13). However, these infection units, i.e root segments with intravesicles, were slightly more numerous in roots inoculated with sheared-root inoculum of *G. versiforme*, while those inoculated with *G. intraradices* developed many penetration points. The percentage root colonization was only 24 % in Petri dishes inoculated with sheared-root inoculum of *G. intraradices* and 35 % for *G. versiforme*.

#### 5.4 Viability and reinfection of VAM propagules

Both propagules, i.e spores and fragments of infected roots, of each fungus germinated on minimal M medium without previous treatment. In association with isolated tomato roots, they were able to complete their life cycle. Inoculation of *Acacia albida* seedlings with newly formed propagules, spores and a mixture of hyphae and colonized tomato roots was successful. The spores produced by *G. intraradices* and mycelia plus infected roots of *G. versiforme* were the most efficient inocula after 1 month of greenhouse culture (Table 1).

**Table 1 : Reinfection of *Acacia albida* seedlings under greenhouse conditions by axenically produced propagules**

Inocula (%)	Root colonization (%)	Intensity of root colonization (%)
Spores of <i>G.intraradices</i>	80.8 a	53.0 a
Mycelia + infected roots by <i>G. intraradices</i>	41.6 b	17.8 b
Spores of <i>G.Versiforme</i>	47.8 b	26.6 b
Mycelia + infected roots by <i>G. versiforme</i>	88.4 a	58.0 a

Values in each column followed by the same letter are not significantly different (P = 0.05 Newman-Keuls test).

## 6. DISCUSSION

Dual culture of tomato roots associated with sheared-root inocula of *G. versiforme* or *G. intraradices* gave excellent sporulation when compared to previous reports (Chabot et al. 1992; Diop et al., 1992a). Both fungi developed extensive extraradical mycelium and massively sporulated in a relatively short period of time for obligate symbionts. Sporulation occurred after 3 - 4 days and the number of spores quickly increased to 893 and 2065, respectively in plates inoculated with *G. intraradices* and *G. versiforme* in 3 incubation months. For *G. intraradices*, the results confirmed that sporulation of this fungus occurs outside roots as already described (Neiderhofer and Schenck, 1987; Chabot et al., 1992a). The same process of *G. intraradices* spore formation occurred under greenhouse conditions in association with *Allium porrum*. The minimal M medium previously used for the establishment of mycorrhizae with spores of *Gigaspora margarita* (Bécard and Fortin, 1988) was also suitable for the establishment of VAM symbiosis with excised colonized roots. In a further experiment (T.A. Diop et al., unpublished work), we noticed that isolated roots colonized by *G. versiforme* were unable to sporulate monoaxenically, despite the fact that they exhibited extensive mycelia. Thus, we think that the presence of root explant is a prerequisite for sporulation of sheared-root inocula of *G. versiforme*. Root exudations, especially CO<sub>2</sub> during root respiration could explain the positive stimulation of extraradical mycelium from sheared-root inocula of vesicular-arbuscular fungi as observed for *Gigaspora margarita* (Bécard and Piché, 1989). Moreover, nontransformed tomato roots, because of their convenient growth, appear to be more promising for the large scale production of VAM inocula than Ri T-DNA transformed carrot roots (Diop, 1990).

As intravesicles in colonized roots act as reserves and propagules, they have a higher inoculum potential than other VAM propagules i.e spores and hyphae (Bierman and Liderman, 1983; Strullu and Romand, 1986, 1987; Mosse, 1988). The multiple germinating hyphae observed from VAM sheared roots seemed to influence positively the physiological status of the VAM fungi by enhancing the number of penetration points with tomato roots and producing good sporulation. Considering the inability of some VAM fungi to produce spores (Johnson, 1977; McGee, 1989), the use of excised VAM roots as inocula offers an opportunity for

taxonomic and genetic studies of these obligate biotrophic microorganisms. However, proper selection of sheared-root inocula is the key of the success of this cultivation system. Leek roots are highly mycotrophic (Plenchette et al., 1983 ) and provide an easy nondestructive way to observe intravesicles. In addition, Strullu and Romand's disinfection method leads to less contamination.

The ability of both propagules to complete their life cycle *in vitro* and to colonize *Acacia albida* roots *in vivo* enhances the interest of this cultivation system. The reproducibility of the system, and the obtaining of clean propagules rapidly in little space, provide a powerful tool for biological studies and practical applications. Based on early work (Strullu et al., 1991b), the *in vitro* system also gives opportunities for automatic production because of easy recovery of propagules by bubbling (Furlan and Fortin, 1975) or by liquifying gel agar with cation chelators (Donner and Bécard, 1991). Developing countries will benefit more from the VAM symbiosis in this culture system, which is cheaper than greenhouse culture. We are now assessing the effectivity of propagules obtained *in vivo* by the usual greenhouse methods and those produced in *in vitro* conditions.

Considering the high production of intravesicles (1 cm of heavily colonized leek roots sometimes contain more than 1500) and their richness in energy sources able to initiate sporulation, we recommend use of these propagules as high-quality inoculum. Root cultures of tomato, surface sterilization of 0.5-cm sheared-root inoculum of VAM fungi (Strullu and Romand, 1986) and the minimal M medium (Bécard and Fortin, 1988) could be the basis of the standardization of axenic culture of VAM fungi producing intravesicles.

### III. CONSTITUTION DE COLLECTIONS *IN VITRO* DE *GLOMUS* PAR CULTURE CONTINUE DE LA FORME INTRARACINAIRE

par D.G. STRULLU (1), T.A. DIOP (1) et C. PLENCHETTE (2)

C.R.Acad. Sci. Paris (1995), soumis

(1) Laboratoire Interactions Plantes-Microorganismes, Université d'Angers, 2 boulevard Lavoisier, 49045 ANGERS Cedex.

(2) Station d'Agronomie INRA, 17 rue Sully, 21034 DIJON Cedex

#### 1. RESUME

Cette note décrit une méthode de production *in vitro* de mycélium et de spores de *Glomus intraradices* et de *Glomus versiforme* à partir de la forme intraracinaire du champignon. La culture continue des champignons formant des mycorrhizes à vésicules et arbuscules sur racines transformées permet de constituer une collection de souches et de multiplier le matériel biologique.

#### 2. SUMMARY

This paper describes an *in vitro* reproducible method of production of *Glomus intraradices* and *Glomus versiforme* using intraradical forms as starter inocula. Mycorrhizal root showing hyphal regrowth have been used to inoculate RiT-DNA transformed roots of carrot by placing the inoculum near the emerging lateral roots. The continuous culture of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in transformed root is suitable for an *in vitro* collection of fungal isolates and for increasing the fungal biomass.

### 3. ABRIDGED ENGLISH VERSION

In natural conditions the mycelium of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi develops some ability for independent growth and produce vegetative spores, so the symbionts are distributed world wide associated with most vascular plants (Harley and Smith, 1983; Strullu, 1985). VAM fungi are obligate symbionts which cannot be so far cultivated in pure culture. Various culture media have been tested for growing *in vitro* VAM fungi and different forms of inocula have been used to produce mycorrhizas with root organ cultures (Mosse and Hepper, 1975; Bécard and Fortin, 1988). Root pieces colonized with VAM fungi have an important capacity for regrowth hyphae (Strullu et al., 1991b). After emerging from disinfected mycorrhizal root pieces, the fungus growth is relatively fast attaining growth rates of up to 9 mm per day. On solid culture media many hyphae are produced without detectable contamination. Generally an homogeneous culture obtained from a single mycorrhizal root is established.

The contact between hyphae and transformed root occurred after 1-3 days of dual culture. The extraradical mycelium rapidly covered the petri-dishes. The main hyphae were often straight and the sporulation of both fungi began 3 days after the first contact. All spores were globular and white spores of *G. intraradices* were 80  $\mu\text{m}$  in diameter and *G. versiforme* 65  $\mu\text{m}$ . After 3 months' incubation in the dark, *G. intraradices* produced 893 spores on M medium and 2085 on modified SR medium. *G. versiforme* produced respectively 2065 and 7550. The distance between the spore varied from 63 to 134  $\mu\text{m}$  for *G. intraradices* and from 36 to 85 for *G. versiforme*. Axenic spores and infected root pieces of both fungus developed on this media and were able to complete the life cycle of the fungi. Successful mycorrhization can be confirmed by non destructive observation of vesicles and arbuscules in root tissues. A schematic life cycle of vesicular arbuscular fungi is proposed. The accomplishment of the life cycle depends on the ability of the fungi to infect a root system and develop an extraradical mycelium which has a saprophytic ability and a property to produce vegetative spores.

#### 4. INTRODUCTION

De nombreuses études ont déjà établi l'intérêt des associations symbiotiques en agronomie et dans la préservation des écosystèmes naturels (Harley et Smith, 1983; Strullu, 1983). On peut affirmer que tous les végétaux sont, de façon permanente dans la nature, sous la contrainte de symbiotes et que ceux-ci modifient le fonctionnement de leur hôte; par exemple l'expression de certains gènes de symbiose correspond à des réactions de défense.

Les champignons Zygomycètes de l'ordre des Glomales formant des mycorhizes à vésicules et arbuscules ne se cultivent pas en culture pure. La culture *in vitro* peut cependant être réalisée à partir de spores végétatives qui sont préalablement désinfectées. Les souches identifiées grâce à diverses spores végétatives sont donc cultivées et entretenues dans des pots, en serre dans des conditions contrôlées mais non axéniques. La culture continue des champignons formant des mycorhizes à vésicules et arbuscules est actuellement un des objectifs importants de la microbiologie appliquée aux sciences végétales. Cette culture continue maîtrisée doit permettre de constituer les collections de souches *in vitro* nécessaires à l'exploitation des ressources génétiques. En utilisant ces cultures, on pourra améliorer la fiabilité des travaux sur le génome de ces champignons, tels ceux traitant de l'identification systématique par les techniques de biologie moléculaire. En effet, les ressources génétiques actuellement disponibles sont constituées de champignons dont les cultures sont entretenues sur des plantes en serre. Celles-ci permettent d'obtenir des spores qui sont stérilisées; les cultures ainsi obtenues *in vitro* peuvent être maintenues quelques mois mais ne donnent pas lieu à des subcultures. Pour chaque expérience, de nouvelles cultures sont initiées à partir de spores produites par un matériel indéfiniment cultivé en serre, avec les risques d'erreurs ou de contaminations que cela comporte.

Plusieurs techniques permettent d'inoculer *in vitro* des Glomales à des racines. Les travaux de Mosse et Hepper (1975) et ceux d'autres auteurs utilisent des chlamydospores de *Glomus mosseae* comme matériel de départ; ceux de Becard et Fortin (1988) retiennent des azygospores de *Gigaspora margarita*. Strullu et Romand (1986; 1987) réalisent les mises en culture axénique de racines mycorhizées ou de vésicules intraracinaires isolées de *Glomus fasciculatus* et *Glomus intraradices* extraites de racines. Dans tous les cas, on effectue une désinfection superficielle des propagules par des désinfectants ou des antibiotiques et une

des racines transformées.

Le but de cette note est de montrer que l'initiation de cultures à partir de vésicules intraracinaires permet d'obtenir une culture de *Glomus intraradices* et de *G. versiforme* en continu et de réaliser les subcultures nécessaires à la distribution des souches à partir d'une collection *in vitro* réalisée en boîtes de Petri.

## 5. MATERIEL ET METHODES

### 5.1 Obtention de la forme intraracinaire du symbiote

Pour ces expériences *Glomus intraradices* (Schenck et Smith) et *G. versiforme* (Karsten) ont été utilisés. Ces champignons sont cultivés sur poireau en serre. Des racines sont prélevées et désinfectées suivant les protocoles de Strullu et Romand (1986; 1987). Les expériences sont menées sur 2 milieux de culture différents : le milieu minimal M de Bécard et Fortin (1988) et le milieu de Strullu et Romand (1986) modifié de la façon suivante (SRM) :

#### Macroéléments (en mM)

MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	3
KNO <sub>3</sub>	0,75
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ,4H <sub>2</sub> O	1,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,03
KCl	0,8
NaFeEDTA	0,02

#### Oligoéléments (en µM)

MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	11
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	0,9
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ,4H <sub>2</sub> O	0,028
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2H <sub>2</sub> O	0,009

#### Vitamines (en µM)

panthothénate de Ca	2
biotine	4
acide nicotinique	8,1
pyrodoxine	4,6
thiamine	2,9
cyanocobalamine	0,3
Saccharose (mM)	29,3
Gélose (mg)	8
pH avant autoclave	5,5

## 5.2 Mycorhization des racines transformées

Des racines de carotte (*Daucus carota*) transformées par *Agrobacterium rhizogenes* ont été fournies par Y. Piché (CRBF, Université Laval, Québec, Canada). Elles sont cultivées sur le milieu Strullu et Romand (1986) non modifié (SR). Les mycéliums axéniques sont mis au contact de ces racines transformées sur chacun des milieux M et SRM. Les racines transformées inoculées sont également cultivées à 27° C à l'obscurité.

## 6. RESULTATS

### 6.1 Mise en culture du champignon

Lorsqu'ils sont placés sur le milieu de culture, les fragments racinaires produisent des hyphes aux deux extrémités ( figure 1). Au cours de l'incubation, les cellules racinaires se dégradent et les hyphes mycéliennes passent progressivement d'un mode de développement symbiotique à un mode de développement saprophytique. Seules les hyphes capables de réaliser une assimilation à partir du milieu de culture ont un développement important. En général elles sont portées par des vésicules intraracinaires riches en substances de réserve, essentiellement des lipides qui sont fournis au champignon au démarrage de la croissance. Il convient de noter que des hyphes non portées par des vésicules sont aussi capables de croître vigoureusement.

Pour les deux espèces et sur deux milieux de culture (M et SRM), après deux jours de co-culture, le champignon entre en contact avec la racine. Il se forme ensuite un appressorium; des arbuscules et des vésicules intraracinaires se développent. L'infection intervient à environ 0,5 cm en arrière de l'apex, dans la zone d'élongation racinaire. A ce niveau apparaissent des racines latérales qui sont rapidement infectées permettant ainsi l'extension de la mycorhization. Le mycélium externe s'étend sur l'ensemble du milieu de culture et se différencie en de nombreuses chlamydospores. Les caractéristiques morphologiques *in vitro* des mycéliums de chacune des espèces sont données ci-dessous.

### *Glomus intraradices*

Les spores sont terminales ou subterminales, arrondies, et ont un diamètre moyen de 80  $\mu\text{m}$ . Après 3 mois de culture, on dénombre en moyenne 893 spores sur milieu M et 2085 sur milieu SRM. Les spores apparaissent isolément ou par 2 ou 3 unités, le long des hyphes longues. Elles sont portées par un pédicelle court, mesurant environ 100  $\mu\text{m}$ . La distance entre chaque spore varie de 63  $\mu\text{m}$  à 134  $\mu\text{m}$  (Figure 2). Les hyphes produisent aussi un mycélium rayonnant constitué d'hyphes fines et courtes enchevêtrées de façon lâche (Figure 3).

### *Glomus versiforme*.

Les spores de cette espèce sont également terminales ou subterminales et arrondies; leur diamètre moyen est de 65  $\mu\text{m}$ . Après 3 mois de culture, on dénombre 2065 spores par boîte sur le milieu M et 7350 sur le milieu SRM. Les spores se forment par petits groupes de 3 à 5 unités le long des hyphes longues (Figure 4). Elles sont portées par un pédicelle court mesurant environ 100  $\mu\text{m}$ . La distance moyenne entre chaque ensemble de spores varie de 36 à 85  $\mu\text{m}$  en moyenne. *Glomus versiforme* constitue aussi de petites masses mycéliennes d'hyphes courtes et rayonnantes, finement enchevêtrées (Figures 5, 6).

## 6.2 Subcultures

A partir d'un mois de culture, les hyphes de *Glomus intraradices* et de *G. versiforme* occupent toute la boîte de Petri. Au bout de 3 mois, un feutrage blanc représentant le mycélium et de nombreuses spores sont visibles à l'oeil nu. Des fragments de racines de 0,5 cm de longueur portant du mycélium sont placés à proximité de jeunes cultures de racines de carotte sur un milieu SRM. Dans la pratique 10 subcultures sont réalisées avec un taux de réussite de 100 pour cent de transmission de la mycorhization (densité mycélienne et nombre de spores produites) aux nouvelles cultures. Ces cultures évoluent de la même façon que les précédentes lorsqu'elles sont placées à 27 °C à l'obscurité. La technique mise au point offre donc des taux de multiplication permettant d'entretenir des collections.



**Figure 1 : Germination d'un fragment mycorhizien**

Les hyphes sont émis en majorité à partir de vésicules internes et sortent au niveau des blessures racinaires.

barre = 500  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2 : Disposition des spores de *G. intraradices* sur un hyphe principal.**

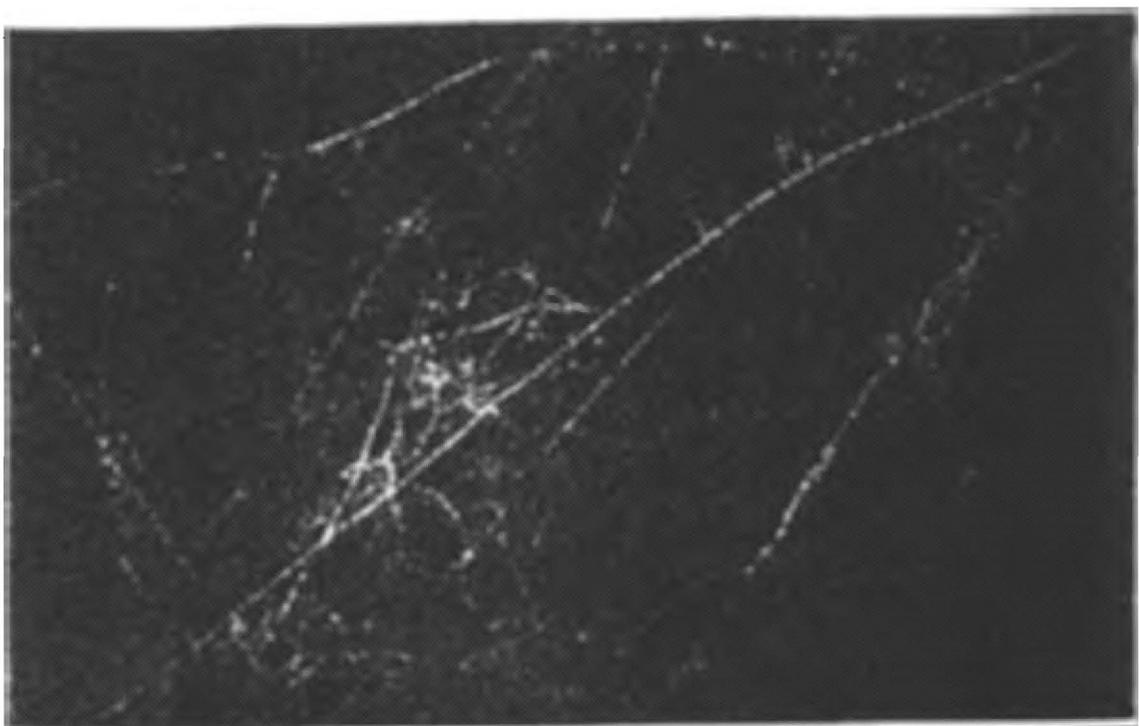
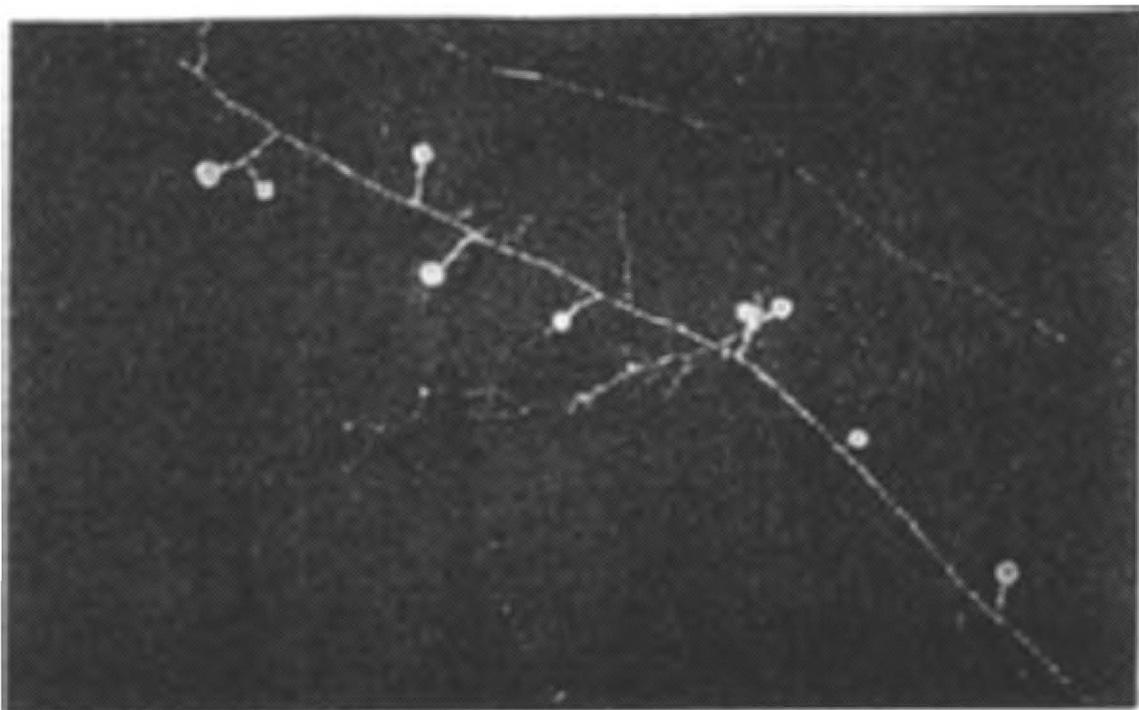
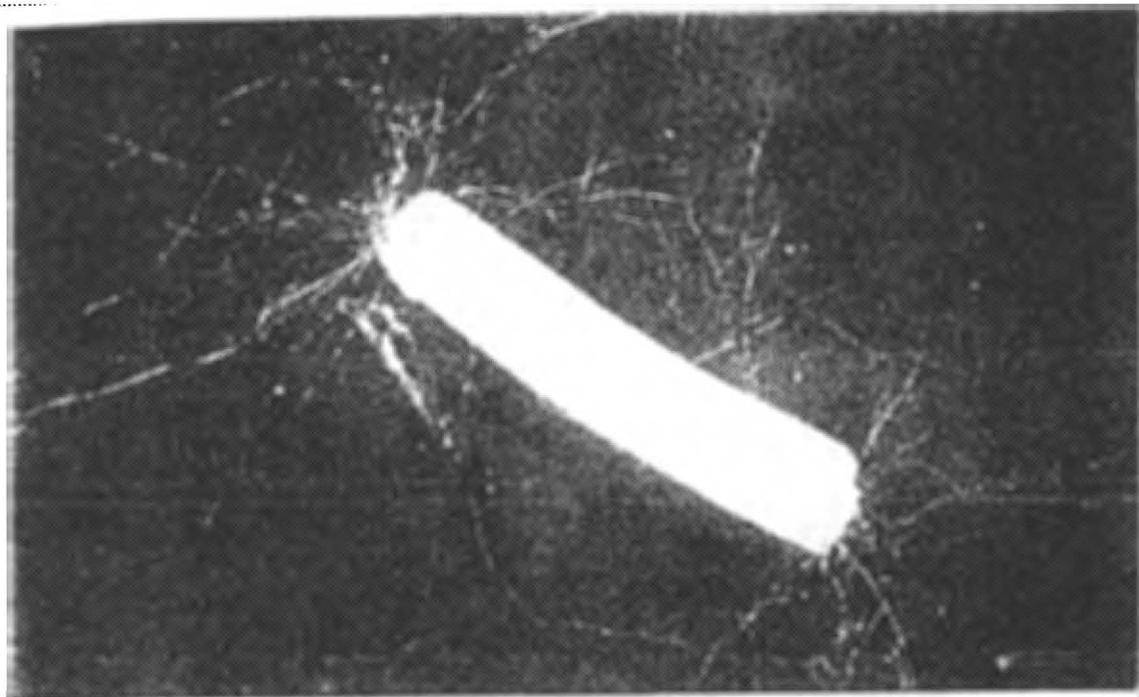
Les spores apparaissent dès les premiers jours de culture et sont terminales ou intercallaires.

barre = 400  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3 : Détail des thalles de *G. intraradices*.**

Peu de spores sont généralement formées dans ces structures.

barre = 500  $\mu\text{m}$ .



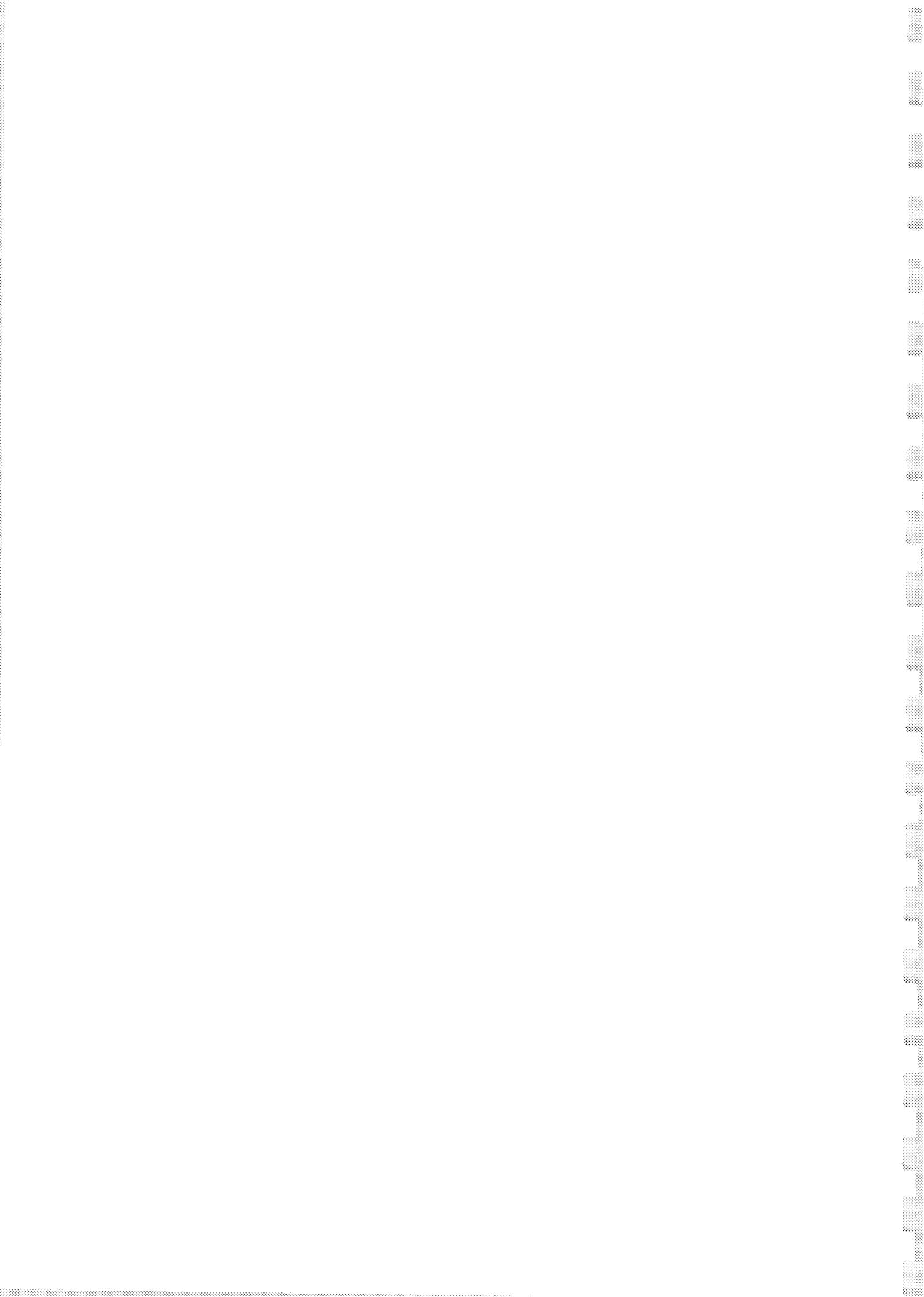




Figure 4 : Développement mycélien et sporulation de *G. versiforme*  
après 2 mois de culture en association avec des racines  
transformées de carotte

barre = 1 mm.

Figure 5 : Disposition des spores de *G. versiforme*

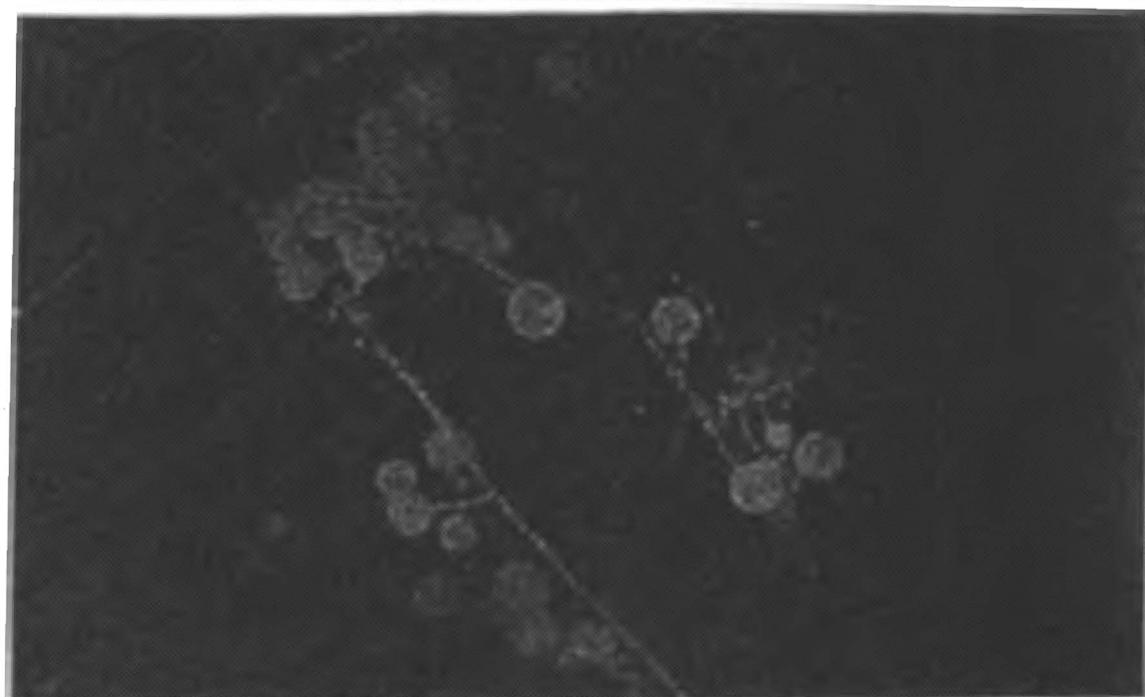
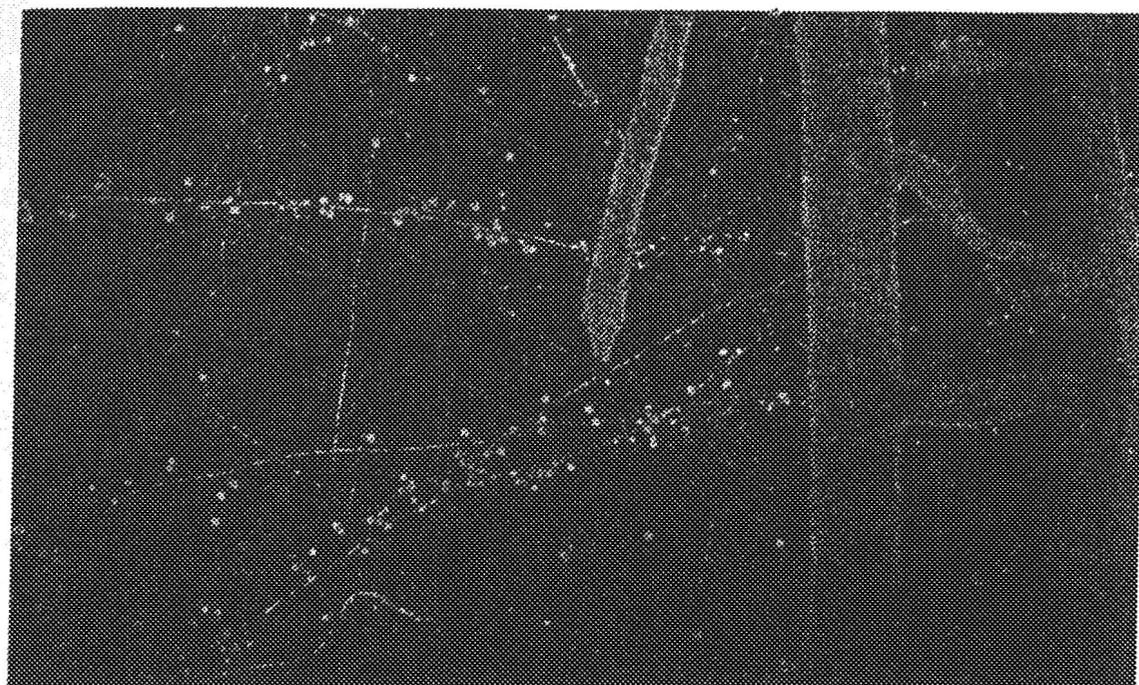
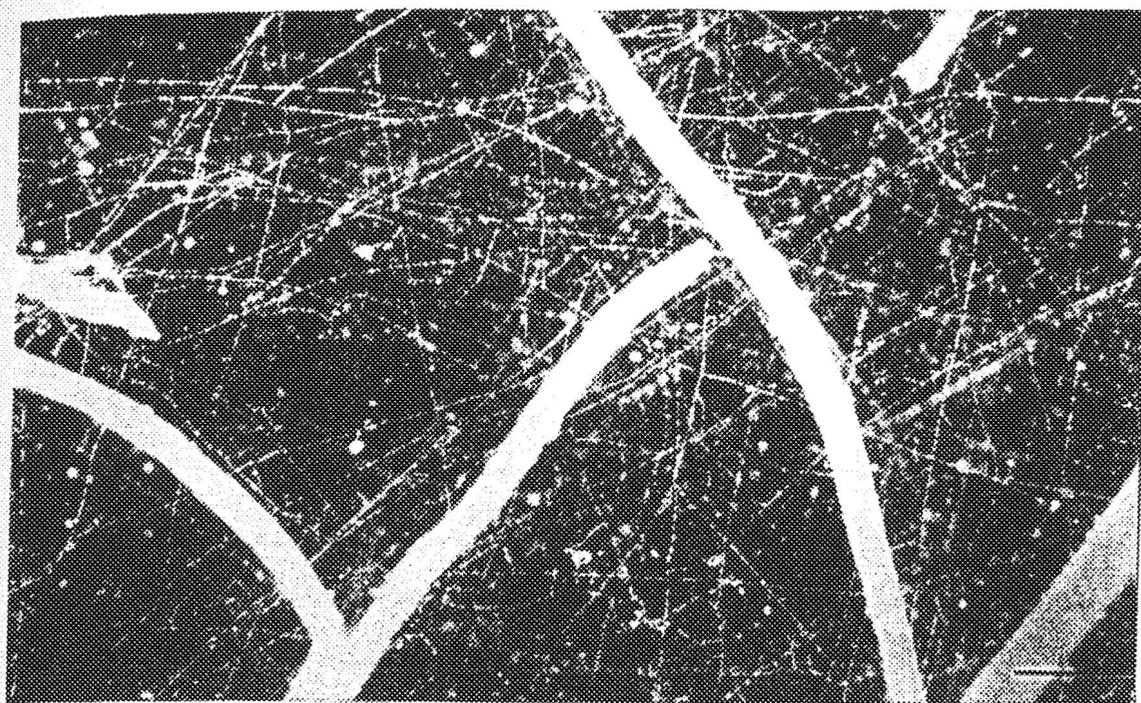
Les spores sont très rapprochées sur les hyphes principales

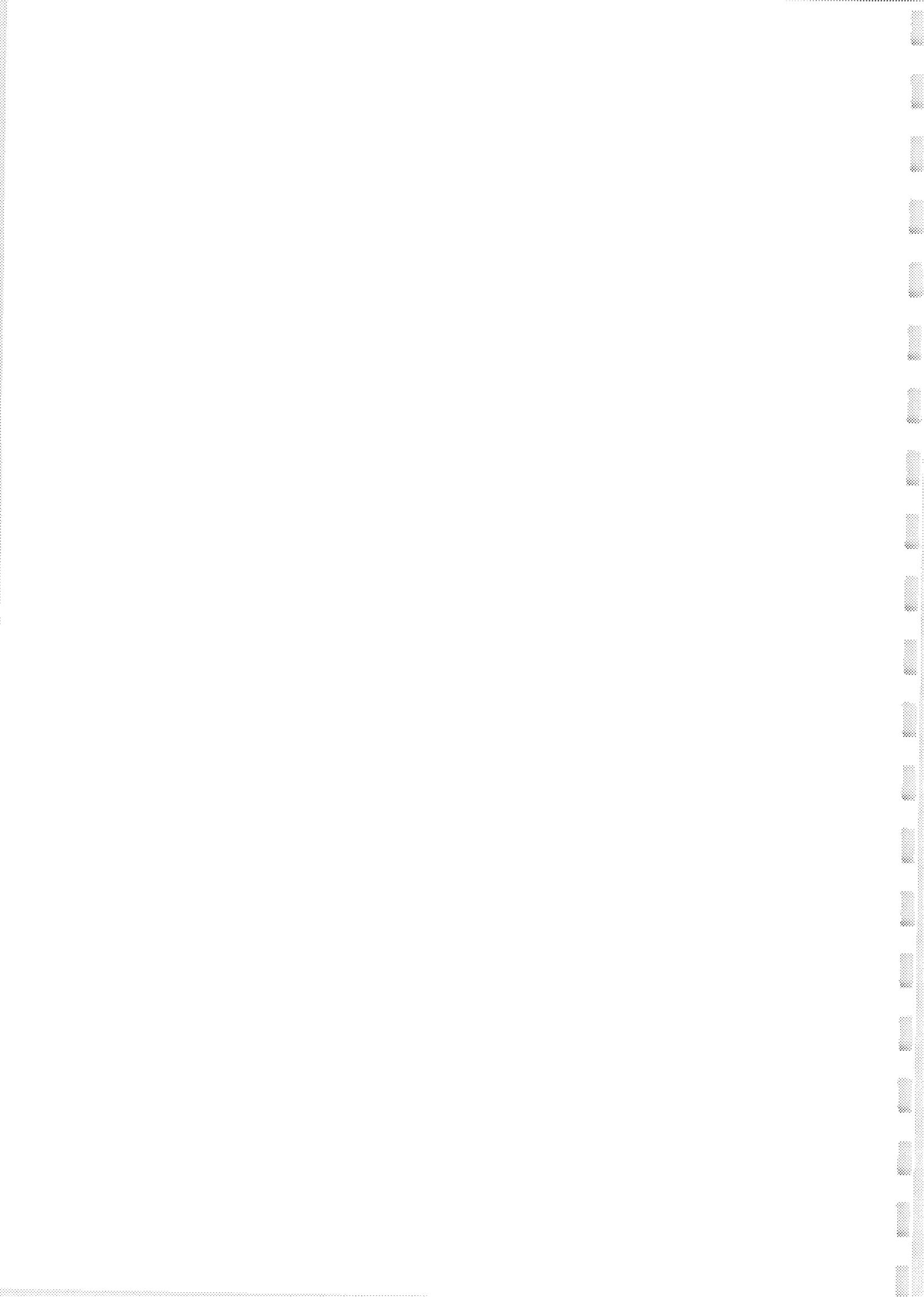
barre = 1 mm.

Figure 6 : Détail des spores de *G. versiforme*

Les spores sont formées en majorité dans le thalle

barre = 200  $\mu$ m.





## 7. DISCUSSION ET CONCLUSION

### 7.1 Importance de l'inoculum fongique

A priori, chaque genre de champignon mycorhizien possède des propagules favorables à sa culture *in vitro* continue; comme pour résoudre les problèmes liés à la culture *in vitro* des plantes supérieures il convient de rechercher l'explant le plus réactif. Mosse et Hepper (1975) et de nombreux autres auteurs ont réalisé leurs expériences sur des chlamydospores; Bécard et Fortin (1988) démarrent leurs cultures avec des azygospores de *Gigaspora margarita*. Les filaments issus de ces propagules, en l'absence de racines, ont un développement limité malgré le grand nombre de milieux de culture testés. L'étude des facteurs physiologiques (Gianinazzi-Pearson et al., 1989, Bécard et Piché, 1989) ou génétiques (Burggraaf et Beringer, 1989; Bianciotto et Bonfante, 1993; Bécard et Pfeffer, 1993) n'ont pas permis d'expliquer le manque de croissance des mycéliums d'origine sporale. Différentes substances (composés volatiles, flavonoïdes) permettent cependant d'améliorer la croissance des filaments obtenus. La plénitude de la croissance ne sera atteinte qu'après l'association à la racine et l'établissement de la symbiose.

La forme intraracinaire est ensuite capable de croître de façon très importante, tant dans le milieu naturel que dans les conditions de culture *in vitro* détaillées dans cette Note. Au cours de l'incubation des fragments de racines mycorhizées, la technique permet d'isoler les éléments fongiques capables de produire un véritable thalle qui est l'équivalent du réseau extramatriciel. Il est bien connu que ce réseau peut progresser sur plusieurs dizaines de centimètres autour de la racine. En présence de la racine, grâce à des échanges symbiotiques, le champignon optimise son développement. En raison de sa progression centrifuge, ce mycélium devient rapidement indépendant de la racine et croît en saprophyte. *In vitro*, sur milieu SRM la forme intraracinaire croît de 9 mm par jour en moyenne pour les 2 espèces étudiées et produit plusieurs milliers de spores végétatives aptes à former de nouvelles mycorhizes.

## 7.2 Cycle des *Glomus*

Le cycle des Zygomycètes formant des mycorhizes est inconnu à ce jour. La figure 7 représente une première proposition de cycle des *Glomus*. Les espèces possèdent des chlamydospores végétatives, organes de résistance à parois épaisses et capables de germer en donnant un promycélium (1). Pour poursuivre son développement ce promycélium doit entrer en contact avec une racine (c); il se développe alors un appressorium (2) qui colonise la racine et il donne des arbuscules (3). La forme intraracinaire (Fi) est mise en place; ce mycélium progresse entre les cellules corticales et se renfle en vésicules. Ces vésicules caractéristiques sont à l'origine de l'appellation mycorhizes à vésicules et arbuscules. La mycorhize constituée produit un réseau extramatriciel décrit par de nombreux auteurs et qui est à l'origine des chlamydospores. Après leur maturation (M), ces spores sont libérées dans le sol (5); en germant, elles seront à l'origine du promycélium de départ (1).

Lors de la sénescence de la racine ou simplement des tissus corticaux, les vésicules sont libérées dans le sol; elles se développent en saprophyte (S), ce qui explique les résultats obtenus dans cette Note. La croissance importante du mycélium se poursuit aussi dans les conditions naturelles par la constitution du réseau extramatriciel représentant le thalle (T). Ce thalle possède des capacités d'assimilation et de croissance. *In vitro*, il s'agit d'exploiter cette caractéristique en fournissant, grâce aux milieux de culture, des conditions favorables à la nutrition des cellules fongiques. La multiplication végétative est alors réalisée grâce à des chlamydospores (4). Après maturation (M) et libération, les chlamydospores (5) redeviennent aptes à réinfecter les racines en produisant un promycélium (1).

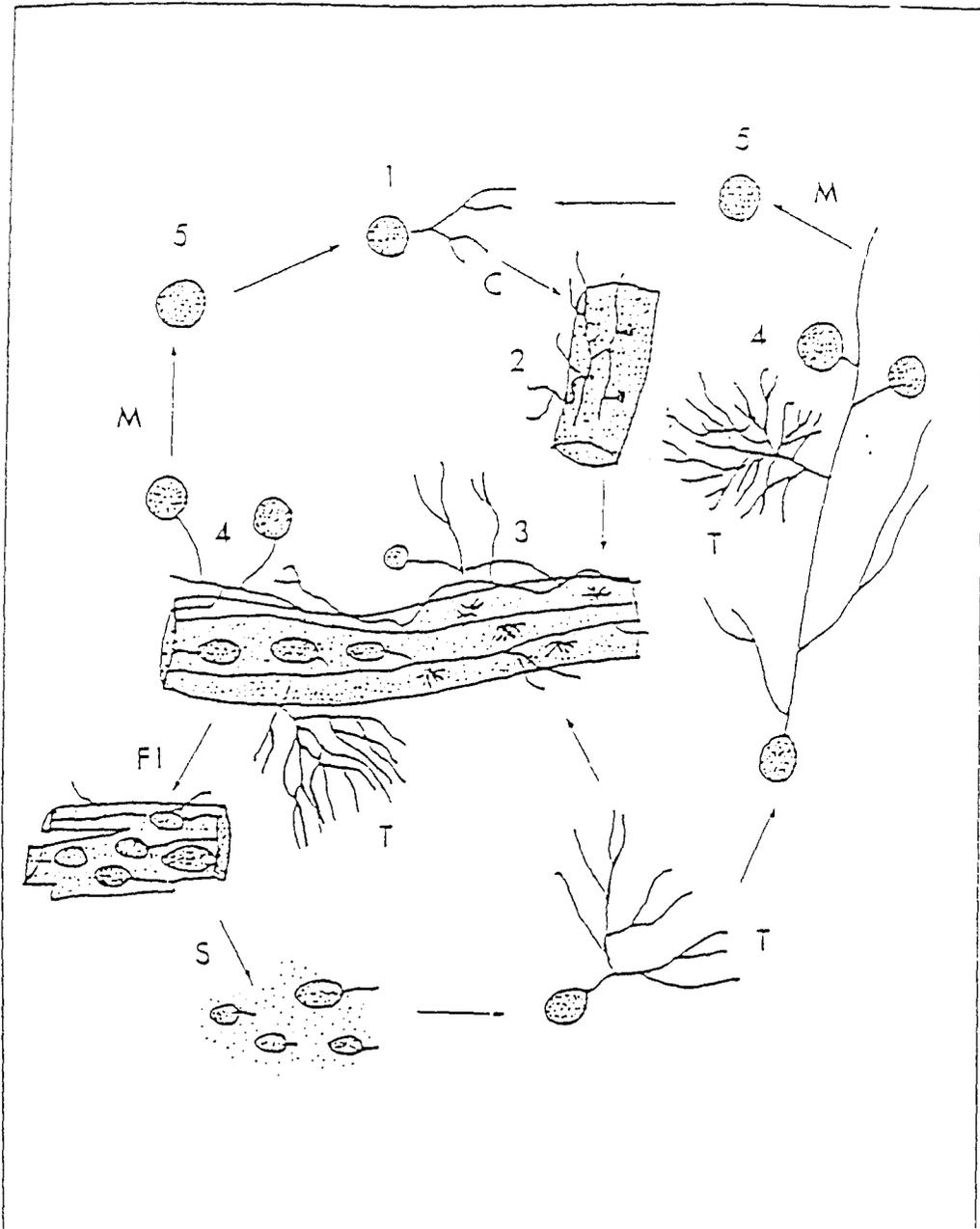


Figure 7 : Cycle de développement des *Glomus*

1 à 5 : stades de développement ; C : contact racinaire ; Fi : forme intraracinaire ;  
M : maturation sporale ; S : phase saprophytique ; T : thalle

Ainsi la forme intraracinaire de *Glomus* peut être cultivée *in vitro*. Les hyphes obtenues ont une croissance rapide et produisent de nombreuses spores. La technique aboutit à la culture continue *in vitro* de *Glomus* en raison du fait que la forme intraracinaire donne naissance à un thalle représentant le réseau extramatriciel qui devient rapidement saprophytique; lorsque les hyphes ne sont plus reliées à la racine de départ où s'est installé le promycélium produit par la chlamydospore. En effectuant des réinoculations périodiques tous les 3 mois, il est possible de conserver les souches *in vitro* dans des banques. Des expériences en cours ont pour but d'évaluer les qualités du matériel produit par les différentes subcultures. Dans l'attente de ces résultats, les souches sont annuellement réinstallées sur des plantes hôtes *in vitro* pour éviter des pertes du pouvoir infectieux *in vitro*, comme ceci est connu pour les champignons pathogènes par exemple. Le développement des méthodes d'identification moléculaire permettra de caractériser de façon plus précise les souches isolées et cultivées à partir de la forme intraracinaire. Actuellement *Glomus intraradices* et *Glomus versiforme* sont disponibles; d'autres souches de VAM colonisant les Acacias du Sahel sont également engagés dans les protocoles de culture continue *in vitro*.

**CHAPITRE IV**

**EFFICACITE *IN VIVO* DES  
PROPAGULES MVA OBTENUES  
EN CULTURE *IN VITRO***

**IN VIVO EVALUATION OF INOCULUM POTENTIALS OF  
A VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS  
PRODUCED IN AXENIC CONDITIONS.**

DIOP TA, DECLERCK S, STRULLU DG, PLENCHETTE C

Plant and Soil, 1995, soumis

**1. RESUME**

La méthode du "most probable number" (MPN) a été utilisée pour évaluer la densité des propagules efficaces de deux cultures de *Glomus versiforme* (Karsten) Berch obtenues en association avec des racines transformées de carotte. L'utilisation des séries de dilution au demi et d'un partenaire végétal sous des conditions standardisées ont permis d'obtenir une importante production de propagules efficaces après 6 semaines. Cependant pour chaque type d'inoculum axénique, il n'y a pas eu de différences significatives de la quantité de propagules efficaces *in vivo*.

**2. ABSTRACT**

The most probable number (MPN) method was used to assess the effective inoculum density of two generations of *Glomus versiforme* (Karsten) Berch produced in association with Ri T-DNA transformed carrot roots. The twofold dilution series and the the use of a host plant under optimal growing conditions, resulted in an important production of infective propagules with both inoculum source after six weeks. However, for a given axenic inoculum, the *in vivo* infective inoculum potentials did not differ significantly in the two generations of *G. versiforme*.

**Key words:** Continuous culture, MPN, VAM, Ri T-DNA transformed carrot root, *in vitro*

### 3. INTRODUCTION

Root organ culture systems have good capacity in obtaining typical vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) colonization with almost all propagules of the obligate biotrophic fungi (Mosse and Hepper, 1975; Strullu and Romand, 1986; 1987; Bécard and Fortin, 1988). The reproducibility of these systems has been exploited to define the nutritional requirement of VAM fungi in the precolonization stage (Bécard and Piché, 1989; Simoneau et al., 1994), to follow their life cycle and to obtain an important production of mature spores in short period cultivations (Chabot et al., 1992a, Diop et al., 1992a, 1994a). This high-quality inoculum yield obtained in root organ culture is mostly used for fundamental studies including stimulatory compounds (Bécard et al., 1992; Koide and Shreinder, 1992) or genetic manipulations (Simon et al., 1993; Piché et al., 1993; Simoneau et al., 1994a). Spores produced under axenic conditions germinated well without previous treatments (Diop et al., 1994a,d). Their infectivity on plants growing in *in vivo* conditions have been verified several times (Bécard and Piché, 1992). Recently, Diop et al. (1994a), related promising results on infectivity of the *in vitro* produced propagules of *Glomus spp.* on colonization of *Acacia albida* seedlings cultivated in greenhouse. More than 40 - 80% of acacia root colonization were obtained with isolated spores and VAM root pieces after 1 month without additional nutrient regimes

The comparisons between *in vivo* and *in vitro* systems for production of spores would be very much in favor for the axenic systems (Fortin, personal communication). However, the effectiveness of axenic VAM propagules under adverse environmental conditions remains unclear. The higher and lower limits of axenic inoculum required for colonization must be known before scale use of the contaminant-free culture of VAM fungi.

We report here the *in vivo* performance of two generations (culture and first subculture) of *Glomus versiforme*, produced axenically in continuous culture with Ri-TDNA transformed roots of carrot. The most probable number method (Porter, 1979; Gianinnazi-Pearson, 1985) is used to evaluate which propagule of axenic *Glomus versiforme* (isolated spores and sheared colonized roots) were more enable of initiating colonization with *Allium porrum* seedlings.

## 4. MATERIALS AND METHODS

### 4.1 Axenic continuous culture of *Glomus versiforme*

Surface-sterilized root pieces colonized with *G. versiforme* (Karsten) Berch in association with excised transformed carrot roots gave thousand spores in a very short period (Fig. 1). The establishment of dual cultures was carried out in Petri dishes ( $\varnothing$  9 cm) by placing a 0.5-cm colonized *Allium porrum* root in the vicinity of a Ri T-DNA transformed carrot root. The culture medium was a modified SR medium which contained in mg l<sup>-1</sup> distilled water: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 139; KNO<sub>3</sub>, 76; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.1; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 359; KCl, 65; NaFeEDTA, 8; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 2.45; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.28; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.86; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.22; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.034; thiamine, 0.1; pyrodoxine, 0.3; nicotinic acid, 0.3; cyanocobalamine, 0.1; calcium panthothenate, 0.3; sucrose, 10000 and Bacto-agar 8000. The pH of the medium was adjusted to 5.5 before sterilization at 121°C for 15 min. Plates containing 40 ml of nutrition solution were then incubated horizontally in a inverted position at 27 °C in the dark.

Regular *in vitro* subcultures of newly produced propagules, i.e., isolated spores or 0.5-cm mycorrhizal root with excised transformed carrot roots, using the conditions described above, allowed continuous production of *Glomus versiforme*. In this way, different generations of fungal library of about height thousands spores were obtained. The subcultures did not alter morphology and viability of VAM propagules over one year. Table 1 lists other characteristics of the two generations of *G. versiforme* we used in this study.

### 4.2 Preparation of inoculum dilution

For both generations of *G. versiforme*, spores and VAM roots were carefully isolated by forceps after 3 months of culture. Cluster of spores were separated with needles under a binocular microscope in order to obtain isolated spores. Colonized roots were cut with scissors

into 0.5-cm pieces. To prepare the spores inocula, 750 spores were stirred into 250 ml distilled water. Ten successive levels of a twofold dilutions were then prepared with distilled water as the diluent. Water was subsequently used because of the shaliness of the axenic spore walls. The spore inoculum in each dilution was then divided into 5 equal aliquots and added near the roots of each test plant. For the preparation of VAM root inocula, 540 pieces corresponding to one third of the total root system were mixed in 150 g of sterilized Terra-green (121 °C for 2 h). Ten successive levels of a twofold dilutions were then prepared with the same sterilized substrate as diluent. The soil of each dilution was also divided into 5 equal portions. Terragreen (a calcined clay distributed by oil -dri Chicago, III, USA) was recommended as a standard substrate for VAM inoculum production (Plenchette and Perrin, 1992).

Most probable number assays were conducted at time of inoculation for each inoculum to quantify the number of infective propagules. One week old seedling of *Allium porrum L.* (Var. Bleu de Solaise) were transplanted into plastic multipots (Somapo-Sopirec, Diemeringer, France) containing 15g of terragreen each. The plants were grown in a growth chamber set at 26/24 °C (day/night) with 65% relative humidity, 16 h photoperiod and 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity. Plants were watered with modified SR medium without sucrose at day 10.

### 4.3 Measurements

Six weeks after inoculation, the plants were harvested and the roots were cleared and stained (Phillips and Hayman, 1970). VAM colonization was assessed without regarding to the stage of symbiosis development. Only presence or absence of VAM fungus in roots was counted. The number of infective propagules was approximated by a most probable number (MPN) technique (Porter, 1979) of the colonized versus no-colonized plants. Values for MPN of mycorrhizal propagules in soil samples were determined and statistically analysed using Table VIII 2 of Fisher and Yates (1948) and Table 1 of Cochran (1950).

**Figure 1 : Subculture of *G. versiforme***

*G. versiforme* in association with transformed roots of carrot produced extensive spores and mycelia after 3 months under axenic conditions.

bar = 1mm.

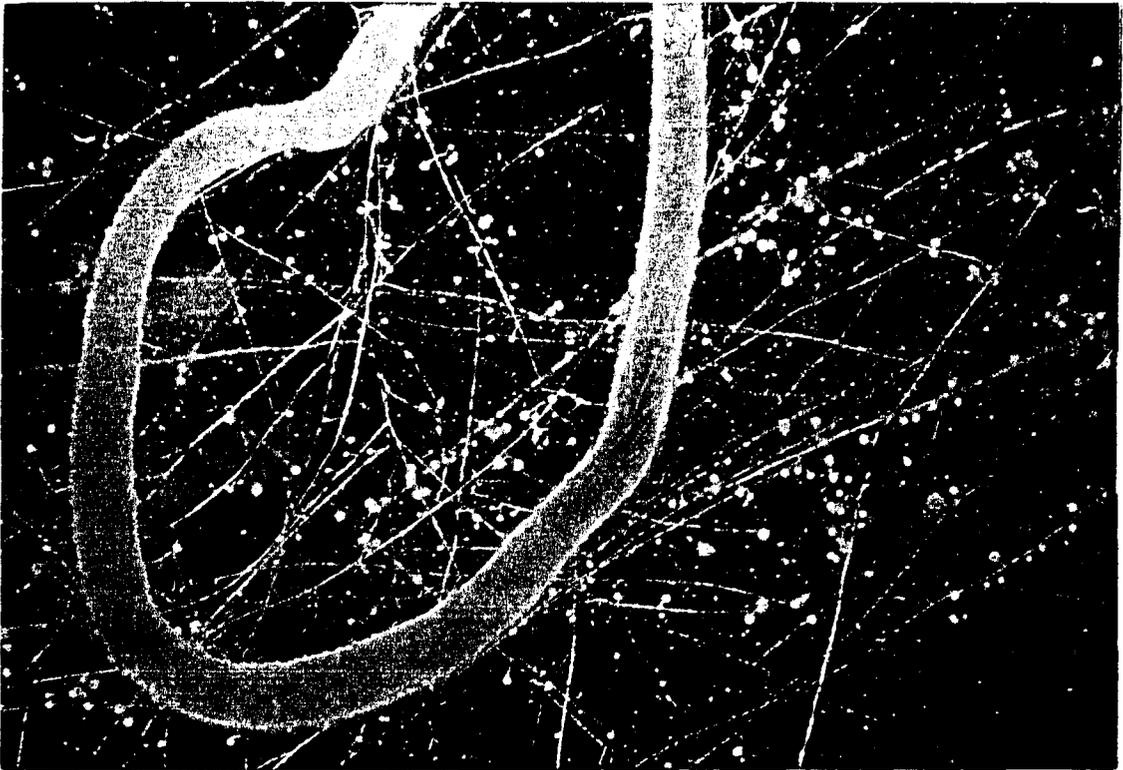


Table 1: Root colonization and *in vitro* germination of two generations of *G. versiforme* after 3 months

	<sup>a</sup> Root colonization (%)	<sup>a</sup> Intensity of root colonization (%)	<sup>b</sup> Germination of axenic spores (%)	<sup>c</sup> Germination of axenic VAM root pieces (%)
1st generation of <i>G. versiforme</i>	93	58	95	90
2nd generation of <i>G. versiforme</i>	90	41	93	75

<sup>a</sup>Percentage and intensity of root colonization were evaluated using the grid intersect method (Giovannetti and Mosse, 1980)

<sup>b</sup>Viability was calculated by testing germinative capacity of spores in groups of 6 on MSR medium during 10 days.

<sup>c</sup>Twenty random VAM root pieces (0.5-cm long) were germinated on MSR medium during 10 days.

## 5. RESULTS AND DISCUSSION

To date, several methods have been used for quantifying inoculum density of VAM fungi (Gerdemann and Nicolson, 1963; Furlan and Fortin, 1975; Giovannetti and Mosse, 1980). The most probable number method originally set up for estimating bacterial densities in water and milk (Prescott et al., 1946; Cochran, 1950) have been adapted with different approaches to quantify VAM inoculum densities (Porter, 1979; Gianinazzi-Pearson et al., 1985; An et al., 1990). The tenfold dilution series has been amply used (Gianinazzi-Pearson et al., 1985; Lesica and Antibus, 1986); however, the twofold dilution series appears more appropriate for the generally low VAM fungal densities recorded in soils (Sanders and Sheikh, 1983; Powell, 1980). The use of the twofold dilution series gives more realistic estimates with high precision than the tenfold dilution ones (Alexander, 1965). However, conflicting results in soils were often advanced because of the lack of relationships between biotic or abiotic factors and VAM propagules densities (Gianinazzi-Pearson et al., 1985).

In this present study, the twofold dilution series was suitable to estimate the infectivity of axenic VAM propagules. For both generations, each VAM inoculum induced typical VAM infections in the roots of the host plant, except at the highest dilution levels where no infections were observed (Table 2). In general, the proportion of positive responses decreased with increasing dilution levels, irrespective of inoculum source and generations of *G. versiforme* (Table 2). Different patterns of mycorrhizal development were observed with each inoculum after 6 weeks. However, VAM symbiosis with typical infections, was more regularly noted with inoculum from the first generation of *G. versiforme*. Histological examination of root system showed arbuscles and vesicles. This suggests that axenic VAM propagules have excellent *in vivo* aggressiveness as already described (Diop et al., 1994a). Under axenic conditions, root organ culture system produced regularly eight thousands mature spores and numerous infection units. The density of infected propagules estimated by the MPN method varied according to the generations of VAM fungus and the inoculum source. For the culture of *G. versiforme*, about 78 and 49% of infective propagules were respectively produced with spores and sheared VAM roots (Table 2).

Table 2: Most probable number (MPN) estimates of axenic inoculum of *G. versiforme*

Generations of <i>G. versiforme</i>	Number of VAM propagules tested		Proportion of aliquots showing infection at indicated dilution										MPN	Confidence limit (95%)	infectivity (%)
	spores	VAM roots	undiluted	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512			
First generation	750	-	5	5	5	5	5	4	3	1	1	0	588	316 - 1094	78.0
	-	540	5	5	5	4	5	4	2	0	0	0	263	141 - 489	49.0
Second generation	750	-	5	5	5	5	4	3	1	1	0	0	285	153 - 530	38.0
	-	540	5	5	5	5	4	3	1	0	0	0	198	106 - 368	37.0

The different inoculum source of the first subculture of *G. versiforme* gave the same proportions of infective propagules estimated at 38 % for VAM spores at 37 % for VAM roots. However, the 95 % confidence interval showed that inoculum source of the two generations of *G. versiforme*, estimated a wide range of infective propagules (Table 2). Thus, the results indicated that the *in vivo* inoculum potential of axenic spores and VAM roots could respectively reach about 6300 and 800 propagules for the primary culture of *G. versiforme* and about 3050 and 600 for the subculture of *G. versiforme* in a single Petri dish. Considering the high germinative capacity of all VAM propagules in *in vitro* conditions (Table 1), we think that the different responses obtained could be due to method of inoculation. Unlike spores, sheared VAM roots were randomly mixed throughout the soil samples, and this decreased inoculum number near the rooting zone in addition to a possible physical damage of some infection units. For more accuracy, encapsulation of axenic VAM propagules could give a way to solve inoculation problems. The entrapment of VAM propagules in alginate beads preserve their physiological properties and stabilize their infectivity (Strullu and Plenchette, 1991).

For each inoculum source, infective propagules fluctuated with generations of VAM fungus. This indicated that this method of continuous culture of VAM fungi, showed other physiological aspects on the biotrophic mode of VAM fungi. As a standard substrate and highly mycotrophic test plant were used in this study, we think that *in vitro* propagules induce different physiological stimuli responsible of their *in vivo* aggressiveness despite the increase of fungal biomass noted in new generations of VAM fungus.

In conclusion, this study is the first report of an adaptation of the MPN technique on axenic VAM propagules. Promising results were obtained using two generations of *G. versiforme*. However, before large scale practical use of axenic VAM fungi, further studies with other bioassay such as mycorrhizal soil infectivity (MSI) method (Plenchette et al., 1989) and mycorrhizal inoculum potential (Sieverding, 1991) must take into consideration. The important production of axenic *Glomus sp.* associated with Ri T-DNA transformed carrot roots in a very short period, allow several types of strategies to understand their infectivity and their effectiveness.

**CHAPITRE V**

**CULTURE ET CARACTERISATION DES  
CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS  
A VESICULES ET ARBUSCULES  
D'ACACIA ALBIDA**

## I. CULTURE DES ISOLATS MVA D'*ACACIA ALBIDA*

Les différents isolats MVA récoltés dans les différentes localités du Sénégal (Figure 1) et suivant les conditions décrites au chapitre 1, sont multipliés en serre en association avec des semis de poireaux (*Allium porum L.*) et d'*Acacia albida*. La culture a été réalisée dans des pots en plastique contenant du Terragreen stérilisé (121 °C pendant 1h). A la plantation, de l'engrais osmocote (18N - 6P -12K) est ajouté dans chaque pot. Les semis sont arrosés régulièrement avec de l'eau distillée et des traitements phytosanitaires sont effectués au besoin. Le dispositif est placé en serre avec une photopériode de 16h et une température de 24 °C. Au bout de 6 mois de culture, les racines des plantes hôtes sont bien colonisées par les différents isolats MVA (% d'infection supérieur à 50% dans tous les pots). Par tamisage humide, les spores sont récoltées dans des tamis (500 µm - 50 µm) et conservées au froid.

Des cultures monosporales des isolats MVA les plus représentatifs sont réalisées dans des petits godets (Somapo - Sopirec, Diemerling, France) contenant aussi du Terragreen stérile avec le poireau comme plante piège. Les plantes sont cultivées en chambre de culture suivant les conditions suivantes : photopériode de 12 h avec une température de 27 °C le jour et 24 °C la nuit et une humidité relative de 70%.

Après 6 mois de culture, les spores sont récoltées par tamisage humide. Les spores issues de cette culture monosporale sont caractérisées par les critères morphologiques.

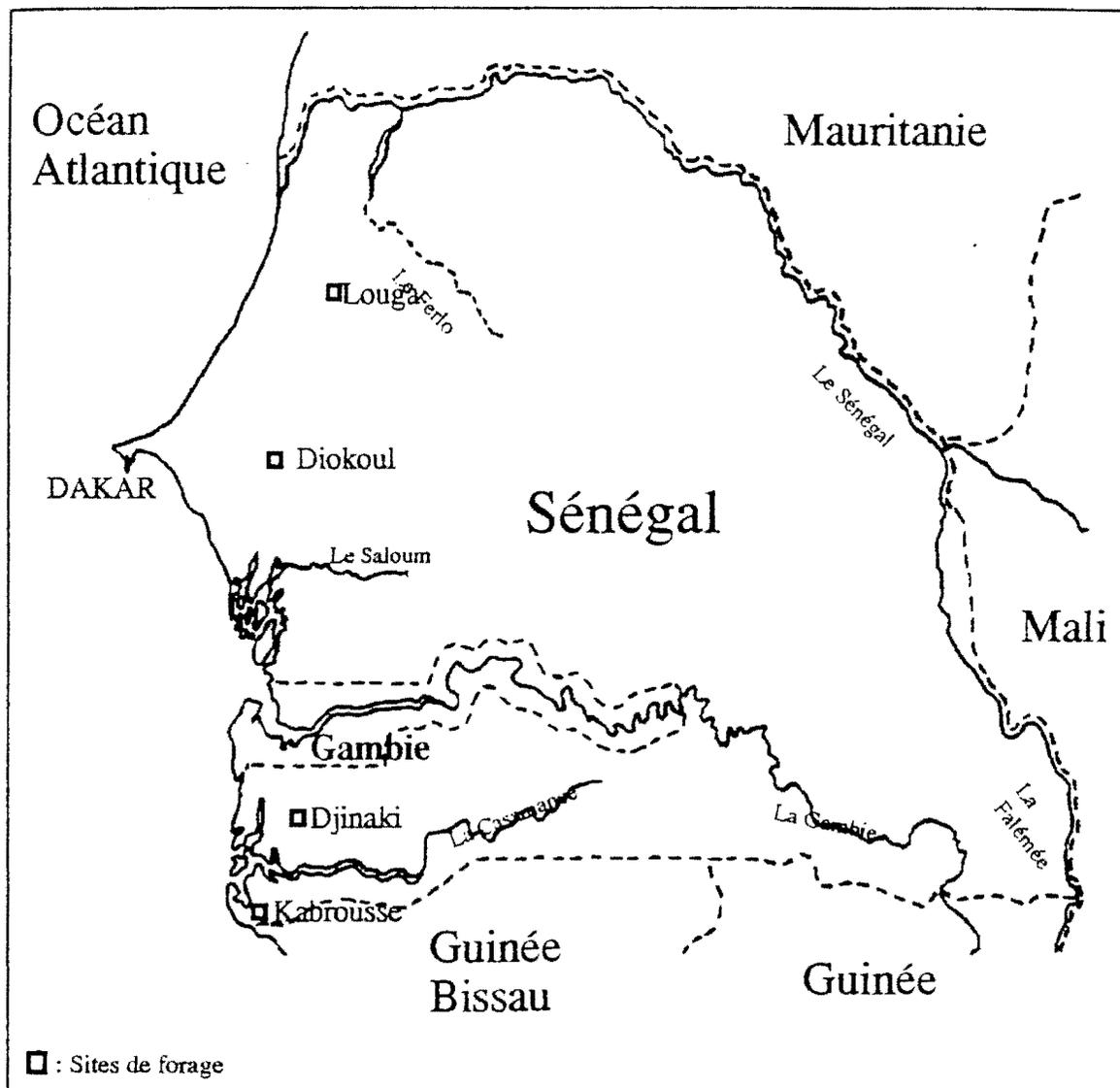


Figure 1 : Localisation des sites de prélèvement des champignons MVA

## II. IDENTIFICATION PAR DES CRITERES MORPHOLOGIQUES

Cette partie a été réalisée avec la collaboration de Yolande DALPE (CRTRB, Agriculture Canada, Ottawa).

Les critères morphologiques (couleur des spores ou sporocarpes, taille et nombre de membranes des spores, rattachement de l'hyphe etc...) sont utilisés pour étudier la diversité des souches MVA de surface et de profondeur des différentes régions écoclimatiques du Sénégal.

La méthode utilisée pour la description des champignons MVA d'*A. albida* comporte les étapes suivantes :

- 1 - Isolement des spores avec des pinces fines (Dumoxel # 5, A. Dumont & fils Suisse)
- 2 - Montage sous lamelles dans le milieu lactoglycerol de polyvinyle (LGPV) de Bolland et Heather (1979).
- 3 - Colorations avec le réatif de Melzer ou avec le Bleu Cotton dans du lactophenol. Le réatif de Melzer met en évidence les composés amyloïdes. Le bleu Cotton colore en bleu la paroi externe des spores qui est souvent hyaline et donc difficile à discerner.

Les spores sont déposées sur une lame microscopique dans une goutte de colorant. Après 3-4 minutes, on aspire l'excès de colorant et on monte dans le LGPV.

- 4 - Observation des spores à 400X et 1000X avec le microscope à contraste interférentiel (DIC) et le microscope lumière optique sans prisme.

5 - Sous le microscope, on mesure les diamètres d'une cinquantaine de spores, on note la couleur, l'épaisseur de la paroi, le nombre de couches qui forment la paroi, la dimension des hyphes suspenseurs, leur diamètre, leur mode d'attachement, l'épaisseur des parois de l'hyphe suspenseur, quelquefois les ornements des spores. Il est aussi utile d'observer des spores jeunes autant que matures pour arriver à détecter l'ensemble des parties qui forment la paroi totale.

6 - Lorsque ces données sont accumulées, on détermine facilement le genre ; quant aux espèces, les clés d'identification sont pratiquement inexistantes. Une clé basée sur la morphologie pariétale (Dalpé et al., en préparation) permet cependant de classer certaines espèces.

L'identification proprement dite se fait en consultant les descriptions originales des espèces MVA connues à ce jour. Leur compilation a été faite par Berch (1988) et par Schenk, (1990).

Différentes espèces de champignons MVA appartenant à l'ordre des Glomales (Morton et Benny, 1990) ont été identifiées. Le tableau 1 donne une fiche descriptive et les figures 2 à 5 montrent les caractères morphologiques des différentes souches. Le tableau 2 présente la collection de souches entretenues *in vivo* à l'Université d'Angers.

Tableau 1 : Fiche descriptive et localisation des champignons MVA du Sahel

Champignons MVA	Caractéristiques	Origines
<i>Glomus mosseae</i>	Sporocarpes contenant 10-20 spores entourées d'un périidium jaune et épais. Les spores sont dorées à foncées ou jaune pales	Diokoul 0,15 Kabrouse 1, 50 m
<i>Glomus caledonium</i>	Spores isolées et sporocarpes en majorité Sporocarpes formées de 10-25 spores entourées d'un périidium cotonneux blanchâtre Les spores ont nettement une paroi externe hyaline facilement séparable de la paroi principale	Diokoul 16,50 m Djinaki 0,15 m Louga 0, 15 m Djinaki 4,50 m
<i>Glomus fasciculatum</i>	Spores isolées reliées par des filaments, jaune dorés Trois parois dont l'intérieur membranaire plus facilement détectable sous coloration au Melzer	Louga 0, 15 m Louga 34 m
<i>Glomus aggregatum</i>	Spores isolées rattachées par un filament, jaune pales à dorées, souvent difformes, tuberculeuses	Kabrouse 0, 15m Djinaki 4,50 m Louga 0, 15 m
<i>Gigaspora margarita</i>	Grosses spores isolées toutes colorées en rose La coloration est due à une contamination par une bactérie et elle n'entraîne pas une baisse de viabilité	Louga 34 m

Tableau 2 : Principales souches MVA mises en collection *in vivo*

Références	Origines
<i>G. mosseae</i> UAORS 120	Diokoul 0,15 m
<i>G. caledonium</i> UAORS 121	Diokoul 16,50 m
<i>G. caledonium</i> UAORS 122	Louga 0,15 m
<i>G. fasciculatum</i> UAORS 123	Louga 0,15 m
<i>Gi. margarita</i> UAORS 124	Louga 34 m
<i>G. aggregatum</i> UAORS 125	Kabrousse 0,15 m
<i>G. mosseae</i> UAORS 126	Kabrousse 1,5 m
<i>G. caledonium</i> UAORS 127	Djinaki 0,15 m
<i>G. aggregatum</i> UAORS 128	Djinaki 4,5 m
<i>G. caledonium</i> UAORS 129	Djinaki 4,5 m
<i>G. caledonium</i> UAORS 130	Louga 0,15 m
<i>G. aggregatum</i> UAORS 131	Djinaki 4,5 m
<i>G. aggregatum</i> UAORS 132	Louga 0,15 m
<i>G. fasciculatum</i> UAORS 133	Louga 34 m
<i>G. caledonium</i> UAORS 134	Kabrousse 0,15 m
<i>G. intraradices</i> UAORS 135	Dijon, France
<i>G. versiforme</i> UAORS 136	Québec, Canada

Figure 2 : Caractères morphologiques de *Glomus mosseae*

A : Très jeune spore avec un hyphes en entonnoir caractéristique

barre = 25  $\mu$ m.

B : Spore avec hyphes ramifié. Noter la présence de gouttelettes lipidiques internes

barre = 25  $\mu$ m.

C : Deux hyphes de germination à travers les 2 épaisseurs de la paroi

barre = 25  $\mu$ m.

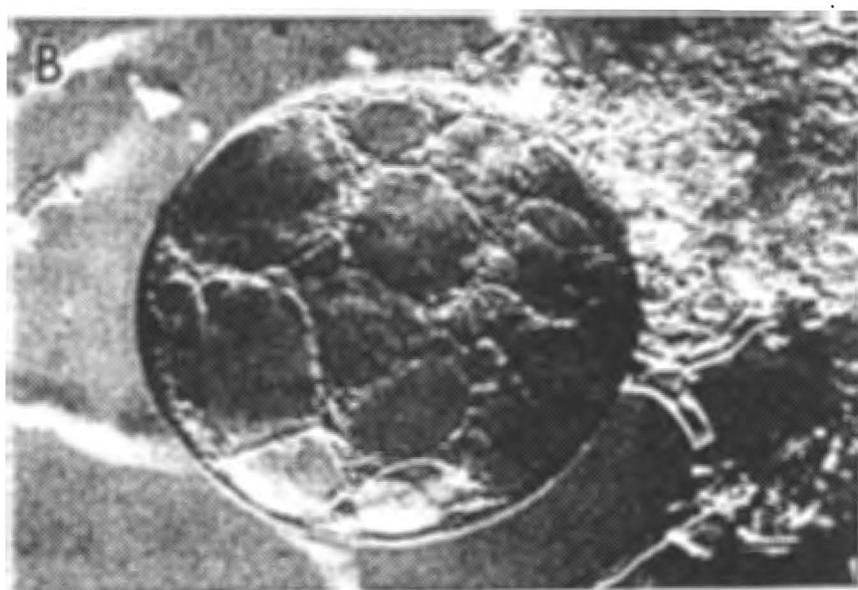
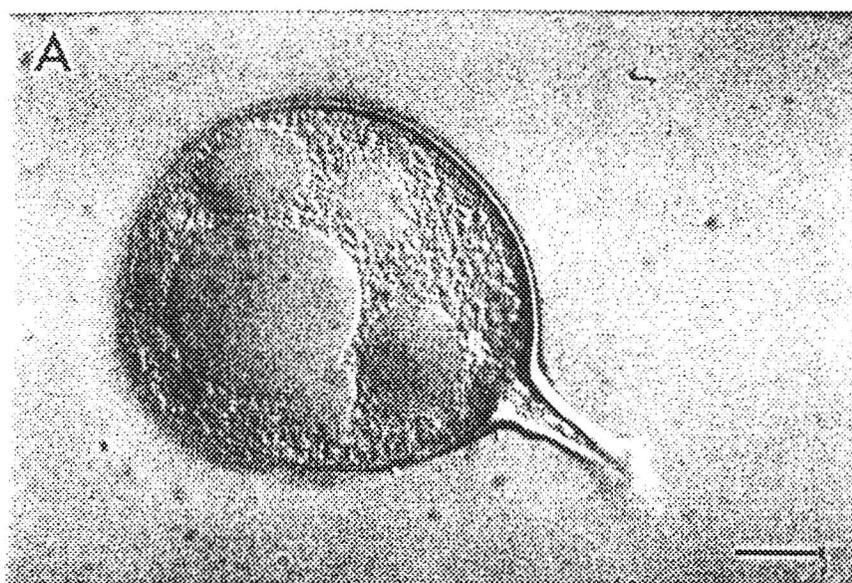


Figure 3 : Spore intacte de *G. fasciculatum*

Les caractères pariétaux sont difficiles à détecter

barre = 45  $\mu\text{m}$ .

Figure 4 : Caractères morphologiques de *Gigaspora margarita*

A : Spores écrasées, hyphe bulbeux

barre = 85  $\mu\text{m}$ .

B : Détail de la paroi externe et de la paroi laminée

barre = 85  $\mu\text{m}$ .

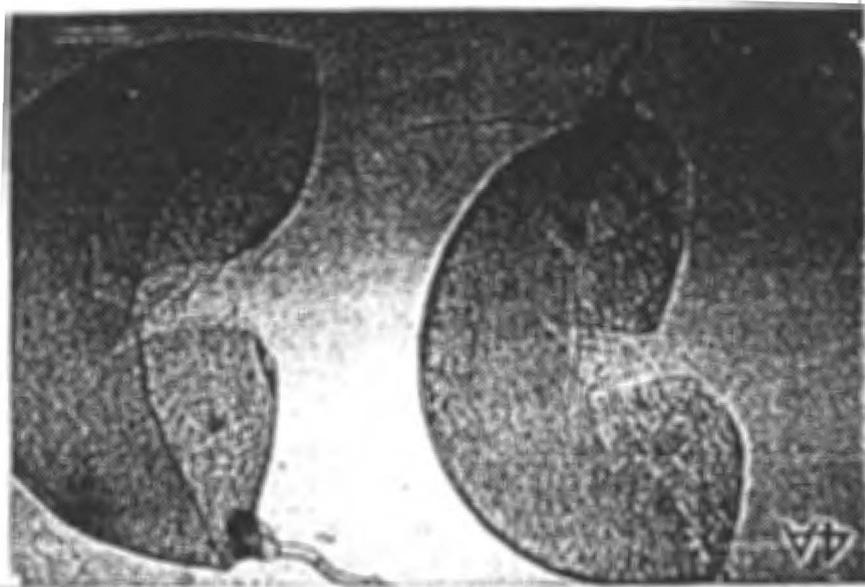
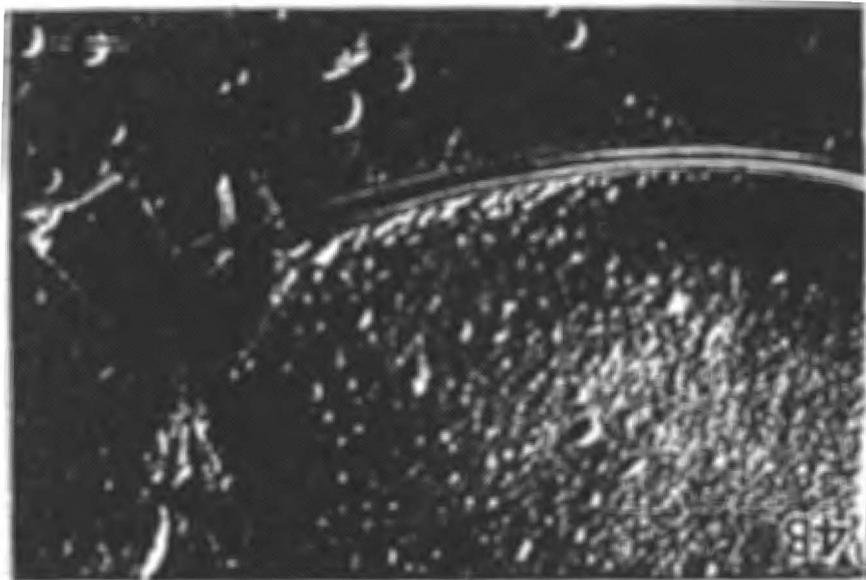


Figure 5 : Caractères morphologiques de *Glomus caledonium*

A : Jeune spore avec deux parois visibles

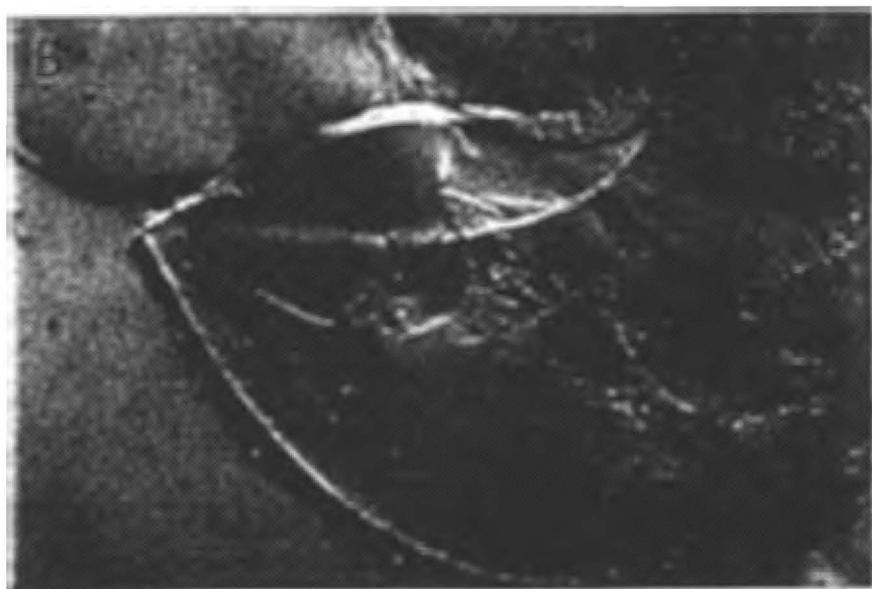
barre = 300  $\mu\text{m}$

B : Vieille spore avec deux parois visibles

barre = 300  $\mu\text{m}$ .

C : Parois séparées lors de l'écrasement (paroi externe hyaline et paroi interne laminée)

barre = 300  $\mu\text{m}$ .



### III. CULTURE *IN VITRO* DES ISOLATS MVA D'*ACACIA ALBIDA*

#### 1. PREPARATION DE L'INOCULUM FONGIQUE

Les méthodes de culture axéniques décrites au chapitre III sont appliquées aux différents isolats MVA d'*A. albida* cultivés selon le protocole décrit au chapitre V. I. Les propagules utilisées sont soit des spores isolées ou des sporocarpes, soit la forme intraracinaire des *Glomus* à savoir des vésicules isolées et des fragments mycorhiziens de 0,5 cm de long issues de cultures monosporales. La désinfection superficielle de la forme intraracinaire et des sporocarpes se fait suivant la méthode décrite au chapitre III. I et III. II, et l'extraction des vésicules se fait sous la hôte en dilacérant délicatement les cellules des fragments mycorhiziens avec des aiguilles fines stériles. Les spores isolées sont stérilisées suivant la méthode de Bécard et Fortin, (1988).

Après stérilisation, la germination des propagules disposées sur des membranes découpées et stériles de cellophane, est réalisée sur des milieux gélosés (0,8 % Bacto-agar Difco) à l'obscurité et à 27 °C.

#### 2. PLANTES HOTES

Les racines isolées transformées de carotte et non transformées de tomate sont utilisées comme partenaire végétal. L'entretien de ces racines se fait à l'obscurité par des subcultures régulières des parties apicales dans le milieu de Strullu et Romand, (1986).

#### 3. MYCORHIZATION

L'établissement de la mycorhization se fait en inoculant de façon dirigée une propagule prégermée à côté d'une racine isolée d'environ 7 cm de long avec quelques ramifications latérales. La culture se fait dans des boîtes de Petri (9 cm de diamètre) contenant 40 ml de milieu SR modifié et décrit en détail dans le chapitre III. III.

Au bout de 3 mois de culture, certaines espèces de MVA, en particulier les *Glomus*, produisent des centaines et des milliers de spores. Les Figures 6 à 10 montrent les différents caractères morphologiques liés au développement *in vitro* de champignons MVA d'*A. albida*. Par des subcultures, en utilisant soit des spores matures, soit des fragments mycorhiziens produits en conditions axéniques, on arrive à constituer une collection de souches MVA. Le tableau 3 résume les différents isolats MVA produits par ces méthodes de culture et maintenus dans la collection **Forme Intraracinaire In Vitro d'Arbusculo-Mycorhizes (FINTRAVAM)**. Cette collection a été déposée à l'Université d'Angers et est actuellement maintenue en boîtes de Petri. La Figure 11 décrit les principales modalités d'entretien de cette collection de souches et les conditions de piégeage des champignons MVA du terrain en vue d'une production d'inoculum de qualité au laboratoire. Les souches sont à la disposition des utilisateurs pour des travaux de recherche. Les conditions d'entretien *in vitro* sont fournies en même temps que la souche.

Au bout d'un an de culture après 3 repiquages, des exemplaires sont lyophilisés et déposés comme échantillons de référence de FINTRAVAM. Des recherches ultérieures devraient permettre de conserver les échantillons lyophilisés non seulement comme référence mais aussi pour initier de nouvelles cultures *in vitro*.

### *Glomus mosseae*

La coculture *in vitro* d'une vésicule isolée de *G. mosseae* en présence d'une racine transformée de carotte aboutit à une importante production de champignon. L'inoculum mère (vésicule) émet en général 2 à 5 hyphes de germination qui s'orientent souvent dans la même direction que la racine, puis se développent des hyphes secondaires plus fins d'orientation quelconque. A partir d'un mois de culture, un mycélium dense non septé couvre toute la gélose et le nombre de spores produites peut dépasser plus de 6000 spores dans certaines boîtes de Petri. Les spores apparaissent isolées ou groupées le long des hyphes. Des paquets de 30 à 50 spores sont régulièrement produites dans les thalles du champignon. Sous la loupe binoculaire, les contacts racinaires (appressoriums) et les vésicules intraracinaires sont facilement visibles alors que la détection des arbuscules n'est possible qu'après coloration des racines. Les

subcultures à partir des spores et fragments de mycorhizes obtenus *in vitro*, montrent un développement identique à celui de la culture de *G. mosseae*. Certaines thalles isolées ont une capacité de croissance et produisent des hyphes mycéliens comparables à ceux issus d'une vésicule isolée, mais la production de spores néoformées a été relativement faible et ne dépassait pas une centaine après 3 mois de culture.

### *Glomus fasciculatum*

Le nombre moyen d'hyphes de germination d'une vésicule de *G. fasciculatum* est identique à celui d'une vésicule de *G. mosseae*. Les cultures réalisées en présence de racines isolées transformées de carotte et non transformées de tomate donnent une production similaire de champignon même si celles obtenues avec les racines de tomates nécessitent plus de surveillance (enlèvements fréquents des condensations d'eau dans les boîtes de Petri pour réduire les risques de contamination). Les hyphes fongiques de 4 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre, produisent des thalles en grand nombre, environ une trentaine de ces structures fongiques sont constituées au bout de 3 jours de culture. La production des spores se fait préférentiellement dans les thalles du champignons avec une densité de plus de 100 spores par thalle; ce qui conduit à la formation de près de 10 000 spores dans une boîte de Petri après 3 mois de culture. L'importance de la production de spores matures réduit les délais de subcultures du champignon. Ainsi des subcultures réalisées à partir des spores néoformées de 3 semaines, transmettent la mycorhization à cent pour cent, le champignon développe les mêmes structures que celles observées dans les premières cultures.

### *Glomus aggregatum*

Un fragment racinaire de poireau colonisé par *G. aggregatum* permet la multiplication *in vitro* du champignon en association avec des racines isolées de tomate. Les hyphes rectilignes originaires en grande partie des vésicules internes, riches en lipides, se développent au hasard sur la gélose qu'elles couvrent complètement au bout d'un mois de culture. Cependant se développement extensif du mycélium s'accompagne d'un nombre réduit de thalles qui apparaissent généralement après 6 semaines de culture. Des spores isolées de 30 à 80  $\mu\text{m}$  de

diamètre se forment en majorité le long de grêles hyphes secondaires. En moyenne près de 700 spores sont produites à la surface et dans la gélose après 3 mois de culture. Des condensations d'hyphes sont visibles parfois par grappes à l'extrémité des parties mortes du partenaire végétal et attestent du mode de vie saprophytique de *G. aggregatum*. Au microscope inversé, quelques vésicules intraracinaires sont visibles et les racines colorées montrent une dominance de structures arbusculaires. Les subcultures réalisées à partir de fragments de mycorhizes conservent le même développement mycélien que la culture du champignon mais la sporulation est plus tardive.

### *Gigaspora margarita*

Les spores prégermées émettent en général un hyphe de germination, puis des hyphes secondaires ondulatoires et coenocytiques, se développent au hasard et colonisent les racines transformées de carotte. De nombreux points de pénétration sont visibles après quelques semaines. Le développement mycélien du champignon est ponctué de la formation de plusieurs cellules auxiliaires ornementées. Après deux mois de culture, après la formation d'une forte densité d'hyphes, on voit dans certaines boîtes de Petri des spores néoformées globuleuses, blanchâtres ou orangées. Trois spores sont produites après 3 mois et des centaines d'unités d'infections sont visibles après coloration des racines.

### *Glomus caledonium*

La culture du champignon est réalisée à partir d'une spore ou d'un sporocarpe isolé en présence de racine de tomate. Les hyphes de germination entrent rapidement avec leur hôte, puis colonisent toute la gélose. Toutefois, la biomasse est moins prolifique que celle des autres *Glomus* après 3 mois de culture, ce qui explique probablement le peu de spores néoformées. Le nombre de ces spores peut varier de 12 à plus de 100 dans certaines boîtes de Petri quelque soit l'inoculum mère. Peu de thalles sont produits à l'intérieur d'un mycélium non septé.

**Figure 6 : Développement *in vitro* de *Glomus mosseae* (UAORS SR 103)**

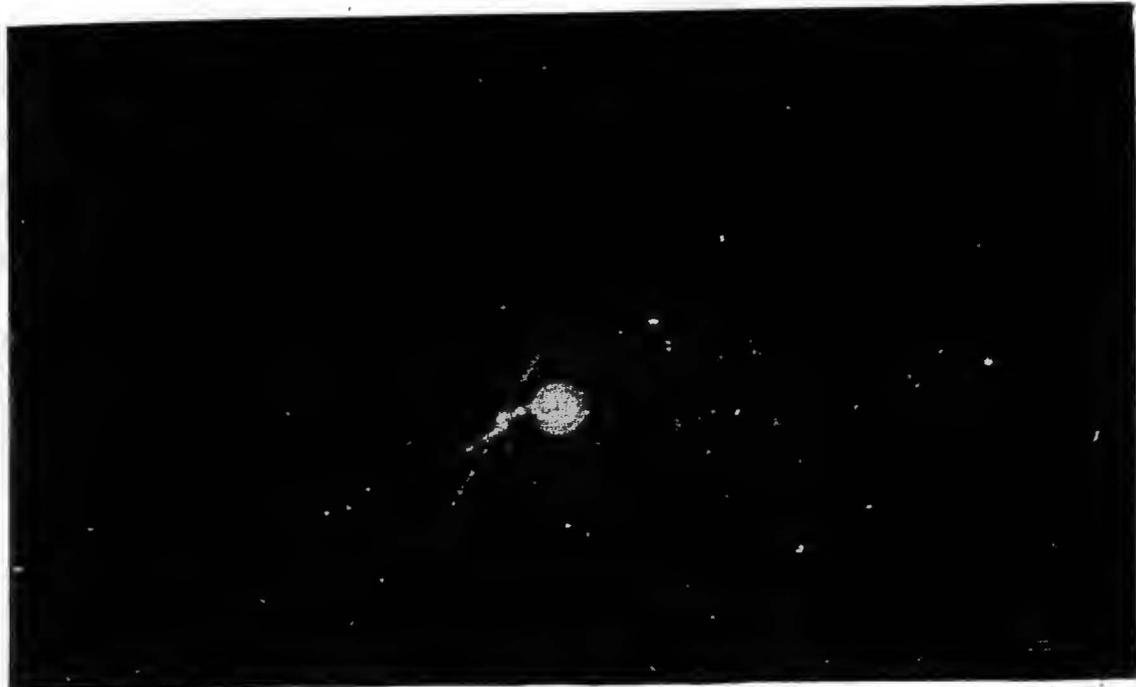
**A : germination d'une vésicule isolée, deux jours après incubation**

barre = 60  $\mu$ m.

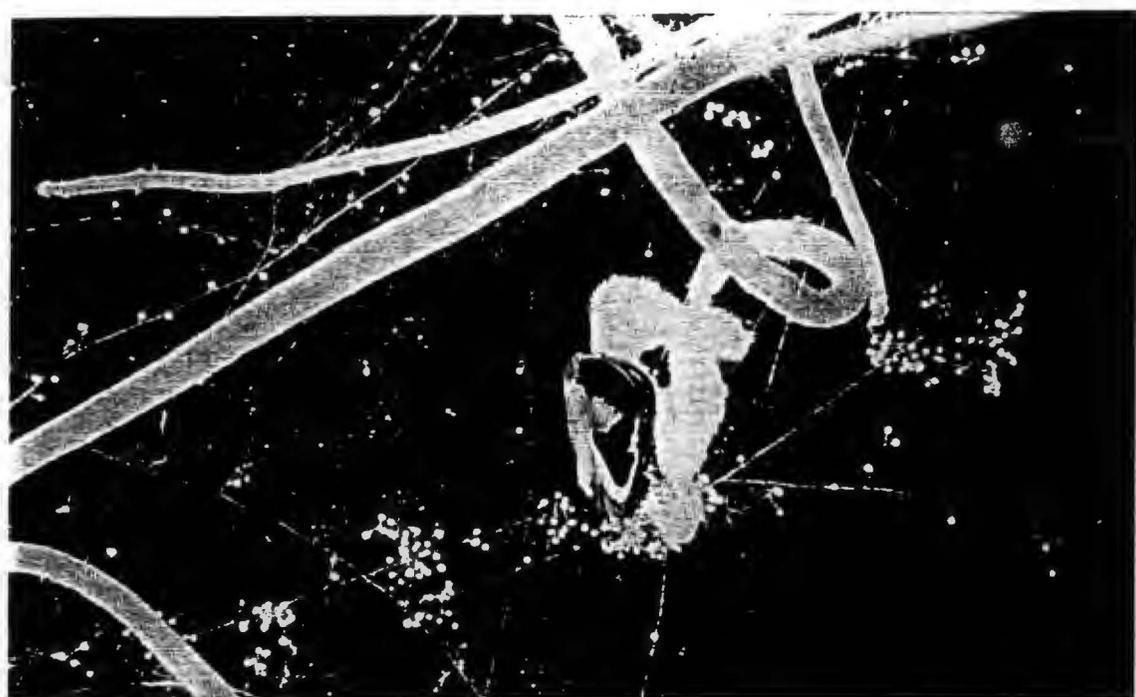
**B : Densité importante de spores produites dans les structures fongiques en association avec une racine transformée de carotte après 3 mois de culture**

barre = 1 mm.

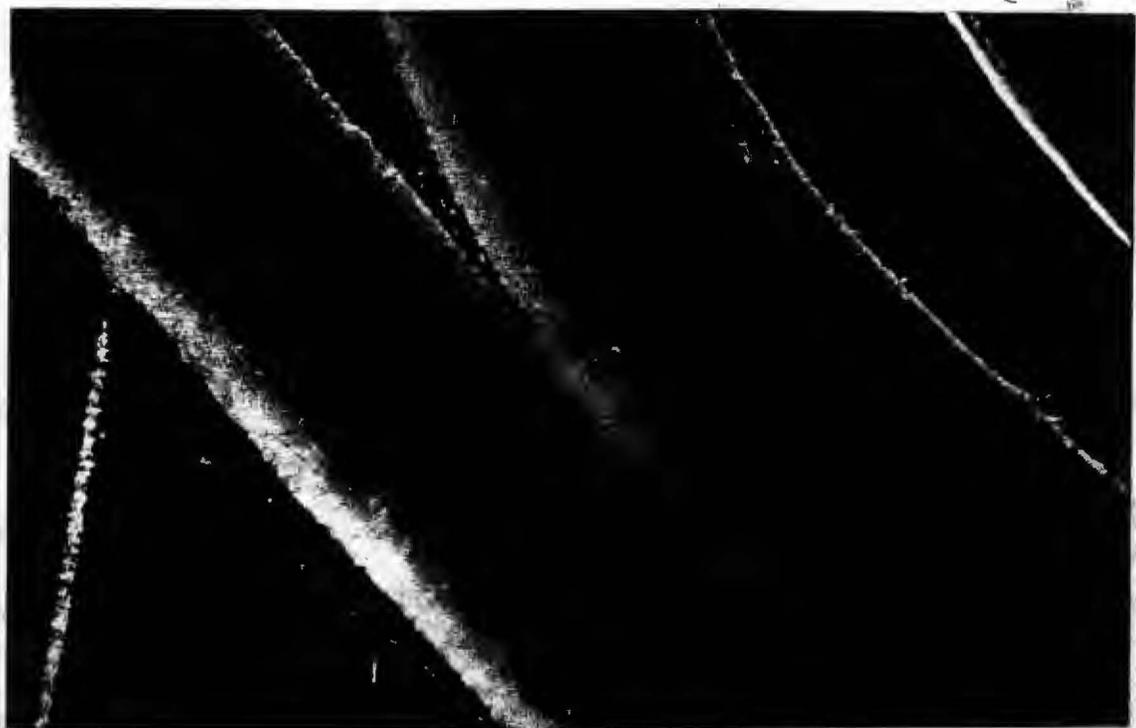
**C : Subculture de *G. mosseae* âgée d'un mois : on observe fréquemment et sans coloration les vésicules dans les racines de carotte (flèche).**



side



2



2

**Figure 7 : Développement *in vitro* de *Gigaspora margarita* (UAORS 109)**

**A : germination d'une spore**

barre = 150  $\mu\text{m}$ .

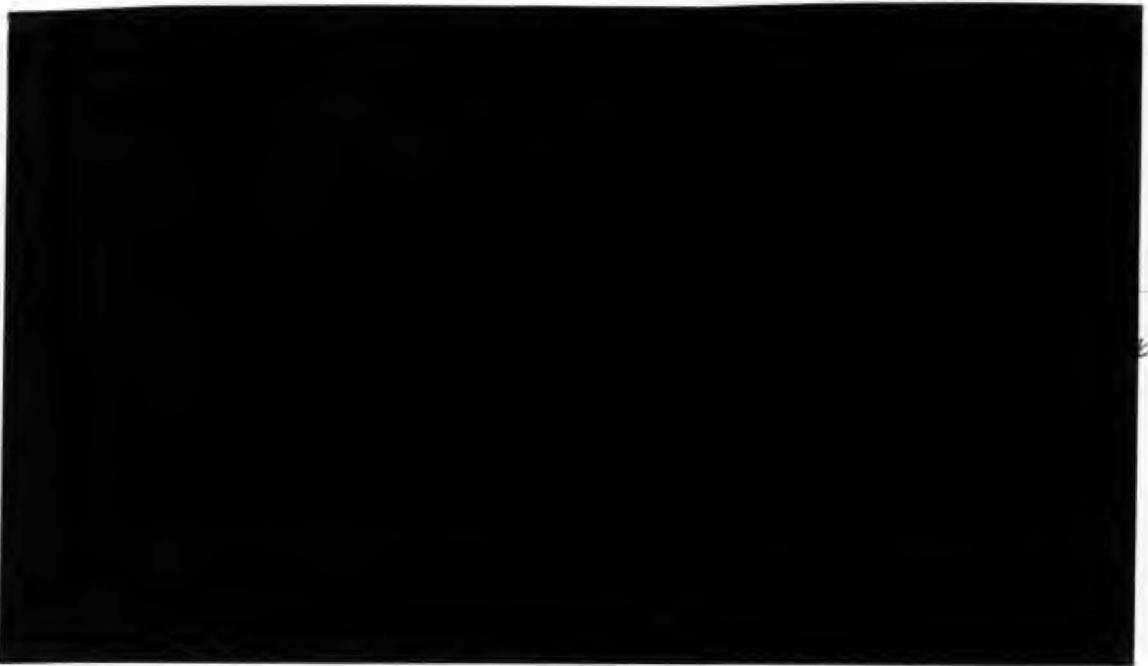
**B : Développement extraradical du champignon après 2 mois de culture :**

noter les cellules auxilliaires

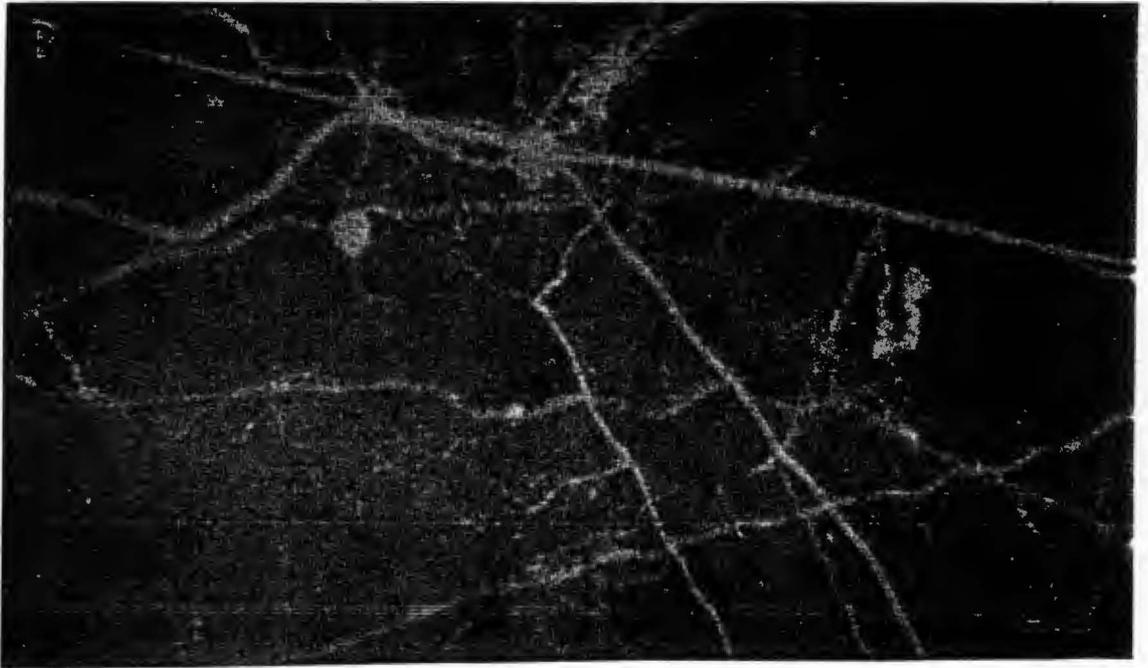
barre = 200  $\mu\text{m}$ .

**C : Détail d'une cellule auxilliaire**

barre = 20  $\mu\text{m}$ .



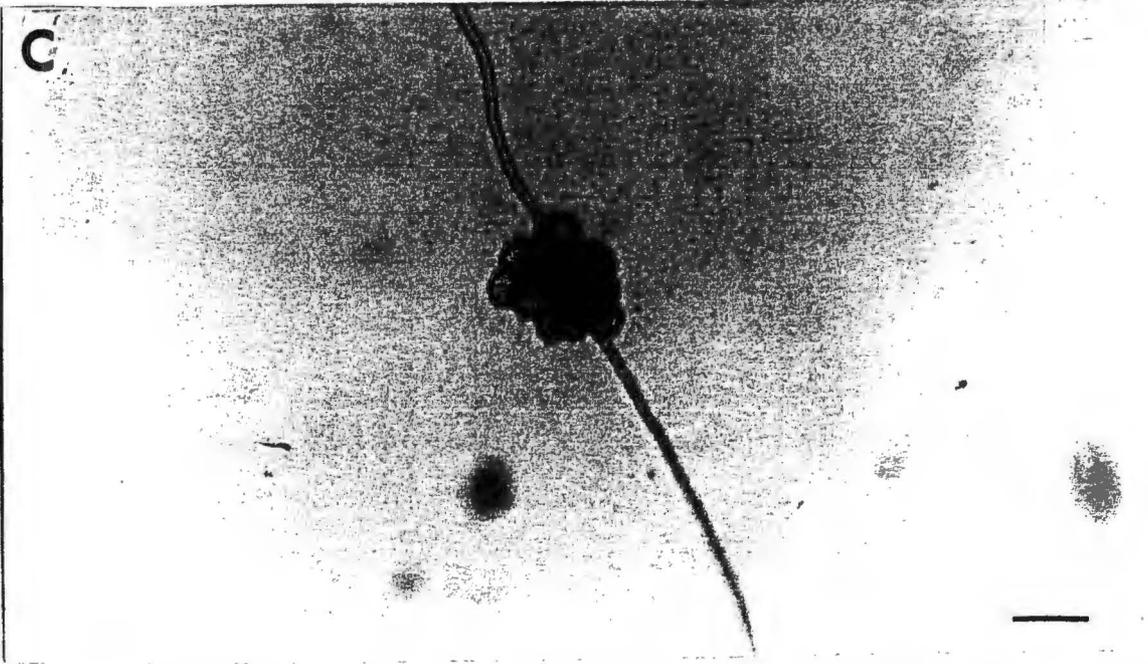
*medial*



*base*

*3*

*medial*



**C**

—

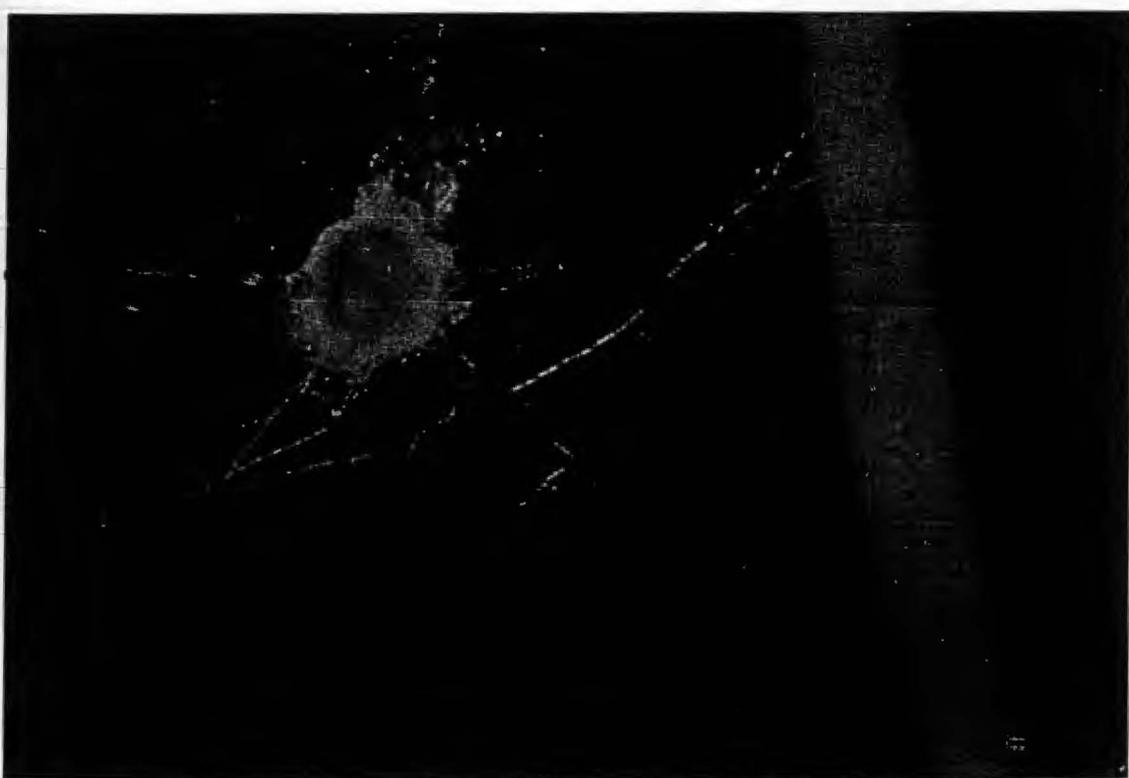
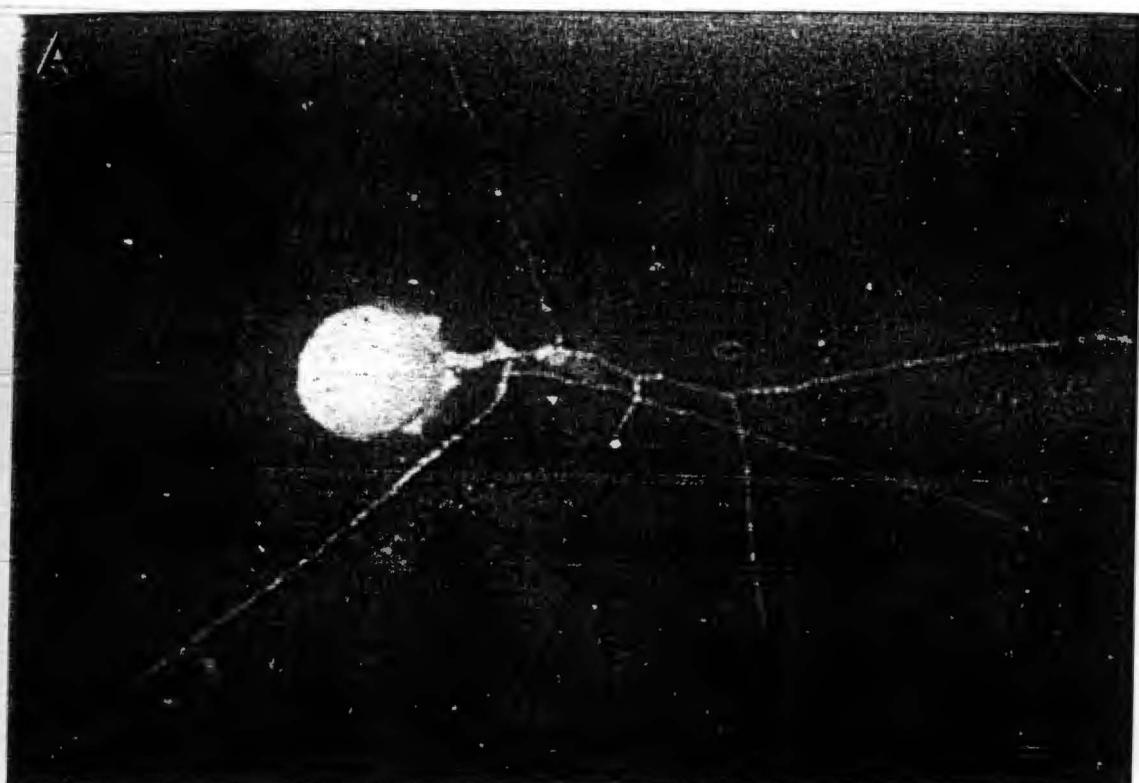
**Figure 8 : Développement *in vitro* de *Glomus caledonium* (UAORS 110)**

**A : Germination d'une spore après 3 jours d'incubation**

barre = 150  $\mu\text{m}$

**B : Développement mycélien à partir de l'inoculum mère (sporocarpe) en présence de racine de tomate**

barre = 500  $\mu\text{m}$



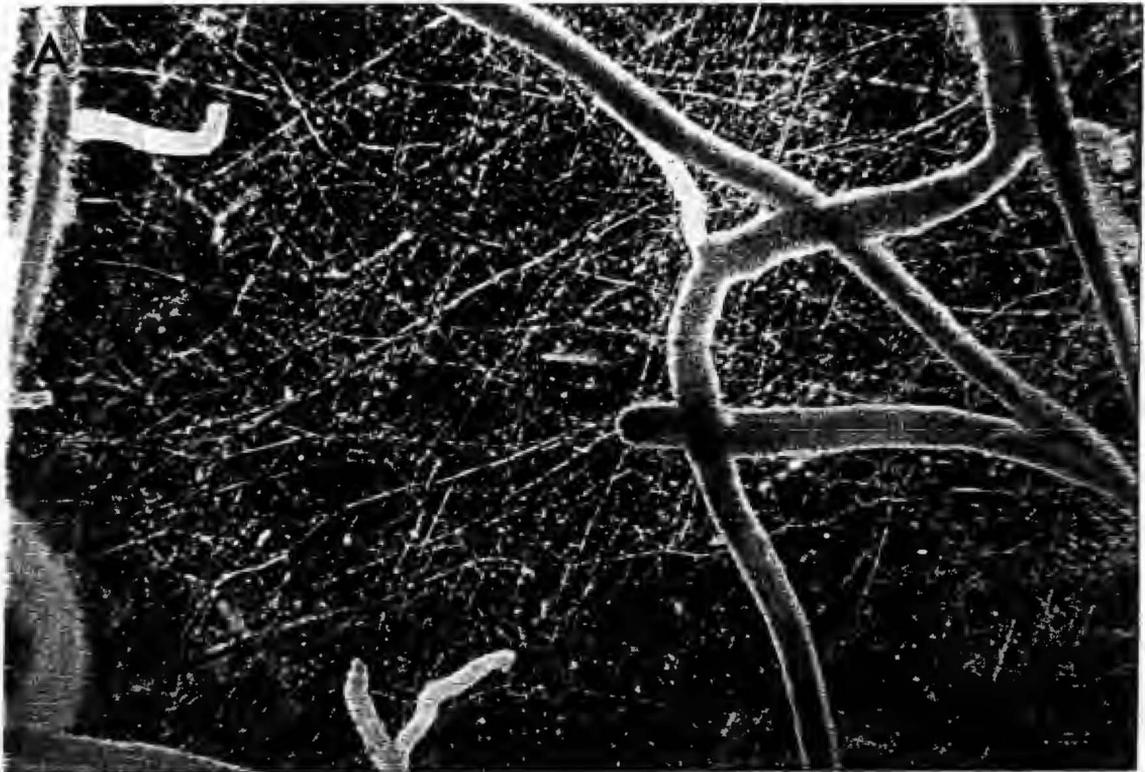
**Figure 9 : Développement *in vitro* de *Glomus aggregatum* (UAORS 108)** <sup>Y</sup>

**A : Importance de la phase extramatricielle du champignon après 2 mois de culture en association avec une racine transformée de carotte**

barre = 1 mm.

**B : Production de spores après 3 mois de culture en association avec une racine de tomate**

barre = 1,5 mm



**Figure 10 : Développement *in vitro* de *Glomus fasciculatum* (UAORS SR 106)**

**A : Germination de vésicule isolée. Noter l'importance des ramifications hyphales**

barre = 100  $\mu\text{m}$

**B : Des structures (thalles) se différentient à partir de l'hyphe principal**

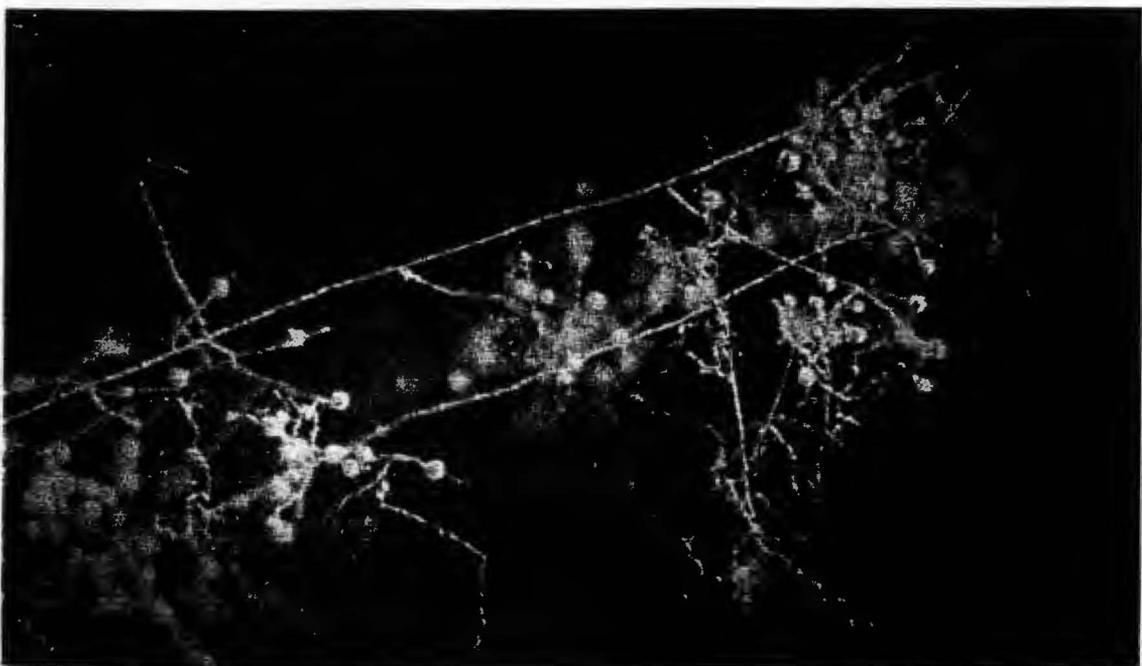
barre = 800  $\mu\text{m}$ .

**C : Production massive de spores au niveau des structures fongiques après un mois de culture en présence de racine transformée de carotte**

barre = 400  $\mu\text{m}$ .



h



**Tableau 3 : Principales souches MVA mises en collection *in vitro***

<b>Espèce Références</b>	<b>Origine</b>	<b>Inoculum mère</b>	<b>Particularités</b>	
<i>G. versiforme</i>	UAORS SR 101	Québec, Canada	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>G. intraradices</i>	UAORS SR 102	Dijon, France	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>G. mosseae</i>	UAORS SR 103	Kabrousse 1,50 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>G. mosseae</i>	UAORS SR 104	Diokoul 0,15 m	Forme intraracinaire	Culture
<i>G. fasciculatum</i>	UAORS SR 105	Louga 0.15 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>G. fasciculatum</i>	UAORS SR 106	Louga 34 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>G. aggregatum</i>	UAORS SR 107	Louga 0,15 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>G. aggregatum</i>	UAORS SR 108	Djinaki 4,50 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>G. margarita</i>	UAORS 109	Louga 34 m	Spores	Culture
<i>G. caledonium</i>	UAORS 110	Kabrousse 0,15 m	Spores	Culture
<i>G caledonium</i>	UAORS 111	Djinaki 4,50 m	Spores	Culture
<i>G. caledonium</i>	UAORS 112	Louga 0,15 m	spores	Culture
<i>G. caledonium</i>	UAORS 113	Diokoul 16,50 m	spores	Culture

**Figure 11 : Protocole d'isolement, de purification, de culture et de conservation, retenu pour les souches MVA du Sahel**

**1** : Prélèvement au champ de champignons MVA après avoir enlevé les débris organiques de surface (0 - 35 cm) (Diop et al., 1994 b, c)

**2** : Multiplication en serre de l'inoculum MVA en association avec une plante piège mycotrophe (Poireau) dans un substrat standard, le Terragreen (Plenchette et Perrin, 1992).

**3** : Si on observe une bonne mycorhization au champ, on peut réaliser une culture monosporale ou monovésiculaire en association avec des racines isolées transformées de carotte ou non de tomate dans le milieu minimal M (Bécard et Fortin, 1995) ou dans le milieu SR modifié (Strullu et al., 1995)

**4** : Une forme de culture continue avec une augmentation notable de biomasse fongique consiste à incuber à 27 °C et à l'obscurité, les cultures obtenues en (3) pendant plusieurs mois. Cette culture sans repiquage peut se maintenir pendant plus d'un an dans une boîte de Petri standard contenant 40 ml de milieu (Diop et al., 1992; Bécard et Piché, 1992).

**5** : Culture monosporale en association avec le poireau dans des petits godets contenant du Terragreen

**6-7** : Culture en boîte de Petri à partir d'un fragment racinaire mycorhizé ou d'une vésicule isolée (Strullu et Romand, 1986; 1987). La désinfection superficielle des racines mycorhizées se fait selon la méthode de Diop et al., (1994 a, b). L'extraction de vésicules se fait facilement en dilacérant les cellules racinaires. Un fragment mycorhizien de 0.5 cm de long est recommandé comme inoculum standard (Diop et al., 1994 a, b).

**8** : Culture *in vitro* à partir de la forme intraracinaire du champignon

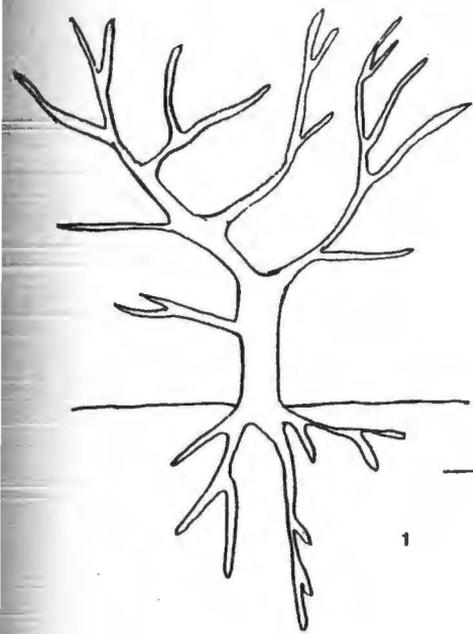
Des milliers de spores et une importante densité mycélienne sont produits en présence de racines isolées dans du milieu SR modifié après 3 mois de culture (Strullu et al., 1995).

Les cultures peuvent être conservées au froid et utilisées au besoin. Un système de culture en milieu semi-contrôlé permet d'obtenir une production du champignon à plus grande échelle. La culture se fait en présence du poireau dans du terragreen stérile. Un sac aéré autoclavable réduit les risques de contamination et maintient une bonne humidité réduisant les fréquences d'arrosage (1 fois tous les mois).

**9** : Subculture *in vitro* par repiquage tous les 4 mois de la forme intraracinaire ou de spores matures produites en association avec des racines isolées dans du SR modifié. Cette méthode de culture continue permet une transmission de 100% de la mycorhization et permet surtout de définir des générations de mycorhizes, offrant donc des perspectives intéressantes dans la compréhension de la biotrophie des symbiotes obligatoires.

Les cultures peuvent aussi être stockées à 4 °C pendant plusieurs mois sans une perte de viabilité des propagules.

**10** : La réassociation *in vitro* des propagules obtenues après plusieurs générations et d'une plante entière (Tomate) permet au besoin de revenir à la première génération après un mois de culture. Ce système de culture est une adaptation de la technique du papier-sandwich décrite pour la production d'ectomycorhizes (Wong et Fortin, 1989). La culture se fait dans des grandes boîtes de Petri (15 cm de diamètre) contenant du SR modifié sans sucre. Une membrane de cellophane stérile empêche les racines de se soulever, permettant ainsi un bon contact avec l'inoculum.



1  
Prélèvement au champ  
ou par forage



3  
Culture *in vitro*  
à partir de vésicules



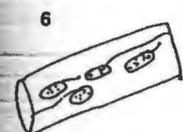
4  
Culture *in vitro*  
à partir de monospores



2  
Piégeage sur plante  
mycotrophe  
et identification



5  
Inoculation  
par monospores  
en serre



6



7



sac aéré  
autoclavé



8

4 mois



9

4 mois



9

4 mois

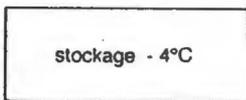


9

1 mois



10



stockage - 4°C



9x

#### IV. IDENTIFICATION PAR LES OUTILS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

La nature de vie symbiotique obligatoire des champignons MVA rend difficile leur identification par des critères uniquement morphologiques. Les études de biologie moléculaire semblent appropriées pour déceler les variations inter et intraspécifiques et pour définir les relations phylogénétiques des champignons MVA (Hewitt et al., 1991; Simon et al., 1993). Le principe de l'approche moléculaire de détection et d'identification est basé sur l'amplification *in vitro* de l'ADN des régions hypervariables du génôme. Les régions ITS (internal transcribed spacer) amplifiées présentent des polymorphismes de séquences permettant de détecter les variabilités génétiques des champignons, en particulier des champignons ectomycorhiziens (Gardes et al., 1991; 1993; Henrion et al., 1992; 1994).

Cependant, l'utilisation d'amorces universelles pour étudier le polymorphisme des régions ITS, est un risque d'amplification de produits parasites; ce qui explique probablement le peu d'études moléculaires de ces régions chez les champignons MVA réalisées à ce jour. Des amorces spécifiques ont été surtout utilisées pour étudier une partie du génome de ces microsymbiotes (Simon et al., 1992; Zézé et al., 1994). Notre objectif est de montrer que sous certaines conditions, l'amplification des régions ITS est un outil valable pour la caractérisation de champignons MVA cultivés *in vitro* et en serre.

##### 1. Préparation de l'ADN fongique

Une cinquantaine de spores champignons MVA obtenues, soit à partir des cultures monosporales en serre [*Gigaspora margarita* UAORS 124; *Glomus caledonium* (UAORS 130 et UAORS 134), *Glomus mosseae* UAORS 120 et *Glomus aggregatum* UAORS 132], soit à partir des cultures axéniques en boîtes de Petri (*Glomus mosseae* UAORS SR 103, *Glomus caledonium* UAORS 113, *Glomus fasciculatum* UAORS SR 105), sont utilisées pour l'extraction. Les spores provenant des cultures en conditions non axéniques subissent préalablement une désinfection superficielle. Les spores sont placées dans des microtubes à

entrifuger et mises en suspension dans une solution de lyse (Tris-HCl pH 7,2 - 50 mM, EDTA - 50 mM SDS 3% - 2-mercaptoéthanol 1%). Les suspensions de spores sont placées au four à microondes pendant 30 secondes puis à 80 °C pendant 10 minutes après dilution avec du tampon de lyse (Goodwin et Lee, 1993). Les extraits sont déprotéinisés par addition d'un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) puis l'ADN est précipité par 2 volumes d'éthanol en présence d'acétate de sodium et d'un "entraîneur" inerte. Après lavage, les culots d'ADN sont séchés, remis en suspension dans un tampon contenant du NaCl (100 mM), puis traités au 2-butoxyéthanol de façon à éliminer les contaminants polyphénoliques et polysaccharidiques (Manning, 1991).

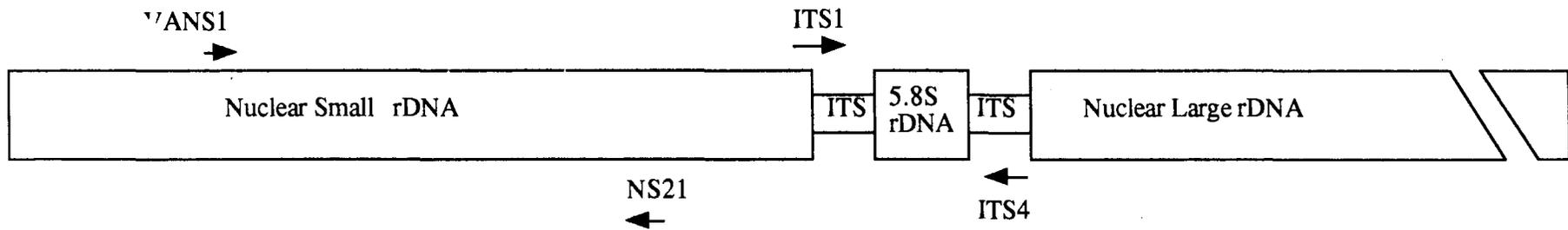
## 2. AMPLIFICATION *IN VITRO*

L'utilisation de la PCR dans le domaine des mycorhizes MVA est récente, ce qui explique l'absence de conditions expérimentales standardisées. Les amorces utilisées dans cette étude sont complémentaires de régions des gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) situés sur l'ADN génomique; leur localisation sur ces gènes est décrite sur la Figure 12. La paire d'amorces universelles ITS1/ITS4 permet l'amplification, chez la majorité des champignons et de nombreuses plantes, de la totalité de la région transcrite séparant les gènes des deux grands ARNr et englobant le gène pour l'ARNr 5,8S (White et al., 1990).

Le milieu réactionnel (volume final de 50  $\mu$ l) contient l'ADN fongique, les amorces (80 pmoles de chaque), des dNTP (200  $\mu$ M), du MgCl<sub>2</sub> (1,5mM) et de la Taq Polymérase (1 u). Un volume environ d'huile minérale est ajouté sur le mélange pour éviter toute évaporation durant la PCR. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur programmé : après une dénaturation initiale (95 °C/ 3 min), 30 cycles de dénaturation (95 °C/ 1 min 30 s) - hybridation des amorces (50 °C/ 30 s) - élongation (72 °C/2 min) sont effectués et suivis d'une élongation finale (72 °C/ 15 min). Les essais effectués avec les amorces VANS1-NS21 ont été conduits selon les paramètres décrits par Simon et al. (1992).

### 3. ANALYSE DES PRODUITS D'AMPLIFICATION

La taille et la pureté des fragments d'ADN amplifiés sont vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (1,2%). La migration des échantillons s'effectue à 50 volts pendant 30 min. et les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière UV après coloration au bromure d'éthidium. Pour faciliter l'étude du polymorphisme des régions amplifiées, celles-ci sont clonées dans un vecteur plasmidique (pCR-Script) et amplifiées *in vivo* dans *Escherichia coli* XL1-Blue selon les méthodes standards (Sambrook et al., 1989). Pour l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), les ADN provenant de l'amplification *in vivo* ou *in vitro* sont digérés par des enzymes de restriction à coupure fréquente (*Hinf* I, *Hae* III) dans les conditions optimales décrites par les fournisseurs. Les fragments de restriction obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (FMC Bioproducts) 3,5% dans du TAE (0,04 M Tris-acétate, 0,001 M EDTA) à 5 volts/cm pendant 5 heures (gel 20 x 20 cm) ou pendant 1heure (gel 12 x 6 cm). La visualisation des fragments d'ADN est effectuée sous lumière UV après coloration au bromure d'éthidium. Pour l'analyse de variations ponctuelles de leur séquence nucléotidique, les ADN amplifiés sont purifiés sur gel d'agarose en utilisant le Kit Gel Clean (BIO 101), puis séquencés selon la méthode de terminaison de chaîne en utilisant des amorces ITS1 ou ITS4.



**Figure 12: Localisation des amorces sur les gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARN r) des champignons**

Les séquences des amorces universelles et spécifiques sont définies comme suit:

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATCC-3'

VANS1: 5'-GTCTAGTATAATCGTTATACAGG-3'

NS21: 5'-AATATACGCTATTGGAGCTGG-3'

## 4. RESULTATS ET DISCUSSION

### 4.1 Amplification des régions de l'ADN ribosomal à partir d'ADN extrait de suspensions de spores de champignons MVA

Les techniques d'extraction de l'ADN génomique utilisées pour les champignons MVA sont basées sur des cycles de congélation-décongélation en présence de Chelex (Simon et al., 1992) avec parfois en plus des traitements aux ultrasons (Wyss et Bonfante, 1993). Les résultats obtenus par ces techniques s'étant avérés peu reproductibles, nous avons adapté une technique récente de lyse au four à micro-ondes (Goodwin et Lee., 1993) à différentes suspensions sporales de champignons MVA. Dans un premier temps, l'ADN brut préparé par cette méthode, est utilisé comme matrice pour des réactions de PCR en présence d'amorces VANS1/NS21 (Simon et al., 1992) ou ITS1-ITS4 (White et al., 1990). Dans les deux cas, aucun signal n'a été obtenu après amplification (Figure 13, pistes 2 et 4).

Par des mélanges de ces préparations d'ADN avec un ADN témoin positif nous avons pu montrer que ces préparations contenaient des inhibiteurs non nucléiques de la réaction PCR (résultats non présentés). L'ADN brut est donc purifié par un traitement au 2-butoxyéthanol; il a été montré que ce composé permet l'élimination de contaminants phénoliques et polysaccharides (Manning, 1991). Après ce traitement, l'amplification en présence des amorces ITS 1-ITS4 se traduit par la présence de 2 bandes à 550 pb et 630 pb et l'amplification en présence de VANS1-NS21, par une bande de 1000 pb environ (Figure 13, pistes 1 et 3).

La taille des régions ITS amplifiées à partir des spores MVA est en accord avec les résultats obtenus dans la littérature pour des génomes végétaux ou fongiques (Gardes et Bruns, 1993; Henrion et al., 1994). Bien que généralement un seul produit d'amplification soit obtenu pour les régions ITS avec la plupart des champignons ou végétaux testés, la présence de deux fragments de tailles différentes peut traduire la présence soit de deux types de séquences ITS à l'intérieur d'un même génôme, soit de deux types de noyaux différents chez les spores MVA. Des résultats similaires ont été observés pour certaines espèces végétales appartenant aux familles des Rosacées et Brassicacées (Cambell et al., 1993; Capesius, 1993). Par contre, la

taille du fragment amplifié avec les amorces VANS1-NS21 est nettement supérieure à la taille attendue de 550 pb (Simon et al., 1992). Il est donc probable que cette différence soit due à une amplification non spécifique.

Le résultat paradoxal obtenu avec VANS1-NS21, nous a conduit à choisir la paire d'amorces ITS1-ITS4 pour étudier le polymorphisme de l'ADN ribosomique des champignons MVA. Des extraits d'ADN purifié au 2-butoxyéthanol ont été préparés à partir de 8 suspensions de spores de champignons MVA d'*A. albida* et correspondant à 5 espèces différentes selon les déterminations morphologiques. Ces préparations ont été amplifiées en présence des amorces ITS1-ITS4. La Figure 14 montre qu'avec la plupart de ces extraits, deux signaux de tailles différentes sont obtenus, sauf avec *Gi. margarita* UAORS 124 et *G. caledonium* UAORS 134 (Figure 14, pistes 5 et 8). Dans tous les cas un fragment à 550 pb est obtenu alors que la taille du second fragment semble plus hétérogène variant de 550 pb (*Gi. margarita* UAORS 124 et *G. caledonium* UAORS 134) à 660 pb (*G. caledonium* UAORS 113).

#### 4.2 Analyse RFLP des régions ITS amplifiées

Afin de mettre en évidence un éventuel polymorphisme dans les séquences des régions ITS amplifiées, les produits d'amplification par ITS1-ITS4 obtenus à partir de différentes préparations d'ADN de spores MVA ont été digérés par les enzymes de restriction *Hae* III et *Hinf* I.

L'analyse des produits de digestion obtenus par l'endonucléase *Hae* III permet de séparer les champignons testés en deux groupes (Figure 15). Pour les champignons du premier groupe (*G. aggregatum* 132, *G. caledonium* 130, *G. fasciculatum* UAORS SR 105, *G. caledonium* UAORS 113), la région ITS de 550 pb possède 1 site pour *Hae* III et est clivée en 2 fragments de 450 et 100 pb respectivement. La région ITS de taille supérieure ne possède pas de site *Hae* III. Pour les champignons du deuxième groupe (*Gi. margarita* UAORS 124 et *G. caledonium* UAORS 134), le clivage par *Hae* III démontre bien la présence de 2 régions ITS amplifiées polymorphes bien que de taille identique. Ces sites correspondent à une région semblable à celle amplifiée chez les champignons du premier groupe générant 2 fragments de 450 et 100 pb et une deuxième région clivée en 3 fragments de 400, 100 et 50 pb respectivement (ce dernier n'étant pas visible sur la Figure 15).

En fonction des profils de migration des produits de digestion par *Hinf* I (Figure 16), les champignons testés peuvent être séparés en 5 groupes:

- groupe I avec *Gi. margarita* UAORS 124 et *G. caledonium* UAORS 134,
- groupe II avec *G. fasciculatum* UAORS SR 105, *G. caledonium* UAORS 130
- groupe III avec *G. mosseae* UAORS SR 103 et *G. mosseae* UAORS 120,
- groupe IV avec *G. caledonium* UAORS 113
- groupe V avec *G. aggregatum* UAORS SR 132

L'analyse détaillée de tels profils (voir par exemple la Figure 16B) ainsi que l'analyse individualisée de différentes régions ITS de ces champignons MVA, clonées dans *E. coli* (Figure 17) permettent de définir la présence d'au moins 6 types de régions ITS dans les différents champignons MVA étudiés. Les caractéristiques de ces régions sont données dans le Tableau 4. De ces différentes données on peut déduire que :

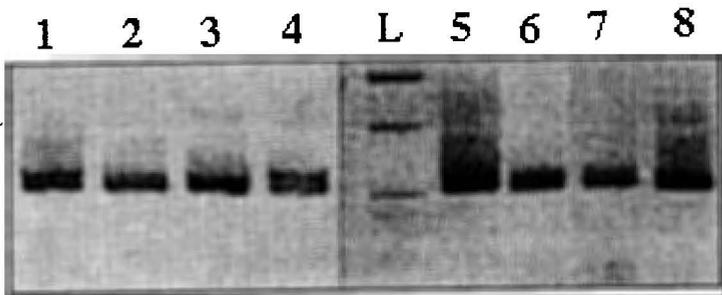
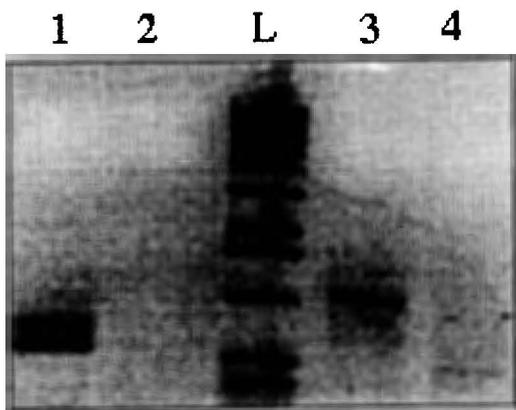
- l'ensemble des champignons testés renferment la région ITS de type A,
- les champignons des groupes II, III, IV et V renferment la région de type C,
- les champignons du groupe I renferment la région de type B,
- les champignons du groupe III renferment la région de type F,
- les champignons du groupe IV renferment la région de type E,
- les champignons du groupe V renferment la région de type D.

**Figure 13 : Effet du traitement au 2-butoxyéthanol sur l'amplification.**

ADN extrait à partir d'une suspension de spores de *Glomus sp* purifié (pistes 1 et 3) ou non (pistes 2 et 4) par le 2-butoxyéthanol, et amplifié en présence des amorces ITS1-ITS4 (pistes 1 et 2) ou VANS-NS21 (pistes 3 et 4); L : échelle de taille moléculaire

**Figure 14 : Amplification de la région ITS à partir d'ADN extrait de suspensions de spores**

Piste 1 : *G. aggregatum* UAORS 132; piste 2 : *G. caledonium* UAORS 130, piste 3 : *G. fasciculatum* UAORS SR 105; Piste 4 : *G. caledonium* UAORS 113; Piste 5 : *G. caledonium* UAORS 134; piste 6 : *G. mosseae* UAORS 120; piste 7 : *G. mosseae* UAORS SR 103; piste 8 : *Gi. margarita* UAORS 124; L : échelle de taille moléculaire



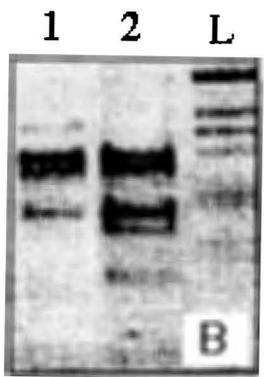
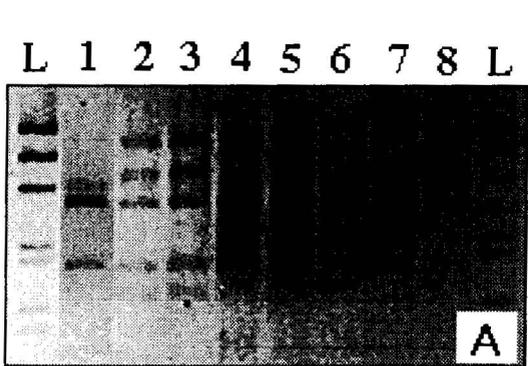
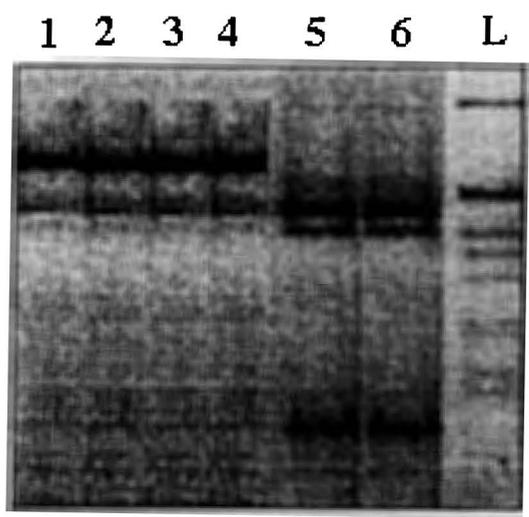
**Figure 15 : Analyse des produits de digestion *Hae* III des régions ITS amplifiées à partir de suspensions de spores**

Piste 1 : *G. aggregatum* UAORS 132; piste 2 : *G. fasciculatum* UAORS SR 105; piste 3 : *G. caledonium* UAORS 130; Piste 4 : *G. caledonium* UAORS 113; Piste 5 : *G. caledonium* UAORS 134; piste 6 : *Gi. margarita* UAORS 124;  
L : échelle de taille moléculaire

**Figure 16 : Analyse des produits de digestion *Hinf* I des régions ITS amplifiées à partir de suspensions de spores sur gel d'agarose Nusieve (A) ou Metaphor (B)**

A : Piste 1 : *Gi. margarita* UAORS 124; piste 2 : *G. mosseae* UAORS SR 103, piste 3 : *G. mosseae* UAORS 120; Piste 4 : *G. fasciculatum* UAORS SR 105; Piste 5 : *G. aggregatum* UAORS 132; piste 6 : *G. caledonium* UAORS 134; piste 7 : *G. caledonium* UAORS 130; piste 8 : *G. caledonium* UAORS 113; L : échelle de taille moléculaire

B : piste 1 : *G. caledonium* UAORS 113; piste 2 : *Gi. margarita* UAORS 124;  
L : échelle de taille moléculaire



**Figure 17 : Analyse de produits de restriction *Hinf* I des régions ITS clonées**

Piste 1 et 6 : région ITS clonée à partir de *G. caledonium* UAORS 113

Piste 2 : région ITS clonée à partir de *G. caledonium* UAORS 134

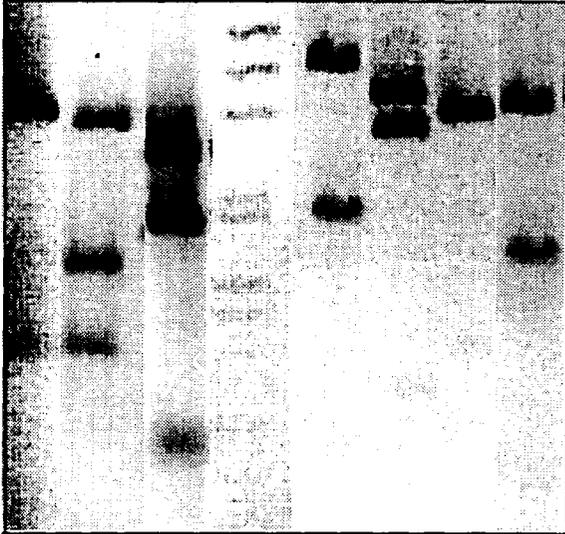
Piste 3 : région ITS clonée à partir de *G. mosseae* UAORS SR 103

Piste 4 : région ITS clonée à partir de *G. mosseae* UAORS SR 103

Piste 5 : région ITS clonée à partir de *G. aggregatum* UAORS 132

Piste 7 : région ITS clonée à partir de *G. caledonium* UAORS 120

1 2 3 L 4 5 6 7



**Tableau 4 : Caractéristiques des régions ITS amplifiées à partir des différents champignons MVA**

Nom de la région	Taille en pb	Fragments de restriction <i>Hinf</i> I (taille en pb)
ITS-A	550	A1 (270), A2 (200), A3 (80)
ITS-B	580	B1 (290), B2 (170), B3 (120)
ITS-C	640	C1 (370), C2 (190), C3 (80)
ITS-D	640	D1 (320), D2 (270), D3 (50)
ITS-E	660	E1 (300), E2, E3, E4 (120)
ITS-F	630	F1 (310), F2, F3 (160)

En conclusion, l'étude du polymorphisme de l'ADN des régions ITS de différentes spores a confirmé la diversité révélée par les études morphologiques des champignons MVA d'*A. albida*. Les amorces ITS sont donc appropriées pour étudier la variabilité génétique des champignons MVA à partir de suspensions sporales. L'analyse RFLP des produits d'amplification PCR a permis de définir deux grands types de séquences ITS chez les champignons MVA axéniques et non axéniques :

- la présence d'une séquence ITS hautement conservée de 550 pb
- et la présence de séquences ITS divergentes de tailles variant entre 580 et 660 pb.

L'étude détaillée des profils de migration des produits de restriction nous a permis de classer les champignons MVA. La distribution par cette méthode, des souches analysées en 5 groupes distincts semble pertinente. En effet ces groupes permettent de séparer les 5 espèces morphologiques :

- groupe I : *Gigaspora margarita*; groupe II : *Glomus fasciculatum*; groupe III : *Glomus mosseae*; groupe IV : *Glomus caledonium* et groupe V : *Glomus aggregatum*.

Toutefois, l'espèce *caledonium* semble très hétérogène puisque des souches classées dans cette espèce selon les critères morphologiques sont retrouvées dans 3 groupes différents, et en particulier, le résultat le plus surprenant est le regroupement *Gi. margarita* UAORS 124 et de *G. caledonium* UAORS 134. Ce polymorphisme de l'espèce *caledonium* a également été décelé au niveau morphologique, par des caractères distincts de la description originale. Au niveau moléculaire, l'hypervariabilité des séquences ITS non communes semble être à l'origine de l'important polymorphisme observé.

Par conséquent, pour une discrimination des souches au niveau de l'espèce, une étude plus détaillée de la séquence ITS de 550 pb commune aux différentes espèces testées nous a semblé intéressante. Pour cela les séquences des régions ITS-A communes à *G. mosseae* UAORS SR 103 et à *G. caledonium* UAORS 130 ainsi que celles de la région ITS-E de *G. caledonium* UAORS 113 ont été établies. La comparaison de ses séquences avec celle de la

région ITS du champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* (P. Simoneau, communication personnelle) est donnée sur la Figure 18. Cette comparaison montre que les régions amplifiées à partir des champignons MVA correspondent bien aux régions ITS puisque la partie conservée codante pour le 5,8 S ARN est retrouvée. La comparaison des régions ITS-A *G. mosseae* UAORS SR 103 et à *G. caledonium* UAORS 130 (Figure 19) montre que ces régions, ainsi qu'il était prédit par l'analyse RFLP, sont hautement homologues. Toutefois il est possible de noter quelques variations ponctuelles. L'existence de ces substitutions discrètes qui pourraient être spécifiques de l'espèce, permet d'envisager le typage des souches par la comparaison des profils de migration des régions ITS-A en gel à gradient de dénaturation (Myers et al., 1987) ou par analyse du polymorphisme de conformation de l'ADN simple brin (Orita et al., 1989).

Figure 18 : Comparaison des séquences des régions ITS-A de *G. mosseae* UAORS SR 103 et à *G. caledonium* UAORS 130 et ITS-E de *G. caledonium* UAORS 113 avec les régions correspondantes du génôme *Paxillus involutus*

Les nucléotides encadrés sont communs aux 4 séquences.

**18S** ←

ITS-MOS -----  
 ITS A-CAL -----  
 ITS-PAX TCCGTAGTGA ACCTGCGGAA GGATCATTAC CGAGTGCGGG CTGCCTCCGG GCGCCCAACC TCCCACCCTT GACTACCTAA CACTGT--TG 88  
 ITS E-CAL -----GC ACTTTCAAAA ATCCATATCC ACCTTGTGTG CAATGTCATC 42

ITS-MOS ----- CCCATG TGAACATAACC TGTTTCGTTT CCTCCGGTGT GTCCGGCCAC GCGCCCCDAG AGGACCCAC AACTCTTTT 76  
 ITS A-CAL ----- CCCATG TGAACATAACC TGTTTCGTTT CCTCCGGTGT GTCCGGCCAC GCGCCCCDAG AGGACCCAC AACTCTTTT 76  
 ITS-PAX CTTCGGCGGG GAGCC--CTT TC-----GGG GCGG-AGCCG CC--CGGGA- -----CTAC T--GANCITC ATG-CCTGA- CAGTGTGCA 157  
 ITS E-CAL TCTCTGGGGG CTGCGCGGCT TCAA-A-AGC CGTGTGGTCA CCTTTGGGAT TTATATCTAC TCAGAACIT- -----T-A- GA-TGATTTT 120

→ **5.8S**

ITS-MOS GAATTTTCA GTATCTTTG A-----GT G---AAAA ACAATAGGTC AAAACTTTCA ACAALGGATC TCTTGGTCTT GGCATCGATG 155  
 ITS A-CAL GAATTTTCA GTATATTTG A-----GT GA---AAAA ACAATAAATC AAAACTTTCA ACAALGGATC TCTTGGTCTT GGCATCGATG 156  
 ITS-PAX G--TTTGA- -----CTTTG AATATAAAAT CAGTCAA--- ----- --AACTTTCA ACAALGGATC TCTTGGTCTT GGCATCGATG 223  
 ITS E-CAL G--TTTGA ACATATTTG AATAC---T TATTAAAAAT AC----- --AACTTTCA ACAALGGATC TCTTGGTCTT GGCATCGATG 193

ITS-MOS AAGAACGCAG GAANTGCGA TAGTAAATGT GAATTGCAGA ATTCAGT GAA TCATCGATC TTTGAACGCA TATTGGGCTC TCCAGTATTC 245  
 ITS A-CAL AAGAACGCAG GAANTGCGA TAGTAAATGT GAATTGCAGA ATTCAGT GAA TCATCGATC TTTGAACGCA TATTGGGCTC TCCAGTATTC 246  
 ITS-PAX AAGAACGCAG GAANTGCGA TAGTAAATGT GAATTGCAGA ATTCAGT GAA TCATCGATC TTTGAACGCA TATTGGGCTC TCCAGTATTC 313  
 ITS E-CAL AAGAACGCAG GAANTGCGA TAGTAAATGT GAATTGCAGA ATTCAGT GAA TCATCGATC TTTGAACGCA TATTGGGCTC TCCAGTATTC 283

**5.8S** ←

ITS-MOS TGGCGGCAT GCTGTTCGA GCGTCATTTT AACCC-TCAA GCTCAGCTT -GTGTTGGGG ATCGGCAGCG CGTCTCCGG TTCGCCCGT 333  
 ITS A-CAL TGGCGGCAT GCTGTTCGA GCGTCATTTT AACCC-TCAA GCTCAGCTT -GTGTTGGGG ATCGGCAAG CGTCTCCGG GTCGCGCGT 334  
 ITS-PAX GGGCGGCAT GCTGTCCGA GCGTCATTG TGCCCATCAA GCCCGGCTT TGTGTTGGG- -TCGTC--G T-CCCCCGG G--GGACGGG 395  
 ITS E-CAL GGGCGGCAT GC----- ----- -----TT--G T----- 299

ITS-MOS CCACCAAATT TAGTGGCGGT CTCGCTGTAG CTTCCCTC-TG CGTA--GTAA TACACCTCGC TCTGGAGTA- -CTCGG-TGC GACCACGCCG 417  
 ITS A-CAL CCCCAAATA TAGTGGCGGT CTCGCTGTAG CTTCCCTC-TG CGTA--GTAA TACACCTCGC TCTGGAGTA- -CTCGG-TGC GACCACGCCG 418  
 ITS-PAX CC-CGAAAGG CAGCGCGG- CACG-TGTCC GGTCCTCGAG CGTATGGGGC TTTGTCACCC GCTCGATTAG GGCCGGCCGG GCGCCAGCCG 482  
 ITS E-CAL ----- 299

ITS-MOS TAAAACCC-- CCAACTTTTT CTGGATGACC TCGAAT----- 451  
 ITS A-CAL TAAAACCC-- CCAACTTTTT CTGGTGGACC TCGAAT----- 452  
 ITS-PAX ACGTCTCCAA CCACTTTTTT CAGGTTGACC TCGGATCAGG TAGGGATACC CGTGAACCT AAGCATATCA ATAAGCGGAG GA 564  
 ITS E-CAL ----- 299

**Figure 19 : Comparaison des séquences ITS-A de *G. mosseae* UAORS SR 103  
et à *G. caledonium* UAORS 130**

Les nucléotides encadrés sont communs aux 2 séquences

ITS-MOS	CCCATGTGAA CATACTGTT TCGTTCCCTC GG	GGTGTCC GGCAACGGCC	50
ITS A-CAL	CCCATGTGAA CATACTGTT TCGTTCCCTC GG	GGTGTCC GGCAACGGCC	50

ITS-MOS	CGCCAGAGGA CCCAACAAAC TCTTTTGAAT TTTTCAGTAT	TTTCTGAGTG	100
ITS A-CAL	CGCCAGAGGA CCCAACAAAC TCTTTTGAAT TTTTCAGTAT	TTTCTGAGTG	100

→ 58S

ITS-MOS	AAAAAACAA TAGTCAAAA CTTTCAACAA CCGATCTCTT	GGTCTGGCA	149
ITS A-CAL	AAAAAACAA TAGTCAAAA CTTTCAACAA CCGATCTCTT	GGTCTGGCA	150

ITS-MOS	TCGATGAAGA ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT	TGCAGAATTC	199
ITS A-CAL	TCGATGAAGA ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT	TGCAGAATTC	200

ITS-MOS	AGTGAATCAT CGAATCTTTG AACGCACATT GCGCCCGCCA	GTATCTGGC	249
ITS A-CAL	AGTGAATCAT CGAATCTTTG AACGCACATT GCGCCCGCCA	GTATCTGGC	250

58S ←

ITS-MOS	GGGCATGCCT GTTCGAGCGT CATTTCAACC CTCAAGCTCA	GCTTGGTGTT	299
ITS A-CAL	GGGCATGCCT GTTCGAGCGT CATTTCAACC CTCAAGCTCT	GCTTGGTGTT	300

ITS-MOS	GGGGATCGGC AAGGCGTCCT CCGGTCGCT	CCGTCCCA AATTAGTGG	349
ITS A-CAL	GGGGATCGGC AAGGCGTCCT CCGGTCGCT	CCGTCCCA AATTAGTGG	350

ITS-MOS	CGGTCTCGCT GTAGCTTCCT CTGCGTAGTA ATACACCTCG	CTCTGGAGTA	399
ITS A-CAL	CGGTCTCGCT GTAGCTTCCT CTGCGTAGTA ATACACCTCG	CTCTGGAGTA	400

ITS-MOS	CTCGGTGCGA CCACGCCGTA AAACCCCAA CTTTTCTGG	TTGACCTCGA	449
ITS A-CAL	CTCGGTGCGA CCACGCCGTA AAACCCCAA CTTTTCTGG	TTGACCTCGA	450

ITS-MOS	AT	451
ITS A-CAL	AT	452

**CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

Les études histologiques du système racinaire pivotant de la légumineuse arborescente *Acacia albida* montrent que la mycorhization est effective jusqu'à 4,5 m dans les régions soudano-guinéennes et à plus de 34 m dans les régions typiquement sahéliennes du Sénégal. Pour la première fois, une telle distribution en profondeur est mentionnée dans l'histoire des symbioses végétales. Ceci a montré les grandes possibilités d'adaptation de ces symbiotes obligatoires que ne peuvent ressortir, les investigations généralement réalisées sur des plantes à système racinaire peu profond tel celui des graminées. L'importance de la mycorhization varie en fonction des saisons pluvieuse et sèche, de l'âge de l'arbre et des propriétés physicochimiques des sols. La diminution en profondeur du nombre des propagules MVA, spores en particulier, apparaît lié à une modification des propriétés physicochimiques du sol (moins de matière organique, diminution de la porosité et de l'aération). Il serait intéressant d'étudier la dynamique des populations MVA en relation avec les facteurs physiques et biologiques dans ces zones.

L'étude combinée du nombre total et viable des spores donne des renseignements écologiques sur les champignons MVA, un indicateur sur les potentialités de mycorhization. Il est fort probable que les champignons MVA jouent aussi en profondeur un rôle dans les cycles biochimiques. La rapide capacité de ces souches à se multiplier en présence de plantes pièges et leurs rôles positifs dans la croissance des semis d'acacias en serre (résultats non montrés) indiquent leur efficacité.

La croissance et la nutrition minérale des provenances d'*A. albida* sont améliorées en présence de microorganismes symbiotiques. L'étude comparée sur sols stérile et non stérile a révélé que les microorganismes du sol pouvaient agir positivement sur les paramètres de croissance de l'arbre. L'inoculation par des symbiotes en pépinières des acacias sur sol stérile peut donc améliorer les conditions de reboisement. Toutefois, une augmentation de l'amplitude écologique des symbioses acacias, nécessite de comprendre les réponses physiologiques des symbiose acacias dans diverses conditions (stress salins, hydriques et thermiques prépondérants dans les régions du Sahel).

La culture de *G. intraradices* et de *G. versiforme* avec ou sans association de partenaire végétal a montré un comportement biotrophique différent des deux champignons. Pour la première fois une propagule isolée (fragment mycorhizien) produit une biomasse hyphale et a la capacité de sporuler *in vitro* sur des milieux aussi pauvres que le Bacto-agar et le milieu minimal M. La richesse des vésicules internes en réserves lipidiques peut donc permettre de supporter un développement à long terme du champignon à partir de cellules racinaires à métabolisme très réduit. L'absence de tests biologiques fiables et non destructifs sur l'état physiologique, ne permet pas de dire avec quasi certitude qu'il s'agit d'un mode de vie saprophytique *in vitro*, même si ce dernier est souvent observé dans le cas d'une coculture à long terme avec un matériel frais. Il nous semble évident que les facteurs physicochimiques sont les facteurs déterminants pour réaliser la culture pure du champignon MVA. Nous pensons cependant que la complexité de certains milieux de culture peut aussi ralentir le développement optimal des biotrophes obligatoires.

Le développement intense des deux champignons sur milieu minimal M et SR modifié en présence de racines isolées, confirme les résultats déjà obtenus sur ces milieux et montre qu'ils renferment des éléments nutritifs utiles à la culture et à la multiplication des champignons MVA. La culture continue des souches MVA par des subcultures sur le milieu SR modifié permet d'avoir une production régulière d'inoculum et surtout de maintenir pour la première fois la permanence *in vitro* des souches MVA du Sahel. Il devient alors possible de vérifier si une souche conserve ou non son potentiel infectieux au cours de multiples repiquages et même d'approfondir au niveau moléculaire la notion de permanence génétique. La possibilité de suivre de façon non destructive l'évolution des champignons symbiotiques par ces techniques culturales, a conduit à l'élaboration d'une proposition de cycle de développement des *Glomus*.

L'infectivité *in vivo* des MVA de *G. versiforme* par la technique "most probable number" MPN, ouvre des perspectives d'utilisation au champ du champignon. Des milliers de propagules infectieuses peuvent être produites dans une boîte de Petri après une culture et subculture. La méthode du potentiel infectieux mycorhizien (PIM) (Plenchette et al., 1989) devrait cependant permettre d'éprouver la qualité de l'inoculum de différentes générations de champignons MVA obtenus *in vitro*. L'enrobage de ces propagules dans des billes d'alginate,

devrait augmenter la performance au champ comme dans le cas des propagules de *Glomus* cultivés en serre (Strullu et Plenchette, 1991).

La caractérisation par les critères morphologiques, montre la diversité des espèces MVA d'*A. albida*. Les champignons appartiennent à l'ordre des Glomales selon la description de Morton et Benny (1990). Les genres *Glomus* et *Gigaspora* sont prépondérants aussi bien en surface et en profondeur des sols des différentes zones écoclimatiques du Sénégal. Les genres *Acaulospora* et *Scutellospora* signalés dans l'étude écologique n'ont cependant pas été retrouvés dans notre étude taxonomique détaillée. D'autres cultures monosporales de ces souches sont nécessaires pour mieux répertorier et exploiter le potentiel des mycorhizes VA d'*A. albida*.

La multiplication *in vitro* de différents isolats MVA en présence des racines isolées indique la reproductibilité des systèmes de culture utilisés. La culture continue *in vitro* des souches sahéliennes d'*A. albida* en plus de permettre d'évaluer la qualité de l'inoculum ouvre des possibilités de production à l'échelle et sans contaminants. Il convient maintenant d'adapter ces systèmes pour étudier en conditions contrôlées le rôle des partenaires symbiotiques en situation de stress. Ce système de culture axénique offre déjà les possibilités d'étudier entre les champignons et les pathogènes et entre différentes espèces de champignons symbiotiques (Douds et Bécard, 1993; Behnamou et al., 1993). Une autre voie est d'exploiter la capacité des racines isolées d'*A. albida* de croître *in vitro* et de régénérer la plante entière en présence de substances hormonales (Ahée et Duhoux, 1994). Une étude comparée entre les systèmes de culture *in vitro* de champignon MVA en présence de racines isolées et/ou de la plante entière, contribuera à l'amélioration des connaissances sur les relations nutritionnelles symbiotiques. Les paramètres physiologiques de vie symbiotique tels que la synthèse de protéines spécifiques pourront être étudiés chez *A. albida* en culture *in vitro* comme dans le cas des symbioses ectomycorhiziennes (Simoneau et al., 1994b). Il serait aussi utile de voir si l'effet bénéfique de ces composés phénoliques sur la germination et la croissance du champignon MVA (Bécard et al., 1992) se maintient chez les associations en situations de carence ou d'excès en phosphore.

Les travaux d'identification des champignons MVA par les outils de la biologie moléculaire, nous ont permis de mettre au point une méthode d'extraction d'ADN bien adaptée à l'étude de ces biotrophes obligatoires et de sélectionner une paire d'amorces amplifiant la région

ITS pour l'étude de la variabilité des espèces. Les amorces ITS1-ITS4 permettent l'amplification des régions espaçant les gènes codant pour les grands ADNr. Ces régions à l'inverse des gènes des ARNr présentent un haut degré de variabilité de séquence entre des champignons appartenant à différentes espèces. Les résultats obtenus par l'utilisation des amorces ITS sur des ADN de suspensions sporales montrent que ces marqueurs moléculaires permettent de réaliser un diagnostic rapide de la qualité des souches maintenues *in vitro* dans des cultures et subcultures par rapport à la souche monosporale ou monovésicule d'origine.

Toutefois ces amorces étant universelles, nous avons pu vérifier que leur utilisation avec des ADN extraits à partir de racines mycorhizées pose des problèmes puisque l'ADN végétal risque aussi d'être amplifié. Pour un suivi qualitatif et quantitatif lors des expériences de terrain, il est donc utile de définir une séquence consensus non présente dans l'ADN des végétaux ou d'autres champignons non MVA à l'une des paires d'amorces ITS pour la détection *in planta* comme dans le cas des champignons ectomycorhiziens (Gardes et Burns, 1993).

Nous sommes à mesure d'affirmer que les techniques culturelles développées *in vitro*, permettent le développement des symbiotes obligatoires et élargissent les perspectives de recherches fondamentale et appliquée. La constitution d'une collection de souches MVA en conditions *in vitro* à partir de la forme intraracinaire, donne un accès à la biodiversité des champignons MVA vivant en symbiose avec les plantes terrestres. La culture continue des mycorhizes par des subcultures doit garantir l'obtention de la quantité et de la qualité de l'inoculum nécessaire à l'utilisation des des mycorhizes dans le cadre de pratiques agrosylvicoles se préoccupant de la limitation des intrants chimiques.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Ahonen U, Markkola AM, Ohtonen R, Tarvainen O, Vare H (1990) Determination of peroxidase activity in some fungi and in mycorrhizal and non mycorrhizal *Pinus sylvestris* roots. *Aquilo ser Botanica* 26: 25-30
- Allen MF, Moore TS, Christensen M (1980) Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. *Can J Bot* 58: 371-374
- Allen MF, Moore TS, Christensen M (1982) Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscissic-acid in the host plant. *can J Bot*, 60: 468-471
- Alexander M (1965) Most probable number method for microbial populations. In: Black CA (ed) *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. pp 1467 - 1472
- An ZQ, Hendrix JW (1988) Determining the viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* 80: 259-261
- Arines J, Palma JM, Vilarino A (1993) Comparison of protein patterns in non mycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal roots of red clover. *New Phytol* 123: 763-768
- Azcon-aguilar C, Barea JM (1985) Effect of soil micro-organisms on formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Trans Br Mycol Soc* 84: 536-537
- Bâ AM, Baladji B, Piché Y (1994) Effect of time of inoculation on *in vitro* ectomycorrhizal colonization and nodule initiation in *Acacia holosericea* seedlings. *Mycorrhiza* 4, 109-119
- Ball DF (1986) Site and soils. In: Moore PD, Chapman SB (eds) *Methods in Plant Ecology*. Blackwell, Oxford, pp 215-284
- Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen fixing systems. In: Varma A, Norris JR, Read DJ (eds) *Methods in Microbiology, Vol 24 : Experiments with Mycorrhizae*. Academic Press, New York, pp 391-415
- Bécard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211-218
- Bécard G, Piché Y (1989) Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55: 2320-2325

- Bécard G, Piché Y (1992) Establishment of VA mycorrhizae in root organ culture: Review and proposed methodology. In: Varma A, Norris JR, Read DJ (eds), *Methods in Microbiology*, Vol 24: Experiments with Mycorrhizae. Academic Press, New York, pp 89-108
- Bécard G, Pfeffer PE (1993) Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* 174: 62-68.
- Bécard G, Doude DD, Pfeffer PE (1992) Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Appl Environ Microbiol* 58: 821-825
- Berch S (1988) *Compilation of the Endogonaceae*. Mycologue, Waterloo, Canada
- Bianciotto V, Bonfante P (1993) Evidence of DNA replication in an arbuscular mycorrhizal fungus in the absence of host plant. *Protoplasma* 176: 100-105
- Bierman B, Linderman RG (1983) Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradicles vesicles and extraradicles vesicles as inoculum. *New Phytol* 95: 97-105
- Black R, Tinker PB (1979) The development of endomycorrhizal root systems. II. Effect of agronomic factors and soil conditions on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in barley and on the endophyte spore density. *New Phytol* 83: 401-413
- Bremner JM, Mulvaney CS (1982). Nitrogen total. In: Page AL, Miller RJ, Keeney DR (eds) *Methods of Soil Analysis in Chemical and Microbiological Properties*. Madison, Wisconsin, ASA-SSSA, pp 595-624
- Burggraaf AJP, Beringer JE (1989) Absence of nuclear DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *New Phytol* 11: 25-33
- Caar GR, Hinkley F, Le Tacon F, Hepper CM, Jones MGK, Thomas E (1985) Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of suspension-cultured plant cells. *New Phytol* 101: 417-426
- Campbell CS, Baldwin BG, Donoghue MJ, Wojciechowski MF (1993) Toward a phylogeny of *Amelanchier* (*Rosaceae* : *Maloideae*): evidence from sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA (nr DNA). *Am J Bot* 80: abstract 398
- Capesius I (1993) sequence of the 5S rRNA gene from *Brassica nigra* and its relation to other 5S rRNA genes from the *Brassicaceae*. *J.Plant Physiol* 142: 112-114

- Chabot S, Bécard G, Piché Y (1992a) Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84: 315-321
- Chabot S, Bel-Rhliid R, Chénnevert R, Piché Y (1992b) Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>-enriched conditions. *New Phytol* 122: 461-467.
- Colonna JP, Thoen D, Ducouso M, Badji S (1991) Comparative effects of *Glomus mossae* and P fertilizer on foliar mineral composition of *Acacia senegal* seedlings inoculated with *Rhizobium*. *Mycorrhiza* 1, 35-38
- Cooper KM, Tinker PB (1978) Translocation and transfer of nutrients in vesicular arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus zinc and sulfur. *New Phytol* 181: 43-52
- David D, Bécard G (1993) Competitive interaction between *Gigaspora margarita* and *Gigaspora gigantea*. In: 9th North American Conference on Mycorrhizae, Guelph, Canada, p 129.
- CTFT (1988) *Faidherbia albida*: monographie. Centre Technique Forestier Tropical, Nogent sur Marne, France, 72p
- Declerck S, Devos B, Delvaux B, Planchette C (1994) Growth response of micropropagated banana plants to VAM inoculation. *Fruits* 49: 103-109
- Dehne HW, Backhaus GF (1986) The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in plant production. I. Inoculum production. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz* 93: 415-424
- Diem HG, Gueye I, Gianinazzi-Pearson V, Fortin JA, Dommergues YR (1981) Ecology of VA mycorrhizae in the tropics : the semi-arid zone of Senegal. *Acta œcol œcol Plant* 2: 53-52
- Diop TA (1990) Méthodes axéniques de production d'inocula endomycorhiziens à vésicules et arbuscules : étude avec le *Gigaspora margarita*. M Sc Thesis, Univ Laval, Québec
- Diop TA, Piché Y (1990) Long-term outcome of an endomycorrhizal symbiosis under axenic conditions. In: 8<sup>th</sup> North American Conference on Mycorrhizae, Jackson Hole, Wyoming, p 81
- Diop TA., Bécard G, Piché Y (1992a) Long-term *in vitro* culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of Carrot. *Symbiosis* 12: 249-259

- Diop TA., Gueye M, Bécard G, Piché Y, Fortin JA (1992b) La culture *in vitro*: un outil privilégié de production d'inocula de mycorrhizes à vésicules et arbuscules. In: International Foundation for Science (ed), Interactions between Plants and Microorganisms. Grev Turegatan, Stockolm, pp. 429-440
- Diop, TA, Plenchette, C et Strullu, DG (1993) Les endomycorhizes d'*Acacia albida* : écologie et méthodes axéniques de culture. Bois et Forêts des tropiques: 238, 28
- Diop TA, Plenchette C, Strullu DG (1994a) Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. Mycorrhiza 5: 17-22
- Diop TA, Gueye M, Dreyfus BL, Plenchette C, Strullu DG (1994b) Indigenous arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Acacia albida* Del in different areas of Senegal. Appl Environ Microbiol: 60, 3433-3436
- Diop TA, Plenchette C, Strullu DG, Gueye M, Dreyfus BL (1994c) Les acacias du Sahel: un espoir pour l'agriculture. La Recherche 269: 1045-1048
- Diop TA, Plenchette C, Strullu DG (1994d) *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. Symbiosis 17: 217-227
- Donner LW, Bécard G (1991) Solubilization of gellan gels by chelation of cations. Biotechnol Techn 5: 25-28
- Dreyfus BL, Dommergues YR (1981) Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. Appl Environ Microbiol 41: 97-99
- Ducouso M (1991) Thèse de l'Université Claude Bernard, Lyon, France
- Dumas-Godot E, Grenier J, Furlan V, Asselin A (1992) Chitinase, chitosanase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonised by *Glomus* species. Plant Science 84:17-24
- Duponnois R, Garbaye J (1991) Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir *Laccaria laccata* symbiosis: effects in vitro and in glasshouse conditions. Ann Sci For 48: 239-251
- Dupuy NC, Dreyfus BL (1992) *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. Appl Environ Microbiol 58: 2415-2419
- Dupuy N, Détéz C, Neyra M, De Lajudie P, Dreyfus B (1991) Les acacias fixateurs d'azote du Sahel. La Recherche 233: 802-804

- Elías KS, Safir GR (1987) Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Appl Environ Microbiol* 53: 1928-1933
- Elmes RP, Mosse B (1984) Vesicular-arbuscular inoculum production. II. Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. *Can J Bot* 62: 1531-1536
- Fisher RA, Yates F (1948) Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Edinburg, Olivier and Boyd, 3rd ed, Table VIII2
- Fitter AH, Garbaye J (1994) Interactions between mycorrhizal fungi and other organisms. *Plant and Soil* 159: 123-132
- Francis R, Finlay RD, Read DJ (1986) Vesicular-arbuscular in natural vegetation systems. IV. Transfer of nutrient in inter and intra-specific combinations of host plants. *New Phytol* 102: 103-111
- Frank AH (1885) Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Bericht der deutschen botanischen Gesellschaft* 3: 128-145
- Furlan V, Fortin JA (1973) Formation of endomycorrhizae by *Endogone calospora* under three temperatures regimes. *Nat. Can.* 100: 467-477
- Furlan V, Fortin JA (1975) A flotation-bubbling system for collecting Endogonaceae spores from sieved soil. *Nat Can* 102: 663-667
- Furlan V, Bartschi H, Fortin JA (1980) Media for density gradient extraction of endomycorrhizal spores. *Trans Br Mycol Soc* 60: 1-21
- Galabert, J (1972) Les arbres les plus utiles de Haute-Volta. Publication du centre culturel Franco-Voltaïque
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soils by wet-sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc* 46: 235-244
- Gianinazzi-Pearson V, Diem HG (1982) Endomycorrhizae in the tropics. In: Dommergues YR, Diem HG (ed.) *Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity*, Junk, the Hague, pp 209-251
- Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Trouvelot A (1985) Evaluation of the infectivity and effectiveness of indigenous vesicular-arbuscular fungal populations in some agricultural soils in Burgundy. *Can J. Bot.* 63: 1521-1524

- Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S (1989) *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-245
- Giffard PL (1971) Recherches complémentaires sur *Acacia albida* (Del). *Bois et Forêts des Tropiques* 135: 3-20
- Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489-500
- Gueye M., Diop TA et Ndaw B (1992) *Acacia albida*, une légumineuse arborescente à fort potentiel mycorrhizien et fixateur d'azote. In: International Foundation for Science (ed) *Interactions between Plants and Microorganisms*. Grev Turegatan, Stockholm, pp 452-461
- Halevy G (1971) A study of *Acacia albida* in Israël. *La Yaaran* 21: n<sup>os</sup> 3-4
- Hardie K, Leyton L (1981) The influence of VA mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphate deficient soil. *New Phytol* 89: 599-608
- Harley JL (1989) The significance of mycorrhiza. *Mycol Res* 92: 129-139
- Harley JL, Smith SE (1983) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, New York and London
- Hayman DS (1970) Endogone spore numbers in soil and vesicular-arbuscular in wheat as influenced by season and soil treatment. *Trans Br Mycol Soc* 54: 53-63
- Henrion B, Chevalier G, Martin F (1994) Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol Res* 98: 37-43
- Hepper CM (1979) Germination and growth of *Glomus caledonius* spores: the effects of inhibitors and nutrients. *Soil Biol Biochem* 11: 269-277
- Hepper CM (1983) Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. *New Phytol* 93: 537-542
- Hepper CM, Jacobsen I (1983) Hyphal growth from spores of the mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*: effect of amino-acids. *Soil Biol Biochem* 15: 55-58
- Hepper CM, Smith GA (1976) Observations on the germination of endogone spores. *Trans Br Mycol Soc* 66: 189-194
- Hetrick BAD (1984) Ecology of VA mycorrhizal fungi. In: Powell CLL, Bagyaraj DJ (eds), *VA mycorrhiza*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 35-36

- Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW (1991) Molecular techniques in taxonomy. Springer Verlag, Berlin
- Hilbert JL, Costa G, Martin F (1991) Ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of Eucalypt mycorrhiza development. *Plant physiol* 81: 802-806
- Ikram A, Mahmud AW, Chong K, Faizah AW (1993) Growth responses of *Calopogonium caeruleum* to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and bradyrhizobia. *Field Crops Research* 31: 131-134
- Ishac YZ, Angle JS, El-Borollosy ME, El-Demerdash ME, Mostafa MI, Fares CN (1994) Growth of *Vicia faba* as affected by inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium leguminosarium* bv. *vicia* in two soils. *Biology and Fertility of Soils* 17: 27-31
- Jasper DA, Abott LK, Robson AD (1991) The effect of soil disturbance on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soils from different vegetation types. *New Phytol* 118: 471-476
- Johnson PN (1977) Mycorrhizal Endogonaceae in a New Zealand forest. *New Phytol* 18: 161-170
- Koide RT, Schreiner RP (1992) Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 557-581
- Lesica P, Antibus RK (1986) Mycorrhizae of alpine fell-field communities on soils derived from crystalline and calcareous parent materials. *Can J Bot* 64: 1691-1697
- Magrou J (1946) Sur la culture de quelques champignons de mycorrhizes à arbuscules et à vésicules. *Revue Générale de Botanique* 53:49-77
- Manning K (1991) Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Analytical Biochem* 195: 45-50
- McGee PA (1989) Variation in propagules numbers of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in a semi-arid soil. *Mycol Res* 92: 28-33
- Menge JA, Jarrel WM, Labanauskas CK, Ojala JC, Huszar C, Johnson ELV, Sibert D (1981) Predicting mycorrhizal dependency of troyer citrange on *Glomus fasciculatus* in California citrus soils and nursery mixes. *Soil Sci Soc Am J* 46: 762-768
- Miller-Wideman MA, Watrub LS (1984) Sporulation of *Gigaspora margarita* on root cultures of tomato. *CanJ Bot* 30: 642-646

- Morandi D (1989) Effects of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. *Plant Physiol Biochem* 27: 697-701
- Morton JB, Benny GL (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes) : a new order, Glomales, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* 37: 471-491
- Mosse B (1988) Some studies relating to "independent" growth of vesicular-arbuscular endophytes. *Can J Bot* 66: 2533-2540
- Mosse B, Hepper CM (1975) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiol Plant Pathol* 5: 215-223
- Mugnier J, Mosse B (1987) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri-T DNA root grow axenically. *Phytopatology* 77: 1045-1050
- Myers RM, Maniatis T, Lerman L (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155: 501-527
- Niederhofer MA, Schenck NC (1987) Morphological diversity within a single-arbuscular mycorrhizal fungus (VAMF) in a mixed hardwood forest in north Florida. In: Sylvia DM, Hung LL, Graham, JH (eds), 7<sup>th</sup> Nord American Conference on mycorrhizae, mycorrhizae in the next decade, practical application and research priorities. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, p 318
- Ojala JC, Jarrel WM (1980) Hydroponic sand culture systems for mycorrhizal research. *Plant and Soil* 57: 297-303
- Olsen SR., Cole CV, Watanabe FS, Dean LA (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. In: United States Department of Agriculture Circular n° 939
- Omar MB, Bolland L, Heather WA (1979) A permanent mounting medium for fungi. *Bull Br Myc Soc* 13: 31-32
- Orita M, Iwattana H, Kanazawa H, Hayashi K, Seikiyat K (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polyphormisms. *Proc Natl Acad Sci* 86: 2766-2770

- Osonubi O, Bakare ON, Mulongoy K. (1992) Interaction between drought stress and vesicular-arbuscular mycorrhiza on the growth of *Faidherbia albida* (syn. *Acacia albida*) and *Acacia nilotica* in sterile and non-sterile soils. *Biology and Fertility of soils* 14: 159-165
- Perrin R (1991) Mycorrhizes et protection phytosanitaire. In: Strullu DG, Perrin R, Plenchette C, Garbaye J (ed), *Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Technique et documentation*, Lavoisier, Paris, France, pp 93-130
- Peyronel B, Fassi B, Fontana A, Trappe JM (1969) Terminology of mycorrhizae. *Mycologia* 61: 410-411
- Pfender WF, Rouse DI, Hagedorn DJ (1981) A "most probable number" method for estimating inoculum density of *Aphanomyces euteiches* in naturally infested soil. *Phytopathology* 71: 1169-1172
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55: 158-161
- Pirozynski KA, Dalpé Y (1989) Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 7: 1-36
- Pirozynski AH, Malloch DW (1975) The origin of land plants. A matter of mycotrophism. *Biosystems* 6: 153-154
- Plenchette C (1991) Utilisation des mycorrhizes en agriculture et horticulture In: Strullu DG, Perrin R, Plenchette C, Garbaye J (ed), *Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Technique et documentation*, Lavoisier, Paris, France, pp 131-196
- Plenchette C, Perrin R (1992) Evaluation in the greenhouse of the effects of fungicides on the development of mycorrhiza on leek and wheat. *Mycorrhiza* 1: 59-62
- Plenchette C, Furlan V, Fortin JA (1982) Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. *J Amer Hort Sci* 107: 535-538
- Plenchette C, Furlan V, Fortin JA (1983) Responses of endomycorrhizal plants grown in a calcined montmorillonite clay to different levels of soluble phosphorus. I. Effect of growth and mycorrhizal development. *Can J Bot* 59: 2003-2008
- Porter WM (1979) The "most probable number" method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Aust J Soil Res* 17: 515-519

- Cl CL (1980) Mycorrhizal infectivity of eroded soils. *Soil Biol Biochem* 12: 247-250
- Scott SC, Winslow, CEA, McCrady MH (1946) *Water bacteriology*. John Wiley & Sons, Inc. New York
- ad DJ, Kouček HK, Hodgson J (1976) Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. I. The occurrence of infection. *New Phytol* 77: 641-653
- onald P, Söderhäll K (1985) Phenylalanine ammonia lyase and peroxidase activity in mycorrhizal and non mycorrhizal short roots of scots pine, *Pinus Sylvestris* L. *New Phytol* 101: 487-494
- sambrook J, fritch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New-York
- Sauter M, Hager A (1989) The mycorrhizal fungus *Amanita muscaria* induces chitinase activity in roots and in suspension-cultured cells of its host *Picea abies*. *Planta* 179: 61-66
- Schenck NC, Pérez Y (1990) *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*. Synergic Publicatios, Gainesville, Florida
- Sieverding E (1991) *Vesicular-arbuscular mycorrhiza managment in tropical agrosystems*. Technical cooperation, germany
- Simon L, Lalonde M, Bruns T (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Env Microbiol* 58: 291-295
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- Simoneau P, Viemont JD, Moreau JC, Strullu DG (1993) Symbiosis-related polypeptides associated with the early stages of ectomycorrhiza organogenesis in birch (*Betula pendula* Roth). *New Phytol* 124: 495-504
- Simoneau P, Louisy-Louis N, Plenchette C, Strullu DG (1994a) Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Appl Environ Micorbiol* 60: 1810-1813
- Simoneau P, Juge C, Dupuis JY, Viemont JD, Moreau JC, Strullu DG (1994b) Protein biosynthesis changes during mycorrhiza formation in roots of micropropagated birch. *Acta Bot Gallica* 141: 429-435

- Simoneau P, Viemont JD, Feugey L, Stullu DG (1994c) Phenylalanine ammonia-lyase activity in birch roots during ectomycorrhiza development. In: de Kouchkovsky Y, Lahrher F (eds), Plant Sciences. SFPV, Paris, p249
- Strullu DG (1985) Les mycorhizes. Handbuch der Pflanzenanatomie Gebruder Borntraeger, Berlin et Stuttgart
- Strullu DG, Romand C (1986) Méthode d'obtention d'endomycorhies à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. C R Acad Sci Paris 303: 245-250
- Strullu DG, Romand C (1987) Culture axénique de vésicules isolées à partir d'endomycorhizes et ré-association *in vitro* à des racines de Tomate. C R Acad Sci Paris 292: 153-156
- Strullu DG, Gouret JP, Garrec JP (1981) Microanalyse des granules vacuolaires des ectomycorhizes, endomycorhizes et endomycorhales. Physiologie Végétale 19: 367-378
- Strullu DG, Perrin R, Plenchette C, Garbaye J. (1991a). Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. Lavoisier, Paris
- Strullu DG, Romand C, Plenchette, C (1991b) Axenic culture and encapsulation of the intraradical forms of *Glomus spp.* World Journal of Microbiology and Biotechnology 7: 292-297
- Strullu DG, Diop TA, Plenchette C (1995) Constitution de collections *in vitro* de *glomus* par culture continue de la forme intraracinaire. C R Acad Sci Paris, soumis
- Sun JS, Simpson RJ, Sands R (1922) Nitrogenase activity of two genotypes of *Acacia mangium* as affected by phosphorus nutrition. Plant and Soil 144: 51-58
- Sutton JC, Barron GL (1972) Population dynamics of Endogone spores in a heathland area of southeastern Australia. Aust J Bot 26: 29-43
- Sylvia DM, Jarstfer AG (1992) Sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Appl Environ Microbiol 58: 229-232
- Thaxter R (1992) A revision of the Endogonaceae. Proceedings of American Academy of Arts and Science 57: 291-351
- Tommerup IC, Abbott LK (1981) Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. Soil Biol Biochem 13: 431-433
- Trochain JL (1969) Le rythme phénologique aberrant de *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev.(*Mimosaceae*). Annales Scientifiques de l'Université de Besançon, Botanique, Série III, 7-13

- Walkey A, Black IA (1934) An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-38
- White PR (1943) In: Cattell J (ed), *A handbook of plant tissue culture*. Lancaster, Pa.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR protocol : a guide to methods and applications*. Academic Press, New-York, pp 315-322
- Williams PG (1992) Axenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Varma AK, Norris JR, Read DJ (eds), *Methods in microbiology*, Vol 24. Academic Press, London, pp 203-219
- Wong KKY, Fortin JA (1989) A Petri dish technique for the aseptic synthesis of ectomycorrhizae. *Can J Bot* 67: 1713-1716
- Wyss P, Bonfante P (1993) Amplification of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycol Res* 97: 1351-1357
- Zézé A, Dulieu H, Gianinazzi-Pearson V (1994) DNA cloning and screening of a partial genomic library from an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora castanea*. *Mycorrhiza* 4: 251-254

**ANNEXE**

## Acacias du Sahel : un espoir pour l'agriculture

TAHIR A. DIOP, CHRISTIAN PLENCHETTE, DÉsirÉ G. STRULLU,  
MAMADOU GUEYE ET BERNARD L. DREYFUS

La Recherche 269 Octobre 1994 volume 25, pp.1045-1047

**La coopération entre un acacia du Sahel et des champignons souterrains est en passe d'être exploitée par les agronomes pour améliorer la fertilité des terres africaines**

La Légumineuse arborescente, *Acacia albida*, qualifiée d'"arbre miracle du Sahel" à cause de ses multiples fonctions (elle abrite les cultures vivrières sous son couvert, sert au reboisement et fournit du fourrage), est aussi un outil fascinant pour l'étude de micro-organismes symbiotiques des plantes. En 1991, le laboratoire de microbiologie des sols de l'ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération) de Dakar avait révélé l'existence, autour des racines de cet arbre d'importantes populations de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote (*Bradyrhizobium*), et cela jusqu'à trente cinq mètres de profondeur (voir "Les acacias fixateurs d'azote du Sahel" dans la Recherche de Juin 1991). Des recherches récentes menées en collaboration avec ce laboratoire, la station d'agronomie de l'INRA (Institut national de la recherche agronomique) de Dijon et le laboratoire de phytonique de l'université d'Angers ont mis en évidence une autre forme de symbiose, connue chez la majorité des plantes agricoles, horticoles et forestières : les mycorhizes (1). Celles-ci résultent de l'association entre des champignons vivant dans le sol et les racines des plantes (voir "Les mycorhizes : une coopération entre plantes et champignons" dans la Recherche de mai 1985). Chez l'acacia, cette symbiose existe depuis les horizons superficiels du sol jusqu'aux nappes phréatiques profondes : cette extension exceptionnelle est une nouveauté dans l'histoire des symbioses végétales.

Les racines d'*Acacia albida* avec des champignons de la famille des Zygomycètes (symbiotes obligatoires) constituent des mycorhizes dites à vésicules et arbuscules, en raison de la formation par le mycélium de renflements et de minuscules ramifications intracellulaires. Ce type de mycorhizes est le plus répandu; on le trouve dans tous les types de cultures : les formations à graminées et légumineuses des prairies, les cultures de serre et de plein champ (haricot, arachide, blé, maïs, tomate, coton, riz, sorgho etc.), les productions ornementales, fruitières et légumières (rosier, framboisier, fraisier, pommier, poireau, poirier, pois, etc.). Seules quelques Crucifères (choux, radis) et Chénopodiacées agricoles (betteraves, épinards) ne sont pas régulièrement associées à des champignons. Les champignons mycorhiziens, qui n'effectuent pas la photosynthèse utilisent les sucres produits dans la plante pour accomplir leurs cycles biologiques. En échange, ils fournissent de l'eau et des éléments minéraux à la plante. Le développement du champignon se fait à la fois à l'extérieur et à l'intérieur de la racine (voir la figure). Ses structures typiques se rattachent à celles des champignons mycorhiziens du genre *Glomus*. Par rapport aux racines non infestées, les associations racinaires comprenant des *Glomus* augmentent la surface d'absorption de l'eau et des sels minéraux ainsi que le volume de sol exploré. De plus, le réseau externe est capable de collecter des éléments minéraux et de l'eau dans des zones éloignées de plusieurs centimètres de la racine. En raison de cette symbiose, les plantes mycorhizées ont une meilleure nutrition minérale, résistent mieux aux agents pathogènes du sol ainsi qu'aux stress hydriques et thermiques (1, 2).

Pour étudier la distribution des mycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA) le long des racines de l'*Acacia albida*, nous avons prospecté la zone de prédilection de cet arbre au Sénégal. De véritables parcs de cette légumineuse existent au nord de ce pays, à Louga et Diokoul, où la pluviométrie moyenne annuelle varie entre deux cents et six cents millimètres, et au sud, à Djinaki et Kabrousse où elle fluctue entre huit cents et quinze cents millimètres. Dans chacune de ces quatre localités, des forages effectués à dix mètres du pied des acacias ont permis d'étudier les mycorhizes en profondeur jusqu'à la nappe phréatique, c'est-à-dire à moins de cinq mètres dans les régions du sud et à plus de seize mètres dans celles du nord.

Les sols prélevés ont été tamisés pour récolter les spores des champignons. Nous avons alors évalué le nombre total de spores viables, ainsi que le degré de colonisation racinaire, en fonction du stade de développement de l'acacia, des saisons et des propriétés physico-chimiques des sols (1). Les horizons superficiels de la rhizosphère de l'acacia sont plus riches en fragments mycorhizés et en spores dans les localités du sud que dans celles du nord, en raison de la teneur du sol en phosphore assimilable, qui est deux à quatre fois plus faible dans les régions du sud.

Les spécialistes admettent généralement que le nombre de spores et de mycorhizes diminuent avec la profondeur (2). Cette réduction de la symbiose serait liée à des modifications physico-chimiques du sol (moindre quantité de matière organique, diminution de la porosité et de l'aération notamment). Nos observations corroborent aussi ces données (3). Il existe en outre des variations locales : si à Kabrousse et à Djinaki, les mycorhizes de profondeur sont présentes jusqu'à 1,5 et 4,5 m de profondeur, elles existent encore en petit nombre jusqu'à seize et trente-quatre mètres à Diokoul et à Louga, dans les régions du nord. Compte tenu des possibilités de dissémination de fragments mycéliens (propagules), nous pensons que pour atteindre de telles profondeurs, leurs hyphes suivent la racine pivotante de l'acacia jusqu'au niveau de la nappe phréatique. En conséquence, la croissance des filaments jusqu'à la nappe dépend fortement de la vitesse de croissance racinaire. Cette dernière peut atteindre, en profondeur, plus de cinq mètres la première année de la vie de l'arbre alors que la croissance de la partie aérienne atteint à peine vingt centimètres.

La colonisation des sols par les hyphes peut donc être rapide et cela a un impact non seulement sur l'acacia mais sur tout l'écosystème. Nous avons observé que la croissance des plantes cultivées (arachide, mil, riz) est plus importante sous la frondaison des acacias. On peut supposer qu'à cet endroit le sol est plus riche en éléments minéraux et donc plus fertile. En effet, les mycorhizes en puisant les éléments minéraux en profondeur augmentent la teneur minérale des acacias, en particulier en phosphore, cuivre et en zinc. La décomposition des feuilles tombées pendant la saison des pluies fournit alors ces éléments aux niveaux superficiels du sol. Par ailleurs, les plantes annuelles qui sont cultivées à cet endroit bénéficient elles même directement de la présence des champignons symbiotiques, car ceux-ci, ayant une large gamme

d'hôtes, peuvent coloniser leurs racines. Nous avons pu vérifier, dans la zone traditionnellement agricole de Diokoul, que la densité de propagules est plus élevée dans le sol où est implanté l'acacia que dans le sol du champ environnant.

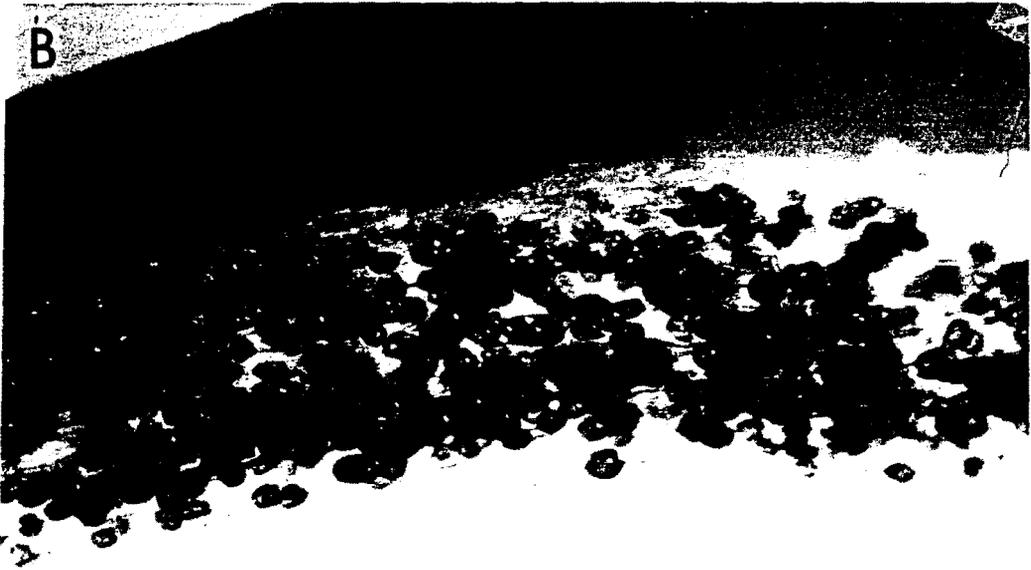
Ainsi, Les mycorhizes associées à l'acacia possèdent une grande aptitude à restaurer la végétation des sols appauvris en éléments minéraux. Les mycorhizes et les bactéries fixatrices d'azote vivant librement dans le sol (*Azotobacter*), établissent une interaction qui s'avère positive pour le développement des plantes. Cependant, malgré une grande densité de bactéries symbiotiques fixatrices d'azote (*Bradyrhizobium*) en profondeur, sous les acacias (4), les nodosités, organes, qui caractérisent la symbiose entre bactéries et légumineuses, n'ont jamais été observées sur les racines de cet arbre dans la zone typiquement sahélienne. En revanche, elles se forment sur les jeunes racines d'acacia mises en contact avec des prélèvements de sol de la nappe phréatique. Il est donc probable qu'une synergie existe entre mycorhizes et *Bradyrhizobium* libres et qu'elle permet à la plante de mieux exploiter les éléments nutritifs présents en profondeur. Cependant, la plupart des travaux réalisés dans le Sahel sur la mycorhization l'ont été avec des souches d'origines tempérées, en particulier le *Glomus mosseae* (5, 6). On ignore tout de la valeur relative des souches indigènes. Il est nécessaire avant tout de bien cerner la nature des mycorhizes de l'acacia et de préciser les analogies et les différences par rapport aux cas bien connus en régions tempérées.

Dans ce but, des cultures de différentes souches de champignons prélevées sous les acacias, sont réalisées à l'INRA de Dijon et à l'université d'Angers, soit sous serres, en association avec des semis d'*A. albida* et de poireaux, qui servent de plantes pièges, soit en conditions axéniques (milieu de culture stérile) en présence des racines isolées de tomate et de carotte transformées ou non par *Agrobacterium rhizogenes* pour avoir une croissance plus rapide et homogène. Lorsque la mycorhization est établie sur les plantes pièges, la multiplication accélérée de spores (inoculum) est assurée à partir de fragments de racines colonisées et de vésicules intraracinaires isolées selon une technique mise au point et maintenant bien maîtrisée par notre groupe (7).

L'arbre sahélien *Acacia albida* est associée à la fois à des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote et à des champignons du sol formant avec ses racines des mycorhizes. Celles-ci améliorent la nutrition minérale de l'acacia. A la suite de la décomposition sur le sol des feuilles de l'acacia, riches en éléments minéraux, les rendements des cultures effectuées sous cet arbre se révèlent supérieurs à ceux obtenus loin de l'arbre.

La photographie A montre une racine d'*A.albida* colonisée extérieurement et intérieurement par un champignon (à droite) et une autre qui n'est pas colonisée. Les structures externes du champignon sont constituées d'un réseau plus ou moins dense de filaments souterrains, les hyphes mycéliens, qui portent les organes de reproduction et de survie, les spores. Les structures internes sont représentées par des hyphes, par des renflements plus ou moins sphériques, ou vésicules (que l'on voit en B), et par des arbuscules, minuscules arborescences produites par le champignon dans les cellules racinaires. Ces arbuscules représentent les sites d'échanges des éléments nutritifs entre les deux partenaires.

(clichés A: T.A. Diop, B: D.G. Strullu et C. Romand).



### **Des mycorhizes à usage agronomique?**

L'utilisation à grande échelle des champignons mycorhiziens associés à *Acacia albida*, nécessite une production massive de spores. Cet "inoculum" peut en effet induire une mycorhization de plantes cultivées. L'encapsulation de fragments de mycorhizes ou de vésicules isolées dans des billes d'alginate de sodium présente un grand intérêt en ce sens. Pour obtenir cet inoculum, les fragments de racines mycorhizées sont tout d'abord stérilisés par un passage aux ultrasons puis par des bains successifs dans des solutions d'éthanol 96°C, d'hypochlorite de calcium, etc. Les vésicules intraracinaires sont, elles, isolées par un traitement enzymatique. Les fragments racinaires stériles et les vésicules isolées sont alors capables de germer et de produire *in vitro* des hyphes et des spores, et ainsi de rétablir la symbiose mycorhizienne en présence de l'hôte végétal. L'inoculum immobilisé dans les billes garde son potentiel après plusieurs mois de conservation à 4°C.

Les spores produites devraient servir à l'identification des souches de champignons symbiotiques selon les critères morphologiques en vigueur de la taxonomie classique (couleur, taille, forme etc...). Les outils de la biologie moléculaire compléteront ces données. Ainsi, en 1992, L.Simon et ses collaborateurs au Centre de recherche en biologie forestière (CRBF) de l'université Laval, au Québec, ont montré que la technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, amplification enzymatique de l'ADN *in vitro*) permet d'identifier les gènes des champignons zygomycètes et même de redéfinir leur généalogie. En liason avec F. Martin, de l'INRA de Nancy nous allons tenter d'établir une carte d'identité moléculaire des souches de champignons mycorhiziens isolés de l'acacia. Elles devraient notamment faciliter, lors d'essais sur le terrain, le suivi de l'installation des souches les plus efficaces pour l'acacia.

Un autre défi est d'expliquer les qualités agronomiques des plantes mycorhizées, en particulier leur meilleure résistance aux pathogènes et au stress hydrique. Il est vraisemblable que chez les acacias, comme cela a été montré pour d'autres plantes mycorhizées (10, 11), la synthèse de protéines spécifiques est induite lors de la vie en symbiose. L'élucidation du rôle de ces protéines facilitera celle des mécanismes mis en jeu lors de la formation et du fonctionnement de la mycorhize. On peut penser qu'une sélection raisonnée des souches de champignons mycorhiziens les plus efficaces pourra alors être réalisée.

L'étude de la symbiose mycorhizienne d'*Acacia albida* s'inscrit dans le cadre des études de l'Observatoire du Sahara et du Sahel (OSS). Cet organisme de lutte contre la desertification, fondé en juillet 1989 à Paris, associe vingt pays africains et diverses organisations régionales et internationales. Dans des régions aux économies très fragiles, l'utilisation d'engrais très coûteux ne peut perdurer en regard des multiples défis de développement. Nous pensons que des champignons mycorhiziens performants constituent un allié sûr pour l'agriculture de demain dans ces régions d'Afrique. Leur utilisation passe par la production massive de spores servant d'inoculum sous une forme facile à manipuler telle que les billes d'alginate (voir l'encadré). Les champignons récoltés dans des sites écologiques très contrastés permettront la création de banques d'inoculum maintenus *in vitro* ou en serre. Ces travaux viendront compléter les dispositifs qui sont d'ores et déjà suivis par le Microbial Resource Center (MIRCEN) dirigé par l'un d'entre nous (M.G.) à l'Institut sénégalais de recherche agricole (ISRA), à Dakar.

## Références

- (1) D. G. Strullu et al., Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. Techn. et Doc. Lavoisier, Paris, 1991.
- (2) Sieverding, E. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in tropical agrosystems. Technical cooperation, Allemagne fédérale, 1991.
- (3) T. A. Diop et al., Applied and Envi. Microbiol., 60, 3433, 1994.
- (4) Dupuy, N. et Dreyfus, B. L., Applied and Envi. Microbiol., 58, 8, 1992.
- (5) F. Cornet et al., INRA Publ. Dijon (ed), France, 13, 1982.
- (6) J. P. Colonna et al., Mycorrhiza, 1, 1, 1992.
- (7) D. G. Strullu et al., World J. Microb. and Biotech., 7, 1991.
- (8) L. Simon et al., Applied and Envi. Microbiol., 58, 1, 1992.
- (9) L. Simon et al., Nature Letters, 363, 1993.
- (10) P. Simoneau et al., New Phytol., 124, 4, 1993.
- (11) P. Simoneau et al., Applied and Envi. Microbiol., 60, 1810, 1994.