

Université de Bourgogne

UFR Sciences de la Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Isolement de séquences répétées du génome
d'un champignon endomycorhizogène à arbuscules
Scutellospora castanea :
Application à la détection *in planta***

THESE

présentée par

Adolphe Zézé

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Soutenue publiquement le 22 Juin 1995

devant la Commission d'Examen suivante :

Pr.	J.C. Debaud	Rapporteur
Pr.	J. Labarère	Rapporteur
Dr.	V. Gianinazzi-Pearson	Examineur
Dr.	G. Laguerre	Examineur
Pr.	H. Dulieu	Directeur de Thèse

Laboratoire de Phytoparasitologie INRA/CNRS
Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes
INRA, BV 1540, 21034 Dijon Cédex, France

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire de Phytoparasitologie INRA CNRS de Dijon grâce à une bourse d'étude qui m'a été accordée par le Ministère de la Recherche Scientifique de Côte d'Ivoire.

➔ Ma reconnaissance va tout d'abord au Dr. Silvio GIANINAZZI, Directeur de Recherche au CNRS et Directeur du Laboratoire, qui m'a fait confiance en m'acceptant dans son laboratoire pour commencer des études moléculaires sur les champignons endomycorhiziens.

➔ Je remercie très vivement Monsieur Hubert DULIEU, Professeur à l'Université de Bourgogne, qui a dirigé ce travail tout en me laissant toute liberté dans le choix des stratégies utilisées.

➔ Je remercie vivement le Dr. Vivienne GIANINAZZI-PEARSON, Directeur de Recherche CNRS, dont les critiques et les inestimables discussions scientifiques m'ont été bénéfiques à tous points de vue. Je la remercie aussi pour avoir accepté d'être membre du Jury.

➔ Je remercie Monsieur Jean-Claude DEBAUD, Professeur à l'Université Lyon I et Monsieur Jacques LABARERE, Professeur à l'Université de Bordeaux qui ont bien voulu juger ce travail en acceptant d'être rapporteurs.

➔ Je remercie également Dr. Gisèle LAGUERRE, Chargée de Recherche à l'INRA qui m'a souvent accordé de son temps pour des discussions toujours intéressantes et qui a bien voulu être membre du Jury.

➔ Toute ma gratitude va également au Dr. Diederik van TUINEN, Chargé de Recherche à l'INRA au Laboratoire de Phytoparasitologie, qui m'a beaucoup aidé dans l'analyse de mes résultats et surtout dans l'utilisation du serveur informatique et des logiciels de comparaison des séquences.

➔ Je remercie également le Dr. Philipp FRANKEN du Max Planck Institut en séjour post-doctoral au Laboratoire de Phytoparasitologie pour l'intérêt qu'il a su manifester à mon travail.

➔ Je n'oublierai pas Odile CHATAGNIER, Technicienne de Recherche CNRS au Laboratoire de Phytoparasitologie, dont l'aide technique et morale m'a été d'un grand soutien.

➔ Je n'oublierai pas Michel, Cousin, Fratelo, Fafa, Laurence, Hélène, Christelle, Naïma, Armelle, Marie-Claude, Paolo, Jean-Philippe, Benoît, Josette, Jacky, Françoise et bien sûr Patricia pour les gâteaux qu'elle avait l'habitude d'apporter au Laboratoire et qui m'ont permis de « résister » ces derniers temps.

➔ Que tout le personnel du Laboratoire soit ici remercié pour toute la joie qu'il m'a donné chaque jour.

➔ Le travail que j'ai réalisé fait partie d'un contrat d'étude financé par la Région Bourgogne et pour cela je tiens à exprimer ma gratitude à la Région.

➔ Je remercie également l'Ecole Doctorale de l'Université de Bourgogne et le COST 8.21 (U.E.) qui m'ont permis de participer à des congrès scientifiques.

Enfin je tiens à exprimer une mention spéciale à ma femme Malau et à mon fils Meryll-Charles.

PLAN

	Pages
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHOIX D'UNE APPROCHE MOLECULAIRE	14
LES SEQUENCES REPETEES	20
MATERIEL ET METHODES	34
RESULTATS ET DISCUSSIONS	47
I Clonage de l'ADN d'un champignon endomycorhizogène à arbuscules <i>Scutellospora castanea</i> ..	48
II Isolement de séquences répétées.....	58
III Mise au point d'une approche moléculaire de détection spécifique d'un champignon endomycorhizogène à arbuscules <i>in planta</i>	64
IV Etude d'une séquence répétée et dispersée chez l'espèce <i>Scutellospora castanea</i> ; détection de cet élément chez d'autres genres par dot blot et par la technique PCR	101
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	132
BIBLIOGRAPHIE.....	149

INTRODUCTION GENERALE

1- LES MYCORHIZES : TYPES, ORIGINE ET ROLES

1.1 Les types

Le terme **mycorhize** a été proposé pour la première fois par Franck en 1885 pour décrire une association symbiotique qui s'établit entre les racines des plantes terrestres et des champignons du sol dits mycorhizogènes. Cette symbiose concerne environ 95% des familles végétales. Il existe trois types de mycorhizes: **les ectomycorhizes, les endomycorhizes et les ectendomycorhizes.**

Les endomycorhizes constituent la symbiose la plus répandue ; elle concerne environ 80% des espèces de plantes terrestres (Newman et Reddell, 1987). Les structures de l'endomycorhize s'établissent après pénétration du champignon dans les cellules du cortex des racines. Il existe trois types d'endomycorhizes:

*Les endomycorhizes à **arbuscules et vésicules** qui colonisent d'une manière non spécifique la majorité des Angiospermes, une partie des Gymnospermes et les Ptéridophytes et tirent cette appellation d'une part, des structures formées par les hyphes dans le cortex (arbuscules) et d'autre part des vésicules qui constituent des "organes" de stockage. L'appellation récente utilise seulement l'adjectif "arbuscules" car des genres comme *Scutellospora* et *Gigaspora* ne développent pas de vésicules dans les racines (Walker, 1995).

*Les endomycorhizes formées par des Orchidées et dont les champignons appartiennent à la classe des Basidiomycètes. *Les endomycorhizes typiques des Ericacées et dont les champignons spécifiques appartiennent à la classe des Ascomycètes. Ces deux

derniers types d'endomycorhizes forment des pelotes de mycélium à l'intérieur des cellules végétales.

Les endomycorhizes arbusculaires ont fait l'objet de notre recherche du fait de leur importance dans la biologie des plantes, et donc comme facteur de productivité.

1.2- L'Origine

Depuis très longtemps la question a été posée de savoir si la plupart des plantes terrestres ont développé dès leur apparition l'aptitude à la symbiose avec un champignon, ou si la symbiose plante/champignon est apparue plus tard. Autrement dit, les plantes terrestres ont-elles développé en co-évolution avec certains champignons l'aptitude à la symbiose?

Dès 1900, Stahl émit une hypothèse sur l'existence de plantes mycotrophes et non mycotrophes. Gerdemann (1968), Trappe (1987) et Rémy et al. (1994) ont montré que des Ptéridophytes fossiles ont formé des associations endomycorhiziennes à arbuscules. Les autres types de mycorhizes seraient apparues plus tard chez les espèces végétales concernées (Harley et Smith, 1983).

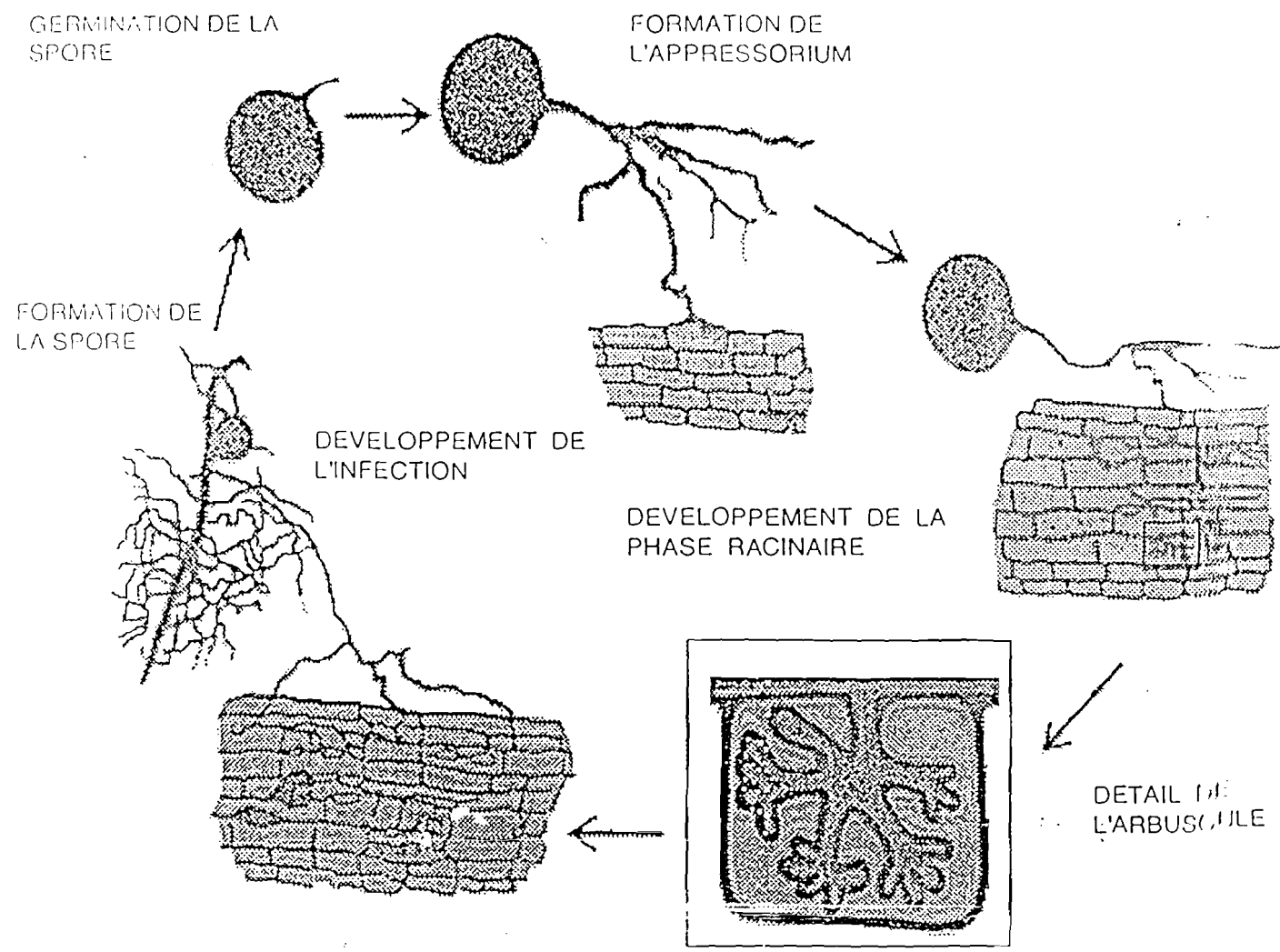
1.3 Les rôles

De nombreux travaux ont montré le rôle important que les mycorhizes jouent dans la vie des plantes. En effet, elles interviennent au niveau de la nutrition minérale (biofertilisants), de la morphologie (biorégulateurs) et de la santé (bioprotecteurs) de la plante (Harley et Smith, 1983). Pour de plus amples informations, voir Gianinazzi-Pearson et Gianinazzi (1981), Bagyaraj (1984), Smith et Gianinazzi-Pearson (1988), Gianinazzi et Schuepp (1994).

2-LES CHAMPIGNONS ENDOMYCORHIZOGENES A ARBUSCULES

2.1 Cycle biologique

Au cours de son cycle biologique, la phase racinaire, qui est la première étape de vie du champignon endomycorhizogène à arbuscules, se fait selon en deux phases (voir page 5): une différenciation intraracinaire du champignon pendant laquelle des hyphes coenocytiques développent des arbuscules intracellulaires et un développement extraradical d'un réseau de mycélium dans le sol. Une interdépendance s'établit alors entre le champignon endomycorhizogène et la plante: c'est la phase symbiotique. Par la suite, des spores sont produites en dehors ou dans la racine. Elles contribuent à la dissémination du champignon et représentent une forme de conservation. Ces spores germent en hyphes coenocytiques qui, à leur tour, engendrent l'infection racinaire et l'endomycorhize. La connaissance du cycle biologique des champignons endomycorhizogènes à arbuscules se limite à ces étapes, car on ne peut cultiver ces champignons en l'absence d'une plante-hôte (symbiotes obligatoires). Les spores des champignons endomycorhizogènes à arbuscules sont des structures unicellulaires et multinucléées, (Walker 1992). C'est la couleur, la taille et la structure pariétale de ces spores qui a permis d'établir la classification des champignons endomycorhizogènes à arbuscules en un groupe homogène, "les Glomales". D'une manière générale, les champignons appartenant à cet ordre ont des hyphes non septés.



*d'après P. BONFANTE ET S. PEROTTO
LE SCIENZE, 1992*

Pour permettre des comparaisons, il faut rappeler les principales caractéristiques du cycle de reproduction chez les Zygomycètes, groupe auquel les champignons endomycorhizogènes sont supposés appartenir. Au cours de leur cycle biologique, la reproduction des Zygomycètes se fait par voie asexuée ou sexuée. Au cours de la reproduction asexuée, qui est la voie la plus répandue chez les Zygomycètes, la partie aérienne du sporangiophore, appelée sporange libère, par éclatement, des spores uninucléées qui germent en un hyphe non septé; celui-ci différenciera à son tour des sporangiophores. C'est l'exemple de *Rhizopus stolonifer*.

Il y a deux types de reproduction sexuée. Chez les espèces dites homothalliques, un seul mycélium peut produire des zygospores sans partenaire. La zygospore peut soit donner directement un thalle ramifié, soit un ²hyphe directement porteur d'un sporange.

Chez les espèces hétérothalliques, deux hyphes génétiquement différents entrent en contact et les deux cytoplasmes fusionnent. Il va ensuite y avoir des mitoses successives et fusion des noyaux par paires pour donner une zygospore. La méiose survient juste après formation de la zygospore, suivie bien plus tard de la caryogamie. On peut citer l'exemple de l'espèce *Rhizopus nigricans*.

Dans ce contexte général, quelle peut être la place des champignons endomycorhizogènes à arbuscules? Ya-t-il effectivement des phénomènes de sexualité semblables à ceux observés chez les Zygomycètes? Dans le cas des champignons endomycorhizogènes à arbuscules, les spores sont maintenant considérées comme des chlamydospores, c'est-à-dire des spores unicellulaires asexuées (Walker, 1992). Cependant, Tommerup et Sivasithamparam (1990) ont interprété leurs observations de fusion entre les hyphes et la

formation de spores chez *Gigaspora decipiens* comme des phénomènes de sexualité, avec formation de zygosporos. Cependant, nous pensons que la nature homothallique ou hétérothallique chez les Glomales n'est pas clairement établie.

2.2- Mise en évidence d'anastomoses entre hyphes de champignons endomycorhizogènes à arbuscules

Au cours de la vie du champignon endomycorhizogène à arbuscules, la spore asexuée développe un hyphe. Une fois en contact avec la racine de la plante, celui-ci donne à la fois des hyphes intraracinaires et des hyphes extraracinaires. Ces hyphes pourraient alors développer des comportements parasexuels assez proches de ceux observés chez les Zygomycètes (Tommerup et Sivasithamparam, 1990).

En effet, la morphologie des hyphes intraradiculaires suggère l'existence d'anastomoses (Casana et Bonfante-Fasolo, 1982). Tommerup (1988) a mis en évidence chez *Acaulospora laevis*, *Glomus caledonium* et *Scutellospora calospora* le phénomène d'anastomose à l'intérieur d'une même espèce, observé dans tous les cas entre hyphes du même isolat et parfois entre hyphes d'isolats différents, ce qui suggère que l'homothallie est de règle mais que des mécanismes d'incompatibilité existent. Des spores isolées du sol à des distances de cinq mètres donnent des mycéliums qui anastomosent à 100% alors que cela ne se fait qu'à 71% entre spores prélevées à des intervalles de 150 mètres. Ce qui, selon l'application proposée par les auteurs témoignerait d'une certaine différence génétique entre différentes populations géographiquement éloignées qui réduirait alors la fréquence d'anastomose. Mais, ces travaux n'ont reçu aucune confirmation d'autres laboratoires. Toutefois, des recherches

d'isoenzymes de la malate déshydrogénase, chez des *Glomus* géographiquement éloignés, ont révélé l'existence, selon les provenances, d'isoformes différentes de cette enzyme (Rosendahl, 1989). On pourrait donc penser qu'il existe des variations intraspécifiques liées aux provenances et une possibilité d'échanges génétiques.

2.3 La taxonomie des champignons endomycorhizogènes à arbuscules

La taxonomie des champignons endomycorhizogènes à arbuscules est principalement basée sur la structure et la morphologie de la spore asexuée. Elle a fait des progrès rapides ces dernières années: près de 140 espèces sont actuellement décrites.

Mais du fait qu'ils ont des hyphes non septés, historiquement, ils ont été placés parmi les Zygomycètes. Initialement, ils ont été classés dans l'ordre des Endogonales qui regroupait la seule famille des Endogonacées (Gerdemann et Trappe 1974; Benjamin 1979; Warcup *et al.* 1990). La famille des Endogonacées était alors composée aussi bien des genres *Endogone* et des *Sclérogone* que des champignons endomycorhizogènes (Tableau 1). En 1990, Morton et Fenny ont proposé la classification actuelle. Cette classification, basée sur la morphologie, la couleur, la taille et la structure pariétale de la spore, sépare les champignons endomycorhizogènes à arbuscules des genres *Endogone* et des *Sclérogone*. Les premiers appartiennent désormais à l'ordre des Glomales alors que les *Sclérogone* et les *Endogone* appartiennent à l'ordre des Endogonales. Les Endogonales ne constituent alors qu'une seule famille, les Endogonacées, comprenant les deux genres *Endogone* et *Sclérogone* qui forment les ectomycorhizes, alors que l'ordre des Glomales renferme deux sous-

ordres et trois familles dont les cinq genres forment des endomycorhizes arbusculaires (Tableau 2).

3-LE PARADOXE DE L'EVOLUTION ET DE L'ARCHAÏSME MAINTENU.

L'évolution peut être comprise comme étant le changement progressif des caractéristiques génétiques d'une population ; ce changement passe par la production d'une diversité génétique. Celle-ci modifie en permanence la valeur adaptative de la population. Le réajustement entre la production de la diversité et la valeur adaptative est permanent. La diversité apparaît par mutation, recombinaison ; les formes locales divergent d'autant plus l'une de l'autre que l'échange génétique entre elles est réduit ou devient nul. La limite que peut atteindre la divergence est fixée par la variation de la valeur adaptative que la divergence va entraîner. L'équilibre entre les deux forces entretient la population.

Pour les Glomales, la fonction principale, l'inféodation de ces champignons aux plantes terrestres depuis le Dévonien, est restée pratiquement invariable. Il a été avancé que ces champignons se sont inféodés aux plantes depuis l'apparition des plantes terrestres. En effet, des endomycorhizes arbusculaires ont été découvertes dans des fossiles du Dévonien, *Aglaophyton* (Rémy et al. 1994) et du Triassique, *Antarcticycas* (Stubblefield et al. 1987).

Ordre: Endogonales
Famille: Endogonacées

Genres: *Endogone*
Sclerogone
Glomus
Sclerocystis
Acaulospora
Entrophospora
Gigaspora
Scutellospora

Tableau 1: Classification ancienne des champignons mycorhizogènes selon Gerdemann et Trappe (1974) Benjamin (1979) et Warcup (1990).

Ordre: Endogonales
Famille: Endogonacées
Genres: *Endogone* et *Sclérogone*

Ordre: Glomales
Sous-ordre: Glomineae
Famille: Glomacées
Genres: *Glomus* et *Sclerocystis*

Famille: Acaulosporacées
Genres: *Acaulospora* et *Entrophospora*

Sous-ordre: Gigasporaceae
Famille: Gigasporacées
Genres: *Gigaspora* et *Scutellospora*

Tableau 2: Classification actuelle séparant les Endogonales des Glomales (Morton et Benny, 1990)

Si l'inféodation aux racines est depuis 400 millions d'années la condition de survie de ces champignons, on peut concevoir leur maintien sous forme archaïque pendant près de 400 millions d'années tout en ayant divergé de manière probablement importante entre genres, espèces et sans doute entre provenances, pour toutes séquences génomiques dont le rôle est neutre vis à vis de la fonction endosymbiotique. Par comparaison, la quasi-totalité des espèces végétales sont apparues après l'ère de développement des ptéridophytes.

Normalement, la spore des Zygomycètes est uninucléée. Or celle des champignons endomycorhizogènes à arbuscules contient plusieurs milliers de noyaux (Burggraaf et Beringer 1988, Viera et Glenn, 1990, Bécard et Pfeffer, 1992). Quelle est donc en réalité la signification biologique d'une spore chez les Glomales? Représente-t-elle un individu ou une population de noyaux équivalant à un hyphe multicaryotique? Si des phénomènes de sexualité ou de parasexualité, ou même de non sexualité, concourent effectivement à l'établissement du mycélium fongique, quel est donc le niveau de variation de la population des noyaux dans une spore? Si une variation entre noyaux existe, conduisant à considérer l'hyphe mycélien et ses spores comme une population de noyaux, est-elle un des facteurs de l'adaptativité de ces champignons vis-vis des plantes-hôtes? Quelles sont les possibilités qui s'offrent à nous pour une analyse génétique fiable des champignons endomycorhizogènes à arbuscules?

4-LA POSSIBILITE D'UNE ANALYSE GENETIQUE OFFERTE PAR LA BIOLOGIE MOLECULAIRE.

L'importance des champignons endomycorhizogènes à arbuscules pour la santé et la croissance des plantes n'est plus à démontrer (Harley et Smith, 1983 ; Gianinazzi et Gianinazzi-Pearson, 1988). Mais une utilisation rationnelle de ces champignons pour l'agriculture implique un contrôle efficient de l'inoculum fongique. Ceci requiert une connaissance approfondie de la génétique (transmission et échange génétique) et de la diversité génétique de ces champignons tant au niveau morphologique que moléculaire. Toutefois, l'analyse génétique de ces champignons est difficile, de par l'impossibilité à cultiver ces organismes en culture pure. D'autre part, il n'existe jusqu'à maintenant aucune preuve formelle (génétique) de sexualité ou de parasexualité malgré les résultats rapportés par Tommerup (1988). De plus des marqueurs discriminants d'espèces ou d'isolats de champignons endomycorhizogènes à arbuscules permettraient de les identifier à n'importe quel stade de leur développement, par exemple au cours de la phase symbiotique pendant laquelle il est particulièrement difficile de distinguer différentes espèces.

La morphologie et la structure pariétale de la spore qui sont à la base de la classification et l'identification de ces champignons peuvent être fortement influencés par les conditions environnementales, ce qui peut introduire des variations apparentes dans les populations naturelles (Morton et Bentivenga, 1994).

Le développement actuel des techniques de biologie moléculaire devrait permettre de développer des outils efficaces de détection et d'identification des champignons endomycorhizogènes à arbuscules.

L'utilisation de la technique PCR offre cette possibilité. Les amorces généralement utilisées sont homologues à des régions conservées dans les génomes telles que les régions rDNA qui sont organisées en régions conservées (18S, 5,8S et 28S) et en régions variables appelées ITS (Internal Transcribed Spacer) et IGS (Intergenic Spacer). Les amorces issues de ces régions sont généralement appelées amorces universelles parce qu'elles peuvent amplifier des fragments d'ADN chez des organismes éloignés, étant donné que ces régions correspondent aux ARN des ribosomes qui jouent un rôle très important au cours de la traduction. Or, il faut signaler que les spores des champignons endomycorhizogènes à arbuscules produites dans du sol en pots de culture peuvent être contaminées par d'autres microorganismes et en particulier des bactéries. L'ADN de la plante-hôte peut être aussi amplifié par de telles amorces. Il se pose donc un problème quand à l'utilisation d'amorces universelles pour l'identification spécifique de champignons endomycorhizogènes à arbuscules. Cependant, cette difficulté peut être contournée par l'utilisation de culture stérile d'endomycorhizes arbusculaires. En effet, en utilisant des cultures *in vitro* de racines transformées et endomycorhizées (Bécard et Fortin, 1988), il a été possible à Simon *et al.* (1992) d'obtenir des spores pour amplifier à partir de leur ADN, sans risque de contamination, une portion de la petite sous-unité 18S. Cela leur a permis de générer pour la première fois des amorces spécifiques de champignons endomycorhizogènes à arbuscules.

En 1993, l'étude moléculaire des champignons endomycorhizogènes à arbuscules a connu un certain développement. Ces mêmes auteurs ont développé des amorces spécifiques de quelques espèces fongiques. Un alignement de séquences de la petite sous-unité 18S de différents

champignons endomycorhizogènes à arbuscules allait ainsi leur permettre d'établir une phylogénie pour ces micro-organismes (Simon *et al.*, 1993).

Des données bibliographiques nous permettent de penser à la possibilité d'autres voies d'analyse des champignons endomycorhizogènes à arbuscules. En effet, le contenu en ADN par noyau chez *Glomus versiforme* est de 0,25pg et de 0,77pg chez *Gigaspora margarita* (Bianciotto et Bonfante, 1992). Entre ces deux espèces de champignons appartenant au même ordre, il existe donc une forte variation en contenu d'ADN par noyau. Aussi faut-il signaler que ces contenus sont du même ordre que chez *Absidia glauca* et supérieur à celui de *Phycomyces blakeleanus*, deux Zygomycètes dont les contenus génomiques en ADN sont respectivement 0,39 pg et 0,0304 pg. Chez *A. glauca*, dont le contenu génomique est relativement élevé, 25% du génome sont constitués de séquences redondantes (Wöstemeyer et Burmester, 1986). Ceci permet de penser que les champignons endomycorhizogènes à arbuscules pourraient avoir un génome en partie redondant, comme comme la plupart des eucaryotes supérieurs (Tanskley et Eran, 1988). A partir de ces considérations, nous avons pensé qu'une analyse génétique pourrait se faire par une étude approfondie du génome fongique en déterminant le niveau de redondance, et cela par la recherche de séquences d'ADN répétées. La mise en évidence de telles séquences d'ADN permettrait d'avoir non seulement des informations sur l'organisation du génome des champignons endomycorhizogènes à arbuscules, mais ouvrirait aussi une voie d'approche moléculaire pour la détection et l'identification des champignons endomycorhizogènes à arbuscules *in planta*.

**CHOIX D'UNE
APPROCHE MOLECULAIRE**

1- LES APPROCHES MOLECULAIRES POSSIBLES

La détection et l'identification de microorganismes ont connu un grand bond en avant depuis l'avènement de la biologie moléculaire. Par exemple, l'utilisation de la technique d'analyse de la diversité par le Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction (P.L.F.R. ou R.F.L.P.) mise au point sur les plantes par Helentjaris *et al.* (1985) a permis de déceler un polymorphisme génomique et génétique entre différents champignons (Castle *et al.*, 1987; Johnson *et Lewis*, 1990). Initialement, les sondes moléculaires utilisées dans cette technique sont issues d'une banque d'ADN génomique ou mitochondriale (Castle *et al.* 1987; Henson, 1989; Förster *et Coffey*, 1992) et particulièrement chez un champignon ectomycorhizien (Marmeisse *et al.*, 1992)

Un nouveau progrès va s'accomplir avec l'invention de la réaction en chaîne de polymérisation en chaîne (PCR) d'une molécule d'ADN *in vitro* (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.* 1986). Les études de diversité génétique et d'identification de différents microorganismes en RFLP peuvent alors se faire en utilisant des sondes produites par amplification par PCR comme c'est le cas pour les champignons ectomycorhiziens (Gardes *et al.* 1990) et pour l'ascomycète *G. graminis* (Ward *et Gray*; 1992).

La PCR va faire un couplage avec la R.F.L.P., qui, cette fois-ci va s'appeler PCR-RFLP. On peut ici éviter les étapes lourdes de digestion d'ADN, de transfert et d'hybridation que comporte la R.F.L.P. classique. On va simplement analyser le produit d'amplification obtenu à partir de l'ADN extrait. Une diversité peut

être perçue directement sur produit PCR par la taille des fragments obtenus. Une telle approche a été déjà utilisée chez des champignons ectomycorhizogènes (Gardes *et al.* 1991; Henrion *et al.*, 1992). Mieux encore, une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide de produits d'amplification digérés par des enzymes de restriction peut montrer directement un polymorphisme. Cela a permis à plusieurs auteurs de typer (Henrion *et al.* 1994), détecter ou d'identifier des microorganismes tels que les champignons ectomycorhiziens (Gardes *et al.* 1991, Gardes et Bruns, 1993) ou des champignons endomycorhizogènes (Simon *et al.* 1992, Simon *et al.* 1993). L'utilisation de la technique PCR permet ainsi de faire un grand progrès en diagnostic moléculaire.

En utilisant des oligonucléotides aléatoires de 9 à 13-mères, il est possible d'amplifier au hasard plusieurs fragments d'un ADN génomique (Williams *et al.*, 1990). Cette technique appelée RAPD permet d'analyser directement sur gel, les fragments amplifiés, ce qui permet d'apprécier des différences de profils entre des organismes. Cette technique a permis à Wyss et Bonfante (1993) d'aborder la diversité génétique entre différents *Glomus*, ce qui a permis à Lanfranco *et al.* (1995) de définir des amorces spécifiques de *Glomus*.

2-RAISONS DU CHOIX D'UNE APPROCHE

Dans le cas des champignons endomycorhizogènes à arbuscules, la technique RFLP est difficilement applicable, (que la sonde soit un clone génomique, du cDNA ou un produit PCR) car la source d'ADN fongique (spores) ne permet pas d'obtenir des quantités suffisantes d'ADN. La technique PCR-RFLP (RFLP sur produit PCR) est

envisageable, mais elle nécessite un très grand nombre d'analyses avec souvent un nombre important d'enzymes de restriction. La technique RAPD ne peut être adaptée à une détection directe du symbionte fongique dans la plante infectée car des profils différents ne sont pas additifs. Tous ces obstacles nous ont conduits à la recherche d'une autre voie d'approche.

L'objectif de notre travail a été d'isoler des séquences répétées à partir du génome d'un champignon endomycorhizogène à arbuscules. Cela devait nous permettre de connaître sa structure génomique. Les séquences répétées une fois obtenues, devaient nous permettre de développer d'une part, une approche moléculaire de détection du partenaire fongique dans une racine infectée et d'autre part, d'étudier la variabilité génétique des champignons endomycorhizogènes à arbuscules.

Pour cela, nous avons établi une banque de l'ADN génomique d'un champignon endomycorhizogène à arbuscules *Scutellospora castanea* isolé pour la première fois en France (Walker *et al.*, 1994) et qui nous a servi de matériel de base. A partir de cette banque, nous avons recherché des séquences d'ADN répétées. Par la suite, des séquences spécifiques ou non de *S. castanea* ont été recherchées afin de développer des outils de détection du champignon *S. castanea in planta*.

Quelles sont les différentes méthodes qui permettent d'isoler des séquences répétées et qu'est-ce qui a justifié notre choix?

3- METHODES D'ISOLEMENT DE SEQUENCES REPETEES

3.1-Utilisation de l'électrophorèse

L'électrophorèse d'un ADN génomique digéré par une enzyme de restriction donne une traînée qui correspond à une distribution "Gaussienne" des fragments libérés. Mais des bandes majeures peuvent être observées; elles correspondent à des fragments d'ADN répétés. Ces bandes peuvent être excisées du gel et clonées après purification. Mao *et al.* (1994) ont ainsi isolé un fragment d'ADN répété d'un motif de 630 pb chez le seigle. Cette technique a permis à Goodier et Davidson (1994) d'isoler un élément répété détecté chez le saumon en utilisant l'enzyme *NheI*. Deux ADN satellites ont été isolés chez la betterave par Santoni et Bervillé (1992) en utilisant cette technique.

3.2-Utilisation de la centrifugation

La technique de centrifugation sur gradient de CsCl permet de séparer différentes fractions de l'ADN nucléaire. Lorsqu'aucun pic ne peut être détecté, des composés tels que le bisbenzimidazole qui se fixe préférentiellement aux liaisons AT, ou l'actinomycine D qui se fixe aux liaisons GC, sont ajoutés afin d'avoir un pic surnuméraire qui correspond à l'ADN satellite. L'utilisation du bisbenzimidazole (Hoechst 33258) a permis à Wöstemeyer et Burmester (1986) de mettre en évidence l'ADN répété chez le champignon *Absidia glauca* (Zygomycète).

3.3- Utilisation du clonage génomique

Le clonage génomique permet d'isoler des séquences d'ADN répétés. L'ADN génomique est digéré par une enzyme de restriction. Après ligature à un vecteur, une transformation bactérienne est effectuée pour avoir des colonies bactériennes. Une hybridation est alors effectuée sur les colonies bactériennes avec l'ADN total marqué. Différents types de signaux sont obtenus. Les fragments d'ADN répétés sont repérés par une forte intensité du signal d'hybridation du fait qu'ils sont représentés en nombre de copies élevé par rapport aux gènes uniques, qui ne donnent presque pas de signal. Saul et Potrykus (1984), Hamer et al. (1989) ont utilisé cette technique pour mettre en évidence des séquences répétées.

3.4- Utilisation de la technique PCR

L'amplification génique en condition limitante de dNTP, permet d'amplifier des séquences d'un génome. L'hybridation en Southern des produits d'amplification avec l'ADN total marqué permet de repérer des séquences d'ADN répétées (Frothingham *et al.* 1992) dans l'amplifiat. Ces séquences pouvant ainsi être isolées et clonées.

Au cours de notre étude, il n'a pas été possible de repérer des bandes majeures après digestion de l'ADN génomique de spores de champignon endomycorhizogène. Par ailleurs, les quantités d'ADN n'étaient pas toujours suffisantes pour une centrifugation en gradient de CsCl. Nous avons par conséquent utilisé le clonage génomique et l'hybridation des inserts avec ADN génomique marqué pour isoler des séquences répétées.

LES SEQUENCES REPETEES

1- LES SEQUENCES REPETEES : ROLES ET CLASSIFICATION

1.1 Rôles

Les gènes peuvent être définis par une fonction pour la biosynthèse d'un produit, qui est soit le résultat de la transcription et de la maturation d'ARNr, d'ARNt et d'ARNn, soit le résultat de la transcription, maturation et traduction via l'ARNm, en polypeptides et protéines. Chez les eucaryotes, ces gènes fonctionnels sont souvent dispersés dans une grande masse de séquences d'ADN non définies comme ayant un sens fonctionnel. Ce sont les ADN répétés et les pseudogènes.

La théorie neutraliste de l'évolution (Kimura, 1983) considère que des séquences doivent ainsi être mises en réserve au cours de la diversification, jusqu'à ce qu'elles retrouvent un sens nouveau. Ce sens peut concerner la régulation ou le code lui-même. On peut donc penser que si les répétitions de séquences ont un rôle diversifiant, elles ont aussi un rôle évolutif (Dover G. 1982; Dover G. 1986). Elles sont, en tous cas, au moins témoins de la diversification, donc de l'effet du temps évolutif. La divergence de séquences empêche les hétéroduplex d'être résolus en méiose (Radman, 1991) donc la barrière génétique se renforce par divergence. Les caractères nouveaux peuvent apparaître dans un phylum à la suite de mutations dont la nature moléculaire n'est pas obligatoirement importante (Flavell, 1982). Ainsi, une mutation ponctuelle peut avoir un effet important sur le phénotype, créer ou non une barrière à la fécondation et entraîner par elle-même peu de divergences au niveau moléculaire (Flavell, 1982).

Les génomes procaryotes sont les plus riches en gènes ayant un sens et les plus pauvres en séquences répétées (1% chez *Escherichia coli*) (Biologie Moléculaire du gène, 4^{ème} édition, Watson *et al.*).

Les eucaryotes ont une complexité génomique plus élevée, ils contiennent donc plus de gènes ou de séquences différentes et de plus, le degré de répétition de certaines est très élevé (Flavell, 1982). Le degré de conservation des séquences uniques est grand, contrairement à celui des séquences répétées (Charleworth *et al.* 1994), ce qui est favorable à l'idée que celles-ci sont à la fois témoin et cause de la diversité.

1.2- Classification

En fonction de leur nombre de copies et de leur organisation dans le génome des eucaryotes, il existe deux grandes classes de séquences répétées. On distingue les séquences répétées en tandem et répétées dispersées.

1.2.1 Les séquences répétées en tandem

En fonction de leur taille, il en existe trois types :

- l'**ADN satellite**: hautement répété et organisé en tandem, qui est constitué de motifs élémentaires dont la taille varie de 5 à 100bp (Lohe *et al.* 1993)
- l'**ADN minisatellite**: modérément répété et organisé en tandem, qui constitue des éléments d'une longueur d'environ 15bp pouvant s'étaler sur une zone d'environ 0,5 à 30 kb. Leur nombre de copies est variable dans une population (Jeffreys *et al.* 1985).
- l'**ADN microsatellite**: modérément répété et organisé en tandem, constitue des éléments d'environ 3bp. Leur nombre de tandems

(généralement de l'ordre de 100) est variable et leur localisation dispersée (Weber et May, 1989).

1.2.2 les séquences dispersées

Modérément répétées, les séquences dispersées sont constituées essentiellement par les éléments transposables et leurs reliques. On peut diviser les éléments transposables en deux groupes (Charlesworth *et al.* 1994, Daboussi et Langin):

- *les rétroéléments* qui se transposent par l'intermédiaire du produit de la transcription inverse de leur ARN. Ce sont les rétrotransposons avec ou sans LTR (long repeat element). Les gènes codent ou non des protéines nécessaires à la transcription inverse. On peut citer comme exemples d'éléments LTR, l'élément Ty découvert chez *Saccharomyces cerevisiae* (Cameron *et al.*, 1979) et le *grh* découvert par Dobinson *et al.* (1992) chez le champignon phytopathogène *Magnaporthe grisea*. Comme séquences sans LTR, on peut citer les séquences LINEs (Long Interspersed Elements) et SINEs (Short Interspersed Elements) chez les mammifères, les SINEs ne codant pas des protéines nécessaires à la transcription inverse.

- *les éléments qui se transposent directement à partir de copies d'ADN* se caractérisent par des ITR (inverted terminal repeat) et des ORF (open reading frame) codant des transposases. C'est l'exemple des éléments P chez *Drosophila melanogaster* (O' Hare et Rubin, 1983).

2- L'EVOLUTION DES SEQUENCES REPETEES

2.1 Les séquences répétées organisées en tandem

Dans les séquences satellites, l'unité de répétition, qui peut être présente à des milliers de copies, est relativement homogène au sein d'une même espèce, mais des différences majeures peuvent être observées entre des unités apparentées pour des espèces appartenant à la même famille ou au même genre. A notre connaissance, les unités répétées en tandem connues chez les champignons sont constituées par les unités d'ADN ribosomique.

Voici quelques exemples de séquences organisées en tandem mises en évidence chez les végétaux. Grellet *et al.* (1986) ont montré que l'unité de 177 bp présente chez le radis à 0,6 millions de copies a 75% d'homologie avec l'unité de 177 bp de la moutarde, mais ne s'hybride pas avec l'ADN du colza lorsqu'elle est utilisée comme sonde.

Martinez-Zapater *et al.*, (1986) ont cloné une unité de répétition de 180 bp chez la crucifère *Arabidopsis thaliana*. Cette unité qui est présente à 4000 copies dans le génome de *Arabidopsis thaliana* a de 63 à 71% d'homologie sur seulement 30 nucléotides avec l'unité correspondante d'autres Crucifères.

Merzloff *et al.* (1986) ont cloné et caractérisé des unités spécifiques de blé. Ces unités utilisées comme sondes et hybridées en dot blot sur l'ADN génomique de blé et de seigle montrent une spécificité vis-à-vis du génome du blé. Schweizer *et al.* (1988) clonent des séquences répétées de 162 bp et de 183 bp spécifiques respectivement de *Lycopersicon esculentum* et *Solanum acaule*.

Ces différents résultats montrent que les unités de répétition organisées en tandem évoluent de façon à être divergentes entre espèces et homogènes au sein d'une même espèce. Mais quels sont les mécanismes qui contribuent à une telle évolution?

En 1982, Gabriel Dover définit l'évolution concertée comme étant la voie par laquelle ces séquences évoluent. L'évolution concertée implique plusieurs mécanismes: l'amplification, les mutations et l'homogénéisation des séquences répétées. Cette évolution concertée a lieu grâce à 1) l'**amplification** (Benslimane *et al.*, 1986), 2) la **mutation**, 3) la **conversion** (Whitehouse 1984; Dvorak et Lassner, 1987), et 4) le **crossing-over inégal** (Smith, 1976). Comment ces différents événements se mettent-ils en place pour faire évoluer une séquence?

L'**amplification**, comme son nom l'indique, produit plusieurs copies d'une même séquence ancestrale. L'un des moteurs de cet événement est la réplication par sauts (saltatory replication), qui se produit au hasard dans une séquence en l'amplifiant sur un brin, augmentant ainsi son nombre de copies (Figure 1). Si une **mutation** s'est produite dans un élément de répétition avant une réplication par sauts, elle pourra être aussi amplifiée, ce qui entraînera une divergence de la séquence d'origine (Southern, 1975 et Lewin 1987). Mais il faut signaler que la **conversion** interrépétitions permet le maintien de la séquence d'origine.

Après réplication d'une molécule d'ADN, les unités de répétition peuvent devenir des points de crossing-over. Au lieu d'avoir un échange réciproque entre les deux brins de chromosomes, l'échange s'effectuera de sorte que le nombre des unités s'accroisse sur un

brin et diminue sur l'autre. Ce phénomène appelé **crossing-over** **inégal** a été décrit par Smith (1976). Il a été démontré notamment au

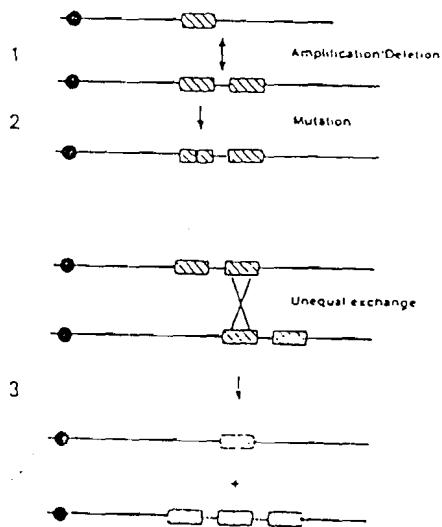


Figure 1 : Les mécanismes affectant une séquence d'ADN répétée en tandem

1- effet d'une amplification et d'une délétion sur la taille d'une séquence

2- effet d'une mutation sur la composition en base d'une séquence

3- effet de l'échange inégal sur le nombre de copies d'une séquence

niveau de l'ADN ribosomique de *Saccharomyces cerevisiae* (Petes, 1980; Szostak *et al.*, 1980).

Cependant, il faut aussi concevoir que la stabilité numérique intraspécifique d'un motif répété nécessite un ralentissement et finalement un arrêt des processus de recombinaison. La protection contre le crossing-over résulterait selon Radman (1991) de la disparition de sites de restriction où ont lieu les cassures simple brin initiateurs de la recombinaison (Biologie Moléculaire du gène, 4^{ème} édition, Watson *et al.*).

2.2 Les séquences dispersées

L'évolution des éléments transposables se caractérise par une replication autonome, qui permet leur excision et leur intégration à un autre locus. Cette autonomie de replication leur permet d'aller d'un chromosome à un autre en leur apportant des copies de gènes nouveaux (Charlesworth *et al.*, 1994). Un élément transposable dénommé Impala a été cloné chez l'espèce *Fusarium oxysporum* (Largin *et al.* 1995).

3-LES SEQUENCES REPETEES COMME OUTILS DE DETECTION MOLECULAIRE ET OBJETS D'ETUDE DE PHYLOGENIE

Les mécanismes évoqués plus haut nous font constater que les séquences répétées, qu'elles soient en tandem ou dispersées, confèrent une instabilité génomique, génératrice de diversification. Cela explique comment des changements peuvent être apportés et être perpétués dans une population. L'apparition de séquences nouvelles dans une population augmente l'ADN total. La duplication, la mutation et la conversion sont les moteurs de la

diversification de génomes et donc leur permettent d'évoluer en divergeant les uns des autres surtout si le flux génique entre individus est nul. Les transpositions entraînent des réarrangements génomiques, apportant du coup une variation dans les populations. En tant que telles, les séquences répétées offrent une possibilité de détection de différences spécifiques, mais aussi un moyen d'étude de la variation dans une population d'organismes.

3.1 La détection spécifique

Plusieurs auteurs ont utilisé des séquences répétées comme outils de détection dont quelques exemples dans le règne végétal peuvent être cités.

En vue de réaliser des tests rapides de reconnaissance de lignées d'addition monosomiques blé-seigle, une unité de répétition de 480 bp de l'ADN spécifique de seigle (Hutchinson *et al.*, (1985) a été utilisée comme sonde. La technique de criblage mise au point sur des racines de jeunes plantes est appelée "squash dot".

Metzlaff *et al.* (1986) ont cloné quatre séquences répétées de 121 bp dont la spécificité vis-à-vis du génome du blé a été montrée par comparaison au génome du seigle.

Après clonage de l'ADN total de *Hordeum vulgare*, Junghans et Metzlaff (1988) identifient quatre clones spécifiques du génome de cette espèce. Ces quatre unités de 180bp ne reconnaissent pas le génome du blé et du seigle par le test "Squash dot".

En vue de cribler des lignées d'addition entre *Beta vulgaris* et *Beta procumbens*, résistantes au nématode *Heterodea schachtii* Schm, Schmidt et al., (1990) ont généré les séquences répétées pTS1 et pTS2 respectivement de 135 et 162bp, et les ont utilisées en Squash dot.

L'obtention de séquences répétées spécifiques de *Lycopersicon esculentum* et de *Solanum acaule* a permis à Schweizer (1988) de cribler les cals obtenus après fusion des protoplastes de ces deux espèces.

3.2 Phylogénie

L'utilisation de séquences d'ADN répété a permis à plusieurs auteurs de faire des études de phylogénie. En voici quelques exemples chez des espèces végétales et fongiques.

*Chez les végétaux

Partant de l'hypothèse que plus les espèces sont proches, c'est-à-dire plus elles ont une parenté phylogénétique, plus il y a d'homologie entre leurs ADN répétés, des expériences de cinétique de renaturation et d'hybridation moléculaire utilisant des séquences d'ADN répété ont permis à Flavell *et al.*, 1977 d'établir des relations phylogénétiques entre le blé, le seigle, l'orge et le soja. Ce même type d'expériences a permis à Flavell *et al.* (1979) de faire des comparaisons entre séquences répétées chez les espèces *Triticum* et *Aegilops* et de montrer que les deux génomes sont très similaires. Par ailleurs, en utilisant comme sonde une séquence hautement répétée de *Aegilops speltoides*, ces auteurs ont pu différencier *Aegilops* de *Triticum*.

Des expériences d'hybridation moléculaire utilisant des unités de répétition de seigle et de blé ont permis à Grellet *et al.*, (1986) et à Hallden *et al.*, (1987) d'établir des relations entre espèces de la sous-famille des Brassicaceae.

Afin de connaître les origines des blés diploïdes et tétraploïdes cultivés par rapport aux blés sauvages, des séquences d'ADN répété cloné à partir d'un blé sauvage diploïde ont été utilisées par Dvorak *et al.*, (1988). En fonction du polymorphisme d'abondance de ces séquences (RSAP, Repeated Sequence Polymorphism Abundance) et leur polymorphisme de longueur de restriction, il a été possible à ces auteurs de proposer une hypothèse sur l'origine du blé cultivé.

Après avoir cloné et caractérisé deux ADN satellites chez la betterave *Beta vulgaris* L., Santoni et Bervillé 1992, ont montré comment ces deux séquences ont évolué et ont été distribuées dans la section *vulgares*.

* chez les champignons

En utilisant l'élément dispersé Ty1-17, cloné chez *Saccharomyces cerevisiae*, Kingsman *et al.*, (1981) ont montré par hybridation en Southern des variations entre différents clones de *S. cerevisiae*.

(Dewar *et al.*, 1985) ont isolé une séquence dispersée dénommée MuR du génome de *Mucor racemosus* dont la nature transposable n'est pas encore démontrée. Lorsque ces auteurs ont utilisé cette séquence comme sonde pour hybrider l'ADN d'espèces voisines de *Mucor racemosus*, ils ont trouvé qu'elle est très conservée entre ces différents espèces.

L'analyse du retroélément dispersé appelé *Grasshoper* a permis à Dobinson et al., (1992) de typer certains isolats de l'espèce *Magnaporthe grisea* par rapport à leur pouvoir pathogène.

On peut supposer que des classes et des familles de séquences répétées divergent entre espèces et s'homogénéisent à l'intérieur d'une espèce à des vitesses différentes, selon leur nombre de copies, leur structure, leur répartition agrégée ou dispersée et leur fonction et selon les mécanismes mis en jeu, par exemple la reproduction sexuée.

On peut donc envisager la recherche de séquences répétées pour évaluer la divergence à l'échelle taxonomique du genre ou de l'espèce selon leur degré de conservation.

Il faut souligner maintenant que le génome des champignons connus est généralement moins riche en ADN répété que les eucaryotes supérieurs. La quantité d'ADN répété dans le génome des champignons varie de 0% (c'est l'exemple de l'Ascomycète *Gaeumanomyces graminis*) à 25% chez le Zygomycète *Absidia glauca* (Wöstemeyer and Burmester, 1986).

Chez les plantes supérieures, beaucoup d'espèces possèdent un génome constitué à 70% par de l'ADN répété; *Arabidopsis thaliana* est cependant une espèce dont le génome est petit et pauvre en ADN répété (25% d'ADN répété dans un génome de 70000kb) (Martinez-Zapater et al. 1986).

Plusieurs ADN répétés ont été mis en évidence chez les champignons. Cameron et Elwin, (1979) ont cloné des séquences dispersées et transposables. Wöstemeyer et Burmester (1986) ont montré que le génome du Zygomycète *Absidia glauca*, qui a un contenu génomique de 0,39 pg d'ADN, a 25% d'ADN répété. Par

ailleurs, ces auteurs ont isolé de ce champignon, un élément dispersé dénommé rAg1. Chez le champignon phytopathogène *Magnaporthe grisea*, deux types de séquences répétées ont été mises en évidence. En effet, Hamer *et al.* (1989) ont cloné une famille de séquences répétées dispersées dénommée MGR (*M. grisea repeat*), ensuite Dobinson *et al.* (1993) ont mis en évidence chez ce champignon, un rétroélément à LTR (Long terminal repeat).

Comme cela a été dit plus haut, il n'est pas encore formellement établi s'il existe un phénomène de sexualité ou de parasexualité chez les champignons endomycorhizogènes à arbuscules, malgré les observations de Tomnerup (1988).

Cependant, même s'il y avait une absence totale de sexualité chez ces champignons, les mutations, les crossing-over mitotiques et la conversion sont autant de sources de variations dans les populations, puisqu'ils procèdent par voie intranucléaire et somatique.

Les premières estimations du contenu en ADN par noyau de champignons endomycorhiziens à arbuscules donnent des valeurs relativement élevées (0,27pg pour *G. versiforme* et 0,77pg pour *Gig. rosea* (Bianciotto Bonfante, 1992).

Ces résultats nous ont fait supposer l'existence de séquences d'ADN répétées et ont orienté notre choix vers leur identification afin de développer des outils moléculaires en vue de détecter les champignons endomycorhizogènes à arbuscules *in planta* et d'étudier leur variation inter- et intraspécifique.

MATERIELS ET METHODES

1- MATERIEL BIOLOGIQUE

Les champignons endomycorhizogènes à arbuscules utilisés sont les suivants:

- **Scutellospora castanea* Walker (LPA4/BEG1) (figure 2A)
- **Scutellospora calospora* (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders (PC19),
- **Scutellospora pellucida* (Nicol. & Schenck) Walkers & Sanders,
- **Scutellospora nodosa* Blaszkowski (PC 282),
- **Gigaspora rosea* Nicolson & Schenck (LPA23/BEG)
- **Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe (LPA1/BEG13)
- **Glomus caledonium* (Nicol. & Gerd.) Trappe & Gerdemann (LPA12)
- **Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe (LPA5/BEG12)

Les champignons endomycorhizogènes à arbuscules sont multipliés sur racines de poireau, ou de trèfle. Les spores utilisées comme inoculum sont désinfectées avec une solution de chloramine T à 5% contenant 0,4% de sulfate de streptomycine. Le substrat de culture est constitué de 50% de terre d'Épisses stérilisée par irradiation aux rayons γ (10 kGy) et 50% de perlite. Les graines de trèfle et de poireau sont désinfectées avant germination ; 10 jours après germination, elles sont transplantées dans le substrat de culture en présence ou absence de spores fongiques.

1.1 Contrôle de l'infection endomycorhizienne

Après huit à dix semaines de culture en chambre climatisée (Photopériode 16h; Température 20-24°C; Humidité 70%), les racines de chaque pot sont observées pour contrôler l'infection endomycorhizienne. Les racines sont prélevées, lavées et digérées dans la potasse à 10% pendant 10 minutes, ensuite elles sont colorées

au bleu de trypan à 0,05%. Les structures fongiques (hyphes ou vésicules) prennent une couleur bleue et peuvent ainsi être observées au microscope (Figure 2B).

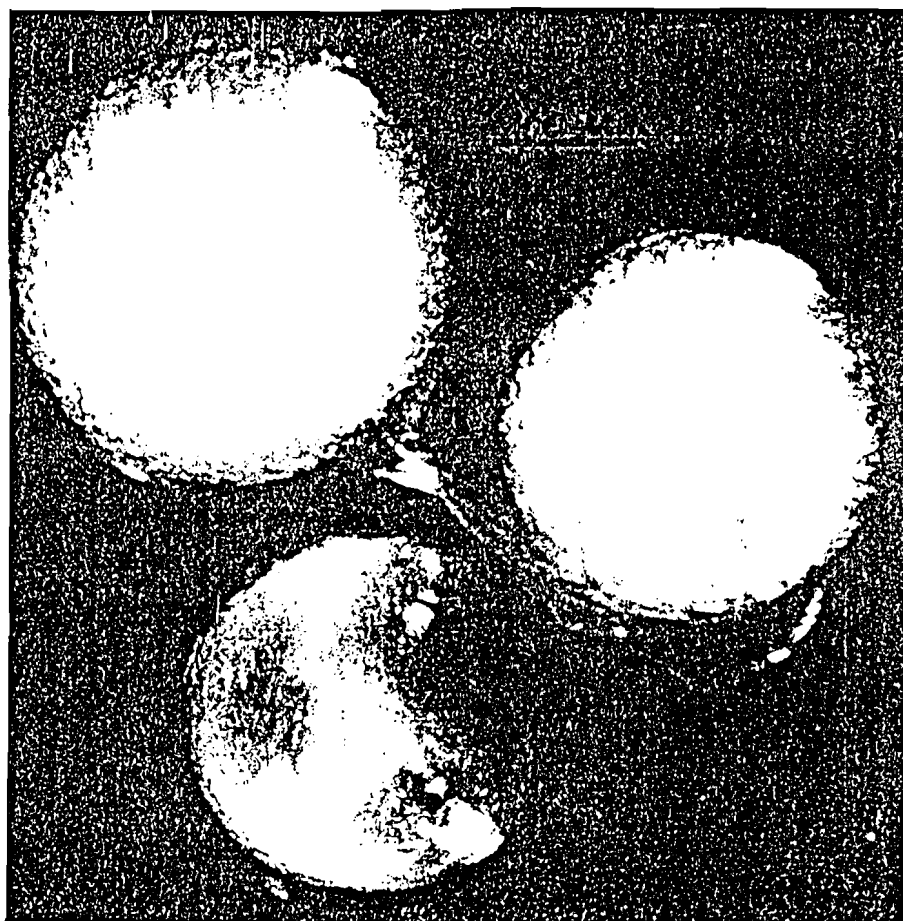


Figure 2 A : Spores de *S. castanea* tamisées et triées à la loupe



Figure 2 B : Mise en évidence des structures fongiques de *Gigaspora rosea* après coloration au bleu trypan de racines de poireau endomycorhizées. (h) hyphe intercellulaire, (a) arbuscule

1.2 La récolte des spores

Les spores formées dans le substrat de culture sont récupérées par tamisage humide et sont contrôlées sous une loupe binoculaire et triées une pince.

2-METHODES

2.1. Extraction de l'ADN génomique

2.1.1 A partir de spores fongiques

Les méthodes de Burggraaf et Beringer (1989), Cummings et Wood (1989) ont été testées. Ces méthodes ne nous ayant pas donné satisfaction quant à la qualité de l'ADN obtenu, nous avons mis au point une méthode d'extraction décrite au chapitre I des résultats.

2.1.2 A partir de racines infectées ou non

Les racines fraîchement prélevées sont lavées et pesées. Pour l'extraction d'ADN, nous avons utilisé la méthode de Rogers et Bendish (1985).

2.1.3 Contrôle de la qualité de l'ADN obtenu

Après extraction, l'ADN obtenu est soumis à électrophorèse. Les échantillons d'ADN natifs ainsi qu'une gamme de dilutions d'ADN de référence du phage lambda sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 0.8% préparé dans du tampon TAE. Après 30 minutes de migration à 50Volts, le gel est coloré au bromure d'éthidium (100µg/l) et les acides nucléiques sont révélés par transillumination aux UV. Le gel est ensuite photographié.

2.1.4 Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Une fois que l'intégrité et la quantité de l'ADN ont été évaluées sur gel, 1 à 2µg d'ADN génomique sont digérés avec 10U d'enzymes de restriction (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* (Boehringer). La réaction a lieu à 37°C pendant la nuit dans une mixture contenant le tampon de l'enzyme, 0,004M de spermidine, (activateur), et 2µg d'albumine sérique bovine (capteur d'inhibiteurs). La réaction a lieu à 37°C pendant une nuit. La qualité de la digestion est ensuite contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose.

2.2 Etablissement d'une banque génomique

2.2.1 Ligature ADN/vecteur pUC18

Après avoir contrôlé la qualité de la digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction, l'ADN est purifié au phénol/chloroforme pour éliminer les traces d'enzyme. La ligature est ensuite effectuée en testant différents rapports ADN total/plasmide pUC18. Celui-ci a été déphosphorylé par le fournisseur (Appligène) et la ligature a lieu dans le tampon de la ligase contenant 1U de T4 ligase (Appligène). La réaction a lieu à 15°C pendant une nuit. La qualité de la ligature est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose en comparant une fraction aliquote équivalente de vecteur non ligaturé et de la mixture réactionnelle.

2.2.2 Transformation bactérienne

200 µl de cellules de *E. coli* DHα5 rendues compétentes par la méthode de Hanahan (1985) sont décongelés sur glace pendant 15 minutes. 3 µl de la réaction de ligature sont alors mélangés aux 200 µl de bactéries compétentes. Après incubation sur glace pendant une heure, les cellules subissent un choc thermique à 42°C pendant 90

secondes. 800µl de SOC sont ensuite ajoutés après 10 minutes d'incubation sur la glace. Les bactéries sont ensuite placées à 37°C et agitées à 200 rpm pendant une heure et ensuite des fractions aliquotes de 100µl sont étalées sur milieu sélectif LB contenant de l'ampicilline, du X-gal et de l'IPTG. Après une culture des boîtes à 37°C pendant la nuit, les colonies de couleur blanche (transformées) sont repiquées sur milieu LB en boîte multipuits. Après une culture à 37°C pendant une nuit, du glycérol (50%) est ajouté dans chaque puit, ensuite les boîtes sont conservées à -70°C en attendant d'être utilisées.

2.3 Extraction de plasmides recombinants à partir de clones bactériens.

Le recombinant plasmidique est isolé du clone bactérien par la méthode à l'ébullition ou alcaline (Maniatis et al. 1983). L'ADN est extrait à partir d'une mini-préparation (5 à 10 ml) de culture de bactéries. L'ADN plasmidique obtenu est contrôlé sur gel d'agarose.

2.4 Purification de fragments d'ADN clonés

2.4.1 méthode de "squeeze-freeze"

La méthode utilisée est décrite par Tausz et Renz (1983). Après séparation de l'ADN par électrophorèse en gel d'agarose, la bande du gel contenant l'insert est récupérée sous UV dans un tube Eppendorf (1,5 ml). On ajoute ensuite une solution contenant de l'acétate de sodium (0,3M) et de l'EDTA (1mM) et on incube à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante. Le contenu est ensuite transféré dans un microtube de 500 µl (préalablement troué par une aiguille et rempli de laine de verre siliconée) qui est plongé dans de l'azote liquide pendant quelques secondes. Le microtube est placé dans un

tube Eppendorf (1,5 ml) et l'ensemble centrifugé à 12000 rpm pendant 10 minutes. L'ADN ainsi recolté est alors précipité au congélateur par 2 volumes d'éthanol contenant 20µg de glycogène; le culot contenant l'ADN est récupéré au fond du tube Eppendorf après une centrifugation à 12000rpm pendant 30 minutes.

2.4.2 Méthodes "GeneClean" ou "Wizard"

L'ADN a été aussi extrait de l'agarose en utilisant le kit Wizard de Promega ou le kit GeneClean de Ozyme.

2.5 Hybridations moléculaires

2.5.1 Marquage de sondes à la digoxigénine

Les fragments d'ADN génomiques purifiés après isolement sont marqués à la digoxigénine selon les instructions du fournisseur (Boehringer).

2.5.2 Hybridation en Southern blot

Après digestion par l'enzyme de restriction *EcoRI*, les ADN totaux de spores ou de racines de poireau sont soumis à l'électrophorèse en gel d'agarose. Avant transfert sur membrane, l'ADN est d'abord dépuriné dans une solution HCL 0,25 N, dénaturé dans du NaOH (0,4N) et neutralisé. Le transfert sur membrane est ensuite réalisé dans une solution contenant 0,4 M NaOH et 0,6M NaCl soit par capillarité (Maniatis *et al*, 1982) ou en utilisant le système "TE Transvac vacuum blotting unit" (Hoefler). Après transfert, la membrane est immergée dans du 6XSSC et l'hybridation est effectuée pendant une nuit avec les différentes sondes à 10 - 50 ng ml⁻¹. L'hybridation a lieu à 68°C dans une solution contenant 5XSSC, 10% d'agent bloquant, 2% SDS, et 0,1% de N-lauryl sarcosinate. La

membrane est ensuite lavée deux fois à température ambiante dans du 2XSSC, 0,1%SDS et deux fois à 68°C dans du 0,1%SSC, 0,1%SDS. L'ADN est révélé en utilisant la méthode de détection chimioluminescente du système DIG (Boehringer). Ce système de détection utilise un substrat, le Lumigen TM PPD, couplé à la phosphatase, qui émet un signal lumineux. Ce signal est détecté au cours de l'exposition de la membrane pendant au moins trente minutes sur Hyperfilm Amersham.

2.5. Hybridation en dot blot

2.5.3.1 Dosage de l'ADN

Avant le dépôt en tâche de l'ADN sur membrane, un dosage préalable est effectué. Dans un premier temps, nous évaluons la quantité d'ADN en gel d'agarose par comparaison avec une gamme de dilution d'un standard qui est l'ADN du phage lambda. Ensuite, un dosage est effectué en minifluorimétrie en utilisant le minifluorimètre TKO 100 (Hoefer scientific instruments). Comme témoin, nous avons utilisé l'ADN de thymus de veau.

2.5.3.2 Dépôt de l'ADN sur membrane

Avant de déposer l'ADN sur membrane, la quantité voulue est récupérée dans un tube Eppendorf, dénaturée soit directement dans de la soude à 0,4N, soit à la chaleur dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Des dilutions sont ensuite effectuées aux facteurs voulus. Le dépôt sur membrane est effectué à l'aide d'une unité de dépôt sous vide (The convertible TM Filtration Manifold, BRL Life Technologies, Inc). L'ADN ainsi déposé sur membranes est soumis à hybridation comme décrit ci-dessus avec les différents inserts marqués à la digoxigénine.

2.6 Séquençage des inserts clonés en pUC18

2.6.1 La réaction et son principe

L'ADN cloné en vecteur pUC18 a été séquençé en utilisant le système *fmol* DNA sequencing de Promega qui permet d'utiliser deux méthodes: le **marquage direct** de l'ADN, qui combine le marquage, l'extension de l'amorce et la terminaison en une seule étape (Sanger *et al*, 1979) et celle utilisant le **marquage préalable en 5'** de l'amorce suivi dans une deuxième étape de l'**extension/terminaison**. Nous avons utilisé le marquage de l'amorce en 5' parce qu'il permet d'éviter de faux amorçages. L'amorce est d'abord marquée en 5' par incorporation du ^{32}P grâce à la T4 kinase. Ensuite une réaction de terminaison/extension est réalisée grâce à la "Grade *Taq* polymérase"(Promega) qui est une forme améliorée de la *Taq* polymérase thermostable de *Thermus aquaticus*. Le principe de la réaction enzymatique est basé sur le fait que, grâce à sa forte activité 5' 3', la *Taq* polymérase peut allonger une amorce fixée sur un brin d'ADN en incorporant un oligonucléotide en terminaison. Pour chaque olinucléotide (dNTP), un analogue (ddNTP), qui n'a pas de groupement 3'-OH nécessaire à l'élongation, est utilisé dans le tube de réaction en quantité limitante. La terminaison se fait donc pour chaque oligonucléotide (A, T, G, C).

Le contenu de chaque tube est soumis à électrophorèse sur 8% de gel acrylamide en condition dénaturante. Après révélation de la radioactivité, une échelle est générée dont le pas correspond au nucléotide. Les amorces pUC18-1 et pUC18-2 situées respectivement à 14 et 56 pb du site *Eco*RI du polylinker du pUC18 ont été utilisées.

2.6.2 Electrophorèse des produits de séquençage

L'électrophorèse des produits de séquençage se fait en gel d'acrylamide à 6%. La solution-mère est un mélange acrylamide/bis-acrylamide (19/1), urée 42% (p/v), APS 0,06% (p/v) et du TEMED dans un tampon TBE pH 8. Le gel est coulé horizontalement sur support et après une heure, une pré-électrophorèse est réalisée pour chauffer le gel. Les échantillons sont ensuite dénaturés 2 minutes à 70°C et déposés chacun dans un puits. L'électrophorèse est réalisée à une puissance de 50 W pendant 2 à 5 heures. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est démoulé et déposé sur papier Whatman 3MM. L'ensemble est ensuite séché sous vide à 80°C pendant au moins 1 heure. Une exposition du gel est ensuite réalisée toute la nuit sur film Amersham.

2.7 Choix d'amorces à partir des séquences générées par séquençage

Dans l'objectif de générer des amorces pour PCR à partir de régions séquencées, un programme appelé "Amplify 1.2" (Bill Engels, 1992) nous a permis de contrôler en simulation, la qualité des régions choisies par estimation de leur dimérisation, de leur mésappariement et de la stabilité de l'hybride formé.

2.8 Amplification à partir d'ADN génomique

Après le choix des amorces à partir de différents types de séquences, les réactions d'amplification sont réalisées après avoir déterminé la température de fixation (T_m) de chaque amorce par la formule $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ (Suggs *et al.* 1981). Un programme est alors déterminé, qui permet une dénaturation, une meilleure fixation des amorces et une élongation du fragment à amplifier par la *Taq*

polymérase. L'amplification est alors réalisée grâce à un thermocycleur (Minicycleur TM, MJ research ou Hybaid).

2.9 Séquençage de produits PCR

2.9.1 Ligature des produits PCR

Les produits obtenus par PCR ont des bouts 3' A débordants, ce qui rend leur clonage difficile. Afin de faciliter leur clonage, nous avons utilisé deux types de vecteur, le vecteur pGEM-T de Promega et le vecteur pT7Blue de Novagen avec des extrémités 3' T débordantes. Après amplification par la PCR, les produits obtenus sont séparés en gel d'agarose et le fragment obtenu est excisé du gel et purifié en utilisant le kit Wizard PCR de Promega. Pour la réaction de ligature, 50 ng du produit d'amplification sont mélangés avec le vecteur dans un rapport 1:1. Une ligature est réalisée dans 10 μ l après avoir ajouté la ligase (1U) et le tampon de l'enzyme. La réaction a lieu pendant une nuit à 15°C.

2.9.2 Transformation de bactéries par les produits PCR ligaturés

3 μ l de produits ligaturés sont utilisés pour la transformation de bactéries compétentes *E. coli* DH α 5. Une fraction aliquote de 50 à 100 μ l est ensuite étalée sur milieu AXI et des clones positifs recherchés. Pour cela, en utilisant un cure-dent, des traces de colonies blanches sont prélevées et homogénéisées dans 100 μ l d'eau stérile. Après avoir bien mélangé et centrifugé brièvement, 2 μ l de la solution sont transférés dans un tube Eppendorf contenant le mélange réactionnel pour la PCR. Les amorces utilisées sont soit le couple pUC18-1/2 ou les amorces qui ont servi à amplifier le fragment cloné.

2.10 Analyse de séquences

Les différentes séquences ont été comparées à la banque des données EMBL ou Genbank en utilisant le programme "FASTA" (Pearson et Lipman, 1988). L'analyse des séquences a été effectuée grâce au logiciel Genetics Computer Group (Devereux, Madison) version 8.0 en se servant du système UNIX via le serveur GENOME du pôle Bioinformatique CNRS-INSERM de Villejuif et les logiciels "Amplify" "DNA strider".

2.11 Analyse densitométrique

L'analyse densitométrique des spots d'hybridation a été effectuée grâce à l'analyseur d'images ALCATEL-TITN (Grenoble, France) par le système IPS (Image analysis system).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I-CLONAGE DE L'ADN D'UN CHAMPIGNON
ENDOMYCORHIZOGENE SCUTELLOSPORA CASTANEA

1-MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION D'ADN A PARTIR DE SPORES

1.1 Introduction

Nous avons mis au point une méthode simple d'extraction d'ADN à partir d'un nombre relativement petit de spores qui nous a permis d'obtenir de l'ADN hydrolysable en quantité suffisante afin de réaliser une banque génomique. Une spore de champignon endomycorhizogène à arbuscules contient plusieurs centaines à plusieurs milliers de noyaux (Cooke et al., 1987; Burggraaf et Beringer, 1989; Bécard et Pfeffer, 1993); cependant, elle est aussi riche en polysaccharides et en protéines (Sward, 1981). Ces polysaccharides et ces protéines peuvent contaminer l'ADN au cours de son extraction, ce qui rend les hydrolyses difficiles. Il fallait donc éliminer au cours d'une étape précoce les polysaccharides et les protéines tout en conservant les noyaux intacts.

1.2 Résultats et discussion

1.2.1 La méthode d'extraction de l'ADN fongique

Après tri de spores sous la loupe, environ 2000 spores sont récupérées dans un tube Eppendorf. Les spores sont lavées plusieurs fois avec de l'eau stérile. Elles sont ensuite broyées doucement grâce à un potter/Eppendorf, dans une solution contenant du Tris (50mM) pH8, de l'EDTA (25mM), du NaCl (50mM) et 2% de mercaptoéthanol. Une centrifugation de 1000 rpm pendant une minute permet d'éliminer le surnageant très riche en lipides et autres molécules. Nous avons choisi un tampon contenant du NaCl (50mM) pour conserver les noyaux intacts au cours du premier broyage. Une lyse de 30 minutes à 65°C est ensuite effectuée dans une solution contenant du tampon

Tris (50 mM) pH8, de l'EDTA (25mM), 2%SDS, 1% N-laurylsarcosinate, de la protéinase K (1mg/ml), et 2% de mercaptoéthanol. Après cette lyse, une centrifugation de 1000 rpm pendant une minute permet de récupérer le surnageant (lysat) contenant l'ADN fongique. Une deuxième lyse est ensuite réalisée dans les mêmes conditions sur le culot et le deuxième lysat obtenu est mélangé au premier dans un tube Eppendorf. Les protéines sont précipitées au froid (4°C) avec 0,5M d'acétate de potassium pendant 15 minutes. Une centrifugation de 13000 rpm pendant 15 minutes permet d'éliminer le précipité. Le surnageant est traité dans un premier temps à la RNase (3mg/ml) à 37°C pendant 10 minutes, ensuite au phénol, au phénol/chloroforme (1:1) et puis au chloroforme afin d'éliminer les traces de protéines. Les acides nucléiques sont ensuite précipités avec deux volumes d'éthanol à -20°C pendant une nuit ou à -70°C pendant 30 minutes. Après centrifugation à 13000 rpm pendant 30 minutes, le culot d'ADN est lavé avec de l'éthanol 70% et séché à l'air ou au "speed vac". Il est ensuite dissout dans l'eau ou dans du TE.

1.2.2 Rendement de la méthode

L'estimation sur gel d'agarose par rapport à une gamme étalon (ADN du phage lambda) de l'ADN obtenu à partir des spores de *S. castanea* et *Gig. rosea*, donne 1,5 à 2ng par spore. Des auteurs comme Burggraaf et Beringer (1989) et Viera et Glenn (1990) ont estimé à des dizaines de milliers, le nombre de noyaux par spore des champignons endomycorhizogènes à arbuscules. Dans le cas de *Gig. margarita*, Cooke et al. (1987) et Bécard et Pfeffer (1993) ont estimé les nombres de noyaux par spore comme variant de 1700 à 3850. *S. castanea* et *Gig. margarita* ayant des spores d'une taille comparable, on pourrait

penser qu'elles contiennent le même nombre de noyaux. Si nous prenons une moyenne de 2000 noyaux par spore, nos résultats sont en accord avec ceux de Bianciotto et Bonfante (1992); ces auteurs mesuré par fluorocytométrie 0,77pg d'ADN par noyau chez *Gig. margarita*, ce qui donne environ 1,5ng d'ADN par spore. Toutefois, ces résultats seraient surestimés si l'on considère le nombre de noyaux estimé par G. Bécard (700 noyaux en moyenne pour *S. castanea*, communication personnelle) et la valeur de 0,7 ng d'ADN par spore du même champignon, obtenue par cytométrie en flux (Michel Hosny, communication personnelle).

Notre premier objectif a été d'obtenir de l'ADN sporal de bonne qualité qui puisse être ensuite utilisé en clonage génomique. Il existait bien entendu dans la littérature une description de techniques utilisées par des auteurs comme Burggraaf et Beringer (1989) ou Cummings et Wood (1989) qui permettaient d'obtenir de l'ADN à partir de spores de champignons endomycorhizogènes à arbuscules. Mais, cet ADN a été obtenu à partir d'un nombre très élevé de spores (600000 dans le cas de Cummings et Wood, 1989) et n'était pas facilement hydrolysable. De plus, l'utilisation d'un nombre très élevé de spores est susceptible d'augmenter les risques de contamination de l'ADN fongique, car les spores obtenues dans des conditions non aseptiques peuvent être contaminées par des bactéries vivant dans le sol. Notre technique nous a permis d'obtenir, à partir d'un nombre relativement faible de spores (2000), et en quantité suffisante, de l'ADN hydrolysable par certaines enzymes de restriction (*EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*), pour un clonage génomique. Il est clair que, pour des espèces comme *Glomus mosseae*, qui ont de petites spores, il faudrait utiliser 5 fois plus de spores que pour *S. castanea*; cela conduirait à trier 10000 spores pour obtenir de l'ADN dans des quantités comparables.

Notre technique nous a permis d'obtenir pour la première fois de l'ADN digestible en vue de la réalisation du clonage de l'ADN d'un champignon endomycorhizogène à arbuscules, *S. castanea* (Zézé *et al.*, 1994).

2-LE CLONAGE GENOMIQUE DE L'ADN FONGIQUE

2.1 Résultats et discussion

2.1.1 Représentativité de la banque

Le clonage de l'ADN de *S. castanea* a été réalisé avec le vecteur pUC18 comme décrit dans Zézé *et al.* 1994. Pour la réalisation du clonage, les rapports suivants entre l'ADN génomique de *S. castanea* hydrolysé par *EcoRI* et le vecteur ont été essayés: (1/1, 2/1, 10/1). Le test de la ligature a été contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose et le rapport 10:1 a donné le meilleur résultat (Figure 3). Cet ADN a donc été utilisé pour transformer les bactéries. Nous avons obtenu environ 1000 clones recombinants après le clonage de l'ADN génomique de *S. castanea*. Désignons par L la taille approximative du génome de *S. castanea* qui est de 10^9 pb (Michel Hosny, communication personnelle). L'enzyme *EcoRI* utilisé pour l'établissement de la banque est une enzyme à 6 bases et la longueur moyenne (l) des fragments générés est calculée comme suit $l = 1:(1/4)^6 = 4 \times 10^3$ pb. Si nous appelons N le nombre de fragments attendus générés par *EcoRI*, sa valeur est $N = L/l = 10^9 \text{pb} / 4 \times 10^3 \text{pb} =$ environ 250000 fragments. Nous n'avons obtenu que 1000 clones recombinants, ce qui représente une banque partielle.

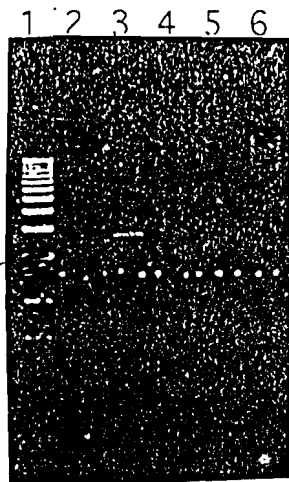


Figure 3 : Electrophorèse en gel d'agarose 0,8% de produits de ligation ADN de *Scutellospora castanea*/vecteur pUC18 :

- ligne 1, ladder 1 kb
- ligne 2, ADN total de spores de *S. castanea*
- ligne 3, 20ng pUC18/*EcoRI*
- ligne 4, produit de ligation, rapport 1:1
- ligne 5, produit de ligation, rapport 2:1
- ligne 6, produit de ligation, rapport 10:1

2.1.2 Confirmation de l'origine fongique de quelques fragments d'ADN de la banque

Les spores pouvant être contaminées par des bactéries du sol, il est indispensable de montrer que les fragments clonés sont effectivement de l'ADN fongique. Le poireau étant la plante-hôte qui nous a permis d'entretenir *S. castanea*, nous avons voulu voir s'il était possible à l'aide de clones recombinants de détecter spécifiquement par hybridation moléculaire l'ADN fongique, non seulement dans la spore, mais aussi dans les racines infectées avec *S. Castanea*, en utilisant comme témoin des poireaux non endomycorhizés. L'ADN extrait de spores de *S. castanea*, de racines de poireau infecté ou non, a été hydrolysé par l'enzyme *EcoRI*. Après électrophorèse des produits de digestion et transfert sur membrane, trois clones choisis au hasard dans la banque contenant respectivement des inserts de 1300, 1800 et 6400pb (tailles estimées sur gel par rapport au ladder 1 kb) ont été marqués à la digoxigénine et utilisés comme sondes en Southern blot. Après hybridation avec les différents inserts marqués, un signal très intense, a été obtenu tant avec l'ADN sporal qu'avec l'ADN extrait des racines du poireau infecté avec *S. castanea* mais non avec l'ADN du poireau non infecté (voir Figure 4 et 5 dans Zézé *et al.* 1994 page 57). Cela confirme l'origine fongique de ces inserts. Nos résultats montrent aussi qu'il est possible de détecter le symbiote fongique *in planta* en utilisant la technique d'hybridation selon Southern. D'une manière générale, l'application de cette technique nécessite l'utilisation d'une quantité importante d'ADN. Même si la détection du symbiote endomycorhizogène à arbuscules *in planta* est envisageable par l'hybridation selon Southern, son application pourrait être sévèrement limitée par le niveau de colonisation de la racine par le champignon.

DNA cloning and screening of a partial genomic library from an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora castanea*

Adolphe Zézé, Hubert Dulieu, Vivienne Gianinazzi-Pearson

Laboratoire de Phytoparasitologie INRA-CNRS, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, 21034 Dijon Cédex, France

Abstract. A technique has been developed to efficiently extract purified, restrictable genomic DNA from spores of different arbuscular mycorrhizal fungi in order to begin detailed investigations of the genome of the Glomales. The protocol yielded variable amounts of DNA depending on the fungal species; for *Scutellospora castanea* and *Gigaspora rosea* it reached values of 1.5–2 ng/spore. *EcoRI* digests of DNA from *S. castanea* were cloned into pUC18 and about 1000 recombinant DNA clones were obtained. Of those screened, 50 contained inserts of 500–7000 bp. Selected inserts detected DNA sequences from *S. castanea* spores or roots infected by this fungus, but not from nonmycorrhizal roots. This is the first report of a partial genomic library from an arbuscular mycorrhizal fungus.

Key words: *Scutellospora castanea* – Arbuscular mycorrhiza – Genomic library

Introduction

Fungi belonging to the Glomales (Zygomycetes) reproduce by the formation of large, multinucleate spores on mycelium developing from an arbuscular mycorrhiza of a preceding culture. These spores, which are considered asexual except for one species (Tomterup 1988), have been estimated to contain several thousand nuclei (Cooke et al. 1987; Burggraaf and Beringer 1989; Viera and Glenn 1990; Bécard and Pfeffer 1993). Thus they are efficient in maintaining and transmitting genetic information to subsequent generations and no doubt contribute to the ubiquity of the Glomales, as well as to their apparent stability during coevolution in association with many different plants (Morton 1990a,b). Numerous attempts to axenically culture axenic mycelium of Glomales have been unsuccessful (Hepper 1984; Williams 1991) and conse-

quently the genetics of these fungi remains a matter of speculation. Taxonomic diagnosis of the Glomales has relied entirely on the morphological characteristics of spores (Walker 1992), but molecular approaches through recombinant DNA or PCR techniques now offer alternative strategies for detailed studies of their genetic variability and phylogenetic relationships (Hewitt et al. 1991). They also open up possibilities of appreciating polymorphic variability between isolates of a same species, and of obtaining specific probes for rapid identification of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi within host tissues, which is virtually impossible at present.

Extraction of genomic DNA from spores of the Glomales is possible (Burggraaf and Beringer 1989; Cummings and Wood 1989; Simon et al. 1992; Waterman and Dales 1993), and amplification of DNA by PCR using oligonucleotide primers has recently been achieved (Simon et al. 1992; Waterman and Dales 1992; Wyss and Bonfante 1993). Up to now no genes have been cloned from AM fungi, nor have RFLP analyses been published, although DNA has been isolated in a form digestible by restriction enzymes using a procedure requiring a very large number of spores (600 000) (Cummings and Wood 1989). In order to begin detailed investigations of the fungal genome in the Glomales, we have: (1) developed a protocol for efficient extraction of restrictable DNA from spores; (2) cloned DNA from *Scutellospora castanea* Walker (Walker et al. 1993) to obtain a partial genomic library; (3) characterized several DNA inserts for their size and specificity vis-à-vis fungal DNA from spores or mycorrhizal roots.

Material and methods

DNA of several AM fungi [*Gigaspora margarita* Becker & Hall (LPA2), *S. castanea* Walker (LPA4), *G. rosea* Nicolson & Schenck (LPA23), two strains of *Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe (LPA1, LPA26)] was isolated from spores which were wet-sieved from pot cultures with *Allium porrum* L., collected individually and surface sterilized (Gianinazzi-Pearson et al. 1989).

Correspondence to: V. Gianinazzi-Pearson

About 2000 spores were gently crushed in 50 mM Tris pH 8.0, 25 mM EDTA, 50 mM NaCl (TE) and 2% mercaptoethanol. The suspension was centrifuged for 1 min at 1000 g to separate the cloudy, lipid-rich supernatant from the broken spore walls with which many nuclei remained associated. The spore walls and nuclei were suspended in a lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 25 mM EDTA, 2% SDS, 1% lauryl sarcosinate, 1 mg ml⁻¹ Proteinase K, 2% mercaptoethanol) for 30 min at 65°C to extract and lyse the nuclei. The lysate was centrifuged for 1 min at 1000 g and the supernatant recuperated. Spore walls were treated again with the lysis buffer and the two supernatants combined. Proteins were precipitated for 15 min on ice with 0.5 M potassium acetate and centrifuged down for 15 min at 13000 g. Nucleic acids contained in the supernatant were treated with DNase-free RNase A (3 mg ml⁻¹) for 10 min at 37°C then purified twice with phenol (once with 1:1 (v/v) phenol:chloroform, and once with chloroform). The purified DNA was precipitated in 2 volumes of ethanol at -20°C or -70°C, centrifuged, washed with 70% ethanol, air-dried and resuspended in TE buffer or sterile water. The quality of DNA obtained from spores of the five different arbuscular mycorrhizal fungi was tested by digestion with different endonucleases (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III) following the protocol indicated by the supplier (Boehringer-Mannheim).

For cloning, DNA from *S. castanea* was completely digested with *Eco*RI and digests were ligated overnight at 15°C with *Eco*RI dephosphorylated pUC18 plasmid in the ratio 10:1. Competent *E. coli* DH5 α MerAE cells were prepared according to Hanahan's (1985) procedure using RbCl₂ and a 200- μ l cell suspension was mixed with 3 μ l (0.7 μ g) of pUC18-ligated DNA. Transformation was achieved by a 90-s heat shock at 42°C and cell expression induced by shaking (200 rpm) for 1 h at 37°C. Aliquots (100 μ l) were plated on Luria Broth agar containing 50 μ g ml⁻¹ ampicillin, 0.1 M isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside and 0.1 M Xgal. Recombinant clones were screened for inserts: plasmids were extracted by mini-preparation using the boiling procedure described by Maniatis et al. (1982) and, after *Eco*RI digestion, inserts were separated from the pUC18 on a 0.8% agarose gel.

Several inserts were isolated by the freeze-squeeze technique (Maniatis et al. 1982) and investigated for their correspondence to fungal DNA sequences by Southern analysis. DNA was extracted from root systems of 8- to 10-week-old mycorrhizal and nonmycorrhizal *Allium porrum* using the CTAB method (Rogers and Bendich 1985). Aliquots (15 μ l = 1 μ g) of insert or of total DNA from *S. castanea* spores, mycorrhizal or nonmycorrhizal roots of *Allium porrum* were labeled with digoxigenin according to the protocol of the Boehringer Research Center (Kit no. 1093657), modified for the washing step after antibody binding. Extracted inserts or digested DNA from spores or roots were separated on 0.8% agarose gel and after depurination in 0.25 M HCl, DNA was transferred to a Bioprobe Biohylon Z⁺ membrane in 0.4 M NaOH and 0.6 M NaCl using a TE 80 Transvac vacuum blotting unit (Hoefer). The membrane was briefly washed in 6 \times SSC buffer (instead of 2 \times SSC as indicated by the supplier) and hybridized overnight at 68°C with 10–50 ng ml⁻¹ digoxigenin-labelled DNA in 5 \times SSC containing 10% blocking solution, 2% SDS and 0.1% N-lauryl sarcosinate. Unbound probe was removed by washing the membrane twice for 5 min at room temperature in 2 \times SSC, 0.1% SDS and twice for 15 min at 68°C in 0.1 \times SSC, 0.1% SDS. Hybridized DNA was revealed using chemiluminescent detection as described by the supplier (Boehringer Research Centre Kit no. 1093657), except that the membrane was washed twice for 3 h in 0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3% Tween 20 at room temperature, before incubating in the AMPPD substrate. The membrane was then exposed for 1 h on an Amersham Hyperfilm.

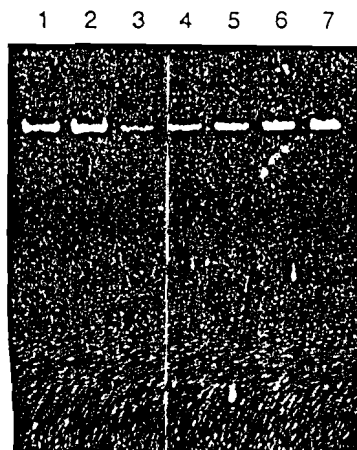


Fig. 1. DNA extracted from spores of *Scutellospora castanea* (lane 1) and *Gigaspora rosea* (lane 2) and electrophoresed through a 0.8% agarose gel. Adjacent lanes of the gel were loaded with 20, 40, 60, 80 and 100 ng lambda DNA (lanes 3–7)

Results and discussion

The simplified protocol described here for obtaining genomic DNA from spores yielded variable amounts of DNA, depending on the species of AM fungus. When extracts from spores of *S. castanea* or *G. rosea*, for example, were compared with DNA from lambda phage (Fig. 1), values were estimated to reach approximately 1.5–2 ng DNA/spore. Although there are indirect estimates suggesting that large spore Glomales species can contain tens of thousands of nuclei per spore (Burggraaf and Beringer 1989; Viera and Glenn 1990), numbers obtained by direct observation of stained nuclei give more realistic values ranging from 1700 to 3850 (Cooke et al. 1987; Bécard and Pfeffer 1993). Taking an average value of 2800 together with fluorocytometric measurements of nuclear DNA contents for *G. margarita* (up to 0.77 pg per nucleus, Bianciotto and Bonfante 1992), this gives approximately 2 ng DNA/spore. This is close to the amount of DNA extracted from *G. rosea* or *S. castanea*, underlining the efficiency of the extraction procedure described here. The high DNA yield obtained after lysis is no doubt due to a large proportion of the nuclei being associated with, or adhering to, the inner surface of the spore wall, as suggested by previous light and electron microscope observations (Sward 1981; Bianciotto and Bonfante 1992).

The DNA obtained from the different fungi was digested by three restriction enzymes; an example is given in Fig. 2 of *Eco*RI digests for five fungi. Spores of the Glomales are rich in lipids, polysaccharides and proteins (Sward 1981) which can contaminate DNA during extraction and make for difficulties in obtaining restrictable DNA. In the two-step procedure we have developed, low-density spore components are eliminated after crushing the spores. Moreover, the protocol requires far fewer spores than that published by Cummings and Wood (1989) and the restricted DNA

1 2 3 4 5 6 7 8



Fig. 2. *Eco*RI digests of 300 ng total DNA from spores of different arbuscular mycorrhizal fungi electrophoresed through a 0.8% agarose gel: lane 2, *S. castanea*; lane 3, *G. rosea*; lane 4, *G. margarita*; lane 5, *Acaulospora laevis* isolate LPA1; lane 6, *A. laevis* isolate LPA26; lanes 1, 8, 1-kb DNA ladder

obtained has been successfully used to clone genomic DNA from *S. castanea*.

A random library of about 1000 recombinant DNA clones was obtained from the *Eco*RI-digested DNA of *S. castanea*, and of 70 that were screened, 50 contained inserts ranging from 500 to 7000 bp (results not shown). Since spores can be contaminated by bacteria, seven of the clones with inserts between 500 and 6400 bp (Fig. 3A) were investigated for their correspondence to fungal sequences. In a first approach, the inserts shown in Fig. 3A were hybridized with total digoxigenin-labeled nuclear DNA from *S. castanea* spores. The inserts gave different hybridization intensities and three showed a significant signal (1300 bp, 4000 bp, 6400 bp; Fig. 3B), suggesting that they could represent repeated DNA sequences present in a high copy number in the fungal genome. In a second approach, two of these inserts (1300 bp, 6400 bp), and a third (1800 bp) which also strongly hybridized with total spore DNA (results not shown), were labeled with digoxigenin and hybridized with an *Eco*RI digest of DNA from either *S. castanea* spores, nonmycorrhizal roots or *S. castanea*-infected roots of *Allium porrum*. The 1300-bp (pSC1), 1800-bp (pSC2) and 6400-bp (pSC3) inserts specifically hybridized with *Eco*RI fragments of corresponding sizes extracted from spores or mycorrhizal roots (Figs. 4, 5). None of the inserts gave a hybridization signal with *Eco*RI-digested DNA from nonmycorrhizal roots, even though a significant amount (3.5 µg) was loaded onto the gel (Fig. 4). The similar hybridization patterns obtained with pSC1, pSC2 and pSC3 using both spores or mycorrhizal roots clearly shows that they represent DNA sequences from *S. castanea*. The fact that none of the selected inserts hybridized with sequences of *Eco*RI-digested DNA from nonmycorrhizal roots of *Allium porrum* suggests that they can be used to specifically detect the presence of the fungal genome in roots.

In conclusion, this is the first report of cloning of genomic DNA from an AM fungus and its use to probe for fungal tissue within roots. Further screening of other recombinant DNA clones from the partial genomic library is presently under way. Preliminary results indicate that some of the inserts are specific to *S. castanea* whilst others hybridize with sequences from other genera of the Glomales. Species- or isolate-specific DNA sequences should allow the identification of fungi in planta, whilst aspecific fungal DNA clones offer the possibility of applying RFLP analyses directly to mycorrhizal tissues. Since fungi in the Glomales are unculturable organisms, the use of mycorrhizal roots will eliminate problems associated with spore analyses (production, isolation, quantity) and represents a potential new tool for analyzing polymorphism in order to define the taxonomic or phylogenetic relationship within this fungal group.

Acknowledgements. The authors thank O. Chatagnier and M. Fourmann for technical assistance and J. Bonnefoy for the photography. This work was partially supported by the EPR-Bourgogne (project EPR 3062A) and the Ministry of Scientific Research and Higher Education, Côte d'Ivoire (grant to A. Z.).

1 2 3 4 5 6 7 8

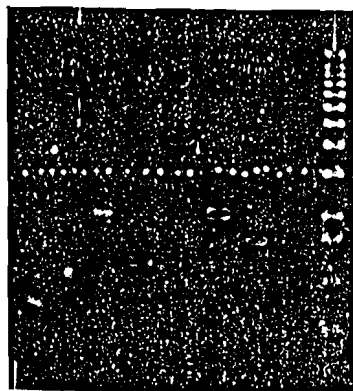


Fig. 3. A Electrophoresis through a 0.8% agarose gel of different-sized squeeze-frozen inserts (200 ng DNA) from the genomic DNA library of *S. castanea*. B Southern hybridization of A with digoxigenin-labeled total DNA from *S. castanea* spores. Lane 1, 1-kb DNA ladder; lane 2, 6400 bp; lane 3, 1800 bp; lane 4, 1300 bp; lane 5, 4000 bp; lane 6, 2000 bp; lane 7, 1500 bp; lane 8, 1-kb DNA ladder. The signals obtained (arrows) correspond to the 6400-bp, 1800-bp and 4000-bp inserts

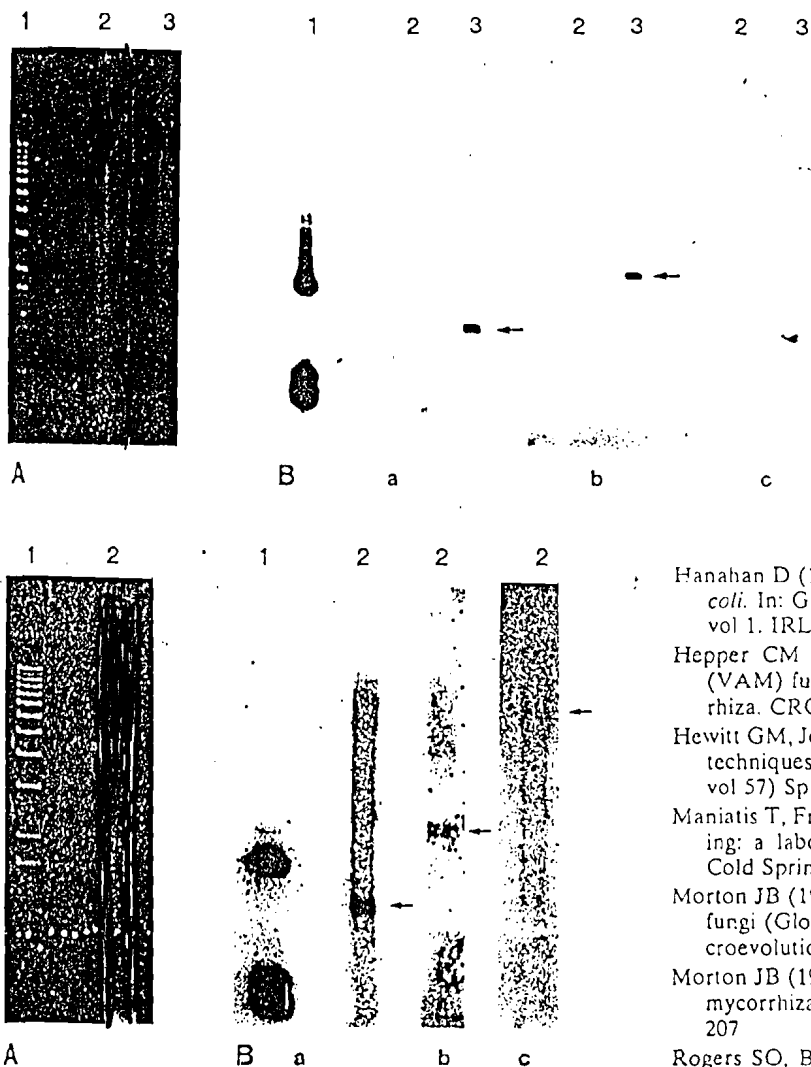


Fig. 5. A Electrophoresis through a 0.8% agarose gel of *Eco*RI-digested DNA (3.5 µg) from *Allium porrum* roots infected with *S. castanea* (lane 2); lane 1, 1-kb DNA ladder. B Southern hybridization of A with the digoxigenin-labeled pSC1-1300-bp (a), pSC2-1800-bp (b) and pSC3-6400-bp (c) inserts (arrows) from the partial genomic library of *S. castanea*

References

- Bécard G, Pfeffer PE (1993) Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 194:62-68
- Bianciotto V, Bonfante P (1992) Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol Res* 96:1071-1076
- Burggraaf AJP, Beringer JE (1989) Absence of nuclear DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *New Phytol* 111:25-33
- Cooke JC, Gemma JN, Koske RE (1987) Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 79:331-333
- Cummings B, Wood T (1989) A simple and efficient method for isolating genomic DNA from endomycorrhizal spores. *Gene Anal Tech* 6:89-92
- Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S (1989) In vitro enhancement of spore germination and hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7:243-255
- Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: Glover DM (ed) DNA cloning, a practical approach, vol 1. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp 109-135
- Hepper CM (1984) Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. In: Powell CLI, Bagyaraj DJ (eds) VA mycorrhiza. CRC Press, Boca Raton, Fla, pp 95-112
- Hewitt GM, Johnston AWB, Young, JPW (eds) (1991) Molecular techniques in taxonomy. (NATO ASI series H: Cell biology, vol 57) Springer Berlin Heidelberg New York
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (eds) (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Morton JB (1990a) Species and clones of arbuscular-mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro- and microevolutionary processes. *Mycotaxon* 37:493-515
- Morton JB (1990b) Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82:192-207
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* 5:69-76
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* 58:761-768
- Sward RJ (1981) The structure of the spores of *Gigaspora margarita*. II. Changes accompanying germination. *New Phytol* 88:661-666
- Tommerup IC (1988) The vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Adv Plant Pathol* 6:81-91
- Viera A, Glenn MG (1990) DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycologia* 82:263-267
- Walker C (1992) Systematics and taxonomy of the Glomales: a possible way forward. *Agronomy* 12:887-897
- Walker C, Gianinazzi-Pearson V, Marion-Huguet H (1993) *Scutellospora castanea*, a newly described arbuscular mycorrhizal fungus. *Crypt Mycol* 14:279-286
- Waterman LD, Dales BG (1993) Protoplast isolation and amplification of ribosomal DNA from VAM fungi of the genus *Gigaspora*. In: Laurent S (ed) Proceedings of the 3rd Caribbean Biotechnology Conference, UNESCO Subregional Office for Science and Technology for the Caribbean, Trinidad, Tobago, pp 75-81
- Williams PG (1991) Axenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi. *Methods Microbiol* 24:203-220
- 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

Fig. 4. A Electrophoresis through a 0.8% agarose gel of *Eco*RI-digested DNA from nonmycorrhizal *Allium porrum* roots (3.5 µg, lane 2) and *S. castanea* spores (1.5 µg, lane 3); lane 1, 1-kb DNA ladder. B Southern hybridization of A with the digoxigenin-labeled pSC1-1300-bp (a), pSC2-1800-bp (b) and pSC3-6400-bp (c) inserts (arrows) from the partial genomic library of *S. castanea*

II-ISOLEMENT DE SEQUENCES REPETES

1. METHODES SPECIFIQUES

1.1 Isolement de séquences répétées

La recherche de séquences répétées se fait en utilisant différentes méthodes, comme nous l'avons présenté dans le chapitre "Choix d'une approche moléculaire". Un échantillon de 23 clones a été choisi au hasard dans la banque de *S. castanea*. Après extraction des plasmides par la méthode à l'ébullition, ou de la lyse alcaline, ceux-ci sont digérés par l'enzyme *EcoRI*, soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 0,8% et ensuite transférés sur membrane. L'ADN total de spores de *S. castanea* marqué à la digoxigénine a été utilisé comme sonde. Les hybridations ont été réalisées à 68°C pendant une nuit. La figure 4 illustre le type de résultats obtenus avec ce procédé.

1.2 Recherche de séquences répétées spécifiques

1.2.1 Utilisation d'ADN totaux comme sondes

L'ADN total de spores de quatre espèces appartenant aux principaux genres des Glomales : *A. laevis*, *G. caledonium*, *Gig. rosea* et *S. castanea* a été extrait, marqué à la digoxigénine et utilisé comme sonde sur un échantillon d'inserts soumis à électrophorèse et transférés sur membrane. Comme précédemment, l'hybridation est réalisée pendant une nuit à 68°C. Cette expérience nous a permis de présélectionner une série de fragments spécifiques ou non de *S. castanea*.

1.2.2 Utilisation de la technique de dépôt en tâche d'ADN totaux

Les ADN totaux des spores de quatre champignons: *A. laevis*, *G. caledonium*, *Gig. rosea* et *S. castanea* sont dilués successivement selon les rapports 1/2 ou 1/3 et déposés sur membrane. Après extraction des plasmides, digestion par *EcoRI* et électrophorèse, les inserts sont récupérés par "Squeeze freeze", marqués à la digoxigénine et utilisés comme sondes. Des inserts non marqués ont servi de témoin et ont été déposés sur membrane après dilution.

2-RESULTATS

1-Isolement de séquences répétées

23 inserts pris au hasard dans la banque génomique de *S. castanea* ont été hybridés avec l'ADN total de *S. castanea* marqué à la digoxigénine. La figure 4 montre un exemple d'hybridation. Après hybridation, 14 inserts ont donné un signal d'hybridation à intensité moyenne ou forte (voir Tableau 3, dans Zézé *et al.* à la page 94). Les neuf autres inserts n'ont donné aucun signal détectable. Ces résultats nous ont permis de retenir les inserts ayant donné un signal pouvant correspondre à des séquences répétées.

2-Recherche de séquences répétées spécifiques ou non de *S. castanea*

Les hybridations utilisant les ADN totaux marqués à la digoxigénine de *A. laevis*, *G. caledonium*, *Gig. rosea* nous ont permis de mettre en 14 inserts parmi lesquels 4 s'hybrident aussi bien avec l'ADN d'autres espèces que celui de *S. castanea* et 10 inserts s'hybrident seulement avec l'ADN de *S. castanea*. Comme l'indique le tableau 3 page 94, les inserts de *S. castanea* SC17 et SC22 s'hybrident aussi

avec l'ADN total de *Gig. rosea*. Le fragment SC3 s'hybride aussi bien avec l'ADN total de *A. laevis* qu'avec celui de *G. caledonium*, tandis que l'insert SC4 est reconnu par les quatre ADN totaux marqués. Pour neuf inserts, nous avons obtenu un signal fort après hybridation avec l'ADN total de *S. castanea*. Cela suggère que ces séquences pourraient être représentées dans le génome de *S. castanea* en nombre de copies élevé. Nous nous sommes servi de ces neuf inserts comme matériel de base en vue d'identifier des séquences répétées spécifiques ou non de *S. castanea* en utilisant la technique de dépôt en tâche.

Les neuf inserts ont été marqués et utilisés comme sondes sur les ADN totaux dilués des différents champignons. La figure 5 montre que l'insert SC1 ne s'hybride qu'à l'ADN total de *S. castanea*, suggérant qu'il pourrait s'agir d'une séquence spécifique du genre *Scutellospora*. Un autre insert (SC4) reconnaît tous les ADN totaux des quatre espèces testées (Figure 6), confirmant les résultats obtenus en utilisant les ADN totaux comme sondes.

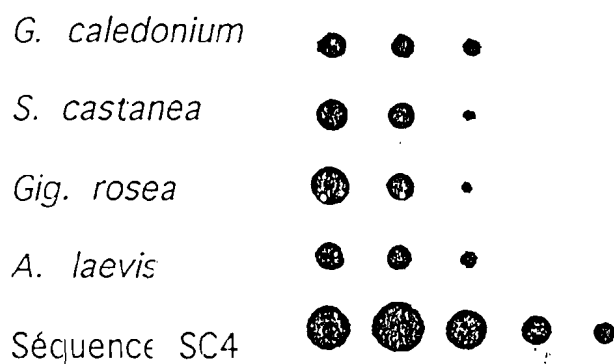


Figure 6 : Hybridation en Dot blot d'ADN totaux de différents genres de champignons endomycorhizogènes à arbuscules avec la séquence SC4 marquée à la digoxigénine. Les ADN totaux sont dilués au facteur 2 de 600ng à 4 ng sauf celui de *G. caledonium*, qui va de 300ng à 2ng et SC4 de 2ng à 0,0078ng. Des réponses positives sont obtenues avec tous les champignons utilisés.

III-MISE AU POINT D'UNE APPROCHE MOLECULAIRE DE
DETECTION SPECIFIQUE D'UN CHAMPIGNON
ENDOMYCOEITZOGENE *IN PLANTA*

3-DI SCUSSION ET CONCLUSION

De 23 clones étudiés, 14 nous ont donné des signaux intenses avec l'ADN total de *S. castanea*. Nous avons donc une fréquence de 14/23 en terme de séquences répétées. Ce qui est relativement important. Ceci laisse supposer que le génome de *S. castanea* pourrait contenir des séquences répétées dans une proportion de l'ordre de 50%.

La recherche de séquences spécifiques de *S. castanea* par la technique de dépôt en tâches nous a permis de repérer une séquence (SC1) qui reconnaît spécifiquement le génome de *S. castanea*. L'hybridation s'est effectuée en conditions stringentes ; cela n'exclut donc pas que la séquence SC1 soit présente du génome des autres espèces testées. Mais dans ce cas, l'homologie n'est pas suffisante pour que l'ADN hybride résiste aux lavages à la température de 68°C. SC1 pourrait être le résultat d'une évolution rapide qui lui aurait permis de diverger et n'être présente que dans le génome de *S. castanea*. Ce niveau de divergence pourrait donc être exploiter pour rechercher des variations à l'intérieur de l'espèce *castanea*.

La même technique de dépôt d'ADN en tâche nous a permis d'identifier un autre type de séquence (SC4) qui reconnaît tous les ADN totaux fongiques testés. Cela suggère que cette séquence est présente dans le génome de tous les champignons endomycorhizogènes à arbuscules étudiés. Selon son degré de conservation qui est vraisemblablement plus élevée que celle de la séquence SC1, cette séquence SC4 pourrait être utilisée pour étudier des variations intergénériques ou interspécifiques.

1-CARACTERISATION D'UNE SEQUENCE REPETEE ET UTILISATION EN DETECTION SPECIFIQUE

1.1 Introduction

Ayant montré que parmi les séquences répétées, certaines sont spécifiques du champignon endomycorhizogène à arbuscules *S. castanea*, nous avons entrepris de caractériser de façon plus approfondie une d'entre elles et de l'utiliser ensuite comme outil de détection de ce champignon *in planta*. En effet, la démonstration que les séquences répétées peuvent être utilisées comme des outils de détection spécifique a été faite chez les plantes (Junghans et Metzlauff, 1988; Schweizer, 1988; Schmidt et al. 1990). Au cours de cette étude, nous avons voulu démontrer la faisabilité d'une telle approche pour la détection spécifique *in planta* de champignons endomycorhizogènes à arbuscules. L'utilisation rationnelle de ces champignons en agriculture implique de savoir contrôler efficacement l'inoculum fongique de même que son évolution dans le sol. La connaissance approfondie de la diversité génétique de ces champignons au niveau moléculaire devrait permettre d'obtenir des marqueurs discriminants d'espèces ou d'isolats de champignons endomycorhizogènes en vue de les identifier à n'importe quel stade de leur développement et notamment au cours de la phase symbiotique.

1.2 Résultats

1.2.1 Caractérisation de la séquence SC1

La séquence de *S. castanea* SC1 s'étant montrée spécifique de l'espèce, nous avons décidé de la caractériser en utilisant trois techniques: (i) l'hybridation en dot en vue de déterminer le nombre de copies,

(ii) l'hybridation en Southern en vue de déterminer le type d'organisation de cette séquence dans le génome de *S. castanea* et le séquençage complet qui nous a permis de déterminer son organisation nucléotidique.

1.2.1.1 Estimation du nombre de copies de la séquence SC1 dans le génome de *S. castanea*

L'hybridation en "dot blot" réalisée sur ADN total de spores de différentes espèces de champignon endomycorhizogène à arbuscules en utilisant comme sonde le fragment SC1 marqué à la digoxigénine (Figure 5) nous a permis, après traitement des spots par analyse d'images, de déterminer le nombre de copies de la séquence SC1 dans le génome de *S. castanea*. On détermine une courbe densitométrique des spots obtenus avec la séquence SC1 comme étalon, ce qui donne directement la valeur correspondante en quantité d'ADN, par intrapolation des valeurs de DOI (densité optique intégrée) des signaux obtenus par rapport à celles de la sonde SC1. Ainsi, le signal obtenu avec 60ng d'ADN total de *S. castanea* correspond à 0,24ng de l'insert SC1. Ce qui donne comme proportion de fragments homologues à SC1 $0,24/60 = 0,004$. Ceci correspond à 0,4% du génome de *S. castanea*. En considérant 1pg comme proche de la masse du noyau de *S. castanea*, nous obtenons $0,004 \times 10^9 = 410^6$ séquences homologues de SC1 dans le génome de *S. castanea*; cela correspond à $410^6/1200 = 2500$ copies de la séquence SC1 par noyau.

1.2.1.2 Organisation de la séquence SC1 dans le génome de *S. castanea*

Pour montrer comment la séquence SC1 est organisée dans le génome de *S. castanea*, 1,5µg d'ADN total de spores de *S. castanea*

sont digérés par *EcoRI*. Après migration sur gel, les produits de digestion sont transférés sur membrane et hybridés avec la séquence SC1 marquée à la digoxigénine comme sonde. Après hybridation, trois types de bandes ont été obtenus (Figure 7). Un correspondant à la taille de la séquence SC1 (1200bp), un autre à 3500bp et un dernier à 6500bp. De tels résultats mettent en évidence la présence vraisemblable de trois familles de la séquence SC1. En plus, nous n'obtenons pas un signal en dessous de 1200bp ce qui pourrait faire penser que SC1 serait l'unité de base.

1.2.1.3 Séquençage et analyse de SC1

En vue de faire une étude plus approfondie de la séquence SC1, un séquençage complet a été réalisé. Cela nous a permis de déterminer la taille exacte de la séquence SC1 qui est de 1202bp (Figure 8). Des séquences de 5 à 15bp orientées dans le même sens et répétées au moins une fois (répétées directes) ont été mises en évidence. La recherche de cadres de lecture ouverts (ORF) en utilisant le programme "DNA strider" n'a pas donné de résultats significatifs. Par ailleurs beaucoup de codons stop ont été mis en évidence. Cette séquence ne coderait donc pas pour une protéine. Elle pourrait être hétérochromatique comme le sont certaines séquences d'ADN répétées en tandem.

1.2.2-Utilisation de la séquence SC1 comme outil de détection de *Scutellospora castanea in planta*

1.2.2.1 Test de détection spécifique du genre *S. castanea* sur l'ADN total de spores par hybridation moléculaire en Dot et Southern blot.

Par une première approche (Figure 5), nous avons pu mettre en évidence par hybridation en dot blot que la séquence SC1 reconnaît l'ADN de *Scutellospora* mais non celui des autres espèces testées c'est-à-dire *A. laevis*, *Gig. rosea*, *G. caledonium*. En vue de confirmer ce premier résultat, l'ADN total de ces quatre espèces de champignons endomycorrhizogènes a été extrait de spores. Après hydrolyse avec l'enzyme *EcoRI* et électrophorèse sur gel d'agarose, les produits ont été transférés sur membrane et hybridés avec la séquence SC1 marquée à la digoxigénine. Seul l'ADN de spores de *S. castanea* a été reconnu (Figure 7).

1.2.2.2-Mise au point d'amorces pour la détection spécifique de *S. castanea* par PCR

1.2.2.2.1 Détermination des amorces

Dans un premier temps, un séquençage partiel des deux brins du fragment SC1 a été réalisé dans le but de générer des amorces utilisables en PCR pour la détection spécifique de *S. castanea in planta*. Pour cela, des régions des parties séquencées ont été choisies comme amorces. Mais avant toute manipulation *in vitro*, la qualité des amorces a été contrôlée par simulation sur ordinateur en utilisant le programme "amplify 1. 2" (Bill Engels, 1992). Cela permet de voir si les deux amorces choisies ne forment pas de

dimères et si l'hybride est stable. Ensuite, en utilisant le programme FASTA (Pearson et Lipman, 1988) nous avons pu voir que les amorces choisies ont très peu d'homologies avec des séquences connues de données. Nous avons ainsi déterminé deux amorces :

-SC1-1 5' TTTCGCTCAATGCATGCC 3'

-SC1-2 5' CACTTAGGTGTTTAGCAGG 3'

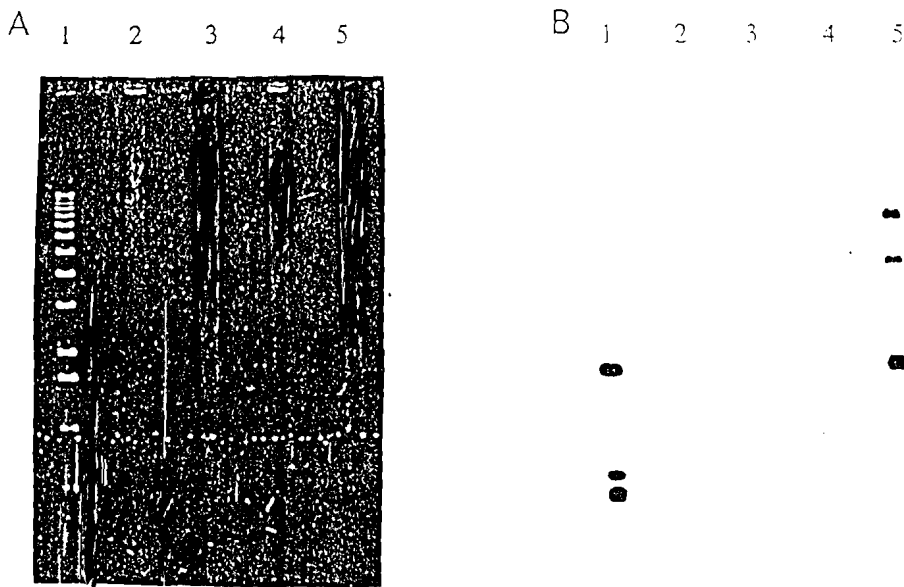


Figure 7: A) Electrophorèse en gel d'agarose 0,8% de 1,5 μ g d'ADN de différents champignons endomycorhizogènes à arbuscules digérés par l'enzyme *EcoRI*:

ligne 1, 1kb ladder

ligne 2, *A. laevis*

ligne 3, *Gig. rosea*

ligne 4, *G. caledonium*

ligne 5, *S. castanea*

B) Hybridation en Southern après transfert sur membrane de (A) avec le fragment SC1 marqué à la digoxigénine. On note une réponse qu'avec l'ADN de *S. castanea* sur trois bandes (1300bp, 3500bp et 6500bp)

1 AATTCGATAA GCTATTCATT TTGGTGTTAC ACAACATATA TAAATACAGT
51 AATACATACG TAAACATTACA AATCATATCT AATGCTAACG **CTAAAAATTTT**
101 TAATTCGCCA AATATGATCC GTTGGAAAAAT AGTTGAAAAG AACTTAGAAG
SC1-2
151 GCTTGTCAAGT TCCAGTAATT GCTAAGCACT **TAGGTGTTTA** GCAGGTCCTC
201 TGTGGGTCGA GTTCTCAAAC AATTTCAAAA GTATGGCTGT GTTGAAGAAT
251 TACCACCACT TTTAGGTAGA ACTCGTTTAT TGAATATAGA TGACATAAAA
301 TATCTCAAAA CTTTAATGAA AGAAAGACCG GATTGGTATT TATATGAGTT
351 ACAATTAGAA ATGGAECTCT GGTTAGGACA CAAAATTAGT CTTGCAAGAC
401 TTTGAAGAGC AGGCCCATCG ACTTGAGTAT ACGAACAAAC AAGTAAGATT
DA DE DA DB
451 **TTATACATAT** **ATTGCATATA** **ATTTATTTTA** TTGGTATATA **TTACTATTCT**
DC
501 AACTATATAC AGATTTTCAA AACTTGCAAT AAAATTGACA **GAGATGGTTC**
DD DC DE DD DE
551 **CTTGTTCGAT** **GAACGTAATG** **GTTCCCTCACT** **TGATGAATAT** **AATGGTTCCT**
601 TGTTTGACGA ATGTAATAGT TCTTTGCTTA TCAGATCTGT TGTTC AATG
DF
651 CTTCCATCTA TTTTACATTG GTTTTCTTTT GGCCTGTAAG **AAAAATTA**AAA
DF
701 TATTTAATAT GATTTTTTTA AATAAAAAAT ATATTACAAT ATAAATATGC
751 AAAAATTTTA CCTCGAGCTT GATTATAATT GTCAACACAT TTCCGGCAAA
801 TATTAATAAA ATCTTGCCCC TCTTGGTTTC AACTTGTTGG TTACAATTTT
851 TTTCGGAACC AGTTGAGGCA AACTCTTGA TCCTATTTAA CCTCTTTTTT
901 TTGTTGGGAG CAACCTACTC GCGTAAATAT GTTTATTAAG AACTTCAAC
951 TTATGGTTCA GTGCTTTTTT TACGCTTCCA CGTGGAGGTG TATTTGGATT
DG
1001 GGCGAAGAAC AGTCTTTGGC CATAAATTTT TGTAGGGCAA **ACTTAAACAT**
SC1-1 DG
1051 GTCATACCAT AGTGGGGCAT GCATTGAGCG **AAAACCTAAT** AAAGGCGTTG
1101 GAAAAAGCCG ACATTGCAAA TATTAATCAA ATAATGTAAT GTAGTAACAC
1151 AAAAATTCCT TTTATACATC TAATCTTACT GAAATCAATA ACTTATCGAA
1201 TT

Figure 8 : Caractérisation de la séquence SC1. Les motifs répétés directs sont marqués en gras et en italique. Les amorces SC1-1 et SC1-2 sont indiqués en gras.

1.2.2.2.2 Test de la spécificité des amorces SC1-1 et SC1-2 sur ADN sporal de différentes espèces de champignons endomycorhizogènes

La spécificité de la séquence SC1 vis-à-vis de *Scutellospora* a été démontrée par hybridation en dot et Southern. Mais en vue de trouver des amorces dont la spécificité est dirigée vers le génome de *S. castanea*, il fallait aussi éprouver non seulement de l'ADN génomique d'autres genres, mais aussi d'autres espèces du genre *Scutellospora*. Après extraction de l'ADN sporal de différentes espèces de champignons endomycorhizogènes à arbuscules, une amplification a été réalisée avec le couple d'amorces SC1-1 et SC1-2. Cela a permis de démontrer leur spécificité (Figure 9).

1.2.2.2.3 Détection spécifique *in planta* de *S. castanea*

La spécificité des amorces SC1-1 et SC1-2 a été démontrée vis-à-vis de l'ADN sporal de *S. castanea* comparativement à l'ADN de plusieurs espèces y compris d'autres espèces de *Scutellospora*. En vue de montrer la possibilité d'utiliser ces amorces en détection spécifique *in planta*, l'ADN de racines de poireaux infectées par plusieurs espèces de champignons endomycorhizogènes a été utilisée en amplification. Comme témoin négatif, l'ADN de poireau non infecté a été utilisé. Seule une amplification a été obtenue avec l'ADN de racines infectées par *S. castanea* (Figure 10)

1.3 Discussion et conclusion

Le clonage de l'ADN du champignon endomycorhizogène *S. castanea* nous a permis d'isoler quelques séquences répétées du génome de ce champignon. Le criblage d'un échantillon de 23 clones a donné 9 clones contenant des séquences fortement répétées qui ont servi de base pour l'isolement d'une séquence répétée parmi celles

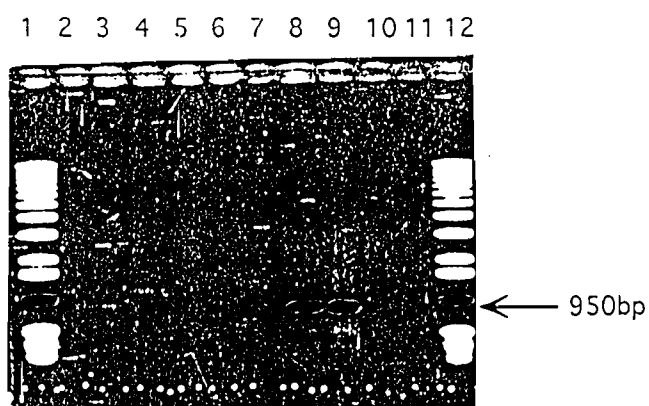


Figure 9 : Test de spécificité des amorces SC1-1 et SC1-2 sur ADN totaux de spores de :

- ligne 2, *A. laevis*
- ligne 3, *Gig. rosea*
- ligne 4, *G. caledonium*
- ligne 5, *S. calospora*
- ligne 6, *S. pellucida*
- ligne 7, *S. nodosa*
- ligne 8, *S. castanea*
- ligne 9, racines de poireau infectées par *S. castanea*
- ligne 10, contrôle négatif
- lignes 1 et 12, 1kb ladder

déTECTANT spécifiquement *S. castanea*. Dans un premier temps, cette détection spécifique a été mise en évidence par hybridation en dot sur ADN totaux de spores de quatre espèces de champignons endomycorhizogènes à arbuscules représentant les quatre principaux genres à savoir *A. laevis*, *Gig rosea*, *G. caledonium* et *S. castanea*. Ensuite, nous avons confirmé ces résultats par hybridation en Southern blot et, nous sommes allés plus loin dans cette confirmation en testant huit espèces (voir Figures 9 et 10) grâce à l'utilisation de la PCR. L'intérêt de la mise au point d'outils de détection des champignons endomycorhizogènes à arbuscules, c'est de pouvoir les détecter à tout moment de leur cycle biologique. Les amorces SC1-1 et SC1-2 nous ont permis d'atteindre ce but.

Pour montrer que la non-amplification de l'ADN des autres espèces fongiques n'était pas due à des phénomènes d'inhibition, des amorces universelles (NS3 et NS6) ont été utilisées sur ces mêmes ADN. Une amplification a été obtenue attestant de la bonne qualité de l'ADN. Ainsi le but principal de ce travail qui était de mettre au point des outils de détection moléculaire de champignons endomycorhizogènes *in planta* à partir de séquences répétées a été atteint. Les techniques d'hybridation en dot et en Southern nécessitent une quantité importante d'ADN. Or, il est souvent difficile d'obtenir suffisamment d'ADN à partir de spores en vue d'appliquer ces deux techniques. Pour contourner cette difficulté, il s'est avéré nécessaire d'appliquer une technique (PCR) pour laquelle la présence d'une petite quantité d'ADN suffirait à la détection du fragment fongique. Ceci est d'autant plus important que le champignon peut être à l'état de trace dans la racine si celle-ci a été inoculée récemment.

Grâce à la PCR, nous avons pu

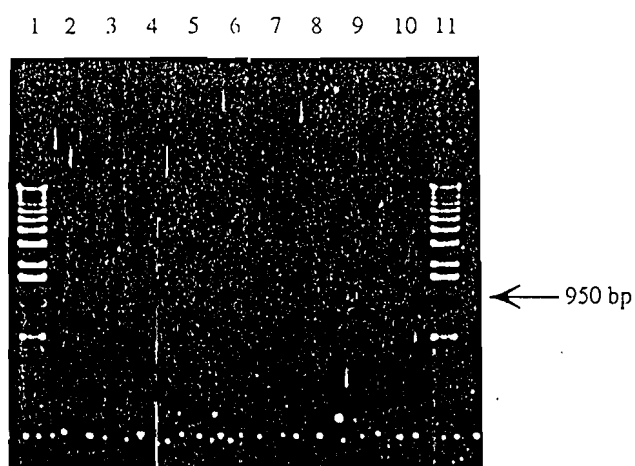


Figure 10 : Amplification test d'ADN obtenus à partir de racines de poireau infectées par différents champignons endomycorhizogènes à arbuscules.

- ligne 2, mycorhize à *A. laevis*
- ligne 3, mycorhize à *Gig. rosea*
- ligne 4, mycorhize à *G. mosseae*
- ligne 5, mycorhize à *G. caledonium*
- ligne 6, mycorhize à *S. pellucida*
- ligne 7, mycorhize à *S. nodosa*
- ligne 8, mycorhize à *S. calospora*
- ligne 9, mycorhize à *S. castanea*
- ligne 10, Témoin sans ADN
- lignes 1 et 11, 1kb ladder

montrer que nos amorces pouvaient détecter spécifiquement le champignon *S. castanea* même à partir d'une très faible quantité d'ADN de ce dernier.

Ces résultats avec ceux du chapitre II ont fait l'objet d'un article intitulé "Evidence for repeated DNA sequences in the arbuscular mycorrhizal fungal genome and use for specific identification of *Scutellospora castanea in planta*." Soumis à Applied and Environmental Microbiology. Voir pages 76-100.

Soumis à Applied and Environmental Microbiology

Evidence for repeated DNA sequences in the arbuscular mycorrhizal fungal genome and use for specific identification of *Scutellospora castanea* in planta.

ADOLPHE ZEZE, HUBÉRT DULIEU* AND VIVIENNE GIANINAZZI-PEARSON

Laboratoire de Phytoparasitologie INRA-CNRS, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, F-21034 Dijon Cédex, France

*Corresponding author. Telephone: 80 63 31 54. Fax: 80 63 32 63

Running title: Repeated DNA sequence specific to *Scutellospora*

7

A highly repeated DNA sequence from the genome of an arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) has been isolated and characterized. This 1.3 kb sequence (SC1), with approximately 3600 copies, represents about 0.4 % of the *S. castanea* genome. The sequence was shown to be a *Scutellospora*-specific probe in Southern and dot blot hybridizations. After partial sequencing of SC1, primers were generated and used to specifically amplify a 950 bp fragment from spores of *S. castanea* or *A. porrum* infected roots. No amplification products were obtained with DNA from spores or intraradical mycelium of other arbuscular mycorrhizal fungi of the same and different genera.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), forming symbiotic associations with the roots of most plants, belong to the order Glomales (Zygomycetes) (20). These associations, called mycorrhizas, are involved in plant nutrient uptake and water absorption (12). AMF are unculturable organisms for which no sexual stage has been clearly defined in their life cycle. Identification and classification of AMF are based solely on the morphology and structure of their vegetative spores, which are multinucleate organs and the only form under which individual species can be isolated (33). However, the criteria used for the identification of these fungi (spore morphology, wall characteristics) can be influenced by environmental conditions and spore maturity (21), introducing problems for accurately identifying field populations. Furthermore, it is extremely difficult to distinguish between AMF species during the symbiotic mycelial phase within root tissues (1). Consequently, there is a real need to develop reliable tools for the detection and identification of these fungi at all stages of their life cycle.

The development of polymerase chain reaction (PCR) technology offers new possibilities for the detection and identification of such unculturable microorganisms (28, 32, 35). Amplification primers for PCR are generally

homologous to conserved sequences, the most frequently used being those in the rDNA genes. These are organized in conserved regions (18S, 5.8S and 28S) and in variable (Internal Transcribed Spacers) as well as intergenic nontranscribed spacers. Universal primers generally used for amplification of rDNA genes can amplify sequences of these regions in most organisms (2, 3, 9, 10, 17, 34). Since AMF spores can sometimes be contaminated by other organisms in soil, such primers have to be employed with great precaution. To overcome this problem, Simon *et al.* (28) used rDNA from axenically produced spores to design AMF-specific primers in the Small Subunit (SSU) to propose a phylogeny for these fungi (27). Furthermore, SSU sequence alignment has led to the construction of some AMF genera-specific primers for detection and identification within root tissues (29).

We have adopted cloning of genomic DNA from AMF as an alternative approach to develop AMF species-specific probes. In previous work, a partial library of genomic DNA was obtained from the AMF *Scutellospora castanea* Walker, and preliminary evidence was obtained for the existence of repeated DNA sequences within the genome of this fungus (36). Repeated DNA sequences other than rDNA genes can be used as markers within or among species depending on their rate of divergence (6, 7, 8). Certain are shared by related species whilst others, considered as specific repeats, are only conserved at the species level and can be used for diagnostic purposes (4, 5). In the present work, we have isolated a repeated DNA sequence from the partial genomic library of *S. castanea*. We have shown by Southern and dot blot hybridization that this sequence is *Scutellospora*-specific, sequence analysis was conducted to design *S. castanea*-specific primers from this sequence for detection by PCR of this fungus in colonized roots.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Different AMF were used in the present study: *Scutellospora castanea* sp. Walker (BEG1), *S. calospora* (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders (BEG32), *S. pellucida* (Nicol. & Schenck) Walkers & Sanders (INVAM 337), *S. nodosa* Blaszkowski (BEG4), *Gigaspora rosea* Nicolson & Schenck (BEG9), *Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe (BEG13), *Glomus caledonium* (Nicol. & Gerd.) Trappe & Gerdemann (BEG20) and *G. mossae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe (BEG12). *Allium porrum* L. was inoculated with spores of each fungus at planting of 10-day old seedlings in a neutral soil for *S. castanea*, *Gig. rosea*, *G. caledonium*, and *G. mosseae*, or in an acid sandy loam soil for *S. calospora*, *S. pellucida*, *S. nodosa* and *A. laevis*.

DNA isolation. Spores of the AMF species were wet-sieved from pot cultures with *A. porrum*, collected individually, surface sterilized (11) and DNA was extracted as previously described (36). Total DNA was extracted from washed root systems of 8 to 10 week-old mycorrhizal and nonmycorrhizal *A. porrum* according to Rogers and Bendich (23). DNA was then quantified in gel or by a minifluorimetric method (TKO 100 mini-fluorimeter, Hoefer scientific instruments).

Screening for repeated DNA sequences. The *EcoRI* genomic library from *S. castanea* in pUC18 (36) was screened for repeated DNA sequences. Since in preliminary experiments no prominent bands could be detected in an agarose gel after digestion of total genomic DNA of *S. castanea* with *EcoRI*, a procedure adapted from the shot gun cloning method (24) was used. A random sample of 23 clones from the genomic library was chosen as starting material. Plasmids were extracted by mini-preparation using the boiling procedure (18), and after digestion, inserts were separated from the pUC18 in a 0.8% agarose gel and transferred to a Bioprobe Biohylon Z⁺ membrane. Hybridization was carried out at 68°C with total DNA from spores of *S. castanea*, *A. laevis*, *Gig. rosea* and

G. caledonium labeled with digoxigenin following the Boehringer (Mannheim) protocol.

Selection of a *Scutellospora*-specific probe. Total DNA (60ng) from spores of four species representing different genera of AMF (*A. laevis*, *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. castanea*) were serially diluted 1/3 and blotted onto a Bioprobe Biohylon Z⁺ membrane according to the manufacturer's procedure. Inserts isolated by squeeze-freeze (18) were digoxigenin-labeled according to the Boehringer Mannheim protocol and used as probes. After overnight hybridization at 68°C, filters were washed twice 5 min. at room temperature in 2xSSC/0.1%SDS and twice 15 min. in 0.1%SSC/0.1%SDS.

Sequence characterization. DNA (1.5µg) from spores of the different AMF species was hydrolysed with *EcoRI* endonuclease, separated in a 0.8% agarose gel, transferred onto a Bioprobe Biohylon Z⁺ membrane and hybridized with a *Scutellospora*-specific digoxigenin-labeled DNA fragment overnight at 68°C. Sequencing of the *Scutellospora*-specific DNA fragment was carried out using a Promega *fmol* sequencing kit with ³²P end-labeled primers. After mini-preparation using the boiling procedure, the insert cloned into the *EccRI* site of pUC18 was used as template for sequencing reactions using pUC18 universal primers in both directions. Primers were designed using the program "amplify 1.2" and synthesized by Eurogentec (parc scientifique de la croix rouge, Belgium).

PCR amplification. A 50 µl reaction mixture contained 10 µM of each primer, 1U of Taq polymerase (Appligene), 250 µM deoxynucleotide triphosphates and 1.5 mM MgCl₂. One ng of the *Scutellospora*-specific plasmid or 5 to 10ng of total DNA from spores or roots were used as templates. For the amplification reaction, the thermal cycling parameters were an initial 95°C denaturation for 2 min., 50°C annealing for 55 sec. and 72°C elongation for 1.5 min. followed by 30 times 93°C denaturation for 55 sec., 52°C annealing for 55 sec. and 72°C elongation for 1.5 min.. Universal primers NS3 and NS6 (34)

were used as positive controls of amplification. The PCR reaction was performed with a Combi thermal reactor (Hybaid).

RESULTS

Selection of repeated DNA sequences from *S. castanea*. In order to screen for repeated DNA sequences in the *S. castanea* genome and appreciate the level of cross-hybridization with other AMF genomes, total digoxigenin-labeled genomic DNA from *S. castanea*, *A. laevis*, *Gig. rosea* and *G. caledonium* was hybridized in Southern blots to a random sample of 23 inserts. Out of these, 14 inserts gave detectable signals either with total genomic DNA from *S. castanea* or with genomic DNA from the three other fungi (Table 1). The remaining inserts gave no detectable signals with the fungal genomic DNA suggesting that they may represent single copy genes. With *S. castanea* genomic DNA, nine inserts gave high signal intensity and five a moderate signal, even with genomic DNA from the three other fungi. Of the 14 inserts which gave a detectable signal, ten hybridized only with *S. castanea* genomic DNA, two (SC17 and SC12) cross-hybridized with *Gig. rosea* genomic DNA, one (SC3) cross-hybridized with *A. laevis* and *G. caledonium* DNA and one (SC4) with DNA from all fungi. The 10 inserts which only hybridized with *S. castanea* genomic DNA may be specific to the genome of *Scutellospora*. As can be seen from the example given in Fig. 1, a number of recombinant plasmids from the partial genomic library of *S. castanea* carried inserts which gave a high signal intensity in Southern hybridization with total genomic DNA from *S. castanea* spores. Out of the 23 recombinant plasmids screened, a total of nine inserts gave a strong signal, suggesting that these could be in high copy number in the *S. castanea* genome. As our aim was to use repeated DNA sequences, these inserts were chosen as starting material for screening of *S. castanea*-specific sequences.

Detection of a *Scutellospora*-specific sequence. The nine plasmids expected to carry repeated DNA sequences from *S. castanea* were investigated for the presence of a *Scutellospora*-specific sequence in dot blot analyses. Most of the nine inserts used as probes cross-hybridized with the other genomes of AMF, but with a lower signal intensity. One insert (SC1) from one recombinant plasmid (pSC1) hybridized with DNA from *S. castanea* but not with DNA from *A. laevis*, *Gig. rosea* or *G. caledonium*, suggesting that it could be a *Scutellospora*-specific fragment (Fig. 2). This specificity was confirmed by Southern analyses of total DNA of the four genera of AMF (Fig. 3A) probed with digoxigenin-labeled SC1; the same specificity for *Scutellospora* DNA as in dot blot hybridization was obtained (Fig. 3B). No signal could be detected with fungi from the genera *Acaulospora*, *Gigaspora* and *Glomus*. The specificity of the SC1 sequence towards the *Scutellospora* genome was obtained under highly stringent conditions in both dot blot and Southern analyses.

SC1 sequence characterization. The Southern blot of *Eco*RI digests of *S. castanea* (Fig. 3A) hybridized with SC1 revealed three bands: a 1.3 kb fragment (corresponding to the size of SC1), another 3.5 kb fragment and a 6 kb one (Fig. 3B). The fragments detectable at higher molecular weights (3.5 kb or more) could result from incomplete hydrolysis, indicating that the repeated SC1 sequences may be linked in long tandem arrays. However, there is a discrepancy between the signal estimated as corresponding to 1.3 kb and the next one (3.5 kb), which suggests that there exists at least two different families of repeated sequences showing homology with the SC1 fragment.

The SC1 sequence was isolated by the "squeeze-freeze" method after *Eco*RI digestion of the plasmid pSC1 and separation in an 0.8% agarose gel. After minifluorimetric quantification of SC1 and genomic DNA from different AMF, serial dilutions were realized. DNA was denatured, dot blotted onto a membrane and hybridized with digoxigenin-labeled SC1. Copy number of SC1 in the *S. castanea* genome was estimated from densitometric analyses of the

dot blot signals (Fig. 2). The signal intensity obtained with 60ng of total DNA corresponded to that of 0.24ng of SC1, that is 0.4% of the *S. castanea* genome. Assuming a genome size of 1 pg for *S. castanea* (14), this value represents approximately 3600 copies of SC1 per nucleus.

Generation of SC1-specific primers for *S. castanea* detection by PCR. A partial restriction map was established after digestion of SC1 with different restriction enzymes (Fig. 4). By partial sequencing using pUC18 forward and reverse primers, a 196bp stretch was identified on one strand and a 212 bp one on the other. These sequences did not show strong homology to any sequence in the EMBL gene bank. Primers SC1-1 5' TTTCGCTCAATGCATGCC 3' and SC1-2 5' CACTTAGGTGTTTAGCAGG 3' corresponding to portions of the sequenced regions (Fig. 4) were synthesized.

In order to verify the results obtained by dot blot and Southern assays and to test primer specificity for *S. castanea*, DNA from spores of seven species of AMF including different species of *Scutellospora* were used for PCR analyses with primers SC1-1 and SC1-2. After 30 cycles, an expected 950bp product was only obtained with DNA from *S. castanea* spores (Fig. 5, lane 8). In order to assess the specificity of the primers towards *S. castanea* during mycorrhiza formation, DNA from *S. castanea*-mycorrhizal *A. porrum* and from mycorrhiza obtained by infecting *A. porrum* roots with different AMF, including other *Scutellospora* species, was used as template. DNA from nonmycorrhizal *A. porrum* was used as control. Only DNA from *S. castanea*-infected *A. porrum* roots was amplified using primers SC1-1 and SC1-2 (Fig. 5, lane 9 & Fig. 6, lane 9). No PCR products were produced during amplification of DNA from uninfected *A. porrum* nor from other mycorrhizas. PCR products were obtained from all DNA using the universal primers NS3 and NS6 (Fig. 7), confirming that any non-amplification of DNA was not due to inhibitors present in the samples.

DISCUSSION

In this paper, we describe the use of a repeated DNA sequence screened from a partial genomic library as a reliable tool for AMF species-specific detection in infected roots. It is the first time that a repeated DNA sequence other than rDNA (28) has been characterized in AMF and subsequently used as a species-specific probe. The specificity of the repeated DNA sequence SC1 towards *S. castanea* spores in either dot and Southern analyses, or by PCR amplification, confirms preliminary observations of its ability to detect *S. castanea* in *A. porrum* mycorrhiza using Southern analyses (36).

DNA probes corresponding to repeated DNA sequences have been constructed for plant species like barley (15), wheat (19) and for *Beta procumbens* (26), and Stradford *et al.* (31) have used species-tandem repeats as diagnostic probes for cyst nematodes. When a DNA or RNA sequence is specific to a particular organism, it can be used for PCR detection of this organism. Schesser *et al.* (25) and Henson *et al.* (13) used a specific mitochondrial DNA sequence to generate primers to detect *G. graminis* in infected wheat. Since dot and Southern analyses require more DNA than PCR amplification, we sequenced SC1 in order to generate primers for PCR detection of traces of fungal DNA in roots. The primers SC1-1 and SC1-2 did not amplify DNA from spores of *Scutellospora* other than *S. castanea*, nor from roots infected by other species of AMF. Compared to dot and Southern analyses, which require at least 60ng and 1.5 μ g, respectively, PCR detection was far more sensitive since we could detect 1 ng of *S. castanea* DNA when mixed with 20 ng of DNA from roots of nonmycorrhizal *A. porrum* (data not shown). These results show that species-specific primers can be generated which will be particularly useful for the maintenance and control of inoculum quality, and serve as reliable tools for detection and identification of the fungus throughout its life cycle.

The cloning of genomic DNA also offers the possibility of prospecting genome structure. Out of the 23 clones analysed from *S. castanea*, nine gave a

high signal intensity in hybridization with genomic DNA suggesting that they are in high copy number in the *S. castanea* genome. The ratio of nine repeated DNA fragments out of 23 indicates that a high proportion of total genomic DNA is in high copy number, so that a large part of *S. castanea* genome could be redundant, like that of higher eukaryotes (30). The SC1 sequence has 3600 copies in the fungal genome which is considerably higher than the 90 copies calculated for rDNA repeats in this fungus (22). When hybridized with SC1, the *Eco*RI digests of *S. castanea* gave distinct, irregularly separated bands, which may indicate that the SC1 sequence is organized in at least two families arranged in tandem arrays in the *S. castanea* genome. A similar distribution of the moderately repeated sequence R8.1 has been reported for the tobacco genome (16). For comparison, R8.1 has 1600 copies per tobacco haploid genome and represents 0.3% of this genome.

In conclusion, since repeated DNA sequences are the major source of variation between species, and if they are a common characteristic of the genome of AMF, they could represent a potentially useful source for generating specific primers and probes for either genetic studies or identification of AMF in natural populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to C. Walker for starting cultures of *S. calospora* and *S. nodosa*, to O. Chatagnier for excellent technical assistance, and to M. Hosny and E. Passerieux for access to unpublished data. We thank Dr. D. van Tuinen for advice in sequence analyses and for helpful discussions, and Dr. P. Franken for useful comments. This work was partially supported by the EPR-Bourgogne (Projet EPR 3062A) and the Ministry of Scientific Research and Higher Education, Côte d'Ivoire (grant to A. Z.).

REFERENCES

1. Abbott, L. K. 1983. Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Aust. J. Bot.* **30**: 485-499.
2. Baura, G., T. M. Szaro, and T. D. Bruns. 1992. *Gastrospora laricina* is a recent derivative of *Suillus grevillei*: molecular evidence. *Mycologia* **84**: 592-597.
3. Bruns, T. D., T. J. White, and J. W. Taylor. 1991. Fungal molecular systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **22**: 525-564.
4. Dover, G. 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* **299**: 111-116.
5. Dover, G. 1986. Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends. Genet.* **2**: 159-165.
6. Dvorak, J., P. E. McGuire, and B. Cassidy. 1988. Apparent source of the A genomes of wheat inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* **30**: 680-689.
7. Flavell, R. B., J. Rimpau, and D. B. Smith. 1977. Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes. *Chromosoma* **63**: 205-222.
8. Flavell, R. B., M. O'Dell, and D. B. Smith. 1979. Repeated sequence DNA comparison between *Triticum* and *Aegilops* species. *Heredity*. **42**: 309-322.

9. Gardes, M., and T. D. Bruns. 1991. Rapid characterization of ectomycorrhizae using RFLP patterns of their PCR amplified-ITS. *Mycol. Soc. Newsletter* 41: 14.
10. Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortin, T. D. Bruns, and J. W. Taylor. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69: 180-190.
11. Gianinazzi-Pearson, V., B. Branzanti, and S. Gianinazzi. 1989. *In vitro* enhancement of spore germination and hyphal growth of a vesicular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-255.
12. Harley, J. L. and S. E. Smith. 1983. *Mycorrhiza Symbiosis*. Academic Press, London, New York.
13. Henson, J, T. Goins, D. E. Grey, W. Mathre, M. L. Elliot. 1993. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially- and naturally-infected soil. *Phytopathology* 83: 283-287
14. Hosny, M. INRA, Dijon. 1994. Personal communication
15. Junghans, H., M. Metzloff. 1988. Genome specific, highly repeated sequences of *Hordeum vulgare*: cloning, sequencing and squash dot test. *Theor. Appl. Genet.* 76: 728-732.
16. Kuhrova, V., M. Bezdek, B. Vyskot, B. Koukalova, and J. Fajkus. 1991. Isolation and characterization of two middle repetitive DNA sequences of nuclear tobacco genome. *Theor. Appl. Genet.* 81: 740-744.
17. Lee, S. B., and J. W. Taylor. 1992. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* 9: 636-653.

18. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
19. Metzloff, M. W. Troebner, F. Baldauf, R. Schlegel, and J. Cullum. 1986. Wheat specific repetitive DNA sequences-construction and characterisation of four different genomic clones. *Theor. Appl. Genet.* 72: 207-210.
20. Morton, J. B. 1990. Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro- and microevolutionary process. *Mycotaxon* 82: 493-515.
21. Morton, J. B., and S. P. Bentivenga. 1994. Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups, p.47-59. *In* A. D. Robson, J. K. Abbott and N. Malajczuk (ed.), *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
22. Passerieux, E. 1994. Personal communication.
23. Rogers, S. O., and A. J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant. Mol. Biol.* 5: 69-76
24. Saul, M., and I. Potrykus. 1984. Species-specific repetitive DNA used to identify interspecific somatic hybrids. *Plant. Cell. Rep.* 3: 65-67.
25. Schesser, K., A. Luder, and J. Henson. 1991. Use of Polymerase Chain Reaction to detect the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*, in infected wheat plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 553-556.
26. Schmidt, T., H. Junghans, and M. Metzloff. 1990. Construction of *Beta procumbens*-specific DNA probes and their application for the screening of *B. vulgaris* x *B. procumbens* (2n=19) addition lines. *Theor. Appl. genet.* 79: 177-181.

27. **Simon, L., J. Bousquet, R. C. Lévesque, and M. Lalonde.** 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69. (Letter).
28. **Simon, L., L. Lalonde, and T. Bruns.** 1992. Specific amplification of 18S ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 291-295.
29. **Simon, L., R. C. Lévesque, and M. Lalonde.** 1993. Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4211-4215.
30. **Steven, D., Transkley, and P. Eran.** 1988. Organization and evolution of sequences in the plant nuclear genome p. 55-83. *In* L. D. Gottlieb and S. K. Jain (ed.), *Plant Evolutionary Biology*. Chapman and Hall, London.
31. **Stradford, R., R. Shields, A. P. Goldsbrough, and C. Fleming.** 1992. Analysis of repetitive DNA sequences from potato cyst nematodes and their use as diagnostic probes. *Phytopathology* **82**: 881-886.
32. **van Tuinen, D., H. Dulieu, A. Zézé, and V. Gianinazzi-Pearson.** 1994. Biodiversity and characterization of arbuscular mycorrhizafungi at the molecular level, p.13-23. *In* S. Gianinazzi and H. Schüepp (ed.), *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser Verlag, Boston.
33. **Walker, C.** 1992. Systematics and taxonomy of the Glomales: a possible way forward. *Agronomie* **12**: 887-897.
34. **White, T. J., T. Bruns S. Lee, and J. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315-322. *In* I. Michael, H. G. David, J. S. John, T. J. White (ed.) *PCR protocol: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York.

Characterization of a Highly Repeated DNA Sequence (SC1) from the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Scutellospora castanea* and Its Detection In Planta

ADOLPHE ZEZE, MICHEL HOSNY, VIVIENNE GIANINAZZI-PEARSON, AND HUBERT DULIEU*

Laboratoire de Phytoparasitologie INRA-CNRS, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, F-21034 Dijon Cédex, France

Received 16 January 1996/Accepted 23 April 1996

A highly repeated DNA sequence from the genome of an arbuscular mycorrhizal fungus has been isolated and characterized. This 1,202-bp sequence (SC1) represents about 0.24% of the *Scutellospora castanea* genome, estimated to be 1 pg by flow cytometry. The sequence was shown to be a *Scutellospora*-specific probe in Southern blots and dot blot hybridizations. After complete sequencing of SC1, PCR primers were generated and used to amplify a 997-bp fragment from spores of *S. castanea* or from colonized *Allium porrum* roots. No amplification products were obtained with DNA from either spores or mycorrhizal root of other species of arbuscular mycorrhizal fungi. These primers were sufficiently specific for unequivocal detection of *S. castanea* in planta.

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), which form symbiotic associations with the roots of most plants, belong to the order Glomales (class Zygomycetes) (23). These associations, called mycorrhizae, are involved in plant nutrient uptake and water absorption (15). AMF are unculturable organisms for which no sexual stage in their life cycle has been clearly defined. Consequently, the identification and classification of AMF are based solely on the morphology and structure of their vegetative spores, which are multinucleate organs and the only form in which individual species can be isolated (3). However, the criteria used for the identification of these fungi (spore morphology and wall characteristics) can be influenced by environmental conditions and spore maturity (24), introducing problems for accurately identifying field populations. Furthermore, it is extremely difficult to distinguish between AMF species during the symbiotic colonial phase within root tissues (1). Consequently, there is a real need to develop reliable tools for the detection and identification of these fungi at all stages of their life cycle.

The development of a variety of PCR technologies offers new possibilities for the detection and identification of such unculturable microorganisms (20, 26, 30-32, 37, 41). Amplification primers for PCR are generally homologous to conserved sequences, the most frequently used being those in the rRNA genes (rDNAs). These are organized in conserved regions (18S, 5.8S, and 28S) and in variable regions (internal transcribed spacers and intergenic nontranscribed spacers). Universal primers generally used for amplification of rDNAs can amplify sequences of these regions in most organisms (3, 10, 11, 26, 31, 32, 40). Since AMF spores can sometimes be contaminated by other organisms in soil, such primers have to be employed with great caution. To overcome this problem, Simon et al. (31, 32) used rDNA from axenically produced spores to design AMF genus-specific primers from the small subunit, and Lanfranco et al. (20) constructed *Glomus mosseae*-specific primers from a random amplified polymorphonuclear DNA (RAPD) fragment for detection and identification of the fungus within root tissues.

We have adopted cloning of genomic DNA from AMF as an

alternative approach to develop AMF species-specific probes. In previous work, a partial library of genomic DNA was obtained from the AMF *Scutellospora castanea* Walker (39), and preliminary evidence for the existence of repeated DNA sequences within the genome of this fungus was obtained (42). Repeated DNA sequences other than rDNAs can be used as markers within or among species, depending on their rate of divergence (6-8, 13). Certain sequences are shared by related species, while others, considered specific repeats, are conserved only at the species level and can be used for diagnostic purposes (16, 17, 22, 29). In the present work, we have isolated a repeated DNA sequence from the partial genomic library of *S. castanea* and have estimated its frequency in the fungal genome. We have shown by Southern and dot blot hybridizations that this sequence is *Scutellospora* specific, and we have designed *S. castanea*-specific primers from this sequence for detection of this fungus in colonized roots by PCR.

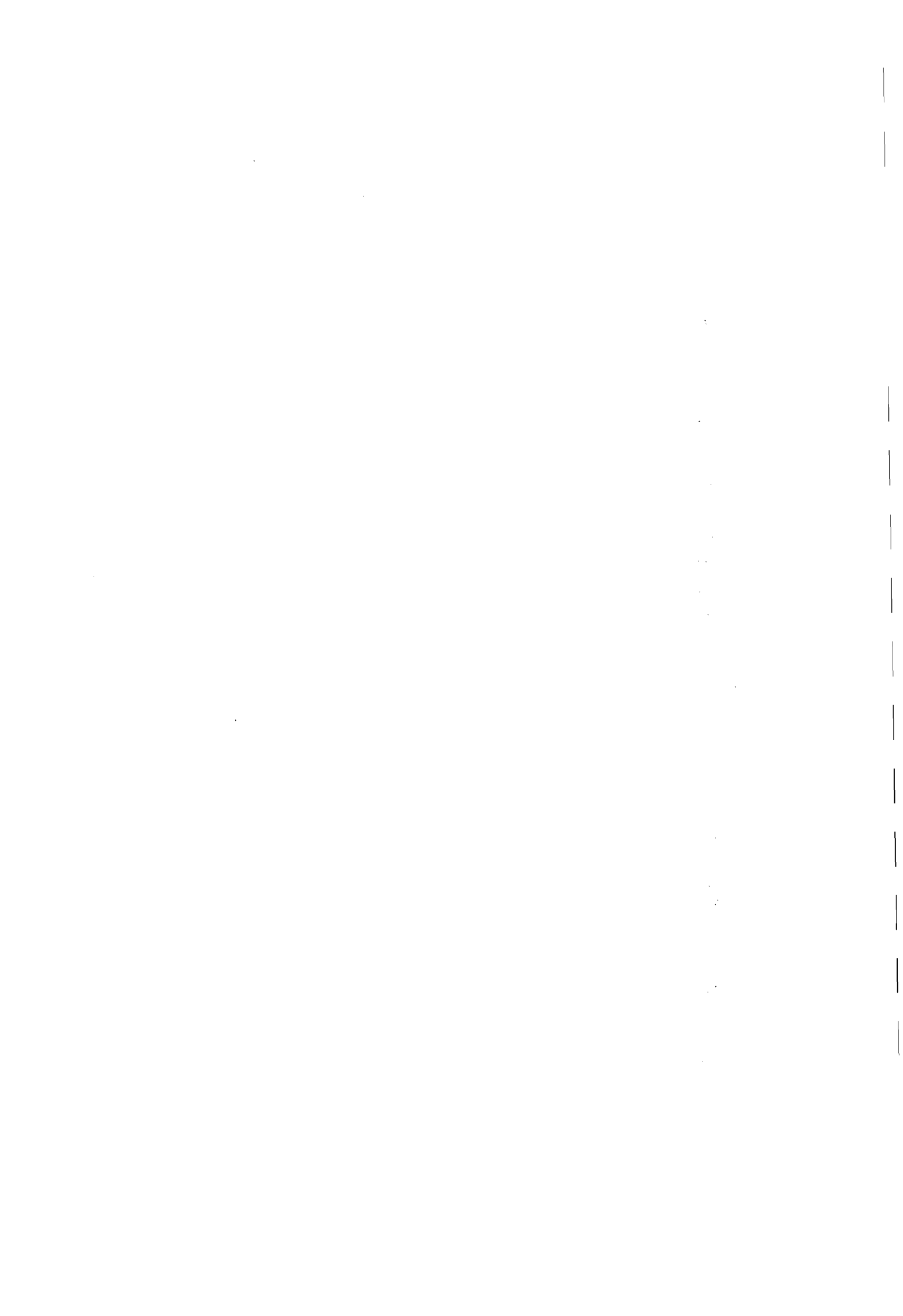
MATERIALS AND METHODS

Materials. The AMF isolates were *S. castanea* Walker BEG1, *Scutellospora calospora* (Nicolson and Gerdemann) Walker and Sanders BEG32, *Scutellospora pellucida* (Nicolson and Schenck) Walker and Sanders INVAM337, *Scutellospora nodosa* Blaszkowski BEG4, *Scutellospora heterogama* (Nicolson and Schenck) Walker and Sanders BEG35, an unidentified *Scutellospora* species closely resembling *S. castanea* W1727 (isolate from Studio sulla Microbiologia del Terreno, Turin, Italy), *Gigaspora margarita* Becker and Hall BEG34, *Gigaspora rosea* Nicolson and Schenck BEG9, *Acaulospora laevis* Gerdemann and Trappe BEG13, *Glomus caledonium* (Nicolson and Gerdemann) Trappe and Gerdemann BEG20, *Glomus intraradices* Schenck and Smith LFA5, and *Glomus versiforme* Harsten (Berch) BEG47 (BEG, Banque Européenne des Glomales; INVAM, International Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal fungi; LPA, Laboratoire de Phytoparasitologie). *Allium porrum* L. was inoculated with spores of each fungus at the planting of 10-day-old seedlings in a neutral soil for *S. castanea*, the *S. castanea*-like species, *Gigaspora rosea*, *Glomus caledonium*, and *Glomus mosseae* or in an acid sandy loam soil for *S. calospora*, *S. pellucida*, *S. nodosa*, and *Acaulospora laevis*.

DNA isolation. Spores of the AMF species were wet-sieved from pot cultures with *Allium porrum*, collected individually, and surface sterilized (12), and DNA was extracted as previously described (42). The yield was around 1 to 2 ng of DNA per spore. Total DNA was extracted from washed root systems of 8- to 10-week-old mycorrhizal and nonmycorrhizal *Allium porrum* as described by Rogers and Bendich (25). Mycorrhizal infection on samples was verified as described by Trouwot et al. (36). DNA was then quantified in a gel or by a methylurimetric method (TKO 100 minifluorimeter; Hoefer Scientific Instruments).

Screening for repeated DNA sequences. The *EcoRI* genomic library from *S. castanea* in pUC8 (42) was screened for repeated DNA sequences. Since in preliminary experiments no prominent bands could be detected in an agarose gel

* Corresponding author. Phone: 80 63 31 54. Fax: 80 63 32 63. Electronic mail address: d.dulieu@epoisses.inra.fr.



after digestion of total genomic DNA of *S. castanea* with *EcoRI*, a procedure adapted from the shotgun cloning method (27) was used. A random sample of 23 clones from the genomic library was chosen as starting material. Plasmids were extracted by miniprep with the boiling procedure (21), and after digestion, inserts were separated from the pUC18 in a 0.8% agarose gel and transferred to a Bioprobe Biohylon Z⁺ membrane. Hybridization was carried out as for the Southern blots (see next paragraph) at 68°C with total DNA from spores of *S. castanea*, *Acaulospora laevis*, *Gigaspora rosea*, and *Glomus caledonium*, which was labeled with digoxigenin by random priming according to the Boehringer (Mannheim, Germany) protocol.

Southern hybridization. DNAs from spores and from mycorrhizal or noninoculated roots (3.5 µg) were hydrolyzed with restriction endonucleases and electrophoresed in 0.8% agarose gels. Genomic blots were prepared as described by Southern (33). Hybridization was performed at 68°C in 5× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)-10% blocking reagent (Boehringer)-2% sodium dodecyl sulfate (SDS)-0.1% lauryl sarcosinate. The membranes were washed twice at room temperature in 2× SSC-0.1% SDS and twice for 20 min in 0.1% SSC-0.1% SDS (high-stringency conditions). The hybridization signals were detected by the chemiluminescence system (Boehringer) and exposure of the membrane to Amersham autoradiographic Hyperfilms.

Selection of a *Scutellospora*-specific probe. Total DNAs (60 ng) from spores of four species representing different genera of AMF (*Acaulospora laevis*, *Gigaspora rosea*, *Glomus caledonium*, and *S. castanea*) were serially diluted 1:3 and blotted onto a Bioprobe Biohylon Z⁺ membrane according to the manufacturer's procedure. Inserts of SC1 isolated by the squeeze-freeze procedure (21) were digoxigenin labeled by random priming according to the Boehringer protocol and used as probes. After overnight hybridization at 68°C, filters were washed twice for 5 min at room temperature in 2× SSC-0.1% SDS and twice for 15 min in 0.1% SSC-0.1% SDS. DNA (1.5 µg) from spores of the four species used in the dot blot experiment was hydrolyzed with *EcoRI* endonuclease, separated in a 0.8% agarose gel, transferred onto a Bioprobe Biohylon Z⁺ membrane, and hybridized with a *Scutellospora*-specific digoxigenin-labeled DNA fragment overnight at 68°C.

Sequence characterization. Sequencing of the *Scutellospora*-specific DNA fragment was carried out by using a Promega *fmoI* sequencing kit with ³²P-end-labeled primers. After miniprep by the boiling procedure, the insert cloned into the *EcoRI* site of pUC18 was used as a template for sequencing reactions in each direction with pUC18 universal primers. The complete sequence was obtained by using a 373A autosequencer as described by the manufacturer (Applied Biosystems). Primers were designed by using the program "Amplify 1.2, Bill Engels, 1992" and synthesized by Eurogentec (Pare Scientifique de la Croix Rouge, Liège, Belgium).

PCR amplification. A 50-µl reaction mixture contained each primer at 0.05 µM, 1 U of *Taq* polymerase (Appigene), 250 µM deoxynucleoside triphosphates, and 1.5 mM MgCl₂. One nanogram of the *Scutellospora*-specific plasmid or 5 to 10 ng of total DNA from spores or roots was used as a template. Three pairs of primers were used: pUC18-1 and -2 (designed at -14 and +56 bp the *EcoRI* cloning site), SC1-1 and SC1-2 (see Results), and the universal 18S rDNA primers NS3 and NS6 (40). For the amplification reaction, the thermal cycling parameters were an initial 95°C denaturation for 2 min, annealing for 55 s (the annealing temperature was adapted to the melting temperature of each pair of primers), and elongation at 72°C for 1.5 min followed by 30 cycles differing by the use of a denaturation temperature of 93°C. The PCR was performed with a Combi thermal reactor (Hybaid).

Determination of sequence copy number and genome organization. In order to determine the copy number of SC1 from *S. castanea*, the DNA content per nucleus was measured by flow cytometry. For this, nuclei were prepared from spores by crushing the spores in a buffer containing a saturating concentration of DAPI (4',6-diamidino-2-phenyl indole) according to the protocol of Galbraith et al. (9). Nuclei were analyzed on a Partec CA11 flow cytometer (Chemunex, Maison-Alfort, France) with a hazzy mercury lamp type HBO 100, and the amount of DNA was estimated by DAPI fluorescence of the nuclei relative to that of *Gigaspora margarita* (0.77 pg) (5), which was taken as an internal standard. The cytometer was also calibrated with chicken erythrocytes containing 2.33 pg of nuclear DNA (2). Histograms of the DAPI-DNA measurements on a linear scale of fluorescence intensity (FL) were used to calculate the amount of nuclear DNA according to the equation DNA content (picograms) = (mean FL of sample/mean FL of standard) × standard DNA content (picograms). This implies that the fluorescence of the DNA-DAPI complex is stoichiometrically related to the amount of DNA.

Restriction enzyme analysis. Products amplified with the SC1-1 and SC1-2 primers from the pSC1 genomic clone and from *S. castanea* genomic DNA were hydrolyzed with *Bgl*II, *Dra*I, *Ava*I, *Hinc*II, *Nco*I, and *Alu*I and electrophoresed in a 2% agarose gel.

Nucleotide sequence accession number. The EMBL accession number for SC1 is X96521.

RESULTS

Selection of clones corresponding to genomic sequences in high copy number in the *S. castanea* genome. Total digoxige-



FIG. 1. Dot blots of denatured DNAs extracted from spores of *Acaulospora laevis* (row 1), *Gigaspora rosea* (row 2), *S. castanea* (row 3), *Glomus caledonium* (row 4), and the SC1 DNA insert (row 5) and hybridized with the SC1 insert labeled by random priming with digoxigenin.

nin-labeled genomic DNAs from *S. castanea*, *Acaulospora laevis*, *Gigaspora rosea*, and *Glomus caledonium* were hybridized in Southern blots to a random sample of 23 inserts. Of these, 14 inserts gave detectable signals either with total genomic DNA from *S. castanea* or with genomic DNAs from the three other fungi. The remaining inserts gave no detectable signals with the fungal genomic DNAs, suggesting that they may represent single-copy genes. With *S. castanea* genomic DNA, nine inserts gave high signal intensities and five gave moderate signal intensities. Of the 14 inserts which gave a detectable signal, 10, including SC1, hybridized only with *S. castanea* genomic DNA, two (SC17 and SC22) cross-hybridized with *Gigaspora rosea* genomic DNA, one (SC3) cross-hybridized with *Acaulospora laevis* and *Glomus caledonium* DNAs, and one (SC4) cross-hybridized with DNAs from all of the tested fungi. The 10 inserts which hybridized only with total labeled *S. castanea* genomic DNA may be specific to the *Scutellospora* genome. The high-intensity signal in Southern hybridizations with total genomic DNA from *S. castanea* spores suggested that these inserts could be in high copy number in the *S. castanea* genome.

Selection of the pSC1 clone. Nine plasmids expected to carry repeated DNA sequences from *S. castanea* were investigated for the presence of a *Scutellospora*-specific sequence in dot blot analyses. Some of the nine inserts used as probes cross-hybridized with total DNA of AMF but with a lower signal intensity than with *S. castanea*. One insert (SC1) from one recombinant plasmid (pSC1) hybridized in a dot blot experiment (Fig. 1) with DNA from *S. castanea* but not with DNA from *Acaulospora laevis*, *Gigaspora rosea*, or *Glomus caledonium*, suggesting that it could be a *Scutellospora*-specific fragment. This specificity was confirmed by Southern blotting of total DNA of the four genera of AMF (Fig. 2) probed with digoxigenin-

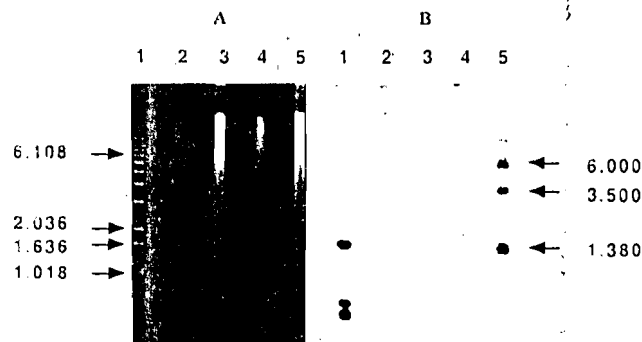
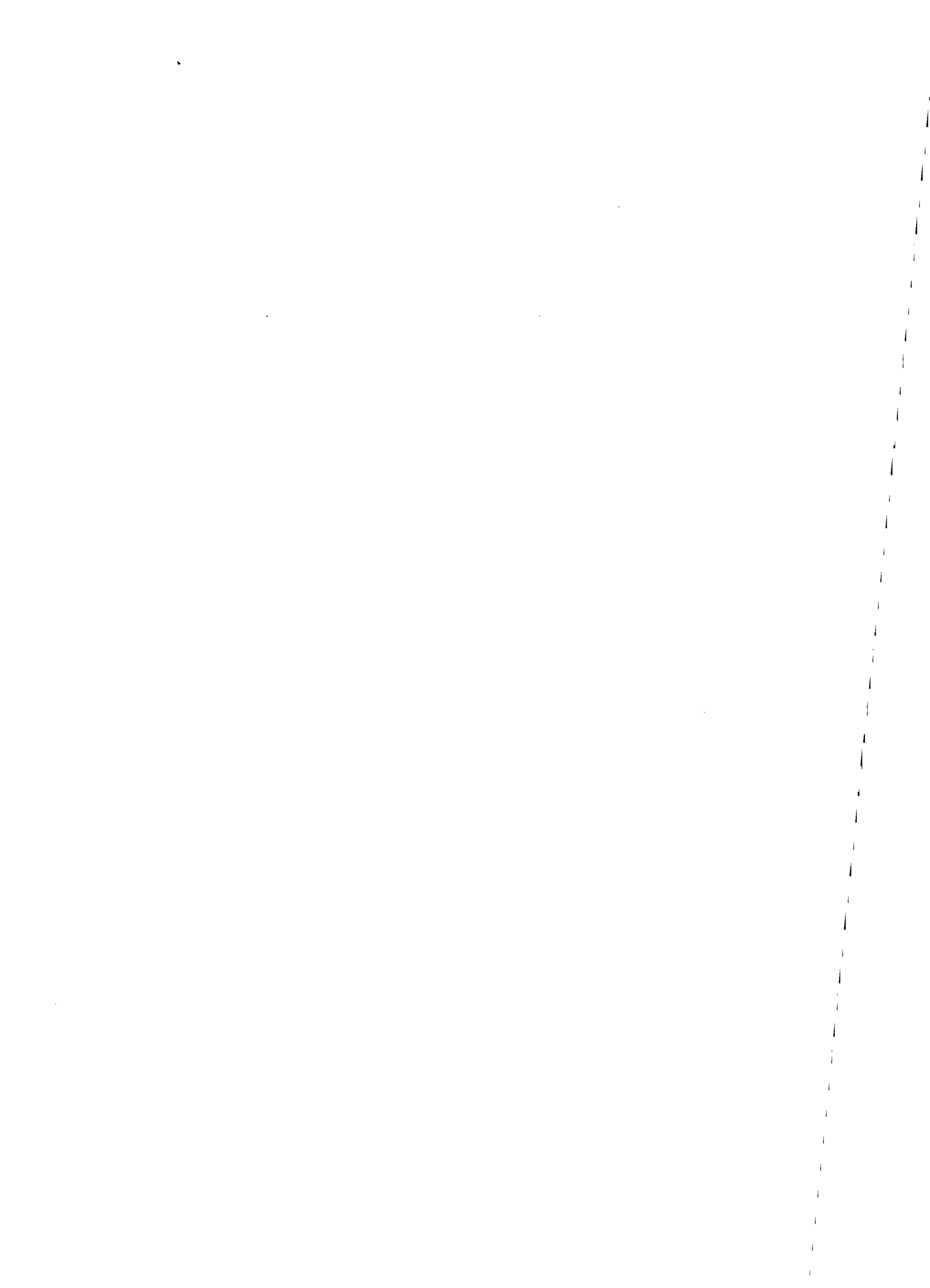


FIG. 2. Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot (B) of DNAs extracted from *Acaulospora laevis* (lanes 2), *Gigaspora rosea* (lanes 3), *Glomus caledonium* (lanes 4), and *S. castanea* (lanes 5), hydrolyzed partially with *EcoRI*, and probed with the SC1 insert labeled with digoxigenin. Lanes 1, 1.5-kb ladder (Bertheda Research Laboratories). Numbers on the sides indicate sizes (in kilobase pairs).



labeled SC1; the same specificity for *Scutellospora* DNA as in dot blot hybridization was obtained. The specificity of the SC1 sequence for the *Scutellospora* genome was obtained under highly stringent conditions in both dot blot and Southern analyses. When these analyses were performed under low-stringency conditions, an extremely low-intensity signal was obtained with the other species, suggesting that sequences with low levels of homology to SC1 are present but must have diverged.

SC1 sequence characterization. Because of a partial hydrolysis of the genomic DNA, three fragments with high signal intensities and other fragments with higher molecular sizes were visible in the Southern blot (Fig. 2). The apparent molecular sizes of the three fragments, which were evaluated to be 1,380, 3,500, and 6,000 bp in this experiment, did not represent a regular scale, indicating that the sequence is probably arranged in short tandem arrays of different numbers of repeats. Such an irregular pattern was observed in two independent analyses, indicating a complex organization of the repeated unit at different loci. Some fragments of the ladder hybridized with the probe because of contamination of the SC1 insert by DNA from the vector, which was labeled by random priming.

When hybridized with SC1, total *EcoRI* digests of *S. castanea* and the double digests obtained with *EcoRI* and *EcoRV* (no site in SC1) or with *EcoRI* and *HindIII* (no site in SC1) revealed one band corresponding to the size of SC1. Digests with *HindIII* or *EcoRV* or both (no sites in SC1) gave signals in a greater size range. The SC1 sequence therefore represents an *EcoRI* family clustered in several tandem families.

SC1 sequencing. Hydrolysis of the pSC1 plasmid with *HindIII* showed that its total molecular size is 3.9 kbp, while the insert, liberated by *EcoRI*, corresponds to 1,200 bp. The complete sequence (Fig. 3), 1,202 bp from the 5' *EcoRI* site residue to the 3' *EcoRI* site residue, is 68% AT and contains several perfect direct short repeats (two copies of each) in the central region of the sequence: DA, ATITTA; DB, ATATATT; DC, ATGGTTCCT; DE, TAATGGTTCCT; DF, AAAATTA; and DG, AAACCTTAA. The SC1 insert does not encode any protein, and many stop codons were found.

Restriction sequences were found with site usages of one for 25 endonucleases, two for 11 restriction enzymes, and three for 10 enzymes. No sites were found for *EcoRV*, *HindIII*, or *EcoRI* (the enzyme used for cutting the genomic fragments for cloning). Unique restriction sites at positions 761 (*XhoI*), 632 (*BglII*), and 716 (*DraI*) (Fig. 4) were chosen for identification of the sequence after PCR amplification.

Generation of SC1-specific primers for detection of *S. castanea* by PCR. Primers SC1-1 (5' CACTTAGGTGTTTAGC AGG 3' from nucleotide 177 to 195) and SC1-2 (5' TTTC GCTCAATGCATGCC 3' from nucleotide 1088 to 1066) were chosen and synthesized to amplify a specific sequence of 907 bp.

In order to verify the results obtained by dot blot and Southern assays and to test primer specificity for *S. castanea*, DNAs from spores of 11 species of AMF, including 4 species of *Scutellospora*, were used for PCR analyses with primers SC1-1 and SC1-2. After 30 cycles, the expected 907-bp product was obtained only with DNA from *S. castanea* spores (Fig. 5A). Several annealing temperatures were tested; 58 and 60°C were specific and gave an abundant product with DNA from *S. castanea* only. The primers SC1-1 and SC1-2 were highly specific for *S. castanea* under these conditions, since the template DNAs from all of the taxa tested were amplifiable with the NS3 and NS6 primers for the 18S rDNA (Fig. 5B).

In order to assess the specificities of the primers for *S. castanea* during mycorrhiza formation, 5-ng portions of DNAs

```

1  AATTCGATAA GCTATTTCATT TTGGTGTAC ACAACAAAT TAAATACAGT
51  AATACATACG TAACATTACA AATCATATCT AATGCTACAG CTAATAATTT
101 TAATTCGCCA AATATGATCC GTTGAAAAAT AGTTGAAAT AACTTAGAAG
    SC1-1
151 GCTTGTCACT TCGAGTAATT GCTAAGCACT TAGGTGATA GCAAGTTCCTC
201 TGTGGGTCGA GTTCTCAAAC AATTTCAAAA GTATGCTGCT GTTGAAGAAT
251 TACCACCACT TTTAGGTAGA ACTCGTTTAT TGAATAGAGA TGACATAAAA
301 TATCTCAAAA CTTTAATGAA AGAAAGACCG GATTCTCTAT TAPATGAGTT
351 ACAATTAGAA ATGGAACCTCT GGTTAGGACA CAAATTAAT CTTGCAAGAC
    DA
401 TTTGAAGAGC AGGCCCATCG ACTTGAGTAT ACCAACAAC AAGTAAGATT
    DB DA DF
451 TTATACATAT ATTGCATATA ATTTATITTA TTGGTAAACA TTACTATTCT
    DC
501 AACTATATAC AGATTTTCAA AACTTGCAAT AAAATTA A GAGATGGTTC
    DE DC DE
551 CTGTTCGAT GAACGTAATG GTTCTCACT TGATGATA T AATGGTTCCT
601 TGTTGACGA ATGTAATAGT TCTTTGCTTA TCAGATCTT TGTTCATAG
    DF
651 CTTCCATCTA TTTTACATTG GTTTCTTTT GGCCTTCTG AAAATTA
    DF
701 TATTTAATAT GATTTTTTTA AATAAAAAAT ATATTAGCAT ATAATATGC
751 AAAAATTTTA CCTCGAGCTT GATTATAATT GTCATACAT TTCCGGCAAA
801 TATTAATAAA ATCTTGGCCC TCTTGGTTTC AACTTCTGG TTACAATTTT
851 TTTCGGAACC AGTTGAGGCA AACTCTTGA TCCTATATA CCTCTTTTTT
901 TTGTTCGGAG CAACCTACTC GCGTAAATAT GTTTCTTAG AAACCTCAAC
951 TTATGGTTCA GTGCTTTTTT TACGCTTCCA CGTGAATTC TATTGGATT
    DG
1001 GCGCAAGAAC AGTCTTTGGC CATAAATTTT TGTAACAAA ACTTAAACAT
    SC1-2 DG
1051 GTCATACCAT AGTGGGCAT GCATTGAGCG AAAATTAAT AAAGGCGTTG
1101 GAAAAGCCG ACATTGCAAA TATTAATCAA ATAATTAAT GTAGTAACAC
1151 AAAAATCTT TTTATACATC TAATCTTACT GAAATATA ACTTATCGAA
1201 TT

```

FIG. 3. Sequence of the SC1 insert, limited by two *EcoRI* residues. Primer sequences SC1-1 and SC1-2 are indicated and underlined. Direct tandem repeats are in italics and boldface and/or are underlined.

from *S. castanea*-mycorrhizal *Allium porrum* and from mycorrhizae obtained by infecting *Allium porrum* roots with different AMF, including *Scutellospora* species, were used as templates. DNA from nonmycorrhizal *Allium porrum* was used as a control (Fig. 6A). In order to verify the SC1 nature of the 907-bp PCR product, the PCR products were hybridized with the labeled SC1 sequence amplified from the pSC1 plasmid. A strong hybridization signal was obtained only with the 907-bp product from *S. castanea* spore DNA or from *S. castanea*-infected roots (Fig. 6B). The sensitivity of PCR detection by the SC1-specific primers was tested by mixing DNA from the fungus with DNA from noninoculated roots of *Allium porrum*: the SC1 sequence was detected down to 0.1 ng of *S. castanea* DNA in a mixture with 20 ng of *Allium porrum* DNA.

Finally, the identity between the product obtained by amplification with the SC1-1 and SC1-2 primers from the pSC1 clone and from *S. castanea* genomic DNA was established by restriction analysis with six endonucleases, which yielded two fragments of the expected sizes inferred from the restriction map (Fig. 4) obtained from the sequence analysis.

Evaluation of the copy number. The SC1 sequence was isolated by the squeeze-freeze method after *EcoRI* digestion of

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

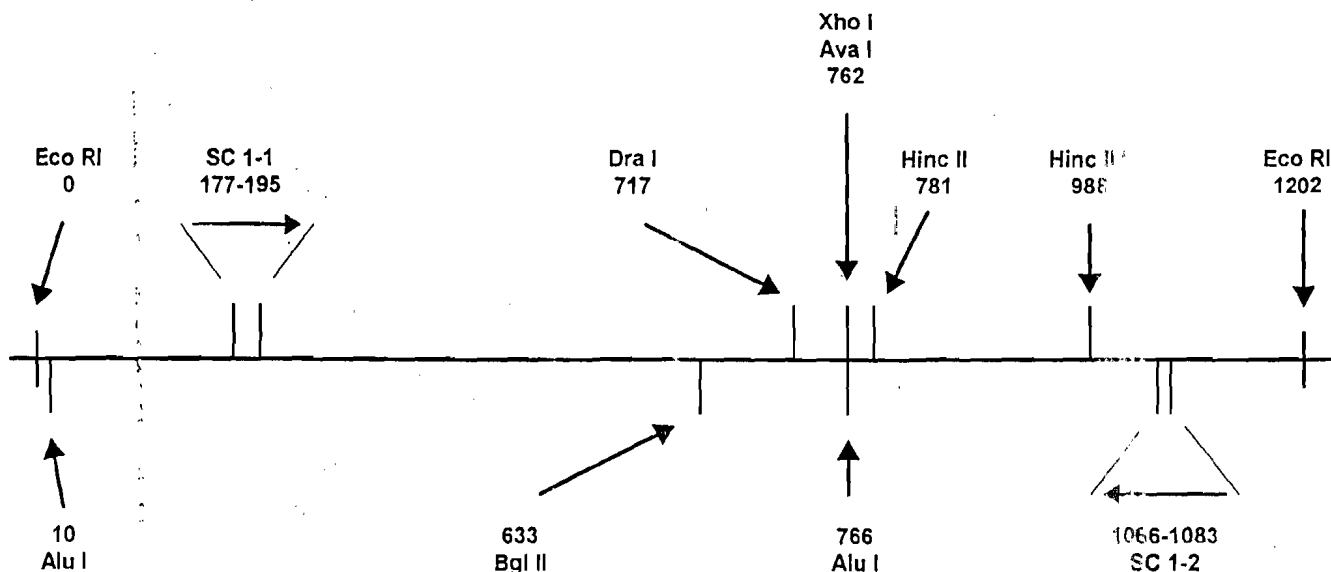


FIG. 4. Restriction map of the SC1 sequence, with the sites used for identification of the PCR product obtained with the SC1-1 and SC1-2 primers. Numbers indicate positions.

plasmid pSC1 and separation in a 0.8% agarose gel. After minifluorimetric quantification of both SC1 and genomic DNA from *S. castanea*, serial dilutions were performed. DNA was denatured, dot blotted onto a membrane, and hybridized with digoxigenin-labeled SC1 amplified with the SC1-1 and SC1-2 primers, generating a 907-bp product. The copy number of SC1 in the *S. castanea* genome was estimated from densitometric analyses of dot blot signals similar to those presented in Fig. 1. The signal intensity obtained with 18.75 ng of total DNA corresponded to that with 0.044 ng of SC1, that is, 0.236% of the *S. castanea* genome.

Flow cytometric analyses gave histograms with two peaks corresponding to *Gigaspora margarita* (peak 1) and *S. castanea* (peak 2) nuclei. An example is given in Fig. 7. The mean ratio (\pm standard deviation) between the arbitrary fluorescence value for *S. castanea* and that for *Gigaspora margarita* nuclei

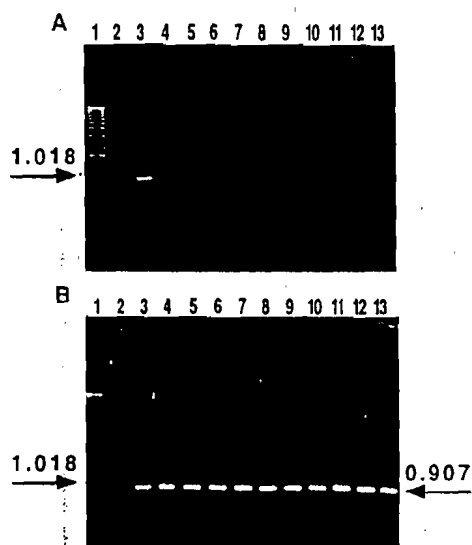


FIG. 5. Amplification with SC1-1 and SC1-2 primers (expected size, 907 bp) (A) and NS3 and NS6 primers (expected size, 907 bp) (B) of DNAs extracted from spores of *S. castanea* (lanes 3), an *S. castanea*-like species (lanes 4), *S. pellucida* (lanes 5), *S. heterogama* (lanes 6), *Glomus mosseae* (lanes 7), *Glomus intraradices* (lanes 8), *Glomus versiforme* (lanes 9), *Glomus caledonium* (lanes 10), *Acaulospora laevis* (lanes 11), *Gigaspora rosea* (lanes 12), and *Gigaspora margarita* (lanes 13). Lanes 1, 1-kbp ladder (Bethesda Research Laboratories); lanes 2, no DNA. Numbers on the sides indicate sizes (in kilobase pairs).

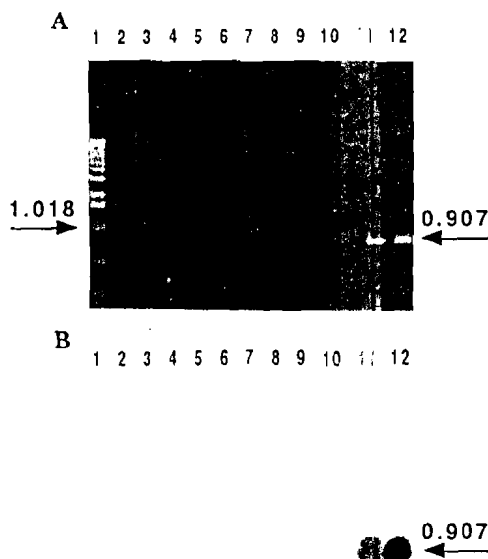


FIG. 6. Amplification with SC1-1 and SC1-2 primers (A) and corresponding Southern blot (B) of DNAs extracted from nonmycorrhizal leek roots (lanes 2); from roots colonized by *Acaulospora laevis* (lanes 3), *Gigaspora rosea* (lanes 4), *Glomus mosseae* (lanes 5), *Glomus caledonium* (lanes 6), *S. pellucida* (lanes 7), *S. nodosa* (lanes 8), *S. calospora* (lanes 9), an *S. castanea*-like species (lanes 10), or *S. castanea* (lanes 11); or from spores of *S. castanea* (lanes 12). The blot of denatured DNA was hybridized with the amplification product obtained with the SC1-1 and SC1-2 primers from plasmid pSC1 and labeled with digoxigenin by random priming. Lanes 1, 1-kbp ladder (Bethesda Research Laboratories). Numbers on the sides indicate sizes (in kilobase pairs).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300

301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400

401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500

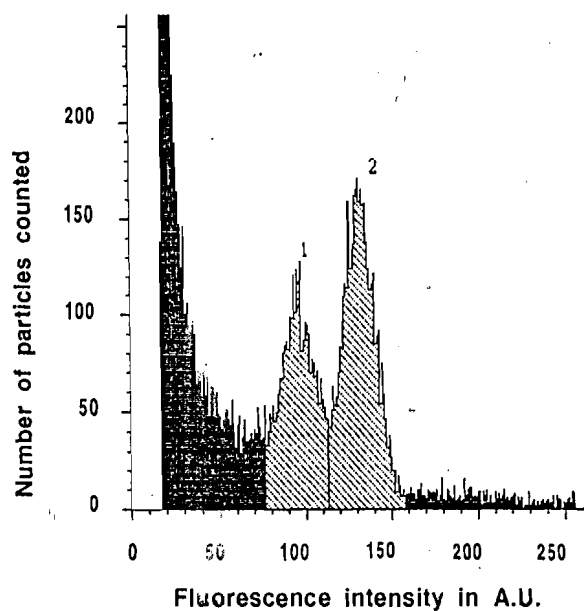


FIG. 7. Cytometric flow analysis of nuclei from spores of *Gigaspora margarita* (peak 1) (as a standard) and *S. castanea* (peak 2). A histogram of frequencies (counts) of DAPI-stained nuclei is shown. Intensities are given in arbitrary fluorescence units (A.U.) on a linear scale. The ratio of the DNA content of *S. castanea* nuclei to that of *Gigaspora margarita* nuclei is 1.35.

was observed to be 1.35 ± 0.03 . By using this value in the equation given in Materials and Methods, the genome size of *S. castanea* was calculated to be 1.04 ± 0.02 pg per nucleus, which corresponds to approximately 9.5×10^8 bp per nucleus. The copy number can be estimated as $(0.00236 \times 10^9)/907 \approx 2,600$. This estimate is clearly not an exact measurement; however, a copy number of 2,000 to 3,000 allows the classification of SC1 sequences as highly repeated DNA.

DISCUSSION

In this paper, we describe the use of a repeated DNA sequence, SC1, screened from a partial genomic library as a tool for specific detection of *S. castanea* in mycorrhizal roots. This is the first time that an AMF repeated DNA sequence other than rDNA has been characterized and subsequently used as a probe. The specificity of the repeated DNA sequence SC1 for *S. castanea* spores either in dot blot and Southern analyses or by PCR amplification confirms preliminary observations of its ability to detect *S. castanea* in *Allium porrum* mycorrhizae by Southern analyses (42).

DNA probes corresponding to repeated DNA sequences have been constructed for plant species such as barley (17), tobacco (18, 19), wheat (22), and *Beta procumbens* (29), and Stradford et al. (34) have used species-specific tandem repeats as diagnostic probes for cyst nematodes. DNA or RNA sequences specific to a particular organism can be used for PCR detection. For example, Schesser et al. (28) and Henson et al. (16) used a specific mitochondrial DNA sequence to generate primers to detect *Glomus graminis* in infected wheat, and more recently Lanfranco et al. (20) have reported *Glomus mosseae*-specific primers designed from a RAPD product. By sequencing SC1, we generated the primers SC1-1 and SC1-2 for PCR detection of *S. castanea* DNA in roots, and under the described conditions, they did not amplify DNA from spores of *Scutellospora* spp. other than *S. castanea* or from roots infected by other species of AMF. Compared with dot blot and Southern

analyses, which required at least 60 ng and 1 μ g of DNA, respectively, PCR detection was far more sensitive, since we could detect 0.25 ng of *S. castanea* DNA when it was mixed with 20 ng of DNA from roots of nonmycorrhizal *Allium porrum*. These primers provide reliable tools for the direct detection and identification of this fungus throughout its life cycle.

Cloning of genomic DNA also offers the possibility of examining genome structure. Previous analyses (5) and the present analyses indicate that members of the order Glomales have high DNA contents per nucleus (0.27 to 1 pg). Of the 23 clones from *S. castanea* analyzed, 9 gave a high signal intensity in hybridization with genomic DNA, suggesting that the corresponding sequences exist in high copy number in the *S. castanea* genome. This may mean that a large part of the *S. castanea* genome is redundant DNA, as is found in higher eucaryotes (35). The fact that complete *EcoRI* digests of *S. castanea* that were hybridized with SC1 yielded one major signal corresponding to the size of SC1 means that this sequence must represent a major DNA repeat in the *S. castanea* genome. From calculations, the sequence is estimated to be at about 2,600 copies, and sequence analysis suggests that it is noncoding. The SC1 sequence is organized in several families throughout the genome, although the SC1 repeat is large (1,202 bp) and does not contain subrepeats as is frequently the case for satellite DNA (4, 14, 18). If the organization consists of a reduced number of tandem repeats of at least 1,202 bp, this would explain the irregular pattern of signals obtained after incomplete digestion of *S. castanea* genomic DNA. Tandemly organized repeated sequences of about 1,000 bp have been similarly isolated from plants (18, 19) or fish (13), and several families were found. The complex pattern observed in genomic blots hybridized with SC1 suggests that the SC1 sequence could have diverged within the *S. castanea* genome, creating several families. The amplification process with the SC1-1 and SC1-2 primers could be restricted to a single family with a small number of nucleotide substitutions among its members. However, this apparent specificity for *S. castanea* cannot be said to be either species or isolate specificity, given the lack of isolates classified as *S. castanea*. It remains that SC1 must be considered a member of a family of repeated sequences that have diverged among species sufficiently to hamper heteroduplex detection in hybridization experiments and to suppress PCR amplification with other AMF isolates. It would be interesting to obtain other isolates of *S. castanea* identified by classical taxonomic characters to test whether the specificity of SC1 is at the species or isolate level.

The present paper is the first to report the possibility of obtaining species-specific PCR primers based upon a repeated noncoding DNA sequence and their use as diagnostic probes to identify the fungal component of arbuscular mycorrhiza. Such primers will be useful to detect the presence of *S. castanea* Walker (BEG1) not only in root tissues but also in DNA extracted from the soil. These primers and those obtained for *Glomus mosseae* (20) are the only molecular tools presently available which can be used for the direct and unequivocal detection of individual AMF species.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to C. Walker, J. C. Dodd, and L. Lanfranco for starting cultures of *S. calospora*, *S. heterogama*, *S. nodosa*, and the unidentified *Scutellospora* sp. and to O. Chatagnier for technical assistance. We thank D. van Tuinen for advice on sequence analyses and for helpful discussions, and we thank P. Franken for useful comments.

This work was partially supported by the EPR-Bourgogne (Project EPR 3062A) and the Ministry of Scientific Research and Higher Education, Côte d'Ivoire (grant to A.Z.).

1-CARACTERISATION D'UNE SEQUENCE REPETEE ET AMPLIFICATION PAR LA TECHNIQUE PCR

1.1 Introduction

Les séquences répétées peuvent non seulement être utilisées comme outils de détection mais aussi comme marqueurs d'évolution (Flavell *et al.* 1977; Santoni et Bervillé, 1992). Au cours de la recherche de séquences répétées chez *S. castanea*, nous avons pu mettre en évidence une séquence présente aussi dans le génome d'autres espèces de champignons endomycorhizogènes à arbuscules. Nous avons voulu utiliser cette séquence pour étudier une possible variation intergénérique entre champignons endomycorhizogènes à arbuscules. Du fait des difficultés d'application de la technique RFLP sur ADN total de spores (pour les raisons évoquées précédemment), nous avons adopté une autre stratégie. Après séquençage complet de la séquence dénommée SC4, des amorces ont été déterminées qui nous ont permis d'amplifier une portion de cette séquence chez différents genres de champignons endomycorhizogènes. Du fait qu'elle a été caractérisée comme une séquence dispersée et qu'elle a été détectée chez les différentes espèces de champignons endomycorhizogènes étudiées, nous l'avons baptisée *Mycdire* pour (Mycorrhizal fungi dispersed element).

1.2 Résultats

1.2.1 Caractérisation de la séquence *Mycdire*

La caractérisation de la séquence *Mycdire* a été réalisée par (i) l'hybridation en dot qui nous a permis de déterminer le nombre de copies de cette séquence dans le génome de: *A. laevis*, *Gig. rosea*, *G. caledonium* et *S. castanea*, (ii) l'hybridation de Southern qui nous permis de déterminer l'organisation de l'élément *Mycdire* dans le génome de *S. castanea*, (iii) le séquençage complet de l'élément *Mycdire* qui nous a permis de déterminer son organisation nucléotidique.

1.2.2 Estimation du nombre de copies de *Mycdire* dans chaque génome

L'hybridation en dot des ADN totaux extraits de spores des espèces *A. laevis*, *G. caledonium*, *Gig. rosea* et *S. castanea* (Figure 1 page 126) permet de déterminer le nombre de copies de *Mycdire* dans le génome de chacune de ces espèces. Après traitement des spots par analyse d'images, une courbe densitométrique étalon est déterminée avec la séquence *Mycdire*. Nous intrapolons ensuite comme nous l'avons fait au chapitre précédent pour avoir la valeur en ng d'ADN des spots inconnus. Le nombre de copies dans chaque génome est alors déterminée comme suit:

Glomus caledonium

75ng d'ADN génomique donnent une quantité équivalente de 0,08 ng de la sonde. **Donc la proportion de séquences homologues à la sonde est:** $0,079659/75 = 0,00106$. Ce qui correspond à 0,1% du génome de *G. caledonium*. En estimant à 0,3 pg (Michel Hosny, communication personnelle) la quantité d'ADN par noyau chez de *G. caledonium* la

proportion de séquences homologues de *Mycdire* est $0,00106 \times 0,310^9 = 318000$ pb. Le nombre de copies de *Mycdire* est donc estimé à $318000/1428 = \underline{223}$.

Scutellospora castanea

150 ng d'ADN génomique donnent une quantité équivalente de 0,06 ng de la sonde. **Donc la proportion de séquences homologues à la sonde est:** $0,059286/150 = 0,00039$, soit 0,039% du génome de *S. castanea*. En estimant la quantité d'ADN par noyau chez *S. castanea* à 1 pg (Michel Hosny, communication personnelle), la proportion de séquences homologues est donc de $0,00039 \times 10^9$ ce qui donne 395240 pb. Le nombre de copies de *Mycdire* est donc estimé à $395240/1428 = \underline{277}$.

Gigaspora rosea

150 ng d'ADN génomique donnent une quantité équivalente de 0,058 ng de la sonde. **Donc la proportion de séquences homologues à la sonde est** $0,058/150=0,00039$, soit 0,039% du génome de *Gig. rosea*. En estimant la quantité d'ADN par noyau chez *Gig rosea* à 0,57 pg (Michel Hosny, communication), la proportion de séquences homologues est: $0,00039 \times 0,5710^9 = 222300$ pb. Le nombre de copies de *Mycdire* est donc estimé à $220400/1428 = \underline{156}$.

Acaulospora laevis

150 ng d'ADN génomique donnent un signal équivalent à 0,068 ng de la sonde. **Donc la proportion de séquences homologues à la sonde est:** $0,068566/150 = 0,00046$. Ce qui correspond à 0,046% du génome de *A. laevis*. En estimant la quantité d'ADN par noyau chez *A. laevis* à 0,67 pg (Michel Hosny, communication personnelle), la proportion

de séquences homologues est: $0,00046 \times 0,6710^9 = 306261\text{pb}$. Le nombre de copies de *Mycdire* est donc estimé à $306261/1428 = \underline{214}$.

1.2.1.2 Organisation de *Mycdire* dans le génome de *S. castanea*

En vue de montrer l'organisation de la séquence *Mycdire* dans le génome de *S. castanea*, 1 μg d'ADN total de spores est digéré par l'enzyme *EcoRI*. Après électrophorèse et transfert sur membrane, une hybridation est effectuée avec la séquence *Mycdire* marquée à la digoxigénine. Une traînée a été obtenue après hybridation montrant que la séquence *Mycdire* est dispersée dans le génome de *S. castanea* (voir Figure 2 page 127).

1.2.1.3 Séquençage et analyse de *Mycdire*

Après séquençage complet de l'élément *Mycdire*, la détermination en bases donne 76% de A+T et 24% de G+C. En utilisant le programme "repeat" du logiciel GCG via le serveur génome à Villejuif, il nous a été possible de déterminer cinq séquences répétées directes et deux répétées inversées. En outre, sept variantes de la séquence **ARS** qui confère une autonomie de réplication chez *Saccharomyces cerevisiae* ont été détectées dans cette séquence (Figure 3 page 128). Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'existence de séquences d'ADN appelées (Centromeric DNA element) CDEI (G/A)TCAC(G/A)TG) et CDEIII (TTCGAA) qui sont caractéristiques des séquences d'ADN centromérique chez *S. cerevisiae*. Ainsi deux CDEI parfaits ont été mis en évidence aux positions (724-731) et (874-881) et un CDEIII avec un mésappariement en position (506-512).

1.2.2-Détection de la séquence *Mycdire* dans le génome de quelques espèces de champignons endomycorhizogènes à arbuscules par la technique PCR

1.2.2.1 Choix des amorces

Le choix des amorces s'est fait comme précédemment en utilisant le programme "Amplify" pour rechercher les dimères et la stabilité des hybrides.

La qualité des amorces dénommées

-Myc1 5' TCATAAAATTTTAATTGGTG 3'

-Myc2 5' TAATTTTCAGGTAAAGATGG 3'

a été ainsi déterminée.

1.2.2.2 Amplification de l'ADN total de spores de *A. laevis*, *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. pellucida* et *S. castanea*

Une fois les amorces testées, une amplification a été effectuée sur ADN total de spores de différents champignons endomycorhizogènes à arbuscules en vue d'amplifier la région correspondante de l'élément *Mycdire* dans le génome de ces champignons. Comme le montre la Figure 4A page 129, une amplification a été obtenue avec l'ADN des espèces testées. Nous nous attendions à un fragment de 1056 bp. Lorsque les produits d'amplification ont été soumis à électrophorèse d'agarose (1,5% Nusieve), un fragment d'une telle taille a été obtenu avec les espèces *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. castanea* et *S. pellucida* comme produit majeur. Mais l'espèce *A. laevis* a donné un fragment de 569 bp comme produit majeur. En plus de ce fragment de 1058bp, des fragments mineurs de petites tailles (600bp et 400bp) ont été obtenus chez *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. castanea* et *S. pellucida*. Un fragment mineur de

même taille que le fragment majeur de *A. laevis* a été obtenu aussi chez *S. castanea*.

1.2.2.3 Relations entre l'élément *Mycdire* et les portions correspondantes amplifiées chez les autres espèces

1.2.2.3.1 Identification des produits d'amplification

Pour montrer la relation entre les différents produits d'amplification obtenus, nous avons procédé à l'hybridation moléculaire des produits d'amplification avec la séquence *Mycdire*. Après électrophorèse, les produits d'amplification ont été transférés sur membrane Biohylon Z+. Ces produits ont été alors hybridés avec l'élément *EcoRI* (*Mycdire*) de *S. castanea*. La Figure 4B page 129 montre que les produits majeurs (1058bp) de *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. castanea* et *S. pellucida* donnent un signal d'intensité très fort comparativement au produit majeur de *A. laevis* qui donne un signal presque inexistant. Les produits de 600 bp de *Gig. rosea* et de *G. caledonium* donnent des signaux d'intensité moyenne, mais plus fort que le signal obtenu avec le produit majeur de *A. laevis*. La bande mineure de 400bp n'a donné aucun signal.

1.2.2.3.2 Séquençage comparé des produits d'amplification

Pour faire une analyse plus approfondie, les produits majeurs de *A. laevis*, *G. caledonium* et de *Gig. rosea* ont été clonés et séquencés sur 300bp sur chaque brin. Une comparaison a été effectuée dans les régions homologues de l'élément *Mycdire* de *S. castanea*. Lorsque nous comparons les 300 bases de *Gig. rosea* et de *G. caledonium* avec *Mycdire*, nous trouvons une homologie d'environ 97% (voir Figure 5, page 130). Cette comparaison montre donc que l'élément *Mycdire* de

S. castanea est très fortement conservé chez les espèces *Gig. rosea* et *G. caledonium*. Les produits de 600 bp des espèces *Gig. rosea* et *G. caledonium* donnent des signaux relativement forts. Ce fragment pourrait être sous-famille relativement conservée de l'élément *Mycdire*.

Nous avons pu obtenir le séquençage complet du produit majeur de *A. laevis*. La comparaison de ce produit avec l'élément *Mycdire* en utilisant le programme de comparaison "besfit", qui est un logiciel de comparaison qui offre le meilleur alignement possible, donne 65% d'homologie sur 341bp ce qui pourrait expliquer le faible signal d'hybridation obtenu.

3 Discussion et conclusion

L'hybridation en dot blot d'ADN totaux nous a permis de mettre en évidence l'élément *Mycdire* comme étant présent dans le génome des différentes espèces testées. Une hybridation en Southern de l'ADN total de spores de *S. castanea* a permis de déterminer que cette séquence est dispersée. C'est une séquence de 1428bp riche en A+T. Nous avons mis en évidence des répétés directs et inversés et la présence d'un élément homologue à la séquence **A R S** (A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T) de *S. cerevisiae* (Broach *et al.* 1993) connue pour conférer une autonomie de réplication. La comparaison de la séquence *Mycdire* aux séquences de la banque de données (EMBL genbank) avec l'algorithme FASTA (Pearson et Lipman, 1988), a révélé 53,5% d'homologie sur 886bp de la séquence ACARS d'*Acremonium chrysogenum*, qui possède une autonomie de réplication et une capacité de transformation (Isogai *et al.* 1987). La localisation de l'élément *Mycdire* dans le génome de *S. castanea* n'est pas encore établie. Mais en utilisant l'algorithme FASTA,

nous avons constaté que *Mycdire* possède 51% d'homologie avec 1200 bp d'un élément centromérique de *Schizosaccharomyces pombe* dénommée SPCEN2C. Des ADN centromériques de *S. cerevisiae* ont été bien étudiés et sont caractérisés par la présence de trois éléments conservés appelés CDE (Centromeric DNA element) (Hieter et al. 1985) appelés CDEI ((G/A)TCAC(G/A)TG) et CDEIII (TTCCGAA) séparés par un troisième, CDEII qui a 86-88bp et qui est très riche en A+T. Comme l'indique la figure 3 page 128, nous avons mis en évidence deux CDEI parfaits aux positions 874-881 et 724-731. Un CDEIII avec un mésappariement apparaît à la position (507-512). Tous ces résultats nous font penser que l'élément *Mycdire* serait un élément centromérique. De plus la séquence anS1 de *Aspergillus nidulans*, qui possède une autonomie de réplication et une capacité de transformation, est située à proximité d'un centromère (Cullen et al. 1987)

La mise en évidence de cet élément chez les champignons testés par la technique d'hybridation en dot nous a permis de déterminer le nombre de copies de cet élément qui varie de 164 à 280. Ceci représente 0,042% du génome de *A. laevis* et de *S. castanea* et 0,082% du génome de *Gig. rosea* et de *G. caledonium*.

Ne pouvant entreprendre des études RFLP sur ADN total, des amorces ont été déterminées à partir de la séquence *Mycdire*. Celles-ci nous ont permis d'amplifier des portions de cet élément chez les espèces testées. L'analyse directe des produits PCR confirme le fait que cette séquence dispersée serait organisée en sous-familles. Différentes sous-familles apparaissent chez toutes les espèces analysées. Les réponses intenses obtenues après hybridation de Southern des produits PCR confirment le fait que l'élément *Mycdire*

est très conservé chez *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. pellucida* et *S. castanea* mais non chez *A. laevis*.

Le séquençage comparé des produits majeurs obtenus après amplification par PCR montre effectivement que cet élément est fortement conservé chez des espèces comme *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. pellucida* et *S. castanea* alors que la portion amplifiée chez *A. laevis* n'a que 65% d'homologie. Ces résultats indiquent que l'élément *Mycdire* est très conservé chez *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. pellucida* et *S. castanea*.

L'élément *Mycdire* possède des **ARS**, ce qui pourrait conférer une autonomie de réplication à cette séquence. Des séquences comportant des ARS ont été caractérisées et utilisées comme vecteur de transformation chez *A. nidulans* (Cullen *et al.* 1987) et chez *A. chrysogenum* (Tokao *et al.* 1987). Cet élément *Mycdire* ouvre par conséquent une voie pour la construction d'un vecteur de transformation.

L'élément transposable MGR du champignon *Magnaporthe grisea* a été utilisé pour discriminer entre les espèces pathogènes et les non pathogènes (Hamer *et al.* 1989). On pourrait donc envisager de rechercher une corrélation entre le pouvoir endomycorhizogène d'un champignon symbiotique et la présence de l'élément *Mycdire*.

L'élément *Mycdire* est conservé chez les différents champignons endomycorhizogènes à arbuscules étudiés. Or ces champignons sont supposés appartenir à des genres différents. Ces résultats soulèvent les questions posées par Morton (1990) quant à la conception du genre et de l'espèce chez ces champignons. Une élucidation devrait être apportée en s'adressant à un nombre élevé de champignons endomycorhizogènes. Mais la nature transposable de l'élément

Mycdire pourrait expliquer ces résultats. Simmons (1992) a montré que l'élément transposable *hobo* est très conservé entre espèces de *Drosophile*. Des observations similaires ont été rapportées pour l'élément transposable *mariner* en comparant trois espèces différentes de *Drosophile* (Maruyama *et al.* 1991). La divergence d'éléments d'insertion se situe entre 0 et 0,3% chez des souches de *E. coli* (Lawrence *et al.* 1992).

Capy *et al.* (1994) soulèvent la question d'une phylogénie étrange, non conventionnelle, dès éléments transposables, non conformes aux phylogénies établies par les méthodes morphologiques ou moléculaires utilisant des séquences d'ADN fonctionnelles. En effet, l'élément *mariner* est présent avec 96% d'homologie chez des genres comme *Drosophila mauritania* et *Zaprionus tuberculatus* (Maruyama *et al.* 1991), deux espèces appartenant à des genres ayant divergé voilà 70 millions d'années (Beverley *et al.* 1984). Mais quand des espèces comme *Drosophila mauritani* et *Drosophila tsacasi* qui appartiennent au même genre sont comparées, on a seulement une homologie de 89%. Comment pourrait-on expliquer une telle contradiction?

Capy *et al.* (1994) propose l'hypothèse d'un transfert horizontal des éléments transposables.

Les phylogénies existantes des champignons endomycorhizogènes à arbuscules montrent que le genre *Glomus* a divergé depuis très longtemps des genres *Gigaspora* et *Scutellospora*. Nos résultats montrent que les séquences *Mycdire* de *G. caledonium*, *S. castanea* et *Gig. rosea* se ressemblent et sont différentes de celle de *A. laevis*. Des transferts horizontaux pourraient expliquer ces résultats.

Si l'on s'appuie sur cette hypothèse, l'élément *Mycdire* peut donc être utilisé pour faire une étude de dynamique de communautés

naturelles de champignons en jouant sur la présence de cet élément chez trois genres ou son absence chez *Acaulospora*.

Avec un nombre de copies moyen d'environ 200, on pourrait aussi disposer de loci potentiels distribués de manière aléatoire dans chacun des génomes afin de développer des marqueurs spécifiques monocus.

Les résultats obtenus ont été rassemblés dans un article intitulé: *Mycdire, a dispersed repetitive DNA element present in the genomes of arbuscular mycorrhizal fungi* ; cet article est soumis à Gene. Pages 112-130.

A soumettre à Gene

***Mycdire*, a dispersed repetitive DNA element in genomes of arbuscular mycorrhizal fungi**

(Glomales; genome structure; conserved dispersed element; PCR; sequence analysis)

Adolphe Zézé*, Hubert Dulieu, Diederik van Tuinen and Vivienne Gianinazzi-Pearson

Laboratoire de Phytoparasitologie INRA-CNRS, SGAP, INRA, BV 1540, F-21034 Dijon Cédex, France

Correspondence to: H. Dulieu, Laboratoire de Phytoparasitologie INRA-CNRS, SGAP, INRA, BV 1540 F-21034 Dijon Cédex, France. Tel: (33)80633156; Fax: (33)80633263; e-mail: Dulieu@epoisses.inra.fr

*Address after 30 June: Department of Soil Science, Waite Campus, University of Adelaide, Glen Osmond, South Australia 5064, Australia

Abbreviations: PCR: polymerase chain reaction; µg: microgram; ng: nanogram; pg: picogram; bp: base pair; kb: kilobase.; µl: microliter; µM: micromolar; LPA: Laboratoire de Phytoparasitologie; BEG: European Bank of Glomales; SDS: sodium dodecyl sulfate; SSC: Sodium citrate; EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid; TAE: Tris acetic acid EDTA; IPTG: isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; Xgal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

SUMMARY

An *Eco*RI 1428bp A+T-rich, dispersed and moderately repetitive element (*Mycdire*: Mycorrhizal fungi dispersed repetitive element) has been identified in the genome of *Scutellospora castanea*, an arbuscular mycorrhizal fungus. After partial sequencing of this element, primers were designed and used in PCR to amplify portions of this element in species of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to four different genera of Glomales. Southern blot analysis of the PCR products showed that this sequence is organized in different subfamilies. Sequence analyses of the main PCR product showed that this element was highly conserved in the five species of arbuscular mycorrhizal fungi examined. EMBL database comparisons indicated that *Mycdire* presents some homologies with the autonomously replicating, A+T-rich element (ACARS) from *Acremonium chrysogenum*, which has a transformation capacity, and contains seven copies of a previously reported autonomously replicating sequence (ARS) from *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUCTION

Arbuscular mycorrhizal fungi are unculturable organisms, belonging to the order Glomales (Zygomycotina) and forming symbiotic association with the roots of most plants (Morton, 1990). This symbiosis is common to at least 80% of terrestrial plant families and is important for its role in plant nutrient uptake and water absorption (Harley and Smith, 1983). Arbuscular mycorrhizal fungi already existed in the Ordovician (Remy et al. 1994) and have persisted through evolution with the appearance of new land plants. The genetics of these fungi, and the adaptative mechanisms which have allowed arbuscular mycorrhizal fungi to maintain similar mutualistic functions with many terrestrial plants are unknown. Arbuscular mycorrhizal fungi typically develop large, unicellular, multinucleate, asexual spores during their life-cycle (Walker, 1992), but the fact that they cannot be grown without a host plant has hampered investigations of their genome. Bianciotto and Bonfante (1992) have estimated DNA content per nucleus to 0.27pg and 0.77pg for the two species *Glomus versiforme* and *Gigaspora margarita*, respectively, and there is preliminary evidence for the existence of repetitive DNA sequences in the genome of an arbuscular mycorrhizal fungus (Zézé et al. 1994). This, together with their large genome sizes has led us to postulate that a proportion of the genome of arbuscular mycorrhizal fungi may be as repetitive DNA, as is common in eucaryotes (Transkley and Eran, 1988).

We recently isolated a tandemly organized, repetitive DNA sequence (SC1) specific to the mycorrhizal fungus *Scutellospora castanea* Walker (BEG1) which could be used for identification of the symbiotic fungus in colonized roots (A. Zézé, M. Hosny H. Dulieu and V. Gianinazzi-Pearson, submitted). The aim of the present work was to describe a dispersed repetitive DNA element (*Mycdire*) which was previously isolated from a partial genomic library of *S. castanea* and detected in the genome of four genera of Glomales (Zézé et al. 1994).

EXPERIMENTAL AND DISCUSSION

(a) Isolation of *Mycdire* and determination of genomic organisation

Amongst repeated DNA sequences detected during preliminary screening of a partial genomic library from the arbuscular mycorrhizal fungus *S. castanea* (Zézé et al. 1994), the *Mycdire* sequence, previously identified as SC4 for *S. castanea* clone 4, hybridized with DNA from all Glomales tested, indicating that it is present in the different genomes (Fig. 1). In order to estimate the copy number of this non-specific element in the genome of *S. castanea*, the dot blot shown in Fig. 1 was analyzed by an image analyser. The integrated area of each spot was determined by comparison to the signal given by the *Mycdire* sequence as reference. Doing this, 150ng of the genomic DNA of *S. castanea* gave a signal equivalent to that of 0.06ng of the *Mycdire* sequence, indicating that this accounts for 0.04% of *S. castanea* genome. Assuming a genome size of 1pg for *S. castanea* (A. Zézé, M. Hosny H. Dulieu and V. Gianinazzi-Pearson, submitted), this represents about 250 copies of the element. Repetitive DNA is not unusual in fungi and contents can be as high as 25% in the genome of the Zygomycotina *Absidia glauca* (Wöstemeyer and Burmester, 1986). In other fungal genomes, repetitive rDNA alone can account from 0.35% in *Achlya bisexualis* (Jaworski et al. 1973) to 2.4% for *Saccharomyces cerevisiae* (Schweizer et al. 1969).

In order to obtain information about the distribution of the repetitive element *Mycdire* in the genome of *S. castanea*, a Southern blot hybridization was realized with 1µg of *EcoRI* digests of DNA from spores of *S. castanea*. After hybridization, a smear was obtained (Fig. 2) suggesting that *Mycdire* is randomly dispersed throughout the *S. castanea* genome. Dispersed repetitive DNA sequences have been characterized in the genomes of other fungi including the Zygomycotina *Mucor racemosus* (Dewar et al. 1985) after genomic cloning, and some have been shown to represent transposable elements (Cameron et al. 1979; Dobinson et al. 1993).

(b) *Mycdire* sequence analyses

Internal primers were used to get the complete sequence of *Mycdire*. As can be seen in Fig. 3, it is a 1428 bp sequence, 76% A+T-rich, and contains five perfect direct repeats (DA, DB, DC, DD, DE) and two imperfect (IA and IB) inverted repeats. The analysis of the sequence *Mycdire* shows the presence of seven copies of sequences that have 10 out of 11 bases of homology to a previously reported core of an autonomously replicating sequence ((A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T)) called ARS which has an autonomously replicating function in *Saccharomyces cerevisiae* (Broach et al. 1983). Further comparison of the *Mycdire* sequence with DNA sequences in the EMBL genebank using FASTA algorithm (Pearson and Lipman 1988) revealed 53.5% identity in 886bp to the sequence ACARS from *A. chrysogenum*, which is also an autonomously replicating sequence (Isogai et al. 1987). These results suggest that *Mycdire* could contain autonomously replicating sequences (transposable-like elements) which might make it useful as a vehicle for transformation. Such vehicles have been constructed for *A. nidulans* (Cullen et al. 1987) and for *A. chrysogenum* (Isogai et al. 1987). Furthermore, the dispersed repetitive element MGR, which is a transposable-like element, has been used to discriminate the virulent strains of the rice pathogen *Magnaporthe grisea* from nonvirulent strains (Hamer et al. 1989). Centromeric DNA from *S. cerevisiae* have been well characterized and consist of three conserved elements called CDEI ((G/A)TCAC(G/A)TG), a 86-88bp A+T-rich region called CDEII and another called CDEIII (TTCCGAA) (Hieter et al. 1985). As shown in Fig. 3, the *Mycdire* element contains two perfect CDEI at positions 724-731 and 874-881 and one CDEIII region with one mismatch occur at position 506-511. The sequence ans1 from *A. nidulans* has been shown to have a centromeric proximal location (Cullen et al. 1987), but this sequence contained no convincing CDEI sequence element and one

CDEIII with one mismatch, A+T rich and contained direct repeats. Moreover, the anS1 sequence has been found to have an autonomously replicating function because of the presence of the ARS element from *S. cerevisiae*.

The location of the *Mycdire* element in the AMF genome is not known but all these results suggest that the *Mycdire* element may possibly be related to a centromeric element which could have an autonomously replicating function.

(c) PCR amplification of a portion of *Mycdire* in other arbuscular mycorrhizal fungal genomes.

The results obtained by dot blot analyses indicated that *Mycdire* is present in the genome of other arbuscular mycorrhizal fungi (Fig. 1). In order to confirm this result, a set of primers called Myc1 (5'TCA TAA AAT TTT AAT TGG TG3') and Myc2 (5'TAA TTT TCA GGT AAA GAT GG3') was designed and used in a PCR reaction (Fig 3). DNA from spores of five different species (*A. laevis*, *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. pellucida* and *S. castanea*) served as template. After a PCR reaction of 30 cycles, an expected 1058 bp product was obtained for *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. castanea* and *S. pellucida*, whilst *A. laevis* yielded a 569 bp (determined after sequencing) product (Fig. 4A). In spite of the stringent conditions, additional smaller fragments were obtained. Two small fragments (400 and 600bp) were present in the genomes of *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. castanea* and *S. pellucida*, but absent from *A. laevis*. A faint band of the same size as that of *A. laevis* appeared in *S. castanea*. In order to determine whether these small fragments were subrepeats of the *Mycdire* element, the PCR products were hybridized with the *Mycdire* sequence. The 1058 bp fragments from *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. castanea* and *S. pellucida* gave a high signal intensity after hybridization. However, a low but distinct signal was obtained either with the 569 bp fragment from *A. laevis* or the small fragment (600bp) in the other species but not with the 400

bp fragment (Fig.4B). These results clearly indicate that the *Mycdire* element is present in the genomes of *Gig. rosea*, *G. caledonium*, *S. castaneu* and *S. pellucida*, and that the small fragments in these fungi represent subfamilies of the *Mycdire* element. The 569 bp fragment in the *A. laevis* genome could be a subfamily of the *Mycdire* element in spite of the low signal obtained after hybridization.

(d) Relationship between *Mycdire* and the corresponding regions amplified in different species

In order to determine the degree of similarity of the *Mycdire* sequence in other arbuscular mycorrhizal fungi used in this study, the main PCR product (1058 bp) from *Gig. rosea* and *G. caledonium* was partially sequenced on both strands, and the 569 bp fragment from *A. laevis* totally sequenced. By comparison with the corresponding regions of the *Mycdire* element from *S. castanea*, the fragment from *Gig. rosea* and *G. caledonium* showed high similarity (97%) with the original *Mycdire* region (Fig. 5). The 569 bp fragment from *A. laevis* only showed a homology of 65% to the *Mycdire* element on 341bp, which could explain the lower hybridization signal in Fig. 4B.

The conservation of this element in different morphological genera underlines the question of the concept of genera and species of AMF (Morton 1990). However, such high conservation is characteristic of transposable elements in other organisms. For example, the transposable element mariner in *Drosophila* shows a very low sequence divergence (Maruyama et al. 1991). *Drosophila mauritani* and *Drosophila tsacasi*, two species belonging to the same genera show 89% homology in the element mariner whilst there is 96% homology between *Drosophila mauritani* and *Zaprionus tuberculatus* (Maruyama et al. 1991) two species which have diverged 70 millions years ago (Beverley and Wilson 1984). Similar observations have been made for

insertion elements which diverge very slowly between *E. coli* strains (Lawrence et al. 1992). Capy et al. (1994) have proposed horizontal transfer to explain strange phylogeny of transposable elements and this could be a hypothesis for the conservation of the *Mycdire* element in AMF. However, a greater number of species have to be used to verify or not such a hypothesis. Nevertheless, the availability of such an element, especially one closely related to an autonomously replicating element, would be of considerable value in molecular studies of population dynamics of AMF.

(e) Conclusions

(1) A repetitive DNA sequence (*Mycdire*), dispersed throughout the *S. castanea* genome, represents 0.04% of this genome and about 250 copies per genome.

(2) The *Mycdire* element is well conserved in four species of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to three genera of Glomales.

(3) The *Mycdire* element contains three variants of the ARS sequence of *S. cerevisiae* and has 53.5% similarity with the ACARS sequence from *A. chrysogenum*, suggesting that autonomously replicating sequences or transposable-like elements may exist in arbuscular mycorrhizal fungi genomes.

(4) The *Mycdire* element may be a centromeric element.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank O. Chatagnier for invaluable technical assistance and S. Gianinazzi for critically reading the manuscript. This work was partially supported by the EPR-Bourgogne (project EPR 3062A) and the Ministry of Higher Education, Côte d'Ivoire (grant to A. Z.)

REFERENCES

- Bianciotto, V. and Bonfante, P.: Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 96 (1992) 1071-1076.
- Cameron, J. R., Loh, E. Y. and Davis, R. W.: Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell* 16 (1979) 739-751.
- Capy, P., Anxolabéhère, D. and Langin, T.: The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? *Trends in Genetics* 10 (1994) 7-12.
- Cullen D., Wilson L. J., Henner D. J., Turner, G. and Ballance D.J.: Sequence and centromere location of a transformation enhancing fragment *ans1* from *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids. Res.* 15 (1987) 9163-9175.
- Dewar, R., Katayama, C., Sypherd, P. S., and Cihlar R. L.: Dispersed repetitive DNA Sequence of *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* 162 (1985) 438-440.
- Dobinson, K. F., Harris, R. E. and Hamer, J. E.: *Grasshopper*, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 6 (1993) 114-126.
- Hamer, J. E., Farrall, L., Orbach, M. J., Valant, B. and Chumley, F. G.: Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a plant fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9981-9985.
- Harley J. L. and Smith, S. E.: *Mycorrhiza Symbiosis*. Academic Press, London, New York. 1993.

Hieter, P., Pridmore, D., Hegemann, J. H., Thomas, M., Davis, R. W., and Philippsen, P.: Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA.

Cell 42 (1985) 913-921.

Isogai T., Yoshida, M., Tanaka, M.: Transformation of *Acremonium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* using an antibiotic resistance marker. Agric. Biol. Chem. 51 (1987) 2321-2329.

Jaworski, A. J. and Horgen, P. A.: The ribosomal cistrons of the water mold *Achlya bisexualis*. Arch. Biochem. Biophys. 157 (1973) 260-267.

Lawrence, J. G., Ochman H., and Hartl, D. L.: The evolution of insertion sequences within Enteric bacteria. Genetics 131 (1992) 9-20.

Maruyama K., Hartl, D. L.: Evolution of the transposable element *mariner* in *Drosophila* species. Genetics 128 (1991) 319-329.

Morton, J. B.: Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro- and microevolutionary process. Mycotaxon 82 (1990) 493-515.

Pearson, W. R. and Lipman, D. J.: Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Sci. USA 85 (1988) 2444-2448.

Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., and Kerp, H.: Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 11841-11843.

Schweizer, E., Mackechnie, C. and Halvorson, H. O.: The redundancy of ribosomal and transfer RNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 40 (1969) 261-277.

Transkley, S. D. and Eran, P.: Organization and evolution of sequences in the plant nuclear genome p. 55-83. In L. D. Gottlieb and S. K. Jain (ed), Plant Evolutionary Biology. Chapman and Hall, London.

Walker, C. Systematics and taxonomy of the Glomales : a possible way forward. Agronomie 12 (1992) 887-897.

Wöstemeyer J. and Burmester, A.: Structural organization of the genome of the Zygomycete *Absidia glauca*: evidence for high repetitive DNA content. *Curr. Genet.* 10 (1986) 903-907.

Zézé, A., Dulieu, H. and Gianinazzi-Pearson V.: DNA cloning and screening of a partial genomic library from an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora castanea*. *Mycorrhiza* 4 (1994) 251-254.

Zézé, A., Dulieu, H. and Gianinazzi-Pearson, V. : Evidence of repeated DNA sequences in the arbuscular mycorrhizal fungi genome and use for specific identification of *Scutellospora castanea in planta*. Submitted to *Appl. and Environ. Microbiol.*

LEGENDS AND FIGURES

Fig.1. The pUC18 plasmid containing the *Mycdire* of *S. castanea* was hydrolysed with *EcoRI*, and electrophoresed in a 0.8% agarose gel. The *Mycdire* insert was isolated from the gel by the "squeeze-freeze" method (Tauf and Renz, 1983). Total DNA was extracted from spores of different genera of arbuscular mycorrhizal fungi (Zézé et al. 1994) and serially diluted two fold from 300 ng to 2 ng for *Glomus caledonium* Nicolson & Gerdemann (LPA12) (a) and from 600 ng to 4 ng for *Scutellospora castanea* Walker (BEG1) (b), *Gigaspora rosea* Nicolson & Schenck (BEG9) (c) and *Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe (BEG13) (d). The *Mycdire* sequence from *S. castanea* was serially diluted two fold from 2 ng to 0.008 ng. DNA was blotted onto a Bioprobe Biohylon Z⁺ membrane according to the manufacturer's procedure. The *Mycdire* sequence was digoxigenin-labeled according to the Boehringer Mannheim protocol and used as a probe. After overnight hybridization at 68°C, the filter was washed twice 5 min. at room temperature in 2XSSC/0.1%SDS and twice 15 min. in 0.1%SSC/0.1%SDS. The copy number in the *S. castanea* genome was determined by quantification of the hybridization signal using

image analysis (Alcatel-TITN, Image analysis system Grenoble, France) and the *Mycdire* sequence as reference.

Fig. 2. A) DNA from spores of *S. castanea* lane 2 (500ng) and lane 3 (1 μ g) was hydrolysed with *Eco*RI endonuclease, separated in a 0.8% agarose gel, transferred onto a Bioprobe Biohylon Z+ membrane and (B) hybridized with the digoxigenin-labeled *Mycdire* fragment overnight at 68°C. Lane 1, 1kb ladder (Gibco BRL).

Fig.3 Sequencing of the *Mycdire* DNA element was carried out using a Promega *fmol* sequencing kit with ³²P end-labeled primers. After mini-preparation using the alkali lysis followed by Quiagen (Quiagen Inc) purification, the insert cloned into the *Eco*RI site of pUC18 was used as template for sequencing reactions using pUC18 universal primers in both directions. Internal primers were chosen on both strands and used to complete the sequence of the *Mycdire* element. Sequence analysis was performed using the Genetics Computer Groups version 8.0. The symbols DA to DE and IR in italic marked above identify direct and inverted repeats respectively. The sequences underlined with arrows indicate the *S. cerevisiae* ARS ((A/T)TTTTAT(A/G)TTT(A/T)) variants identified. Primers Myc1 and Myc2 are indicated in bold. CDEI and CDEIII regions were identified using the program "Amplify" (Bill Engels, 1992). Identified CDEI regions are located at positions 724-731 and 874-881 and CDEIII at position 506-511.

Fig.4 A) A 50 μ l reaction mixture contained 10 μ M of each primer (Myc1 and Myc2), 1U of Taq polymerase (Appligene), 250 μ M deoxynucleotide triphosphates and 1.5 mM MgCl₂. 5 to 10 ng of total DNA from spores were used as templates. For the amplification reaction, the thermal cycling

parameters were an initial denaturation at 95°C for 2 min., annealing at 53°C for 55 sec. and elongation at 72°C for 1.5 min. followed by 30 times denaturation at 93°C for 55 sec., annealing at 52°C for 55 sec. and elongation at 72°C for 1.5 min.. After amplification with primers Myc1 and Myc2, the PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% Nusieve agarose gel made up in 1xTAE. After staining with ethidium bromide, the DNA was visualized under ultra violet light. Lane 1, *A. laevis*; lane 2 *Gig. rosea*; lane 3, *G. caledonium*; lane 4, *S. castanea*; lane 5, *S. pellucida*; lane 6, negative control; lane 7, 1kb ladder.

B) After denaturation in NaOH (0.4N), the PCR products were transferred onto a biohylon Z⁺ membrane using the TE 80 transvac vacuum blotting unit system (Hofer scientific instruments) and hybridized overnight at 68°C with the digoxigenin-labeled *Mycdire* sequence from *S. castanea* as in Fig. 1.

Fig.5 Comparison of 280 nucleotides on the 5' strand of *Gig. rosea*, *G. caledonium* and their corresponding region of the *Mycdire* sequence from *S. castanea*. After electrophoretic fractionation of different PCR products on 1.5% Nusieve (FMC Bioproducts) agarose gel, the band of the expected size using the primers Myc1 and Myc2 were excized from the gel and purified using the Promega "wizard kit". The fragment from each species was cloned into the pT7Blue vector according to the manufacturer (Novagen). The ligation was performed at 15°C overnight in the presence of 1U ligase. After transformation of *E. coli* (DH α 5) competent cells (Promega) with 3 μ l of ligated product, aliquots of 50-100 μ l were plated on ampicillin selection media containing IPTG and Xgal. White colonies were resuspended in 100 μ l of sterile water and 2 μ l were used in a PCR reaction with Myc1 and Myc2 primers, as described above. Positively amplified clones were checked by controlling insert sizes after electrophoresis on an 0.8% agarose gel. Mini-preparation of positive clones was performed by the alkali-lysis followed by

Qiagen mini column purification. Sequencing was then performed using the dideoxy chain terminating method. The sequences were compared with the EMBL database using FASTA (Pearson and Lipman, 1988). The alignment of sequences were performed using the CLUSTAL V multiple sequence alignment.

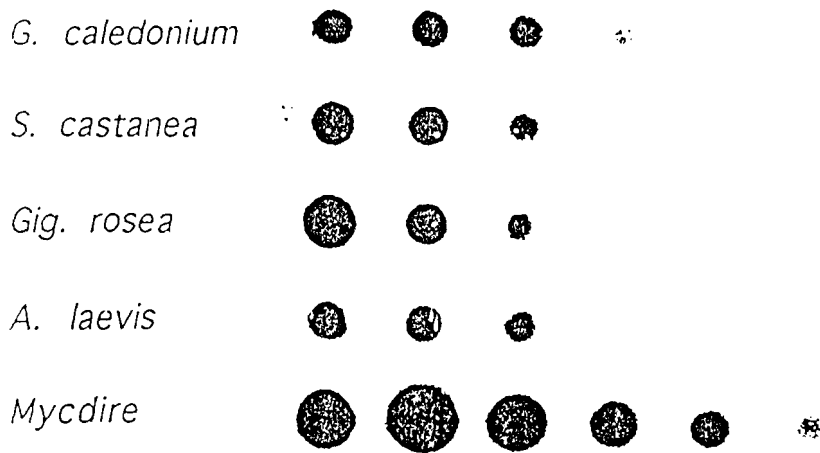


FIGURE 1

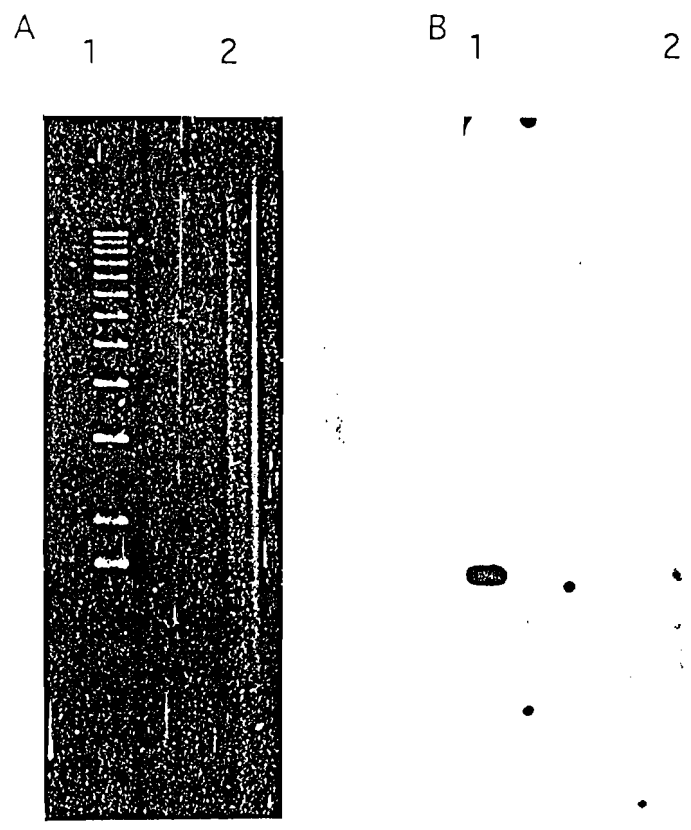


FIGURE 2

1 AATTTCGATAA ACAAATAAATT TATAATAAAA ACCAGTTTTC TTATCATAAA
MYC1
51 ATTTTAATTG GTGTTT TAGA AATTTAAAAG TTTTTCAAAA TATATATCTA
101 AATTAAGAAA GTTTAFAAAA AATTCCTTATT GCTTTAGTTT TATTTAATA
DA DA
151 AAAAACTAGA TATTAAATTGA GTAAAATTTT GTATTCTAAA AATTTCTTAA
IR
201 AGAAGAACAA GTAAAFATCT TAATAAAATT AGTTAAAAAA AATTAFAAAA
DB DC ← ← ← ← ← DB ← ← ← ← ←
251 AATAAAAACG TATTTTITTG ATATATTTTT TAACATCTAT TTTTCTGTAG
DC
301 TACTATATTT GG'GTATAAT ATATTTTTTAA GGATTTTATA ATTTATGGCC
→ → → → →
351 ATGGCGATGT ATCGCCACCT TCTGATCAAC CAATTAGAAT GCAGGATCAG
401 GTGTAATGTG AAATTGAAGC GATTATGATT TTTTTTCAA AATCGGTAT
451 AGCATGAAAT TTGCGCTATA AAACCATCTC TCATGCTCTA ACAAATAAAA
501 ATTCTTTTCG AAATTTTGGA TTAGAACCCTC TTTATTAAG CGCCCTAGCC
DD DD
551 TAACCCTAAC CTAACCTCA CCTAACCCT AAATTAAGGA APTAAATTGA
601 TTGTTTGGAT TTCATCTTAC ACCAGATCTT ATAGGGTGGG TTATACTGGA
651 TATGTGAAAA AATAAAAAT TCTATTTTTA ATACTATATT TATATAACTT
DE ← ← ← ← ← DE
701 ATATACACTA TATAACTATA TACATCACGT GACCGTGTTF ATACACGGTG
751 TGTACAAATA GAAATCTCT TAAAAGAATA ATATTAATTA TCTAATTTT
801 TTTTTATTAA AATTTATCTT TTTTTTAATA TATATAAAAT ATATAATTTT
→ → → → → ← ← ← ← ←
851 AACTTTTTTC CCTTTTTAA AAAATCACAT GATTTTTGTT ACTTCTTTA
901 ATAAAATTTT TTATTGAAT TTTAAAATCA ATCCTATTTA TATTAECTTC
951 ACCATATAGT ATTTTATAAA ATTCTATGCT GTAAAATAAA TATTAATTTT
1001 ATTAATAGTT TAAAACATTG CTATTCCTAT AACTTTTTTAT GAAGTTTTCA
MYC2
1051 CCCTTTTTTA TATTGATTCT TAGACTTAAC CATCTTTACC TGAATAATAA
1101 TAATACATAT TATTTTCATA TAATTATCGC TTCATTATAT AACCAATAAT
1151 TCTAACCAAT ATTCTAACCT TTCTTTTCAA ATTTCTCTGI TCTAANTGAG
1201 AACCAATTATT TGATTCTGTA ACCTCAACAC CATTACTATT ATTCTGTCA
1251 GCTTTGTAT GTCCCTGAT TTTGCTGTCT CTATCTTTTG ATAATCTACC
1301 CCGTTTTTTG ACGATATAG CATTCTCAGT AGAAAATTCC ACAATCAATC
IR
1351 TCTTTTTTTC ACCAAATATG CCTGGATTGT TGTTAAGATA TCTCACTGCT
140 GCTAATGCAT GAGAAIGTTG TGTGAATT

FIGURE 3

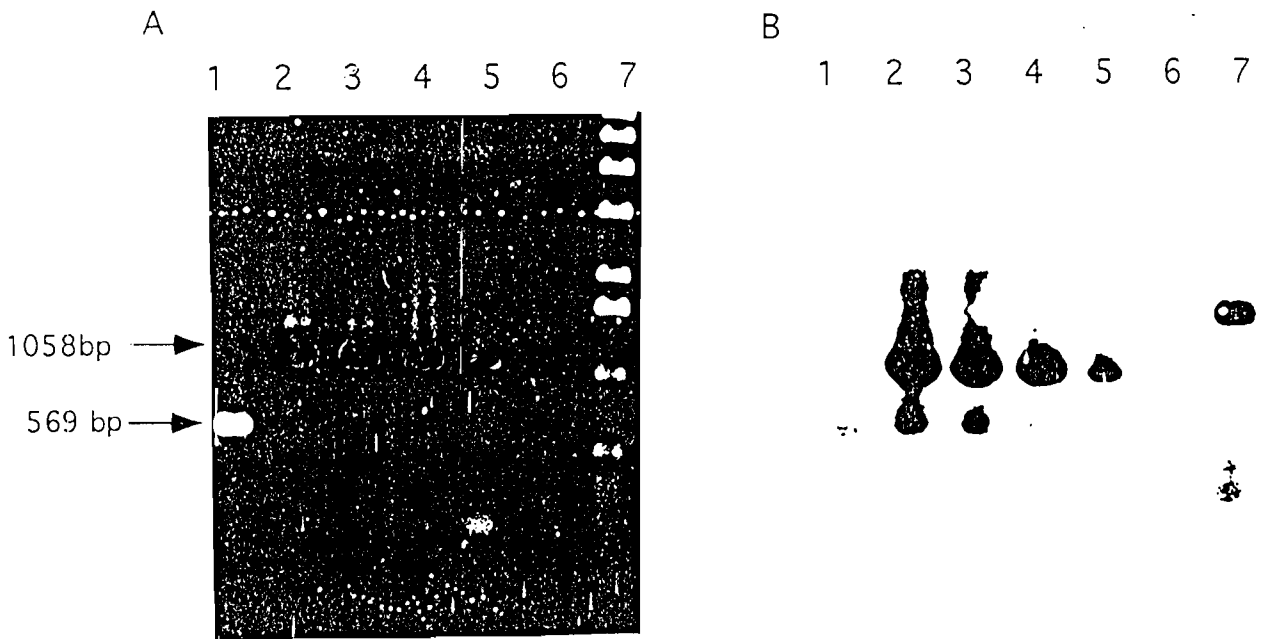


FIGURE 4

<i>G. rosea</i>	1	TTAAGTCTAAGAATCAATATAAAAAAGGGTGAAAACCTCATAAAAAGTTATAGGAATAGC
<i>Gl. cal</i>	1	TTAAGTCTAAGAATCAATATAAAAAAGGGTGAAAACCTCATAAAAAGTTATAGGAATAGC
<i>Mycdire</i>	1	TTAAGTCTAAGAATCAATATAAAAAAGGGTGAAAACCTCATAAAAAGTTATAGGAATAGC *****
<i>G. rosea</i>	60	AATGTTTTAAACTACTAATAAAATTAATATTTATTTTACAGTATAGAATTTTATAAAATA
<i>Gl. cal</i>	60	AATGTTTTAAACTACTAATAAAATTAATATTTATTTTACAGTATAGAATTTTATAAAATA
<i>Mycdire</i>	60	AATGTTTTAAACTACTAATAAAATTAATATTTATTTTACAGCATAGAATTTTATAAAATA *****
<i>G. rosea</i>	120	CTATATGGTGAAGTCAATATAAATAGGATTGATTTTAAAAATTCACATAAAAAA-TTTTAT
<i>Gl. cal</i>	120	CTATATGGTGAAGTCAATATAAATAGGATTGATTTTAAAAATTCACCTAAAAAA-TTTTAT
<i>Mycdire</i>	120	CTATATGGTGAAGTCAATATAAATAGGATTGATTTTAAAAATTCAAAATAAAAAAATTTTAT *****
<i>G. rosea</i>	180	TAAAAGAAGTAACAAAAATCATGTGATTTTTTAAAAAAGGGTAAAAAAGTTAAAATTATA
<i>Gl. cal</i>	180	TAAAAGAAGTAACGAAAAATCATGTGATTTTT-AAAAAAGGGTAAAAAAGTTAAAATATA
<i>Mycdire</i>	180	TAAAAGAAGTAACAAAAATCATGTGATTTTTTAAAAAAGGGTAAAAAAGTTAAAATTATA *****
<i>G. rosea</i>	240	TATTTTATATATATCAAAAAA-GATAAATTT
<i>Gl. cal</i>	240	TATTTAATATATATCAAAAAAAGATAAATTT
<i>Mycdire</i>	240	TATTTTATATATATCAAAAAAAGATAAAT-- *****

FIGURE 5

**CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

Les objectifs majeurs de ce travail ont été d'une part, la mise au point d'une approche moléculaire d'identification de champignons endomycorhizogènes *in planta* et d'autre part, la recherche d'un marqueur génomique pouvant permettre des études de variation. Les séquences répétées sont largement citées dans la littérature quant à leur utilisation comme outil de diagnostic et d'étude de variation et de phylogénie, notamment chez les végétaux (Schmidt *et al.* 1990 ; Santoni et Bervillé 1992).

Dans un premier temps, nous avons cloné l'ADN génomique d'un champignon endomycorhizogène, *S. castanea*. Mais cela a nécessité la mise au point d'une technique simple d'extraction d'ADN à partir de spores de champignons endomycorhizogènes à arbuscules. La mise au point de cette technique constituait une étape importante car il fallait obtenir de l'ADN hydrolysable pour atteindre notre premier objectif, l'établissement d'une banque génomique.

La technique d'extraction nous a en effet permis d'obtenir de l'ADN hydrolysable à partir de spores de champignons endomycorhizogènes à arbuscules. L'ADN de spores de l'espèce *S. castanea*, digéré par *EcoRI* a été cloné en vecteur puC18. Cela nous a permis d'obtenir environ 1000 clones recombinants.

Les spores des champignons endomycorhizogènes à arbuscules pouvant être contaminées par d'autres micro-organismes du sol, il nous est apparu nécessaire, avant l'initiation de toute étude, confirmer l'origine fongique de quelques inserts de la banque. Pour cela, après digestion par *EcoRI* des ADN totaux de spores de *S. castanea*, et de racines de poireau infectées par cette même espèce, une hybridation moléculaire utilisant la technique de Southern a été réalisée en se servant de quelques inserts de la banque. L'ADN de

poireau a été utilisé comme témoin. Nous avons alors confirmé que les inserts testés appartiennent effectivement au champignon.

Cette partie d'expérimentation nous a aussi montré que la détection du symbiote fongique peut se faire directement en Southern blot sur ADN total de racines infectées. Mais cette détection nécessite un effet endomycorhizogène très important de la part du champignon.

La deuxième grande ligne directrice de nos recherches a été la recherche de séquences répétées dans la banque génomique de *S. castanea*. Des hybridations utilisant l'ADN total de spores de *S. castanea* sur des clones de la banque nous ont permis de repérer des séquences répétées. Au total, 23 clones ont été testés. 14 ont donné des signaux dont 9 avec des signaux très intenses.

Nous nous sommes orientés vers ces 9 clones très répétés en vue de rechercher des séquences spécifiques ou non de *S. castanea*. Une fois repérés, ces deux types de séquences devaient nous permettre de développer d'une part des outils de détection spécifique de *S. castanea in planta* et d'autre part, la mise en évidence d'un fragment pouvant être présent chez les différentes espèces testées en vue d'une étude de variation intergénérique.

La technique d'hybridation en dot d'ADN totaux de différents champignons endomycorhizogènes à arbuscules utilisant ces neuf séquences nous ont permis de montrer l'existence de certaines d'entre elles, qui ont donné des réponses de type spécifique vis-à-vis de *S. castanea* et d'autres des réponses non spécifiques, reconnaissant tous les champignons testés. Deux séquences **SC1** et *Mycdire* donnant respectivement une réponse spécifique ou non ont été choisis pour la suite de notre travail. Avant leur utilisation en détection spécifique *in planta* (SC1) et en étude de variation intergénérique (*Mycdire*), une caractérisation de ces deux séquences

a été effectuée. La technique d'hybridation en Southern nous a permis de montrer que la séquence SC1 est organisée en tandem dans le génome de *S. castanea* alors que la séquence *Mycdire* est dispersée. Le séquençage complet a permis de mettre en évidence des séquences répétées directes dans la séquence SC1. Aucun cadre de lecture ouvert (ORF) significatif n'a été mis en évidence. De nombreux codon stop ont été mis en évidence et aucune protéine codée par cette séquence n'a été mise en évidence. Ce qui nous fait penser qu'elle constituerait une séquence de structure de l'hétérochromatine comme le sont certaines séquences répétées en tandem. La caractérisation nucléotidique de l'élément *Mycdire* nous a permis de mettre en évidence de courtes séquences répétées directes et inversées. Une séquence conférant une autonomie de replication (ARS) a été mise en évidence. Des éléments caractéristiques d'ADN centromérique de *S. cerevisiae* (CDE) ont été mis en évidence. Ces résultats indiquent que l'élément *Mycdire* pourrait être une séquence centromérique ayant une autonomie de replication et de transformation.

La détection spécifique de *S. castanea*, en utilisant la séquence SC1, s'est faite à plusieurs niveaux, par: (i) hybridation en Southern blot d'ADN de racines infectées par *S. castanea* d'ADN totaux obtenus à partir de spores et (ii) utilisation de la technique PCR, en utilisant des amorces obtenues de la séquence spécifique SC1. En utilisant les amorces mises au point SC1-1 et SC1-2, il nous a été possible de détecter le symbiote fongique *S. castanea* au cours de ses deux phases de vie, la phase sporale et la phase symbiotique.

L'hybridation en "dot blot" d'ADN totaux de différents champignons endomycorhizogènes nous a permis de montrer que la séquence *Mycdire* est présente dans les génomes des espèces testées. La

variation de cette séquence a été recherchée entre différents genres. Ne pouvant appliquer la technique RFLP sur ADN génomique, des amorces ont été mises au point à partir de cette séquence. Leur utilisation en PCR sur ADN génomique de différents genres de champignons endomycorhizogènes à arbuscules nous a permis d'amplifier une portion de cette séquence. En vue de savoir les relations qui pourraient exister entre l'élément *Mycdire* de *S. castanea* et les portions amplifiées chez les autres genres, une hybridation en Southern utilisant cette séquence comme sonde sur les produits amplifiés a été réalisée. Les réponses fortes obtenues avec les produits de *Gig. rosea*, *S. pellucida* et *G. caledonium*, indiquent que l'élément *Mycdire* est très conservé chez ces espèces, mais pas chez *A. laevis*, qui n'a donné qu'un signal faible. Le séquençage comparé des produits d'amplification nous a permis de confirmer ces résultats.

En conclusion, cette étude a permis de cloner, pour la première fois, l'ADN génomique d'un champignon endomycorhizogène à arbuscules et de mettre en évidence l'existence de séquences répétées dans son génome. La possibilité d'utiliser une séquence répétée comme outil moléculaire de détection des champignons endomycorhizogènes à arbuscules *in planta* a été démontrée.

La séquence *Mycdire* qui possède une séquence conférant une autonomie de replication pourrait être d'un intérêt particulier pour la mise au point d'un vecteur de transformation comme cela a été fait pour des champignons comme *A. nidulans* et *A. chrysogenum*. La présence de la séquence ARS fait de cet élément une séquence transposable. L'étude de variation entreprise a mis en évidence une conservation presque parfaite de cet élément entre des genres de

champignons endomycorhizogènes à arbuscules appartenant à des genres différents. Mais ces résultats ne sont surprenants car des résultats similaires ont déjà été obtenus avec d'autres organismes par d'autres auteurs (Lawrence *et al.* 1992 ; Maruyama *et al.* 1991).

Hamer *et al.* (1989) ont utilisé l'élément transposable conservé de *Magnaporthe grisea* pour différencier les pathogènes du riz des non pathogènes. L'élément *Mycdire* pourrait être utilisé comme marqueur du pouvoir endomycorhizogène des symbiotes fongiques. Par ailleurs, l'élément *Mycdire* pourrait être utilisé comme marqueur d'étude de la dynamique de populations naturelles de champignons endomycorhizogènes à arbuscules.

Au cours de cette étude, le clonage génomique, couplé aux techniques de PCR et de séquençage nous a permis de développer une approche moléculaire de détection d'un champignon endomycorhizogène à arbuscules *in planta*. Dans l'article suivant intitulé "**Biodiversity and characterization of arbuscular mycorrhizal fungi at the molecular level**", un aperçu général sur les différentes techniques moléculaires utilisables pour la caractérisation et l'étude de la biodiversité des champignons endomycorhizogènes à arbuscules est donné.

Biodiversity and characterization of arbuscular mycorrhizal fungi at the molecular level

D. van Tuinen, H. Dulieu, A. Zézé and V. Gianinazzi-Pearson

Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA-CNRS, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, INRA, BV 1540, F-21034 Dijon cédex, France

Introduction

Biodiversity within a biological group provides the basis for distinguishing members into genera and species according to taxonomic criteria, and between individuals within a species depending on more detailed differences at the genetic level. Diversity between species occurs after a genetic barrier has been created either by a geographic or genetic impedance of gene flow. Divergence can continue by nucleotide substitutions and by mutations in a broader sense (deletions, translocations, duplications), and resulting diversity can be evaluated at the molecular level and used as a phylogenetic character. Diversity at the subspecies level is a function of both mutation rates and gene flow between individuals.

Variability in arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can be appreciated at different levels (Giovannetti and Gianinazzi-Pearson, 1994), but up to date evaluation of their genetic diversity has relied mainly on morphological and structural features of asexual spores (see Rosendahl et al., this volume). Spore characteristics can, however, vary depending on environmental factors and on the physiological status of the fungus. Moreover, it is not possible to differentiate between AMF at the subspecies level, due to the general absence of sexual reproduction and to the recalcitrance of these fungi to grow in the absence of a host plant. For these different reasons, biochemical and molecular tools offer a valuable alternative to resolve taxonomic issues, and to address the question of biodiversity at different taxonomic levels.

Possible sources of genetic diversity in AMF

In the actual state of knowledge, AMF are considered to have originated between the Ordovician and Lower Devonian, 400-500 Myr ago, from a common ancestor in the Glomaceae (Berbee and Taylor, 1992; Pirozynski and Dalpé, 1989; Simon et al., 1993a). Divergence with evolution has led to what are presently recognized as three families, six genera and some 130 species in the order *Glomales* (Morton and Benny, 1990; Walker and Trappe, 1993). Apart from one report (Tommerup, 1988), sexual reproduction is not known for *Glomales* and there is presently no information concerning plasmogamy, karyogamy nor meiosis in these fungi. However, this does not necessarily mean that genetic flux between individuals of the same species is absent or limited, since sexuality or parasexuality could exist but be very simple and limited to the formation of a coenocytic mycelium containing nuclei of different origins. AMF have an aseptate, multinucleate mycelium which originates from an asexual, multinucleate spore. Saprophytic development of the fungus in soil is extremely limited, whereas it is abundant both within root tissues and soil once the symbiosis is established. Vegetative hyphal anastomosis occurs in saprophytic and symbiotic mycelium of AMF (Casana and Bonfante-Fasolo, 1982; Hepper and Mosse, 1975; Tommerup, 1988; unpublished observations) and provides opportunities for somatic reassortment of nuclei, also during growth in the root cortex. It has been suggested that hyphal incompatibility arising between isolates due to geographic distancing could be one mechanism contributing to localized genetic differences between AMF populations (Tommerup, 1988).

As no uninucleate stage is known for AMF, it would be reasonable to assume that hyphae harbour a heterogeneous population of nuclei which would be subject to random genetic drift. If there is no sexual or parasexual reproduction in AMF, variations due to spontaneous allelic mutations in the population of nuclei in any one species would tend to become homogenous during repeated divisions and sporulation. The latter could then be considered simply as a sort of 'packaging' of a sample of nuclei into a limited space. In this case, diversity would become important between species originating from different soils or geographical regions, since the species would have a clonal origin, with random divergence and no gene flow. If sexual or parasexual reproduction occurs, nucleotide substitution frequency will remain the same but exchange of genetic material will be possible, leading to an increasing diversity in genotypes within a same species or group.

In either situation, the theoretical models for origin and scattering of diversity can be based on those of population genetics (Spiess, 1989). In order to clone a unique genotype of the nuclear population, the genetic drift during sporulation has to be taken into consideration.

Estimates of numbers of nuclei in spores of different glomalean fungi give extremely high values of between one and several thousand per spore (see in Giovannetti and Gianinazzi-Pearson, 1994). However, it is not known whether nuclei within a spore originate from a small number which subsequently divides, or whether the entire population migrates directly from the vegetative mycelium. This is pertinent since the possibility of genetic drift would depend on the size of the sample of nuclei. Using a model genotype of one locus and two alleles, p and q respectively, the probability of the frequency of either p or q evolving towards 1 or 0 will be greater if the number of original nuclei in the spore is small. If there is such a random drift phenomenon with sporulation, several reinoculation cycles starting from a single spore will inevitably lead to cloning of one of the single nuclear types (p or q). If, in contrast, the population of nuclei in one spore represents the nuclear diversity of the mycelia from which they have all originated, repeated reinoculation with a single spore is likely to maintain diversity. The analysis of nucleotide sequence divergence through a number of generations starting from a single spore should make it possible to detect an eventual genetic drift and estimate its amplitude.

Estimations of DNA contents of nuclei indicate values from 0.25 pg for *Glomus versiforme* to 0.77 pg for *Gigaspora margarita* (Bianciotto and Bonfante, 1992), but there is no information as to whether the amplitude of such variation could be due to polyploidisation or to amplification of certain DNA sequences (repeated sequences) without changes in the overall information contained within the genome. Estimates of thermal reassociation curves of DNA that has been split and denatured could help to answer this question (Britten and Kohne, 1968).

The genetics of AMF may be relatively simple but it is difficult to analyse. The development of molecular approaches represents a powerful alternative towards understanding biodiversity in these unculturable organisms.

Analysis of diversity in AMF at the molecular level

The study of biodiversity requires tools which provide criteria for defining and resolving biological groups at different taxonomic levels, and different techniques can be applied to analyse genetic diversity depending on the level to be considered. In the case of anamorphic, mitotically reproducing fungi that do not undergo sexual reproduction, like AMF, molecular characters offer extremely interesting possibilities for addressing problems of diversity complexity and phylogenetic relationships.

Isozyme analysis Information on the genetic and nuclear condition of a fungal isolate can be obtained from isozyme analyses. Isozymes are proteins having the same enzymatic

activity but coded by different alleles at a same genetic locus (allozymes) or by separate genetic loci. This gives rise to a different tertiary structure of the protein and consequently different electrophoretic mobilities in gels (Micales et al., 1986). Allozyme bands migrate closely together whilst isozymes encoded by different loci occur in different regions of gels.

A number of isozyme systems has been studied in AMF and it has been suggested from analyses of banding patterns that these fungi may be haploid (Rosendahl and Sen, 1992). As the banding patterns represent direct gene products, they can reveal genetic differences between closely related fungi. Isozyme analysis has been applied particularly to members of the genus *Glomus* and, as can be seen in Figure 1, variations in allelic and locus isozyme banding patterns occur between species and isolates. It is interesting to observe an apparent genetic diversity between isolates recognised as *G. mosseae* and of different geographical origin, as previously reported by Hepper et al. (1988a). However, the amplitude of isozyme variability depends very much on the enzyme in question (fig.1), so that unambiguous genetic analyses based on isozyme expression in fact requires testing of a large number of different enzyme systems. The usefulness of isozyme pattern variability as a taxonomic criterion, in conjunction with morphological characters is discussed more fully elsewhere (Rosendahl and Sen, 1992; Rosendahl et al., this volume).

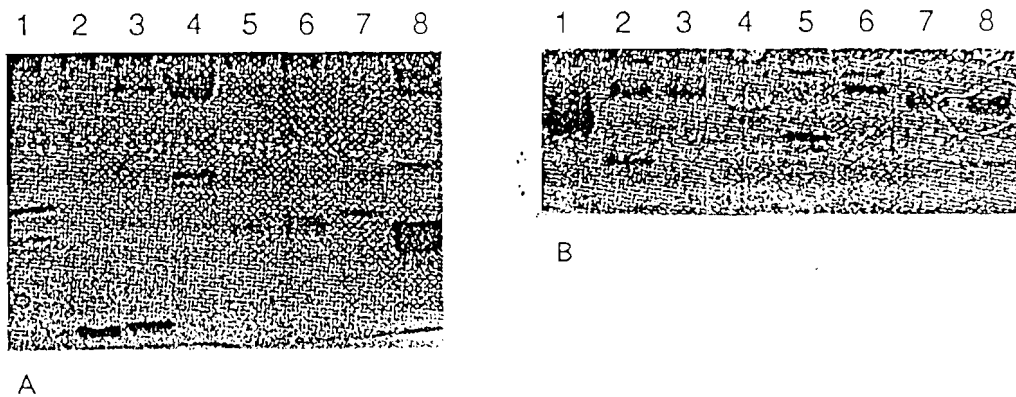


Figure 1. Esterase (A) and malate dehydrogenase (B) isozyme activities of different *Glomus* species. Extracts in lanes from 1) *G. intraradices*, 2) *G. fistulosum*, and 3) *G. claroideum* (DK, S. Rosendahl), 4) *G. geosporum* (UK, J. Dodd), 5) *G. coronatum* (I, M. Giovannetti), 6-7) *G. mosseae* (UK, Rothamsted), 8) *G. mosseae* (DK). Data kindly provided by S. Rosendahl.

Differential expression of alleles or loci at different stages of development or due to dissimilar nuclear conditions can give rise to variations in isozyme banding patterns. For example, Hepper et al. (1986) reported expression of a peptidase locus in symbiotic mycelium, but not in spores, of two *Glomus* species. Nevertheless, some diagnostic

isozyme bands are stable under variable growth conditions which makes them potentially useful tools for monitoring otherwise morphologically-indistinguishable AMF in combined infections (Hepper et al., 1986, 1988b; Rosendahl et al., 1989)

Nucleic acid analysis. Methods for analysing diversity at the nucleic acid level essentially screen for substitutions, insertions, deletions or rearrangement of groups of nucleotides. Initially, the molecular techniques used were based on electrophoretic profiles of genomic DNA digested by restriction enzymes and revealed by hybridization with cloned DNA fragments (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP). Research into diversity at the genomic level in AMF was, until recently, hampered by the problem of obtaining sufficient amounts of digestible DNA required for this type of analysis. However, this field of research is gaining interest with the development of new molecular techniques such as enzymatic amplification of DNA (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986) or the polymerase chain reaction (PCR), which have completely modified nucleic acid analyses and studies of biodiversity (Gibbons, 1991). With this new technology, it has been possible to have access to the DNA molecule and to the genetic code of organisms for which only minute amounts of DNA are available, and even from fossil species.

Random Amplified DNA Polymorphism: Due to the development of PCR it is now possible to analyse and characterize a species at the DNA level starting from a small amount of material such as a single arbuscular mycorrhizal fungal spore. The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method uses short arbitrary primers to amplify DNA fragments by PCR and analyse them electrophoretically (Williams et al., 1990). Depending on the primer used, the banding pattern of DNA fragments varies and can be species-specific. Wyss and Bonfante (1993) used the RAPD approach to detect polymorphism between AMF. They showed that similarity in banding profiles obtained after RAPD amplification was greatest in spores of a same isolate and least between different species. The advantage of this method is that it does not require preliminary knowledge of a DNA sequence, as the DNA fragments are randomly amplified. This method has nevertheless several serious drawbacks. Since the primers used are not specific, the DNA present in any contaminating organism can lead to amplification of a DNA fragment and so give unspecific banding patterns. This is of particular concern for arbuscular mycorrhizal research, as the fungi cannot generally be produced axenically so that bacterial contamination is difficult to avoid. Furthermore, this method cannot be directly used to identify the fungi within roots because of interference by plant DNA. Nevertheless, recent reports have shown this method to be more sensitive than the use of isozymes (Wang et al., 1993) and it can lead to the isolation of specific DNA

fragments for which corresponding primers can be generated. Such primers can then be used in combination with PCR-RFLP analysis of variability or, if species-specific, as probes to detect a given fungus.

PCR-RFLP One possible way to overcome unspecific amplification of DNA is to use the technique of PCR-RFLP. In this, a specific DNA fragment is digested, after PCR amplification, by several restriction enzymes. Variations in nucleotide sequences will lead to a different restriction pattern after electrophoresis of the digestion products, if the differences are located within the restriction site of an enzyme. Instead of randomly amplifying a fragment using one arbitrary primer as for RAPDs, two primers specifically flanking the DNA region of interest are used. This requires knowledge of the target DNA sequence, or at least of the primer regions, in order to synthesize corresponding primers. The choice of the target DNA will depend on the presence of conserved nucleotide sequences to allow binding of the primers, and of non-conserved sequences for the detection of variability between genomes. This feature is generally the property of multicopy genes.

One of the main targets for studies of variability and biodiversity in genomic studies are the ribosomal genes. These multicopy genes are made up of three coding regions of different sizes (18S, 5.8S and 25-28S), separated by two non-translated sequences (intra-genic transcribed spacers: ITS). The coding regions have been sufficiently conserved during evolution to enable the design of specific primers for the ribosomal gene. The ITS sequences, separating the 5.8S region from the 18S and 25-28S regions, are very variable and can be used to differentiate between closely related species (White et al., 1990). The ITS regions have been used to identify ectomycorrhizal fungi by PCR-RFLP (Gardes et al., 1991), and to design taxon-specific primers (Gardes and Bruns, 1993). The first gene of AMF to be sequenced was the complete region coding for 18S rRNA subunit from *Glomus intraradices* and *Gigaspora margarita* (Simon et al., 1992). By comparing the sequences obtained with known 18S rRNA sequences from other fungi, these authors were able to generate a primer specific for AMF. This primer simplified subsequent work as the problem of contamination by DNA from other organisms was eliminated. Using this primer in combination with universal primers, almost complete nucleotide sequences for the 18S gene were obtained for twelve different AMF (Simon et al., 1993a). Variability and similarity in these sequences were used to analyse phylogenetic relationships between the fungi, based on the fact that the rate of nucleotide substitution is correlated with divergence between species. The resulting phylogenetic tree was congruent with the classification of the AMF established on morphological diversity. It also concurs with the hypothesis that the ancestral form of AMF was *Glomus*-like, originating with the appearance of vascular land plants and

subsequently diversifying into the presently recognized different families of *Glomales*. More recently, the technique of Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) has been applied to AMF in combination with taxon-specific primers (Simon et al., 1993b). This technique not only opens the possibility of identifying AMF in root tissues but also of detecting more punctual variations in the genome, since it enables separation of DNA fragments which have undergone point mutations (Hayashi and Yandell, 1993).

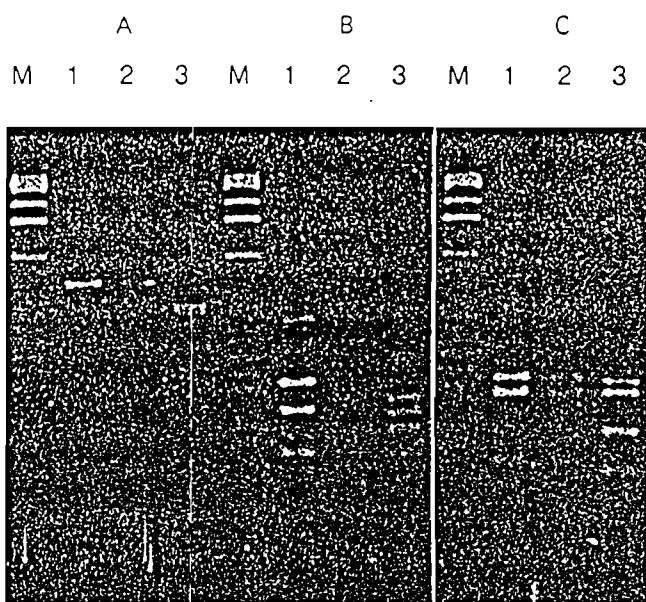


Figure 2. PCR-RFLP analyses of the 5' end of the large rRNA 28S gene subunit of (1) *Glomus mosseae* (F. C. Leyval), (2) *G. mosseae* (UK, Rotbarnsted) and (3) *G. vesiculiferum*. Fragments were obtained after no digestion (A) and after digestion by *Hinf* I (B) or *RSA* I (C). Molecular weight markers (1kb ladder) (M).

The large 25-28S rRNA subunit gene is also suitable for studies of variability and for phylogenetic comparisons. This gene possesses a common conserved core, which in eukaryotes is interspersed with 12 (labelled D1 to D12) divergent and more rapidly evolving domains (Hassouna et al., 1984; Michot and Bachellerie, 1984). The variability of several of these twelve domains has been used for phylogeny studies of *Fusarium* (Guadet et al., 1989). Starting from a single AMF spore, we have analysed by PCR-RFLP an amplified portion of the large subunit rRNA gene, covering the domains D1 and D2 located near the 5' end of the subunit, in two isolates of *Glomus mosseae* and in *G. vesiculiferum*. A variability in length of the amplified fragment was observed between *G. vesiculiferum* and *G. mosseae* (fig.2A). Digestion by different restriction enzymes gave banding patterns which clearly differentiated the two species (fig.2B and C), whereas the two *G. mosseae* isolates could be

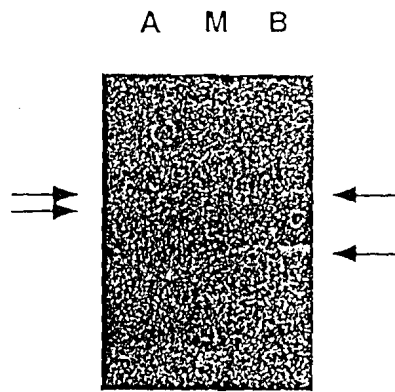


Figure 3. Two single spores of (A) *Glomus mosseae* (F, C. Leyval) and (B) *G. mosseae* (UK, Rothamsted) subjected to PCR-RFLP analyses as described in Figure 2.

distinguished after digestion of the amplified fragment by only one out of nine enzymes tested (fig.3). Although it is necessary to screen a large number of restriction enzymes, these preliminary results indicate that the 28S rRNA subunit gene may be sufficiently variable in AMF to permit differentiation between isolates of species defined on a morphological basis.

DNA cloning: Random cloning of genomic DNA fragments representing sequences of interest can be used to obtain probes to detect variability between genomes. Recent progress has been made in our laboratory in the extraction and cloning of genomic DNA from AMF using a relatively low number of spores (500-2000), and partial genomic libraries of two species have been established in plasmids or phages (Zézé et al., 1994; P. Franken unpublished results). Screening of a partial genomic library of *Scutellospora castanea* has indicated the existence of repeated DNA sequences in moderate or high copy number within the fungal genome. Species-specific and non-specific DNA cloned fragments have been identified and some sequenced with the aim of obtaining primers specific to *Scutellospora castanea* and primers with a broader specificity (unpublished results). The availability of taxon-specific primers will enable the detection of AMF directly in root extracts, whereas the non-specific primers will provide a means for detecting variability between AMF species by PCR-RFLP. For example, amplification products from different AMF obtained with a pair of 20mer primers designed from the sequence of a random clone from *S. castanea* and digested by the restriction enzyme MboI give a banding profile showing differences between *S. castanea* and the other species tested (fig.4). The use of partial genomic libraries to generate specific or non-specific primers or to analyse DNA sequence variability is not as

straight forward as the techniques described above as it requires preliminary cloning, screening and sequencing clones of interest, but it does offer the possibility of exploring different parts of the fungal genome.

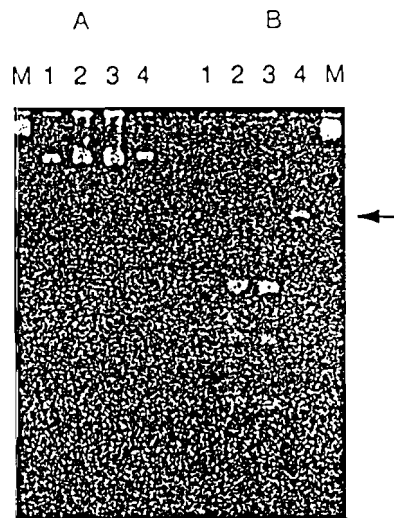


Figure 4. PCR-RFLP analyses after amplification with primers deduced from a clone of a partial genomic library of *Scutellospora castanea*. Fragments from the genomic DNA of *Acaulospora leavis* (1), *Gigaspora rosea* (2), *Glomus caledonium* (3) and *Scutellospora castanea* (4) were obtained after no digestion [A] or digestion with *Mbo*I after amplification [B]. Molecular weight marker (100 bp ladder) (M).

Conclusions

In studies of biodiversity, no one character can give an accurate picture of the amplitude of variation within a given population or taxon, and for AMF there exists no one criterion for taxonomy and phylogeny that is infallible. Different types of characters have to be analysed separately then compared to each other, and it is necessary to be aware that whilst molecular data may be congruent with morphological characters, contradictions may well arise (Keen, 1992). Furthermore, interpretations of diversity in molecular characters, and in particular DNA sequences, have to bear in mind that each analytical method is focused on a limited portion of the genome and that little is known about how different regions of the fungal genome evolve relative to each other, nor of the pressures that may be selectively affecting change. In conclusion, knowledge of the genetics and the genome complexity of AMF would greatly contribute to a fuller understanding of their biodiversity. In the absence of such information, molecular techniques provide the opportunity of better appreciating

genomic variability and of evaluating the magnitude of diversity within this group of obligate symbionts.

Acknowledgement

The authors are grateful to S. Rosendahl and C. Leyval for access to unpublished results.

References

- Berbee, M. and Taylor, J.W. (1992) Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Can. J. Bot.* 71: 1114-1127.
- Britten, R.J. and Kohne, D.E. (1968) Repeated sequences in DNA. *Science*. 161: 529-540.
- Bianciotto, V. and Bonfante, P. (1992) Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 96: 1071-1076.
- Casana, M. and Bonfante-Fasolo, P. (1982) life intercellulari ed arbuscoli di *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerd. et Trappe isolato con digestione enzimatica. *Allionia* 25: 17-25.
- Gardes, M., White, T.J., Fortin, J. A., Bruns, T.D. and Taylor, J.W. (1991) Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69: 180-190.
- Gardes, M. and Bruns, D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rust. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Gibbons, A. (1991) Systematics goes molecular. *Science* 251: 872-874.
- Giovannetti, M. and Gianinazzi-Pearson, V. (1994) Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 98 (in press).
- Guait, J., Julien, J., Lafay, J.F. and Brygoo, Y. (1989) Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *J. Mol. Evol.* 6: 227-242.
- Hassouna, N., Michot, B. and Bachellerie, J.P. (1984) The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implication for the process of size increase of the large rRNA in higher eukaryotes. *Nucleic Acid Res.* 12: 3563-3583.
- Hayashi, K. and Yandell, D.W. (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum. Mutat.* 2: 338-346.
- Hepner, C.M. and Mosse, B. (1975) Techniques used to study the interaction between *Endogone* and plant roots. In: Sanders, F.E., Mosse, B. and Tinker, P.B. (eds) *Endomycorrhizas*. Academic Press, London, pp 65-75.
- Hepner, C.M., Sen, R. and Maskall, C.S. (1986) Identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the roots of leek (*Allium porrum* L.) and maize (*Zea mays* L.) on the basis of enzyme mobility during polyacrylamide gel electrophoresis. *New Phytol.* 102: 529-539.
- Hepner, C.M., Sen, R., Azcon-Aguilar, C. and Grace, C. (1988a) Variation in certain isozymes amongst different geographical isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus monosporum* and *Glomus mosseae*. *Soil Biol. Bioch.* 20: 51-59.
- Hepner, C.M., Azcon-Aguilar, C., Rosendahl, S. and Sen, R. (1988b) Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.) *New Phytol.* 110: 207-215.
- Kotila, L. (1992) Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* 84: 139-153.
- Miccies, J.A., Bonde, M.R. and Peterson, G.L. (1986) The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* 27: 405-449.
- Michot, B. and Bachellerie, J.P. (1984) Secondary structure of mouse 28S rRNA and general models for the folding of the large RNA in eukaryotes. *Nucleic Acid Res.* 12: 4259-4279.
- Morton, J.B. and Benny, G.L. (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.
- Mullis, K., Faloona, F., Schaarf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Pirozynski, K.A. and Dalpé, Y. (1989) Geological history of the Glomaceae with the particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* 7: 1-36.

- Rosendahl, S., Sen, R., Hepper, C.M. and Azcon-Aguilar, C. (1989) Quantification of tree vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp) in the roots of leek (*Allium porrum*) on the basis of the activity of diagnostic enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis. *Soil Biol. Bioch.* 1: 519-522.
- Rosendahl, S. and Sen, R. (1992) Isozyme analysis of mycorrhizal fungi and their mycorrhiza. In: J R Norris, D J Read and A K Varma (eds) *Methods in Microbiology* 24. Academic Press, New York, pp 169-194.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B. and Horn, G.T. (1985) Enzymatic amplification of the beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Simon, L., Lévesque, R.C. and Lalonde, M. (1992) Rapid quantification by PCR of endomycorrhizal fungi colonizing roots. *PCR Methods and Application* 2: 76-80.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C. and Lalonde, M. (1993a) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Simon, L., Lévesque, R.C. and Lalonde, M. (1993b) Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4211-4215.
- Spiess, E.B. (1989). Random genic changes in populations of limited size. In: *Genes in populations. I.* Wiley & Sons, New York, pp 329-360.
- Tommerup, I.C. (1988) The vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Adv. Plant Path.* 6: 81-91.
- Walker, C. and Trappe, J.M. (1993) Names and Epithets in the *Glomales* and *Endogonales*. *Mycol. Res.* 97: 339-344.
- Wang, G., Whittam, T.S., Berg, M. and Berg, D.E. (1993) RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acid Res.* 21: 5930-5935.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tinguey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) *PCR Protocols, a guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, pp 315-322.
- Wyss, P. and Bonfante, P. (1993) Amplification of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycol. Res.* 97: 1351-1357.
- Z z , A., Dulieu, H. and Gianinazzi-Pearson, V. (1994) DNA cloning and screening of a partial genomic library from an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora castanea*. *Mycorrhiza* 4 (in press).

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, L. K. 1983 : Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Aust. J. Bot.* 30 485-499.

Bagyaraj, D. J. 1984: Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. dans VA mycorrhiza (eds) Powell C. L. et Bagyaraj D. J., C. R. C. Press Inc., Boca Raton, Florida, pp 131-153.

Baura, G., T. M. Szaro, et Bruns, T. D. 1992 : *Gastrospilus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei* molecular evidence. *Mycologia* 84 592-597.

Bécard, G. et Pfeffer, P. E. 1993 : Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* 194 62-68.

Bécard, G., et Fortin, J. A., 1988 : Early events of vesicular arbuscular mycorrhizal formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108 211-218

Benjamin, R. K. 1979: Zygomycetes and their spores. Dans *The Whole Fungus*. vol. 2 (ed.) B. Kendrick. National Museums of Canada, Ottawa, Canada pp. 573-622.

Benlismane, A. A., Dron, A., Hartmann, C. et Rode, A. 1986 : Small tandemly repeated sequences of higher plants likely originate from a tRNA gene ancestor. *Nucl. Acids Res.* 14 8111-8119.

Beverley, S. M. et Wilson, A. C. 1984 : Molecular evolution in *Drosophila* and the higher Diptera II. Time scale for fly evolution J. Mol. Evol. 21 1-13.

Bianciotto, V. et Bonfante, P. 1992 : Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. Mycol. Res. 96 1071-1076.

Biologie moléculaire du gène eds Watson, Hopkins, Roberts, Steitz et Weiner quatrième édition 1989

Broach, J. R., Li, Y. Y., Feldman, J., Jayaram, M., Abraham, J., Nasnyth, K. A. et Hicks, J. B. 1983 : Localization and sequence analysis of yeast origins of DNA replication. Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol. 47 1165-1173.

Brunns, T. D., White, T. J. et Taylor, J. W. 1991: Fungal molecular systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 22 525-564.

Burggraaff, A. J. P. et Beringer, J. E. 1989 : Absence of nuclear DNA synthesis in vesicular arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development New. Phytol 111 : 25-33.

Cameron, J. R., Loh, E. Y. et Davis, R. W. 1979 : Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. Cell 16 739-751.

Capy, P., Anxolabéhère, D. et Langin, T. 1994 : The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? Trends in Genetics 10 7-12.

Castle, A. J., Horgen, P. A. et Anderson, J. B. 1987 : Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. Appl. Environ. Microbiol. 53 816-822.

Charlesworth, B., Sniegowski, P. et Stefan, W. 1994: The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 371 215-220.

Cooke, G. C., Gemma, J. N. et Koske, R. E. 1987 : Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia 79 331-333.

Cullen, D., Wilson, L. J., Henner, D. J., Turner, G. et Ballance, D.J. 1987 : Sequence and centromere location of a transformation enhancing fragment *ans1* from *Aspergillus nidulans*. Nuc. Acid. Res. 15 9163-9175.

Cummings, B. et Wood, T. 1989 : A simple and efficient method for isolating genomic DNA from endomycorrhizal spores. Gene Anal Tech 6 89-92.

Dewar, R., Katayama, C., Sypherd, P. S., et Cihlar, R. L. 1985 : Dispersed repetitive DNA Sequence of *Mucor racemosus*. J. Bacteriol. 162 438-440.

Dobinson, K. F., Harris, R. E. et Hamer, J. E. 1993 : *Grasshopper*, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *MPMI* 6 114-126.

Dover, G. 1982 : Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299 111-116.

Dover, G. 1986 : Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends. Genet.* 2 159-165.

Dvorak, J. et Lassner, J. 1987 : Homogenisation of the tandemly repeated nucleotide sequence by distance-dependant nucleotide sequence conversion. *Genetics* 116 487-498.

Dvorak, J., McGuire, P. E. et Cassidy, B. 1988 : Apparent source of the A genomes of wheat inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* 30 680-689.

Flavell, R. 1982 : Sequence amplification, deletion and rearrangement : major sources of variation during species divergence In *Genome Evolution* (eds) Dover D. A. and Flavell R. B. pp 301-323.

Flavell, R. B., J., Rimpau, et Smith, D. B. 1977 : Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes. *Chromosoma* 63 205-222.

Flavell, R. B., M. O'Dell, et Smith, D. B. 1979 : Repeated sequence DNA comparison between *Triticum* and *Aegilops species* Heredity 42 309-322.

Förster, H. et Coffey, M. 1992 : Molecular characterization of *Phytophthora* isolates with non-papillate sporangia causing root rot of raspberry using mtDNA restriction fragment length polymorphisms Mycol. Res. 96 571-577.

Frothingham, R. B., Blitchington, D. H., Lee, D. H., Greene, R. C. et Wilson, K. H. 1992 : A PCR-based method of identifying species-specific repeated DNAs. Biofeedback 13 210-212.

Gardes, M. et Bruns, D. 1993 : ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts Molecular ecology 2 113-118.

Gardes, M., et Bruns, T. D. 1991: Rapid characterization of ectomycorrhizae using RFLP patterns of their PCR amplified-ITS. Mycol. Soc. Newsletter 41 14.

Gardes, M., Fortin, J. A., Mueller, G. M. et Kropp, B. R. 1990 : Restriction fragment length polymorphisms in the nuclear ribosomal DNA of four *Laccaria* spp : *L. bicolor*, *L. luccata*, *L. proxima*, and *L. amethystina*. Phytopathology 80 1312-1317.

Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D. et Taylor, J. W. 1991: Identification of indigenous and introduced symbiotic ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* **69** 180-190.

Genome evolution eds Dover G. et Flavell R. B. première édition 1982

Gerdemann, J. W. 1968: Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Ann. Rev. Phytopath.* **6** 342-349.

Gerdemann, J. W. et Trappe, J. M. 1974: Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Mem.* **5** 1-76.

Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V., et Trouvelot 1982 : Les mycorhizes. Partie intégrante de la plante : biologie et perspectives d'utilisation. Les colloques de l'INRA, p.397.

Gianinazzi, S. et Gianinazzi-Pearson, V. 1988 : Mycorrhizae : a plant's health insurance, *Chimicaoggi* **8** 56-58.

Gianinazzi, S., et Schüepp, H. 1994 : Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems

Gianinazzi-Pearson, V. 1982: Importance des mycorhizes dans la nutrition et la physiologie des plantes. Dans: les Colloques de l'INRA, p 51-59

Gianinazzi-Pearson, v. et Gianinazzi, S. 1984: Role of endomycorrhizal fungi in phosphorus cycling in the ecosystem. Dans : The fungal Community. Its organization and role in the Ecosystem, Mycology Series, (Eds. D. T. Wicklow, G.C. Carroll) 2 637-652.

Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B. et Gianinazzi, S. 1989. *In vitro* enhancement of spore germination and hyphal growth of a vesicular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7 243-255.

Goodier, J. L. et Davidson, W. S. 1994 : Characterization of a repetitive element detected by NheI in the genomes of *Salmo* species . *Genome* 37 639-645.

Grellet, F., Delcasso, D., Panabières, F. et Delseny, M. 1986 : Organization and evolution of a higher plant Aliphoid-like satellite DNA sequence . *J. Mol. Biol.* 187 495-507.

Hallden, C., Bryngelson, T., Säll, T., et Gustafsson, M. 1987 : Distribution and evolution of a tandemly repeated DNA sequence in the family Brassicaceae . *J Mol Evol* 25 318-323.

Hamer, J. E., Farrall, L., Orbach, M. J., Valant, B. et Chumley, F. G. 1989 : Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a plant fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 9981-9985.

Harley, J. L. et Smith, S. E. 1983. Mycorrhiza Symbiosis. Academic Press, London, New York.

Helentjaris, T., King, G., Slocum, M., Siedanstrang, C. et Wegman, S. 1985 : Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding . *Plant Mol. Biol.* 5 109-118.

Henrion, B., Chevalier, G. et Martin, F. 1994 : Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers . *Mycol. Res.* 98 37-43.

Henrion, B., Le Tacon, F., et Martin, F. 1992 : Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of RNA genes . *New Phytol.* 122 289-298.

Henson, J. M. 1989 : DNA probe for the identification of the take-all fungus *Gaeumannomyces graminis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 284-288.

Henson, J., Goins, T., Grey, D. E., Mathre, W. et Elliot, M. L. 1993 : Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces graminis* DNA in plants grown in artificially- and naturally-infected soil. *Phytopathology* 83 283-287.

Hieter, P., Pridmore, D., Hegemann, J. H., Thomas, M., Davis, R. W., et Philippsen, P. 1985 : Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA. *Cell* 42 913-921.

Hutchinson, J., Abbott, L. K., O'Dell, M. et Flavell, R. B. 1985 : A rapid screening technique for the detection of repeated DNA sequences in plant tissues. *Theor Appl Genet* **69** 329-333.

Isogai T., Yoshida, M., et Tanaka, M. 1987 : Transformation of *Acremonium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* using an antibiotic resistance marker. *Agric. Biol. Chem.* **51** 2321-2329.

Jaworski, A. J. et Horgen, P. A. 1973 : The ribosomal cistrons of the water mold *Achlya bisexualis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **157** 260-267.

Jeffreys, A. J., Wilson, V. et Lay Thein, S. 1985 : Hypervariable "minisatellite" region in human DNA . *Nature* **314** 67-73.

Johnson, R. D. et Lewis, B. G. 1990 : DNA polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **37** 417-424.

Junghans, H. et Metzlauff, M. 1988 : Genome specific, highly repeated sequences of *Hordeum vulgare*: cloning, sequencing and squash dot test. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 728-732.

Kimura, M., 1983: *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press.

Kingsman, A. J., Gimlich, R. L. et Clarke, L. 1981 : Sequence variation in dispersed repetitive sequences in *Saccharomyces cerevisiae*, Dans : Academic Press Inc. London Ltd. pp 619-632.

- Kuhrova, V., M. Bezdek, B. Vyskot, B. Koukalova, et Fajkus, J. :** 1991. Isolation and characterization of two middle repetitive DNA sequences of nuclear tobacco genome. *Theor. Appl. Genet.* 81 740-744.
- Lanfranco, L., Wyss, P., Marzachi, C., et Bonfante, P.,** 1995 : Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mossae*, an arbuscular mycorrhizal fungus *Molecular ecology* 4 61-68
- Langin, T., Cappy, P., et Daboussi, M. J.** 1995 The transposable element *impala*, a fungal member of the Tc1-mariner superfamily. *Mol Gen Genet* 246 19-28.
- Lawrence, J. G., Ochman, H., et Hartl, D. L.** 1992 : The evolution of insertion sequences within Enteric bacteria. *Genetics* 131 9-20.
- Lee, S. B. et Taylor, J. W.** 1992 : Phylogeny of five fungus-like prot ctistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* 9 686-699.
- Lewin, G.** 1987 : Organization of simple sequence DNA. Dans : *Genes III.* ed. Cell 3 821-392.
- Lohe, A. R., Hilliker, A. J. et Roberts, P. A.** 1993 : Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134 1149-1174.

- Maniatis, T., Fritsch, E. F. et Sambrook, J. 1982 : Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Mao, L. Zhai, W., Hu, H. et Zhu, L. 1994 : Cloning and characterization of a repetitive sequence in rye (*Secale secale*). Plant Science 100 51-57.
- Marmeisse, R., Débaud, J. C. et Casselton, L. A. 1992 : DNA probes for species and strain identification in the ectomycorrhizal fungus Hebeloma. Mycol. Res. 96 161-165.
- Martinez-Zappater, J. M. Estelle, M. A. et Somerville, C.R. 1986 : A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet 204 417-423.
- Maruyama K. et Hartl, D. L. 1991 : Evolution of the transposable element *mariner* in *Drosophila* species. Genetics 128 319-329.
- Metzlaff, M, W. Troebner, F. Baldauf, R. Schlegel. et Cullum, J. 1986. Wheat specific repetitive DNA sequences-construction and characterisation of four different genomic clones. Theor. Appl. Genet. 72 207-210.
- Morton, J. B. 1990 : Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro- and microevolutionary process. Mycotaxon 82 493-515.

Morton, J. B. et Benny, G. L. 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.

Morton, J. B. et Bentivenga, S. P. 1994 : Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups, p.47-59. In A. D. Robson, L. K. Abbott and N. Malajczuk (ed.), *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Mullis, K., Falooma, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., et Erlich, H. 1986 : Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51** 263-273.

Nemman, E. I. et Redell, P. 1987 : The distribution of mycorrhizas among families of vesicular plants. *New Phytol.* **106** 745-751.

O'hare K. et Rubin, G. M. 1983 : Structure of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* **34** 25-35.

Pearson, W. R. et Lipman, D. J. 1988: Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Sci. USA* **85** 2444-2448.

- Petes, T. D. 1980 : Unequal meiotic recombination within tandem arrays of yeast ribosomal DNA genes. *Cell* 19 765-774.
- Radman, M. 1991: Mismatch repair and the fidelity of genetic recombination. *Genome* 31 68-73.
- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., et Kerp, H. 1994: Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 11841-11843.
- Rogers, S. O., et Bendich, A. J 1985 : Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant. Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Rosendahl, S. : 1989 : Comparisons of spore-cluster forming *Glomus*-species (*Endogonaceae*) based on morphological characters and isozyme banding patterns. *O. Bot.* 100 215-223.
- Saiki, R. K., Schaarf, S., Faloona, F., Mullis, K. B. et Horn, G. T. 1985 : Enzymatic amplification of the beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 1350-1354.
- Santoni, S. et Bervillé, A. 1992 Two different satellite DNAs in *Beta vulgaris* L. : evolution, quantification and distribution in the genus . *Theor Appl Genet* 84 1009-1016.
- Saul, M. et Potrykus, I. 1984. Species-specific repetitive DNA used to identify interspecific somatic hybrids. *Plant. Cell. Rep.* 3 65-67.

Schesser, K., A. Luder, et Henson, J. 1991 : Use of Polymerase Chain Reaction to detect the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*, in infected wheat plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **57** 553-556.

Schmidt, T., Junghans, H. et Metzloff, M. 1990 : Construction of *Beta procumbens*-specific DNA probes and their application for the screening of *B. vulgaris* x *B. procumbens* (2n=19) addition lines. *Theor. Appl. genet.* **79** 177-181.

Schweizer, E., Mackechnie, C. et Halvorson, H. O. 1969 : The redundancy of ribosomal and transfer RNA genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **40** 261-277.

Schweizer, G., Ganai, M., Ninnemann, H. et Hemleben, V. 1988 : Species-specific DNA sequences for identification of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum acaule*. *Theor Appl Genet* **75** 679-684.

Simmons, G. 1992 : Horizontal transfer of hobo transposable elements within the *Drosophila melanogaster* complex : Evidence from DNA sequencing. *Mol. Biol. Evol.* **9** 1050-1060.

Simon, L., Bousquet, J. Lévesque, R. C. et Lalonde, M. 1993 : Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363** 67-69. (Letter).

Simon, L., Lalonde, L. et Bruns, T. 1992 : Specific amplification of 18S ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** 291-295.

Simon, L., Lévesque, R. C. et Lalonde, M. 1993 : Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** 4211-4215.

Smith, G. P. 1976 : Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* **191** 528-535.

Smith, S. E. et Gianinazzi-Pearson, V. 1988 : Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39** 221-244.

Southern, E. M. 1975 : Long range periodicities in mouse satellite DNA. *J. Mol. Biol.* **94** 51-70.

Steven, D., Transkley. et . Eran P 1988 : Organization and evolution of sequences in the plant nuclear genome p. 55-83. *In* L. D. Gottlieb and S. K. Jain (ed.), *Plant Evolutionary Biology*. Chapman and Hall, London.

Stradford, R., Shields, R., Goldsbrough, A. P. et Fleming, C. 1992 : Analysis of repetitive DNA sequences from potato cyst nematodes and their use as diagnostic probes. *Phytopathology* **82** 881-886.

Stubblefield, S. P., Taylor T. N., et Seymour, R. L. (1987): A possible endogonaceous fungus from the Triassic of Antarctica. *Mycologia* 79 905-906.

Sward, R. J. 1981 : The structure of of the spores of *Gigaspora margarita*. II. Changes accompanying germination. *New Phytol* 88 661-666.

Szostak, J. W. et Wu, R. 1980 : Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccaromyces cerevisiae* *Nature* 284 426-430.

Tauz, D. et Renz, M. 1983 : An optimized squeeze-freeze method for the recovery of DNA from agarose gels. *Anal. Biochem.* 132 14-19.

Tommerup, I. C. (1988): The vesicular-arbuscular mycorrhizas. dans *Advances in Plant Pathology* 6 81-91.

Tommerup, I. C. et Sivasithamparam, K. (1990): Zygosporos and asexual spores of *Gigaspora decipiens*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycol. Res.* 94 897-900.

Trappe, J. 1987: Phylogenetic and ecological aspects of mycotropy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. pp. 5-25. In: *Ecophysiology of VA Mycorrhizal plants*. G. Safir (Ed.) CRC Press. Boca Raton, FL.

Van Tuinen, D., Dulieu, H., Zézé, A. et Gianinazzi-Pearson, V. 1994 : Biodiversity and characterization of arbuscular mycorrhizafungi at the molecular level, p.13-23. In S. Gianinazzi and H. Schüepp

(ed.), Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. Birkhäuser Verlag, Boston.

Viera A, et Glenn, M. G. 1990 : DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycologia* 82 263-267.

Walker, C. 1992 : Systematics and taxonomy of the Glomales : a possible way forward. *Agronomie* 12 887-897.

Walker, C. 1995 : AM or VAM : what's in a word? In "Mycorrhiza Structure, function, molecular biology and biotechnology" pp 25-26.

Warcup, J. H. 1990: Taxonomy, culture and mycorrhizal associations of some zygosporic Endogonaceae. *Myc. Res.* 94 173-178.

Ward, E. et Gray, R. M. 1992 : Generation of a ribosomal DNA probe by PCR and its use in identification of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complexe *Plant Pathology* 41 730-736.

Weber, J. L. et May, P. E. 1989 : Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44 338-396.

White, T. J., T. Bruns S. Lee, et Taylor, J. 1990 : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315-322. In I. Michael, H. G. David, J. S. John, T. J. White (ed.) PCR protocol: a guide to methods and applications. Academic Press, New York.

Whitehouse, L. K. 1984 : Genetic recombination. Understanding the mechanisms.

Wöstemeyer J. et Burmester, A. 1986 : Structural organization of the genome of the Zygomycete *Absidia glauca*: evidence for high repetitive DNA content. *Curr. Genet.* 10 903-907.

Wyss, P. et Bonfante, P. 1993 : Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycol. Res.* 97 1357-1357.

Zézé A. Dulieu, H. et Gianinazzi-Pearson V. 1995 : Evidence for repeated DNA sequences in the genomes of arbuscular mycorrhizal fungal genome and use for specific detection of *Scutellospora castanea* in planta. Soumis à *Appl Environ Microbiol.*

Zézé, A., Dulieu, H. et Gianinazzi-Pearson, V. 1994. DNA cloning and screening of a partial genomic library from an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora castanea*. *Mycorrhiza* 4 251-254.

Zézi, A., Dulieu, H. van Tuinen, D. et Gianinazzi-Pearson V. *Mycodire*, a dispersed repetitive DNA element in genomes of arbuscular mycorrhizal fungi. Soumis à *Gene*.

SUMMARY

Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) are obligate symbionts which are very important for the development and the health of land plants. Knowledge of these fungi at the molecular level is still poor, due to the inability to culture them without the host plant. Development of an efficient technique for extracting DNA from spores of arbuscular mycorrhizal fungi has enabled the establishment of a partial genomic library of the species *Scutellospora castanea*. Molecular hybridization was used to screen this library for repeated DNA sequences. A sequence (SC1) specific to the *S. castanea* genome and another one present in genomes of four genera (*Mycdire*) were obtained by Southern and dot blot hybridization of a sample of repeated DNA sequences with total digoxigenin-labeled DNA from *S. castanea*, *Gigaspora rosea*, *Acaulospora laevis* and *Glomus caledonium*. The characterisation of SC1 showed that this sequence is organized in tandem array, possesses direct repeats and does not code for any known protein. It could therefore be an element of the heterochromatin structure. The *Mycdire* sequence was shown to be a dispersed repeated element which possesses autonomously replicating sequences (ARS) and centromeric DNA elements (CDE); this suggests that the *Mycdire* sequence could be a centromeric element with an autonomously replicating function.

In order to apply the PCR technique for specific detection of *S. castanea*, a set of primers was deduced from the SC1 sequence which specifically amplified DNA of *S. castanea* from spores or from infected roots.

Using a set of primers derived from the *Mycdire* sequence, it was possible to amplify DNA from spores of *A. laevis*, *Gl. caledonium*, *Gig. rosea*, *S. pellucida* and *S. castanea* and follow the variation of this sequence in the genomes of these species. After sequencing and comparison of PCR products from the *Mycdire* sequence, it was shown that this element is well conserved in the genomes of *Gl. caledonium*, *Gig. rosea*, *S. pellucida* and *S. castanea* while it has diverged in the genome of *A. laevis*.

Keys words : arbuscular mycorrhizal fungi, Glomales, repeated DNA sequences, characterisation, detection *in planta* by PCR, CDE, ARS, conserved centromeric sequence.

RESUME

Les champignons endomycorhizogènes à arbuscules (Glomales) sont des symbiontes obligatoires qui jouent un rôle très important pour le développement et la bioprotection de la plante. Les connaissances génétiques et moléculaires de ces champignons sont encore parcellaires, du fait de l'impossibilité de les cultiver sans la plante-hôte. La mise au point d'une technique d'extraction d'ADN de spores de champignons endomycorhizogènes à arbuscules a permis de réaliser un clonage partiel de l'ADN de l'espèce *Scutellospora castanea*. Le criblage de cette banque génomique a permis de mettre en évidence des séquences répétées par hybridation moléculaire. L'hybridation en dot ou en Southern de l'ADN de spores des espèces *S. castanea*, *Gigaspora rosea*, *Glomus caledonium* et *Acaulospora laevis* avec un échantillon de séquences répétées a permis de mettre en évidence une séquence (SC1), spécifique de *S. castanea* et une autre (*Mycdire*), présente chez les quatre espèces utilisées. Une caractérisation approfondie a été entreprise montrant que la séquence SC1 est organisée en tandem dans le génome de *S. castanea*, possède des séquences répétées directes. Des recherches de cadre de lecture ouverts n'ont donné aucun résultat significatif. Par ailleurs cette séquence possède plusieurs codons stop et ne code pour aucune protéine. La séquence SC1 pourrait donc être une séquence de structure hétérochromatique. La séquence *Mycdire*, dispersée dans le génome de *S. castanea* possède des séquences répétées directes et répétées inversées. Par ailleurs des séquences à **autonomie de replication (ARS)** conférant une autonomie de réplication et des appelés **CDE** (éléments centromériques) ont été mis en évidence dans cette séquence; ce qui ferait de cette séquence un élément centromérique à autonomie de réplication.

En vue de mettre au point des outils de détection spécifique par la technique PCR, des amorces ont été choisies de la séquence SC1 pour amplifier électivement l'ADN de spores de *S. castanea* et l'ADN de racines de poireau infectées par cette espèce.

Le choix d'un couple d'amorces de la séquence non spécifique *Mycdire* a permis de suivre la variation intergénérique de cette séquence après amplification de l'ADN de spores et analyse comparée des produits d'amplification. Cette analyse a permis de montrer que cette séquence est conservée sous forme allélique chez les espèces *G. rosea*, *G. caledonium*, *S. castanea* et *S. pellucida* alors qu'elle a subi une modification très importante chez l'espèce *A. laevis*.

Mots clés: Champignons endomycorhizogènes à arbuscules, Glomales, séquences répétées, caractérisation, détection *in planta* par PCR, CDE, ARS, séquence centromérique conservée, autonomie de replication