

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



CN1603000

P342

DIA

ECOLE DOCTORALE: SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE
L'ENVIRONNEMENT

FACULTE : SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2011 N° d'ordre : 003

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Présentée par : Nathalie DIAGNE

Titre : Diversité, fonctionnement et incidence sur la
symbiose actinorhizienne des champignons mycorhiziens
associés aux *Casuarina equisetifolia* dans leur zone
endémique et dans leur zone d'introduction

Soutenue le 16 Juin 2011 devant le jury composé de :

Président :	M. Diaga DIOUF	Maître de conférences - UCAD
Rapporteurs :	M. Kandiora NOBA M. Laurent LAPLAZE	Professeur titulaire, Directeur de thèse - UCAD Directeur de Recherches - IRD
Examineurs :	M. Djibril SANE M. Robin DUPONNOIS	Maître de conférences - UCAD Directeur de Recherches, Co-Directeur - IRD

ECOLE DOCTORALE: SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE
L'ENVIRONNEMENT
FACULTE : SCIENCES ET TECHNIQUES

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies Végétales et Microbiennes et Amélioration des Plantes

Résumé

Nom et prénom de la Candidate : DIAGNE Nathalie

Titre de la thèse: Diversité, fonctionnement et incidence sur la symbiose actinorhizienne des champignons mycorhiziens associés aux *Casuarinaceae* dans leur zone endémique et dans leur zone d'introduction

Date et lieu de soutenance : 16 Juin 2011 UCAD Dakar

Jury: Président:	M. Diaga DIOUF	Maître de conférences - UCAD
Rapporteurs :	M. Kandoura NOBA	Professeur titulaire, Directeur de thèse -UCAD
	M. Laurent LAPLAZE	Directeur de Recherches - IRD
Examineurs :	M. Djibril SANE	Maître de conférences - UCAD
	M. Robin DUPONNOIS	Directeur de Recherches, Co-Directeur - IRD

Résumé :

Depuis plusieurs décennies, des essences forestières à croissance rapide ont été introduites en Afrique de l'Ouest afin de réhabiliter des milieux dégradés, c'est le cas de *Casuarina equisetifolia*, un arbre australien introduit au Sénégal. Une technique utilisée pour améliorer la croissance des arbres plantés est l'inoculation avec des champignons mycorhiziens, généralement faite avec des souches présentes dans la zone d'introduction ou connues pour leur agressivité vis à vis de la plante hôte. Cependant, l'effet de l'inoculation est très variable selon la souche utilisée, et il n'existe aucune étude sur l'efficacité de l'inoculation avec des souches issues de la zone d'origine de l'arbre introduit. Or ces souches peuvent être potentiellement intéressantes car dans ce cas une co-évolution longue entre les deux partenaires symbiotiques peut aboutir à une optimisation de la symbiose. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'impact sur la croissance et sur la communauté bactérienne du sol des complexes microbiens (champignons arbusculaires et *Frankia*) associés à *C. equisetifolia* dans sa zone d'origine (Australie) et dans sa zone d'introduction (Sénégal) selon trois approches: (1) en étudiant la diversité des champignons endomycorhiziens et de la communauté microbienne associée aux *C. equisetifolia* dans leur zone d'origine et d'introduction, (2) en explorant l'impact de ces complexes symbiotiques sur la croissance de *C. equisetifolia* et la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes du sol (3) en caractérisant la fonctionnalité de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne chez *C. equisetifolia* inoculé avec un complexe microbien d'origine australienne ou sénégalaise. Nos résultats montrent que la composition de la communauté fongique et son impact sur la communauté bactérienne du sol est variable suivant les origines des sols, mais qu'une diversité accrue est observée pour les échantillons australiens. Nous avons aussi montré que l'inoculation a un effet positif sur la croissance de *C. equisetifolia* et modifie la diversité structurale et fonctionnelle de la communauté microbienne tellurique ; cet effet positif sur la croissance est plus marqué chez les plantes inoculées avec l'inoculum sénégalais, où le métabolisme est plus actif et le transport symbiotique de phosphate plus accru.

Mots clés : *Casuarina equisetifolia*, Mycorhizes à arbuscules, *Frankia*, Diversité, Communauté bactérienne

Dédicaces

A MES PARENTS

A MES FRERES ET SOEURS

A MES BELLES SOEURS

A MES NEVEUX ET NIECES

A TOUTES LES FAMILLES DIAGNE, DIOUF, NDOUR, SENE, FAYE, NDIAYE et MBOW

A tous ceux qui me sont chers

Remerciements

Je tiens à remercier Pr. Ibrahima NDOYE, responsable de la formation doctorale Sciences de la vie, de la Santé et de l'Environnement de m'avoir autorisé à s'inscrire à cette école. Mes sincères remerciements pour vos conseils récurrents.

Je remercie Pr. Samba N. SYLLA chef de département de Biologie Végétale pour avoir autorisé cette inscription en thèse et merci pour sa sympathie.

Je remercie Pr. Amadou BA responsable du Laboratoire Commun de Microbiologie (LCM, ISRA, UCAD) pour l'accueil sympathique au sein de ce laboratoire et pour ses précieuses remarques.

Je remercie également Dr. Serge HAMON responsable de l'UMR DIADE et Dr. Didier BOGUSZ pour l'accueil chaleureux au sein de l'équipe Rhizogenèse et particulièrement pour son enthousiasme.

Je tiens à remercier l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD, DSF) pour le financement de ces travaux de thèse.

Mes sincères remerciements à mes encadreurs Dr. Sergio SVISTOONOFF, Dr. Diegane DIOUF, Dr. Robin DUPONNOIS et Pr. Kandioura NOBA. Je témoigne de l'intérêt avec lequel, ils ont suivi cette thèse, de leur rigueur dans le travail bien fait, de leur disponibilité et particulièrement de leur sympathie.

J'exprime ma profonde gratitude au Dr. Diaga DIOUF, pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury et surtout je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour l'enthousiasme qu'il a toujours manifesté. Encore merci pour les discussions scientifiques.

Je remercie vivement Dr. Djibril SANE qui a accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements.

Je remercie Dr. Laurent LAPLAZE pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Merci pour les conseils très précieux qui m'ont aidé à perfectionner ce document.

Mes sincères remerciements au Dr. Aboubakry KANE pour sa participation à ce projet de thèse. Un grand merci pour les remarques et les conseils pertinents qui m'ont aidé à améliorer ce manuscrit.

Je tiens à remercier Dr. Claudine FRANCHE, pour ses conseils avisés et ses remarques très pertinentes qui m'ont aidé à perfectionner ce travail.

Je remercie également Pr. Tahir DIOP et Pr. Mamadou GUEYE pour leurs conseils et leurs encouragements.

Je remercie Florence AUGUY et Dr. Valérie HOCHER pour leur aide et conseils en biologie moléculaire.

Merci au Dr. Ezékiel BAUDOUIN pour son aide dans les expériences d'étude de la diversité génétique des microorganismes.

Je remercie Dr Jacques ESCOUTE, Dr. Jean Luc VERDEIL et Dr Marc LARTAUD pour leur aide en imagerie.

Un grand merci au Dr. Abdala G. DIEDHIOU pour sa disponibilité et pour les discussions scientifiques fructueuses.

Un grand merci à Jocelyne BONNEAU pour avoir accepté d'apporter des corrections à la rédaction de ce document.

Un grand merci à Christine OUATTARA qui a participé avec efficacité à ce projet de thèse.

Je ne saurais oublier, dans mes remerciements Cheikh NDIAYE pour l'assistance qu'il m'a apportée durant ces trois années de thèse.

Toute ma sympathie va également à tout le personnel du LCM : Jean BAKHOUM, Maimouna CISSOKHO, Mathieu FAYE, Paul TENDENG, Francis do REGO, Anna Marthe KONTE, Marie Claire DASYLVA, Tatiana WADE, Ramatoulaye MBAYE, Mansour THIAO, François KOUADJO, Saliou FALL, Omar TOURE, Ousseynou GUEYE.

Je remercie tous les membres de l'équipe Rhizogenèse Hassen, Antony, Alexandre, Daniel Khalid, Soazig, Mikael. Une pensée particulière aux filles Virginie, Amandine, Meriem, Stella, Alice, Anaïs, Faten et Joane pour les agréables moments passés ensemble.

Je remercie tous mes collègues du LCM Niokhor BAKHOUM, Amadou DIENG, Fatou NDOYE, Dioumacor FALL, Abdoulaye SOUMARE, Godar SENE, Fatou GUEYE, Arsène SANON, Mansour NGNING, Fatou DIOUF, Fatoumatou FALL, Marie BOURY, Mikaella EBENYE, Mamadou DIALLO, Ibou DIOP et Seynabou SENE pour leur aide et pour la bonne ambiance dans laquelle se sont déroulés ces travaux.

J'ai une pensée particulièrement à tous mes amis : Boubacar DIEDHIOU, Papa Makhtar DRAME, Augustin DIOUF, Souleymane DOUCOURE, Massila SENHOR, Jean Birame SARR, Cheikh Lô, Myriem DIATTA, Ambroise NGNING et Gaston DIATTA pour leur écoute, leur disponibilité et leurs conseils.

Un grand merci à mes frères, mes sœurs, mes belles sœurs pour leur soutien constant durant toutes mes études.

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, je leur témoigne toute ma reconnaissance.

Liste des abréviations

AA	Acide Aminé
ABA	Acide abcissique
ACP	Analyse de composante principale
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AFTD	Agroforestry tree database
AIA	Acide indole acétique
AJ	Acide jasmonique
ALP	Alcaline phosphatase
AMT	Transporteur d'ammonium « Amonium transporter »
APP	Appareil de pré-pénétration
ARISA	Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
ARN	Acide ribonucléique
AS	Acide salicylique
ATP	Adénine Triphosphate
BAM	Bactéries Auxiliaires de Mycorhization
BAP	« Buffered mineral medium Added of Phosphatidylcholine »
BGA	Between Group Analysis
BLAST-N	Local Alignment Search Tool
CaCMK	Calcium Calmoduline Kinase
CAS	Chrome Azurol S
CBE	chlorale black E
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CK	Cytokinine
CLSM	Confocal Laser Scanner Microscopy
cm	Centimètre
CMN	Common Mycorrhizal Network
COA	Complexe microbien d'origine australienne
COS	Complexe microbien d'origine sénégalaise
° C	Degré celsius
DAB	Diaminobenzidine
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMI	Does Not Make Infection
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
EO	Espèces actives d'oxygène
EDTA	Ethylènediamine tétracétate
EM	Champignons Ectomycorhiziens
ENOD	Noduline précoce «Early Nodulin »

ET	Ethylène
FDA	Fluoresceine diacétate
FITC	fluoro thioisocyanate
FM	Microscope à épifluorescence « Fluoresceine Microscopie »
g	Gramme
g.l-1	Gramme par litre
GA	Gibbérelline
GUS	β-glucuronidase
H (milieu)	Hoagland et Arnon
IARC	«International Agency for Research on Cancer»
IMAGO	Instrumentations Moyens Analytiques Observatoires en Géophysique et Océanographie
INRA	Institut Nationale de Recherches Agronomiques
INVAM	International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhiza
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactoside
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
IRGA	Analyseur à Gaz Infrarouge
ISRA	Institut Sénégalais de Recherches Agronomiques
kb	Kilobase
kcal	Kilocalorie
kg	Kilogramme
km	kilomètre
LAMA	Laboratoires des Moyens Analytiques
LIPO	Lipolytique
LRR	« Leucine Rich Repeats » Motifs Riches en Leucine
LSTM	Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
MA	Mycorhize à Arbuscules
μl	Microlitre
μm	Micromètre
mg	Miligramme
MHB	« Mycorrhizal Helper Bacteria »
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimole
MST	Transporteur de Carbone « Monosaccharide transporter »
NBT	Nitro Blue Tétrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFP	Nodule Factor Perception
NFR	Nodule Factor Receptor

nm	Nanomètre
NRC	National Research Council
NUP	Nucléporines
p/p	Poids/Poids
p/v	Poids/Volume
pb	Paire de base
PCIS	Potentiel Catabolique in situ
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH	Potentiel Hydrogène
PRONASEF	Programme National Forestières de Semences
PT	Transporteur de Phosphaste « Phosphate transporter »
qPCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative
qsp	Quantité Suffisante Proportionnelle
PVC	Poly-vinyl-chloride
RFLP	Polymorphisme de la Longueur des Fragments de Restriction
RLK	Récepteur de type kinase ("Receptor-Like Kinase")
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	Transcription reverse suivie d'une Réaction de Polymérisation en Chaîne
s	Seconde
SDH	Succinate Deshydrogénase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIR	Respiration Induite par un Susbtrat
TBE	Tris-borate EDTA
TCP	Tricalcique Phoshate
UCAD	Université Cheikh Anta Diop
UV	Ultraviolet
v/v	Volume par volume
WGA	Wheat Germ Agglutinin
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -Dgalactopyranoside

LISTE DES FIGURES

Partie 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1. La symbiose mycorhizienne : échange d'éléments nutritifs.....	5
Figure 2. Les principaux types d'associations symbiotiques entre des champignons du sol et des racines de végétaux.....	6
Figure 3. Relation phylogénétique entre les champignons de la famille des Gloméromycètes.....	10
Figure 4. Etude taxonomique de la famille des <i>Glomeromycota</i> basée sur l'analyse de la séquence de la sous unité de l'ARN ribosomique.....	11
Figure 5. Cycle d'un champignon mycorhizien arbusculaire	13
Figure 6. Plante parasite d'Orobanche : la germination des graines pouvant être stimulée par les strigolactones.....	13
Figure 7. Résumé schématique du processus de colonisation racinaire par les champignons MA.....	14
Figure 8. Colonisation par les champignons arbusculaires.....	15
Figure 9. Structure des Lipochitoooligosaccharides des facteurs Myc	16
Figure 10. Cascade de signalisation commune pour la symbiose mycorhizienne à vésicules et arbuscules et les symbioses nodulaires.....	17
Figure 11. Mécanisme de transport du phosphore, de l'azote et du carbone dans l'interface sol-champignon, champignon-plante	19
Figure 12. Dendrogramme des transporteurs de phosphate de la plante.....	21
Figure 13. Stimulateur biologique : Produit sous licence INRA.....	22
Figure 14. Représentation schématique de l'acquisition des principaux éléments par la symbiose mycorhizienne.....	25
Figure 15. Evolution des endosymbioses racinaires.....	34
Figure 16. Phylogénie des Légumineuses.....	36
Figure 17. Structure chimique d'un facteur Nod (avec quelques substitutions observées chez les différentes espèces de <i>rhizobium</i> indiquées en couleur).....	37
Figure 18. Processus d'infection intracellulaire et organogenèse d'un lobe nodulaire chez les plantes actinorhiziennes.....	41
Figure 19. Infections intra et inter-cellulaire chez les plantes actinorhiziennes.....	41
Figure 20. Arbre phylogénique représentant le clade des Rosid I chez les Angiospermes déduit des résultats des séquences rbcl.....	42

Partie 2 : ETUDE DE LA DIVERSITE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES ET DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE ASSOCIEE A CASUARINA EQUISETIFOLIA DANS LEUR ZONE D'ORIGINE ET DANS LEUR ZONE D'INTRODUCTION

Figure 21. Piégeage avec les complexes symbiotiques.....	61
Figure 22. Dispositif expérimental.....	63
Figure 23. Différents morphotypes de spores des champignons MA présents dans le sol des plantes après 6 mois de culture.....	64
Figure 24. Arbre phylogénique montrant la diversité des champignons MA dans les racines mycorhizées par les souches fongiques d'origine australienne (COA) ou d'origine sénégalaise (COS).....	68
Figure 25. Reconstitution in silico par le logiciel de l'Agilent Bioanalyser 2100 (électrophorèse capillaire) d'un gel bactéries-ARISA.....	69
Figure 26. Analyse de composante principale (ACP) des profils ARISA (Agilent 2100	

Bioanalyser).....	70
Figure 27. Profil DGGE de l'ADNr de la séquence 16S des bactéries dans le sol.....	71
Figure 28. Analyse de composante principale (ACP) des profils DGGE.....	72

Partie 3 : EFFET DE L'INOCULATION AVEC UN COMPLEXE MICROBIEN (FRANKIA ET CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES SUR LA CROISSANCE DE CASUARINA EQUISETIFOLIA ET SUR LA DIVERSITE FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES TELLURIQUES

Figure 29. Notation de l'infection mycorhizienne (classe 0 à classe 5).....	190
Figure 30. Impact de l'inoculation avec les complexes microbiens symbiotiques sur la croissance en hauteur de <i>C. equisetifolia</i> sur sol désinfecté et non désinfecté.....	84
Figure 31. Mesure de l'activité fluorescéine diacétate dans le sol non désinfecté sous des plantes de <i>C. equisetifolia</i> non inoculées, inoculées avec un complexe microbien symbiotique d'origine sénégalaise ou australienne après 6 mois de culture.....	92
Figure 32. Activités cataboliques de chaque sol en fonction des substrats testés.....	96
Figure 33. Représentation graphique de l'analyse inter-groupe (Between Group Analysis, BGA) montrant les résultats de respirométrie induite en fonction des traitements.....	98
Figure 34. Numération des souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents isolées dans le sol des différents traitements.....	99
Figure 35. Diversité génétique des <i>Pseudomonas</i> fluorescents dans le sol sous les plants de <i>C. equisetifolia</i>	100
Figure 36. Analyse de composante principale (ACP) des profils DGGE de la diversité des <i>Pseudomonas</i> fluorescents dans le sol sous les plants de <i>C. equisetifolia</i>	101
Figure 37. Amplification de l'ADN 16S par PCR de <i>Pseudomonas</i> sp. fluorescents digérés avec les enzymes de restriction <i>MspI</i> et <i>HaeIII</i>	102
Figure 38. Distribution des génotypes de <i>Pseudomonas</i> fluorescents dans le sol de chaque traitement.....	103
Figure 39. Arbre phylogénique montrant la diversité des <i>Pseudomonas</i> fluorescents dans le sol...	104

Partie 4 : CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE ET ACTINORHIZIENNE CHEZ C. EQUISETIFOLIA INOCULEE AVEC DES COMPLEXES MICROBIENS D'ORIGINE AUSTRALIENNE ET D'ORIGINE SENEGALAISE

Figure 40. Pépinière de <i>Casuarina equisetifolia</i>	117
Figure 41. Dispositif expérimental.....	118
Figure 42. Fréquence de mycorhization des plantes de <i>C. equisetifolia</i> inoculées avec le complexe microbien d'origine sénégalaise (COS) ou d'origine australienne (COA).....	128
Figure 43. Activité métabolique dans les racines de <i>Casuarina equisetifolia</i> inoculées avec le COA ou le COS.....	131
Figure 44. Expression de gènes marqueurs de la symbiose mycorhizienne (<i>CePT4</i>) et actinorhizienne (<i>Ce12</i> , <i>CeHB</i> , <i>nifH</i>) dans les racines de plantes inoculées avec le COA ou le COS.....	134

LISTE DES TABLEAUX

Partie 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1. Les différents types de mycorhizes	9
Tableau 2. Estimation de la taille de la famille des Légumineuses.....	35
Tableau 3. Distribution des plantes actinorhiziennes par continent	39

Partie 2 : ETUDE DE LA DIVERSITE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES ET DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE ASSOCIEE A CASUARINA EQUISETIFOLIA DANS LEUR ZONE D'ORIGINE ET DANS LEUR ZONE D'INTRODUCTION

Tableau 4. Caractéristiques Physico-chimiques du sol de Sagalkam.....	190
Tableau 5. Composition du milieu H.....	191
Tableau 6. Liste des amorces.....	192
Tableau 7. Caractéristiques des communautés de spores de champignons mycorhiziens dans les sols (désinfecté ou non) avec différents traitements après 6 mois de culture en serre.....	193
Tableau 8. Similarités entre les séquences de souches de champignons MA obtenues et quelles souches de champignons MA disponibles dans la banque de gènes. COA : complexe symbiotique d'origine australienne, COS : complexe symbiotique d'origine sénégalaise.....	66
Tableau 9. Composition du Bleu de Trypan.....	67

Partie 3 : EFFET DE L'INOCULATION AVEC UN COMPLEXE MICROBIEN (FRANKIA ET CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES SUR LA CROISSANCE DE CASUARINA EQUISETIFOLIA ET SUR LA DIVERSITE FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES TELLURIQUES

Tableau 9. Composition du Bleu de Trypan.....	193
Tableau 10. Composition du milieu King B	193
Tableau 11. Composés organiques utilisés pour établir les profils cataboliques des sols.....	194
Tableau 12. Composition du milieu TCP (Tricalcique Phosphate)	194
Tableau 13. Composition du milieu Lipolytique.....	194
Tableau 14. Composition du milieu CAS modifié (Chrome Azurol S).....	195
Tableau 15. Effet de l'inoculation avec les complexes microbiens sur la croissance de <i>C. equisetifolia</i> après 6 mois de culture en serre sur sol désinfecté.....	85
Tableau 16. Effet de l'inoculation avec les complexes microbiens sur la croissance de <i>C. equisetifolia</i> après 6 mois de culture en serre sur sol non désinfecté.....	86
Tableau 17. Effet de l'inoculation par les complexes microbiens et la désinfection du sol sur la croissance de <i>C. equisetifolia</i> après 6 mois de culture en serre.....	87
Tableau 18. Effet de l'inoculation par les complexes microbiens et la désinfection du sol sur le statut mycorhizien et la nutrition minérale (teneurs en N et P des parties aériennes) de <i>C. equisetifolia</i> après 6 mois de culture en serre.....	89
Tableau 19. Comparaison des teneurs totales en phosphore et en azote par plant dans chaque traitement.....	91
Tableau 20. Equitabilité catabolique et respiration induite moyenne ($\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ de sol h^{-1}).....	95

¹) pour chaque groupe de substrats (Carbohydrates, alcools, Acides aminés et acides carboxyliques) pour chaque traitement.....	
Tableau 21. Similarités entre les séquences de souches de <i>Pseudomonas fluorescents</i> obtenues et celles des souches <i>Pseudomonas fluorescents</i> disponibles dans la banque de gènes.....	105
Tableau 22. Pourcentages de souches actives et activités phosphatasiques, lypolitiques et production de sidérophores des souches de <i>Pseudomonas fluorescents</i> isolées des sols des différents traitements.....	107
Tableau 23. Corrélations entre les teneurs totales de Pi des plants, l'équitabilité catabolique et les valeurs de respirométrie induites par les acides carboxyliques dans chaque traitement.....	108
 Partie 4 : CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE ET ACTINORHIZIENNE CHEZ C. EQUISETIFOLIA INOCULEE AVEC DES COMPLEXES MICROBIENS D'ORIGINE AUSTRALIENNE ET D'ORIGINE SENEGALAISE	
Tableau 24. Composition du milieu BAP.....	196
Tableau 25. Coloration des racines mycorhizées avec l'Encre/ vinaigre.....	196
Tableau 26. Coloration des racines mycorhizées avec du Bleu d'aniline.....	197
Tableau 27. Coloration des racines mycorhizées avec du Wheat Germ Agglutinin (WGA).....	197
Tableau 28. Coloration des racines mycorhizées avec du Nitro Blue Tetrazolium (Succinate Dehydrogenase).....	198
Tableau 29. Coloration des racines mycorhizées avec du Fast Blue RR (Alcaline phosphatase).....	199
Tableau 30. Coloration des racines mycorhizées avec une solution de Diaminobenzidine (DAB).....	200
Tableau 31. Evaluation de la concentration de la solution d'Uvitex2B et du temps d'incubation pour la coloration des racines mycorhizées par les champignons endomycorhiziens.....	125

LISTE DES PLANCHES

Partie 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Planche 1. Aspects morphologiques de <i>Casuarina equisetifolia</i> (Filao).....	51
 Partie 4 : CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE ET ACTINORHIZIENNE CHEZ C. EQUISETIFOLIA INOCULEE AVEC DES COMPLEXES MICROBIENS D'ORIGINE AUSTRALIENNE ET D'ORIGINE SENEGALAISE	
Planche 2. Colorations mettant en évidence les structures fongiques des racines mycorhizées de <i>Casuarina equisetifolia</i>	124
Planche 3. Racines de Carotte, <i>C. equisetifolia</i> et <i>M. truncatula</i> (respectivement première, deuxième et troisième colonne) colonisées par <i>G. intraradices</i>	127
Planche 4. Colorations histochimiques mettant en évidence l'activité métabolique ou la sénescence de structures fongiques dans des racines de <i>C. equisetifolia</i>	130

Sommaire

1 ° INTRODUCTION GENERALE

1) Contexte de l'étude.....	1
2) Plan de la thèse.....	3

2° Chapitre 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Avant Propos.....	4
I) LES SYMBIOSES MYCORHIZIENNES.....	5
1) Les différents types de mycorhizes	5
1 1) Les ectomycorhizes (EM).....	6
1 2) Les endomycorhizes à arbuscules (MA)	7
1 2 1) Généralités sur les mycorhizes à arbuscules.....	7
1 2 2) Phylogénie des champignons MA et évolution des plantes.....	10
1 2 3) Mise en place de la symbiose endomycorhizienne.....	11
1 2 4) Fonctionnement de la symbiose endomycorhizienne	17
1 2 5) Rôles écologiques des champignons mycorhiziens.....	21
1 3) Les ectendomycorhizes.....	30
2) Interaction champignons endomycorhiziens et champignons ectomycorhiziens	30
3) Interactions entre les champignons mycorhiziens et la communauté bactérienne du sol	31
4) Histoire évolutive des symbioses mycorhiziennes	34
II) LES SYMBIOSES RACINAIRES FIXATRICES D'AZOTE	34
II 1) La symbiose rhizobienne.....	35
1) La plante hôte : la famille des Légumineuses	35
2) Le partenaire bactérien : les bactéries du genre rhizobia.....	36
2 1) Etablissement et fonctionnement de la symbiose rhizobienne	37
2 1 1) Processus d'infection et d'organogenèse nodulaire.....	37
2 2 2) La fixation d'azote chez la symbiose rhizobienne.....	38
II 2) La symbiose actinorhizienne.....	38
1) Les plantes actinorhiziennes.....	38
2) Le partenaire bactérien : <i>Frankia</i>	39
3) Etablissement et fonctionnement de la symbiose actinorhizienne.....	40
II 3) Histoire évolutive des symbioses fixatrices d'azote.....	41
II 4) Interaction champignons mycorhiziens et bactéries fixatrice d'azote.....	43
III) TECHNIQUES PERMETTANT D'ETUDIER LA FONCTIONNALITE DE LA SYMBIOSE ENDOMYCORHIZIENNE ET ACTINORHIZIENNE.....	43
1) Etude de la fonctionnalité de la symbiose endomycorhizienne.....	44
1 1) Evaluation de l'impact du champignon MA sur la plante hôte	44
1 2) Etude de la fonctionnalité de la symbiose endomycorhizienne en visualisant les structures formées..	44
1 3) Etude de la fonctionnalité de la symbiose endomycorhizienne à l'aide de marqueurs histochimiques.....	46
1 4) Etude de la fonctionnalité de la symbiose endomycorhizienne et actinorhizienne à l'aide de marqueurs moléculaires.....	48
IV) LES CASUARINACEA : EXEMPLE CASUARINA EQUISETIFOLIA.....	50
1) Taxonomie des Casuarinaceae.....	50
2) Caractéristiques botaniques	50
3) Distribution géographique des Casuarinaceae	52
4) Importances écologiques des Casuarinaceae.....	52
5) Importances économiques des Casuarinaceae.....	53
6) Résistance aux maladies.....	54
V) OBJECTIFS DE LA THESE.....	54
1) Etudier la diversité des champignons endomycorhiziens et leur influence sur la communauté	55

bactérienne associée aux <i>Casuarina equisetifolia</i> dans leur zone d'origine et dans leur zone d'introduction	
2) Explorer l'impact du complexe symbiotique d'origine sénégalaise ou australienne sur la croissance de <i>Casuarina equisetifolia</i> et sur la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes telluriques.....	55
3) Caractériser la fonctionnalité de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne chez <i>C. equisetifolia</i> inoculé avec un complexe de souches symbiotiques d'origine australienne ou sénégalaise.....	55
3° Chapitre 2 : ETUDE DE LA DIVERSITE DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES ET DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE ASSOCIEE AUX CASUARINA EUISETIFOLIA DANS LEUR ZONE D'ORIGINE ET DANS LEUR ZONE D'INTRODUCTION	
Avant Propos.....	57
I) INTRODUCTION.....	58
II) MATERIEL ET METHODES	59
1) Préparation du substrat de culture.....	59
2) Germination des graines de <i>C. equisetifolia</i>	59
3) Les souches fongiques : Prélèvement, multiplication, caractérisation morphologique, génétique et inoculation des plants	60
4) Dispositif expérimental.....	62
5) Impact de l'inoculation sur la diversité structurale des communautés bactériennes du sol.....	63
6) Analyses statistiques.....	63
III) RESULTATS.....	6 3
1) Diversité des champignons MA associés à <i>Casuarina equisetifolia</i> dans leur zone d'origine et dans leur zone d'introduction.....	63
1 1) Caractérisation morphologique des souches fongiques.....	64
1 2) Caractérisation génétique des souches fongiques.....	67
2) Détermination de la diversité génétique de la communauté bactérienne dans le sol.....	69
2 1) Détermination de la diversité génétique de la communauté bactérienne par ARISA.....	69
2 2) Détermination de la diversité génétique de la communauté bactérienne par DGGE.....	71
IV) DISCUSSION.....	73
1) Diversité structurale des champignons MA associés à <i>Casuarina equisetifolia</i> dans leur zone d'origine et dans leur zone d'introduction.....	73
1 1) Caractérisation morphologique des souches fongiques.....	73
1 2) Caractérisation génétique des souches fongiques.....	74
2) Détermination de la diversité génétique de la communauté bactérienne du sol.....	75
V) CONCLUSION.....	76
4° Chapitre 3 : EFFET DE L'INOCULATION AVEC UN COMPLEXE MICROBIEN (FRANKIA ET CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES SUR LA CROISSANCE DE CASUARINA EUISETIFOLIA ET SUR LA DIVERSITE FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES TELLURIQUES	
Avant Propos.....	77
I) INTRODUCTION.....	78
II) MATERIEL ET METHODES.....	79
1) Expérience en serre.....	79
2) Mesure de la croissance en hauteur, la biomasse aérienne, racinaire et la biomasse totale des plants de <i>Casuarina equisetifolia</i>	79
3) Evaluation de la mycorhization des plantes de <i>C. equisetifolia</i> inoculées avec les complexes symbiotiques par une technique de coloration classique.....	79

4) Dosage des teneurs en N et Pi des parties aériennes des plantes.....	80
5) Etude de la communauté de <i>Pseudomonas fluorescents</i> dans le sol.....	80
6) Analyse de la diversité génétique des souches de <i>Pseudomonas fluorescents</i>	80
7) Etude de la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes telluriques.....	81
7 1) Estimation de l'activité microbienne totale par la mesure de l'activité fluorescéine diacétate (FDA).....	81
7 2) Mesure de la diversité catabolique des communautés microbiennes du sol.....	82
7 3) Mesure de la diversité fonctionnelle des souches de <i>Pseudomonas fluorescents</i> sur trois milieux de culture : milieu TCP, CAS et Lipolytique.....	82
8) Analyses statistiques.....	83
III) RESULTATS.....	83
1) Effet de l'inoculation avec le complexe microbien symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur la croissance en hauteur des plants de <i>C. equisetifolia</i>	83
2) Impact de l'inoculation avec le complexe microbien symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur la biomasse des plantes de <i>C. equisetifolia</i> (biomasse aérienne, racinaire et totale).....	85
3) Effet de l'inoculation avec les complexes microbiens symbiotiques sur la fréquence, l'intensité de mycorhization et la nutrition minérale des plantes de <i>C. equisetifolia</i>	88
4) Effet de l'inoculation avec le complexe microbien symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur la diversité fonctionnelle de la microflore du sol non désinfecté.....	92
5) Relations entre la teneur en Pi des plants et la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols.....	108
IV) DISCUSSION.....	108
1) Impact de l'inoculation avec les complexes microbiens symbiotiques d'origine australienne ou sénégalaise sur la croissance de <i>C. equisetifolia</i>	109
2) Impact de l'inoculation microbienne sur la diversité fonctionnelle de la microflore native du sol.....	110
3) Effet de l'inoculation avec les complexes symbiotiques sur la nutrition phosphatée des plants de <i>C. equisetifolia</i>	112
V) CONCLUSION.....	113
5° Chapitre 4 : CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA SYMBIOSE MYCORHIZIENNE ET ACTINORHIZIENNE CHEZ CASUARINA EQUISETIFOLIA INOCULEE AVEC DES COMPLEXES MICROBIENS D'ORIGINE AUSTRALIENNE ET D'ORIGINE SENEGALAISE	
Avant Propos.....	114
I) INTRODUCTION.....	115
II) MATERIEL ET METHODES.....	116
1) Préparation du substrat de culture	116
2) Germination des graines de <i>C. equisetifolia</i>	117
3) Inoculation avec les souches fongiques.....	117
4) Inoculation avec les souches bactériennes.....	117
5) Dispositif expérimental.....	118
6) Détermination de la fréquence de mycorhization des plants de <i>C. equisetifolia</i> inoculés avec les complexes symbiotiques : Techniques de coloration des racines mycorhizées.....	119
7) Etude du métabolisme fongique dans les racines mycorhizées de <i>C. equisetifolia</i> inoculées avec les complexes microbiens COA et COS.....	120
8) Etude de l'expression de gènes marqueurs de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne chez <i>C. equisetifolia</i>	121
9) Analyses statistiques.....	123
III) RESULTATS.....	123
1) Caractérisation de la symbiose mycorhizienne chez <i>C. equisetifolia</i> au niveau histologique	123
1 1) Mise au point de techniques de coloration des structures fongiques.....	123
1 2) Mise au point de la coloration à l'Uvitex 2B.....	124
1 3) Utilisation de l'Uvitex2B pour colorer les structures fongiques à l'intérieur des racines.....	126

1 4) Utilisation de l'Uvitex2B pour quantifier la colonisation par le champignon mycorhizien.....	127
2) Caractérisation fonctionnelle de la symbiose mycorhizienne chez <i>C. equisetifolia</i> à l'aide de marqueurs histochimiques.....	128
2 1) Mise en évidence des structures fongiques métaboliquement actives en révélant l'activité succinate déshydrogénase (SDH).....	128
2 2) Mise en évidence des structures fongiques métaboliquement actives en révélant l'activité phosphatase alcaline (ALP).....	129
2 3) Mise en évidence des structures fongiques sénescents en utilisant la Diaminobenzidine (DAB).....	129
3) Etude de la fonctionnalité des symbioses mycorhizienne et actinorhizienne à l'aide de marqueurs moléculaires	132
3 1) Caractérisation fonctionnelle de la symbiose mycorhizienne à l'aide de marqueurs moléculaires : Analyse de l'expression de <i>CePT4</i> , marqueur du transport symbiotique de Pi.....	132
3 2) Caractérisation fonctionnelle de la symbiose actinorhizienne à l'aide de marqueurs moléculaires : étude de l'expression des gènes <i>Ce12</i> , <i>CeHB</i> et <i>nifH</i>	132
IV) DISCUSSION.....	134
V) CONCLUSION.....	138
 6° Chapitre 5: DISCUSSION GENERALE	
1) Diversité des souches fongiques dans les complexes symbiotiques COA et COS et impact de l'inoculation avec ces complexes sur la croissance de <i>C. equisetifolia</i> et sur la diversité structurale de la communauté bactérienne du sol.....	139
2) Impact de l'inoculation avec des complexes symbiotiques (champignons MA et bactéries) sur la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne associée.....	141
3) Les marqueurs histologiques, histochimiques et moléculaires : outils permettant de caractériser fonctionnellement la symbiose mycorhizienne et fixatrice d'azote chez <i>C. equisetifolia</i>	143
 7° CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	
1) Conclusion Générale	146
2) Perspectives	147
 8° REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
 9° ANNEXES	
	190

1 ° INTRODUCTION GENERALE

Introduction

1) Contexte de l'étude

Depuis plusieurs années, la déforestation est devenue un problème majeur dans les pays sahéliens. Elle est liée à la fois aux actions anthropiques (surexploitation des écosystèmes) (Matson *et al.*, 1997) et aux aléas naturels (aridité et salinité des terres). Cette déforestation provoque une disparition du couvert végétal et entraîne une érosion accrue des sols, une baisse de la disponibilité des nutriments minéraux pour les plantes, une réduction de l'infiltration de l'eau, une perte de l'activité bactérienne et parallèlement une baisse considérable de la quantité de matière organique (Lal, 1996; Garcia *et al.*, 1997; Remigi *et al.*, 2008). Ces phénomènes sont, entre autres, à l'origine de la baisse de la productivité des écosystèmes affectés. Pour améliorer la productivité de ces écosystèmes, le premier recours de la population est l'utilisation de fertilisants chimiques. Du fait de leur coût élevé, ces intrants chimiques ne sont accessibles qu'à une petite partie de la population paysanne. De plus, l'application de ces produits perturbe le sol et affecte les organismes présents, entraînant ainsi une perte de la biodiversité (Johansson *et al.*, 2004 ; Gosling *et al.*, 2006). Ces fertilisants chimiques sont de grands pollueurs de la nature car 80% des produits appliqués précipitent sous des formes insolubles (CaHPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 et AlPO_4). Ainsi, ils deviennent indisponibles pour les plantes (Lopez-Bucio *et al.*, 2000) et sont drainés par les eaux de pluies entraînant la contamination de la nappe phréatique. Au regard de ces problèmes, il s'avère important de proposer de nouvelles pratiques agricoles à la fois productives et respectueuses de l'environnement. Une des solutions, pour lutter contre ce fléau, est l'introduction d'espèces fixatrices d'azote. De nombreuses essences forestières à croissance rapide ont été introduites en Afrique de l'Ouest afin de réhabiliter des milieux dégradés. Duponnois *et al.* (2005b) ont montré que l'établissement de plantes appropriées améliore les propriétés biologiques et physiques du sol. Le choix de ces espèces forestières repose non seulement sur leurs caractéristiques intrinsèques à résister à certaines contraintes du milieu (résistance à la sécheresse, à la salinité, etc.) mais aussi sur leur capacité à fixer l'azote et à augmenter la disponibilité du phosphate (Pi). Dans ce contexte, la prise en compte de certains microorganismes du sol, comme les champignons mycorhiziens (Plenchette et Strullu, 1995) et les bactéries fixatrices d'azote, semble favorable. Ces communautés peuvent améliorer certaines propriétés des systèmes de culture, tel un recyclage plus efficace des

éléments minéraux, une meilleure absorption du Pi et de l'eau, une résistance face aux agents pathogènes conduisant à améliorer la productivité et la durabilité des systèmes de culture (Altieri, 1999 ; Hooper *et al.*, 2005). Plus récemment, il a été démontré que la performance de ces essences forestières à croissance rapide pouvait être largement augmentée en milieu tropical en leur associant des souches symbiotiques bactériennes (rhizobia ou *Frankia* ; Forrester *et al.*, 2006) ou fongiques performantes quant aux critères retenus (ex : production de biomasse ligneuse, résistance à la crise de transplantation, etc.) (Galiana *et al.*, 2002 ; Duponnois *et al.*, 2005b ; 2007).

Parmi ces essences forestières, figure l'espèce australienne *Casuarina equisetifolia* implantée au Sénégal vers les années 1920. Cette espèce forme une plantation longue de 180 km dans la zone des Niayes (Fall *et al.*, 2001). Cette plantation joue au Sénégal non seulement un rôle écologique important (stabilisation des dunes, brise-vent, protection des cultures maraîchères adjacentes, mise en valeur de terres salées et amélioration de la fertilité des terres via une production massive de matière organique), mais aussi un rôle économique considérable ; puisque la quasi totalité des légumes consommés par la mégapole dakaroise proviennent de cette zone. Les travaux de Shah *et al.*, (2006) et Hé *et al.*, (2008) ont montré l'importance de l'association entre les Casuarinacées et les champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules (MA) et/ou la souche bactérienne *CcI3* du genre *Frankia*. Ces études ont été confirmées par Elumalai et Raaman, (2009) qui ont démontré que les champignons mycorhiziens, de même que les bactéries du genre *Frankia*, stimulaient la croissance de *Casuarina* et que cet effet positif sur la croissance est plus significatif avec la double symbiose.

Par ailleurs, il a été observé qu'une co-évolution entre les 2 partenaires aboutit à une optimisation du fonctionnement de la symbiose (Brundrett, 2002). Le choix des symbiotes fongiques (en vue d'améliorer la production d'essences forestières) a rarement tenu compte de cette optimisation naturelle. Elle a été réalisée de manière empirique en utilisant des souches généralement présentes dans la zone d'introduction ou connues pour leur agressivité vis à vis de la plante hôte (ex : *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*) (Cornet et Diem, 1982 ; Duponnois *et al.*, 2001). Chez les espèces exotiques où cette démarche est encore plus rare, les peuplements naturels de symbiotes constituent donc un réservoir potentiel de souches performantes permettant d'améliorer la croissance de la plante (Callaway et Ridenour, 2004). Dans ce projet, nous nous proposons de comparer l'effet des souches fongiques associées à *C. equisetifolia*, dans sa zone d'endémisme et dans sa zone d'introduction afin de sélectionner

les souches les plus performantes pouvant être utilisées à grande échelle pour la régénération de la plantation de *Casuarina* de la zone des Niayes, et indirectement pour améliorer la fertilité de ces sols largement utilisés dans le maraîchage.

2) Plan de la thèse

Pour mieux cerner ce problème, cette étude a été abordée sous 3 angles :

1° d'abord, la détermination de la diversité des champignons endomycorhiziens et leur influence sur la communauté bactérienne associée aux *Casuarina equisetifolia* dans leur zone d'origine et dans leur zone d'introduction

2° ensuite l'étude de l'impact de l'inoculation avec les complexes microbiennes d'origine australienne ou sénégalaise sur la croissance de *Casuarina equisetifolia* et sur la diversité fonctionnelle de la communauté bactérienne tellurique,

3° enfin la détermination des bases physiologiques et moléculaires des performances des souches fongiques (MA) et bactériennes (*Frankia*) présentes dans les complexes symbiotiques.

2° CHAPITRE 1

Revue Bibliographique

Revue Bibliographique

Cette synthèse bibliographique a fait l'objet :

1) D'un article de synthèse en préparation pour soumission :

Nathalie Diagne, Diegane Diouf, Sergio Svistoonoff, Aboubacry Kane, Claudine Franche, Kandioura Noba, Didier Bogusz, and Robin Duponnois (2011). Establishment of *Casuarina* species in Africa: ecological roles and interaction with arbuscular and ectomycorrhizal symbionts.

Cette partie intitulée revue bibliographique donne l'état des connaissances sur les symbioses mycorhiziennes, fixatrices d'azote et sur la plante hôte de la famille des Casuarinaceae. Elle explique particulièrement le processus d'installation et de fonctionnement de la symbiose endomycorhizienne et fixatrice d'azote.

Dans cette revue bibliographique, certains marqueurs histologiques, histochimiques et moléculaires qui permettent de caractériser fonctionnellement ces symbioses sont exposés. D'une façon globale, cette synthèse bibliographique permet de mieux cerner le sujet traité pour atteindre les objectifs qui sont posés.

I) Les symbioses mycorhiziennes

Les symbioses mycorhiziennes sont des associations entre les racines de végétaux et un champignon (Strullu, 1991). Le terme **mycorhize** est issu du grec « mukês » qui signifie champignon et de « rhiza » qui signifie racine. Ce type d'association a été proposé pour la première fois par le phytopathologiste allemand Albert Bernhard Frank en 1885. Observées chez la majorité des plantes terrestres, les symbioses sont des unions ubiquistes et durables où s'effectuent des échanges réciproques entre les deux partenaires (Smith et Read, 1997, 2008). Généralement la plante-hôte fournit au champignon des composés carbonés dérivés de la photosynthèse (Harley et Smith, 1983) tandis qu'elle reçoit de la part du champignon des éléments minéraux prélevés du sol (Smith et Read, 2008 ; Figure 1). Cette association est très fortement impliquée dans le prélèvement de nutriments nécessaires pour la croissance des plantes (Smith et Read, 2008).

Environ 6000 espèces de champignons appartenant aux phylums des Glomérormycètes, des Ascomycètes et des Basidiomycètes sont mycorhiziens. Pour les espèces mycorhiziennes, le nombre décrit est en hausse avec l'avènement de la biologie moléculaire (Bonfante et Anca, 2009).

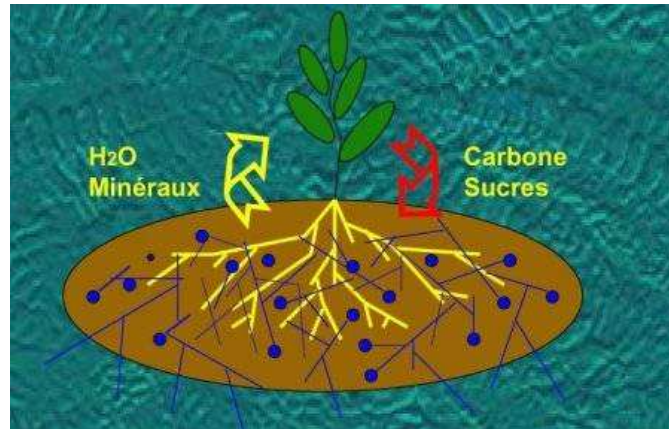


Figure 1. La symbiose mycorhizienne : échange d'éléments nutritifs. Le champignon fournit à la plante de l'eau et des éléments minéraux et il reçoit des composés carbonés de la plante.

(Source : <http://www4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/display-afficher.do?id=1236712919454&lang=fra>)

(Date de modification: 2009-03-10)

1) Les différents types de mycorhizes

Selon le fait que le champignon pénètre ou pas à l'intérieur des cellules racinaires, on peut distinguer d'une façon globale les différents types de mycorhizes suivants : les

endomycorhizes, les ectomycorhizes et les ectendomycorhizes (Bonfante et Anca, 2009, Figure 2).

Les endomycorhizes, se caractérisent par des structures fongiques qui se développent à l'intérieur des cellules végétales et ils comprennent les mycorhizes à arbuscules, les mycorhizes des Ericacées et celles des Orchidées.

Les ectomycorhizes sont caractérisées par des hyphes extracellulaires et l'infection d'une racine par le champignon ectomycorhizien entraîne des modifications importantes de sa morphologie.

Les ectendomycorhizes ont des formes intermédiaires entre les endomycorhizes et les ectomycorhizes.

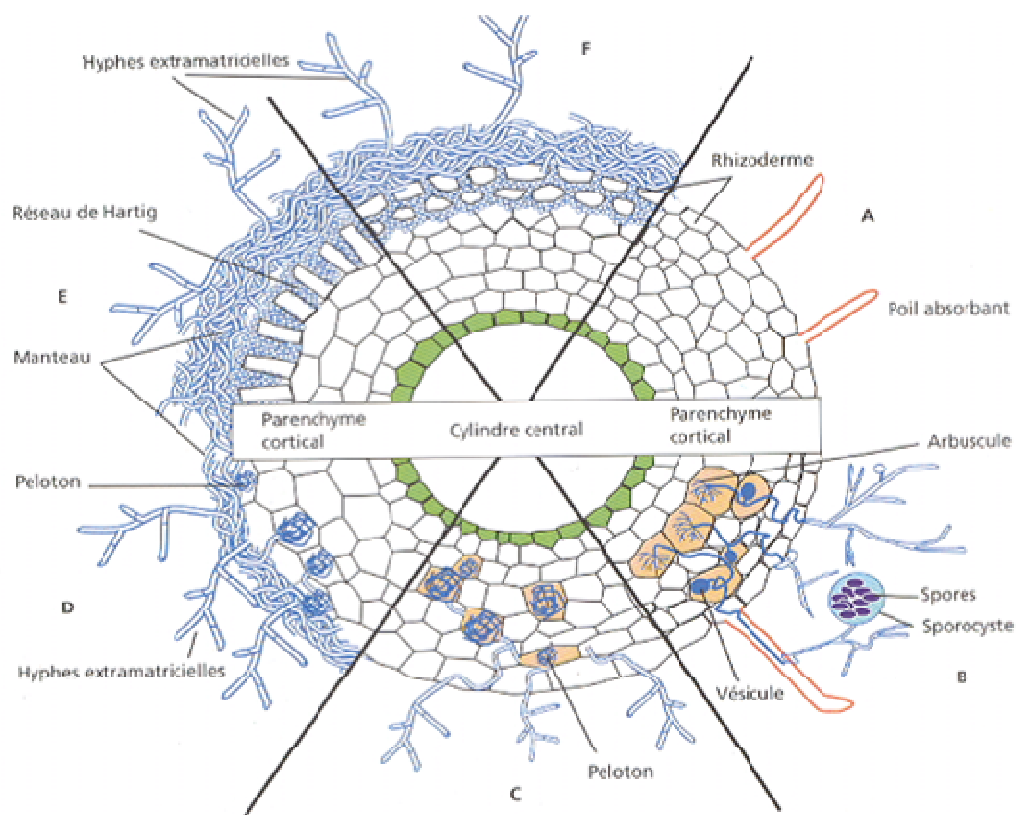


Figure 2. Les principaux types d'associations symbiotiques entre des champignons du sol et des racines de végétaux : (A) Coupe transversale d'une racine sans mycorhizes ; (B) endomycorhizes à vésicules et à arbuscules ; (C) endomycorhizes à pelotons ; (D) ectendomycorhizes ; (E) ectomycorhizes chez les Angiospermes ; (F) ectomycorhizes chez les Gymnospermes.

(Source : Duhoux et Nicole, 2004)

1 1) Les ectomycorhizes

Les ectomycorhizes se caractérisent par un développement du champignon à l'extérieur des racines et par la colonisation des espaces intercellulaires dans les couches externes de la racine. Ce type de mycorhize est observé chez des espèces ligneuses d'Angiospermes ou de Gymnospermes en association avec les champignons de la famille des Ascomycètes ou des Basidiomycètes (Tableau 1). Notons que ces champignons ectomycorhiziens (EM) (Ascomycètes ou Basidiomycètes) représentent plus de 5000 espèces.

Particulièrement présente chez les plantes ligneuses, la symbiose ectomycorhizienne concerne 3 à 5% des plantes à graines (Fortin *et al.*, 2008). Les essences forestières ectomycorhiziennes ont une large distribution et jouent un rôle écologique et économique considérable. La symbiose ectomycorhizienne est fréquente chez les essences des régions tempérées et boréales mais plus rare chez les arbres tropicaux (Newbery *et al.*, 1988 ; Béreau *et al.*, 1997 ; Smith et Read, 1997 ; Onguene et Kuyper, 2001). La spécificité de la relation champignon-plante est très large pour certaines espèces fongiques tandis que d'autres ont un spectre d'hôte très étroit (Thoen et Bâ, 1989).

Du point de vue anatomique, une ectomycorhize se compose de trois tissus. D'abord à l'extérieur se trouve un réseau d'hyphes fongiques qui s'étend à plusieurs centimètres de la racine. Ensuite autour de la racine se trouve un réseau dense de mycélium appelé manteau, caractéristique des racines ectomycorhizées. Souvent bien coloré, la présence de ce manteau entraîne l'absence de poils absorbants et permet de discerner facilement une racine ectomycorhizée à l'œil nu. Enfin à l'intérieur de la racine se trouve le réseau de Hartig, un tissu mixte où l'on observe à la fois des cellules végétales et des hyphes qui colonisent les espaces intercellulaires. Chez les Angiospermes, le réseau de Hartig est formé d'une seule couche de cellules, tandis que chez les Gymnospermes il est composé de deux couches (Figure 2). C'est surtout au niveau du réseau de Hartig que s'effectuent les échanges bidirectionnels entre les deux partenaires.

Beaucoup de champignons ectomycorhiziens forment des carpophores comestibles (bolets, truffes, amanites et agarics ; Bâ et Thoen, 1990)

1 2) Les endomycorhizes à arbuscules

1 2 1) Généralités sur les mycorhizes à arbuscules

Les endomycorhizes à arbuscules (MA) se caractérisent par un développement du champignon à l'intérieur de la racine et ne sont généralement pas visibles à l'œil nu. Parmi ces associations endomycorhiziennes, on peut trouver :

*** les mycorhizes à arbuscules** qui concernent des plantes très variées (Angiospermes,

Gymnospermes, Fougères, Lycopodes et Bryophytes). Le symbiote fongique qui s'associe à ces plantes appartient au phylum des Glomeromycota (Schüßler, 2002) ;

* **les mycorhizes des Ericacées** qui sont restreintes à l'ordre des Ericales, le champignon est généralement un Ascomycète. Les hyphes se développent dans les cellules épidermiques et forment des pelotons ;

* **les mycorhizes des Orchidées** résultent d'une association entre un champignon de la famille des Basidiomycètes avec les plantes de la famille des Orchidées. Les hyphes forment des amas dans les cellules corticales (Tableau 1).

La plupart des plantes supérieures ont l'aptitude à former, avec des champignons du Phylum des Glomeromycota (Schüßler, 2002), une association symbiotique nommée mycorhize arbusculaire (MA). Les champignons MA sont des symbiotes obligatoires et ne peuvent produire de spores et compléter leur cycle de vie que suite à la colonisation des racines d'une plante-hôte. Ces champignons MA représentent approximativement 200 espèces qui sont ubiquitaires des écosystèmes terrestres (Morton *et al.*, 1995; Smith et Read, 1997). Quelques familles de plantes présentant peu ou pas d'associations mycorhiziennes sont connues. Il s'agit des *Brassicaceae*, des *Amaranthaceae* et des *Juncaceae*. Généralement, ces plantes aposymbiotiques sont pourvues de nombreux poils racinaires pouvant remplacer les symbiotes fongiques.

Tableau 1. Les différents types de mycorhizes

	Arbusculaires	Ericoïdes	Orchidoïdes	Ectomycorhizes	Ectendomycorhizes	Arbutoïdes	Monotropoïdes
Champignon (Taxon)	Glomeromycètes	Ascomycètes	Basidiomycètes	Basidiomycètes Ascomycètes	Basidiomycètes Ascomycètes	Basidiomycètes	Basidiomycètes
Plante-hôte (Taxon)	Bryophytes Ptéridophytes Gymnospermes Angiospermes	Ericacées Bryophytes	Orchidées	Gymnospermes Angiospermes	Gymnospermes Angiospermes	Ericacées	Monotropacées

(Source : Smith et Read, 2008 modifié).

1 2 2) Phylogénie des champignons MA et évolution des plantes

Auparavant les champignons MA étaient classés dans l'ordre des Glomerales appartenant au phylum des Zygomycètes. Cependant cette classification a été bouleversée en 2001 par une étude basée sur la séquence de la sous-unité 18S de l'ADNr qui a montré que l'ancien Phylum des Zygomycètes était paraphylétique (Schüßler *et al.*, 2001). A la suite de cette étude un nouveau phylum fongique regroupant tous les champignons MA a été proposé, c'est le phylum des Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) (Figure 3).

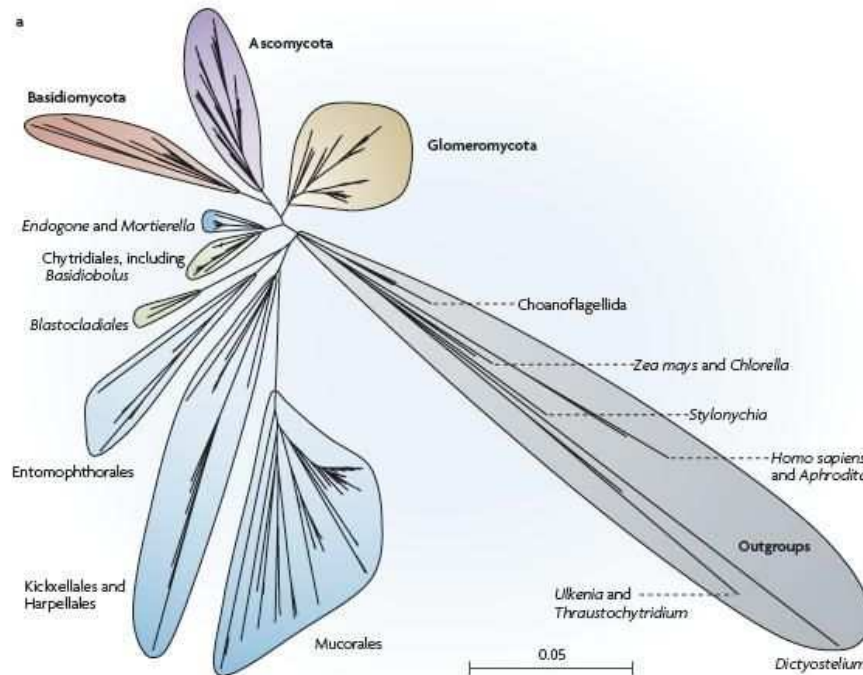


Figure 3. Relation phylogénétique entre les champignons de la famille des Gloméromycètes.
(Source : Pamiske, 2008).

Actuellement, la phylogénie des Glomeromycota est basée sur la séquence de l'ARN 18S ; d'autres gènes sont en cours de séquençage (Helgason *et al.*, 2003; Corradi *et al.*, 2004), mais il n'existe pas encore de phylogénie basée sur un séquençage multi-locus. Le phylum des Glomeromycota se compose d'une seule classe, celle des Glomeromycètes, divisée en quatre ordres : les Paraglomerales, les Archaeosporales, les Diversisporales et les Glomerales (Figure 4).

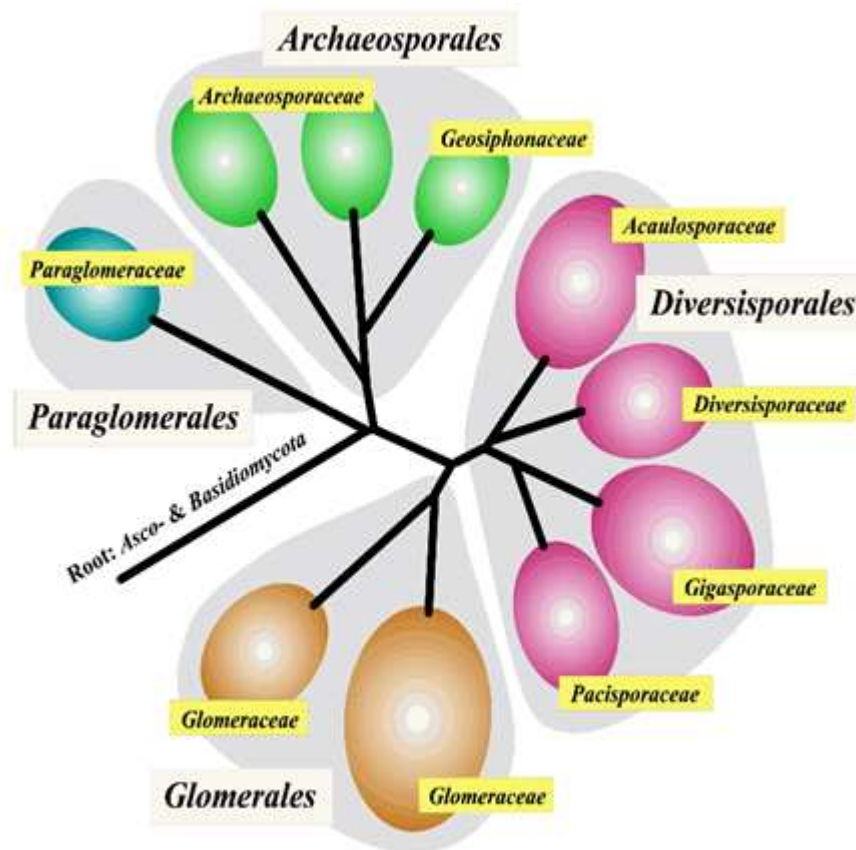


Figure 4. Etude taxonomique de la famille des Glomeromycètes basée sur l'analyse de la séquence de la sous unité de l'ARN ribosomique. (Schüßler *et al.*, 2001 dans Sharmah *et al.*, 2010)

1 2 3) Mise en place de la symbiose endomycorhizienne

L'établissement de la symbiose MA fait intervenir trois étapes : La phase asymbiotique, la phase présymbiotique et la phase symbiotique (Figure 5).

* La phase asymbiotique :

Au début du cycle, les spores des champignons MA se trouvent dans le sol dans un état de dormance qui peut durer plusieurs années. La germination de ces spores a lieu dans des conditions optimales de température et d'humidité et peut être favorisée par différents facteurs comme un accroissement de CO₂ ou la présence d'exsudats racinaires (Bécard *et al.*, 2004). La survie de l'hyphe en germination est assurée par les réserves lipidiques contenues dans la spore qui lui permettent de se développer pendant quelques jours (Smith et Read, 2008). Si la spore ne rencontre pas de racines de plantes hôtes, et avant un épuisement de ses réserves, on assiste à une dégénérescence des hyphes et au retour au stade de dormance (Figure 5a). Des germinations successives peuvent avoir lieu jusqu'à l'épuisement des réserves contenues dans la spore ; dans le cas d'espèces formant des spores de grande taille celles-ci peuvent germer

jusqu'à dix fois (Bécard *et al.*, 2004).

*** La phase présymbiotique :**

De profondes modifications métaboliques ont lieu si le champignon détecte la proximité d'une racine. Ces modifications se traduisent par : des changements du pH du cytosol et de la polarisation de la membrane, une augmentation de l'activité respiratoire, une expression de nombreux gènes fongiques et une activité accrue des mitochondries (Tamasloukht *et al.*, 2003 et Bécard *et al.*, 2004, Bücking *et al.*, 2008, Ramos *et al.*, 2008 ; Seddas, 2009). Les hyphes se développent alors extensivement ce qui augmente la chance de contact entre la plante hôte et le champignon. Cette extension des hyphes encore appelée « branching » devient de plus en plus importante jusqu' à un épuisement total des réserves de la spore ; de ce fait l'entrée dans la phase présymbiotique est irréversible (Figure 5b). Le champignon détecte la présence de la plante hôte grâce à des facteurs appelés « branching factors ». La nature des « branching factors » présents dans les exsudats racinaires a longtemps été recherchée. Finalement, Akiyama *et al.*, (2005) ont identifié qu'ils s'agissaient de strigolactones appartenant au groupe des sesquiterpènes. Produites par les racines de la plupart des plantes, les strigolactones stimulent la ramification des hyphes du champignon MA même à des concentrations très faibles de l'ordre de 10^{-13} M (Akiyama, 2005 ; Akiyama, 2006 ; Besserer *et al.*, 2006). La découverte de la nature chimique des « branching factors » fut une surprise, car les strigolactones étaient déjà connues auparavant en tant que stimulateurs de la germination de graines de plantes parasites comme le Striga et l'Orobanche (Figure 6) (Cook *et al.*, 1966). Les champignons MA tout comme les plantes parasites détectent donc la présence de racines par le biais de cette hormone végétale.

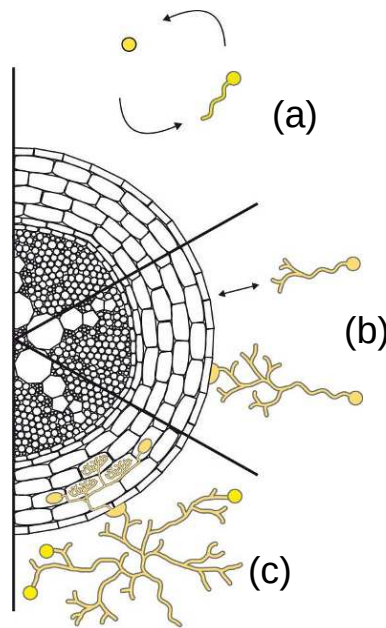


Figure 5. Cycle d'un champignon mycorhizien arbusculaire (a) **phase Asymbiotique**, germination de la spore suivie de la croissance de l'hyphe. Le cycle recommence si aucune racine hôte n'est détectée (b) **phase Presymbiotique** : la présence d'une racine à proximité induit une ramification extensive et irréversible des hyphes. (c) **phase Symbiotique**: après le contact avec la racine hôte, un hyphophodum se forme ; à cet endroit les hyphes pénètrent à travers des cellules de l'épiderme et colonisent ensuite le cortex où se développent des structures intracellulaires : les arbuscules. Alimenté par les carbohydrates fournis par la plante le champignon poursuit sa colonisation de la racine et forme des structures de réserves , les vésicules. A l'extérieur de la racine les hyphes se développent et forment de nouvelles spores (d'après Peret *et al.*, 2009).



Figure 6. Plante parasite d'Orobanche : la germination des graines pouvant être stimulée par les strigolactones.

Photo : Svistoonoff S.

* La phase symbiotique : Infection et colonisation :

Cette troisième étape correspond à la phase de symbiose, elle commence par le contact entre l'hyphe et la racine (Figure 5c, 7). L'hyphe mature développe au niveau de l'épiderme

de la racine un hyphopodium (Figure 7). La présence du champignon induit une profonde réorganisation au niveau de la cellule épidermique en contact avec celui-ci aboutissant à la formation d'un appareil de prépénétration (APP) (Genre *et al.*, 2005). Cette structure tubulaire qui traverse la cellule épidermique est formée par la plante. Au travers de celle-ci s'effectue l'entrée du champignon à l'intérieur de la racine. L'APP est formé 4 à 5 h après la formation de l'hyphopodium et reste visible environ 4 h pour disparaître après la pénétration du champignon. La formation de l'APP commence par un mouvement du noyau qui vient se coller contre l'hyphopodium. Par la suite les microtubules et le réticulum endoplasmique forment une invagination qui traverse la cellule. La formation de cette invagination est suivie par un mouvement du noyau. Lorsque cette sorte de tunnel est formé, l'hyphe du champignon croît à l'intérieur et peut ainsi traverser la cellule épidermique (Genre *et al.*, 2005). Une fois que l'hyphe ait traversé complètement les cellules épidermiques, naît un second APP dans les cellules corticales externes (Genre *et al.*, 2008). Des structures de type APP sont formées à chaque fois qu'un hyphe colonise une cellule corticale (Genre *et al.*, 2008).

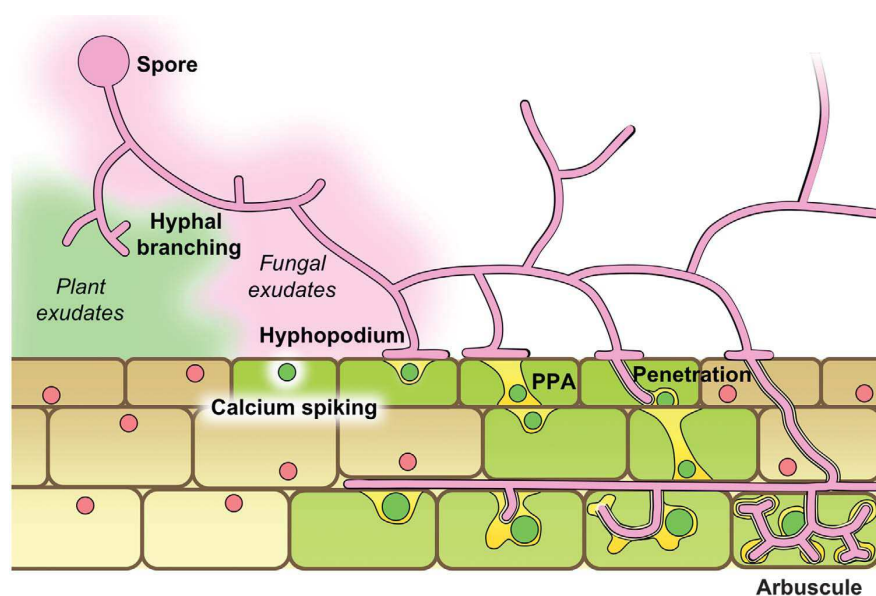


Figure 7. Résumé schématique du processus de colonisation racinaire par les champignons MA. (Bonfante et Genre, 2010).

Selon les espèces de plantes et de champignons deux types de colonisation au niveau cortical ont été décrits (Figure 8). La colonisation de type ARUM qui se caractérise par une progression des hyphes intercellulaires et la formation intracellulaire de structures ramifiées, les arbuscules (Figure 8a); la colonisation de type PARIS où les hyphes progressent de cellule en cellule de manière intracellulaire produisant généralement de petits arbuscules ou des

pelotons d'hyphes (Figure 8b). Dans ce dernier cas, les pelotons d'hyphes jouent le même rôle que les arbuscules et l'on considère que ce type d'association fait partie des MA même si aucun arbuscule n'est présent. Entre ces deux extrêmes il existe toute une série de morphologies intermédiaires (Dickson, 2004, Smith et Read, 2008). La nomination de ces modes de colonisation PARIS et ARUM vient respectivement de *Paris quadrifolia* et *Arum maculatum*, espèces à partir desquelles ils ont été décrits pour la première fois (Gallaud, 1905 ; Smith et Smith, 1997 ; Dickson *et al.*, 2007). Une des conséquences importantes de la morphologie des arbuscules et des pelotons d'hyphes est leur très grande surface par rapport au volume occupé ce qui leur permet de jouer un rôle majeur au niveau des échanges trophiques entre les deux partenaires symbiotiques (Smith et Read, 2008).

D'autres structures, les vésicules, peuvent se former suite à l'installation du champignon. Ces structures ne sont pas présentes chez la famille des *Gigasporaceae* tels que les genres *Gigaspora* et *Scutellospora* (Morton, 1990), c'est pourquoi il est recommandé de les appeler mycorrhizes arbusculaires et non « mycorrhizes à vésicules et arbuscules ». À l'instar des arbuscules, les vésicules peuvent se retrouver à l'intérieur des cellules corticales mais également intercalées entre celles-ci. De formes variables, elles renferment d'abondants lipides et de nombreux noyaux (Jabaji-Hare *et al.*, 1984; Smith et Read, 1997). Il est par conséquent reconnu que ces vésicules sont d'importants organes de réserves chez les champignons MA mais peuvent également endosser la fonction de propagules (Biermann et Linderman, 1983; Bonfante-Fasolo, 1984).

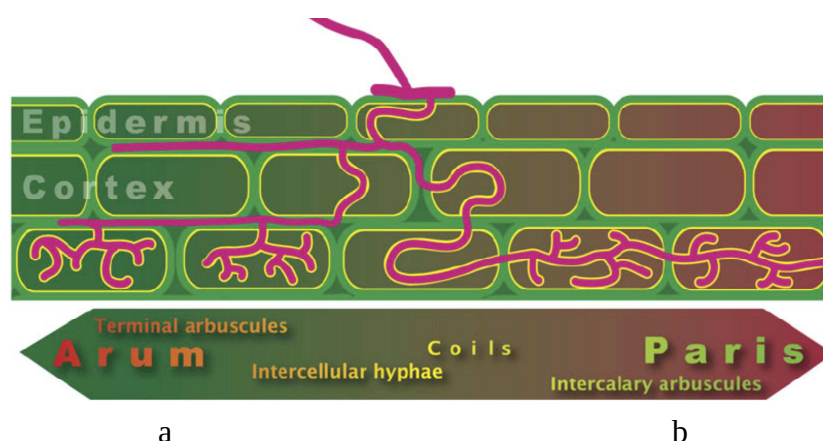


Figure 8. Colonisation par les champignons arbusculaires :

A gauche, des structures de type **ARUM** caractérisées par des hyphes intercellulaires bifurquants à l'intérieur des cellules pour former des arbuscules ; A droite, des structures de type **PARIS** avec des hyphes intracellulaires et des arbuscules terminaux. Toutefois, il existe des structures intermédiaires dont la présence dépend des combinaisons plantes/champignons. Genre, (2005).

La colonisation des racines de l'hôte par le champignon implique une reconnaissance de celui-ci par la plante. Par analogie avec les facteurs Nod, médiateurs de la reconnaissance des rhizobia symbiotiques par leurs plantes hôtes, il existe des « facteurs Myc » sécrétés par le champignon MA et reconnus par la plante hôte. L'existence de ces facteurs a été démontrée par les travaux de Kosuta *et al.*, (2003) et Olah *et al.*, (2005). A l'instar des facteurs Nod, la reconnaissance par la plante des facteurs Myc est suivie par le déclenchement d'oscillations calciques qui jouent un rôle primordial dans la transduction du signal perçu par la plante hôte (Navazio *et al.*, 2007). La nature chimique des facteurs Myc a longtemps été recherchée sans succès car l'absence d'outils génétiques chez le partenaire fongique rend leur identification très difficile (Harrison, 2005). Récemment, Maillet *et al.*, (2011) ont réussi à purifier et identifier des molécules pouvant correspondre aux facteurs Myc. Ces auteurs ont purifié à partir d'extraits de racines mycohizées ou de spores de *G. intraradices* des lipochito-oligosaccharides sulfatés ou non sulfatés (Figure 9) capables d'activer des réponses typiques de la mycorhization comme la stimulation de la formation de racines latérales et l'activation de l'expression de gènes symbiotiques (Maillet *et al.*, 2011).

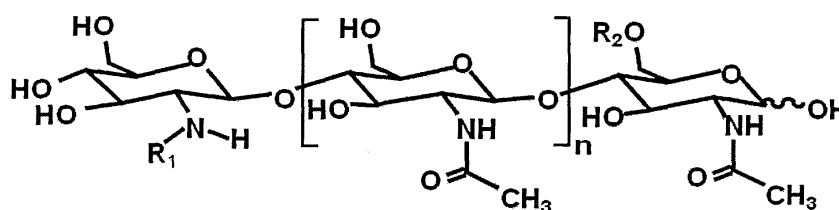


Figure 9. Structure des Lipochito-oligosaccharides des facteurs Myc. (Maillet *et al.*, 2011).

$n = 0, 1, 2, 3, 4$ ou 5 , préférablement 2 ou 3 ;

R_1 représente une chaîne d'acide gras avec 14 à 20 atomes de carbones ;

R_2 représente H ou SO_3H .

La reconnaissance du partenaire fongique par la plante fait intervenir plusieurs gènes appartenant à une cascade de signalisation dont une partie est commune aux symbioses MA et aux symbioses nodulaires fixatrices d'azote. Cette cascade de signalisation commune est composée de 7 gènes (Maillet *et al.*, 2011, Figure 10).

A l'image de ce qui est connu pour la signalisation rhizobienne, on suppose que les facteurs Myc sont perçus par un récepteur. Chez *Lotus japonicus*, la transduction du signal fait d'abord intervenir le gène *SymRK* (Symbiosis Receptor Kinase ; Figure 10) (Stracke *et al.*, 2002). Par la suite un canal ionique est activé dans l'enveloppe nucléaire, celui-ci est codé par les gènes

Castor et Pollux (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005 ; Charpentier *et al.*, 2008).

L'activation de ces gènes induit des oscillations calciques (Charpentier *et al.*, 2008) qui nécessitent la présence de nucléoporines comme le gène NUP85, NUP133 et NENA chez le *L. lotus* (Kanamori *et al.*, 2006 ; Saito *et al.*, 2007 ; Groth *et al.*, 2010).

Ces nucléoporines interviendraient dans la génération des oscillations calciques. Ils seraient des constituants d'un complexe localisé au niveau des pores nucléaires mais leur mode d'action est inconnu (Parniske, 2008).

Un complexe de protéines situé dans le noyau et contenant au moins une kinase dépendante du calcium et de la calmoduline codée par le gène *CCaMK* (Oldroyd et Downie, 2006 ; Yano *et al.*, 2008) interviendrait ensuite en décodant le signal des oscillations calciques. A l'image de ce qui est décrit pour la symbiose rhizobienne, interviendraient ensuite des facteurs de transcription qui n'ont pas encore été caractérisés dans le cadre de la symbiose MA.

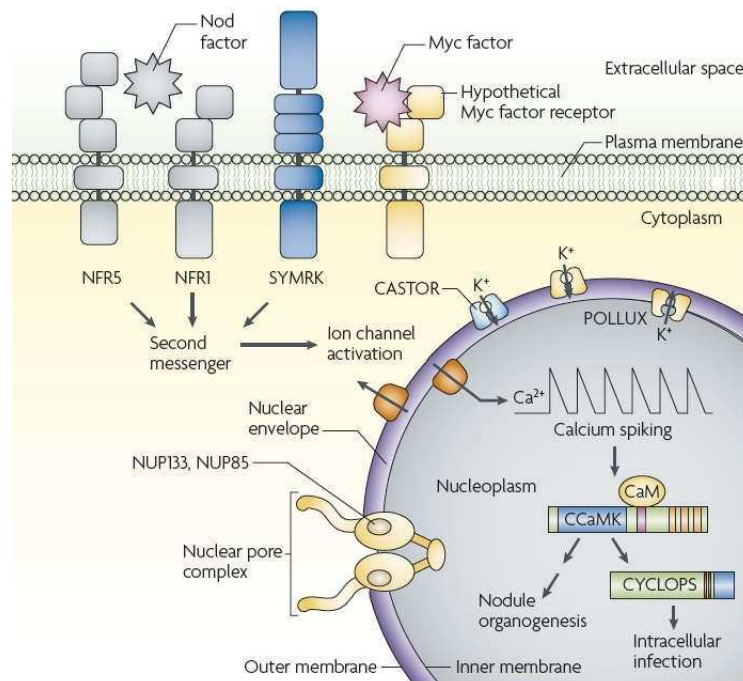


Figure 10. Cascade de signalisation commune pour la symbiose mycorhizienne à vésicules et arbuscules et les symbioses nodulaires. (Source : Parniske, 2008)

1 2 4) Fonctionnement de la symbiose endomycorhizienne

Au cours de la symbiose, des échanges nutritionnels intenses ont lieu entre la plante et le champignon. Ces échanges concernent les sucres et les composés carbonés fournis au champignon par la plante ; l'eau et les sels minéraux fournis à la plante par le champignon (Smith et Read, 2008). Ils peuvent avoir lieu au niveau de tous les hyphes au contact des cellules végétales, mais du fait de leur surface importante, ils sont surtout concentrés au

niveau des arbuscules et/ou des pelotons d'hyphes. Le réseau d'hyphes largement répandu dans le sol forme une extension du système racinaire de la plante et ce réseau a accès à un volume de sol plus important que le système racinaire lui-même. Jusqu'à 100 hyphes par centimètre cube de sol ont été dénombrées (Miller *et al.*, 1995) ce qui augmente considérablement le pouvoir d'absorption des racines dans l'hyposphère c'est-à-dire le sol exploré par l'ensemble du réseau mycélien (Rambelli, 1973 ; Lindermann, 1988). En outre, de par leur faible diamètre en comparaison des racines, les hyphes peuvent s'immiscer dans les interstices des particules du sol qui sont inaccessibles aux poils absorbants. Ce réseau mycélien donne accès à beaucoup d'éléments nutritifs parmi lesquels le carbone, l'azote, le phosphate (Pi) et divers microéléments (Smith et Read, 2008).

Pour ce qui est du carbone, les études de Harrison, (1999 ; 2005); Smith et Smith, (1990) ont montré que les arbuscules sont le lieu d'échange de Pi mais aussi du carbone. Notons que le transfert du C vers le champignon a été démontré vers les années 1960. Grâce à leur structure très ramifiée, les arbuscules permettent d'accroître considérablement la surface de contact entre le champignon et la plante. Ceci a largement contribué à reconnaître les arbuscules comme étant le siège privilégié d'échanges de nutriments entre les symbiotes (Cox et Tinker 1976; Gianinazzi *et al.*, 1979; Dexheimer *et al.*, 1985). Toth et Miller, (1984), Alexander *et al.*, (1989), et Brown et King, (1991) ont montré que les arbuscules sont cependant des structures éphémères qui dégénèrent une fois le stade de maturité ultime atteint. Leur durée de vie est environ de 4 à 10 jours (Alexander *et al.*, 1989) et la succession des arbuscules coûte cher, en termes d'énergie, dépensée aux deux partenaires, mais permettrait un contrôle accru de l'interaction de la part de la plante qui peut ainsi privilégier les symbiotes qui lui fournissent plus de Pi (Sanders et Croll, 2010).

Les gènes intervenant dans le transfert de carbone restent toujours mal connus à l'exception du *GpMST1* décrit chez *Geosiphon pyriforme* (Schüßler *et al.*, 2006), un glomeromycète qui s'associe en symbiose avec une Cyanobactérie. La forme préférable de carbone prélevée par les champignons est l'hexose (Figure 11). Toutefois, il arrive que le carbone soit prélevé sous forme de sucrose (Pfeffer *et al.*, 1999). Ces hexoses sont ensuite convertis en tréhalose et glycogène qui sont la forme de réserve (Shachar-Hill *et al.*, 1995).

Quant à l'azote, une importante quantité est transmise à la plante par les champignons MA. Ces champignons font intervenir des gènes codant des transporteurs d'ammonium, d'acides aminés (Siciliano, 2007 et Bonfante et Genre, 2010) à l'instar du gène *GintAMT1* codant un transporteur d'ammonium chez *G. intraradices* (Lopez-Pedrosa *et al.*, 2006). Ces transporteurs sont impliqués dans le prélèvement de l'azote par les hyphes extraradicales

(Lopez-Pedrosa *et al.*, 2006). Les MA peuvent prélever ainsi l'azote sous différentes formes ; sous forme d'ammonium (NH_4^+) (Frey et Schuepp, 1993 ; Johansen *et al.*, (1996), sous forme d'acides aminés (AA) (Hawkins *et al.*, 2000) et sous forme de nitrate (NO_3^-) (Bago *et al.*, 1996; Johansen *et al.*, 1996) (Figure 11).

Les champignons MA possèdent aussi des enzymes telles que la nitrate réductase, la glutamine synthétase, la glutamine déshydrogénase et des phosphatases qui sont impliquées dans le métabolisme de l'azote et du P_i (Marschner et Dell, 1994, Karandashov *et al.*, 2004 ; Guether *et al.*, 2009).

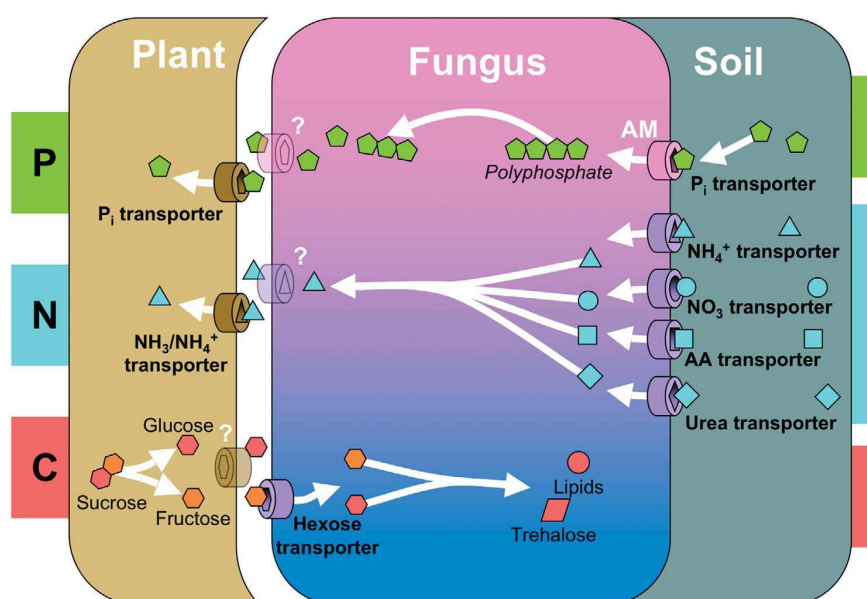


Figure 11. Mécanisme de transport du phosphore, de l'azote et du carbone dans l'interface sol-champignon, champignon-plante :

Le P inorganique et minéral, ainsi que l'N sous forme NH_4^+ , NO_3^- et AA (acide aminé) sont prélevés par des transporteurs spécifiques localisés au niveau de la membrane des hyphes extraracinaires.

$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ et le P_i (le dernier résultant de l'hydrolyse par les polyphosphates chez le champignon) sont importés de l'interface symbiotique aux cellules de la plante par des transporteurs spécifiques.

Les transporteurs d'hexoses importent le carbone dérivé de la photosynthèse de la plante au champignon (Bonfante et Genre, 2010)

Pour ce qui est du P_i , la mycorhization améliore sensiblement son absorption et ne se développe de manière extensive que lorsque le milieu extérieur est pauvre en P_i (Smith et Read, 2008). L'effectivité, la croissance et le prélèvement du P_i varie significativement selon l'association plante-symbiote fongique. Ces différences ne sont pas directement liées au taux de colonisation et de développement du mycélium mais aux niveaux de P_i transféré (Smith *et al.*, 2003 ; 2004).

Le transport de P_i fait intervenir des transporteurs de phosphate du champignon et de la plante (Harrison et van Buuren, 1995 ; Bonfante et Genre, 2010) (Figure 11, 12). Chez le

champignon, un transporteur de Pi (GvPT) a été identifié chez *Glomus versiforme*. Ce transporteur est localisé au niveau des hyphes externes et est impliqué dans le prélèvement du Pi dans le sol. Le Pi accumulé est transformé en polyphosphate et transporté par le mycélium vers la racine de la plante hôte (Hijikata *et al.*, 2010). Au niveau de l'interface entre le champignon et les cellules végétales, le polyphosphate redonne des ions phosphate qui sont transportés à l'extérieur du champignon, probablement par des transporteurs de type GvPT (Harrison et van Buuren, 1995). Ces ions Pi sont transportés activement de l'espace matriciel à l'intérieur des cellules végétales par des transporteurs de Pi spécifiquement exprimés dans les cellules contenant des arbuscules. Aujourd'hui plusieurs dizaines de ces transporteurs ont été identifiés notamment chez plusieurs espèces végétales : la pomme de terre (*StPT3* et *StPT4*) (Rausch *et al.*, 2001; Javot *et al.*, 2007b), le pétunia (*PhPT3*, *PhPT4* et *PhPT5*) (Wegmüller *et al.*, 2008), la tomate (*LePT4*) (Nagy *et al.*, 2005), le tabac *NtPT1*, *NtPT2*, *NtPT3*, *NtPT4* et *NtPT5* (Chen *et al.*, 2007), le riz (*OsPT11*) (Pazkowski *et al.*, 2002), le maïs (*ZmPT6*) (Nagy *et al.*, 2006), le lotier (*LjPT3*) (Maeda *et al.*, 2006) et *Medicago truncatula* (*MtPT4*) (Harrison *et al.*, 2002). Ces transporteurs appartiennent tous à la famille *PhPT1* qui comporte aussi des gènes codant des transporteurs de Pi à haute ou à basse affinité exprimés en conditions non symbiotiques dans les racines des plantes (Figure 12). Des données fonctionnelles ne sont cependant disponibles que chez *Lotus japonicus* et *M. truncatula*, où le phénotype de mutants nuls de ces gènes a été analysé (Harrison *et al.*, 2002 ; Javot *et al.*, 2007a).

Le lien positif entre l'expression de ces gènes et le transport symbiotique de Pi est bien connu. Maeda *et al.*, (2006) et Javot *et al.*, (2007a) ont montré qu'une sous expression ou une mutation du transporteur de phosphate *LjPT3* chez *L. japonicus* et *MtPT4* chez *M. truncatula* entraîne une réduction de la mycorhization et une diminution du taux de Pi prélevé.

Chez *M. truncatula*, le transporteur de phosphate *MtPT4* est localisé au niveau de la membrane périarbusculaire (Harrison *et al.*, 2007). La mutation de ce gène entraîne une sénescence précoce des arbuscules (Javot *et al.*, 2007a). Ces auteurs ont montré une forte expression de ce gène dans les cellules contenant des arbuscules matures et une absence d'expression dans celles qui contiennent des arbuscules en sénescence. Ce résultat montre que ce gène *MtPT4* codant un transporteur de Pi est nécessaire pour l'augmentation des teneurs en Pi mais aussi pour l'amélioration de la croissance de la plante en association avec les champignons mycorhiziens (Javot *et al.*, 2007a).

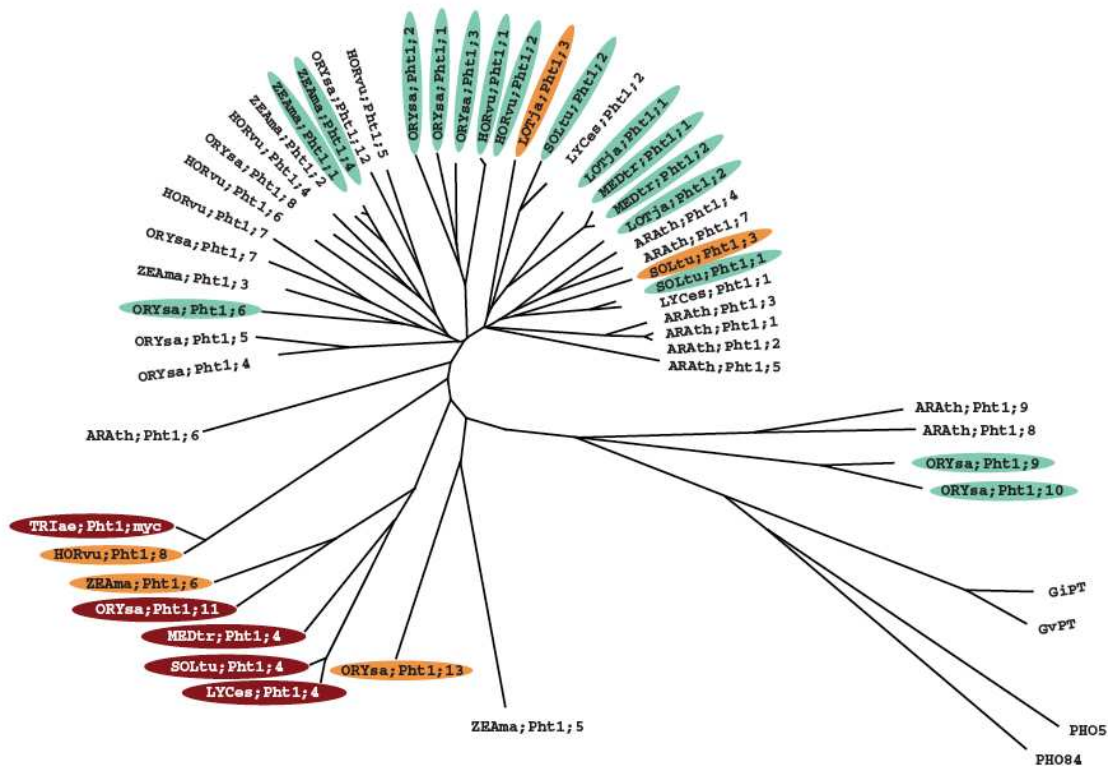


Figure 12. Dendrogramme des transporteurs de phosphate de la plante. (Javot *et al.*, 2007a)

Rouge : transporteurs de Pi spécifique des mycorhizes ; Orange : transporteurs de Pi sous exprimé ; Bleu : transporteurs de Pi sur exprimé

Les transporteurs de Pi chez les plantes:

Arabidopsis thaliana, ARAt; Pht1;1 à 9 (Mudge *et al.*, 2002);

Tomate, LYCe;Pht1;1,2 et 4 (Liu *et al.*, 1998a; Nagy *et al.*, 2005);

Potato, SOLtu;Pht1;1 à 4 (Leggiewe *et al.*, 1997; Rausch *et al.*, 2001; Karandashov *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2005);

Medicago truncatula, MEDtu;Pht1;1, 2 et 4 (Liu *et al.*, 1998b; Harrison *et al.*, 2002);

Lotus japonicus, LOTja;Pht1;1 à 3 (Maeda *et al.*, 2006);

Riz, ORYsa;Pht1;1 à 13 (Paszkowski *et al.*, 2002; Güimil *et al.*, 2005);

Orge, HORvu;Pht1;1, 2, et 4 to 8 (Rae *et al.*, 2003; Glassop *et al.*, 2005);

Blé, TRIae;Pht1;myc (Glassop *et al.*, 2005);

Maïs, ZEAm;Pht1;1 à 6 (Wright *et al.*, 2005; Glassop *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2006).

Les transporteurs de Pi chez les champignons:

Neurospora crassa, PHO5 (Versaw, 1995);

Saccharomyces cerevisiae, PHO84 (Bun-ya *et al.*, 1991);

Glomus versiforme, GvPT (Harrison et van Buuren 1995);

Glomus intraradices, GiPT (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001)

1 2 5) Rôles écologiques des champignons mycorhiziens

Les champignons mycorhiziens améliorent le développement et la croissance de la plante-hôte en augmentant l'absorption d'eau et l'acquisition de nutriments minéraux (Smith et Read, 2008). Ils jouent un rôle important dans la résistance aux stress environnementaux tels que le déficit d'eau (Ruiz-Lozano *et al.*, 2006), la salinité (Evelin *et al.*, 2009), la carence en nutriments minérales (Lambers *et al.*, 2008), le froid (Paridis *et al.*, 1995), l'attaque par les

pathogènes (Borovicz, 2001 ; Liu *et al.*, 2007), la résistance aux métaux lourds et la pollution (Leyval *et al.*, 1994 ; Gohre et Paszkowski, 2006). Généralement, les plantes mycorhizées sont beaucoup plus compétitives et mieux tolérantes aux stress environnementaux que les plantes non mycorhizées

* Effets des champignons mycorhiziens sur la croissance et le développement des plantes

De nombreuses expériences montrent l'effet des champignons ectomycorhiziens (EM) et endomycorhiziens dans l'amélioration de la biomasse des plantes mycorhizées (Duponnois *et al.*, 2000 ; 2005 a,b).

L'association avec des champignons MA se traduit généralement par une amélioration de la croissance et celle-ci est positivement corrélée au taux de mycorhization (Smith et Read, 2008). Cette stimulation de la croissance se traduit généralement aussi par une floraison et une fructification plus précoces et plus abondantes (Wang *et al.*, 1993). Les champignons stimulent l'enracinement racinaire des plantes d'où l'augmentation de la biomasse racinaire notée chez les plantes mycorhizées (Duponnois *et al.*, 2008, Elumai et Raaman, (2009).

D'une manière générale, les spores de MA sont présentes dans les sols agricoles. Cependant, certains phénomènes comme les incendies et le labourage peuvent affecter les champignons MA présents dans le sol et diminuer considérablement leur nombre (Pattison *et al.*, 1999 ; Jansa *et al.*, 2002). Dans ces cas particuliers, des champignons MA commercialisés comme stimulants biologiques naturels peuvent être rajoutés au sol pour augmenter la productivité (Figure 13).



Figure 13. Stimulateur biologique : Produit sous licence INRA.

(Institut National de la Recherche Agronomique) APV N° 98 10002 (société BIORIZE).

Composition : Inoculum d'une souche naturelle d'endomycorhizes : *glomus* sur base argile en granulé.

Cependant, il faut noter que la relation symbiotique plante-champignon mycorhizien peut passer au profit d'un des partenaires, si les conditions nutritionnelles sont favorables dans le cas des sols fertiles et ceci conduit souvent à un parasitisme (Johnson *et al.*, 1997 ; Neuhauser et Fargione, 2004, Selosse, 2010). Un cas extrême est présent chez certaines Orchidées et Ericacées mycotrophes sans chlorophylle qui dépendent du carbone fourni par le champignon associé (Selosse *et al.*, 2009).

Les études de Modjo et Hendrix, (1986) ont montré un rabougrissement des plantes de tabac et un retard dans la croissance suite à une inoculation avec *Glomus macrocarpum*. Quant à Smith *et al.*, (2004), ils ont noté que l'inoculation de la tomate *Lycopersicon esculentum* par *Glomus caledonium*, *G. intraradices* et *Gigaspora rosea* n'est pas suivie d'une réponse positive stimulant le développement de celle-ci. Les Travaux de Bever *et al.*, (2002) ont montré que ce feedback négatif qui peut avoir lieu au cours de la relation symbiotique serait lié à des relations nutritionnelles asymétriques. La plante ne reçoit plus du champignon la quantité d'éléments minéraux nécessaires lui permettant de se développer alors que ce dernier continue à bénéficier des carbohydrates de la plante. Cependant, ces travaux ont été effectués au laboratoire. Dans les conditions naturelles, où il y a souvent une compétition entre espèces, le fait d'avoir des champignons MA est généralement très avantageux (Smith et Read, 2008).

*** Rôle des champignons mycorhiziens dans la résistance au stress hydrique**

- Résistance des champignons mycorhiziens au déficit d'eau

Les champignons MA et EM améliorent la nutrition hydrominérale des espèces végétales associées et leur permettent ainsi de résister au stress hydrique (Smith et Read, 2008).

Le déficit hydrique est l'un des stress environnementaux les plus communs limitant la productivité des plantes (Bray, 2004). Ce stress hydrique peut être contourné grâce à l'aptitude de certaines plantes terrestres à s'associer avec les MA (Augé, 2001 ; Ruiz-Lozano, 2003 ; Augé, 2004). La contribution des champignons mycorhiziens à la tolérance au stress hydrique peut résulter d'un certain nombre de mécanismes physiques, physiologiques, cellulaires et nutritionnels (Ruiz-Lozano, 2003 ; Khade et Rodrigues, 2009). Par exemple, une augmentation de la densité des racines et une modification de leur morphologie suite à la colonisation par le champignon permet aux plantes mycorhizées de prélever beaucoup plus d'eau que celles non mycorhizées en condition de stress hydrique (Davies *et al.*, 1992, 1996). En plus, il a été noté que colonisation par les champignons MA induisait une réduction des

pertes d'eau au niveau des stomates (Augé *et al.*, 1986) ce qui explique la meilleure résistance au manque d'eau des plantes mycorhizées comparées aux plantes non mycorhizées.

Chez les champignons ectomycorhiziens, la résistance au manque d'eau est possible grâce aux hyphes qui sont capables d'abaisser suffisamment leur potentiel osmotique pour s'alimenter en eau au bénéfice de la plante (Smith et Read, 1997). Ces hyphes forment par agrégation des structures appelés rhizomorphes qui sont de bons conducteurs d'eau (Duddridge *et al.*, 1980).

- Résistance des champignons mycorhiziens au surplus d'eau

Parallèlement à l'amélioration de la nutrition hydrique, les champignons MA confèrent à la plante hôte une tolérance au surplus d'eau. Les études de Osundina, (1997) ont montré que les plantes de *C. equisetifolia* mycorhizées étaient plus adaptées aux sites inondés que les plantes non mycorhizées. Plus tard, les travaux de Muok et Ishii, (2006) utilisant une autre espèce *Sclerocarya birrea* ont montré que les plantes mycorhizées avaient une biomasse plus importante que les plantes non mycorhizées en sol inondé. D'autres auteurs ont montré une accumulation importante d'éthanol dans les racines des plantes non mycorhizées comparées aux plantes mycorhizées (Rutto *et al.*, 2002) en sol inondé. Ces auteurs pensent que dans ce cas, la résistance des plantes mycorhizées au surplus d'eau serait liée à une suppression de l'accumulation d'éthanol dans les racines et à une amélioration de la nutrition de la plante.

*** Les champignons mycorhiziens dans l'amélioration de la nutrition minérale**

Pendant la croissance des plantes mycorhizées, beaucoup d'éléments tels que le Pi, N, Zn, Cu, K, Ca, Mg (Figure 14) sont mobilisés par les champignons et assurent la croissance des plantes hôtes (Clark et Zeto, 2000). Dans beaucoup de sols, le phosphore et l'azote présents en faible quantité ou indisponibles constituent des facteurs limitants pour la croissance des plantes (Toro *et al.*, 1998 ; Vance *et al.*, 2003 ; Lambers *et al.*, 2008). Le prélèvement de ces nutriments peut être soit limité par leur concentration dans la zone d'absorption racinaire, soit par la surface totale des racines prêtes à absorber ces éléments ou soit par la distribution des racines dans le sol (Lambers *et al.*, 2008).

Par l'amélioration du prélèvement des éléments minéraux, le champignon augmente la vigueur et la reproduction des plantes associées (Seddas *et al.*, 2009). Du fait de ce prélèvement important de nutriments, le champignon MA serait indirectement impliqué dans la réduction de la malnutrition humaine en augmentant la quantité de nutriments dans la

biomasse des plantes mycorhizées qui pourraient être utilisés dans l'alimentation humaine (He et Nara, 2007).

Ce rôle positif des champignons est aussi connu chez les ectomycorhizes où les hyphes du champignon organisés en réseaux complexes permettent une exploration très efficace du sol (Rousseau *et al.*, 1994) et contribuent ainsi à 70% à 80% de l'apport de phosphate pour la plante (Marschner, 1995).

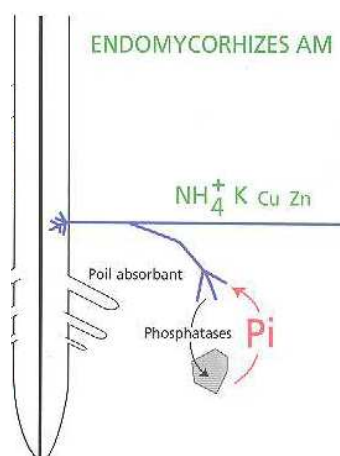


Figure 14. Représentation schématique de l'acquisition des principaux éléments par la symbiose mycorhizienne : Le phosphore est le principal élément chez les plantes. Chez les champignons, l'hyphe extramatrielle est capable d'excréter des phosphatases. L'acquisition de certains éléments est améliorée lors de la symbiose mycorhizienne (Cu et Zn). (Source : Duhoux et Nicole, 2004 - modifié)

* Rôle des champignons mycorhiziens dans la tolérance au stress salin

Peu de plantes halophytes sont mycotrophes (Brundrett, 1991), cependant la symbiose mycorhizienne peut s'établir en conditions de stress salin (Rozema *et al.*, 1986 ; Yamato *et al.*, 2008). La salinité peut affecter aussi bien la plante-hôte que le symbiote fongique.

Les champignons MA généralement observés en conditions de stress salin sont du genre *Glomus* (Wang *et al.*, 2004 ; Manga *et al.*, 2005). Une augmentation du nombre de spores et de la colonisation a été notée en conditions de stress salin (Aliasgharzadeh *et al.*, 2001). Sous ces conditions, il a été observé une croissance plus importante chez les plantes inoculées comparées aux plantes non inoculées (Giri *et al.*, 2003 ; Sannazzaro *et al.*, 2007 ; Zuccarini et Okurowska, 2008). Des résultats similaires ont été obtenus par Colla *et al.*, (2008) qui démontrent que l'inoculation par *G. intraradices* de *Cucurbita pepo* en conditions de stress salin améliore la croissance, la production, la colonisation par le champignon, la teneur en nutriments et aussi la qualité du fruit. Il en est de même des travaux de Diouf *et al.*,

(2005) qui ont montré que la double inoculation champignon et bactérie fixatrice d'azote (*Bradyrhizobium*) confère une meilleure résistance au stress salin à *Acacia mangium* et *Acacia auriculoformis*. Malgré le fait qu'en conditions de stress salin l'ion phosphate a tendance à précipiter avec le Ca^{2+} , le Mg^{2+} , et le Zn^{2+} et devient indisponible, le champignon améliore aussi dans ces conditions le prélèvement de Pi et augmente donc la croissance de la plante (Plenchette et Duponnois, 2005). Des effets négatifs de la salinité sur le champignon fongique ont été prouvés par Hirrel, (1981) ; Jahromi *et al.*, (2008). Rozema *et al.*, (1986) et Sheng *et al.*, (2008) ont trouvé une baisse de la colonisation des plantes par le champignon en présence de sel tandis que Tian *et al.*, (2004) et Sheng *et al.*, (2008) ont montré que cette salinité pouvait même supprimer la formation d'arbuscules.

Chez les champignons EM, il y a peu d'études portant sur l'interaction champignon EM, plante et tolérance au stress salin. Les travaux de Huang *et al.*, (2006) ont montré que l'inoculation de *Pinus tabulaeformis* avec les champignons ectomycorhiziens *Boletus edulis* et *Xerocomus chrysenteron* augmente la croissance et la biomasse des plantes inoculées comparées aux plantes non inoculées. Cependant, Bandou *et al.*, (2006) ont noté que la colonisation par le champignon ectomycorhizien était réduite quand les teneurs en sel du milieu augmentaient.

*** Rôle des champignons mycorhiziens dans la résistance aux métaux lourds**

Le champignon mycorhizien joue un rôle important dans la tolérance de la plante aux métaux toxiques. Cette résistance des plantes mycorhizées aux métaux lourds a été démontrée par Gohre et Paszkowski, (2006).

Leyval *et al.*, (1997) ont montré que les champignons MA, interviendraient dans la résistance aux métaux tels que le Cd, le Mn, le Ni, le Pb, le Cu et le Zn. Ils peuvent diminuer le prélèvement des métaux et augmenter leur efflux. Ces métaux sont séquestrés et immobilisés à l'aide des exopolysaccharides ou d'autres métabolites extracellulaires (Perotto et Martino, 2001 ; Baldrian, 2003). Les études de Heggo *et al.*, (1990) rapportent que, sous l'effet de la mycorhization, la concentration des métaux (Cu et Zn) transférés à la plante diminue.

La capacité des MA à chélater ces métaux toxiques joue un rôle important dans cette tolérance. Les champignons possèdent des chélateurs de métaux tels que les métallothionéines et les phytochélatines. A cela s'ajoute leur système vacuolaire qui interviendrait dans la séquestration et la détoxification des métaux (White et Gadd, 1986 ; Liu et Culotta, 1999). Les champignons mycorhiziens peuvent encore jouer le rôle dans la phytoremédiation (Ker et

Charest, 2010). Ces auteurs ont trouvé une quantité de Nickel (Ni) plus importante dans les feuilles des plantes inoculées que dans les plantes non inoculées. Par ailleurs, l'effet toxique des métaux sur le champignon est variable suivant le type de métal auquel il est exposé (Plaza *et al.*, 1998).

Ce rôle des champignons mycorhiziens dans la résistance aux métaux lourds est aussi étendu aux ectomycorhizes qui ont un effet protecteur pour les plantes en accumulant des métaux lourds par le cordon mycélium. Cette faculté fait des ectomycorhizes de bons détoxificateurs des sols.

Cependant, les études de Pennanen *et al.*, (1996) ; Olayinka et Babalola, (2001) ont montré que les métaux toxiques réduisaient la diversité microbienne du sol mais aussi l'activité de ces microorganismes. Ils inhibent la croissance et la germination des spores et affectent leur reproduction, leur activité métabolique et réduisent leur capacité à coloniser les racines des plantes-hôtes (Amir et Pineau, 1998 ; Moynahan *et al.*, 2002 ; Mozafar *et al.*, 2002 ; Baldrian, 2003).

*** Rôle des champignons mycorhiziens dans la protection phytosanitaire des plantes**

La symbiose mycorhizienne réduit l'incidence des maladies radiculaires et diminue l'effet nocif de certains agents pathogènes comme les nématodes sur les plantes (Dehne, 1982 ; St-Arnaud *et al.*, 1995). L'inoculation avec les champignons MA limite la croissance de ces agents pathogènes et augmente la résistance de la plante à ces derniers (Borovicz, 2001 ; Liu *et al.*, 2007). Les résultats de Newsham *et al.*, (1995) et Toljander, (2008) montrent qu'une perturbation de la communauté microbienne dans la rhizosphère (souvent négative à la production des plantes) pouvait modifier positivement le système de résistance de ces plantes aux agents pathogènes.

Selon les hypothèses émises par Muchovej *et al.*, (1991) et Traquair, (1995), le champignon MA réduirait la croissance des agents pathogènes en étant plus compétitif pour l'infection des racines mais aussi pour l'acquisition des photosynthétats ou même en promouvant la croissance d'autres microorganismes du sol, antagonistes des agents pathogènes (Linderman, 1992 ; Thomas *et al.*, 1994). Ces champignons mycorhiziens réduisent la performance des agents pathogènes en stimulant des réponses défensives (Volpin *et al.*, 1994 ; Morandi, 1996) ou en altérant les exsudats racinaires utilisés par l'agent pathogène (Graham et Menge, 1982). De nombreuses études ont confirmé ce rôle positif des champignons MA sur l'augmentation de la résistance de la plante-hôte aux maladies. Cependant, les travaux de Bååth et Hayman, (1983, 1984) et de Vaast *et al.*, (1998) ont

démontré que dans certains cas le champignon MA pouvait favoriser l'infection par l'agent pathogène.

Les champignons EM jouent aussi un rôle de protecteur des plantes hôtes (Marx, 1969). Il a été démontré par Duchesne *et al.*, (1989) que les champignons EM produisaient des antibiotiques et des composés phénoliques inhibiteurs des agents pathogènes. Le manteau de ces champignons constitue une barrière mécanique difficile à franchir par certains microorganismes (Marx, 1972).

*** Rôle des champignons mycorhiziens dans la structuration du sol, la stabilité et le fonctionnement des écosystèmes**

Les champignons MA interviennent dans l'amélioration de la structure des sols colonisés (Rillig, 2004). Les associations symbiotiques permettent la constitution d'un sol résistant mieux aux intempéries, stockant mieux l'eau grâce à la formation d'agrégats plus stables (Tisdall et Oades, 1979 ; Miller et Jastrow, 1990 ; Zhu et Miller, 2003). Ces agrégats stables dans le sol peuvent se former à la suite de l'excrétion par les hyphes d'une glycoprotéine, la glomaline (Smith et Read, 1997 ; Loveloc *et al.*, 2004 ; Rillig, 2004). Une absence de glomaline a été notée chez les plantes non mycorhizées alors chez les plantes mycorhizées le taux de glomaline augmente avec le temps (Wright et Upadhyaya, 1996).

En améliorant la structure du sol par la glomaline, le champignon MA augmente la stabilité des écosystèmes. Les MA interviennent positivement dans le fonctionnement de l'écosystème en augmentant la productivité et la biodiversité des plantes associées (Grime *et al.*, 1987 ; van de Heijden *et al.*, 1998 a,b ; Sanon *et al.*, 2006). Il a été démontré par Helgason *et al.*, (1998) qu'une baisse de la biodiversité fongique dans un écosystème entraînait son instabilité.

Les travaux de Grime *et al.*. (1987) laissent penser que l'influence positive des champignons mycorhiziens sur la biodiversité végétale pourrait être due à un transport de métabolites entre différentes plantes de l'écosystème via le réseau mycélien.

Chez les ectomycorhizes, ce réseau mycélien forme un pont entre le sol et la plante et il est à l'origine de la structure appelée « wood-wide web » terme qui signifie « réseau à l'échelle de la forêt » et indiquant un lien direct entre les plantes mycorhizées adjacentes et les champignons associés (Simard *et al.*, 1997). Ce réseau d'hyphes inter plantes a été mis en évidence depuis les années 1960 (Björkman, 1960 ; Bidartondo, 2005). Ce pont mycélien est capable de connecter toute une communauté de plantes et permet ainsi un transfert horizontal efficace de nutriments (Bonfante, 2001). Ces réseaux influencent le fonctionnement des

écosystèmes et permettent des flux importants de carbone organique et de minéraux (azote, phosphore) via le sol.

Beaucoup de plantes non chlorophylliennes obtiennent leur carbone en se connectant à ce réseau grâce aux endophytes mycorhiziens (Selosse et Roy, 2009). Appelé aussi « Common Mycorrhizal Network » (CMN), ce réseau intervient dans la nutrition des plantes (photosynthétiques ou pas) et constitue un des éléments les plus dynamiques dans le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne pour une amélioration du développement de la plante-hôte. Ce réseau interconnecté souterrain relie les racines d'une plante ou de plantes différentes ce qui fait que les mycorhizes sont à l'origine des écosystèmes les plus complexes et en particulier des forêts tropicales qui poussent souvent sur des sols pauvres. Dans ce cas, les champignons mycorhiziens peuvent s'associer à des espèces pionnières qui ont la capacité de coloniser ces écosystèmes dégradés pour préparer le terrain à des plantes mycotrophes beaucoup plus exigeantes (Azcon-Aguilar *et al.*, 2003).

*** Les champignons mycorhiziens en tant que producteur d'hormones : Effets sur la plante hôte**

Les champignons mycorhiziens MA peuvent être considérés comme des biorégulateurs, ils interviennent en changeant la composition et la distribution des phytohormones (Hause *et al.*, 2007).

Ce rôle des MA comme biorégulateurs a été étudié avec différents hormones telles que : l'acide jasmonique (AJ), un dérivé lipidique, l'acide abscissique (ABA), un apocaroténoïde et la gibbérelline (GA), un dérivé terpénoïde, l'auxine (AIA), les cytokinines (CK), l'éthylène (ET) et l'acide salicylique (AS) (Hause *et al.*, 2007). Concernant les hormones produites pendant la symbiose mycorhizienne et impliquées dans le développement dans la plante, beaucoup d'études ont été particulièrement réalisées sur l'auxine et les cytokinines.

Les champignons ont une forte aptitude à produire de l'AIA (acide indole 3-acétique) (Niemi *et al.*, 2000 ; Marmeisse *et al.*, 2004). Cette hormone provoque un effet rhizogène en stimulant le développement de racines latérales (Gay, 1990 ; Normand *et al.*, 1996a; Karabaghi *et al.*, 1998). Il a été démontré par Jentschel *et al.*, (2006) que l'inoculation avec les champignons mycorhiziens augmente le taux d'auxine de la plante. Ainsi, plus l'intensité de la colonisation est forte, plus la quantité d'auxine produite est importante (Ek *et al.*, 1983).

Pour les cytokinines, les travaux de Barker *et al.*, (2000) ont montré une accumulation de cytokinines au niveau des plantes mycorhizées comparées aux plantes non mycorhizées.

Ce résultat se traduirait par une croissance et un métabolisme plus important chez ces plantes mycorhizées. Les travaux de Dutra *et al.*, (1996) ont montré que les phytohormones ainsi synthétisées participent à la stimulation de la croissance des plantes mycorhizées.

Les champignons ectomycorhiziens produisent aussi des régulateurs de croissance pour l'établissement de la symbiose (Augé et Duan, 1991). Parmi ces hormones, on peut noter l'AIA qui stimule la formation de racines courtes réceptives à l'infection. Exportées vers la plante, les phytohormones synthétisées par le champignon EM stimulent la biomasse des racines, des tiges et des feuilles.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'effet positif de la mycorhization est un phénomène complexe qui est généralement dû à une combinaison des facteurs décrits ci-dessus.

1 3) Les ectendomycorhizes

Les ectendomycorhizes ont à la fois des caractères d'ectomycorhizes (présence du manteau fongique et d'un réseau de Hartig) et des caractères d'endomycorhizes (colonisation intracellulaire de cellules racinaires corticales). Un manteau externe coexiste avec les hyphes qui pénètrent à l'intérieur des cellules racinaires, soit sous forme de pelotons (mycorhizes arbutoïdes), soit sous forme d'hyphes très courtes (mycorhizes monotropoïdes).

Les mycorhizes monotropoïdes sont formées par l'association d'un Basidiomycète et d'une monotropacée (Tableau 1) aboutissant à la formation de pelotons intracellulaires.

Les mycorhizes arbutoïdes résultent d'une association entre un champignon de la famille des Basidiomycètes et une Ericacée (Tableau 1). Leur nom vient de l'arbusier (*Arbutus unedo*). Chez ces mycorhizes, les hyphes à pelotons intracellulaires sont très développés.

Contrairement, aux endomycorhizes et aux ectomycorhizes qui sont largement utilisées dans les domaines agricoles et sylvicoles, à notre connaissance, les ectendomycorhizes ne sont pas utilisées dans ces domaines (Smith et Read, 2008).

2) Interaction champignons endomycorhiziens et champignons ectomycorhiziens

Chez quelques espèces végétales, les champignons ectomycorhiziens et endomycorhiziens peuvent coexister (Bâ *et al.*, 1987 ; Wang et Qiu, 2006). Cette coexistence est notée chez le genre *Acacia* (exemple : les acacias australiens), les *Casuarinaceae*, les *Eucalyptus*, les *Populus* et les *Quercus* (Brundrett *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 2000 ; Founoune *et al.*, 2001 ; Diouf *et al.*, 2005). Les études de Selosse *et al.*, (2006) ont montré que les

champignons endomycorhiziens s'installent en premier pour ensuite laisser la place ou coexister avec les ectomycorhizes. Cependant, le manteau fongique des ectomycorhizes peut agir comme barrière et diminuer l'infection par le champignon arbusculaire (Chilvers *et al.*, 1987). Les études de Duponnois *et al.*, (2003) ont montré que l'inoculation avec les deux symbiotes fongiques chez *Allocasuarina verticillata* entraînait des effets antagonistes qui résultaient souvent en une forte colonisation par les ectomycorhizes. Par contre, la double inoculation champignon endomycorhizien et champignon ectomycorhizien diminue le taux de mycorhization des ectomycorhizes chez *Acacia holosericea*; cette diminution peut aller jusqu'à 39% (Ducouso, 1991). Un effet synergique avec augmentation du taux de mycorhization a été observé chez *C. equisetifolia* lors de la double inoculation de ces deux symbiotes fongiques (Elumanai et Raaman, 2009). Ces résultats montrent que la colonisation par les deux symbiotes (endomycorhizienne et ectomycorhizienne) est caractérisée par une première infection rapide par le champignon MA et une deuxième infection plus tardive par le champignon ectomycorhizien (Chilvers *et al.*, 1987).

3) Interactions entre les champignons mycorhiziens et la communauté bactérienne du sol

Les champignons MA ont un effet positif sur la croissance de la communauté bactérienne en modifiant l'activité et la structure de cette dernière dans la mycorhizosphère (Duponnois *et al.*, 2005a). Les études de Roesti, (2005) utilisant des outils moléculaires (PCR-DGGE) ont montré que la structure des communautés microbiennes dépendait beaucoup plus du champignon MA que de la plante-hôte associée. Cette dépendance de la communauté microbienne envers les champignons endomycorhiziens a été prouvée par (Vestergård *et al.*, 2008). Les champignons MA interviennent dans la préservation de la structure de la communauté bactérienne du sol (Kisa *et al.*, 2007).

Les bactéries PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) qui stimulent la croissance de la plante (Artursson *et al.*, 2006) peuvent influencer fortement la croissance du champignon (Linderman, 1988, 1992). Les travaux de Garbaye, (1994) ont montré que la présence de bactéries dans le sol nommées MHB « Mycorrhizal Helper Bacteria » ou BAM (Bactéries Auxiliaires de la Mycorhization) qui influencent l'établissement de la mycorhization.

Parmi les MHB, on trouve des bactéries à Gram négatif appartenant aux Proteobacteria, des bactéries Gram positif appartenant aux Firmicutes et des Actinomycètes (Garbaye et Duponnois, 1992 ; Founoune *et al.*, 2002 ; Frey-Klett *et al.*, 2005 ; 2007). Ce

concept MHB est étendu à la symbiose ectomycorhizienne (de Oliveira et Garbaye, 1989 ; Frey-Klett, 1996), à la symbiose MA (Ames, 1989 ; Perroto et Bonfante, 1997) et à la symbiose mycorhizienne des Orchidées (Wilkinson *et al.*, 1989). Ces MHB améliorent la compétitivité du champignon inoculé vis-à-vis de la flore fongique indigène (Duponnois *et al.*, 1993). Ces bactéries sécrètent des acides organiques, des composés volatils (Garbaye et Duponnois, 1992) et une phytohormone, l'auxine (Duponnois, 1992) qui stimuleraient la germination des spores, la croissance des hyphes, la croissance de la plante-hôte et la susceptibilité de la racine à être infectée (Mosse, 1959 ; Bowen, 1994 ; Garbaye, 1994 ; Budi *et al.*, 1999).

Notons que le champignon lui aussi agit positivement sur les MHB par la production d'un disaccharide, le tréhalose, assurant la survie des MHB et pouvant sélectionner les bactéries mycorhizosphériques (Duponnois et Kisa, 2006 ; Uroz *et al.*, 2007 ; Frey-Klett *et al.*, 2007). Les études de Toljander *et al.*, (2006) ont montré une corrélation positive entre la diminution de la communauté de champignons arbusculaires et celle de la communauté bactérienne. Ces auteurs ont tenté d'expliquer ce phénomène par une baisse de la vitalité des hyphes diminuant ainsi le rattachement des bactéries sur les hyphes.

Les mécanismes d'action de ces bactéries demeurent longtemps hypothétiques (Garbaye, 1994). Cependant des études récentes de Frey-Klett *et al.*, (2007) et de Tarkha et Fey-Klett, (2008) ont montré que les MHB agissent sur différent axes : 1) en augmentant la surface racinaire colonisable par le champignon ; 2) en sécrétant des substances ramollissant la paroi des racines ; 3) en réduisant l'effet des stress environnementaux ; 4) en stimulant la germination des spores, l'extension du mycélium et en favorisant la reconnaissance de l'hôte et 5) en agissant sur la spécificité du champignon.

*** Rôle des MHB dans l'amélioration de la croissance du mycélium :** Les MHB stimulent la biomasse mycélienne et augmentent les chances de rencontre champignon-racine d'où une mycorhization plus rapide (Brulé *et al.*, 2001). En caractérisant le surnageant d'une culture bactérienne de *Streptomyces sp.* AcH 505, Riedlinger *et al.*, (2006) ont pu isoler une molécule, l'auxofuran, responsable de la stimulation de la croissance du champignon ectomycorhizien *Amanita muscaria*. Les études de Deveau *et al.*, (2007) ont montré l'implication de certains gènes dans l'amélioration de la croissance du champignon. Il s'agit de gènes précoces de *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 dont l'expression entraîne une augmentation de la croissance et de la morphologie du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* A238N associé.

*** Les MHB augmentent la réceptivité de la racine de la plante hôte :** Certaines bactéries comme les MHB possèdent des enzymes qui augmentent la perméabilité de la racine à la pénétration par le champignon et facilite la colonisation de la racine. Mosse, (1962) a montré que les MHB du genre *Pseudomonas* produisaient des enzymes digestives de la paroi et facilitaient l'établissement de la symbiose mycorhizienne.

*** Les MHB provoquent des modifications dans le sol mycorhizosphérique :** La mycorhizosphère est ce compartiment microbien influencé par la symbiose mycorhizienne (Rambelli, 1973). Au niveau de cette mycorhizosphère, certains microorganismes tels que les champignons sécrètent des métabolites toxiques limitant la croissance d'autres agents compétiteurs. Duponnois et Garbaye, (1990) ont montré que les MHB pouvaient détoxifier les inhibiteurs fongiques sécrétés dans le sol. Les MHB peuvent modifier indirectement la structure du sol en stimulant le développement des mycorhizes qui sécrètent la glomaline, une substance qui modifie la structure du sol (Zhu et Miller, 2003). Les MHB améliorent le développement du champignon en conditions de stress hydrique (Vivas *et al.*, 2003b). Cet effet positif des MHB a été noté dans les sols contaminés par les métaux lourds (Zn, Cd) (Vivas *et al.*, 2003a, 2003c). Ces effets positifs des mycorhizes peuvent résulter d'une amélioration de la teneur des carbohydrates transportés de la plante-hôte au symbiote fongique.

*** Rôle des MHB dans la stimulation de la germination des propagules fongiques, dans la reconnaissance de l'hôte et le changement de l'architecture du système racinaire :** Les MHB stimulent la germination des spores par la sécrétion d'exsudats (Mosse, 1962 ; Mayo *et al.*, 1986 ; Azcón-Aguilar *et al.*, 1986). Xavier et Germida, (2003) ont montré que cette germination nécessite le contact entre les deux symbiotes et la présence d'un probable site de reconnaissance et d'un récepteur pour l'interaction champignon-bactérie. Les travaux de Xie *et al.*, (1995) ont montré que les MHB jouent un rôle important dans l'établissement de la symbiose mycorhizienne en agissant sur les flavonoïdes de la plante et en stimulant la formation de mycorhizes. Ces MHB peuvent souvent modifier le spectre de flavonoïdes de la plante-hôte (Xie *et al.*, 1995). Ils modifient l'architecture racinaire (Garbaye, 1994 ; Schrey *et al.*, 2005) et stimulent la formation de racines latérales entraînant une colonisation plus importante par le champignon grâce à la sécrétion d'auxine ou de substances proches.

*** Rôle des MHB dans la spécificité de l'interaction avec le champignon :** L'interaction MHB et champignon mycorhizien est bien connue chez les ectomycorhizes où elle est d'une grande spécificité. Les études de Garbaye et Bowen, (1987 ; 1989) montrent que les MHB peuvent stimuler, inhiber ou être sans effet sur la formation de mycorhizes. L'ajout des

bactéries *Pseudomonas fluorescens* BBc6 et *Pseudomonas sp.* SBc5 a un effet positif sur *L. laccata* et *L. bicolor* alors que ces mêmes bactéries ont un effet négatif sur *Hebeloma cylindrosporum* et *Paxillus involutus*. Cependant, l'origine de la souche fongique peut influencer la spécificité de l'infection MHB-champignon (Duponnois et Garbaye, 1991).

4) Histoire évolutive des symbioses mycorhiziennes

Les mycorhizes les plus anciennes sont les MA trouvées dans le rhizome des premières plantes vasculaires. Divers études ont permis de situer l'origine de ces endosymbioses à environ 400 à 460 millions d'années avant notre ère c'est-à-dire au Dévonien, soit en même temps que l'apparition des premières plantes terrestres (Simon *et al.*, 1993; Remy *et al.*, 1994; Redecker *et al.*, 1999 ; Dotzler *et al.*, 2006). Cela suggère que les Glomeromycota ont permis aux plantes primitives de coloniser le milieu terrestre (Selosse et Le Tacon, 1999 ; Schwarzott *et al.*, 2001). Quant aux ectomycorhizes, ils ont été datés au Crétacé ; il en est de même des endosymbioses racinaires à bactéries fixatrices d'azote, datées à la fin du crétacé environ 65 millions d'années (Figure 15).

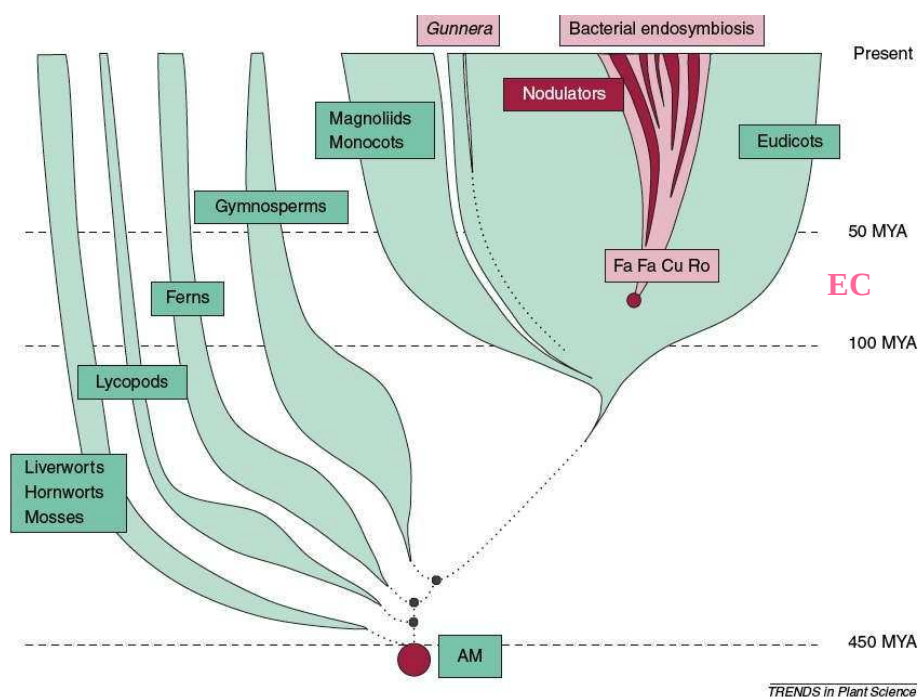


Figure 15. Evolution des endosymbioses racinaires : AM : champignon endomycorhizien ; EC : champignon ectomycorhizien (Source : Kistner et Parniske, 2002)

II) Les symbioses racinaires fixatrices d'azote

Le diazote est un élément constituant près de 80% de l'atmosphère terrestre.

Paradoxalement, il est un facteur limitant majeur de la production végétale. Ce paradoxe est dû au fait que l'azote moléculaire (N₂) est très stable, et seuls certains Procaryotes sont capables de le réduire sous une forme combinée assimilable par les plantes (Boivin et Denarie, 1998). Certaines plantes ont développé une capacité à s'associer avec ce type de bactéries fixatrices d'azote. Ces symbioses fournissent chaque année à l'échelle de la planète, une quantité d'azote qui est presque équivalente à celle synthétisée dans l'industrie des engrais et joue donc un rôle écologique important (Vance, 1998). Parmi les symbioses fixatrices d'azote figurent les symbioses rhizobiennes, les symbioses actinorhiziennes et les symbioses cyanobactériennes.

II 1) La symbiose rhizobienne

1) La plante hôte : la famille des Légumineuses

La famille des Légumineuses est subdivisée en trois familles : les Caesalpiniacées, les Fabacées et les Mimosacées (Tableau 2, Figure 16).

Les Légumineuses sont cosmopolites et largement représentées dans les régions tempérées et tropicales (Rundel, 1989). Cette famille est constituée de plus 19000 espèces (Lewis *et al.*, 2005) dont certaines forment des symbioses nodulaires avec la bactérie fixatrice d'azote du genre rhizobia (Patriarca *et al.*, 2004 ; Gage, 2004 ; Stacey *et al.*, 2006).

Elles jouent un rôle écologique important dans la fertilisation des écosystèmes (Lewis *et al.*, 2005). Du fait de la grande quantité d'azote fixée par ces plantes, les légumineuses jouent aussi un rôle important en agronomie (Vessey *et al.*, 2004).

Les Légumineuses sont très utiles à l'homme et aux animaux. Elles fournissent des huiles végétales, des fibres alimentaires, du fourrage, du bois de chauffe, de construction et de charpente et ont beaucoup de vertus médicinales.

Tableau 2. Estimation de la taille de la famille des Légumineuses.

	Taubert, (1894)		Hutchinson, (1964)		Lewis <i>et al.</i> , (2005)	
	Genres	Espèces	Genres	Espèces	Genres	Espèces
Ceasalpinaiceae	31	1000	56	2800	66	2900
Mimonsoideae	90	1000	152	2800	177	2800
Papilionaceae	308	8000	482	1200	505	1400
Total	492	10000	690	17600	748	19700

Dans la famille des Légumineuses, le nombre d'espèces nodulantes est variable d'une sous-famille à une autre : 97 % des Fabacées, 90 % des Mimosacées et 23 % des Caesalpiniacées (de Faria *et al.*, 1989).

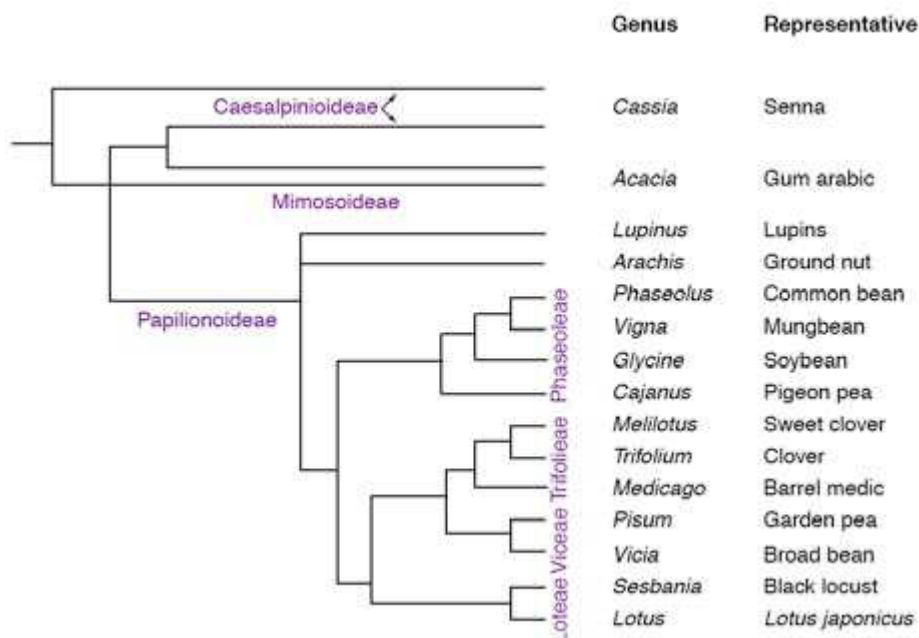


Figure 16. Phylogénie des Légumineuses : Les Légumineuses sont groupées en trois grandes sous familles : les Mimosoïdées, les Césalpinoïdées et les Papilionoïdées, comprenant de nombreuses espèces cultivées. (D'après Udvardi *et al.*, 2005).

2) Le partenaire bactérien : les bactéries du genre rhizobia

Les rhizobia sont des bactéries Gram négatif aérobies de la famille des Rhizobiacées. Depuis plusieurs années, les genres rhizobia et *Azorhizobium* ont été regroupés avec *Agrobacterium*, et les phyllobacteria dans la même famille que celle des *Rhizobiaceae* (Jordan, 1984). L'utilisation des méthodes telles que la taxonomie numérique, l'hybridation des acides nucléiques et l'analyse du 16S de l'ARN ribosomique ont montré l'existence dans cette famille de 15 genres dont 12 appartiennent à la sous-classe des α protéobactéries : *Rhizobium* (Jordan, 1982), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Ensifer* (Casida, 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Allorhizobium* (de Lajudie *et al.*, 1998), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2002), *Blastobacter* (Van Berkum et Eardly, 2002), *Phyllobacterium* (Mantelin *et al.*, 2006), *Ochrobacterium* (Zurdo Piñeiro *et al.*, 2007) et *Shinella* (Lin *et al.*, 2008) et deux genres de la sous-classe des β protéobactéries : *Herbaspirillum* (Baldani *et al.*, 1986), *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001) et *Cupriavidus* (Chen *et al.*, 2001).

Cependant, l'aptitude à noduler n'est pas commune à toutes les rhizobia, beaucoup de

bactéries non symbiotiques ont été trouvées dans la rhizosphère des Légumineuses. Elles peuvent ensuite devenir capables de noduler grâce à un transfert latéral de gènes ou une recombinaison (Eardly *et al.*, 1995).

2 1) Etablissement et fonctionnement de la symbiose rhizobienne

2 1 1) Processus d'infection et d'organogenèse nodulaire

L'établissement de la symbiose est sous le contrôle d'un dialogue moléculaire entre la bactérie et la plante-hôte. En présence de substances inductrices végétales de nature phénolique comme les flavonoïdes et les bêtaïnes, les protéines régulatrices NodD de la bactérie sont activées et induisent l'expression des gènes de la nodulation (Debellé *et al.*, 2007). L'expression des gènes nod conduit à la production de signaux bactériens les facteurs Nod ou Lipochitooligosaccharides qui jouent un rôle essentiel dans le processus d'infection et d'organogenèse des nodosités (Dénarié *et al.*, 1996) (Figure 17). Cependant, ce phénomène n'est pas universel car les travaux de Giraud *et al.*, (2007) ont montré que ces facteurs Nod n'étaient pas indispensables à l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote *Aeschynomene* - *Bradyrhizobium* (Giraud *et al.*, 2007).

Deux modes d'infection existent : l'infection intracellulaire où la bactérie pénètre par les poils absorbants (invasion cellulaire), l'infection intercellulaire ou « crack entry » au cours de laquelle la bactérie pénètre entre les cellules du cortex.

Chez les Légumineuses, deux types de nodules ont été distingués, les nodules dits déterminés et les nodules dits indéterminés. La morphologie du nodule dépend surtout de la plante-hôte et non de la bactérie associée.

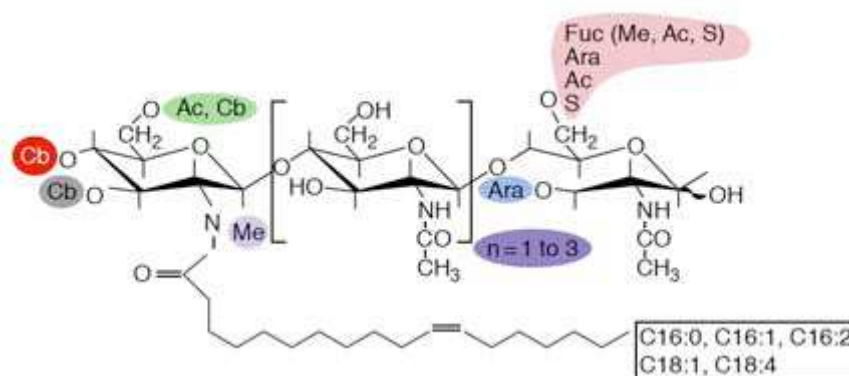


Figure 17. Structure chimique d'un facteur Nod (avec quelques substitutions observées chez les différentes espèces de *rhizobium* indiquées en couleur). Les variations les plus courantes de la chaîne d'acides gras sont également représentées. Ac, acétyl ; Ara, arabinosyl ; Cb, carbonyl ; Fuc, fucosyl ; Me, méthyl ; S, sulfuryl. (Source : Cullimore *et al.*, 2001).

2 2 2) La fixation d'azote chez la symbiose rhizobienne

Le nodule formé au cours de la symbiose rhizobienne est le siège du processus de la réduction de l'azote N_2 de l'air en ammoniac NH_4 utilisable par la plante (Boivin et Dénarié, 1998) par l'intermédiaire d'un complexe enzymatique, la nitrogénase. Cette enzyme très conservée au niveau biochimique et génétique est composée de deux métalloprotéines : la protéine I ou dinitrogénase et la protéine II ou dinitrogénase réductase de 68 000 Da (Dean *et al.*, 1993). La protéine I est un tétramère d'environ 220 000 Da. Elle est formée de deux sous-unités α et de deux sous-unités β de masses moléculaires voisines. Cette protéine contient le cofacteur à fer et à molybdène appelé FeMo-co. L'azote moléculaire est réduit en ammoniac au niveau de la protéine I. La protéine II assure le transfert des électrons libérés par la ferrédoxine.

La réaction de fixation de l'azote est la suivante :



II 2) La symbiose actinorhizienne

La symbiose actinorhizienne résulte de l'association entre l'actinomycète du sol du genre *Frankia* et les plantes actinorhiziennes (Baker et Mullin, 1992).

1) Les plantes actinorhiziennes

Les plantes actinorhiziennes appartiennent à 8 grandes familles : Casuarinacées, Elaeagnacées, Myricacées, Rhamnacées, Rosacées, Datisacées, Bétulacées et Coriacées (Wall, 2000). Elles sont réparties en 25 genres et sont composées d'environ 260 à 280 espèces d'angiospermes (Moiroud, 1996). Elles sont toutes des plantes ligneuses à l'exception de deux espèces de la famille des *Datisceae* (Dawson, 1986).

Au sein de chaque famille, seuls quelques genres forment des nodules. Les plantes actinorhiziennes constituent le deuxième groupe de plantes fixatrices d'azote et sont responsables de 15% des entrées d'azote fixé biologiquement sur terre (Wall, 2000).

Plantes pionnières très adaptées aux sols marginaux, les plantes actinorhiziennes ont une distribution cosmopolite (Tableau 3).

Certaines plantes actinorhiziennes sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique en raison d'une très grande production de molécules phénoliques possédant diverses activités antimicrobienne, antioxydant, antivirale, anti-inflammatoire et antitumorale. (Parekh *et al.*, 2005 ; Harisaranraj *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2010). Les plantes actinorhiziennes jouent un rôle important dans la réhabilitation des sols dégradés et l'amélioration de la fertilité des sols

(Baker et Mullin, 1992 ; Diem et Dommergues, 1990).

Tableau 3. Distribution des plantes actinorhiziennes par continent D'après (Baker et Schwintzer, 1990)

Continents	Genres natifs	Genre Introduits
Amérique du Nord	<i>Alnus</i> , <i>Ceanothus</i> , <i>Cercocarpus</i> , <i>Chamaebatia</i> , <i>Comptonia</i> , <i>Coriaria</i> , <i>Cowania</i> , <i>Datisca</i> , <i>Dryas</i> , <i>Elaeagnus</i> , <i>Myrica</i> , <i>Purshia</i> , <i>Shepherdia</i>	<i>Casuarina</i> , <i>Elaeagnu</i> spp.
Amérique du Sud	<i>Alnus</i> , <i>Colletia</i> , <i>Coriara</i> , <i>Discaria</i> , <i>Kentro-</i> <i>Thamnus</i> , <i>Myrica</i> , <i>Retanilla</i> , <i>Talguenea</i> , <i>Trevoa</i>	<i>Casuarina</i> , <i>Elaeagnus</i>
Afrique	<i>Myrica</i>	<i>Allocasuarina</i> , <i>Casuarina</i>
Eurasie	<i>Alnus</i> , <i>Casuarina</i> , <i>Coriaria</i> , <i>Datisca</i> , <i>Dryas</i> , <i>Eleagnus</i> , <i>Hippophae</i> , <i>Myrica</i>	<i>Casuarina</i> , <i>Gymnostoma</i>
Océanie (incluant l'Australie)	<i>Allocasuarina</i> , <i>Casuarina</i> , <i>Ceuthostoma</i> , <i>Coriaria</i> , <i>Discaria</i> , <i>Gymnostoma</i> , <i>Myrica</i>	<i>Alnus</i> , <i>Elaeagnus</i> , <i>Purshia</i>

2) Le partenaire bactérien : *Frankia*

Les bactéries du genre *Frankia* appartiennent à la classe des actinobactéries à l'ordre des Actinomycétales (Normand *et al.*, 1996b). Dans cette famille, seul le genre *Frankia* est capable de fixer l'azote (Franche *et al.*, 1998 ; Wall, 2000). Les *Frankia* sont caractérisées par une paroi à Gram positif, un génome de grande taille, un pourcentage élevé en Guanine et Cytosine (66-75%) et une croissance très lente.

Le premier isolement de ces bactéries a été effectué en 1978 à partir des nodules de *Comptonia peregrina* par (Callaham *et al.*, 1978). A la suite, de nombreuses tentatives d'isollements ont été effectuées mais elles demeurent sans succès (perte de souches, non reproductibilité de la méthode) ce qui fait que la culture de *Frankia* a été obtenue beaucoup plus tard que celle des rhizobia (Sprent et Sprent, 1990). Cependant, certaines souches de *Frankia* ne peuvent pas être cultivées (Wall, 2000).

La plupart des bactéries du genre *Frankia* ont des caractéristiques particulières : des

hyphes ramifiées, des sporanges multiloculaires, et des diazo-vésicules (cellules spécialisées pour la fixation de l'azote ; Lechevalier, 1994 ; Obertello, 2003).

3) Etablissement et fonctionnement de la symbiose actinorhizienne

Processus d'infection et d'organogenèse nodulaire

La mise en place d'un nodule actinorhizien nécessite la présence de microorganismes du genre *Frankia* qui s'approche de la racine attiré par divers exsudats. Des signaux moléculaires, les facteurs actinorhiziens excrétés par la bactérie, interviendraient dans le dialogue moléculaire entre la plante et la bactérie. La nature biochimique de ces molécules reste toujours mal connue malgré les investigations dans certains laboratoires (Prin et Rougier, 1987 ; van Ghelue *et al.*, 1997 ; Laplaze *et al.*, 2000). Les études de Cérémonie *et al.* (1999) et de Normand *et al.*, (2007) ont révélé que ces facteurs étaient probablement différents des facteurs Nod des rhizobia.

Les signaux de la bactérie, perçus par la plante, provoquent la courbure des poils absorbants qui est la première étape dans le cas d'une infection de type intracellulaire (Figure 17, 18). Chez les plantes actinorhiziennes, on peut noter deux types d'infections ; l'infection intracellulaire et l'infection extracellulaire (Figure 19).

Les nodules actinorhiziens sont des structures coralloïdes composées de multiples lobes nodulaires. Contrairement aux nodules des Légumineuses, qui sont des organes nouveaux, les nodules des plantes actinorhiziennes sont considérés comme des racines latérales modifiées.

Au niveau du nodule 4 zones peuvent être distinguées : la zone méristématique, la zone d'infection, la zone de fixation et la zone de sénescence (Figure 18).

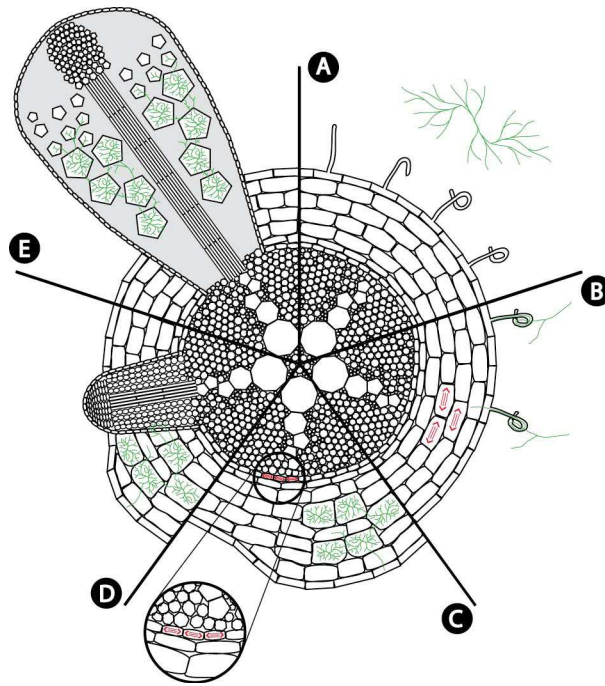


Figure 18. Processus d'infection intracellulaire et organogenèse d'un lobe nodulaire chez les plantes actinorhiziennes : (A) Echange de signaux entre *Frankia* et la plante actinorhizienne aboutit à la déformation du poil racinaire. (B) La bactérie pénètre dans un poil déformé et provoque des divisions des cellules corticales ; (C) Les cellules corticales en division sont infectées par les hyphes de *Frankia* et s'hypertrophient ce qui provoque l'apparition du pré-nodule. En même temps, quelques cellules du péricycle situées en face du pôle de xylème se divisent pour donner naissance au primordium nodulaire ; (D) Les hyphes de *Frankia* en provenance du pré-nodule envahissent les cellules corticales du nodule en formation ; (E) Nodule mature (Peret *et al.*, 2009)

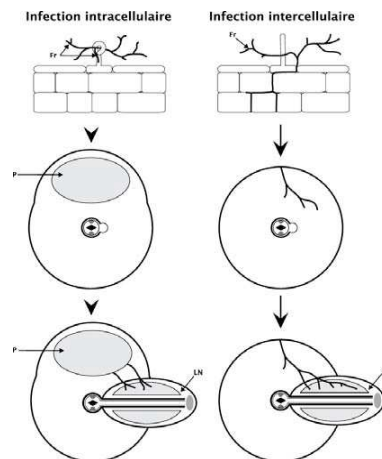


Figure 19. Infections intra et inter-cellulaire chez les plantes actinorhiziennes (Franche *et al.*, 1998) :

Infection intracellulaire (*Myrica*, *Comptonia*, *Alnus* et *Casuarina*) et infection intercellulaire (*Elaeagnus*, *Ceanothus* et *Cercocarpus*)

II 3) Histoire évolutive des symbioses fixatrices d'azote

L'étude par phylogénie moléculaire en utilisant le gène *Rbcl* d'Angiospermes capables

de fixer l'azote dans des nodules a montré que l'ensemble des plantes pouvant faire des symbioses fixatrices d'azote nodulaires était regroupé dans un seul clade, celui des Rosid I (Soltis *et al.*, 1995). Cette analyse a révélé la présence de 4 sous-clades qui présentent tous des plantes fixatrices d'azote. Un des sous-clades est uniquement constitué par des Légumineuses tandis que les 3 autres sont composés de plantes actinorhiziennes (Figure 20). La présence de plantes non fixatrices d'azote dans les 4 sous-clades ou figurent des plantes symbiotiques suggère que leur ancêtre commun ne devait pas lui-même être capable de réaliser une fixation symbiotique mais il possédait une prédisposition à la nodulation. La nodulation serait apparue de manière indépendante plusieurs fois au cours de l'évolution (Soltis *et al.*, 1995 ; Swensen, 1996).

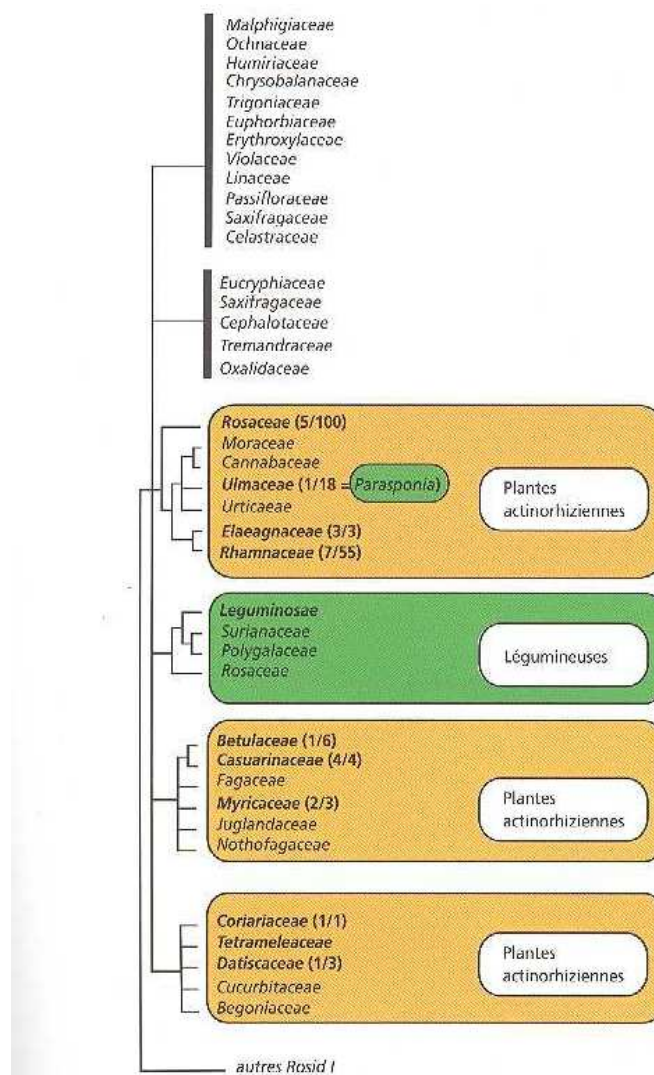


Figure 20. Arbre phylogénique représentant le clade des Rosid I chez les Angiospermes déduit des résultats des séquences *rbcl* (modifié d'après Doyle, 1998). Les familles soulignées en gras comprennent des plantes nodulées : les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de genres nodulés, par rapport au nombre total que compte la famille. Toutes les plantes qui réalisent une symbiose nodulaire sont réparties dans 4 sous-clades du clade des Rosid I.

II 4) Interaction champignons mycorhiziens et bactéries fixatrice d'azote

Beaucoup de travaux ont montré le rôle bénéfique des champignons mycorhiziens dans la symbiose rhizobia-Légumineuses (Arthursson *et al.*, 2006), mais par contre, les effets de l'interaction *Frankia*/symbiose mycorhizienne sont beaucoup moins connus. Les études de Tian *et al.*, (2002) ont montré que ces deux symbioses étaient étroitement liées et que l'établissement de la symbiose mycorhizienne stimule généralement le développement de l'actinomycète *Frankia* ainsi que la fixation d'azote.

Les champignons ectomycorhiziens et endomycorhiziens contribuent avec succès à l'établissement de la symbiose fixatrice d'azote. Dans le cas de la symbiose actinorhizienne, il a été montré chez *Casuarina* que la triple inoculation, champignon ectomycorhizien, endomycorhizien et la bactérie *Frankia*, améliorait la fixation d'azote (He et Critchley, 2008). Des études réalisées chez *Casuarina* ont montré un pourcentage de colonisation plus élevé chez les plantes inoculées à la fois avec le champignon et la bactérie (Gardner, 1986). Chez des plants de *Casuarina* inoculés avec *Glomus fasciculatum* et *Frankia*, la croissance de la plante et le taux de nodulation sont plus élevés chez les plantes inoculées avec les deux symbiotes que chez les plantes inoculées uniquement avec le champignon ou avec la bactérie (Vasanthakrishna *et al.*, 1994).

En résumé, l'intérêt de cette double inoculation résulte de l'amélioration de la performance de la plante par une active symbiose fixatrice d'azote et une augmentation des nutriments phosphatés via un prélèvement du Pi grâce au champignon.

Cependant, un effet antagoniste induisant l'inhibition de la nodulation a été observé lors de la double inoculation. Une compétition peut aussi être notée entre la bactérie *Frankia* et le champignon. L'origine de cette compétition pourrait être l'occupation des sites d'infection pour la colonisation de la racine et l'approvisionnement en nutriments minéraux permettant la survie du symbiote.

III) Techniques permettant d'étudier la fonctionnalité de la symbiose endomycorhizienne et actinorhizienne

L'inoculation des plantes avec des champignons et/ou des bactéries améliorent la croissance de la plante. Cependant des différences peuvent être observées selon la souche utilisée. Ces différences liées à l'action des souches fongiques peuvent être phénotypiquement visibles sur la plante pour ce qui est de la croissance ou alors mises en évidence à un stade plus précoce en procédant à une caractérisation histologique, histochimique des structures

formées ou bien encore en mesurant l'expression de gènes qui interviennent dans la performance de la symbiose.

1) Etude de la fonctionnalité de la symbiose endomycorhizienne

1 1) Evaluation de l'impact du champignon MA sur la plante hôte

L'étude de la fonctionnalité de la symbiose MA peut se faire en examinant les effets phénotypiques de l'inoculation par la comparaison de plantes inoculées à des plantes non inoculées. Ainsi, sont évalués généralement des paramètres de croissance comme la hauteur des plantes, la biomasse aérienne (BA) et racinaire (BR), le ratio BR/BA rapport de la biomasse racinaire sur la biomasse aérienne. Un autre moyen consiste à doser la teneur en certains éléments comme le phosphore et l'azote dans les parties aériennes. Des travaux évaluant ces paramètres ont montré que l'inoculation de *C. equisetifolia* avec le champignon MA augmente significativement la croissance en hauteur des plantes, la biomasse racinaire et totale (Rajendran et Devaraj, 2004 et Elumai et Raaman, 2009). Le rapport de la biomasse racinaire sur la biomasse aérienne (ratio BR/BA) est un outil permettant de mesurer le degré d'efficacité de la symbiose mycorhizienne (Tobar et al., 1994). Chez les plantes mycorhizées, un ratio BR/BA élevé traduit un meilleur développement du système racinaire de la plante mycorhizée ; qui à son tour influencerait le prélèvement de certains nutriments d'où les teneurs importantes en N et Pi généralement trouvées chez les plantes mycorhizées (Kang et van Iersel, 2004).

1 2) Etude de la fonctionnalité de la symbiose endomycorhizienne en visualisant les structures formées

La mycorhization d'une racine par un champignon entraîne la formation de nombreuses structures fongiques (hyphes, vésicules, arbuscules et spores). Il est généralement difficile voir impossible de dire qu'un système racinaire est mycorrhizé par les champignons MA sans passer par une coloration et une observation microscopique de ce système (Smith et Read, 1997 ; Vierheilig et al., 2001). Pour de très cas rares, cette étape de coloration n'est pas obligatoire comme l'exemple de la souche fongique *Gigaspora gigantea* qui a une forte autofluorescente (Genre et al., 2008).

Des techniques destructives et non destructives ont été développées pour observer les MA dans les racines mycorhizées:

*** Les méthodes destructives non vitales :**

Les méthodes de coloration destructives non vitales permettent d'avoir une idée sur le taux d'infection de la racine par le champignon mais ne permettent pas une distinction entre les structures mycorhiziennes actives ou sénescents. Parmi ces techniques, on peut noter :

Le bleu de trypan : Le bleu de trypan est le colorant le plus couramment utilisé au laboratoire pour visualiser les mycorhizes (Phillips et Hayman, 1970). Il permet de mettre en évidence les structures fongiques formées et d'avoir une idée sur l'infection mycorhizienne de la racine. Toutefois, cette technique présente des limites : 1) la coloration au bleu de trypan donne des images avec un faible contraste rendant les observations au microscope difficile au fort grossissement (Brundrett *et al.*, 1994), 2) le bleu de trypan a une spécificité faible dans la mesure où il colore aussi les tissus végétaux 3) la coloration des racines au bleu de trypan n'est pas permanente, les échantillons ne peuvent donc pas être conservés indéfiniment 4) le bleu de trypan a été classé comme produit cancérigène (IARC, 1987).

Le chlorale black E (CBE) : Le chlorale black E est un colorant qui donne des images plus contrastées que le bleu de trypan (Brundrett *et al.*, 1994) mais des études ont montré que comme pour le bleu de trypan, le CBE pourrait avoir des effets cancérigènes et mutagènes (Coombes et Haveland-Smith, 1982).

Le Bleu d'aniline : La coloration au bleu d'aniline est une technique qui peut se substituer au bleu de trypan car étant moins toxique (Grace et Stribley, 1991). Toutefois, les racines colorées au bleu d'aniline décolorent très vite et les images obtenues ont un contraste très faible (Brundrett *et al.*, 1984).

L'encre et le vinaigre : La coloration des racines mycorhizées peut être effectuée avec de l'encre plus du vinaigre (Vierheilig *et al.*, 1998). Cette technique de coloration semble être moins toxique dans la mesure où l'encre et le vinaigre sont couramment utilisés par l'homme. Cependant, une série de rinçages avec de l'eau déminéralisée acide est nécessaire pour maintenir la coloration. L'utilisation d'une eau basique au cours des rinçages conduit à une décoloration des racines (Vierheilig *et al.*, 2005). De plus, toutes les encres ne permettent pas de colorer les champignons MA (Vierheilig *et al.*, 2005).

Plus récemment, l'observation des structures mycorhiziennes se fait en utilisant des colorants fluorescents en combinaison avec la microscopie confocale et les images obtenues ont une grande résolution. Dans ce cadre, la technique utilisant le **WGA-488 (Wheat Germ agglutinin)** est une des plus utilisées: Le WGA-488 est une lectine de blé qui a été couplée à un fluorochrome (le vert Oregon). Le WGA se fixe sur les parois des champignons et permet

donc de marquer avec une grande précision les structures fongiques (Vierheilig *et al.*, 2005). Cette technique de coloration en combinaison avec la microscopie confocale permet d'avoir des images de grande qualité et de visualiser les structures fongiques en trois dimensions (Javot *et al.*, 2007a). Cependant cette méthode de coloration très coûteuse (Vierheilig *et al.*, 2005) est peu stable. En plus, dans des plantes avec des forts niveaux d'autofluorescence, la distinction entre le marquage du champignon par le WGA-488 et l'autofluorescence des tissus végétaux est difficile.

***Les méthodes non destructives**

Elles permettent de détecter le champignon mycorhizien sans détruire la racine. Parmi ces méthodes on peut citer celle basée sur le rouge neutre, un colorant acide permettant la détection des structures fongiques dans les racines vivantes, (Vierhelig *et al.*, 2005) ou celle utilisant l'autofluorescence de certains champignons MA (Jabaji-Hare *et al.*, 1984, Genre *et al.*, 2005). Cette dernière méthode non destructive permet une détection rapide des structures fongiques dans des tissus vivants, et permet donc de suivre l'infection par le champignon; c'est en utilisant cette technique que l'APP a été mis en évidence (Genre *et al.*, 2005).

Ces techniques de coloration ne donnent aucune idée sur le métabolisme des structures fongiques dans les racines mycorhizées. Elles sont limitantes pour l'étude de la fonctionnalité de la symbiose mycorhizienne car il n'y a pas de corrélation stricte entre l'infection mycorhizienne totale et son impact sur les plantes hôtes.

1 3) Etude de la fonctionnalité de la symbiose endomycorhizienne à l'aide de marqueurs histochimiques

*** Les méthodes destructives vitales :**

Les méthodes destructives vitales permettent de distinguer les structures fongiques actives où ont lieu les processus physiologiques (Hamel *et al.*, 1990). Généralement, ces méthodes vitales portent sur la détection *in situ* de certaines activités enzymatiques. Les activités utilisées sont la phosphatase alcaline (ALP) caractéristique du transport mycorhizien de Pi (Tisserant *et al.*, 1993) et la succinate deshydrogénase (SDH), un marqueur du métabolisme fongique (Vierheilig *et al.*, 2005).

Pour mettre en évidence les structures fongiques sénescents, c'est la production d'espèces actives d'oxygène qui est utilisée, avec un colorant spécifique comme la diaminobenzidine (DAB) (Vierheilig *et al.*, 2005).

- La **Phosphatase Alcaline (ALP)**

Les phosphatases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de liaisons organiques en libérant de l'orthophosphate (Moussain *et al.*, 1997). D'une manière générale, les plantes, les champignons et les bactéries ont une activité phosphatase acide ou alcaline avec différentes gammes de pH (Abd-Alla, 1994 ; McLachlan, 1980 ; Nyc, 1967). La phosphatase alcaline, enzyme hydrolytique détache le groupement P en position 5' et 3'. Cette activité phosphatase alcaline se situe dans la vacuole du champignon (Tisserant *et al.*, 1993) et dans les hyphes intra-racinaires (Gianinazzi *et al.*, 1979) et donc dépend du nombre et du développement de ces vacuoles (Tisserant *et al.*, 1998). La phosphatase peut catalyser la précipitation d'un colorant, le Fast Blue RR avec le Phosphate alpha naphthyl et permet ainsi de visualiser les cellules où le métabolisme est actif (Tisserant *et al.*, 1993). Ces mêmes auteurs ont noté une activité plus intense au niveau des arbuscules et des hyphes matures ; ils relèvent que l'activité ALP diminue voire même disparaît quand le nombre d'arbuscules et d'hyphes en sénescence augmente. L'activité ALP est liée au développement des structures fongiques et son augmentation pourrait être corrélée à un nombre de structures fongiques actives plus importantes dans la racine mycorhizée.

Puisque les échanges nutritionnels entre le champignon et la plante se font au niveau des arbuscules, le nombre d'arbuscules actifs matérialisé par la présence de phosphatase alcaline reflète l'efficacité de la symbiose mycorhizienne en termes d'échanges nutritionnels. Tisserant *et al.*, (1993) ont trouvé une corrélation positive entre le prélèvement de Pi et l'activité ALP. L'activité ALP détectée dans les mycorhizes à arbuscules est donc un marqueur physiologique de l'efficacité des mycorhizes.

Il existe également une méthode basée sur un fluorochrome permettant de détecter l'activité ALP (Van Aarle *et al.*, 2001).

- La **Succinate Déshydrogénase (SDH)**

La SDH est une enzyme intervenant dans le cycle de Krebs qui fournit des intermédiaires énergétiques pour la production d'ATP. Elle peut catalyser la réaction entre le succinate et le Nitro blue Tétrazolium (NBT) pour donner un précipité noir et insoluble, indicateur de la viabilité : le formazan (Pearse, 1972). Mac Donald et Lewis, (1978) utilisant le NBT ont pu déterminer une activité enzymatique uniquement au niveau de structures fongiques actives. Une baisse de l'activité SDH a été notée avec l'augmentation de l'âge des mycorhizes (Guillemin *et al.*, 1995) et aussi après application d'un fongicide (Kough *et al.*, 1987) ce qui suggère une relation entre l'activité SDH et le développement des structures fongiques. L'activité SDH est donc un autre indicateur de la viabilité des structures

fongiques et de l'efficacité de la symbiose mycorhizienne (Smith et Dickson, 1991).

- La Diaminobenzidine (DAB)

La stimulation de la production d'EAO (espèces actives d'oxygènes) a été observée en conditions de stress. Cette production d'EAO est généralement impliquée dans la résistance à l'attaque contre certains agents pathogènes. La sénescence des structures fongiques et l'accumulation des EAO sont souvent corrélées (Hause et Fester, 2005). Ces EAO peuvent être visualisées par une coloration à la diaminobenzidine (DAB) qui est oxydée par l'eau oxygénée (H_2O_2), une des espèces actives d'oxygène (EAO).

Les travaux de Salzer *et al.*, (1999) portant sur des racines de *M. truncatula* mycorhizées et colorées par la DAB ont permis de localiser l'accumulation de H_2O_2 sous forme d'un précipité au niveau des cellules corticales et particulièrement les cellules hébergeant les arbuscules. Ces auteurs ont pu noter une accumulation de H_2O_2 plus importante dans les cellules contenant des arbuscules en sénescence. L'augmentation de cette coloration DAB dans les structures fongiques permet de mettre en évidence la réduction de l'efficacité de la symbiose mycorhizienne et donc l'effet du champignon sur la plante.

1 4) Etude de la fonctionnalité de la symbiose endomycorhizienne et actinorhizienne à l'aide de marqueurs moléculaires

Aussi bien pour la symbiose mycorhizienne que pour la symbiose actinorhizienne, il existe plusieurs gènes pouvant être utilisés comme marqueurs dans le fonctionnement de ces symbioses (Hocher *et al.*, 2006 ; Guether *et al.*, 2009).

Symbiose endomycorhizienne

Au niveau moléculaire, la quantité totale de champignon peut être quantifiée en amplifiant ses ARN ribosomiaux par PCR quantitative (Isayenkov *et al.*, 2004).

Comme le transport accru de Pi est l'un des facteurs les plus importants expliquant l'amélioration de la croissance induite par la mycorhization, on peut utiliser l'expression de gènes codant des transporteurs symbiotiques de Pi en tant que marqueur de la fonctionnalité de la symbiose.

Beaucoup d'études ont été menées sur le transporteur *MtPT4* de phosphate inorganique (Pi) chez *M. truncatula*. Il a été montré par Javot *et al.*, (2007b) que ce transporteur de Pi est essentiel pour l'acquisition du phosphore mais aussi nécessaire pour le maintien des arbuscules et le développement du champignon. Chen *et al.*, (2007) ont montré que l'expression du gène transporteur de Pi *OsPT11* chez le riz, équivalent au gène *MtPT4*

chez *M. truncatula* n'est possible qu'en cas d'une bonne formation des arbuscules. D'autres résultats ont révélé que l'extinction de ces gènes se traduit par une altération précoce des structures symbiotiques et l'arrêt de la colonisation fongique (Maeda *et al.*, 2006, Javot *et al.*, 2007b). Puisque ces gènes transporteurs sont fortement impliqués dans le prélèvement de Pi pour la plante et que leur absence peut conduire à une diminution de l'efficacité de la symbiose mycorhizienne, ces gènes pourraient servir de marqueurs pour étudier le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne qui influence directement le développement de la plante.

D'autres gènes non reliés au transport de Pi ont également été utilisés comme marqueurs de la symbiose. C'est le cas de *MtENod11* une noduline précoce chez *M. truncatula*. Les travaux de Chabaud *et al.*, (2002) ont montré que le gène *MtEnod11* peut être utilisé comme marqueur de la symbiose mycorhizienne dans la mesure où il est fortement exprimé dans les cellules épidermiques et corticales envahies par les hyphes et dans les cellules corticales contenant des arbuscules.

Les chitinases gènes marqueurs de l'expression de la chitine, peuvent également être utilisées comme marqueurs dans l'étude du fonctionnement de la symbiose mycorhizienne. Ces études ont été prouvées par Salzer *et al.*, (2000) qui ont trouvé une expression spécifique de certaines chitinases chez *M. truncatula* inoculées avec un champignon MA. Cette expression est plus forte au niveau des structures mycorhiziennes matures et augmente en fonction du degré d'infection de la plante par le champignon.

Symbiose actinorhizienne

Des gènes préférentiellement ou spécifiquement exprimés dans les nodules appelés nodulines ont été caractérisés chez les espèces actinorhiziennes les plus étudiées. Ces gènes sont utilisés en tant que marqueurs du processus symbiotique nodulaire. Chez *C. glauca*, le gène *Cg12* exprimé spécifiquement dans les cellules récemment envahies par *Frankia* (Svistoonoff *et al.*, 2003) est un marqueur de l'infection tandis que *CgHb* (Jacobsen-Lyon *et al.*, 1995), un gène codant l'hémoglobine symbiotique, est associé à la différenciation des cellules fixatrices d'azote. Cette fonctionnalité de la symbiose peut également être suivie en analysant l'expression de gènes symbiotiques de *Frankia* comme ceux codant la nitrogénase (*nif*) ou la « uptake hydrogenase » (Normand *et al.*, 2007).

IV) Les Casuarinaceae : exemple *Casuarina equisetifolia*

Les *Casuarinaceae* sont des arbres à croissance rapide qui possèdent des rameaux chlorophylliens à activité photosynthétique et des feuilles réduites à des écailles verticillées cornées, limitant les pertes en eau et leur permettant de survivre dans des climats chauds et secs. En association avec *Frankia* et les champignons mycorhiziens, les *Casuarinaceae* peuvent croître sur des sols marginaux carencés en azote et en phosphore.

1) Taxonomie des Casuarinaceae

Le nom de *Casuarina* donné par Linné en 1759, fait référence à l'oiseau du nom de casoar (*Casuarinus*) par son port retombant qui a l'allure du feuillage faisant penser à son plumage (Boland *et al.*, 1994).

Les espèces de *Casuarinaceae* ont été regroupées à une seule famille sous le seul genre *Casuarina*, mais progressivement des études taxonomiques ont conduit à la subdivision du genre *Casuarina* en quatre genres. Ces différents genres sont : *Allocasuarina* (Johnson, 1982), *Casuarina* (Jonhson, 1988), *Ceuthostoma* (Jonhson, 1988) et *Gymnostoma* (Johnson, 1980). Au total, cette famille comprend 97 espèces parmi lesquelles 59 espèces appartenant au genre *Allocasuarina*, 2 au genre *Ceuthostoma*, 18 au genre *Gymnostoma* et 18 au genre *Casuarina* (Wilson et Johnson, 1989 ; Wilson et Berendsohn, 2005 ; Bisby *et al.*, 2007).

2) Caractéristiques botaniques des Casuarinaceae

C. equisetifolia est un arbre à port élancé qui possède des écorces grises et fissurées se desquamant en longues bandes longitudinales. Son feuillage persistant, rugueux, gris-vert est formé d'aiguilles implantées, fines de 15-20 cm de long. Aux nœuds des rameaux sont présentes des minuscules feuilles squamiformes et verticillées (planche 1). Ces rameaux chlorophylliens à activité photosynthétique ont des feuilles réduites à des écailles verticillées cornées, limitant les pertes en eau et leur permettant de survivre dans des climats chauds et secs. Ce sont les entre-nœuds verts qui assurent la photosynthèse. Les fleurs de *C. equisetifolia* sont apérianthées et unisexuées. Cependant, on peut trouver dans la nature des plantes dioïques comme il en est de règle chez les Casuarinacées (NCR, 1984). Les fleurs mâles sont sous forme d'épis sphériques terminaux et les fleurs femelles en glomérules avec une bractée, un pistil et des stigmates bilobés. Les fleurs mâles sont de couleur crème virant au brun et les fleurs femelles d'un brun rougeâtre (planche 1). La pollinisation se fait par le vent (NCR, 1984). Chaque carpelle s'ouvre de manière indépendante pour donner un fruit. Le fruit est en forme de cône de 1-2 cm de diamètre. Ces fruits épineux sont des akènes. Les

cônes contiennent un nombre très élevé de graines qui peuvent atteindre environ 750 000 graines/kg (NCR, 1984). Par ailleurs, le taux de germination des graines peut passer de 75% pour les graines fraîches à 40-30% pour des graines qui ont été stockées (Jerlin et Srimathi, 1997).



Planche 1. Aspects morphologiques de *Casuarina equisetifolia* (Filao) :

A : Plantation de *Casuarina equisetifolia* au Sénégal ; B : Feuille sous forme d'aiguilles ; C : Fleurs femelles en glomérules ; D : Fleurs mâles en forme d'épis ; E : Branche avec des fruits ; F : Graines.

(Sources : A : Diédhiou B. ; B : Castle, (2008) ; C, D, et F : Ouattara C. et E : [http://www.fleppc.org/ID_book/Casuarina equisetifolia.pdf](http://www.fleppc.org/ID_book/Casuarina_equisetifolia.pdf))

3) Distribution géographique des Casuarinaceae

Les Casuarinas sont originaires d'Australie. Elles se rencontrent le long des côtes en zones à climat chaud et sec, et ont été établies pratiquement partout dans le monde : Afrique du Sud, Argentine, Bangladesh, Chili, Chine, Egypte, Etats-Unis, Inde, Israël, Japon, Kenya, Mexique, Philippines, Porto Rico, Sénégal, Thaïlande, Tanzanie, Zimbabwe, depuis plus de 100 ans (Midgley *et al.*, 1983 ; Subba-Rao et Rodriguez-Barrueco, 1995 ; Pinyopusarerk *et al.*, 1996).

Les espèces de Casuarina résistent aux contraintes du milieu et s'adaptent aux sols pauvres, sablonneux et chargés en sel, ce qui explique leur large utilisation en agroforesterie, en foresterie et en sylviculture (Midgley *et al.*, 1983 ; NRC, 1984 ; Diem et Dommergues, 1990).

4) Importances écologiques des Casuarinaceae

La grande importance des Casuarina réside sur leur grande capacité à coloniser des sols dégradés et à les enrichir en minéraux. Ces plantes ont une aptitude à former une symbiose avec des actinomycètes du genre *Frankia* qui leur permet de fixer de l'azote de l'air. Les Casuarina sont des espèces qui accroissent considérablement la fertilité du sol par leur forte capacité à fixer l'azote et à améliorer la disponibilité du Pi grâce aux mycorhizes (Midgley *et al.*, 1983 ; NRC, 1984; Gadner, 1986 ; Subba-Rao et Rodriguez-Barrueco, 1995 ; Pinyopusarerk *et al.*, 1996 ; Forrester *et al.*, 2006 ; Wang et Qiu, 2006). Les sols ainsi régénérés permettent diverses productions agricoles, telles que la patate douce en Nouvelle-Guinée (Silvester, 1977), l'arachide en Inde (Kondas, 1983), ou la plantation d'arbres non-fixateurs d'azote tel qu'*Anacardium occidentale* pour la production de noix de cajou en Inde et les plantes maraîchères au Sénégal (Soumaré, 2004). Ces symbioses permettent aux *Casuarinaceae* de s'installer de façon pionnière, d'où l'intérêt de voir se développer ces arbres dans des pays où les sols sont épuisés et particulièrement carencés en phosphore et en azote. Beaucoup de travaux ont été réalisés dans plusieurs endroits montrant encore le rôle écologique important de ces plantes :

- au **Sénégal**, les plantations de *C. equisetifolia* couvrent 10 000 hectares sur le littoral Nord entre Dakar et Saint-Louis, sur une distance de 185 à 200 km. Ces plantations servent de barrières contre les dunes de sable et ont permis l'aménagement des Niayes pour l'implantation et la culture de légumes consommées par la population locale (Seck, 1985)
- en **Nouvelle-Guinée**, les plantes de *C. equisetifolia* sont utilisées avec succès en

agroforesterie depuis des siècles (Bourke, 1985)

- en **Egypte**, des cultures de *Casuarina* sont utilisées pour servir de brise-vents à des cultures maraîchères expérimentales plantées

- en **Chine**, des plantations de *C. equisetifolia* de plus d'un million d'hectares ont servi à fixer des dunes mobiles dans le sud et forment ainsi une ceinture protectrice du littoral de 300 km de long dans le désert (Zhong *et al.*, 2010).

Une particularité de *Casuarina* est la formation de **racines protéoïdes** « clusters roots » qui n'ont pas d'interaction symbiotique mais améliorent la nutrition minérale de la plante (Pi et Fe). Certaines espèces comme *C. equisetifolia*, *C. glauca* et *C. cunninghamiana* possèdent des « clusters roots » spécialisées dans le prélèvement du P à partir du sol (Diem, 1996 ; Arahou et Diem, 1997 ; Reddell *et al.*, 1997 ; Zaïd *et al.*, 2003 ; Lambers *et al.*, 2006). Il faut aussi noter que les *Casuarina* interviennent dans la séquestration du carbone. Les études de Resh *et al.*, (2002) ont montré que la séquestration de carbone est plus importante sous des plantes de *C. equisetifolia* que sous des plantes d'Eucalyptus et que ce carbone séquestré jouerait un rôle considérable dans la compensation du carbone perdu par émission. Avec une importante production de matière organique sous les plantes, il existerait un **effet allélopathie** des *Casuarina*. Le dégagement de substances allélopathiques retarde la germination des graines sous ces plantes mais aussi la croissance d'autres espèces compétitives (www.bonsaimalta.org/resources/lectures/Casuarina.pps).

5) Importances économiques des Casuarinaceae

Bien que la majorité des plantes actinorhiziennes soit représentée en milieu tropical, actuellement c'est la famille de Casuarinacées qui forme le groupe le plus introduit et le plus important du point de vue économique.

Le bois de *C. equisetifolia* est caractérisé par sa dureté, sa densité, son important pouvoir calorifique (4000-5000 kcal/kg), sa capacité à brûler (même étant humide) et à produire du charbon de très grande qualité. Cet excellent bois de chauffage est comparable au charbon industriel du fait qu'il ne dégage pas beaucoup de fumée (Rockwood *et al.*, 1983; El-Lakany, 1991 ; Subba-Rao et Rodriguez-Barrueco, 1995). Ces critères font que *C. equisetifolia* est l'espèce appelée « iron wood » (bois de fer). Son bois lourd difficile à scier (densité 0,8 à 1,2) est utilisé comme bois d'ouvrage, pour la construction navale, la confection de meubles et

d'objets divers. Ses aiguilles abondantes peuvent être utilisées comme combustible pour le fumage artisanal du poisson ou comme compost dans le maraîchage et l'horticulture (Soumaré, 2004). Les cendres du bois de *Casuarina* sont utilisées pour faire du savon (<http://www.bonsaimalta.org/resources/lectures.htm>; présentation du Dr. Alfred Grech, 29 Avril 2008).

En médecine : *C. equisetifolia* est une espèce qui a une large gamme médicinale. Les écorces extraites servent de remède contre la diarrhée, la dysenterie, le béri béri, les douleurs (les maux de tête et de ventre), les inflammations, les toux, tandis que la poudre des écorces est utilisée pour traiter les boutons du visage (Maiden 1889 ; 1913). Ces écorces contiennent du tannin dont le pourcentage varie de 6 à 8%.

Source alimentaire : *C. equisetifolia* ne constitue pas une source pour l'alimentation humaine. D'une manière générale, la valeur nutritionnelle des Casuarinacées est très limitée mais, ils sont utilisés pour cet effet en cas de famine sévère. La gomme produite par certains *Casuarina* est comestible et constitue une source de nourriture pour la population autochtone en Australie. Le feuillage est aussi utilisé en pâturage pour les animaux (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962).

Papeterie : En Inde, plus de 100 000 hectares de *C. equisetifolia* sont cultivés pour sa pulpe largement utilisée dans la fabrication du papier (Nicodemus *et al.*, 2001) - ex : « Andhra Pradesh Paper Mills expérience » (Jinendra Kumar Jain, communication personnelle).

6) Résistance aux maladies

C. equisetifolia est une espèce qui peut être attaquée par le champignon hypomycète *Trichosporium vesiculosum* qui cause la maladie appelée « blister bark » (Titze et Van Der Penne, 1983 ; Mohanan et Sharma, 1993 ; Ghosh *et al.*, 2004). La bactérie *Pseudomonas solanacearum* peut aussi attaquer les feuilles ce qui souvent conduit au jaunissement de ces dernières.

V) Objectifs de la thèse

L'objectif de ce travail est d'étudier la diversité, le fonctionnement et l'incidence des complexes symbiotiques (souche de champignons MA + bactérie *Frankia*) d'origine sénégalaise ou australienne sur la croissance de *C. equisetifolia* et sur la diversité

fonctionnelle des communautés bactériennes telluriques. Cette étude a été effectuée sur trois axes :

1) Etudier la diversité des champignons endomycorhiziens et leur influence sur la communauté bactérienne associée aux *Casuarina equisetifolia* dans leur zone d'origine et dans leur zone d'introduction

Afin d'étudier la diversité des champignons MA et de la communauté microbienne associée à *C. equisetifolia*, une collection de souches a été faite à partir de prélèvements de sols et de racines réalisés sur des arbres dans deux zones géographiques: (1) l'Australie, zone d'origine de *C. equisetifolia*, où la coévolution ancienne des deux partenaires a pu conduire à une optimisation des échanges symbiotiques et (2) les zones de plantation de *C. equisetifolia* au Sénégal, où l'introduction de *C. equisetifolia* est relativement récente, mais où l'on pourrait trouver des souches particulièrement bien adaptées aux conditions environnementales du Sénégal. Les souches ont été multipliées en serre et puis la diversité des champignons MA a été étudiée en utilisant des amorces spécifiques des Glomérormycètes tandis que la structure de la communauté bactérienne rhizosphérique a été étudiée par les techniques ARISA (Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) et PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

2) Explorer l'impact du complexe symbiotique d'origine sénégalaise ou australienne sur la croissance de *Casuarina equisetifolia* et sur la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes telluriques

Afin d'explorer l'impact du complexe symbiotique d'origine sénégalaise ou australienne sur la croissance de *C. equisetifolia* et sur la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes telluriques, des plantes de *C. equisetifolia* ont été inoculées soit avec le complexe symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise. La croissance des plantes, les biomasses, les teneurs en N et Pi des parties aériennes et le taux de colonisation par le champignon ont été évalués. L'activité catabolique montrant la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes dans le sol des plantes inoculées a été analysée.

3) Caractériser la fonctionnalité de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne chez *C. equisetifolia* inoculé avec un complexe de souches symbiotiques d'origine australienne ou sénégalaise

Afin de comprendre les bases fonctionnelles des différences obtenues entre les plantes inoculées avec le complexe symbiotique d'origine australienne et celles inoculées avec le

complexe symbiotique d'origine sénégalaise, trois approches ont été utilisées. Une approche histologique et histochimique pour étudier les structures fongiques et leur métabolisme et une approche moléculaire pour caractériser le fonctionnement des symbioses mycorhizienne et actinorhizienne.

3 ° CHAPITRE 2

Etude de la diversité des champignons mycorhiziens à arbuscules et
de la communauté bactérienne associée aux *Casuarina equisetifolia*
dans leur zone d'origine et dans leur zone d'introduction

Etude de la diversité des champignons mycorhiziens à arbuscules et de la communauté bactérienne associée aux *Casuarina equisetifolia* dans leur zone d'origine et dans leur zone d'introduction

Cette première partie des résultats permet d'apprécier la diversité des souches fongiques présentes dans les complexes microbiens et de comprendre l'impact de l'inoculation avec ces souches fongiques sur la communauté bactérienne du sol. Elle porte sur une expérimentation qui a été effectuée en serre où les plantes de *C. equisetifolia* utilisées ont été inoculées avec les complexes microbiens d'origine australienne (COA) ou sénégalaise (COS).

I) Introduction

Au Sénégal, l'implantation de *Casuarina* a été réalisée au milieu du siècle dernier (1948). Ces arbres présentent en zone sahélienne, et en particulier au Sénégal, une importance écologique et économique considérable. Ils sont largement utilisés pour la reforestation, la fertilisation des sols et la réhabilitation des écosystèmes naturels. Ils servent également de brise-vent et contribuent à la mise en valeur des sols salés. Une plantation de *Casuarina* couvrant 10 000 hectares le long du littoral Nord entre Dakar et Saint-Louis, sur une distance de 185-200 km, a été mise en place afin de fixer les dunes côtières et ainsi protéger les zones maraîchères des Niayes contre l'ensablement.

Cette essence forestière s'associe généralement avec des champignons mycorhiziens à arbuscules, beaucoup plus rarement avec des symbiotes ectomycorhiziens (Duponnois, communication personnelle) et également avec des bactéries rhizosphériques.

Cependant, les travaux de Marschner *et al.*, (2001) et Marschner et Timonen, (2005) ont montré que les champignons MA influençaient la structure de la communauté bactérienne. Marschner et Crowley, (1996) ont trouvé que même des plantes faiblement infectées par le champignon MA pouvaient modifier la structure de la communauté bactérienne. La modification de la structure de la communauté bactérienne résulte d'une modification de la quantité et/ou de la qualité des exsudats racinaires de la plante par le champignon, ce qui favorise le développement des bactéries pouvant métaboliser les nouveaux composés nouvellement sécrétés.

Toutefois, il n'existe pas à notre connaissance des publications scientifiques décrivant la diversité des souches fongiques et l'impact sur la communauté bactérienne associée chez *C. equisetifolia* (aussi bien dans sa zone d'origine que dans sa zone d'introduction). Par contre, de nombreux rapports attestent que, dans cette zone d'introduction, *C. equisetifolia* est uniquement mycorhizé par des champignons MA (Bassirou Sougoufara, communication personnelle).

Afin d'explorer la diversité des souches fongiques associés à *C. equisetifolia* et leur influence sur la communauté bactérienne du sol, une collection de souches fongiques a été créée à partir de prélèvements de sols et de racines réalisés sur des arbres dans deux zones géographiques: (1) l'Australie, zone d'origine de *C. equisetifolia*, où la coévolution ancienne des deux partenaires a pu conduire à une optimisation des échanges symbiotiques et (2) les zones de plantation de *C. equisetifolia* au Sénégal, où l'introduction de *C. equisetifolia* est relativement récente, mais où l'on pourrait trouver des souches particulièrement bien adaptées

aux conditions environnementales du Sénégal.

Ainsi, ce chapitre porte sur l'analyse de la diversité des souches fongiques et leur impact sur la communauté bactérienne du sol associée à *C. equisetifolia*. Ces analyses ont été réalisées sur des plants de *C. equisetifolia* élevés en serre dans un sol (désinfecté ou non désinfecté) prélevé sous une plantation de *C. equisetifolia* au Sénégal et inoculés par des complexes symbiotiques (*Frankia* + symbiotes fongiques) d'origine australienne ou sénégalaise.

II) Matériel et Méthodes

1) Préparation du substrat de culture

Un sol sableux prélevé dans la localité de Sagalkam près de la zone des Niayes (environ 30 km à l'Est de Dakar) a été utilisé pour étudier l'impact de l'inoculation avec les complexes symbiotiques sur la croissance de *C. equisetifolia* et sur la diversité structurale de la communauté microbienne tellurique. Ce sol de Sagalkam est caractérisé par sa pauvreté en Pi et en N (Tableau 4, annexe) (Olsen *et al.*, 1954). Une partie du sol a été homogénéisé, tamisé à 2 mm puis désinfecté à l'autoclave à 120°C pendant 20 min. Avant utilisation, ce sol désinfecté a été conservé au sec à la température ambiante afin d'éliminer les composés toxiques issus de la stérilisation à la vapeur. Des pots en polyéthylène de 1L ont été utilisés et remplis soit par du sol désinfecté ou soit par du sol non désinfecté.

2) Germination des graines de *C. equisetifolia*

Les graines utilisées dans cette expérimentation sont des graines de *C. equisetifolia* (L. Johnson) subsp *equisetifolia* (Wilson et Johnson, 1989) récoltées à Notto Gouye Diama (14° 59' 29. 89'' N ; 17° 00' 35. 97''O, lot SN/2008/0018/D au nord de la région de Thiès et qui nous ont été fournies par le PRONASEF (Programme national de semences forestières) du Sénégal. Ces graines ont été scarifiées par un trempage dans de l'acide sulfurique 95% pendant 3 min. Elles ont ensuite été rincées abondamment avec de l'eau distillée stérile, puis elles ont été désinfectées par un trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium 5% pendant 40 min. Après plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile, les graines ont été laissées sous la hotte pendant quelques heures pour sécher les surfaces. Elles ont été placées stérilement dans des boîtes de Pétri contenant du milieu H gélosé (Tableau 5, annexe). Les boîtes ont été incubées à l'étuve (27°C) pendant 72 h pour permettre la germination. Les

graines pré-germées ont été utilisées lorsque leur radicule mesurait 1 à 2 cm de long.

3) Les souches fongiques : prélèvement, multiplication, caractérisation morphologique, génétique et inoculation des plants

- Prélèvement

Deux complexes de souches fongiques ont été utilisés. 1) Un complexe de souches d'origine australienne notée COA (champignons mycorhiziens à arbuscules + *Frankia*) prélevé sous des plantations de *C. equisetifolia* au Noah Beach (au nord de Queensland, 16° 12' 32'' S - 15° 27' 27'' E, Australie) sous forme d'un mélange de sol et de racines fourni par Y. Prin (CIRAD. LSTM. Montpellier). 2) Un complexe microbien d'origine sénégalaise notée COS (champignons mycorhiziens à arbuscules + *Frankia*), formé de sol contenant aussi des fragments de racines dont le prélèvement a été effectué sous des plantations de *C. equisetifolia* à Bel-Air (Centre de Recherche de l'IRD, 14°43' N, 17°26' O, Dakar, Sénégal). Le prélèvement de ces deux échantillons de sol a été réalisé à l'horizon 0-25 cm pendant la saison sèche.

- Multiplication

Pour multiplier l'inoculum fongique par piégeage, du maïs a été utilisé comme plante piège. Le piégeage a été d'abord effectué dans des tubes PVC de 250 ml contenant du sol de Sagalkam désinfecté. Le sol prélevé sous des plantations de *C. equisetifolia* en Australie (zone d'origine de cette espèce) et au Sénégal (zone d'introduction) a été rajouté à ce substrat avant l'ensemencement des graines de maïs. Ce piégeage a été effectué en serre pendant trois mois. Ensuite, en vue d'augmenter la quantité d'inoculum, un second piégeage a été réalisé avec des pots en plastique de 500 ml en utilisant le même sol de Sagalkam désinfecté auquel les sols prélevés sous des plantations de *C. equisetifolia* en Australie (zone d'origine de cette espèce) et au Sénégal (zone d'introduction) ont été rajoutés. Pour chaque pot, trois graines de maïs ont été ensemencées.

Après 4 mois de piégeage, les plantes ont été coupées au collet. Un volume de 100 g de sol a été prélevé pour estimer le nombre de spores dans le sol. Cette extraction de spores a été effectuée selon le protocole de Gerdermann et Nicolson, (1963) utilisant une colonne de tamis à maille décroissante (400 µm, 200 µm, 100 µm).

- Caractérisation morphologique des souches fongiques

Les spores issues du piégeage (Figure 21) ont été morphologiquement caractérisées.

Pour cela, des observations ont été réalisées avec la loupe et la caractérisation des spores a été effectuée en se basant sur la taille de la spore et sur la forme de rattachement de l'hyphe selon la classification décrit dans INVAM (International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizae).

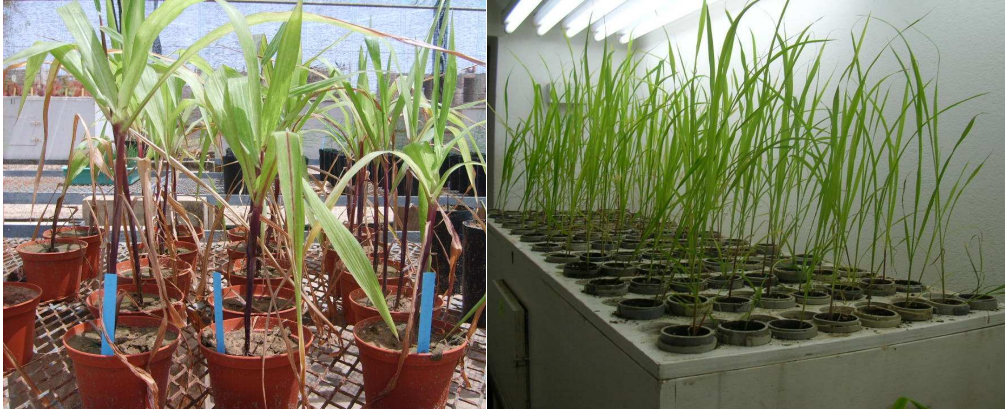


Figure 21. Piégeage avec les complexes fongiques

- Caractérisation génétique des souches fongiques

La diversité génétique fongique dans les complexes symbiotiques a été caractérisée en utilisant des racines de *C. equisetifolia* mycorhizées par ces complexes.

L'extraction de l'ADNr des champignons a été effectuée avec le kit commercial PureLink Plant (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) sur des racines (50 mg de matière sec) de *C. equisetifolia* mycorhizées selon les recommandations du fabricant. La diversité du cortège endomycorhizogène des racines a été étudiée au travers d'une banque de clones d'un fragment du gène ribosomal 25S amplifié par PCR nichée ou gigogne (GoTaq, Promega, Mannheim, Allemagne) sur la base des extraits d'ADN racinaire. La première amplification par PCR a été réalisée sur 10 ng d'ADN racinaire avec le couple d'amorces universelles des eucaryotes LR1/NDL22 (van Tuynen *et al.*, 1998; Pivato *et al.*, 2007; Farmer *et al.*, 2007 ; Tableau 6 : annexe). Cet amplifiat a ensuite été dilué 100 fois dans de l'eau ultra-pure et le diluat a été utilisé comme ADN cible dans la deuxième PCR mettant en jeu les amorces spécifiques des Gloméromycètes FLR3/FLR4 (van Tuynen *et al.*, 1998; Trouvelot *et al.*, 1999; Gollotte *et al.*, 2004). Les seconds amplifiats FLR3/FLR4 (environ 400 pb) ont été excisés sur gel agarose 2% (p/v) purifiés avec le kit PureLink Quick Gel extraction (Invitrogen) avec 30 μ l de tampon d'élution puis quantifiés en mesurant l'absorbance à 260 nm avec un spectrophotomètre Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer) (SS souches sénégalaises : 23 ng amplifiat μ l⁻¹, SA souches australiennes : 35 ng amplifiat μ l⁻¹).

Les amplifiats FLR3/FLR4 purifiés (20 ng) ont été clonés dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega, Mannheim, Allemagne) qui confère la résistance à l'Ampicilline (100 mg.L⁻¹) et les cellules bactériennes ultracompétentes XL2-Blue (Stratagène) dont le génotype est endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 Amy Cm^R] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) (Stratagène, Californie, USA) selon les recommandations des fabricants. Dans chaque cas (racines COS/COA), 96 clones blancs ont été sélectionnés au hasard et repiqués sur le même milieu sélectif. L'ADN des clones a été obtenu par lyse thermique d'un aliquot de cellules dans 50 µl d'eau ultrapure (96°C-2 min, puis 7 alternances 4°C-10 sec / 96°C-2 min) suivie d'une centrifugation à 3000 x g. Un volume de 25 µl du surnageant considéré comme extrait d'ADN du clone a été prélevé. Tous les clones ont alors été testés par PCR en utilisant les amorces plasmidiques M13f/M13r. Le séquençage a été réalisé par la société Genoscreen (Lille, France) directement sur produits PCR M13f/M13r dans un seul sens avec l'amorce référencée M13rev par Genoscreen. Au total, 47 clones de chaque banque de souches fongiques (COS et COA) ont été séquencés avec un seul échec pour la banque racines-SS. Le cladogramme a été construit selon la méthode Bootstrap Neighbour Joining (Saitou et Nei, 1987) avec le logiciel CLC Sequence Viewer 5.

- Inoculation des plantes de *C. equisetifolia* avec le complexe de souches fongiques

Afin d'introduire dans chaque pot le même nombre de propagules fongiques, la masse de sol placée dans un pot a été ajustée pour contenir 470 spores. La masse de racines inoculées dans chaque pot a été fixée à 500 mg (matière fraîche). Les racines des plantes pièges ont été découpées en de fragments d'environ 2 cm et ont été mélangées au sol du piégeage pour servir d'inoculum. L'inoculation a été effectuée selon la technique décrite par (Duponnois *et al.*, 2003).

4) Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental comprend deux facteurs : le facteur désinfection du sol et le facteur inoculation. Au total, 16 et 24 répétitions ont été réalisées respectivement pour le facteur inoculation et désinfection.

Trois traitements ont été effectués : les plantes témoins non inoculées (NI), le traitement inoculé avec le complexe microbien d'origine australienne (COA) et avec le complexe microbien d'origine sénégalaise (COS). Pour chaque traitement, 8 répétitions ont été effectuées (Figure 22).

Dispositif expérimental I

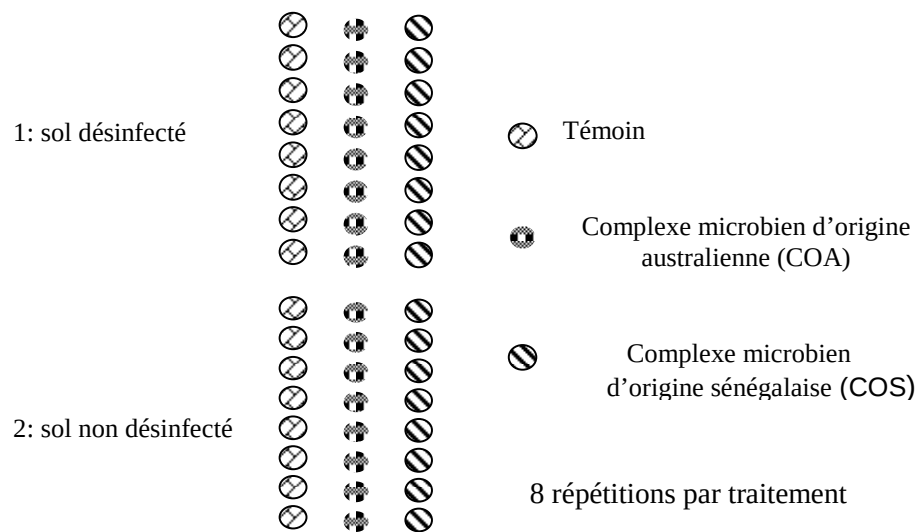


Figure 22. Dispositif expérimental

5) Impact de l'inoculation sur la diversité structurale des communautés bactériennes telluriques

La diversité totale de la communauté bactérienne a été caractérisée par deux techniques moléculaires : la première est la méthode ARISA (Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) qui permet d'amplifier l'intergène 16S-23S de l'ADNr des bactéries présentes dans les sols à l'aide des amorces S-D-Bact-1522-b-S-20 et L-D-Bact-132-a-A-18 (Normand *et al.*, 1996c ; Ranjard *et al.*, 2001 tableau 6, annexe) et la deuxième est celle de la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) qui permet d'amplifier un fragment 16S de l'ADNr des bactéries en utilisant les amorces F 338 GC et R 518 (Muyzel *et al.*, 1993). La migration de l'amplifiat a été effectuée avec un gel polyacrylamide à gradient de concentration dénaturant.

6) Analyses statistiques

Les données obtenues ont été traitées par une analyse de variance à 2 facteurs contrôlés et à un facteur contrôlé et les moyennes ont été comparées 2 à 2 en utilisant le test de Newman-Keul ($p < 0,05$).

II) Résultats

1) Diversité structurale des champignons MA associés à *Casuarina equisetifolia* dans leur zone d'origine et dans leur zone d'introduction

1 1) Caractérisation morphologique des souches fongiques

Afin de caractériser l'ensemble des morphotypes présents dans les sols des plantes inoculées avec le COA ou COS, nous avons effectué une analyse morphologique en comparant le phénotypique (couleur, taille, forme de rattachement de l'hyphe etc.) des spores présentes dans les échantillons aux données phénotypiques disponibles dans la banque de données INVAM (International Culture Collection of Arbuscular (Vesicular) Mycorrhizal Fungi).

Les résultats obtenus montrent que les spores observées dans les deux origines de sols australienne et sénégalaise appartiennent au genre *Glomus* et au genre *Scutellospora* (Figure 23). Les spores du genre *Glomus* ont une taille beaucoup plus petite comparées aux spores du genre *Scutellospora*. Elles sont de couleur beige, blanche et l'hyphe est directement rattaché à la spore alors que celles du genre *Scutellospora* majoritairement de couleur marron sont caractérisées par un hyphe suspenseur bulbiforme (Figure 23).

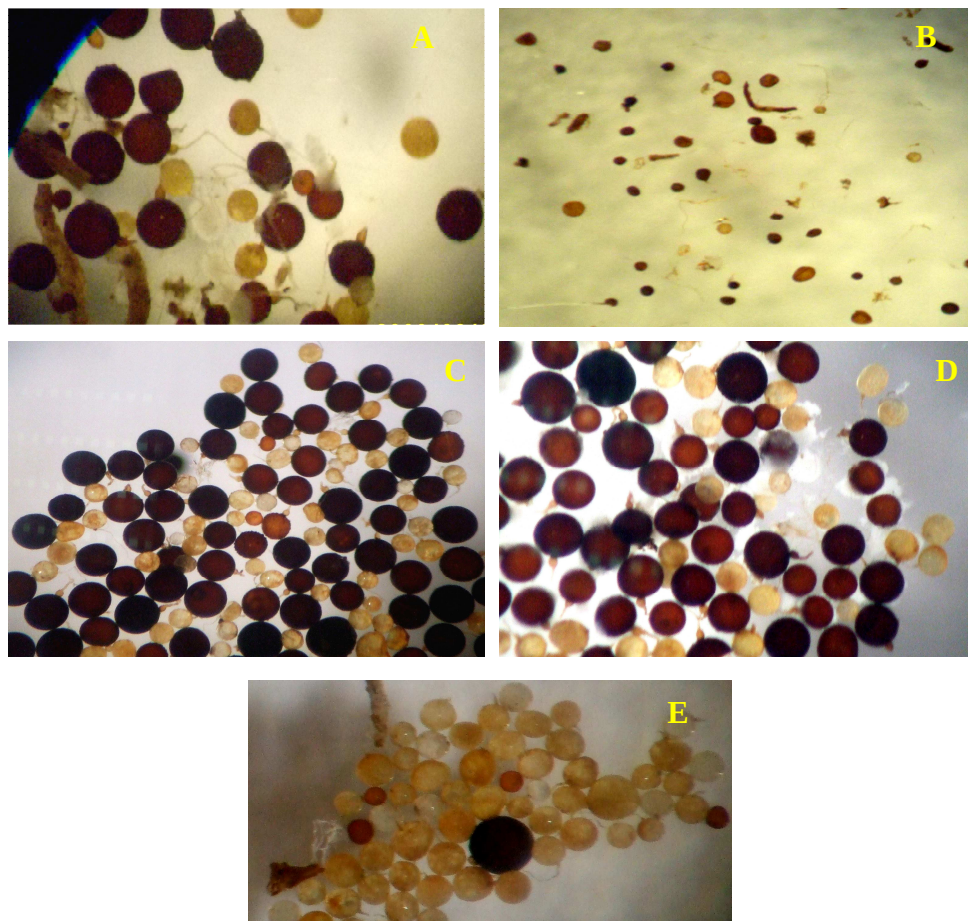


Figure 23 : Différents morphotypes de spores des champignons MA présents dans le sol des plantes après 6 mois de culture. (Grossissement X40) A : spores en sol désinfecté sous plants inoculés avec COA; B : spores en sol désinfecté sous plants inoculés avec COS ; C : spores T (témoin) en sol non désinfecté ; D : spores en sol non désinfecté sous plants inoculés avec COA ; E : spores en sol non désinfecté sous plants inoculés avec COS

Le dénombrement du nombre de spores par morphotypes effectué sur 100 g de sol a révélé que la désinfection du sol réduit considérablement le nombre total de spores (Tableau 7) et l'abondance des *Glomus* et des *Scutellospora*. Le nombre total de spores (341,3) en sol non désinfecté est réduit à (86,8) pour le sol désinfecté. Cette abondance est significativement plus importante en sol non désinfecté aussi bien pour le genre *Glomus* que pour le genre *Scutellospora* (Tableau 7).

Les résultats obtenus montrent que pour le facteur inoculation, le nombre total de spores est significativement plus important chez les plantes inoculées avec le COA (260,3) et chez les plantes non inoculées (256,5) comparées aux plantes inoculées avec le COS où ce nombre est de (125,4). Il en est de même du nombre de spores de genre *Scutellospora* qui est significativement plus important chez les plantes inoculées avec le COA et les plantes non inoculées comparées aux plantes inoculées avec le COS. Par contre, pour les spores du genre *Glomus*, il n'y a pas de différence significative entre ces trois traitements.

Des interactions significatives entre les facteurs « désinfection » et « inoculation » ont été relevées pour le nombre total de spores et pour les spores du genre *Scutellospora* alors que pour le genre *Glomus* cette interaction n'était pas significative (Tableau 7).

Tableau 7: Caractéristiques des communautés de spores de champignons mycorhiziens dans les sols (désinfecté ou non) avec différents traitements après 6 mois de culture en serre.

Facteur ⁽¹⁾	Nombre total de spores par 100 g de sol	Nombre de spores du genre <i>Scutellospora</i> par 100 g de sol	Nombre de spores du genre <i>Glomus</i> par 100 g de sol
Désinfection (Des.)			
Sol désinfecté	86,8 (27,5) ⁽²⁾ a ⁽³⁾	86,8 (27,5) a	0,0
Sol non désinfecté	341,3 (47,7) b	312,1 (45,6) b	29,3 (4,7) a
Inoculation (Inoc.)			
Témoin	256,5 (101,3) b	237,9 (94,1) b	18,6 (7,3) a
Complexe Australie	260,3 (34,1) b	248,4 (30,1) b	11,9 (6,7) a
Complexe Sénégal	125,4 (31,2) a	112,0 (26,6) a	13,4 (6,5) a
Des.	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
Inoc.	$p = 0,0031$	$p = 0,0020$	$p = 0,5036$
Interaction Des. x Inoc.	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p = 0,5036$

⁽¹⁾ Les valeurs représentent la moyenne de 24 répétitions pour le facteur «désinfection » et de 16 répétitions pour le facteur « inoculation ». ⁽²⁾ Erreur standard. ⁽³⁾ Les valeurs pour chaque colonne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keul).

1 2) Caractérisation génétique des souches fongiques

Afin de caractériser la diversité génétique, nous avons amplifié puis cloné un fragment du gène ribosomal 25S des souches fongiques dans les racines de *C. equisetifolia* mycorhizées. Le séquençage des différents clones obtenus a permis d'analyser la diversité génétique de la communauté de champignons MA dans le complexe d'origine sénégalaise et dans le complexe d'origine australienne.

Les résultats obtenus (Figure 24) montrent une importante diversité génétique des souches fongiques aussi bien dans le COS que dans le COA. Cependant, ce polymorphisme semble être plus marqué pour les souches fongiques d'origine australienne. Ce résultat est nettement visible sur l'arbre phylogénétique (Figure 24) où les clones des champignons d'origine australienne sont rattachés à plusieurs branches et se situent de part et d'autre du point de rattachement des clones de MA d'origine sénégalaise. Pour ces derniers, ils ont un seul point commun de rattachement sur l'arbre.

L'analyse génétique effectuée par blast sur NCBI en comparant les séquences des souches fongiques trouvées dans les complexes microbiens aux séquences de souches fongiques dans la banque de données, montre une forte similarité avec des champignons MA du genre *Glomus* (Tableau 8). Pour les COA, les différents types de champignons MA trouvés seraient des souches de *Glomus. sp* et de *G. mossea*. Dans le COS, les souches fongiques trouvées sont des souches de *G. intraradices*, de *G. sinuosum*, de *G. clarum* et des Uncultured glomeromycete (Tableau 8). Cependant, aucune similarité supérieure à 97% n'a pas été obtenue en comparant les souches fongiques ayant colonisées les plantes aux souches fongiques du genre *Scutellospora*.

Tableau 8. Similarités entre les séquences de souches de champignons MA obtenues et quelles souches de champignons MA disponibles dans la banque de gènes. COA : complexe symbiotique d'origine australienne, COS : complexe symbiotique d'origine sénégalaise

Pourcentage de similarité	<i>Glomus. sp</i>	<i>G. mossea</i>	<i>G. sinuosum</i>	<i>G. clarum</i>	<i>G. intraradices</i>	Uncultured glomeromycete
COA	99%	99%				
COS			98%	98%	97%	97%

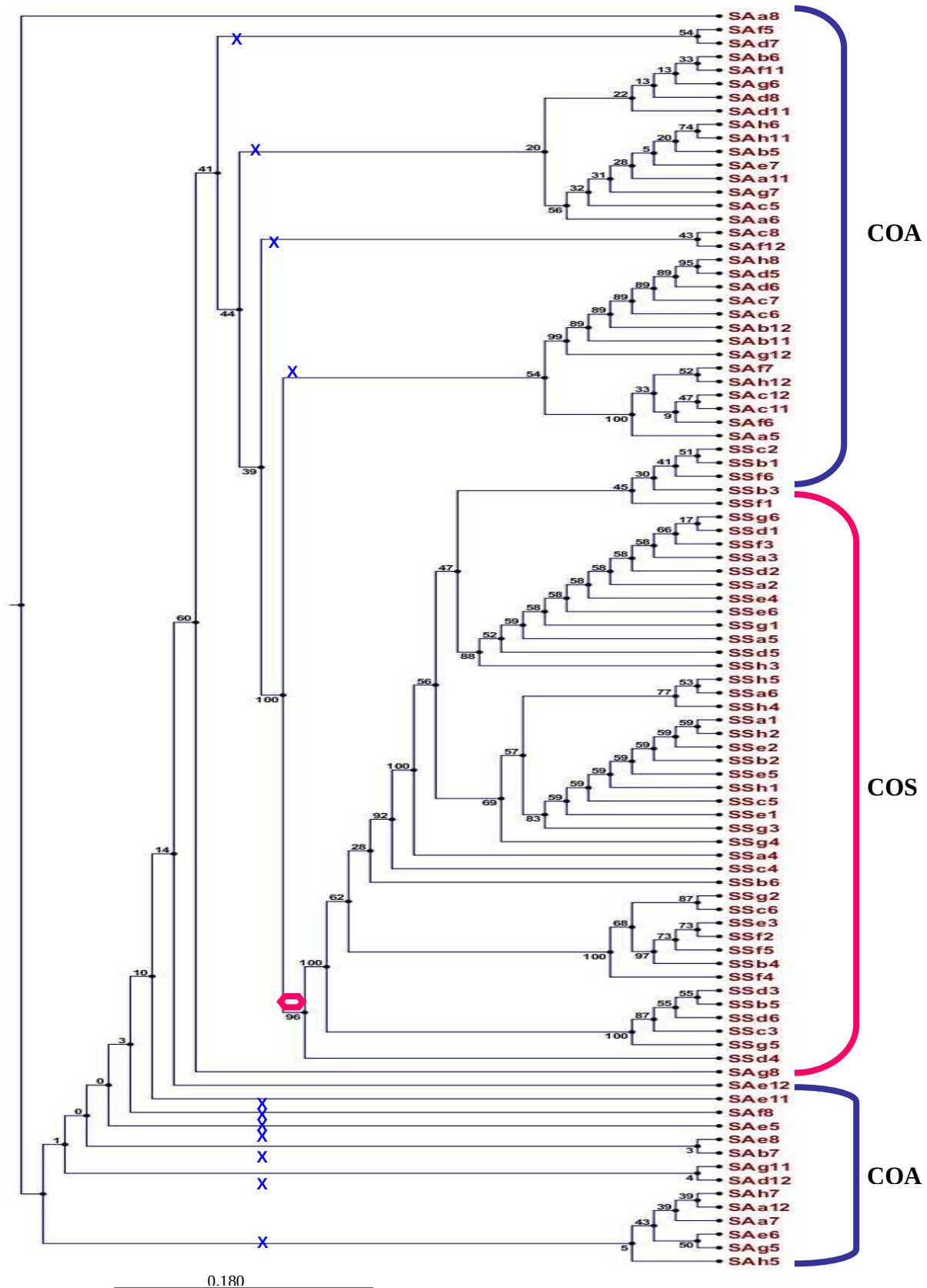


Figure 24. Arbre phylogénique montrant la diversité génétique des champignons MA dans les racines mycorhizées par les souches fongiques d'origine australienne (COA) ou d'origine sénégalaise (COS). Cet arbre est construit avec les séquences du gène ribosomal 25S en utilisant l'algorithme Neighbour Joining dont la robustesse est évaluée par la méthode de bootstrap.

2) Détermination de la diversité génétique de la communauté bactérienne dans le sol

Pour déterminer la diversité génétique de la communauté bactérienne dans le sol sous des plantes inoculées avec le COA ou le COS, nous avons utilisé deux approches : une première approche par ARISA et une deuxième par DGGE.

2 1) Détermination de la diversité génétique de la communauté bactérienne par ARISA

Afin d'estimer la diversité de la communauté bactérienne totale, nous avons analysé l'intergène 16S-23S de l'ADNr des bactéries présentes dans les sols après six mois de culture par la technique d'ARISA, une technique qui utilise un marqueur fluorescent permettant de détecter les amplicons par électrophorèse. Le nombre de pics fluorescents donnent une idée sur la diversité de la communauté bactérienne.

Le profil ARISA de la séquence de l'intergène 16S-23S de l'ADNr des bactéries obtenu (Figure 25) illustre la diversité de la communauté bactérienne par la présence de nombreuses bandes. Ces trois profils différents montrent que l'inoculation affecte la structure de la communauté microbienne du sol.

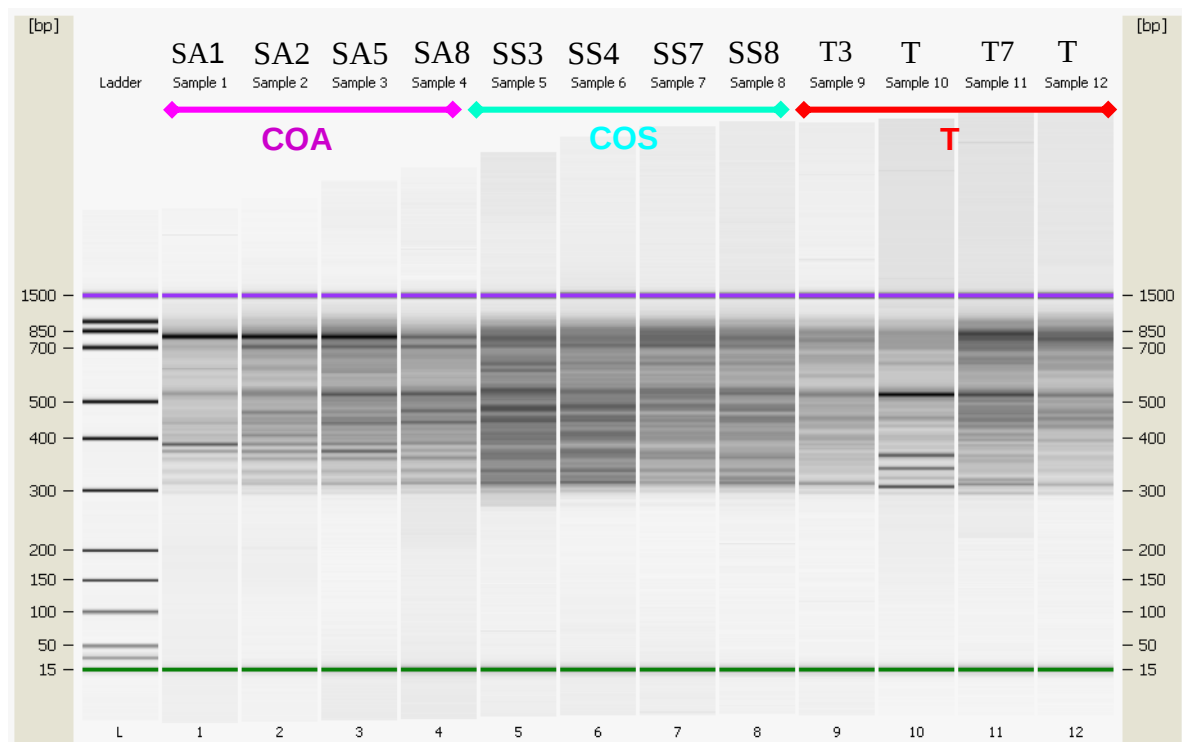
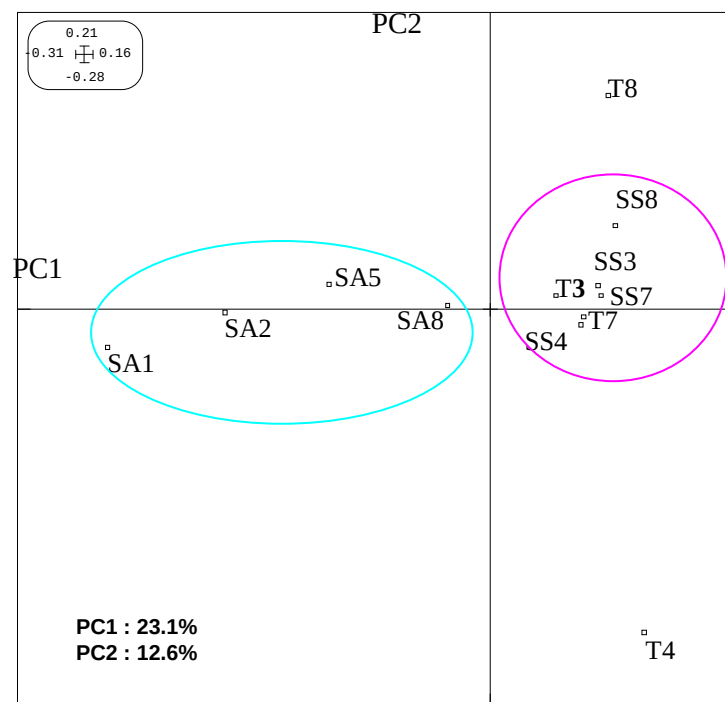


Figure 25. Reconstitution in silico par le logiciel de l'Agilent Bioanalyser 2100 (électrophorèse capillaire) d'un gel bactéries-ARISA.

T : témoin (T3, T4, T7 et T8) ; COA : complexe microbien d'origine australienne (SA1, SA2, SA5 et SA8) et COS : complexe microbien symbiotique d'origine sénégalaise (SS3, SS4, SS7 et SS8)

Ce résultat est vérifié par les analyses ACP (Figure 26) qui indiquent que la communauté microbienne totale est modifiée suite à l'inoculation avec le COA ou le COS comparée à la communauté du sol des plantes témoins. Le regroupement des points SS3, SS4, SS7, SS8, T3 et T7 suivant le même axe, montre que l'inoculation avec le COS modifierait moins la communauté bactérienne dans le sol. La dispersion des points SA1, SA2, SA5 et SA8 suivant l'axe PC1 montrent que l'inoculation avec le COA influence fortement la communauté bactérienne du sol. En résumé, cette analyse ACP montre que la structure de la communauté bactérienne du sol des plantes inoculées avec le COS serait plus proche de celle des plantes non inoculées.



Figures 26. Analyse de composante principale (ACP) des profils ARISA (Agilent 2100 Bioanalyser) Intensités relatives obtenues sur ADN des bactéries des sols sous des plantes de *C. equisetifolia*. T : témoin (T3, T4, T7 et T8), inoculées avec le COA : complexe microbien d'origine australienne (SA1, SA2, SA5 et SA8) ou le COS : complexe microbien symbiotique d'origine sénégalaise (SS3, SS4, SS7 et SS8).

2 2) Détermination de la diversité génétique de la communauté bactérienne par DGGE

Afin de renforcer notre étude sur la structure de la communauté bactérienne, nous avons réalisé une analyse génétique par DGGE de l'ADN ribosomique 16S des bactéries dans le sol (Figure 27). Cette technique consiste à amplifier un fragment et puis à faire migrer le produit de PCR sur un gel polyacrylamide dénaturant à gradient de concentration. La migration du produit de PCR par DGGE donne un ensemble de bandes traduisant généralement le nombre de bactéries dans l'échantillon de sol correspondant et montrant les différences dans le peuplement bactérien des trois sols.

Le profil DGGE obtenu montre que l'inoculation avec les complexes symbiotiques modifie la structure de la communauté bactérienne vue la différence du nombre de bandes dans le sol des plantes inoculées comparées aux plantes non inoculées.

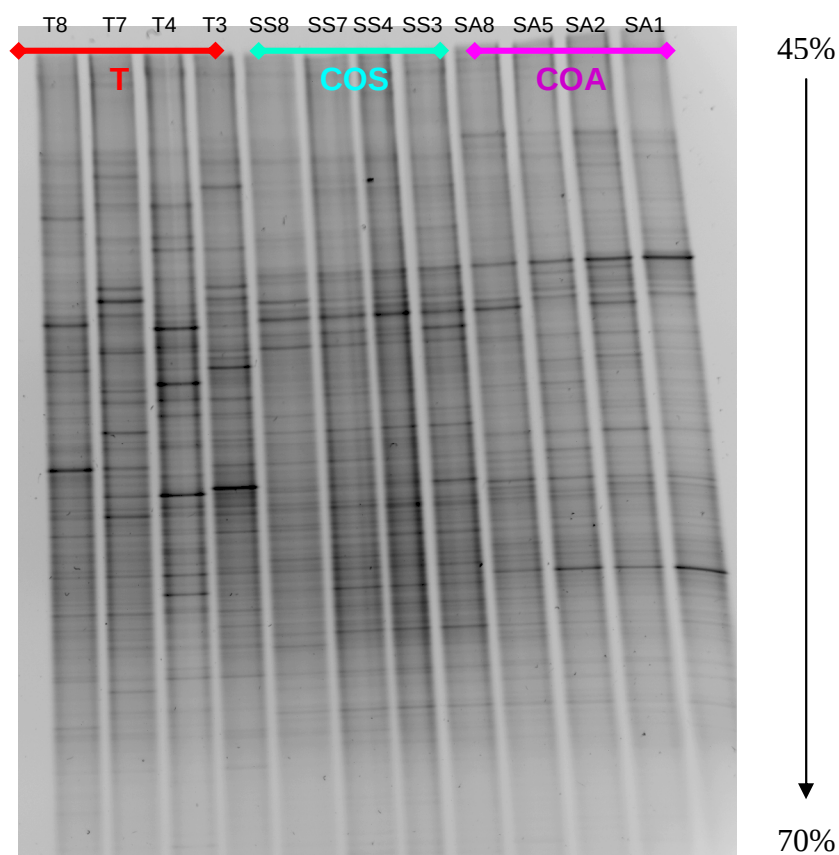


Figure 27. Profil DGGE de l'ADNr de la séquence 16S des bactéries dans le sol

T témoin (T3, T4, T7 et T8), inoculées avec le COA : complexe microbien d'origine australienne (SA1, SA2, SA5 et SA8) ou le COS : complexe microbien symbiotique d'origine sénégalaise (SS3, SS4, SS7 et SS8)

Cette variabilité est plus visible au niveau de l'ACP où la dispersion des points SA suivant l'axe CP1 est plus marquée (Figure 28). Cette ACP confirme les résultats obtenus

avec l'ARISA montrant une faible modification de la communauté bactérienne à la suite de l'inoculation avec le COS alors que l'inoculation avec le COA modifie fortement cette communauté. De plus l'ACP du profil DGGE montre que la structure de la communauté bactérienne dans le sol des plantes inoculées avec le COS serait beaucoup plus proche de celle dans le sol des plantes non inoculées. Ces résultats sont similaires à ceux observés au niveau du profil ACP de l'ARISA.

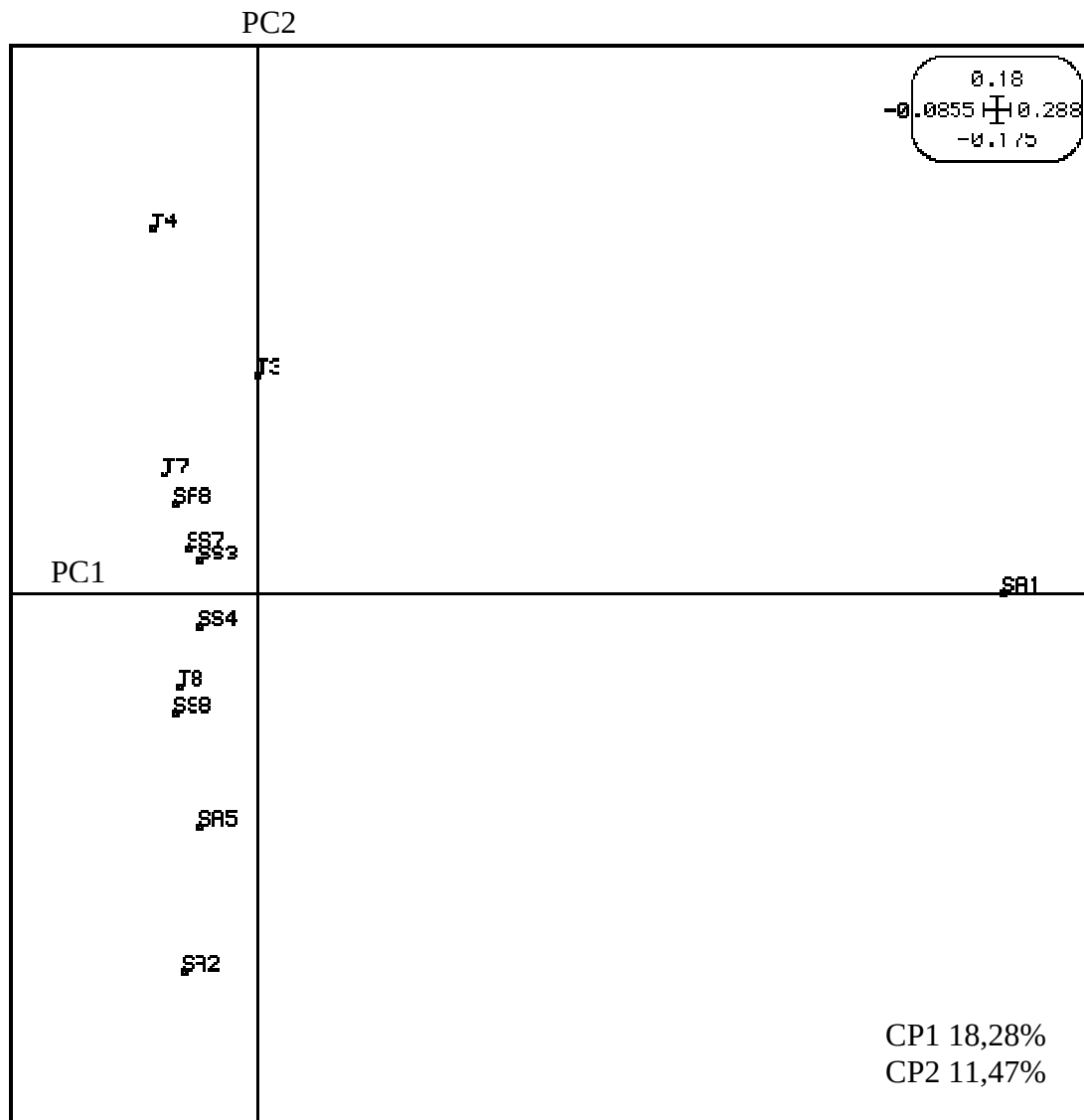


Figure 28. Analyse de composante principale (ACP) des profils DGGE. Intensités relatives obtenues sur ADN des bactéries des sols sous des plantes de *C. equisetifolia*. T : témoin (T3, T4, T7 et T8), inoculées avec le COA : complexe microbien d'origine australienne (SA1, SA2, SA5 et SA8) ou le COS : complexe microbien symbiotique d'origine sénégalaise (SS3, SS4, SS7 et SS8)

III) Discussion

1) Diversité structurale des champignons MA associés à *Casuarina equisetifolia* dans leur zone d'origine et dans leur zone d'introduction

Les résultats obtenus dans ces travaux montrent que : (i) dans les COS et COA, deux morphotypes de spores ont été trouvés ; des spores du genre *Glomus* et des spores du genre *Scutellospora*, (ii) au niveau des racines mycorhizées, les champignons MA trouvés sont majoritairement du genre *Glomus*, (iii) la communauté fongique et bactérienne sont plus variable dans le COA que dans le COS.

1 1) Caractérisation morphologique des souches fongiques

A l'issue de la caractérisation morphologique, les spores trouvées en association avec *C. equisetifolia* au Sénégal et en Australie sont soit du genre *Glomus* ou *Scutellospora*. Le nombre significatif de spores du genre *Scutellospora* trouvé dans le sol sous des plantes inoculées avec le COA comparé au nombre de spores de ce même genre dans le sol sous des plantes inoculées avec le COS pourrait être lié aux conditions écologiques différentes auxquelles les souches fongiques indigènes et exotiques ont été soumises. Les travaux de Sunita et Hippalgaonkar, (1995) ont montré que la nature des spores dans un sol pouvait être influencée par les conditions édaphiques du sol et aussi les interactions avec la plante hôte. Des résultats similaires ont été trouvés par Khan, (1971) qui a montré que la distribution spatiale des spores des champignons MA dépendait des conditions édaphiques des sols.

Dans le sol désinfecté, une diminution du nombre de spores a été observée. Des résultats similaires ont été trouvés par Sieverding *et al.*, (1991) qui ont montré que la désinfection du sol a des effets négatifs sur la communauté fongique. Ces résultats pourraient s'expliquer par des modifications des caractéristiques chimiques du sol après désinfection. Chez les microorganismes pathogènes, Bever *et al.*, (1997) et Troelstra *et al.*, (2001) ont montré que les modifications des caractéristiques chimiques du sol après désinfection pourraient influencer les flux de nutriments et réduire leur disponibilité pour les microorganismes du sol. Un faible accès des nutriments du sol par la communauté microbienne pourrait engendrer une diminution des microorganismes absorbant ces éléments minéraux.

Une baisse considérable du nombre de spores dans les sols des plantes inoculées avec le COS a été notée comparée aux sols des plantes inoculées avec le COA ou le sol des plantes non inoculées. Il est connu que certains champignons mycorhiziens ont des capacités plus ou moins importantes à sporuler dans le sol. En conséquence, ces résultats montrent que les

champignons du COS développent des stratégies de dissémination différentes de celle des symbiotes fongiques du COA. D'autres facteurs biotiques peuvent être impliqués dans ces phénomènes de multiplication. Ainsi Villenave *et al.*, (2003) ont montré que l'inoculation par des champignons MA pouvait augmenter l'abondance des nématodes saprophages et ces nématodes saprophages sont des agents nuisibles au développement du mycélium et réduisent ainsi le potentiel infectieux du sol d'où un nombre de spores faible dans ces sols.

De même, beaucoup d'études ont montré que la production des spores dans le sol varie en fonction des saisons ce qui veut dire que la détermination du nombre de spores dans le sol à un stade donné peut ne pas refléter globalement la diversité des champignons fongiques présentes dans ce sol (Gemma *et al.*, 1988 ; Clapp *et al.*, 1995; Kjoller et Rosendahl, 2001).

1 2) Caractérisation génétique des souches fongiques

L'arbre phylogénétique construit à partir des séquences de clones du gène ribosomal 25S des champignons indique que la population de champignons MA dans le sol prélevé sous des plantations de *Casuarina* en Australie est différente de celle prélevée sous des plantations de *Casuarina* au Sénégal. Des résultats similaires ont été trouvés par Bever *et al.*, (1996) qui ont montré que des associations préférentielles existent entre la plante et le champignon. Ces associations résulteraient d'une spécificité écologique entre le champignon et la plante. Ces résultats suggèrent que la variabilité notée au sein des communautés fongiques dans notre étude serait plutôt liée aux conditions environnementales vue que la plante hôte est la même dans cette expérience. Ces résultats sont confirmés par Porter *et al.*, (1987) qui ont trouvé que certains facteurs abiotiques comme le pH du sol influençaient la structure de la communauté fongique.

La présence importante de souches de *Glomus* montre que *C. equisetifolia* est préférentiellement mycorhizée par les *Glomus*. Ces résultats rejoignent ceux notés par Bassirou Sougoufara (communication personnelle) c'est-à-dire que dans la zone des Niayes, *C. equisetifolia* est majoritaire associée aux champignons MA de genre *Glomus*. Certains travaux réalisés par (Porter *et al.*, 1987) ont montré que ces champignons du genre *Glomus* étaient plus abondants dans des sols à pH très élevé ce qui montre l'influence des conditions environnementaux sur la structure de la communauté fongique.

Cependant, la très faible homologie notée entre les clones MA et la souche fongique du genre *Scutellospora* montre que la communauté de spores caractérisée morphologiquement à partir du sol ne reflète pas entièrement celle trouvée en utilisant les racines mycorhizées. Des

résultats similaires ont été trouvés par Clapp *et al.*, (1995); Kjoller et Rosendahl, (2001). Ce type de résultats pourrait s'expliquer par le fait que la colonisation par le champignon ne dérive pas dans ce cas des spores mais d'autres propagules comme le réseau mycélien extramatriciel (Read et Birch, 1988; Brundrett et Abbott, 1994).

2) Détermination de la diversité génétique de la communauté bactérienne du sol

L'inoculation avec les complexes symbiotiques chez *C. equisetifolia* modifient positivement la structure de la communauté bactérienne. Des résultats similaires ont été trouvés par Roesti, (2005) et Vestergård *et al.*, (2008) qui ont montré que la structure des communautés microbiennes dépendait des champignons endomycorhiziens.

Ces modifications de la structure de la population bactérienne pourraient être liées à une action directe et indirecte des champignons MA. Les travaux de Andrade *et al.*, (1998) ; Graham *et al.*, (1981) ; Marschner *et al.*, (1997) ont montré que les champignons MA modifiaient la physiologie de la plante et en conséquence son exsudation racinaire ce qui aboutissait à des modifications dans la structure des peuplements bactériens mycorhizosphériques qui jouent un rôle important dans l'établissement de la symbiose mycorhizienne.

Cette modification de la communauté bactérienne est plus forte chez les plantes inoculées avec le COA. Ce résultat pourrait être influencé par 1) l'introduction de bactéries d'origine australienne qui se rajouteraient aux bactéries déjà présentes dans le sol ou par 2) celle des souches fongiques puisque ces souches fongiques ont la capacité de sécréter des substances ayant un effet sélectif sur la communauté bactérienne. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Meyer et Linderman, (1986) et Hobbie, (1992) qui ont montré l'effet sélectif du champignon sur la communauté bactérienne.

Parallèlement, Toljander *et al.*, (2007) ont montré que ces exsudats fongiques renforçaient la vitalité des bactéries du sol. Ces différences dans la composition du cortège mycorhizien entraînent également des modifications au niveau de la microflore totale. Il est connu que les caractéristiques génétiques de la microflore mycorhizosphérique sont fonctions des caractéristiques des symbiotes associés à la plante hôte (Kisa *et al.*, 2007).

IV) Conclusion

La caractérisation morphologique et génétique montre la présence de deux genres de spores ; le genre *Glomus* et le genre *Scutellospora* qui sont aussi bien trouvés dans le complexe symbiotique sénégalais que dans le complexe symbiotique australien.

Les résultats obtenus montrent aussi que l'inoculation avec les complexes COA ou COS modifient la communauté bactérienne tellurique et que la microflore mycorrhizosphérique du traitement avec le COS serait plus proche de celle des plantes témoins.

4° CHAPITRE 3

Effet de l'inoculation avec un complexe microbien (*Frankia* et
champignons mycorhiziens à arbuscules) sur la croissance de
Casuarina equisetifolia et sur la diversité fonctionnelle des
communautés bactériennes telluriques

Effet de l'inoculation avec un complexe microbien (*Frankia* et champignons mycorhiziens à arbuscules) sur la croissance de *Casuarina equisetifolia* et sur la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes telluriques

Cette partie des résultats a fait l'objet :

1) D'une communication orale au **4th International Casuarina Meeting**: Improving smallholder livelihoods through improved *Casuarina* productivity (22-25 March 2010, Haikou, Hainan, China)

2) D'un article qui sera publié dans le proceedings book de ce congrès

Nathalie Diagne, Sergio Svistoonoff, Claudine Franche, Aboubacry Kane, Didier Bogusz, Diégane Diouf & Robin Duponnois (2010). Characterization of endomycorrhizal strains from *Casuarina equisetifolia* to be used for reforestation and rehabilitation of degraded ecosystems in Senegal

3) D'une présentation orale à l'atelier International « **LES MYCORHIZES** »

“Les mycorhizes un outil pour le développement durable en Afrique” 21-23 Février Dakar

Cette seconde partie des résultats est un complément de la première partie. Elle a permis de voir l'effet du champignon sur la croissance de la plante et l'impact de l'inoculation avec le COA ou le COS sur la diversité fonctionnelle de la communauté bactérienne du sol.

I) Introduction

La symbiose mycorhizienne joue un rôle important dans l'amélioration de la croissance et du développement de la plante (Smith et Read, 2008). De nombreux travaux attestent de l'importance de cette symbiose mycorhizienne chez beaucoup d'espèces végétales à l'exemple des Casuarinacées (Rose, 1980 ; Reddell *et al.*, 1986, Thoen *et al.*, 1990 ; Dell *et al.*, 1994 ; Duponnois *et al.*, 2003). Il a été démontré que l'association des essences forestières avec les champignons mycorhiziens augmente la performance de ces plantes en agroforesterie. Toutefois, l'effet de la symbiose mycorhizienne sur le développement de la plante ne résulte pas uniquement des relations bidirectionnelles entre le symbiote fongique et la plante hôte mais serait également influencé par d'autres composantes microbiennes telles que la microflore mycorhizosphérique. Dans ce volume de sol influencé par le champignon mycorhizien se trouve une communauté de microorganismes qui interagit à la fois avec le champignon et la plante. Ces bactéries mycorhizosphériques associées à la plante jouent un rôle important dans la nutrition de celle-ci, dans l'amélioration de sa croissance, le maintien de la diversité et du fonctionnement des écosystèmes (Van der Heijden *et al.*, 1998 a, b).

Cependant, des études récentes ont montré que les champignons MA influençaient la diversité fonctionnelle de la communauté bactérienne (Marschner et Timonen, 2005, Dabire *et al.*, 2007). Cette influence sur la diversité fonctionnelle des microorganismes est directement liée à la modification de la composition des exsudats racinaires par le champignon (Marschner *et al.*, 1997).

Cependant, une étude couplant l'efficacité (agressivité, effet sur la croissance de l'hôte) et l'impact sur la communauté bactérienne tellurique des peuplements de champignons MA associés à *C. equisetifolia* n'a été réalisée. Les travaux de Klironomos, (2003) ont montré que l'effet des champignons MA est optimal pour les couples associant pour une espèce végétale donnée, les champignons MA isolés de la zone native de cette plante. Cependant, il n'existe pas à notre connaissance d'études comparant la réponse de *C. equisetifolia* aux champignons MA de son aire d'origine à la réponse de ce même arbre aux symbiotes MA de son aire d'introduction.

Dans ce chapitre nous présentons l'étude de l'impact de l'inoculation avec un complexe symbiotique d'origine australienne (COA, zone d'origine de *C. equisetifolia*) ou avec un complexe symbiotique d'origine sénégalaise (COS, zone d'introduction) sur la croissance de *C. equisetifolia* et sur la communauté microbienne du sol.

Cette expérience a été effectuée avec des plantes de *C. equisetifolia* inoculées par le

complexe symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise en sol désinfecté et non désinfecté. Au bout de 6 mois, la croissance en hauteur, les biomasses (aérienne, racinaire et totale), les teneurs en azote et phosphore des parties aériennes, la fréquence et l'intensité de mycorhization des plantes ont été déterminées. En parallèle, l'effet de ces complexes symbiotiques sur la diversité fonctionnelle de la microflore du sol a été étudié.

II) Matériel et Méthodes

1) Expérience en serre

Les analyses réalisées dans ce chapitre ont été effectuées avec les plantes de *C. equisetifolia* inoculées avec les COA ou COS de l'expérimentation décrite dans la partie précédente. La diversité structurale et fonctionnelle de la communauté microbienne a été déterminée avec le sol de culture non stérile utilisé dans cette expérimentation.

2) Mesure de la croissance en hauteur, la biomasse aérienne, racinaire et la biomasse totale des plants de *Casuarina equisetifolia*

La croissance en hauteur (cm) des plants a été mesurée chaque mois en utilisant les graduations de la règle. Après 6 mois de culture en serre, les plantes ont été dépotées et les poids secs (65°C, 1 semaine) des biomasses aériennes et racinaires produites dans chaque traitement ont été pesées.

3) Evaluation de la mycorhization des plantes de *C. equisetifolia* inoculées avec les complexes symbiotiques par une technique de coloration classique

Pour évaluer le taux et l'intensité de mycorhization de chaque plante, 100 fragments d'environ 1 cm chacun ont été prélevés par plante. Après un rinçage abondant à l'eau distillée, les fragments racinaires ont été décolorés après incubation dans du KOH 10% à 90°C. Ce temps d'incubation peut varier de quelques heures suivant la lignification des racines et souvent un remplacement de la solution de KOH au fur du processus de décoloration est nécessaire. Les fragments racinaires bien décolorés ont été rincés dans de l'eau distillée. Pour visualiser les structures fongiques. Ces fragments racinaires ont été colorés au Bleu de Trypan (Tableau 9, annexe) en les incubant dans une solution de Bleu de Trypan à 90°C pendant 30 min (Philips et Hayman, 1970). La fréquence de mycorhization ainsi que l'intensité de mycorhization ont été analysées selon la méthode de Trouvelot *et al.*, (1986) utilisant une gamme d'intensité de colonisation notée de zéro (0) à cinq (5) (Figure 29, annexe).

4) Dosage des teneurs en N et Pi des parties aériennes des plantes

Les analyses minérales en N et P des parties aériennes des plants ont été réalisées par le LAMA ; US191 IMAGO (le laboratoire des moyens analytiques ; Instrumentation, Moyens Analytiques, Observatoires en Géophysique et Océanographie IRD/Sénégal), du centre de recherche ISRA/IRD de Bel Air. Les parties aériennes sèches ont d'abord été broyées, puis calcinées à 500 °C. Le phosphore total a été dosé par colorimétrie (John, 1970) en traitant les tissus calcinés dans 2 ml HCl 6N et 10 ml HNO₃ 1N. L'azote total a été dosé selon la méthode Kjeldhal, en traitant les tissus dans 15 ml H₂SO₄ 18 N contenant 50 g.l⁻¹ d'acide salicylique.

5) Etude de la communauté de *Pseudomonas* fluorescents dans le sol

Pour isoler, dénombrer et caractériser la communauté de *Pseudomonas* fluorescent présente dans le sol de culture des plants de *C. equisetifolia*, 10 g de sol ont été prélevés pour chaque traitement (plants non inoculés : NI, inoculés avec le COS ou COA). Un volume de 100 ml d'eau stérile a été rajouté au 10 g de sol et le mélange a été vigoureusement agité. Des dilutions sériées au 10^{ème} ont été réalisées. L'ensemencement suivie de la purification ont été réalisés selon la méthode décrite par (King *et al.*, 1954) en utilisant du milieu gélosé King B (Tableau 10, annexe).

6) Analyse de la diversité génétique des souches de *Pseudomonas* fluorescents

Pour chaque traitement, vingt colonies de *Pseudomonas* ont été mises en suspension dans du milieu King B et conservées dans du glycérol 60% (v/v). De chaque suspension, un microlitre a été prélevé et rajouté dans 50 ml du tampon (0,05 M NaOH, 0,25% SDS), vortexé pendant 1 min, chauffé à 95°C pendant 15 min et puis centrifugé à 13000 rpm pendant 10 min. La suspension cellulaire ainsi obtenue a été diluée avec de l'eau distillée (1/10, v/v) avant d'amplifier le 16S de l'ADNr. Les amorces utilisés pour amplifier l'ADNr 16S sont des amorces spécifiques des *Pseudomonas* rD1 et fD1 (Weisburg *et al.*, 1991) (Tableau 6, annexe). L'amplification de l'ADN a été effectuée selon la méthode de Assigbetse *et al.*, (2005) modifiée.

Etude du Polymorphisme de la longueur des Fragments de Restriction (RFLP)

La diversité des *Pseudomonas* a été étudiée en effectuant une analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction avec deux enzymes bactériennes (endonucléases) *Hae*III (5'-GG/CC-3') et *Msp*I (5'-C/CGG-3').

Un fragment de plus de 1000 pb du gène ribosomal 16S a été réamplifié à partir d'extraits

d'ADN des souches (aliquot de colonie bactérienne porté à ébullition pendant 10 min dans 200 µl d'eau ultra pure, puis centrifugé pendant 10 min à 10000 rpm). L'amplification a été effectuée avec les amorces FGPS1509 (Normand *et al.*, 1992) et 16S-1080r (Sy *et al.*, 2001). Pour chaque souche, 100 µl d'amplifiat ont été déposés sur agarose 1% (p/v) puis excisés et purifiés avec QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les produits PCR ainsi purifiés ont été quantifiés sur un deuxième gel agarose 1% (p/v) par comparaison visuelle

au marqueur Smart Ladder (Eurogentec, Angers, France). Le séquençage a été réalisé par la compagnie Genoscreen (France, Lille) avec les mêmes amorces FGPS1509/16S-1080r. Les séquences ont été comparées à celle de la banque de gène « GenBank » par l'utilisation du programme blastn 2.2.22. Les séquences brutes ont été corrigées sur ChromasPro (1.4.9.0), alignées sur ClustalX (1.81) et vérifiées manuellement sur Genedoc (2.7.0.0). Le cladogramme a été construit selon la méthode Neighbour Joining avec le logiciel TreeView.

7) Etude de la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes telluriques

7 1) Estimation de l'activité microbienne totale par la mesure de l'activité fluorescéine diacétate (FDA)

L'activité fluorescéine diacétate (FDA) a été évaluée en sol non stérile dans des tubes Pyrex® de 18 ml contenant 1 g de sol. Pour chaque échantillon de sol, 3 répétitions biologiques avec chacune 3 triplicats techniques ont été réalisées. Le tampon du mélange a été constitué par du potassium phosphate à 60 mM pH 7,6. L'expérimentation a été réalisée avec 2 témoins : un témoin enzyme et un témoin substrat (voir ci-dessous)

- TS (témoin substrat) : 15 ml de tampon + 200 µl de substrat de FDA
- TE (Témoin Enzyme) : 15 ml de tampon + 200 µl d'eau stérile + 1g de sol
- E (Essais) 3 essais : 15 ml de tampon + 200 µl de substrat de FDA + 1g de sol

Avant d'être rajouté au mélange, le substrat de FDA (Sigma®) a été dilué dans de l'acétone pure 100 % (p/v) à raison de 1 mg.ml⁻¹ (solution mère). Les tubes ont été vortexés avant d'être incubés sous agitation à 30 °C (Adam et Duncan, 2001) pendant 1 h. Après incubation, 1 ml du mélange de chaque tube a été récupéré dans un tube Eppendorfs auquel 1 ml d'acétone a été rajouté pour arrêter la réaction. Ce mélange ainsi obtenu a été légèrement homogénéisé puis centrifugé pendant 5 min à 1000 rpm. Pour chaque tube, 1 ml a été prélevé pour lire la quantité de fluorescéine produite dans chaque tube au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 490 nm (Schnürer et Rosswall, 1982). La concentration de fluorescéine produite durant la réaction a été mesurée à l'aide d'une gamme de concentrations standards (0

$\mu\text{g.mL}^{-1}$; 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) préparée à partir d'une solution de fluorescéine de concentration (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans de l'acétone pure). La concentration standard 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a été utilisée pour faire le zéro du spectrophotomètre avant la lecture. La quantité de fluorescéine est exprimée en $\mu\text{g FDA/g de sol/h}$.

7 2) Mesure de la diversité catabolique des communautés microbiennes du sol

Pour mesurer la diversité fonctionnelle microbienne du sol, nous avons évaluée la respirométrie induite par un substrat (SIR) des communautés microbiennes selon la méthode décrite par Degens et Harris (1997). Trente deux (32) substrats composés d'acides aminés, d'hydrates de carbone, d'alcool, d'acides organiques et d'amides ont été utilisés pour évaluer la capacité de la microflore tellurique à cataboliser chaque substrat (Tableau 11, annexe). Les concentrations des substrats organiques utilisés sont indiquées dans ce tableau.

Pour chaque échantillon de sol, 1 g de sol sec a été prélevé dans des tubes de 10 ml. Dans ces tubes, le substrat et 2 ml d'eau distillée stérile ont été rajoutés (West et Parling, 1986). La production basale de CO_2 provenant de l'activité respirométrie dans le sol pour chaque échantillon de sol a été également déterminée en ajoutant 2 ml d'eau distillée stérile dans 1 g de sol sec. Après la mise en suspension des échantillons de sol dans chaque mélange aqueux, les tubes ont été immédiatement fermés et incubés à 28 °C pendant 4 h. Les flux de CO_2 provenant des sols ont été mesurés en utilisant un analyseur de gaz à infrarouge (IRGA) (Polytron IR CO_2 , DrägerTM) en combinaison avec un compteur de débit de courant ascendant (Heinemeyer *et al.*, 1989). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{gCO}_2/\text{g}^{-1}\text{soil/h}^{-1}$. La diversité catabolique (mesure de la variabilité relative des fonctions cataboliques) a été calculée en utilisant l'indice de Simpson-Yule avec $E = 1/p_i^2$ avec p_i = quantité de CO_2 produite à partir d'un substrat donné / quantité totale de CO_2 produite, émise en réponse.

7 3) Mesure de la diversité fonctionnelle des souches de *Pseudomonas* fluorescents sur trois milieux de culture : milieu TCP, CAS et Lipolytique

La diversité fonctionnelle des colonies de *Pseudomonas* fluorescents obtenues après purification a été estimée en utilisant 3 milieux de cultures révélant les activités de *Pseudomonas* fluorescents ; 1) le milieu TCP afin de mesurer la capacité des souches à solubiliser un phosphate inorganique complexe tricalcium orthophosphate (Tableau 12, annexe), 2) le milieu lipolytique pour mesurer la capacité à produire des enzymes lipolytiques (Tableau 13, annexe) et 3) le milieu CAS pour mesurer la capacité des souches à produire des sidérophores (Tableau 14, annexe). La croissance des souches de *Pseudomonas* cultivées dans

ces différents milieux a été déterminée par la mesure du diamètre de la colonie et du halo formé tous les deux jours. Leur capacité solubilisatrice du TCP est notée de « - » ou « + » en fonction de l'apparition d'un halo translucide autour de la colonie. Cette notation a également été suivie pour le milieu CAS où l'apparition d'un halo de couleur orangée autour des colonies est notée (+) et une non apparition (0). Pour le milieu « lipolytique », l'activité des souches a été révélée par l'apparition de cristaux de laurate de calcium autour des colonies.

8) Analyses statistiques

Les données obtenues ont été traitées par une analyse de variance à 2 facteurs contrôlés et à un facteur contrôlé et les moyennes ont été comparées 2 à 2 en utilisant le test de Newman-Keul ($p < 0,05$). Les distributions des souches bactériennes en fonction de leur origine et selon leurs propriétés fonctionnelles ont été comparées par le test χ^2 ($p < 0,05$). Avant leur traitement statistique, les taux de mycorhization ont été transformés par la fonction Arc sin ($\sqrt{x}$). Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview™.

L'analyse inter-groupe (Between Group Analysis, BGA ; Culhane *et al.*, 2002) a été utilisée pour comparer les profils cataboliques des sols des différents traitements en utilisant le logiciel R.

III) Résultats

1) Effet de l'inoculation avec le complexe microbien symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur la croissance en hauteur des plants de *C. equisetifolia*

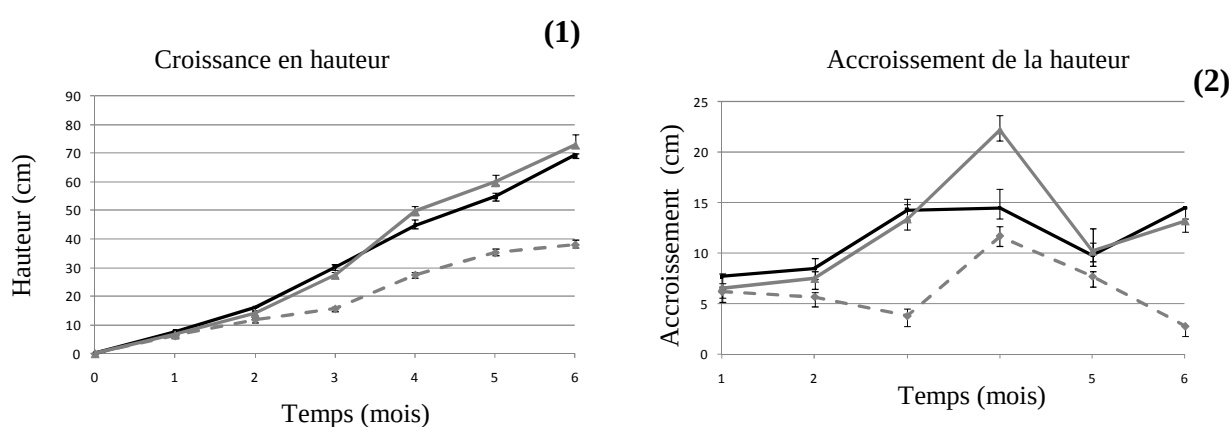
L'inoculation avec les complexes symbiotiques microbiens stimule significativement la croissance en hauteur des plantes de *C. equisetifolia* dans le sol désinfecté et dans le sol non désinfecté (Figure 30 A1 & 30 B1). Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative entre la croissance en hauteur des plants de *C. equisetifolia* inoculés avec le COA et ceux inoculés avec le COS en sol désinfecté (Figure 30 A1). Cependant, la croissance en hauteur des plants inoculés avec le COS (66,61 cm) est significativement supérieure à celle des plants inoculés avec le COA (53,68 cm) dans le sol non désinfecté (Figure 30 B1).

Un accroissement maximum de la croissance en hauteur des plants a été obtenu à partir de 3 mois après inoculation sur sol désinfecté ou non désinfecté et ceci pour tous les traitements : les plants non inoculés et les plants inoculés avec les complexes symbiotiques (Figure 30 A2 & 32 B2). Toutefois, cet accroissement est plus important pour les plants inoculés avec le COS. Cet inoculum fongique d'origine sénégalaise entraîne une

Impact de l'inoculation sur la croissance de la plante et la diversité fonctionnelle des bactéries

augmentation de la croissance en hauteur de + 10 cm comparées aux plantes inoculées avec le COA en sol non désinfecté. A partir de quatre mois après inoculation, une baisse de l'accroissement a été notée jusqu'au cinquième mois en sol désinfecté pour les plants inoculés avec les complexes symbiotiques tandis que pour les plants non inoculés, cette diminution est observée jusqu'au 6^{ème} mois après l'inoculation sur sol désinfecté. Ces tendances sont également observées en sol non désinfecté (Figure 30 A2 & 30 B2). Pour les plantes inoculées avec le COS, la diminution atteint -10 cm (Figure 30 A2).

Sol désinfecté (A)



Sol non désinfecté (B)

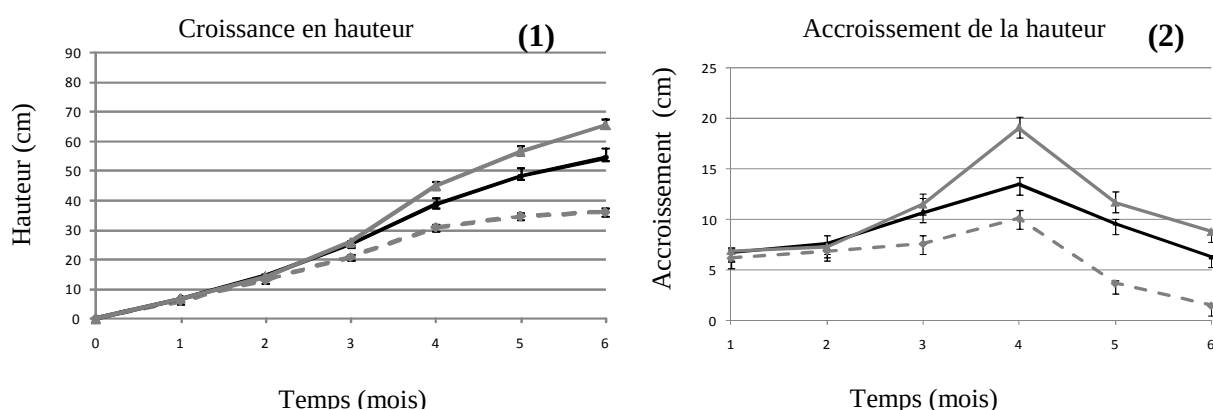


Figure 30. Impact de l'inoculation avec les complexes microbiens symbiotiques sur la croissance en hauteur de *C. equisetifolia* sur sol désinfecté et non désinfecté.

Complexe microbien symbiotique d'origine Australienne —
 Complexe microbien symbiotique d'origine Sénégalaise —
 Témoin (non inoculé) - - -

2) Impact de l'inoculation avec le complexe microbien symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur la biomasse des plantes de *C. equisetifolia* (biomasse aérienne, racinaire et totale)

Dans le sol désinfecté, l'effet de l'inoculation avec les complexes symbiotiques sur la biomasse des plantes est représenté dans le tableau 15. Ces résultats montrent que les deux complexes symbiotiques stimulent significativement le développement des parties aériennes, racinaires et totales des plants par rapport aux plants non inoculés. Cependant, un ratio BR/BA plus élevé (0,308) et significativement différent de celui des plants inoculés a été obtenu chez les plantes témoins. Les valeurs de ratio les plus faibles ont été observées chez les plants inoculés avec le COS (0,118) suivies de celles enregistrées chez les plants inoculés avec le COA (0,169) (Tableau 15). Les rapports BR/BA dans les traitements inoculés sont significativement différents.

Tableau 15 : Effet de l'inoculation avec les complexes microbiens sur la croissance de *C. equisetifolia* après 6 mois de culture en serre sur sol

Traitements ⁽¹⁾	Biomasse aérienne (g poids sec)	Biomasse racinaire (g poids sec)	Biomasse totale (g poids sec)	Ratio BR / BA ⁽²⁾
Témoin	1,629 (0,07) ⁽³⁾ a ⁽⁴⁾	0,499 (0,05) a	2,128 (0,09) a	0,308 (0,03) c
COA	5,091 (0,396) b	0,834 (0,05) b	5,925 (0,42) b	0,169 (0,01) b
COS	6,088 (0,312) b	0,698 (0,09) b	6,785 (0,31) b	0,118 (0,02) a

⁽¹⁾ COA : Complexe microbien d'origine australienne ; COS : Complexe d'origine sénégalaise. ⁽²⁾ BR/BA : ratio biomasse racinaire / biomasse aérienne. ⁽³⁾ erreur standard. ⁽⁴⁾ Les valeurs d'une même colonne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes d'après l'analyse de variance à un facteur contrôlé ($p < 0,05$).

Dans le sol non désinfecté, l'inoculation avec les deux complexes symbiotiques a significativement augmenté la croissance des plants (biomasses aériennes, racinaires et totales). Les valeurs de biomasses racinaires les plus élevées ont été obtenues avec l'inoculation par le COS (Tableau 16). Par contre, le ratio BR/BA des plantes était

Impact de l'inoculation sur la croissance de la plante et la diversité fonctionnelle des bactéries

significativement plus élevé chez les plants non inoculés que chez les plants inoculés (Tableau 16).

Tableau 16. Effet de l'inoculation avec les complexes microbiens sur la croissance de *C. equisetifolia* après 6 mois de culture en serre sur sol non désinfecté

Traitements ⁽¹⁾	Biomasse aérienne (g poids sec)	Biomasse racinaire (g poids sec)	Biomasse totale (g poids sec)	Ratio BR / BA ⁽²⁾
Témoin	1,862 (0,13) ⁽³⁾ a ⁽⁴⁾	0,657 (0,04) a	2,519 (0,17) a	0,362 (0,02) c
COA	4,504 (0,19) b	0,963 (0,08) b	5,467 (0,25) b	0,213 (0,01) a
COS	5,026 (0,32) b	1,265 (0,11) c	6,291 (0,42) b	0,251 (0,01) b

⁽¹⁾ COA : Complexe microbien d'origine australienne ; COS : Complexe d'origine sénégalaise. ⁽²⁾ BR/BA : ratio biomasse racinaire / biomasse aérienne. ⁽³⁾ erreur standard. ⁽⁴⁾ Les valeurs d'une même colonne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes d'après l'analyse de variance à un facteur contrôlé ($p < 0,05$).

Globalement, la non désinfection du sol a entraîné une augmentation de la croissance des parties racinaires et du rapport BR/BA.

En ce qui concerne le facteur « inoculation », un effet positif a été observé pour tous les paramètres mesurés, excepté pour le ratio BR/BA où l'inoculation microbienne entraîne une baisse significative des valeurs mesurées (Tableau 17). Pour certains paramètres dendrométriques (biomasse aérienne et totale), elles sont significativement plus importantes chez les plants de *C. equisetifolia* inoculées avec le COS (Tableau 17).

Une interaction significative a été relevée entre les facteurs « désinfection » et « inoculation » pour les paramètres « biomasse aérienne » et « biomasse racinaire ». Cette interaction n'était pas significative pour les 2 autres paramètres mesurés (ratio BR/BA et biomasse totale) (Tableau 17).

Tableau 17. Effet de l'inoculation avec les complexes microbiens et la désinfection du sol sur la croissance de *C. equisetifolia* après 6 mois de culture en serre.

Facteur ⁽¹⁾	Biomasse aérienne (BA) (g poids sec)	Biomasse racinaire (BR) (g poids sec)	Biomasse totale (BT) (g poids sec)	Ratio BR / BA ⁽²⁾
Désinfection (Des.)				
Sol désinfecté	3,673 (0,38) ⁽³⁾ a ⁽⁴⁾	0,637 (0,04) a	4,310 (0,41) a	0,223 (0,02) a
Sol non désinfecté	3,275 (0,29) a	0,883 (0,06) b	4,158 (0,35) a	0,300 (0,02) b
Inoculation (Inoc.)				
Témoin	1,749 (0,08) a	0,581 (0,04) a	2,330 (0,10) a	0,336 (0,02) b
Complexe Australie (COA)	4,817 (0,24) b	0,894 (0,05) b	5,711 (0,25) b	0,190 (0,01) a
Complexe Sénégal (COS)	5,557 (0,26) c	0,981 (0,1) b	6,538 (0,26) c	0,184 (0,02) a
Des.	$p = 0,014$	$p < 0,0001$	$p = 0,3912$	$p = 0,0004$
Inoc.	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
Interaction Des. x Inoc.	$p = 0,0099$	$p = 0,0044$	$p = 0,1164$	$p = 0,1866$

⁽¹⁾ Les valeurs représentent la moyenne de 24 répétitions pour le facteur «désinfection » et de 16 répétitions pour le facteur « inoculation ». ⁽²⁾ Ratio = Biomasse racinaire / Biomasse aérienne. ⁽³⁾ Erreur standard. ⁽⁴⁾ Les valeurs pour chaque colonne et chaque facteur suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keul).

3) Effet de l'inoculation avec les complexes microbiens symbiotiques sur la fréquence, l'intensité de mycorhization et la nutrition minérale des plantes de *C. equisetifolia*

Dans le sol désinfecté, l'établissement de la symbiose mycorhizienne chez les plants inoculés n'était pas significativement différente pour les deux origines d'inocula microbiens. L'inoculation a amélioré de manière significative les teneurs en N et P des plants avec des valeurs significativement plus élevées pour les plants inoculés avec le COS (Tableau 18).

Globalement la désinfection du sol a un effet négatif sur la fréquence de mycorhization (Tableau 18). Ce traitement a diminué significativement la fréquence de mycorhization des plants de *C. equisetifolia* qui a décru de 43,6 % à 21,6 % (Tableau 18). Cependant, en sol désinfecté cette intensité diminue sans être significativement différente de celle observée en sol non désinfecté. Les valeurs obtenues varient de 5,79 % pour les plants évoluant dans le sol désinfecté à 9,35 % pour les plants se développant dans le sol non désinfecté.

L'inoculation des plants avec les complexes symbiotiques a significativement augmenté la fréquence de mycorhization en comparaison de celle observée chez les plants témoins. Le COS a amélioré significativement l'intensité de mycorhization (13,66%) par rapport aux plants non inoculés avec des intensités de 3,89%. Les intensités obtenues avec le complexe d'origine australienne ne sont pas significativement différentes de celles des plants témoins (Tableau 18).

La désinfection du sol n'a pas eu d'influence significative sur les teneurs en N et P des parties aériennes. Quant au facteur inoculation, l'inoculation avec les complexes symbiotiques a significativement augmentée les teneurs en azote dans les parties aériennes des feuilles comparé aux témoins (Tableau 18). Par contre il n'y a pas de différence significative entre l'effet de l'inoculation avec le COA ou avec le COS. Concernant les teneurs en phosphore, la teneur la plus importante a été observée chez les plantes témoins (1742,7 mg.kg⁻¹) suivies par les plants inoculés avec le COS (987,8 mg.kg⁻¹) et enfin par celles inoculées avec COA (987,8 mg.kg⁻¹). Ces valeurs obtenues sont significativement différentes entre traitements (Tableau 18).

Une interaction significative entre les facteurs « désinfection » et « inoculation » a été observée pour la fréquence de mycorhization et les teneurs en azote. Par contre, pour l'intensité de mycorhization et le teneur en P, il y'a pas d'interaction significative entre ces deux facteurs (Tableau 18).

Tableau 18. Effet de l'inoculation avec les complexes microbiens et la désinfection du sol sur le statut mycorhizien et la nutrition minérale (teneurs en N et P des parties aériennes) de *C. equisetifolia* après 6 mois de culture en serre.

Facteur ⁽¹⁾	Fréquence de mycorhization (%)	Intensité de mycorhization (%)	N Kjeldahl (%)	P total (mg.kg ⁻¹)
Désinfection (Des.)				
Sol désinfecté	21,6 (5,13) ⁽²⁾ a ⁽³⁾	5,79 (2,03) a	1,356 (0,159) a	1154,3 (162,1) a
Sol non désinfecté	43,6 (4,16) b	9,35 (1,33) a	1,244 (0,146) a	1076,1 (209,8) a
Inoculation (Inoc.)				
Témoin	18,1 (4,49) a	3,89 (1,16) a	0,742 (0,023) a	1742,7 (175,2) c
Complexe Australie (COA)	45,7 (6,11) b	8,67 (1,38) ab	1,563 (0,118) b	615,2 (78,9) a
Complexe Sénégal (COA)	48,4 (5,85) b	13,66 (3,53) b	1,595 (0,076) b	987,8 (26,1) b
Des.	$p = 0,0012$	$p = 0,2654$	$p = 0,1182$	$p = 0,5528$
Inoc.	$p < 0,0001$	$p = 0,0014$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
Interaction Des. x Inoc.	$p = 0,0476$	$p = 0,0672$	$p = 0,0063$	$p = 0,2713$

⁽¹⁾ Les valeurs représentent la moyenne de 24 répétitions pour le facteur «désinfection » et de 16 répétitions pour le facteur « inoculation ». ⁽²⁾ Erreur standard. ⁽³⁾ Les valeurs pour chaque colonne et chaque facteur suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keul).

En sol désinfecté, les teneurs maximales en N et P des parties aériennes (respectivement 95,81 mg / plant et 6,33 mg / plant) ont été observées chez les plants inoculés avec le COS (Tableau 19). Ces teneurs sont significativement plus importantes que celles obtenues chez les plants inoculés par le COA avec des teneurs en azote de 71,36 mg / plant et des teneurs de P de 3,97 mg / plant. Pour ces éléments, les valeurs minimales ont été observées chez les plants non inoculés avec 12,21 mg / plant pour les teneurs en N et 2,67 mg / plant pour les teneurs en P (Tableau 19).

En sol non désinfecté, des résultats similaires ont été obtenus avec des teneurs maximales en N et P chez les plants inoculés avec le COS (P = 4,69 mg / plant et N = 84,44 mg / plant). Ces teneurs sont significativement plus élevées que celles mesurées dans les autres traitements (plants témoins : P = 3,43 mg / plant et N = 13,59 mg / plant ; plants inoculés avec le COA : P = 2,03 mg / plant et N = 59,91 mg / plant) (Tableau 19). Il est à noter que la quantité de phosphate absorbée par les plantes est moindre pour le complexe d'origine australienne par rapport au traitement témoin (Tableau 18).

Des différences significatives négatives ont été obtenues en comparant les teneurs en P entre les plants évoluant sur sol désinfecté ou sur sol non désinfecté (Des. vs sol NDes) inoculés avec le COS ou avec le COA (Tableau 19). Cependant, des différences significatives positives des teneurs en P ont été obtenues chez les plants témoins évoluant sur le sol désinfecté ou non (Des. vs sol NDes). Pour ce qui est des teneurs en N, aucune différence significative n'a été notée en comparant les valeurs obtenues des plants évoluant sur le sol désinfecté ou non.

Tableau 19. Comparaison des teneurs totales en phosphore et en azote par plant dans chaque traitement. Complexe microbien d'origine australienne (COA) : Complexe microbien d'origine sénégalaise (COS). Témoin : non inoculé.

Paramètres		Traitements		
		Témoin	COA	COS
Sol désinfecté (sol Des.)				
	P (mg / plant)	2,67 (0,11) ⁽¹⁾ a ⁽²⁾	3.97 (0,31) b	6,33 (0,33) c
	N (mg / plant)	12,21 (0,51) a	71,36 (5,55) b	95,81 (4,92) c
Sol non désinfecté (sol NDes.)				
	P (mg / plant)	3,43 (0,25) b	2,03 (0,09) a	4,69 (0,31) c
	N (mg / plant)	13,59 (0,97) a	59,91 (2,59) b	84,44 (5,42) c
Comparaison sol Des. vs sol NDes.				
	P (mg / plant)	(+) ⁽³⁾ (<i>p</i> = 0,01)	(-) (<i>p</i> < 0,0001)	(-) (<i>p</i> = 0,002)
	N (mg / plant)	(0) (<i>p</i> = 0,228)	(0) (<i>p</i> = 0,098)	(0) (<i>p</i> = 0,143)

⁽¹⁾ Erreur standard. ⁽²⁾ Les valeurs d'une même ligne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de Newman-Keul ($p < 0,05$). ⁽³⁾ (+) : différence positive significative ; (0) : différence non significative ; (-) : différence négative significative.

4) Effet de l'inoculation avec le complexe microbien symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur la diversité fonctionnelle de la microflore du sol non désinfecté

- Impact de l'inoculation avec le complexe microbien symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur l'activité microbienne du sol

- Analyse de l'activité microbienne totale dans le sol sous *C. equisetifolia* inoculée ou non inoculée avec le complexe symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise par hydrolyse de la fluorescéine diacétate

Afin de déterminer l'activité microbienne totale, nous avons utilisé la fluorescéine diacétate (FDA) un composé incolore présent dans le sol. Cette fluorescéine diacétate est hydrolysée par des enzymes (protéases, lipases, estérases) présentes dans la membrane des champignons et des bactéries. La fluorescéine résultant de cette hydrolyse correspond à l'activité enzymatique totale de la communauté microbienne du sol et peut être mesurée par spectrofluomètre.

Les résultats obtenus ont montré que l'inoculation avec les complexes symbiotiques augmente significativement l'activité fluorescéine diacétate. Cependant il y'a pas de différence significative entre l'activité fluorescéine des plantes inoculées avec le COA et celles inoculées avec le COS (Figure 31).

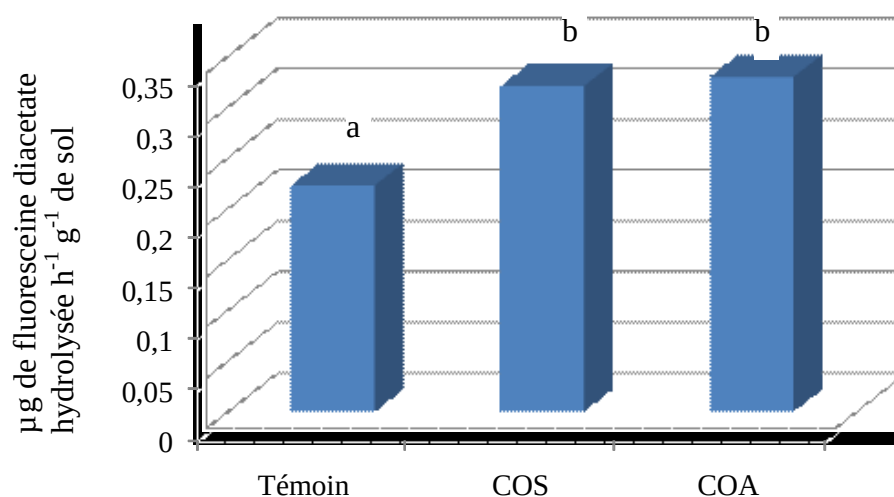


Figure 31. Mesure de l'activité fluorescéine diacétate dans le sol non désinfecté sous des plantes de *C. equisetifolia* non inoculées, inoculées avec un complexe microbien symbiotique d'origine sénégalaise ou australienne après 6 mois de culture.

Témoin : non inoculé, COA : Complexe microbien d'origine australienne, COS : Complexe microbien d'origine sénégalaise.

Analyse de l'activité catabolique de la microflore dans le sol sous des plantes de *C. equisetifolia* non inoculées ou inoculées avec le complexe symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise

L'activité catabolique de la microflore a été étudiée en analysant la respirométrie induite par un substrat (SIR) des communautés microbiennes. Elle est basée sur la mesure du CO₂ dégagé dans les sols amendés par différents substrats. Le comportement des microorganismes vis-à-vis de ces substrats permet de déterminer la diversité fonctionnelle microbienne du sol.

Concernant les acides carboxyliques, la respiration induite est significativement supérieure (0,848 µg CO₂ g⁻¹ de sol h⁻¹) dans le sol récolté sous les plants inoculés avec le complexe COA par rapport au sol sous les plants non inoculés ou inoculés avec le COS. Dans le sol sous les plants non inoculés ou inoculés avec le COS, la quantité de CO₂ dégagée par le catabolisme des acides carboxyliques est identique (0,644 µg CO₂ g⁻¹ de sol h⁻¹) (Tableau 20). Cette activité catabolique des acides carboxyliques s'accompagne d'une dégradation plus importante des acides keto-glutariques, des acides maloniques, des acides succiniques, des acides maliques, des acides fumariques, des acides citrique et des acides ascorbique (Figure 32).

Concernant les acides aminés, l'activité catabolique est significativement plus élevée dans le sol issu des plants non inoculés (0,189 µg CO₂ g⁻¹ de sol h⁻¹) par rapport au sol collectés sous des plants inoculés avec le COS (0,105 µg CO₂ g⁻¹ de sol h⁻¹) ou inoculés avec le COA (0,146 µg CO₂ g⁻¹ de sol h⁻¹). Cette activité est surtout marquée par le catabolisme de certains substrats comme la Lysine et l'Histidine (Figure 32). En outre, l'activité catabolique de ces acides aminés, trouvée dans le sol sous des plants inoculés avec le COA est significativement supérieure à celle obtenue avec le sol collecté sous des plants inoculés avec le COS (Tableau 20).

Il en est de même des alcools, avec une activité catabolique significativement plus importante dans le sol récolté sous les plants non inoculés (0,104 µg CO₂ g⁻¹ de sol h⁻¹) comparée aux sols issus des plants inoculés avec le COA (0,072 µg CO₂ g⁻¹ de sol h⁻¹) et des plants inoculés avec le COS (0,059 µg CO₂ g⁻¹ de sol h⁻¹) (Tableau 20). Toutefois, la respiration mesurée après l'ajout de ces alcools est significativement plus élevée dans le sol récolté sous les plants inoculés avec le COA comparé à celle mesurée avec le sol collecté sous les plants inoculés avec le COS.

Concernant les hydrates de carbones, l'activité catabolique est significativement

supérieure ($0,087 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ de sol h}^{-1}$) dans les sols sous les plants non inoculés comparée à l'activité obtenue dans le sol collecté sous des plants inoculés avec les complexes symbiotiques (Tableau 20). Cependant, il n'a pas de différence significative pour cette activité entre le sol échantillonné sous les plants inoculés avec le COA ($0,061 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ de sol h}^{-1}$) et le COS ($0,055 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ de sol h}^{-1}$).

L'équitabilité catabolique est significativement inférieure dans le sol collecté sous des plants inoculés avec le COA ($12,7 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ de sol h}^{-1}$) par rapport aux sols collectés sous des plants inoculés avec le COS ($15,6 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ de sol h}^{-1}$) ou sous des plants non inoculés ($16,9 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ de sol h}^{-1}$). Par ailleurs, il n'y a pas de différence significative entre l'équitabilité catabolique dans les sols récoltés sous des plants inoculés avec le COS et les plantes témoins (Tableau 20).

Tableau 20. Equitabilité catabolique et respiration induite moyenne ($\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ de sol h^{-1}) pour chaque groupe de substrats (Carbohydrates, alcools, Acides aminés et Acides carboxyliques) pour chaque traitement.

	Traitements		
	Témoin (non inoculé)	Complexe microbien d'origine Australienne (COA)	Complexe microbien d'origine Sénégalaise (COS)
Equitabilité catabolique	16,9 (0,798) ⁽¹⁾ b ⁽²⁾	12,7 (0,555) a	15,6 (0,303) b
Acides carboxyliques	0.644 (0.055) a	0.848 (0.016) b	0.644 (0.055) a
Acides aminés	0.189 (0.01) c	0.146 (0.012) b	0.105 (0.001) a
Alcools	0.104 (0.005) c	0.072 (0.004) b	0.059 (0.001) a
Hydrates de carbone	0.087 (0.007) b	0.061 (0.003) a	0.055 (0.002) a

⁽¹⁾ Erreur standard. ⁽²⁾ Les valeurs d'une même ligne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman-Keul).

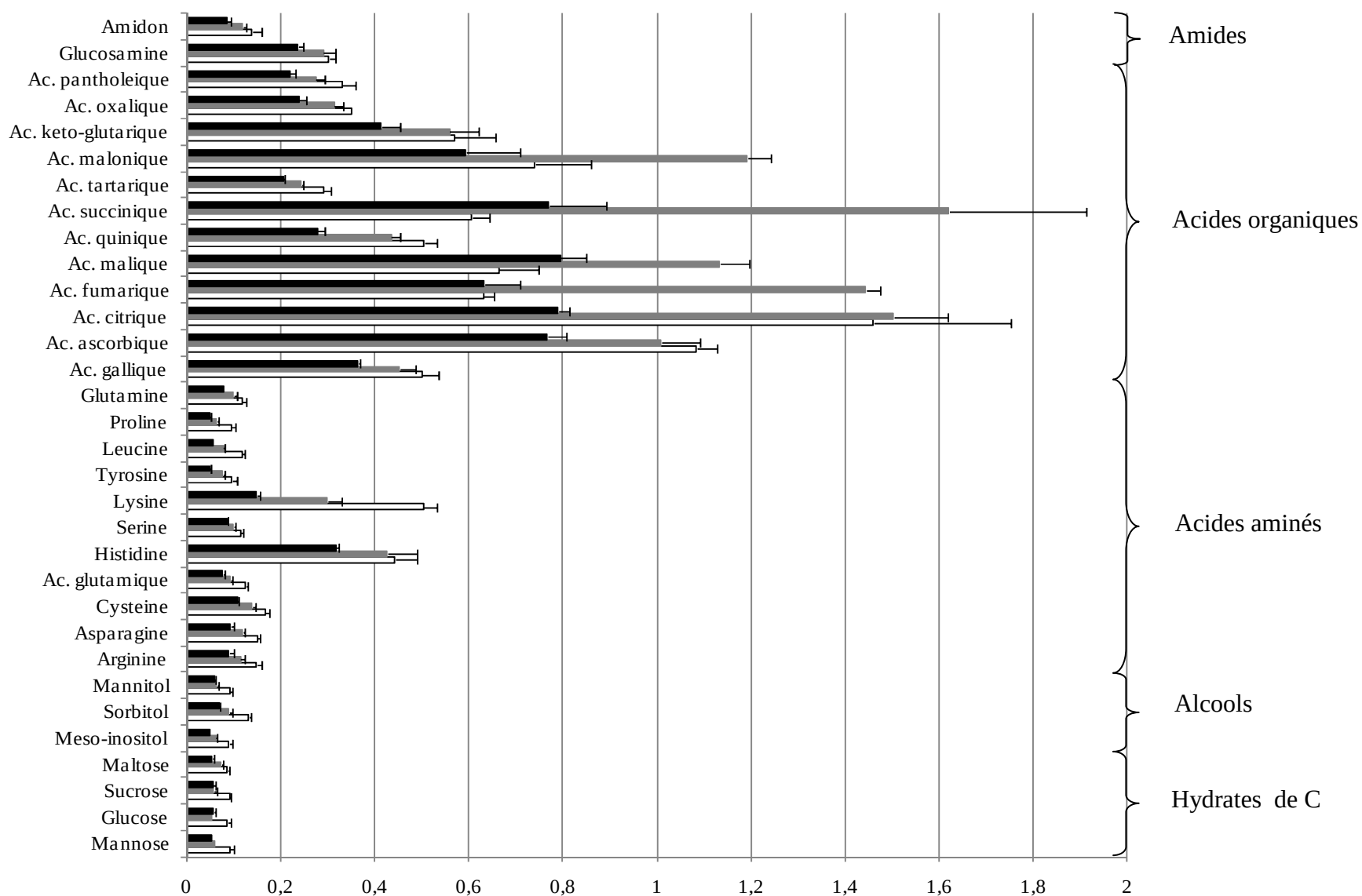


Figure 32. Activités cataboliques de chaque sol en fonction des substrats testés. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n=3).

□ Traitement témoin (non inoculé); ■ Complexe microbien d'origine Sénégalaise (COS) ; ▒ Complexe microbien d'origine Australienne (COA)

L'analyse inter-groupe (Between Group Analysis, BGA) montrant les tendances entre les valeurs de respirométrie induite en fonction des traitements est représentée par la figure 33. Cette figure comporte 2 parties : une partie supérieure où sont représentés les 32 substrats sur les 1^{er} et second axes de l'analyse BGA et la partie inférieure où sont inscrites 3 courbes de Gauss représentant la moyenne et la variance des résultats obtenus avec les 3 sols sur le 1^{er} et second axe de l'analyse BGA. Au niveau de la partie supérieure à gauche de la figure ; sur le 1^{er} axe un groupage de substrats tels que la kétoglutarique, l'acide citrique, la glucosamine l'acide ascorbique, la succinique et l'acide oxalique a été noté. Du côté opposé ; sur le second axe de l'analyse BGA des substrats comme l'acide glutarique, la lysine, la leucine, le sorbitol et la proline ont été regroupés. Pour les sols représentés sur la partie inférieure de cette figure, le sol récolté sous des plantes inoculées avec le COA est situé à gauche sur le 1^{er} axe de l'analyse BGA et les sols sous les plants non inoculés ou inoculés avec COS se retrouvent à droite de la figure sur le second axe de l'analyse BGA. Cette répartition montre que la microflore du sol échantillonné sous des plants inoculés avec le COA a la capacité de métaboliser des substrats tels que la kétoglutarique, l'acide citrique, la glucosamine, l'acide ascorbique, la succinique et l'acide oxalique alors que dans le sol récolté sous des plants non inoculés ou inoculés avec le complexe de souches d'origine sénégalaise la microflore métabolise préférentiellement d'autres substrats comme l'acide glutarique, la lysine, la leucine, le sorbitol et la proline. L'ampleur de la courbe de Gauss obtenue par le catabolisme de ces substrats dans le sol récolté sous les plants inoculés avec le COS est plus importante. Ce résultat montre que cette activité catabolique est plus marquée lorsque les sols ont été influencés par des plants associés avec le COS.

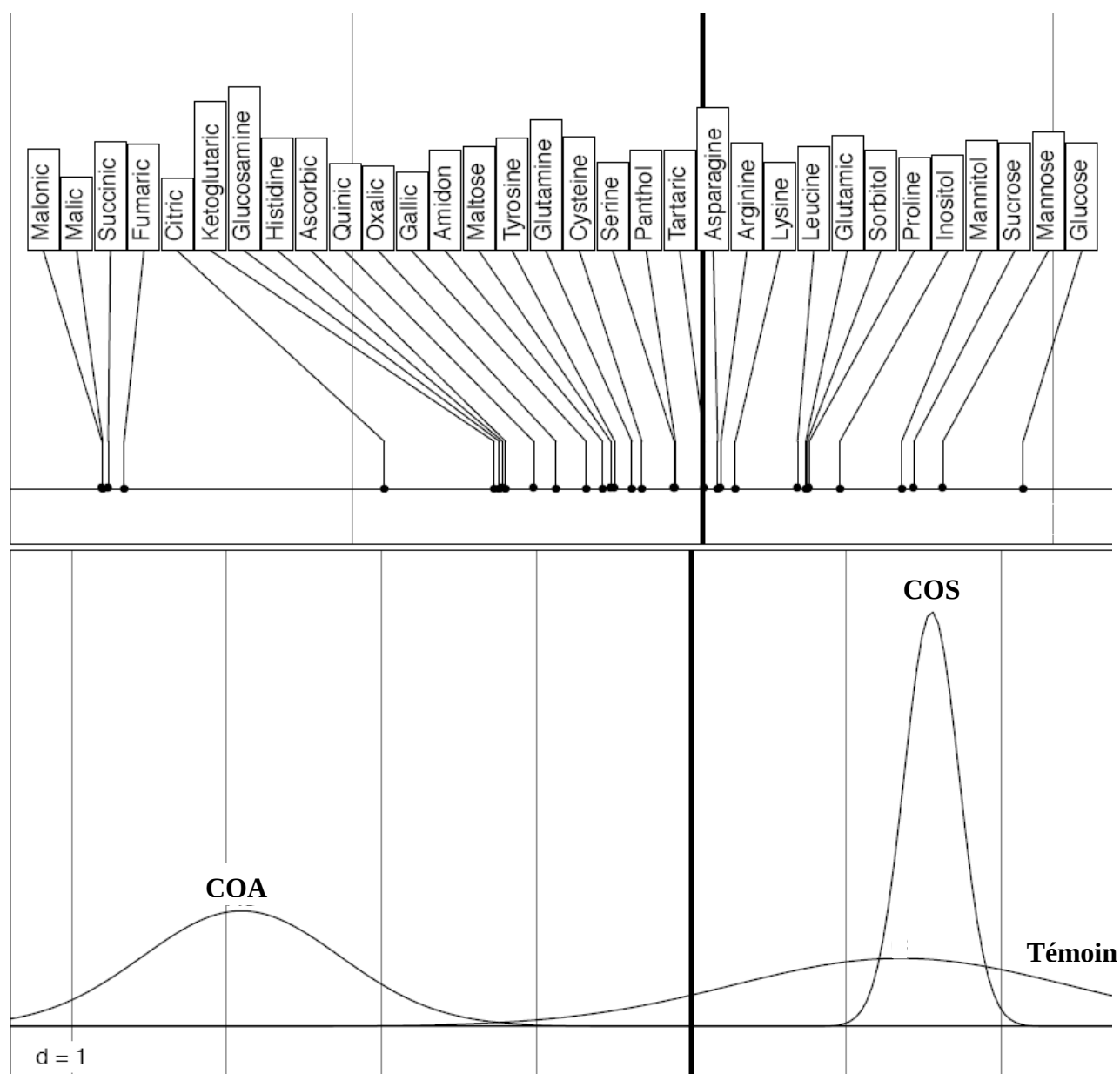


Figure 33. Représentation graphique de l'analyse inter-groupe (Between Group Analysis, BGA) montrant les résultats de respirométrie induite en fonction des traitements. La partie supérieure de la figure montre les résultats obtenus avec les 32 substrats sur les 1^{er} et second axes de l'analyse BGA. Les 3 courbes de Gauss inscrites dans la partie inférieure de la figure représentent la moyenne et la variance des résultats obtenus avec les 3 sols sur le 1^{er} et second axe de l'analyse BGA.

Témoïn : non inoculé ; COA : Complexe microbien d'origine australienne ; COS : Complexe microbien d'origine sénégalaise.

Effet de l'inoculation avec le complexe microbien symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur la communauté de *Pseudomonas* fluorescents

Afin d'étudier l'influence de l'inoculation sur la communauté de *Pseudomonas*, nous avons dénombré le nombre de *Pseudomonas* fluorescents dans le sol prélevé sous des plantes inoculées avec les complexes symbiotiques. Nous avons aussi déterminé leur diversité génétique et testé la capacité de ces bactéries à produire des sidérophores, des lipases et à solubiliser le phosphate.

Pour étudier quantitativement la population de *Pseudomonas* fluorescents présente dans notre sol de culture, nous avons compté le nombre de *Pseudomonas* fluorescents qui se trouve dans le sol. Le nombre de bactéries représenté au niveau de la figure 34 montre que l'inoculation avec le complexe symbiotique augmente l'abondance des bactéries du groupe des *Pseudomonas* fluorescents. Dans le sol récolté sous les plants inoculés avec le COA, le nombre de *Pseudomonas* fluorescents est triplé par rapport au nombre existant dans le sol sous des plants non inoculées. En ce qui concerne le sol récolté sous les plants inoculés avec le COS, le nombre de *Pseudomonas* fluorescents est aussi double par rapport à celui déterminé dans le sol récolté sous des plants non inoculés. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre l'abondance des *Pseudomonas* dans le sol collecté sous des plants inoculés avec COS ou COA.

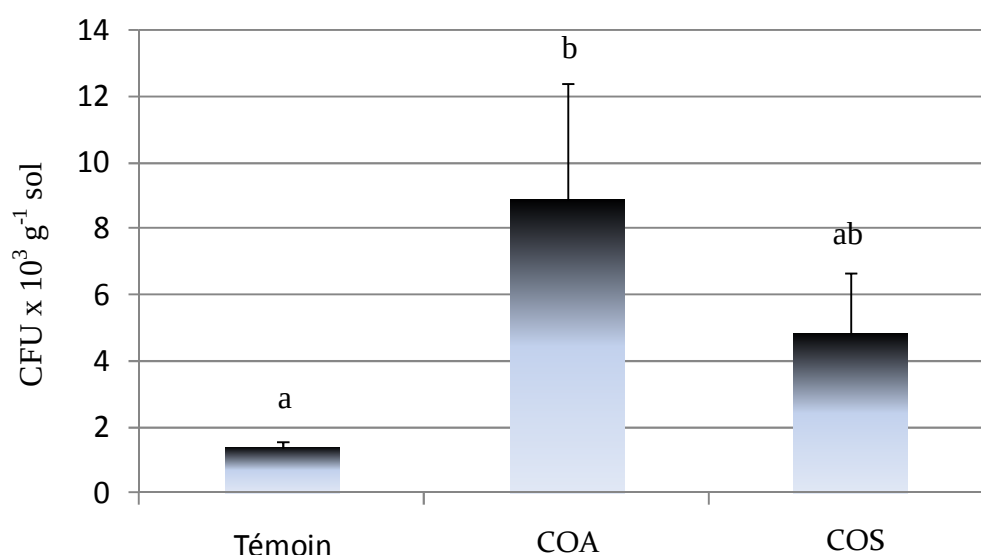


Figure 34. Numération des souches de *Pseudomonas* fluorescents isolées dans le sol des différents traitements. Témoin : non inoculé, COA : Complexe microbien d'origine australienne, COS : Complexe microbien d'origine Sénégalaise.

Les colonnes indexées par une même lettre représentent des valeurs qui ne sont pas significativement différentes d'après le test de Newman-Keul ($p < 0,05$).

Effet de l'inoculation avec le complexe symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur la diversité génétique de la communauté de *Pseudomonas* fluorescent

Diversité génétique de la communauté de *Pseudomonas* fluorescent : Approche par DGGE

Afin de caractériser génétiquement la structure de la communauté des bactéries du groupe des *Pseudomonas* fluorescents, nous avons amplifié l'ADNr 16S des bactéries. Nous avons réalisé la migration des produits de PCR en utilisant un gel DGGE ; gel dénaturant à gradient de concentration permettant une migration différentielle des bandes d'ADN en fonction de la concentration du dénaturant. Le profil de ce gel révèle la diversité génétique dans l'échantillon considéré.

Le profil DGGE obtenu montre que comparées aux plantes témoins, l'inoculation avec les complexes symbiotiques modifie la structure de la communauté de bactéries du genre *Pseudomonas* (Figure 35). Ce résultat est nettement visible au niveau du profil DGGE où de nombreuses bandes sont décelables pour les échantillons des plantes inoculées.

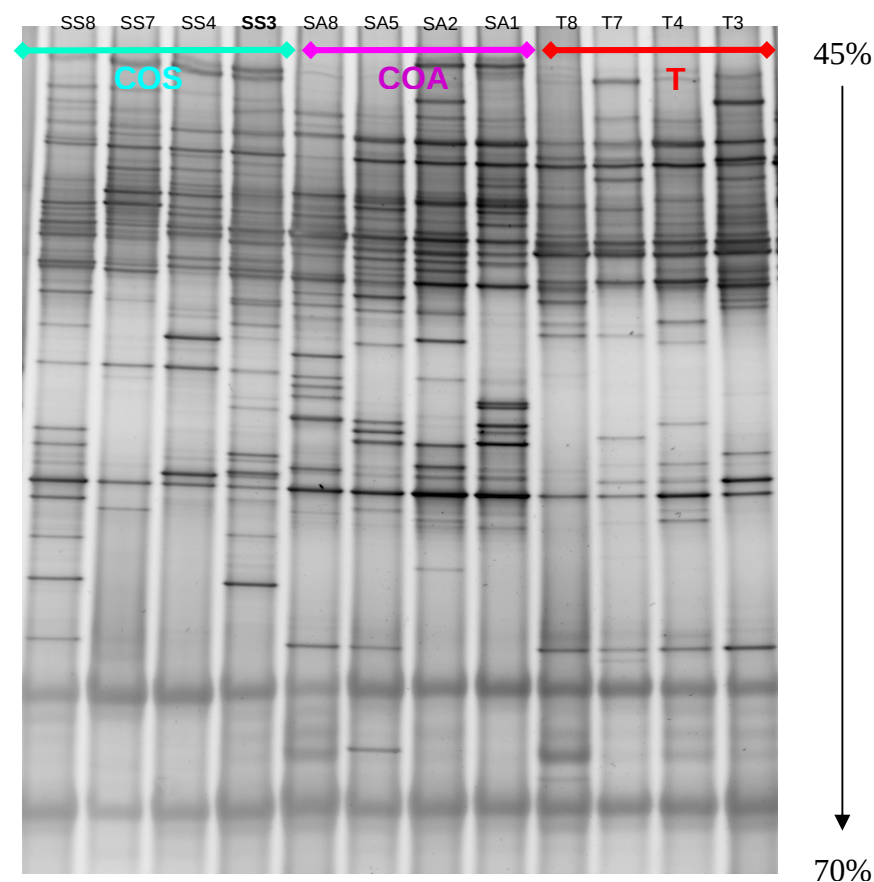


Figure 35. Diversité génétique par DGGE des *Pseudomonas* fluorescents dans le sol sous les plants de *C. equisetifolia* : témoins (T8, T7, T4 et T3), inoculées avec le COS : Complexe microbien d'origine sénégalaise

(SS8, SS7, SS4 et SS3) ; ou avec le COA : Complexe microbien d'origine australienne (SA8, SA5, SA2 et SA1).

L'analyse ACP illustre bien ces variations au niveau de la structure des *Pseudomonas*. Elle montre nettement l'influence de l'inoculation avec les complexes symbiotiques sur la structure de la communauté de *Pseudomonas* (Figure 36). Cependant, la comparaison de la structure des *Pseudomonas* dans le sol des plants inoculés avec le COS et celle sous des plants inoculés avec le COA montre que les *Pseudomonas* dans le sol des plants inoculés avec le COS sont moins variables et sont regroupés suivant l'axe CP1 alors que les souches de *Pseudomonas* dans le sol sous des plants inoculés avec le COA seraient plus dispersées suivant cet axe.

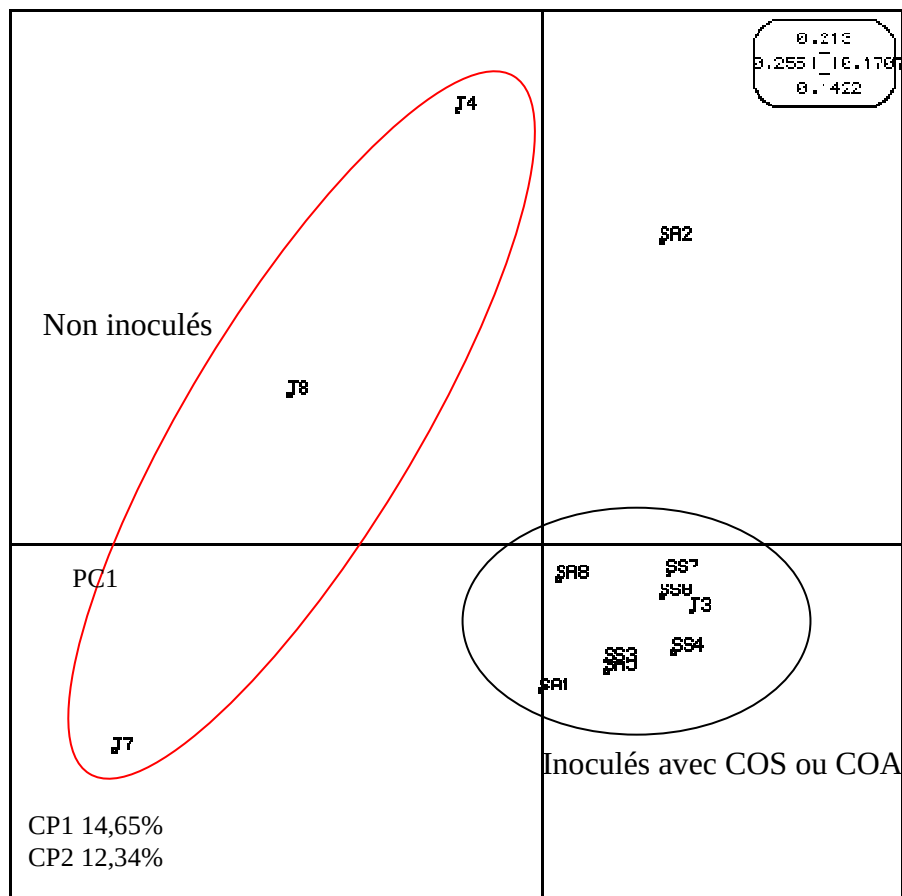


Figure 36. Analyse de composante principale (ACP) des profils DGGE de la diversité des *Pseudomonas* fluorescents dans le sol sous les plants de *C. equisetifolia*. Témoins : (T8, T7, T4 et T3), plantes inoculées avec le COS : Complexe microbien d'origine sénégalaise (SS8, SS7, SS4 et SS3) ; ou avec le COA : Complexe microbien d'origine australienne (SA8, SA5, SA2 et SA1).

Diversité génétique de la communauté de *Pseudomonas* fluorescent : Approche par RFLP

Parallèlement, nous avons caractérisé la diversité génétique des *Pseudomonas*

fluorescents par RFLP. Cette technique nous a permis de déterminer le polymorphisme des bactéries du groupe de *Pseudomonas* fluorescents dans le sol.

Les résultats obtenus en utilisant deux enzymes différentes *MspI* et *HaeIII*, montrent différents géotypes de souches de *Pseudomonas* fluorescents dans les sols sous des plants non inoculés, des plants inoculés avec le COA et celles inoculées avec le COS (Figure 37). Un nombre plus élevé de souches de *Pseudomonas* fluorescents a été trouvé dans le sol sous les plants inoculés avec le COA (4 géotypes) suivi par le nombre trouvé dans le sol sous des plantes inoculées avec le COS (3 géotypes) et les plantes non inoculées (1 géotype).

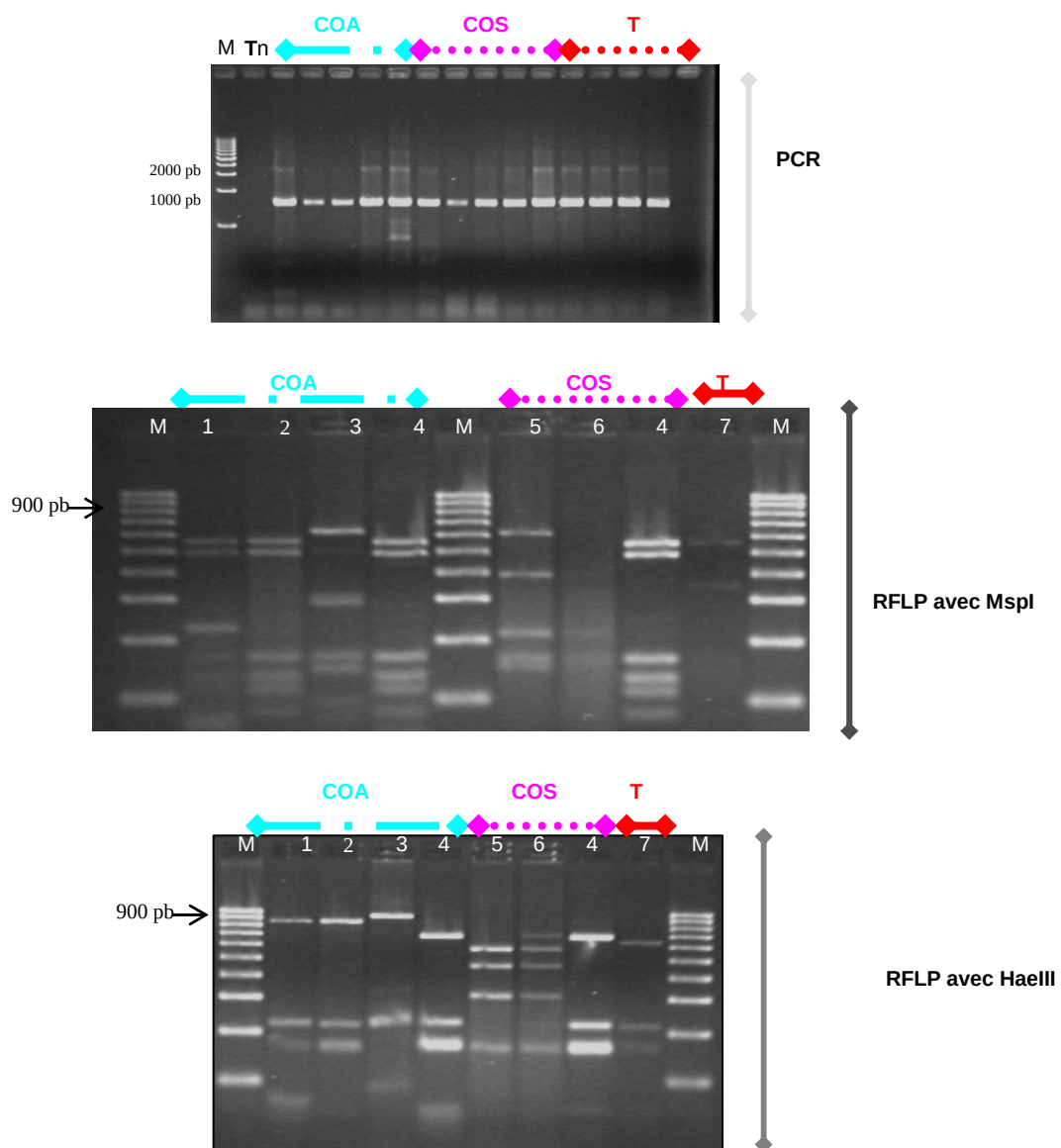


Figure 37. Amplification de l'ADN 16S par PCR de *Pseudomonas* sp. fluorescent digérés avec les enzymes de restriction *MspI* et *HaeIII*. M : marqueur moléculaire, Tn : Témoin négatif, T : Témoin non inoculé, COA : Complexe microbien symbiotique d'origine australienne, COS : Complexe microbien d'origine Sénégalaise.

L'analyse de la répartition des différents génotypes montre que le génotype 7 est uniquement trouvé dans le sol sous des plantes non inoculées et les génotypes 1, 2 et 3 dans le sol sous des plantes inoculées avec le COA, les génotypes 5 et 6 dans le sol sous des plantes inoculées avec le COS (Figure 38). Cependant le génotype 4 est largement présent dans le sol sous des plantes inoculées avec le COA et COS. Dans l'ensemble, la distribution des génotypes est significativement différente en partant du sol sous des plantes non inoculées, aux sols sous des plantes inoculées avec le COA et aux sols sous des plantes inoculées avec COS.

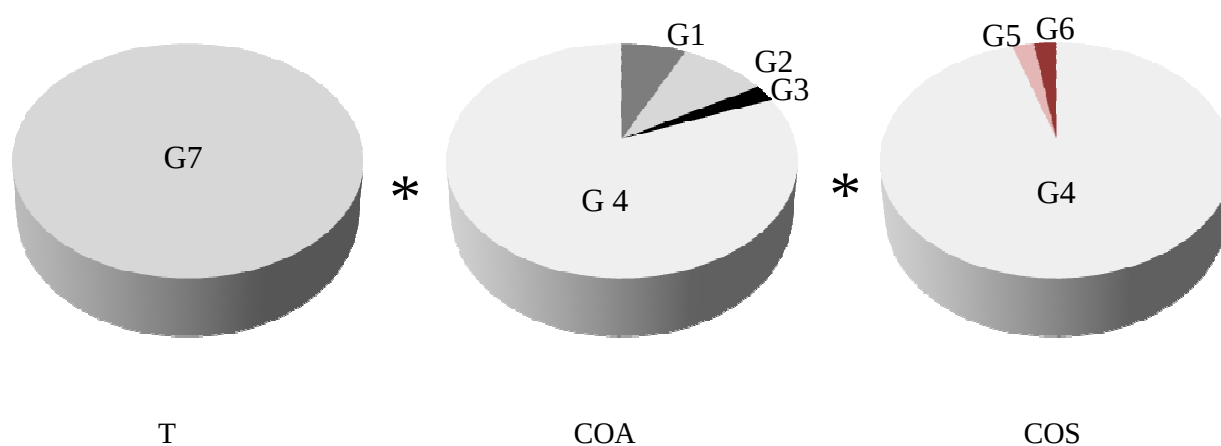


Figure 38. Distribution des génotypes de *Pseudomonas* fluorescents dans le sol de chaque traitement. T : témoin ; COA : Complexe microbien symbiotique d'origine australienne ; COS : Complexe microbien symbiotique d'origine sénégalaise ; G : Génotype ⁽¹⁾ * : distributions des génotypes significativement différentes d'après le test du Khi 2 ($p < 0,05$).

L'analyse phylogénétique du gène 16S de l'ADNr de l'ensemble de ces génotypes effectuée par la méthode Neighbour Joining avec le logiciel TreeView montre de forte ressemblance avec certaines souches de *Pseudomonas* présentes dans « Genbank » (Figure 39). Certaines de ces similarités sont présentées dans le tableau 21.

Les souches du génotype 1 et 3 ont une similarité de 99% avec les souches *Pseudomonas putida* W619 (NC 010501.1), GB-1 (NC 010322.1), F1 (NC 009512.1) et KT2440 (NC 002947.3). Celles du génotype 4 sont à 100% identiques avec les souches *Pseudomonas putida* F1 (NC 009512.1), KT2440 (NC 002947.3) et 99% identiques aux souches *Pseudomonas putida* W619 (NC 010501.1) et GB-1 (NC 010322.1). Pour les génotypes 2, 5 et 6 une similarité de 100% avec les souches *Pseudomonas putida* W619 (NC

010501.1), GB-1 (NC 010322.1) et KT2440 (NC 002947.3) a été obtenue. Le dernier génotype 7 est 100% identique aux souches *Pseudomonas aeruginosa* LESB58 (NC 011770.1), PA7 (NC 009656.1), UCBPP-PA14 (NC 008463.1) et PAO1 (NC 002516.2) (Tableau 21).



Figure 39. Arbre phylogénique montrant la diversité des *Pseudomonas* fluorescents dans le sol. Arbre construit en utilisant l'algorithme Neighbour Joining. Les valeurs numériques disposées sur les branches renseignent sur les valeurs des bootstraps

- Souches de *Pseudomonas* fluorescents trouvées dans le sol sous des plants non inoculés
- Souches de *Pseudomonas* fluorescents trouvées dans le sol sous des plants inoculés avec le complexe symbiotiques d'origine australienne
- Souches de *Pseudomonas* fluorescents trouvées dans le sol sous des plants inoculés avec le complexe symbiotiques d'origine sénégalaise
- Souche de *Pseudomonas* fluorescent commune trouvée dans les sols des plants inoculés avec le complexe australien ou sénégalais.

Tableau 21. Similarités entre les séquences de souches de *Pseudomonas fluorescents* obtenues et celles des souches de *Pseudomonas fluorescents* disponibles dans la banque de gènes.

Pourcentage de similarité	<i>P. putida</i> F1 (NC 009512.1)	<i>P. putida</i> KT2440 (NC 002947.3)	<i>P. putida</i> W619 (NC 010501.1)	<i>P. putida</i> GB-1 (NC 010322.1)	<i>P. aeruginosa</i> LESB58 (NC 011770.1)	<i>P.aeruginosa</i> PA7 (NC 009656.1)	<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14 (NC 008463.1)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (NC 002516.2)
Souches G1-G3	99%	99%	99%	99%				
Souche G4	100%	100%	99%	99%				
Souches G2-G5-G6		100%	100%	100%				
Souche G7					100%	100%	100%	100%

Effet de l'inoculation avec le complexe microbien symbiotique d'origine australienne ou sénégalaise sur l'activité des *Pseudomonas* fluorescents dans le sol

Afin de déterminer l'activité des *Pseudomonas* fluorescents dans le sol, nous avons analysé la capacité des *Pseudomonas* fluorescents à produire des sidérophores, des lipases et à solubiliser le phosphate.

L'analyse des propriétés cataboliques des bactéries de *Pseudomonas* fluorescents montre la présence d'un nombre très élevé de souches actives de *Pseudomonas* fluorescents dans les 3 sols étudiés (Tableau 22).

Pour le sol récolté sous des plants témoins, 100% de souches de *Pseudomonas* fluorescents sont capables de produire des sidérophores et ont une activité phosphatasique. Pour le nombre de souches ayant une activité lyopolitique sous des plants témoins, il est plus faible et représente 77,8 % dans les sols.

Pour les *Pseudomonas* fluorescents présents dans le sol sous des plants inoculés avec le COA, 100% de ces souches ont une activité phosphatasique et pour la production de sidérophores et l'activité lyopolitique le nombre de souches actives sont respectivement de 88% et 76%.

Dans le sol sous des plants inoculés avec le COS, 100% des bactéries *Pseudomonas* fluorescents produisent des sidérophores et 94,3% ont une activité phosphatasique et seulement 72,7% ont une activité lyopolitique.

L'intensité de leur activité a été mesurée, pour ce qui est de l'activité phosphatasique, elle est significativement supérieure pour les *Pseudomonas* fluorescents isolés du sol sous des plants non inoculés par rapport aux sols sous des plantes inoculées avec les complexes symbiotiques. Cependant l'activité phosphatasique est significativement plus importante dans le sol sous des plants inoculés avec le COS par rapport au COA.

Pour la production de sidérophores, une production significativement plus importante a été notée dans le sol sous des plantes non inoculées. Cependant il n'y a pas de différence significative entre la production de sidérophores dans le sol sous des plantes inoculées avec le COA ou avec le COS. En outre, dans le sol sous des plants inoculés avec le COS, l'activité lyopolitique est significativement supérieure à celle obtenue dans les sols sous des plantes non inoculées ou inoculées avec le COA. Pour le sol de ces deux derniers traitements, il y'a pas de différence significative pour l'activité lyopolitique des *Pseudomonas* fluorescents présents dans le sol.

Tableau 22. Pourcentages de souches actives et activités phosphatasiques, lypolitiques et production de sidérophores des souches de *Pseudomonas* fluorescents isolées des sols des différents traitements.

Activités mesurées	Origines des souches de <i>Pseudomonas</i> fluorescents		
	Non inoculé (témoin)	Complexe d'origine Australienne (COA)	Complexe d'origine Sénégalaise (COS)
Souches actives (%)			
Activité phosphatasique	100	100	94,3
Production de sidérophores	100	88	100
Activité lypolitique	77,8	76	72,7
Intensité des activités mesurées (mm)			
Activité phosphatasique	14,8 (0,21) ⁽¹⁾ c ⁽²⁾	6,8 (0,36) a	9,5 (0,36) b
Production de sidérophores	10,2 (0,85) b	4,1 (0,14) a	3,9 (0,15) a
Activité lypolitique	20,6 (0,63) a	22,3 (0,78) a	27,3 (1,03) b

⁽¹⁾ Erreur standard. ⁽²⁾ Les valeurs d'une même ligne suivies par une même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de Newman-Keul (p<0,05)

5) Relations entre la teneur en Pi des plants et la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes des sols

Le test de corrélation entre les teneurs en Pi des parties aériennes des plantes et les valeurs de respirométrie induite montrent une corrélation négative pour l'ensemble des acides carboxyliques testés excepté l'acide tartarique et l'acide pantholeique pour lesquels les interactions ne sont pas significatives. Cette corrélation a été aussi notée entre l'équitabilité catabolique et les teneurs en Pi des plantes (Tableau 23).

Tableau 23. Corrélations entre les teneurs totales de Pi des plants, l'équitabilité catabolique et les valeurs de respirométrie induites par les acides carboxyliques dans chaque traitement.

Acides carboxyliques	R	Equation	<i>pi</i>
Ac. gallique	- 0,412	$y = 0,520 - 0,019 x$	0,0201
Ac. ascorbique	- 0,485	$y = 1,165 - 0,052 x$	0,0057
Ac. citrique	- 0,628	$y = 1,826 - 0,154 x$	0,0002
Ac. fumarique	- 0,623	$y = 1,409 - 0,173 x$	0,0002
Ac. malique	- 0,472	$y = 1,050 - 0,072 x$	0,0073
Ac. quinic	- 0,443	$y = 0,548 - 0,034 x$	0,0126
Ac. succinique	- 0,544	$y = 1,500 - 0,181 x$	0,0016
Ac. tartarique	- 0,290	$y = 0,287 - 0,009 x$	0,1131
Ac. malonique	- 0,719	$y = 1,244 - 0,128 x$	< 0,0001
Ac. glutarique	- 0,579	$y = 0,634 - 0,032 x$	0,0006
Ac. oxalique	- 0,426	$y = 0,369 - 0,016 x$	0,0170
Ac. pantholeique	- 0,321	$y = 0,331 - 0,012 x$	0,0782
Equitabilité	+ 0,452	$y = 13,501 + 0,615 x$	0,0107

IV) Discussion

Les principaux résultats obtenus dans ces travaux montrent que : (i) la symbiose mycorhizienne améliore significativement la croissance des plants de *C. equisetifolia*, (ii) cet effet positif est également observé lorsque l'inoculation est réalisée dans un sol où la

microflore est préservée (Sol non désinfecté) et enfin (iii) l'inoculation induit des modifications dans la diversité fonctionnelle de la microflore qui sont fonction de l'origine du complexe microbien et qui sont susceptibles d'interagir avec l'impact de la symbiose mycorhizienne sur le développement de la plante hôte (production de biomasse et nutrition minérale).

1) Impact de l'inoculation avec les complexes microbiens symbiotiques d'origine australienne ou sénégalaise sur la croissance de *C. equisetifolia*

Dans le sol désinfecté, la dépendance mycorhizienne $\{(Biomasse\ totale\ des\ plants\ inoculés - Biomasse\ totale\ des\ plants\ témoins) / (Biomasse\ totale\ des\ plants\ inoculés) \times 100$ (Plenchette *et al.*, 1983)} est de 64,1% pour les plants inoculés avec le complexe d'origine australienne et 68,1% pour les plants inoculés avec le COS. De nombreuses études ont montré que l'inoculation mycorhizienne stimulait le développement des espèces végétales dans les sols fréquemment observés dans les conditions semi-arides (sols sableux et carencés en macro-éléments tels que le Pi et l'N) (Estaun *et al.*, 1997 ; Duponnois *et al.*, 2001). Ces résultats confirment la haute dépendance mycorhizienne du genre *Casuarina* qui peut être classé dans le groupe des espèces hautement dépendante de la symbiose mycorhizienne (Habte et Manjunath, 1991). Rajendran et Devajaj, (2004) utilisant la même nature de complexe symbiotique microbien ont trouvé des résultats similaires. Il en est de même des études d'Elumai et Raaman, (2009) sur l'effet positif du complexe symbiotique microbien sur la croissance de *C. equisetifolia*. L'augmentation de l'accroissement en hauteur à partir de cinq mois des plants inoculés avec le complexe symbiotique en sol désinfecté et à l'opposé la baisse de cet accroissement au même moment des plants non inoculés illustre cet effet positif du complexe microbien symbiotique. Des résultats similaires ont été obtenus par Shah *et al.*, (2006) en inoculant les plants avec un complexe « champignon endomycorhizien et bactérie du genre *Frankia* ». Cette augmentation de la croissance peut s'expliquer par une extension de la surface d'absorption de la plante en présence du champignon mycorhizien qui améliore la nutrition hydro-minérale de la plante. Les travaux de Perry, (1982) ont également montré que la surface d'absorption des racines est augmentée significativement en présence du champignon mycorhizien. Ceci se traduit par une amélioration de la nutrition minérale de la plante (N, Pi) en lui permettant *via* le mycélium extramatriciel, d'avoir accès à des formes azotés (molécules complexes organiques) et phosphatées (composés complexes organiques et/ou inorganiques) qui ne sont pas mobilisables directement par les racines de la plante hôte. Cet effet positif sur la croissance des plants de *C. equisetifolia* a été également mesuré en

utilisant le sol non désinfecté. Dans ces conditions, la dépendance mycorhizienne des plants est de 53,9% pour le COA et de 59,9% pour le COS. L'effet mycorhizien est donc plus faible lorsque l'inoculation est réalisée dans un sol non désinfecté. Ce résultat est fréquemment observé dans ce type d'expérience où des phénomènes de compétition entre les microorganismes inoculés et la microflore native sont généralement mesurés (Dabire *et al.*, 2007). Les résultats acquis dans nos expériences révèlent pourtant un effet bénéfique de l'inoculation par les complexes mycorhiziens dans ces conditions. Ceci montre que le sol utilisé est réceptif à l'inoculation mycorhizienne. La réceptivité des sols à l'établissement de la symbiose mycorhizienne est définie comme étant la capacité du substrat à assurer un fonctionnement optimal de la symbiose mycorhizienne en permettant à l'inoculant d'exprimer toutes les fonctions pour lesquelles il a été sélectionné (Ex : aptitude à promouvoir la croissance de la plante *via* une amélioration de sa nutrition minérale en Pi et/ou en N, etc.). Cette aptitude est fonction des caractéristiques physico-chimiques du sol (Ex : teneurs faibles en Pi biodisponible) mais aussi des caractéristiques de la microflore naturellement présente dans le substrat de culture (abondance, diversité génétique et fonctionnelle). Dans la présente étude, l'effet positif enregistré dans le sol non désinfecté montre que la microflore native n'exerce pas d'effet inhibiteur sur l'établissement de la symbiose. Cette situation peut s'expliquer par la présence de BAM « Bactéries Auxiliaires de la Mycorhization » dans le sol (Frey-Klett *et al.*, 2005 ; 2007) qui stimulent le développement de la symbiose mycorhizienne comme il l'a été démontré par Duponnois, (1992) ; Garbaye, (1994) et Duponnois, (2006). Cet effet BAM s'exprime suivant plusieurs voies d'action à savoir; 1) leur capacité à augmenter la réceptivité des racines aux champignons en sécrétant des substances qui fragilisent la paroi de ces dernières et facilitent ainsi l'infection mycorhizienne racinaire (Frey-Klett *et al.*, 2007, Tarkha et Fey-Klett, 2008), 2) leur effet rhizogénèse (sécrétion de l'auxine), qui stimule le développement de la surface racinaire pouvant être colonisée par le champignon (Duponnois, 1992).

2) Impact de l'inoculation microbienne sur la diversité fonctionnelle de la microflore native du sol

De nombreux travaux ont montré que l'établissement de la symbiose mycorhizienne engendrait des modifications importantes au niveau de la communauté microbienne du sol (saprophyte et symbiotique). De par les transformations induites par la symbiose au niveau de la physiologie de la plante hôte, la qualité et la quantité des exsudats racinaires sont différentes de celles identifiées et mesurées chez les plantes non mycorhizées (Marschner *et al.*,

(1997). Ceci entraîne une compartimentation de la microflore tellurique matérialisant une communauté microbienne ayant une structure et une diversité fonctionnelle différentes de celles caractérisant la rhizosphère. Ce compartiment influencé par le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne a été nommé « mycorhizosphère » (Linderman, 1988 ; Marschner *et al.*, 2001 ; Marshner et Timonen, 2005). Les composés organiques produits par les hyphes mycorhiziens engendrent également des modifications au niveau de la microflore associée au réseau extramatriciel pour créer « l'hyphosphère » (Johansson *et al.*, 2004).

Dans notre étude, une augmentation de l'activité fluorescène diacétate reflétant l'activité métabolique globale de la microflore tellurique a été mesurée dans le sol sous les plants inoculés avec les complexes microbiens symbiotiques. Cette augmentation est probablement due à l'augmentation de la croissance racinaire et, en conséquence, à une augmentation de l'exsudation racinaire fournissant ainsi des nutriments facilement métabolisables par les microorganismes du sol et en particulier les microbes adoptant une stratégie de type r. Cette catégorie microbienne est généralement caractéristique du milieu rhizosphérique en montrant un développement rapide du fait de leur capacité à métaboliser des composés facilement assimilables comme les exsudats racinaires (Ex : acides aminés, acides carboxyliques, etc.). Alors que l'impact de l'inoculation mycorhizienne est relativement modéré sur la diversité génétique et fonctionnelle des bactéries du groupe des *Pseudomonas* fluorescents, l'introduction des complexes microbiens a entraîné de profondes modifications dans la capacité de la microflore tellurique à cataboliser les différents substrats testés. L'équitabilité catabolique, qui représente la variabilité de la capacité d'une communauté microbienne à cataboliser une gamme de substrats organiques donnée, n'a pas été significativement modifiée dans le cas du traitement avec le COS mais a diminué en présence de l'inoculum d'origine australienne. Cet effet négatif a été relaté par les travaux de Dabire *et al.*, (2007) en inoculant une souche fongique exotique, *Glomus intraradices*, dans un sol non désinfecté et prélevé en milieu sahélien (Burkina Faso). Ce résultat peut être la conséquence de phénomènes de compétitions consécutifs à l'inoculation de souches fongiques issues d'un milieu différent de celui caractérisant la microflore du sol prélevé au Sénégal alors qu'il est probable que les souches d'origine Sénégal ont établi des interactions de type trophique avec les composantes microbiennes de la microflore tellurique. Il est admis que la capacité d'un sol à résister à des perturbations d'origine biotique ou abiotique, est fonction du niveau de son équitabilité catabolique (Degens *et al.*, 2001). En conséquence, bien que le COA ait amélioré le développement des plants de *C. equisetifolia*, il a également induit de profonds déséquilibres dans les différentes fonctions de la microflore tellurique. Ainsi, la réponse de la microflore

tellurique en termes de diversité fonctionnelle est fonction de l'origine et de la composition de l'inoculum fongique.

Les principales modifications induites avec le COA concernent la capacité de la microflore à métaboliser préférentiellement les substrats tels que l'acide kétoglutarique, l'acide citrique, la glucosamine, l'acide ascorbique, la succinique et l'acide oxalique pour le COA alors que dans le sol récolté sous des plants non inoculés ou inoculés avec le COS la microflore métabolise préférentiellement d'autres substrats comme l'acide glutarique, la lysine, la leucine, le sorbitol et la proline. Dabire *et al.*, (2007) ont montré que le potentiel mycorhizien d'un sol était positivement corrélé à la capacité de la microflore à cataboliser des composés organiques tels que la lysine et l'acide glutamique. Ce potentiel mycorhizien résulte de l'abondance de propagules infectieuses mycorhiziennes sous forme de structures mycorhiziennes, de morceaux de racines et d'hyphes mycorhiziens (Duponnois *et al.*, 2001). Les résultats obtenus dans notre étude suggèrent que l'inoculation mycorhizienne avec le COS a entraîné une amélioration significative du potentiel mycorhizien infectieux du sol, en particulier via une plus grande colonisation du substrat par le mycélium extramatriciel ce que ne peuvent relier les mesures des taux de mycorhization effectuées au niveau des racines pour cette expérimentation (aucune différence significative n'a été enregistrées entre les deux traitements fongiques).

3) Effet de l'inoculation avec les complexes symbiotiques et la nutrition phosphatée des plants de *C. equisetifolia*

Un des rôles fondamentaux de la symbiose mycorhizienne est l'amélioration de la nutrition en Pi de la plante hôte, le phosphore étant le principal macro-éléments limitant la productivité des agro- et écosystèmes sahéliens (Duponnois *et al.*, 2001). Des corrélations négatives ont été mises en évidence entre les teneurs en Pi des plants de *C. equisetifolia* et le catabolisme des différents acides organiques testés montrant que moins ces acides sont métabolisés par la microflore tellurique, meilleure est la nutrition minérale phosphatée des plants. Certains de ces acides organiques (acide oxalique, acide citrique, acide malique) sont connus pour être impliqués dans la mobilisation du Pi à partir des complexes minéraux du sol (Landeweert *et al.*, 2001). Plusieurs études ont émis comme hypothèses que l'inoculation mycorhizienne et l'établissement consécutif de la symbiose mycorhizienne avaient pour conséquences majeures, une excrétion massive d'acides organiques dans le milieu qui (i) solubilisait le Pi présent dans la matrice minérale du sol et (ii) exerçait une pression sélective sur la microflore tellurique en favorisant les microorganismes capables d'utiliser pour leur

propre métabolisme ces acides organiques (effet se traduisant par des valeurs de respirométrie induite élevées pour ces substrats) (Kisa *et al.*, 2007 ; Duponnois *et al.*, 2005b ; Ouahmane *et al.*, 2009). Dans notre étude, un effet contraire a été observé à savoir que de faibles valeurs de respirométrie induite avec les acides organiques à forte capacité chélatante sont corrélées à une nutrition minérale en Pi efficiente. Une autre hypothèse peut être émise : la faible abondance de microorganismes capables de cataboliser ces acides organiques permet une implication plus importante et constante de ces composés dans les processus d'altération des minéraux et ainsi une mise à disposition significative pour la plante de Pi assimilable. Ces deux hypothèses contradictoires concernant deux environnements régis par des interactions de type trophique ne peuvent être corroborées par des arguments scientifiques pertinents. Toutefois ces résultats mettent en évidence l'importance de ces interactions microbiennes dans les processus biologiques régissant la fertilité des sols et le développement de la plante, renforçant ainsi le concept de « complexe trophique » Frey-Klett *et al.*, (2005). De plus, nos résultats ont mis en évidence une corrélation positive entre l'équitabilité catabolique et la nutrition phosphatée des plants de *C. equisetifolia* montrant ainsi la pertinence de cet indice quant à l'évaluation de la capacité d'un sol à entretenir un bon développement de la couverture végétale.

V) Conclusion

Les résultats obtenus montrent que le complexe COA ou COS stimulent significativement la croissance de *C. equisetifolia*. Ces complexes microbiens modifient également la diversité fonctionnelle de la microflore mycorrhizosphérique. Ces interactions entre la plante hôte / les symbiotes fongiques / la microflore mycorrhizosphérique ont un effet significativement plus marqué pour leur impact sur la croissance végétale et la nutrition minérale lorsque le COS est inoculé aux plantes. Ceci renforce les hypothèses selon lesquelles des mécanismes de co-évolution ont mis en place des relations étroites entre la symbiose mycorrhizienne et la microflore tellurique aboutissant à la mise en place d'un ensemble de composantes microbiologiques (saprophytes et symbiotiques) dont la pérennité est assurée par des interactions trophiques et dont les principales causes se manifestent par un développement optimal de la plante hôte. Ces mécanismes biologiques régissant le fonctionnement de ce complexe trophique doivent être pris en compte dans les stratégies de réhabilitation de milieux dégradés ou de conservation de ressources naturelles, en particulier dans le choix des inoculants fongiques mycorrhiziens afin d'assurer un fonctionnement optimal du sol.

5° CHAPITRE 4

Caractérisation fonctionnelle de la symbiose mycorhizienne et
actinorhizienne chez *Casuarina. equisetifolia* inoculée avec des
complexes microbiens d'origine australienne ou sénégalaise

Caractérisation fonctionnelle de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne chez *C. equisetifolia* inoculée avec des complexes microbiens d'origine australienne ou sénégalaise

Cette partie des résultats a fait l'objet :

1) D'une publication dans le journal Mycorrhiza :

Nathalie Diagne, Jacques Escoute, Marc Lartaud, Jean Luc Verdeil, Claudine Franche, Aboubacry Kane, Didier Bogusz, Diégane Diouf, Robin Duponnois, Sergio Svistoonoff. Uvitex2B: A rapid and efficient stain for detection of arbuscular mycorrhizal fungi within plant roots Mycorrhiza. DOI 10.1007/s00572-010-0357-8

2) D'une communication orale au congrès international: MYCOMED

"Mycorrhizal Symbiosis: Ecosystems and Environment of Mediterranean Area" 11-13 October 2010, Marrakech (Maroc)

Cette troisième partie des résultats est un complément des deux parties précédentes. Elle porte sur la caractérisation fonctionnelle des symbioses pour comprendre les différences obtenues à la suite de l'inoculation avec le COA ou le COS des plants de *C. equisetifolia*.

I) Introduction

La symbiose mycorhizienne joue un rôle important dans le développement des plantes de la famille des Casuarinacées en améliorant leur nutrition hydro-minérale (Zhong *et al.*, 2010). Cet effet positif des champignons mycorhiziens est surtout dû à une meilleure exploration du sol par le réseau d'hyphes formé et à une augmentation de la capacité d'absorption des éléments minéraux.

Ces éléments minéraux sont transportés à l'intérieur des hyphes jusque dans le cortex des racines et absorbés par la plante au niveau des arbuscules. Les arbuscules étant le site d'échange, leur nombre, leur morphologie et leur fonctionnement sont en étroite relation avec l'efficacité de la symbiose. Pour mieux caractériser les différences entre les COS et COA, nous avons analysé la symbiose mycorhizienne en couplant des approches histologiques, histochimiques et moléculaires.

Au niveau histologique, des colorations sont généralement effectuées avec le bleu de trypan (Phillips et Hayman, 1970), l'encre et le vinaigre (Vierheilig *et al.*, 1998) et le bleu d'aniline (Nicolson, 1959). Ces colorations ont été testées avec succès sur *C. equisetifolia*. Afin d'obtenir des images d'une meilleure qualité en utilisant la microscopie confocale, nous avons aussi développé des protocoles de coloration de *C. equisetifolia* avec deux colorants fluorescents : (1) le WGA-488, une lectine couplée à un fluorophore, qui se fixe spécifiquement sur la paroi des champignons et (2) l'Uvitex 2B, un colorant similaire au Calcofluor White qui se fixe également sur les parois des champignons qui n'avait pas encore été utilisé pour observer des structures mycorhiziennes à l'intérieur de la racine. En utilisant ces techniques de coloration nous avons pu visualiser les structures fongiques et évaluer le degré de colonisation par le champignon dans les racines de plantes inoculées avec chacun des deux complexes de souches (sénégalais et australien).

Au niveau histochimique, nous avons utilisé des colorants qui permettent de mettre en évidence l'activité métabolique des structures fongiques. Cette activité est généralement corrélée avec la quantité de Pi absorbé par la voie symbiotique (Smith et Gianinazzi-Pearson, (1990), Tisserant *et al.*, (1993) et Vierheilig *et al.*, (2005). Parmi ces colorants : le NBT (=nitro blue tetrazonium) qui permet de mettre en évidence l'activité succinate deshydrogenase et le Fast Blue RR qui met en évidence l'activité phosphatase alcaline. Enfin nous avons aussi utilisé la diaminobenzidine qui permet de révéler les structures fongiques en sénescence (Vierheilig *et al.*, 2005).

Nous avons complété nos travaux sur l'efficacité des complexes symbiotiques associés à *C.*

equisetifolia en couplant à ces études histochimiques une analyse au niveau de l'expression de gènes connus pour intervenir dans la symbiose mycorhizienne ou actinorhizienne. Dans ce cadre nous nous sommes intéressés à trois gènes marqueurs chez *C. equisetifolia*: *CePT4*, *Ce12*, *CeHB* et au gène *nifH* de *Frankia*.

CePT4 est l'orthologue de *MtPT4*, un gène de *M. truncatula* exprimé dans les cellules contenant des arbuscules et codant un transporteur de Pi impliqué dans le transport symbiotique de Pi. *CePT4* est donc un marqueur permettant d'étudier l'efficacité du transport symbiotique de Pi dans le cadre de la symbiose mycorhizienne.

Ce12 est l'orthologue de *Cg12*, un gène de *C. glauca* codant une subtilase exprimé spécifiquement dans les cellules infectées par *Frankia* (Svistoonoff *et al.*, 2003). *CeHB* est l'orthologue de *CgHB*, gène de *C. glauca* codant l'hémoglobine symbiotique dont l'expression est liée à la fixation symbiotique d'azote (Jacobsen-Lyon *et al.*, 1995). Ces deux gènes sont donc des marqueurs de l'infection bactérienne symbiotique et de la fixation d'azote. Enfin le gène *nifH* est un gène de *Frankia* codant la nitrogénase, dont l'expression est également liée à la fixation biologique d'azote (Normand *et al.*, 2007).

Dans ce chapitre nous décrivons l'utilisation de ces différentes méthodes pour comprendre et comparer l'efficacité de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne chez *C. equisetifolia* associé à des souches fongiques de sa zone d'origine (Australie) ou à des souches fongiques de sa zone d'introduction (Sénégal). Dans un premier temps nous avons mis au point différentes techniques de coloration des structures fongiques sur *C. equisetifolia* et avons utilisé celle qui a donné les meilleurs résultats (=l'uvitex2B) pour comparer la mycorhization obtenue avec chacun des complexes de souches. Nous avons ensuite caractérisé la mycorhization du point de vue fonctionnel en utilisant les marqueurs histochimiques et moléculaires décrits ci-dessus.

II) Matériel et Méthodes

1) Préparation du substrat de culture

Du Terreau « Humin Substrat Art.-Nr. 4950 » mélangé à du sable siliceux de granulométrie 0,4 à 0,6 mm (Ecobati, Vedène, France) à une proportion 1: 10 (p/p) a été utilisé comme substrat de culture pour étudier la colonisation de *C. equisetifolia* par le champignon et la caractérisation fonctionnelle des souches fongiques et de la bactérie *Frankia* associées à cette espèce.

2) Germination des graines de *C. equisetifolia*

La germination des graines a été effectuée en pépinière pendant une semaine dans des bacs contenant du sable plus du terreau stérile 1:10 (p/p) (Figure 40). Après cette période de prégermination, les plantes ont été repiquées dans des pots de 1L.



Figure 40. Pépinière de *Casuarina equisetifolia*.

3) Inoculation avec les souches fongiques

Différentes origines de souches fongiques ont été utilisées : (1) une souche de laboratoire : *Glomus intraradices* DAOM 197198 fournie par G. Bécard (Laboratoire surfaces cellulaires et signalisation des plantes, CNRS-Université Paul Sabatier, Toulouse, France) qui a servi à faire mycorhizer les racines de *M. truncatula* et de Carotte et 2) le complexe de souches fongiques (COA) et (COS) décrit dans la première partie des résultats. L'inoculation a été effectuée comme décrite dans la partie précédente.

4) Inoculation avec les souches bactériennes

Culture de la souche *Frankia*

La souche de *Frankia CcI3* (McEwan et Wheeler, 1997 ; Normand *et al.*, 2007) a été utilisée pour inoculer les plantes. La culture de cette bactérie a été réalisée sur du milieu BAP (Tableau 24, annexe) à une température de 28°C, à l'obscurité, sous agitation à 200 rpm pour s'assurer d'une bonne aération (Schwencke, 1991) ; cette culture a été entretenue par des repiquages hebdomadaires (Fontaine *et al.*, 1986). La qualité (pureté) de l'inoculum a été vérifiée 24 h après avoir arrêté l'agitation. La culture pure de *Frankia* est formée de 2 phases : un surnageant très limpide et le culot de bactéries se déposant au fond. Les cultures ayant ses caractéristiques ont été choisies comme inoculum bactérien. La culture bactérienne bien décantée a été centrifugée deux fois de suite à 6000 rpm à 20°C pendant 15 min. Les hyphes

ont été cassés à l'aide d'une aiguille TERUMO 0,8 X 50 mm stérile. La solution de *Frankia* ainsi obtenue a été utilisée pour un nouveau repiquage. Avant l'inoculation des plantes, la bactérie *Frankia*, a été repiquée au minimum tous les quatre jours pendant trois semaines.

Inoculation avec la souche *Frankia*

Au moment de l'inoculation des plantes, un volume renfermant 15 µg d'équivalente protéine par plante a été prélevé, centrifugé et lavé 2 fois. Le culot a été re-suspendu et dilué dans du milieu H (Hoagland et Arnon, 1938). Les racines des plantes ont été trempées dans la solution de bactéries constituant l'inoculum pendant au moins 2 h pour la fixation des bactéries sur les racines. Après ce temps de fixation, les plantes ont été mises en terre et la solution de bactéries a été inoculée aux plantes à raison de 5 ml par plante.

5) Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est formé d'un seul facteur avec du sol désinfecté. Au total, 6 traitements ont été effectués : les plantes témoins non inoculées (NI), les plantes inoculées avec la souche *Frankia*, inoculées avec le complexe microbien d'origine australienne (COA), inoculées avec le complexe microbien d'origine australienne plus *Frankia* (COA + *Frankia*), inoculées avec le complexe microbien d'origine sénégalaise (COS) et les plantes inoculées avec le complexe microbien d'origine sénégalaise plus *Frankia* (COS+ *Frankia*). Pour chaque traitement, 12 répétitions ont été effectuées (Figure 41).

Dispositif expérimental II

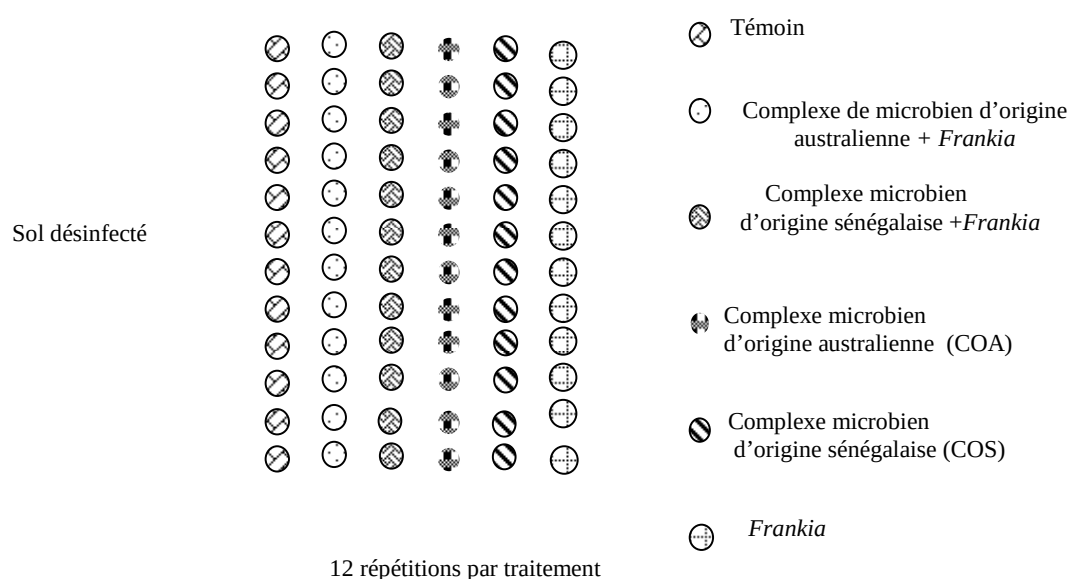


Figure 41. Dispositif expérimental II

6) Détermination de la fréquence de mycorhization des plants de *C. equisetifolia* inoculés avec les complexes symbiotiques : Techniques de coloration des racines mycorhizées

L'analyse histologique des structures mycorhiziennes formées a été effectuée sur les racines des plantes de *C. equisetifolia* mycorhizées par les deux complexes symbiotiques (COA et COS). Plusieurs colorants non vitaux ont été testés: le bleu de trypan (Tableau 9, annexe), l'encre et vinaigre (Tableau 25, annexe) et le bleu d'aniline (Tableau 26, annexe) afin de choisir le colorant permettant une distinction facile et une meilleure description des structures fongiques dans la racine. Des colorants fluorescents tels que le Wheat Germ Agglutinin-488 (WGA-488 ; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Tableau 27) ont été utilisés pour permettre des observations en détail au microscope à Epifluorescence (FM) et au Confocal laser-scanner microscopy (CLSM). Un autre colorant fluorescent l'Uvitex 2B non encore utilisé à notre connaissance dans la détection des structures fongiques à l'intérieur des racines a été mise au point pour la coloration des MA dans les racines mycorhizées de *C. equisetifolia*.

La fréquence de mycorhization des plantes a été calculée comme décrit dans Gherbi *et al.*, (2008) en utilisant des racines de *C. equisetifolia* découpées en fragments de 1 cm, et colorées avec l'Uvitex 2B. La coloration à l'Uvitex 2B a été effectuée selon le protocole suivant :

Les racines mycorhizées ont été abondamment rincées dans de l'eau puis éclaircies avec une solution de KOH 10% (p/v) à 90°C pendant 2 h pour les racines transgéniques de *M. truncatula* lignée L416 contenant le promoteur ProMtEnod11::gus et fournies par D. Barker (Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes, UMR INRA/CNRS (441/2594), Castanet Tolosan, France) et pour les racines de carottes transgéniques mycorhizées par *G. intraradices* DAOM 197198 fournies par G. Bécard (Laboratoire surfaces cellulaires et signalisation des plantes, CNRS-Université Paul Sabatier, Toulouse, France) et pendant 12 h pour les racines de *C. equisetifolia*. Les racines bien éclaircies ont été rincées à nouveau dans de l'eau puis colorées avec une solution d'Uvitex 2B (Polysciences Europe ; Eppelheim, Allemagne). Plusieurs concentrations variant de 0.005% à 0.05% (p/v) combinée et des temps d'incubation variant de 0.005% à 0.05% (p/v) ont été testés.

Les racines colorées à l'Uvitex ont été montées entre lames et lamelles avec le liquide de Hoyer dont la composition est la suivante : (chlorale hydrate/gomme arabique, glycérol/eau) [100:7.5:5:30]). Une observation a été effectuée avec le microscope DMRB (Leica) pour vérifier la coloration du champignon par l'Uvitex 2B.

Des observations ont été effectuées au microscope confocal LSM510 (Zeiss) avec l'objectif X63/ 1.4 à huile. Deux acquisitions indépendantes ont été effectuées, une à 405/420-480 (excitation/émission) pour l'Uvitex 2B et l'autre à 488/530 LP pour l'autofluorescence, avec comme taille de pinhole 102 et 100 µm respectivement.

D'autres images ont été acquises avec le microscope DM6000B (Leica) équipé par une caméra C4742-80-12AG ORCA-ER camera (Hamamatsu) avec l'objectif X63 en utilisant le logiciel Volocity 5 (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Les acquisitions ont été effectuées avec le filtre A4 (Leica) pour le DAPI (excitation BP, 360/40 nm/stop, 400 nm/emission BP, 470/40 nm) ou le filtre I3 (Leica) pour le FITC (excitation BP, 470/40 nm/stop, 510 nm/emission LP, 515 nm).

Une déconvolution a été appliquée aux images en utilisant le logiciel Volocity 5. L'ensemble des images ont été traitées avec Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Une coloration au bleu de trypan a été aussi effectuée pour comparer la technique de coloration à l'Uvitex 2B à celle utilisant le bleu de trypan. Cette dernière a été effectuée comme il a été décrit par Gherbi *et al.*, (2008).

7) Etude du métabolisme fongique dans les racines mycorhizées de *C. equisetifolia* inoculées avec les complexes microbiens COA et COS

L'étude de l'activité métabolique des plantes a été effectuée avec les racines de *C. equisetifolia*. Différents colorants vitaux ont été utilisés comme le NBT (Nitro blue Tétrazolium) (Tableau 28, annexe) pour détecter le métabolisme actif dans les structures fongiques à l'aide de la Succinate Déhydrogénase (SDH), le Fast blue RR pour déterminer l'activité alcaline phosphatase (ALP) (Tableau 29, annexe) et la Diaminobenzidine (DAB) (Tableau 30, annexe). Ces colorations ont été effectuées comme il a été décrit par (Vierheilig *et al.*, 2005) pour visualiser les structures fongiques en sénescences.

Pour chacun de ces marqueurs histochimiques, une coloration a été effectuée avec les racines mycorhizées des plantes à deux mois et à quatre mois après inoculation. Un lot de trois plantes a été poolé et le système racinaire a été découpé en de fragments de 1 cm. Pour chaque type de coloration, 100 fragments ont été colorés comme il est décrit dans les tableaux 28, 29 et 30 pour respectivement le NBT, le Fast blue RR et la Diaminobenzidine. L'ensemble des racines a été observé avec le microscope DMRB (Leica) selon la méthode de Trouvelot *et al.*, (1986).

8) Etude de l'expression de gènes marqueurs de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne chez *C. equisetifolia*

Pour une caractérisation fonctionnelle des souches, plusieurs gènes marqueurs de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne ont été isolés en se basant sur les séquences des gènes suivants : le gène *MtPT4* de *M. truncatula* (Javot *et al.*, 2007a, b), le gène *Cg12* de *C. glauca* (Svistoonoff *et al.*, 2003), le gène *CgHB* de *C. glauca* (Jacobsen-Lyon *et al.*, 1995), le gène *nifH* de *Frankia* (Normand *et al.*, 2007) et le gène « de ménage » *CgUbi* de *C. glauca* (Ozkaynak *et al.*, 1987, Hoher *et al.*, 2006). La technique d'isolement de ces gènes comprend d'abord, l'extraction de l'ADN génomique de *C. equisetifolia*, ensuite, l'amplification de l'ADN en utilisant des amorces spécifiques des gènes marqueurs, puis le clonage de l'ADN amplifié, suivie du séquençage.

- Extraction de l'ADN génomique de *Casuarina equisetifolia*

L'ADN génomique de *C. equisetifolia* a été extrait par le kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur.

- PCR et clonage des gènes marqueurs

Les séquences des amorces pour cloner les gènes *CePT4*, *Ce12* et *CeHb* ont été dessinées sur des régions conservées des gènes orthologues chez *C. glauca* *CgPT4*, *Cg12* et *CgHb*. Elles ont été testées avec le logiciel Amplify 3X version 3.1.4 (© Bill Engels-Université du Wisconsin, Madison, USA) et synthétisées par la société Eurogentec (Angers, France ; Tableau 6, annexe). Pour examiner l'expression des gènes de *C. equisetifolia*, des amorces spécifiques ont été définies avec le logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft International, Palo Alto, Californie, USA) et synthétisées par Eurogentec (Tableau 6, annexe). Pour un volume réactionnel de 50 µl, le mélange est formé de 5 µl de tampon 10x, 5 µl de dNTP 10 Mm, 1 µl Taq polymérase 5U/µl, 1µl de chaque amorce de concentration 10 µM et 1 µl d'ADN. Pour l'amplification des gènes marqueurs, 30 cycles ont été effectués avec une température d'annealing de 68°C pour *Ce12* pendant 1 min 40s et 60°C pour *CePT4/CeHB/CeUbi* pendant 30 s.

L'ADN obtenu a été purifié à l'aide du kit commercial Geneclean Turbo Kit (Qiagen) selon le protocole fourni par le fabricant. La séquence amplifiée a été introduite dans le vecteur pGEM-T easy et le clonage a été effectué dans la bactérie *E. coli* dont le génotype est e14–(McrA–) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK– mK+)* *supE44 relA1 Δ(lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacIqZΔM15*] selon les recommandations du fournisseur.

Pour vérifier la présence de l'insert une digestion a été ensuite réalisée grâce à l'enzyme EcoRI

sur 1 µl d'ADN, la digestion a été analysée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%. Après vérification, le produit de PCR a été préparé pour le séquençage.

- Séquençage des amplifiats

Le séquençage a été réalisé par MWG Biotech (Allemagne). Les séquences obtenues ont été comparées aux banques des données NCBI (National Center for Biotechnology Informatic) à l'aide du logiciel BLAST-N (Basic Local Alignment Search Tool). Ainsi une étude de similarité a été effectuée entre les gènes de *C. equisetifolia* et de *C. glauca*. Les séquences obtenues ont été utilisées pour définir les amorces pour l'étude de l'expression de gènes marqueurs par RT-qPCR.

- RT- qPCR

D'abord, l'ARN de *C. equisetifolia* des plantes inoculées avec les souches fongiques COA et COS a été extrait à partir de 3-4 g des racines mycorhizées / non mycorhizées et des racines nodulées/ non nodulées par la méthode d'ultracentrifugation sur coussin de chlorure de césium (Chirgwin *et al.*, 1979).

Ensuite pour une utilisation en PCR quantitative, les ARN ont subi un traitement à la DNase à l'aide du kit DNA-free (Ambion, Austin, USA) afin de supprimer toute trace d'ADN génomique.

Puis, ils ont été rétro-transcrits selon le protocole du Kit Superscript III First-Strand Synthesis System pour la RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, Calofornie, USA).

- PCR quantitaive (qPCR)

L'efficacité des amorces pour les couples *CePT4*, *Ce12*, *CeHB* et *CeUBI* (Ubiquitine ; Hocher *et al.*, 2006) a d'abord été testée en effectuant une qPCR sur une gamme de dilutions sériées (au 1/5) de six points réalisées avec d'ADNc de *C. equisetifolia*.

Les réactions de qPCR ont été réalisées en plaques de 96 puits (Stratagène Mx 3000P) adaptées au thermocycleur Stratagene Mx3005P QPCR System. Pour chaque réaction, un volume final de 15 µl contenant du SYBR Green 2X Brilliant II QPCR Master Mix (Stratagene) a été préparé comme il a été décrit par le fabricant. De ce volume, 12 µl ont été prélevés et déposés dans chaque puits auxquels on ajoute 3 µl d'ADNc. Les plaques ont été couvertes par un film (Optically clear Heat Sealing Film AB gene). Pour l'amplification, 40 cycles ont été réalisés à 60°C. Le gène d'ubiquitine caractérisé par son expression constante dans tous les tissus a été utilisé comme référence pour la normalisation (Hochoer *et al.*, 2006) des résultats d'expression. Pour chaque réaction, les ADNc ont été dilués au 1/100 ème et des triplicats techniques ont été effectués.

9) Analyses statistiques

Les données obtenues ont été traitées par une analyse de variance à un facteur contrôlé et les moyennes ont été comparées 2 à 2 en utilisant le test de Newman-Keul ($p < 0,05$). Avant leur traitement statistique, les taux de mycorhization ont été transformés par la fonction Arc sin ($\sqrt{x}$). Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statview™.

III) Résultats

1) Caractérisation de la symbiose mycorhizienne chez *C. equisetifolia* au niveau histologique

Afin de caractériser les structures formées lors de la symbiose mycorhizienne chez *C. equisetifolia* nous avons utilisé des techniques de colorations permettant de visualiser les structures fongiques.

1 1) Mise au point de techniques de coloration des structures fongiques

Pour visualiser les structures fongiques dans les racines de *C. equisetifolia* inoculées avec le COA ou COS, les racines mycorhizées ont été décolorées avec une solution de KOH 10 % puis colorées avec du bleu de trypan, de l'encre, du bleu d'aniline ou du WGA-488 selon les protocoles décrits dans Vierheilig *et al.*, (2005). Les détails des techniques de coloration figurent dans les tableaux (9, 25, 26 et 27). Les échantillons ont ensuite été montés entre lame et lamelle et observés au microscope.

Un des paramètres qui a nécessité une optimisation est le temps nécessaire pour obtenir un éclaircissement des racines optimum; celui-ci varie selon le matériel utilisé: plus les racines sont âgées et épaisses, plus le temps nécessaire est long. Chez *C. equisetifolia*, le temps utilisé varie de 60 min pour les jeunes plantes dont les racines ne sont pas encore très lignifiées à 12 h pour des racines lignifiées.

Pour les colorants cités précédemment, des différences existent au niveau du temps de coloration ; la coloration avec l'encre et le vinaigre est la moins longue et peut se faire environ 3 min tandis que celle utilisant le bleu de trypan, le bleu d'aniline dure plus longtemps et peut atteindre 60 min. De toutes ces techniques de coloration, le WGA-488 est la méthode la plus longue car elle nécessite un temps de fixation de 14 h avant l'étape d'éclaircissement de 2 h et de la coloration de 14 h.

De bons résultats ont été obtenus avec l'ensemble de ces colorants. Les structures fongiques comme les hyphes, les arbuscules et les vésicules sont clairement visibles lorsqu'on

observe les échantillons colorés au microscope, qu'il s'agisse de racines colorées avec l'encre (planche 2 a, b), le WGA-488 (planche 2 c), le bleu d'aniline (planche 2 d) ou le bleu de trypan (planche 2 e). Le WGA-488 permet d'avoir des images d'une grande qualité, en particulier quand les échantillons sont observés avec un microscope confocal. Cependant c'est un colorant coûteux et instable dont l'utilisation n'est pas adaptée à des études sur un grand nombre d'échantillons. Nous avons donc essayé également un autre colorant fluorescent, l'Uvitex 2B qui est peu cher, non toxique et stable, mais qui n'avait jamais été utilisé auparavant pour mettre en évidence les structures fongiques à l'intérieur de racines mycorhizées.

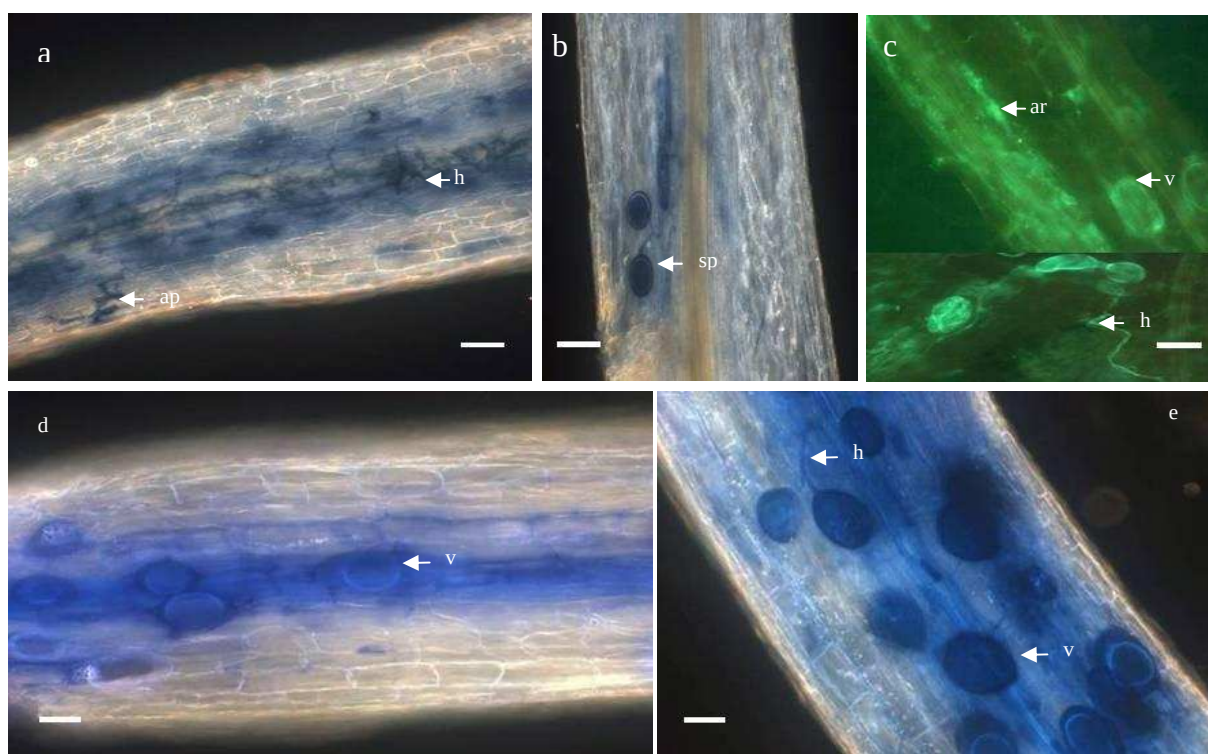


Planche 2. Colorations mettant en évidence les structures fongiques des racines mycorhizées de *Casuarina equisetifolia* **a, b** : Apprésoirium (ap), Hyphes (h) colorés à l'Encre ; **c** : Hyphes, vésicules (v), arbuscules (ar) colorés par du WGA-488. **d** : Hyphes, vésicules colorés par du Bleu d'Aniline. **e** : Hyphes, vésicules colorés par du Bleu de Trypan. Barre=200 μ m

1 2) Mise au point de la coloration à l'Uvitex 2B

L'Uvitex 2B est similaire au Calcofluor White largement utilisé dans les industries textiles et de papiers pour blanchir et prévenir le jaunissement du papier et des produits fabriqués. Il se lie aux β 1-3 et β 1- 4 polysaccharides comme ceux trouvés dans les parois chitineuses ou celluloses. Il en résulte une coloration bleu clair des structures fongiques visibles suite à une excitation avec la lumière UV. Ces propriétés fluorescentes ont fait que l'Uvitex 2B est très utilisé dans le domaine médical pour la détection des champignons

parasites (Wachsmuth, 1988). Ce colorant est aussi utilisé pour détecter les champignons pathogènes (Moldenhauer *et al.*, 2006 ; Fu *et al.*, 2009). Plus récemment, Felten *et al.*, (2009) ont utilisé l'Uvitex 2B pour étudier la colonisation des racines du peuplier par le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor*. Concernant la coloration des champignons endomycorhiziens avec l'Uvitex 2B, cette étude a été uniquement faite sur le mycélium extraracinaire mais à notre connaissance, l'Uvitex 2B n'est pas encore été utilisé pour visualiser les structures fongiques à l'intérieur de la racine.

Premièrement nous avons optimisé le temps d'éclaircissement nécessaire à l'obtention d'une coloration satisfaisante. Les temps (5, 15, 30, 60 et 120 min) ont été testés. Les résultats obtenus montrent que les racines sont bien colorées à partir de 15 min d'incubation (Tableau 31). Nous avons ensuite optimisé la concentration de colorant à utiliser et la durée d'incubation. Comme le montre le tableau 31, les meilleurs résultats sont obtenus avec un temps d'incubation de 30 minutes dans une solution d'Uvitex 2B à 0,005%. Une augmentation de la concentration et/ou du temps d'incubation entraîne un bruit de fond beaucoup plus intense (Tableau 31).

Tableau 31. Evaluation de la concentration de la solution d'Uvitex2B et du temps d'incubation pour la coloration des racines mycorhizées par les champignons endomycorhiziens.

Concentration d'Uvitex2B	Temps de coloration (min)	Coloration des MA	Bruit de fond
0,005%	5	-	-
	15	+	-
	→ 30	++	-
	60	++	+
	120	++	+++
0,01%	5	+	+
	15	++	+
	30	++	+
	60	++	+
	120	++	+++
0,05%	5	++	++
	15	++	++
	30	++	++
	60	++	+++
	120	++	+++

→ Indique la meilleure combinaison (concentration /temps d'incubation) pour une bonne coloration des racines à l'Uvitex2B

1 3) Utilisation de l'Uvitex2B pour colorer les structures fongiques à l'intérieur des racines

Comme l'uvitex2B n'avait pas été utilisé auparavant pour colorer des mycorhizes à l'intérieur des racines, nous avons aussi testé ce colorant chez deux espèces couramment utilisées dans les travaux sur les MA: la carotte et *M. truncatula*. Les racines de carottes, de *C. equisetifolia* et de *M. truncatula* inoculées avec *G. intraradices* ont été colorées à l'Uvitex 2B et observées en microscopie confocale. Les résultats obtenus sont très satisfaisants : la planche 3 montre en détail de cellules colonisées par le champignon où sont clairement visibles des hyphes intra (planche 3 a) ou intercellulaires (planche 3 b) et des arbuscules. Les autres structures fongiques telles que les spores et les vésicules sont facilement détectées (résultat non montré). Pour mieux visualiser le contexte dans lequel se trouvent les structures fongiques, une seconde image de la fluorescence rouge a été prise séquentiellement en excitant l'échantillon avec de la lumière verte, ce qui permet de détecter l'autofluorescence des parois végétales. Les niveaux d'autofluorescence les plus élevés ont été observés chez la plante ligneuse *C. equisetifolia* où les parois sont clairement visibles (planche 3 b).

Le microscope confocal offre aussi la possibilité d'explorer l'image fluorescente en trois dimensions ce qui est très utile dans l'analyse du type de colonisation de la racine par le champignon dépendant de la plante et du champignon. Chez *C. equisetifolia* les images obtenues montrent une morphologie de type ARUM caractérisée par le développement d'hyphes intercellulaires avec des bifurcations à l'intérieur des cellules donnant naissance à la formation d'arbuscules au niveau de leur partie terminale (planche 3 b). Au contraire, dans les racines de carotte, la structure observée est de type PARIS, caractérisée par des hyphes intracellulaires. Des bifurcations sont nées à partir de ces hyphes et sont sous forme de pelotons comparables aussi à des arbuscules (planche 3 a).

A fin d'obtenir des images de grande résolution sans utiliser un microscope confocal, nous avons utilisé un microscope à épifluorescence motorisé pour prendre une série d'images à des profondeurs différentes. En utilisant ensuite un algorithme de déconvolution nous avons réussi à diminuer considérablement le bruit de fond (planche 3 d-f) et à obtenir des images de grande qualité rendant compte de la structure des arbuscules à l'intérieur des racines.

L'uvitex 2B permet donc d'obtenir des images de grande qualité sur *C. equisetifolia*. Nous avons utilisé par la suite cette méthode de coloration pour comparer la mycorhization obtenue avec les COS et COA.

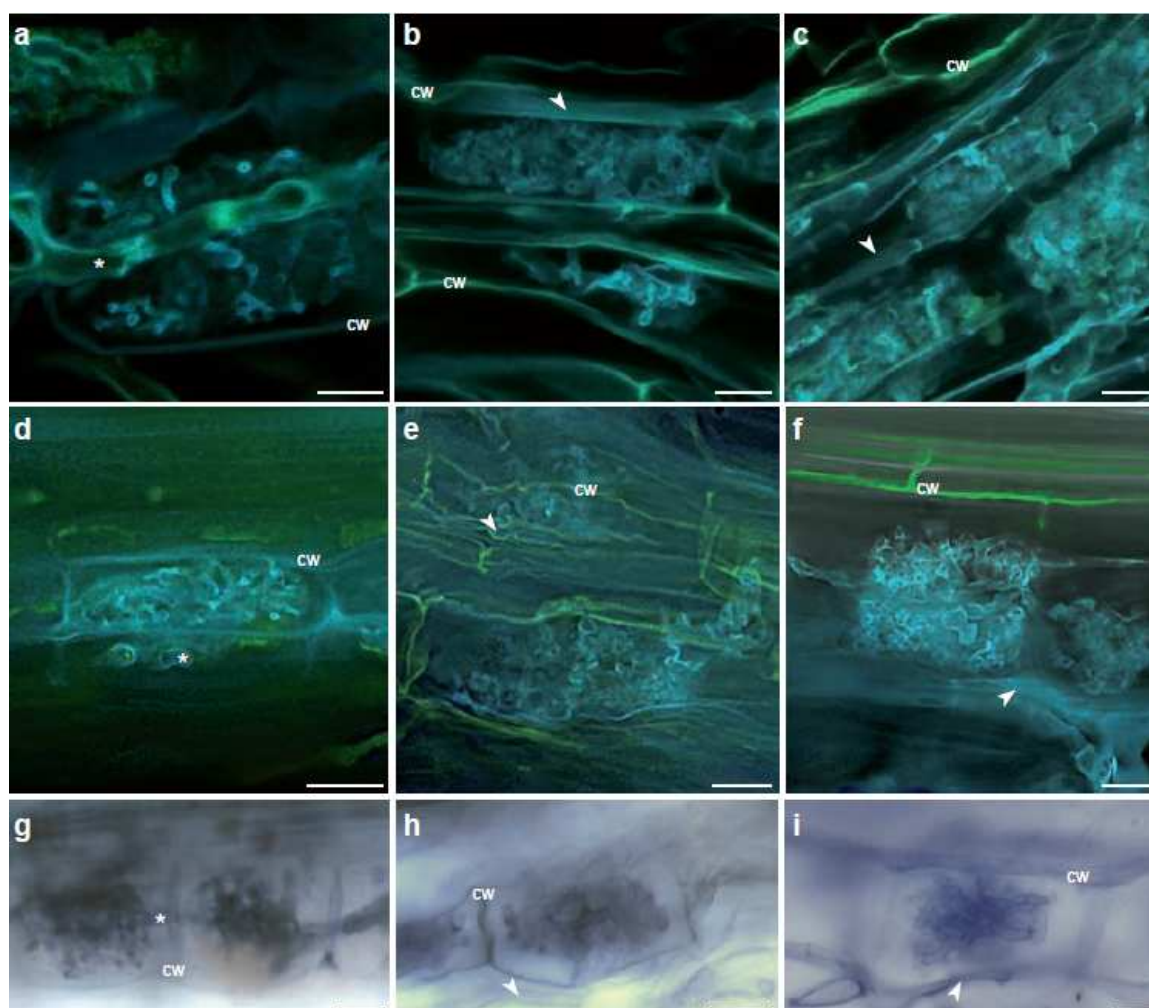


Planche 3. (a-f) Racines de Carotte, *C. equisetifolia* et *M. truncatula* (respectivement première, deuxième et troisième colonne) colonisées par *G. intraradices*; (a-c) racines colorées à l'Uvitex2B et observées au microscope confocal ou au microscope à épifluorescence, la fluorescence de l'Uvitex correspond au bleu et l'auto fluorescence de cellules au vert ; (d-f) Images acquises au microscope à épifluorescence et déconvoluées ; (g-i) racines colorées par le bleu de trypan et observées à la lumière blanche. Barre=10 μ m

1 4) Utilisation de l'uvitex2B pour quantifier la colonisation par le champignon mycorhizien

Pour étudier l'effet des différentes souches colonisant *C. equisetifolia*, nous avons analysé le taux de colonisation de la racine. Pour ce faire, nous avons inoculé des plantes de deux semaines avec les complexes COS ou COA, nous avons récolté les racines au bout de deux mois et nous avons visualisé les structures fongiques sur des racines colorées à l'Uvitex 2B au microscope. Cela a permis de calculer la fréquence de mycorhization selon la méthode décrit dans Gherbi *et al.*, (2008).

Dans tous les cas le type de colonisation observé au niveau des racines est de type

ARUM. Un taux de mycorhization significativement plus élevé a été observé chez les plantes inoculées avec le COS. Pour les plantes co-inoculées avec ce complexe symbiotique et *Frankia*, une diminution de la fréquence de mycorhization a été notée. La fréquence de mycorhization la plus faible a été obtenue chez les plantes inoculées avec le COA. Cependant chez ces plantes, la double inoculation COA / *Frankia* stimule significativement la mycorhization (Figure 42).

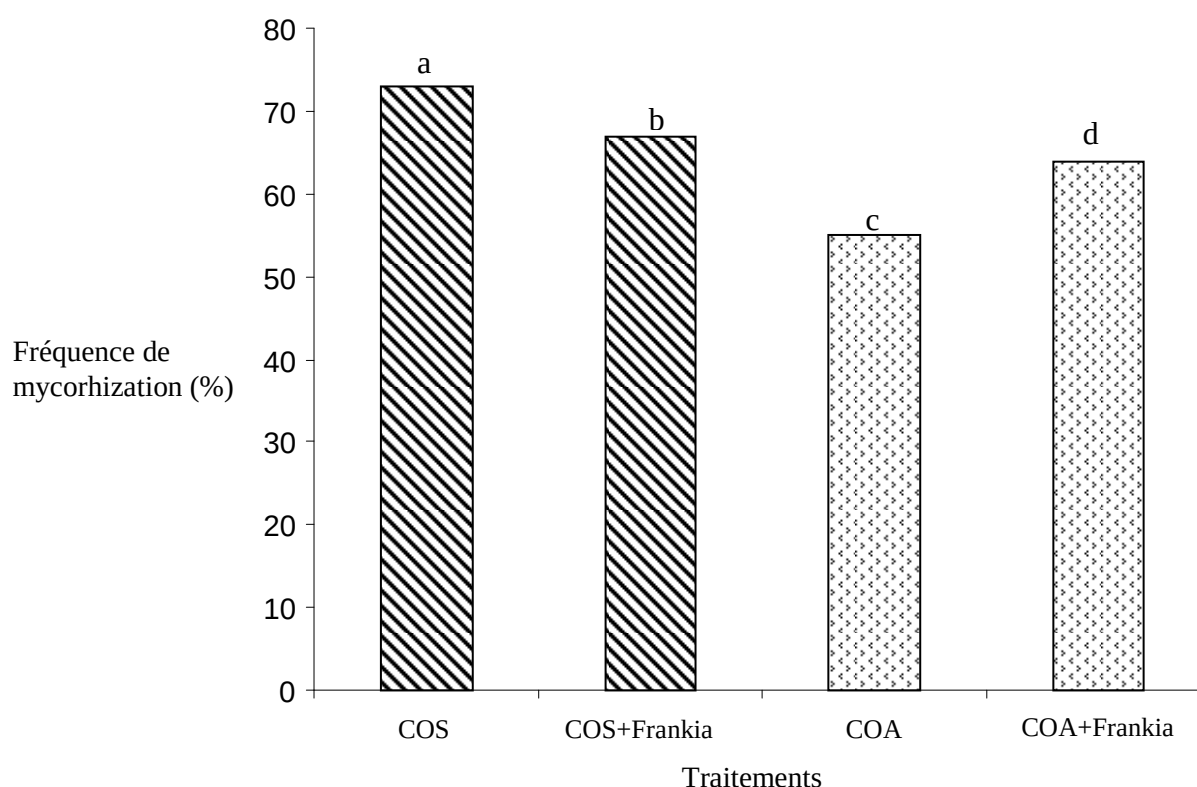


Figure 42. Fréquence de mycorhization des plantes de *C. equisetifolia* inoculées avec le complexe microbien d'origine sénégalaise (COS) ou d'origine australienne (COA). *Frankia* : traitement incluant en plus une inoculation avec *Frankia*. Les traitements affectés la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman - Keuls).

2) Caractérisation fonctionnelle de la symbiose mycorhizienne chez *C. equisetifolia*

à l'aide de marqueurs histochimiques

2 1) Mise en évidence des structures fongiques métaboliquement actives en révélant l'activité succinate déhydrogénase (SDH)

Pour déterminer le métabolisme actif dans les structures fongiques, nous avons révélé l'activité SDH, cette activité est un marqueur de l'efficacité de la symbiose mycorhizienne. Les racines des plantes de *C. equisetifolia* inoculées avec le COA ou avec le COS ont été

prélevées au bout de deux et de quatre mois après inoculation et colorées par une solution de NBT, selon le protocole décrit dans Vierheilig *et al.*, (2005).

L'activité SDH est significativement plus importante chez les plantes inoculées avec le COS à deux mois et quatre mois après inoculation (planche 4 a, Figures 43 A1 et A2). Deux mois après inoculation, il n'y a pas de différence significative entre l'activité SDH des plantes co-inoculées avec le COS et *Frankia* et les plantes inoculées avec le COA. Par ailleurs à 4 mois après inoculation, une baisse de l'activité SDH a été notée chez les plantes inoculées avec le COA ou avec ce complexe et *Frankia* comparé à l'intensité d'activité SDH obtenue à deux mois après inoculation (figure 43 A1).

2 2) Mise en évidence des structures fongiques métaboliquement actives en révélant l'activité phosphatase alcaline (ALP)

Un autre marqueur de l'activité métabolique mycorhizienne est l'activité phosphatase alcaline, qui peut être révélée en utilisant un colorant, le Fast Blue RR. Nous avons utilisé le protocole décrit dans Vierheilig *et al.*, (2005) pour mettre en évidence cette activité dans des racines de *C. equisetifolia* inoculées avec le COS ou le COA (planche 4 b, figures 43 B1 et 43 B2).

Les résultats obtenus montrent qu'à deux mois et quatre mois après inoculation l'activité ALP est légèrement plus importante chez les plantes inoculées avec le COS comparées à celles co-inoculées avec ce complexe symbiotique et *Frankia* (figure 43 B1 et 43 B2) ou celles inoculées avec le COA. Cependant cette augmentation notée n'est pas significative. Pour les plantes inoculées avec le COA ou co-inoculées avec ce complexe symbiotique et *Frankia*, l'intensité de l'activité ALP observée n'est pas significativement différente aussi bien à deux mois et quatre mois après inoculation.

2 3) Mise en évidence des structures fongiques sénescentes en utilisant la diamino-Benzidine (DAB)

Pour évaluer le nombre de structures fongiques en sénescence, nous avons coloré les racines de *C. equisetifolia* inoculées avec le COA ou le COS en utilisant la diaminobenzidine, ce colorant permet de visualiser l'accumulation d'espèces actives d'oxygène, que l'on trouve en abondance dans les cellules contenant des structures fongiques en sénescence (Vierheilig *et al.*, (2005) (planche 4 c, figure 43 C1 et 43 C2).

Les résultats obtenus montrent qu'à deux mois après inoculation (figure 43 C1), il n'y

a pas de différence significative du nombre de structures fongiques en sénescence observées chez les plantes inoculées avec le COS et celles inoculées avec le COA. A quatre mois après inoculation (figure 43 C2), ce nombre est significativement plus élevé chez les plantes co-inoculées avec le COA et *Frankia* comparées aux plantes inoculées uniquement avec le COA ou avec le COS.

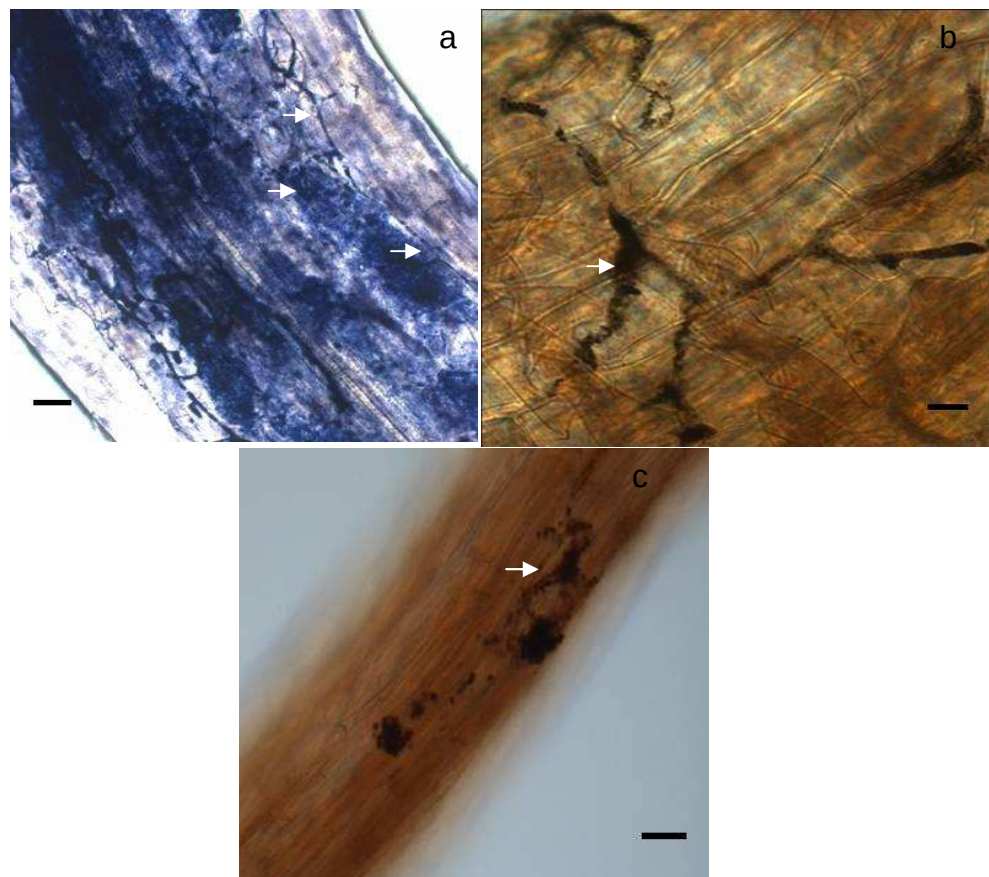


Planche 4. Colorations histochimiques mettant en évidence l'activité métabolique ou la sénescence de structures fongiques dans des racines de *C. equisetifolia*. a : Coloration au NBT mettant en évidence l'activité Succinate Dehydrogenase sous forme d'un précipité bleu au niveau des hyphes et des arbuscules. Barre = 25 μ m ; b : Coloration au fast blue RR mettant en évidence l'activité alcaline phosphatase sous forme d'un précipité brun au niveau d'un arbuscule Barre= 25 μ m ; c : Coloration à la diaminobenzidine mettant en évidence les espèces actives d'oxygène au niveau d'un arbuscule sénescents Barre = 50 μ m.

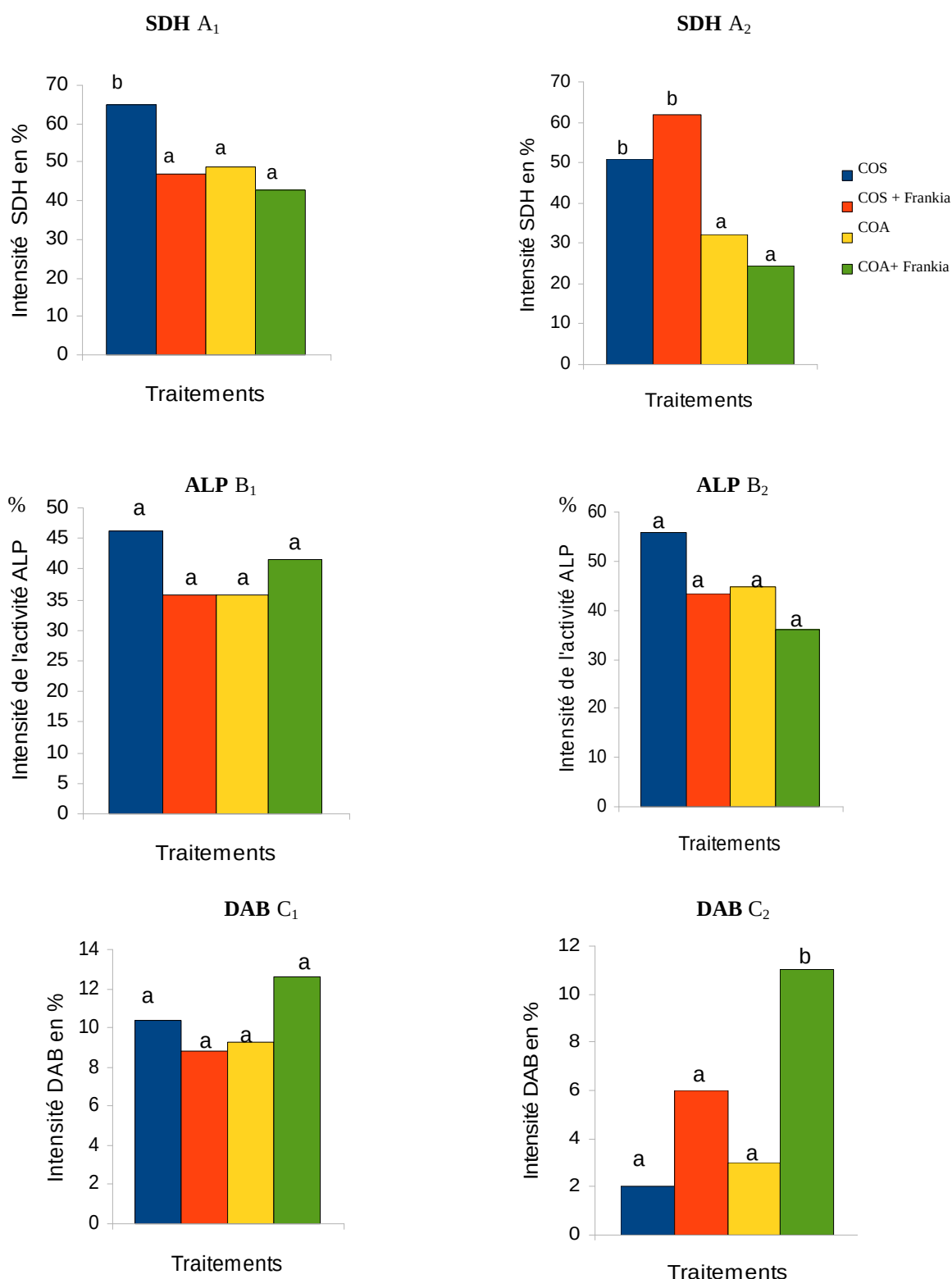


Figure 43. Activité métabolique dans les racines de *Casuarina equisetifolia* inoculées avec le COA ou le COS. A : Intensité SDH dans les racines mycorhizées A₁ : deux mois après inoculation ; A₂ quatre mois après inoculation. B : Intensité de l'activité ALP dans les racines mycorhizées B₁ : deux mois après inoculation ; A₂ quatre mois après inoculation. C : Visualisation de la coloration (DAB) dans les racines mycorhizées (DAB) C₁ : deux mois après inoculation ; C₂ : quatre mois après inoculation.

3) Etude de la fonctionnalité des symbioses mycorhizienne et actinorhizienne à l'aide de marqueurs moléculaires

Pour caractériser les différences fonctionnelles obtenues suite à l'inoculation avec le complexe symbiotique d'origine australienne ou le complexe symbiotique d'origine sénégalaise nous avons utilisé des gènes dont l'expression est liée à la fonctionnalité des symbioses : le gène *CePT4* pour la symbiose mycorhizienne, les gènes *Ce12*, *CeHb* et le gène *nifH* pour la symbiose actinorhizienne.

3 1) Caractérisation fonctionnelle de la symbiose mycorhizienne à l'aide de marqueurs moléculaires : Analyse de l'expression de *CePT4*, marqueur du transport symbiotique de Pi

Chez *M. truncatula* le transport symbiotique de Pi est réalisé par la protéine *MtPT4*. Le gène correspondant, *MtPT4* est spécifiquement exprimé dans les cellules contenant des arbuscules, et cette expression est essentielle au transport symbiotique de Pi (Javot *et al.*, 2007a,b). Le niveau d'expression de *MtPT4* est donc corrélé au niveau de transport symbiotique de Pi et traduit la fonctionnalité de la symbiose mycorhizienne. Un gène très proche de *MtPT4* avait déjà été isolé par le laboratoire (équipe Rhizogenèse) chez *C. glauca*, *CgPT4*. *CePT4*, l'orthologue de *CgPT4/MtPT4* dans *C. equisetifolia* a été cloné par PCR en utilisant des amorces situées dans des régions conservées. Nous avons ensuite analysé l'expression de ce gène par RT-PCR quantitative dans les racines de *C. equisetifolia* inoculées avec le complexe symbiotique d'origine australienne ou le complexe symbiotique d'origine sénégalaise (Figure 44 A). Le gène *CePT4* est plus exprimé dans les racines mycorhizées des plantes inoculées avec le COS par rapport à celles inoculées avec le COA. Pour ces plantes, l'inoculation avec *Frankia* n'a pas d'effet significatif.

3 2) Caractérisation fonctionnelle de la symbiose actinorhizienne à l'aide de marqueurs moléculaires : étude de l'expression des gènes *Ce12*, *CeHB* et *nifH*

- Expression du gène marqueur *Ce12*, marqueur de l'infection par *Frankia*

Chez *C. glauca*, le gène *Cg12* est un marqueur de l'infection des cellules végétales par *Frankia* : son expression est restreinte aux cellules infectées (Svistoonoff *et al.*, 2003). En utilisant des amorces correspondant à des régions conservées entre *Cg12* et l'orthologue de *Cg12* chez l'Aulne, *Ag12*, nous avons isolé le gène correspondant chez *C. equisetifolia*, *Ce12*. Nous avons ensuite analysé l'expression de ce gène dans les racines de *C. equisetifolia*

inoculées avec le COS ou le COA. Les analyses d'expression par PCR quantitative montrent que *Ce12* est davantage exprimé chez les plantes inoculées avec le COA par rapport aux plantes inoculées avec le COS. Ces résultats suggèrent que les niveaux de colonisation par *Frankia* sont supérieurs chez les plantes inoculées avec le COA. La double inoculation complexe COA ou complexe COS a significativement augmenté l'expression du gène *Ce12* dans les racines (Figure 44 B), mais cette augmentation est beaucoup plus faible pour les plantes inoculées avec le COS.

- Expression du gène marqueur *CeHB*, gène de *C. equisetifolia* codant l'hémoglobine

Chez *C. glauca* le gène *CgHB* code une hémoglobine symbiotique fortement exprimée dans les nodules, c'est un marqueur de la fixation biologique de l'azote ayant lieu à l'intérieur des nodules. Comme pour *Ce12*, nous avons isolé l'orthologue de *CgHb* chez *C. equisetifolia*, *CeHb* en utilisant des amorces situées sur des régions conservées et nous avons analysé son expression par RT-PCR quantitative (Figure 44 C). *CeHB* est fortement exprimé dans les racines de plantes co-inoculées avec le COA et *Frankia* (Figure 44 C). Une plus faible expression de ce gène a été notée chez les plantes inoculées uniquement avec le COA, chez les plantes inoculées uniquement avec le COS ou co-inoculées avec le COS et *Frankia*. La double inoculation complexe symbiotique (COA ou COS) plus *Frankia* stimule significativement l'expression de *CeHB* uniquement pour le COA. Ces résultats suggèrent que les plantes inoculées avec le COS fixent moins d'azote que celles inoculées avec le COA, et que dans ce cas celle-ci ne peut être accrue par une inoculation de *Frankia*.

- Expression du gène marqueur *nifH* gène de *Frankia* codant la nitrogénase

Un autre marqueur de la fixation d'azote est le gène *nifH* de *Frankia* qui code une nitrogénase essentielle pour la fixation biologique de l'azote. Nous avons analysé l'expression du gène *nifH* de *Frankia* dans les plantes de *C. equisetifolia* inoculées avec le COS ou le COA. Nos analyses montrent que *nifH* est fortement surexprimé dans les racines de plantes co-inoculées avec le COA et *Frankia* comparées aux autres traitements (Figure 44 D). Ces résultats montrent aussi que la double inoculation COS et *Frankia* augmente l'expression du gène *nifH*. Cependant, l'augmentation de l'expression du gène *nifH* obtenue lors de la co inoculation COA et *Frankia* est significativement plus important que celle obtenue lors de la co inoculation COS et *Frankia*.

Ces résultats suggèrent, tout comme ceux obtenus avec *Ce12* et *CeHB* que les plantes inoculées avec le COA fixent davantage d'azote et que c'est dans ce contexte que l'inoculation avec *Frankia* a un effet significatif.

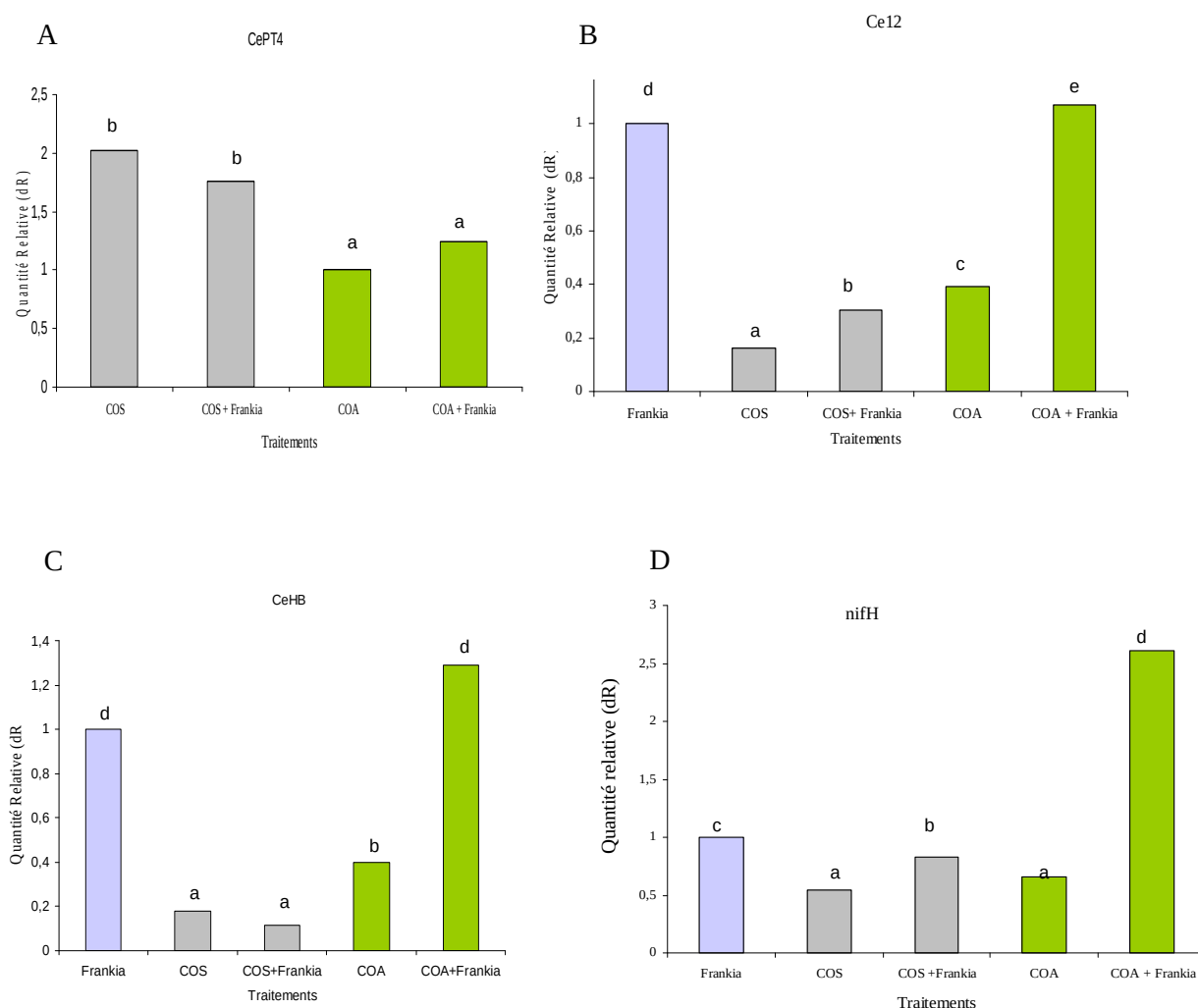


Figure 44. Expression de gènes marqueurs de la symbiose mycorhizienne (*CePT4*) et actinorhizienne (*Ce12*, *CeHB*, *nifH*) dans les racines de plantes inoculées avec le COA ou le COS. A : Expression de *CePT4*, gène de *C. equisetifolia* codant un transporteur de Pi, B : Expression de *Ce12* gène de *C. equisetifolia* codant une substilase, marqueur de l'infection par *Frankia* ; C : Expression de *CeHB*, gène de *C. equisetifolia* codant l'hémoglobine, marqueur de la fixation d'azote; D : Expression de *nifH*, gène de *Frankia* marqueur de la fixation d'azote.

IV) Discussion

Les différents résultats obtenus dans ces travaux montrent que : (i) l'Uvitex 2B est un bon marqueur pour la caractérisation histologique des structures fongiques, (ii) l'inoculation avec le COS améliore significativement la fréquence de mycorhization des plantes de *C. equisetifolia*, (iii) cette fréquence de mycorhization plus importante chez les plantes inoculées avec le COS s'accompagne d'un métabolisme actif plus important des structures fongiques,

d'un nombre de structures fongiques en sénescence moins important et d'un transport de Pi plus élevé chez ces plantes inoculées avec le COS.

Une visualisation des structures fongiques a été possible grâce à une coloration de racines de *C. equisetifolia* au bleu de trypan (Phillips et Hayman, 1970), au bleu d'aniline (Nicolson, 1959), à l'encre et vinaigre (Vierheilig *et al.*, 1998) et au WGA-488 (Vierheilig *et al.*, 2005). Cet ensemble de colorants permet de détecter les structures fongiques et notamment de calculer les pourcentages et l'intensité de colonisation racinaire par le symbiote fongique comme il a été décrit par Giovannetti et Mosse, (1980) ou par Trouvelot *et al.*, (1986). La coloration à l'Uvitex 2B, une nouvelle technique pour la caractérisation histochimique des structures fongiques à l'intérieur des racines mycorhizées a donné de très bons résultats. Ce colorant présente de nombreux avantages par rapport à l'ensemble de colorants testés : (1) L'uvitex 2B est un colorant fluorescent qui permet donc d'obtenir des images de très grande qualité en microscopie confocale. Comme sa fluorescence est très intense et stable, des images de grande qualité peuvent même être obtenues en microscopie à épifluorescence, en faisant une acquisition séquentielle d'images à plusieurs profondeurs et en appliquant un algorithme de déconvolution pour supprimer le bruit de fond. (2) Aucun effet toxique de ce colorant n'a été relevé à nos jours ce qui justifie davantage son choix parmi d'autres colorants comme l'acide fuschine et le bleu de trypan soupçonnés d'avoir des effets cancérogènes (Coombes et Haveland-Smith, 1982; IARC, 1987, 1999). (3) Son faible coût, sa facilité d'utilisation et sa stabilité permet son utilisation à grande échelle par exemple pour l'analyse de la fréquence et de l'intensité de mycorhization sur de nombreux échantillons.

En utilisant l'Uvitex 2B nous avons pu visualiser les structures fongiques formées lors de l'inoculation avec le COA et le COS. Aucune différence notable au point de vue structurel n'a pu être décelée, dans les deux cas des hyphes, des vésicules et des arbuscules de morphologie et de taille similaire ont été observés, et dans tous les cas le mode d'infection est de type ARUM, avec des hyphes intercellulaires donnant naissance à des arbuscules intracellulaires. Malgré les différences phénotypiques entre les plantes inoculées avec le COA ou avec le COS, aucune différence structurelle majeure n'a pu être décelée. Par contre nous avons mis en évidence des différences significatives en ce qui concerne le pourcentage de mycorhization : un taux de colonisation par le champignon significativement plus élevé est observé chez les plantes inoculées avec le COS. Ce résultat suggère que le COS contient des souches plus agressives pour l'infection des racines de *C. equisetifolia*.

L'inoculation avec *Frankia* a des effets contrastés: elle augmente la colonisation

fongique chez les plantes inoculées avec le COA alors qu'elle diminue cette colonisation chez les plantes inoculées avec le COS. Ce résultat pourrait s'expliquer par une différence de compatibilité entre la souche de *Frankia* utilisée pour l'inoculation (=CcI3) et les complexes COS et COA. Les travaux de Shah *et al.*, (2006) et d'Elumalai et Raaman, (2009) ont montré que la double inoculation champignon MA et la bactérie du genre *Frankia* augmentait significativement l'infection mycorhizienne comparée aux plantes inoculées avec le partenaire fongique ou bactérienne uniquement.

Ces différences au niveau du taux de colonisation nous permettent d'émettre l'hypothèse que les deux origines de complexes symbiotiques pourraient être fonctionnellement différentes. Les tests histochimiques réalisés confirment cette différence fonctionnelle des complexes symbiotiques car l'activité métabolique au niveau des structures fongiques est différente suivant le complexe symbiotique inoculé aux plantes.

Concernant le métabolisme actif des structures mycorhiziennes, une forte activité SDH a été notée chez les plantes inoculées avec le COS à deux et quatre mois après inoculation. Chez ces plantes, cette activité SDH importante traduirait une symbiose mycorhizienne plus fonctionnelle par rapport à celle des plantes inoculées avec le COA où elle est moins importante. Puisque l'activité SDH est un indicateur du métabolisme actif des structures fongiques (MacDonald et Lewis, 1978 ; Smith et Gianinazzi-Pearson, 1990 et Abdel-Fattah, 2001), cette activité métabolique importante notée au niveau des plantes inoculées avec le COS est corrélable à l'efficacité de la symbiose mycorhizienne observée au niveau des racines de ces plantes. De plus, pour ces plantes, le pourcentage de colonisation par le champignon est plus important ce qui confirme l'agressivité de souches fongiques présentes dans le COS. Des résultats similaires sont obtenus avec l'activité phosphatase alcaline un autre marqueur de la fonctionnalité mycorhizienne. De façon intéressante, quand nous avons utilisé un marqueur qui visualise les structures fongiques en sénescence ; la diaminobenzidine nous avons obtenu un résultat inverse : ce sont les plantes inoculées avec les souches sénégalaises qui ont montré les taux plus faibles de sénescence. Un nombre important de structures fongiques en sénescence a été noté chez les plantes co-inoculées avec le COA et *Frankia* à quatre mois après inoculation. Ce nombre de structures fongiques en sénescence élevé dans ces racines et la faible activité SDH observée au niveau de ces mêmes racines pourraient être des arguments pour dire que la symbiose mycorhizienne est moins efficace chez les plantes inoculées avec le COA. Selon Vierheilig *et al.*, (2005) ces structures visualisées par la DAB sont généralement des arbuscules produisant d'abondantes espèces actives d'oxygène. D'après Alexander *et al.*, (1988) et Blee et Anderson, (1996) l'induction

d'espèces actives d'oxygènes a généralement lieu pendant la phase de dégénérescence des arbuscules. Il a été démontré par Toth et Miller, (1984) que les arbuscules sont des structures éphémères avec une durée de vie de 4 à 5 jours. En se basant sur ces travaux, on peut émettre comme hypothèses : i) une dégénérescence plus précoce des arbuscules formés chez les plantes inoculées avec le COA, ii) un surplus de *Frankia* dans ce complexe qui pourrait induire des réponses de défenses comme la production d'espèces actives d'oxygène. Cette dégénérescence importante des structures fongiques formées chez les plantes inoculées avec le COA pourrait être la cause de l'importante baisse de l'activité SDH de ces plantes à quatre mois comparée au métabolisme actif des structures fongiques obtenu à deux mois. Ce résultat pourrait être confirmé par l'augmentation significative des arbuscules en sénescence observées à quatre mois après inoculation chez les plantes co-inoculées avec le COA et *Frankia*. L'ensemble de ces analyses histochimiques montrent qu'à côté d'un taux d'infection plus important chez les plantes inoculées avec le COS, le métabolisme actif des structures fongiques formées par ce complexe symbiotique est plus important.

Les analyses moléculaires réalisées pour une caractérisation fonctionnelle de la symbiose mycorhizienne montrent une corrélation positive entre le métabolisme actif des structures fongiques et le transport symbiotique de Pi, mis en évidence par les études d'expression de *CePT4*. Pumplin et Harrison, (2009) ont montré une absorption optimale de Pi dans les arbuscules matures. Ces résultats sont en concordance avec notre étude où l'on note, cette corrélation positive entre le métabolisme actif des structures fongiques et le transport du Pi. Les travaux de Javot *et al.*, (2007a) ont montré une sénescence prématurée des arbuscules en l'absence de ce transport spécifique de Pi pendant la symbiose mycorhizienne. Ces auteurs sont allés plus loin en montrant que la durée de vie de l'arbuscule était influencée par sa capacité à délivrer du Pi ; mieux, ils montrent que la mutation de ce transporteur chez *M. truncatula* entraînait la dégradation des arbuscules. L'ensemble de leurs travaux montre une corrélation positive entre l'expression de ce gène et le transport de phosphate symbiotique dans les racines. Leurs travaux sont en concordance avec nos résultats, où on note chez les plantes inoculées avec le COS un métabolisme fongique actif et un transport de Pi plus important positivement corrélés. Ces résultats suggèrent que les plantes inoculées avec le COS sont capables de mobiliser davantage de Pi par la voie symbiotique.

Inversement, l'expression plus faible de ce gène transporteur de Pi observé dans les racines des plantes inoculées avec le COA pourrait être liée au nombre de structures en sénescence beaucoup plus important chez les plantes inoculées avec le COA et un métabolisme fongique plus faible mis en évidence avec les activités SDH et ALP. Des études

ont montré que cette activité ALP est reliée à l'efficacité du prélèvement du Pi par les mycorhizes et que plus l'intensité de l'activité ALP est forte plus le prélèvement du Pi est important (Tisserant *et al.*, 1993). L'absence de différences significatives pour l'activité ALP entre les traitements pourrait être due à une moindre sensibilité de cette technique empêchant de mettre en évidence de faibles différences d'activité métabolique.

En ce qui concerne les marqueurs de la symbiose actinorhizienne, notre étude montre une expression des gènes *Ce12* et *CeHB* plus forte dans les racines des plantes inoculées avec le COA ou COA plus *Frankia* comparée à l'expression chez les plantes inoculées avec le COS ou COS plus *Frankia*. Cependant, il y a pas de différence significative de l'expression du gène *nifH* chez les plantes inoculées avec le COA ou le COS alors que la double inoculation par le COA plus *Frankia* entraîne une augmentation significative de l'expression de ce gène. La forte expression chez les plantes inoculées par le COA plus *Frankia* pourrait s'expliquer par une quantité plus importante de *Frankia* dans le COA. Il est intéressant de noter que l'inoculation avec *Frankia* a un effet positif sur l'expression de *Ce12*, *CeHb* et *nifH*, mais cet effet est très faible à deux mois après inoculation chez les plantes inoculées avec le COS, ce qui suggère que les différences entre le COA et le COS ne se situent pas au niveau de la quantité de *Frankia* initialement présente, mais de la compatibilité avec le COS. Cependant, les teneurs importantes d'azote notées dans le chapitre 3 des résultats à 6 mois suggèrent que cette teneur plus élevée ne serait pas liée à une fixation d'azote par *Frankia* mais plutôt à un transfert d'N via les transporteurs d'N du champignon (Lopez-Pedrosa *et al.*, 2006).

Ces résultats ont aussi une implication au niveau pratique : en présence du COS, l'inoculation avec *Frankia* n'améliore pas la fixation d'azote.

IV) Conclusion

Les résultats de ces expériences montrent une fréquence de mycorhization plus importante chez les plantes inoculées avec le COS. Parallèlement, les analyses permettant d'étudier la fonctionnalité de cette symbiose avec des marqueurs histochimiques et moléculaires montrent un métabolisme plus actif et un transport symbiotique de Pi accru pour les plantes inoculées avec le COS. Ces résultats traduisent une symbiose mycorhizienne plus efficace chez les plantes inoculées avec le COS. La croissance et la biomasse racinaire significativement plus importante observées pour les plantes inoculées avec le COS (chapitre 3) seraient donc dues à une symbiose mycorhizienne plus efficace en termes de métabolisme et de transport symbiotique de Pi.

6° CHAPITRE 5

Discussion Générale

Discussion Générale

Afin de sélectionner des microorganismes symbiotiques performants en association avec *C. equisetifolia*, nous avons étudié la diversité de deux complexes microbiens symbiotiques provenant de l'Australie (=COA, la zone d'origine de *C. equisetifolia*) et du Sénégal (=COS, une zone d'introduction de *C. equisetifolia*), leur impact sur la croissance de *C. equisetifolia* et sur la diversité fonctionnelle de la communauté bactérienne, et le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne chez cette espèce végétale. Les résultats obtenus montrent que, l'inoculation avec les complexes symbiotiques stimule significativement la croissance en hauteur des plantes, leur biomasse, le taux de colonisation par le champignon et aussi les teneurs en N et Pi des parties aériennes des plantes. En sol non désinfecté, la croissance en hauteur la plus importante et les teneurs en N et Pi les plus élevées ont été trouvées chez les plantes inoculées avec le COS. L'étude de l'impact de l'inoculation sur la communauté microbienne du sol montre que le COS modifierait moins la structure de cette communauté comparé au COA. Cependant, un métabolisme actif des structures fongiques plus important, un transport de Pi et une équitabilité catabolique plus élevés ont été obtenus à la suite de l'inoculation avec le COS.

Ces résultats nous conduisent à dire que :

- la composition de la communauté fongique est variable suivant les origines des sols et ces variations auraient des influences sur la croissance de la plante,
- l'inoculation avec les complexes symbiotiques aurait un impact positif sur la croissance de *C. equisetifolia* et modifierait la diversité structurale et fonctionnelle de la communauté microbienne tellurique,
- cet effet positif des mycorhizes MA est plus marqué chez les plantes inoculées avec le COS et serait influencé par le métabolisme actif et le transport de Pi plus important notés dans les structures fongiques des racines mycorhizées par les champignons d'origine sénégalaise.

1) Diversité des souches fongiques dans les complexes symbiotiques COA et COS et impact de l'inoculation avec ces complexes sur la croissance de *C. equisetifolia* et sur la diversité structurale de la communauté bactérienne du sol

Dans ces complexes symbiotiques, des spores de genre *Glomus* et *Scutellospora* ont été trouvées dans le sol des plantes inoculées avec les complexes symbiotiques. Par contre, la caractérisation génétique de la communauté fongique à partir de racines mycorhizées par ces complexes montre une communauté fongique majoritairement composée de champignons

MA du genre *Glomus*. Ce résultat reflète une différence entre la communauté fongique des spores dans le sol et celle trouvée dans les racines mycorhizées. Des résultats similaires ont été trouvés par Clapp *et al.*, (1995); Kjoller et Rosendahl, (2001) et pourraient s'expliquer par l'infection des racines par d'autres types de propagules mycorhiziens différents des spores (Read et Birch, 1988; Brundrett et Abbott, 1994).

Dans ces deux complexes, les analyses génétiques ont révélé une différence dans la structure de la communauté fongique. La diversité des souches fongiques est plus importante au sein du COA alors que les plantes inoculées avec ce complexe ont une croissance en hauteur moins importante en sol non désinfecté. Ce résultat fait penser à deux hypothèses 1) les souches fongiques présentes dans le COA interagissent négativement avec la microflore native ce qui réduirait son influence sur les plantes et 2) le COS, mettrait en place des interactions positives soit de type trophiques avec la microflore native ce qui augmenterait son effet positif sur la plante. Ces interactions positives peuvent reposer sur le fait que certaines souches bactériennes peuvent augmenter la disponibilité des nutriments pour le champignon et jouer aussi le rôle d'antagonisme contre certains agents pathogènes et améliorer la stabilité du sol et de l'association champignon MA et plante hôte (Xavier et Germida, 2003, Rillig *et al.*, 2005).

Suite à l'inoculation, la communauté microbienne sous le sol des plantes inoculées avec le COA est moins proche de celle sous les plantes témoins. Cette communauté microbienne très différente de celle sous des plantes témoins pourrait être liée à la diversité de la communauté fongique dans ce même complexe car il a été démontré par Meyer et Linderman, (1986) et Hobbie, (1992) que les champignons MA avaient un effet sélectif sur la communauté bactérienne.

Paradoxalement, cette communauté microbienne très différente de celle sous les plantes témoins ainsi que la diversité fongique plus importante notée dans le COA n'entraînent pas un meilleur développement des plants de *C. equisetifolia*. La meilleure croissance en sol désinfecté a été obtenue chez les plantes inoculées avec le COS. Ce résultat montre une efficacité des souches fongiques du COS qui ont stimulé la croissance de la plante et augmenté les teneurs en N et Pi dans les parties aériennes. Puisque les champignons MA peuvent différer par la quantité de phosphate transféré à la plante (Smith *et al.*, 2004), la performance du complexe symbiotique s'explique par une présence de structures mycorhiziennes plus efficaces dans le mécanisme d'absorption des minéraux et particulièrement dans le prélèvement de Pi (Smith et Read, 2008). Ceci est confirmé par les teneurs plus importantes de Pi et d' N dans les feuilles des plantes inoculées par ce complexe mais aussi par la forte expression du gène *CePT4*, gène codant un transporteur symbiotique de

Pi dans les racines mycorhizées par les souches fongiques de ce complexe.

Ce résultat montre que les souches natives seraient plus performantes que les souches exotiques. Des résultats similaires ont été trouvés par (Caravaca *et al.*, 2003 et Ouahmane *et al.*, 2007). D'après ces derniers, les souches fongiques natives constituent des inocula très performants comparées aux souches introduites.

Parallèlement en sol non désinfecté, la croissance importante des plantes inoculées avec les souches natives s'est traduite par une augmentation de la biomasse racinaire. Les travaux de Duponnois *et al.*, (2008), Elumai et Raaman, (2009) ont montré que le champignon MA favorisait l'enracinement des plantes associées et stimulait le système racinaire. Malgré, une dépendance mycorhizienne faible a été obtenue dans ce sol non désinfecté. Cependant l'inoculation avec les complexes mycorhiziens a des effets bénéfiques sur les plants de *C. equisetifolia*. La proposition qui pourrait être faite pour expliquer ce résultat est la réceptivité du sol de culture à l'inoculum. Cette réceptivité du sol est fonction de ces caractéristiques physicochimiques mais aussi de la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne présente dans ce sol ce qui illustre le rôle important de la microflore bactérienne. Parmi cette microflore, on peut noter les bactéries auxiliaires de la mycorhization (BAM). Ces BAM peuvent améliorer l'établissement de la symbiose en stimulant le développement du système racinaire de la plante et du mycélium, en sécrétant des phytohormones comme l'auxine qui a des effets sur la rhizogenèse, en stimulant la réceptivité des plantes et en sécrétant des substances rendant plus compétitifs les champignons MA vis-à-vis de la communauté bactérienne native du sol. Ces bactéries peuvent soit fragiliser la paroi des racines ce qui faciliterait leur infection par le champignon ou soit jouer le rôle de détoxificateur du milieu et réduire ainsi la compétition des champignons vis-à-vis d'autres agents microbiens du sol.

2) Impact de l'inoculation avec des complexes symbiotiques (champignons MA et bactéries) sur la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne associée

Les champignons MA influencent directement la communauté bactérienne par la sécrétion d'exsudats fongiques (Toljander *et al.*, 2007) ou indirectement en influençant la composition des exsudats racinaires de la plante (Andrade *et al.*, 1998). Par ces exsudats racinaires modifiés, le champignon change la structure de la communauté bactérienne dans le sol (Graham *et al.*, 1981 ; Marschner *et al.*, 1997 et Andrade *et al.*, 1998). Il en résulte souvent une modification de la diversité fonctionnelle de la communauté bactérienne comme il a été démontré par Duponnois *et al.*, (2005a) ; Sanon *et al.*, (2006) ; Ouahmane *et al.*, (2006).

Cette modification de la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne est bien visible en étudiant l'activité microbienne avec la méthode de la fluorescéine diacétate (FDA) qui représente l'activité microbienne totale dans le sol. La forte augmentation de cette activité dans le sol sous des plantes inoculées avec les complexes symbiotiques comparées aux plantes témoins, montre l'effet des champignons MA sur la communauté bactérienne. Puisque l'influence des champignons MA sur la diversité microbienne dépend surtout de l'extension du champignon dans le sol (Dabire *et al.*, 2007), une forte activité microbienne (qui pourrait correspondre à une diversité microbienne plus importante) dans le sol pourrait être corrélée à un développement important du système racinaire et à une quantité plus importante d'exsudat racinaire susceptible d'être modifié par le champignon MA.

Cette modification de la qualité des exsudats racinaires par le champignon peut provoquer une pression sélective sur la communauté microbienne du sol. Cette sélection s'explique par le changement de la composition des exsudats excrétés par la plante qui pourraient contenir plus de substrats facilement métabolisables par une large gamme de bactéries adoptant une stratégie de type r. Il en résulte une activité microbienne totale élevée comme il a été observé dans notre expérience chez les plantes inoculées avec les complexes symbiotiques.

Comme l'activité microbienne dans le sol est un facteur majeur qui détermine la disponibilité de nutriments pour la plante, une forte activité microbienne améliorerait considérablement la nutrition de la plante et provoquerait directement une augmentation de la productivité des plantes (Jeffries *et al.*, 2003) ce qui confirme la croissance plus importante des plantes inoculées avec les complexes symbiotiques comparées aux plantes non inoculées. Contrairement à un effet modéré sur la diversité fonctionnelle et génétique des bactéries du groupe des *Pseudomonas* fluorescents, l'inoculation avec des complexes microbiens symbiotiques a entraîné des modifications considérables dans la capacité de la microflore tellurique à cataboliser les différents substrats testés. Ces différences cataboliques ont des influences directes sur la stabilité des écosystèmes concernés. Les travaux menés par Degens *et al.*, (2001) ont permis de voir que la capacité d'un sol à résister aux perturbations et aux stress est fonction de son équitabilité catabolique et plus l'équitabilité catabolique est faible moins le sol est résistant aux stress et aux perturbations. Dans notre expérience, l'équitabilité catabolique la plus faible a été obtenue avec le sol sous des plantes inoculées avec le COA. Ce résultat suggère que ce sol résisterait moins aux stress environnementaux. Cette faible résistance aux stress crée un environnement plus déséquilibré comme il pourrait être le cas avec l'inoculation par le COA et d'où la croissance moins importante des plantes inoculées avec le COA. Ces résultats confirment l'hypothèse avancée sur la performance et l'efficacité

du COS. D'après les résultats de Dabire *et al.*, (2007) la capacité de la microflore à cataboliser des composés organiques tels que la lysine et l'acide glutamique est positivement corrélée au potentiel mycorhizien d'un sol. Le résultat obtenu avec un fort catabolisme plus important de la lysine et de l'acide glutamique chez les plantes inoculées avec le COS suggère un potentiel infectieux plus important dans le sol sous des plantes inoculées avec ce complexe. En résumé, la réponse de la microflore tellurique en termes de diversité fonctionnelle est fonction de l'origine et de la composition de l'inoculum fongique. Ces résultats corroborent avec ceux de Ouahmane *et al.*, (2007) qui ont montré que l'utilisation des champignons MA natifs permet d'optimiser la réhabilitation des sols dégradés car ils provoquent un environnement équilibré, stable et favorable au développement des essences végétaux. La corrélation positive entre l'équitabilité catabolique et la nutrition phosphatée des plants de *C. equisetifolia* montre aussi que cet indice est très pertinent dans l'évaluation de la stabilité des écosystèmes.

3) Les marqueurs histologiques, histochimiques et moléculaires : outils permettant de caractériser fonctionnellement la symbiose mycorhizienne et fixatrice d'azote chez *C. equisetifolia*

Certains colorants sont très efficaces dans la caractérisation histochimique des structures fongiques des racines mycorhizées. Parmi ces colorants, l'Uvitex2B a été choisi grâce à ses caractéristiques particulières : colorant très fluorescent et stable, sans effets toxiques, faible coût, utilisation facile. L'ensemble de ces caractéristiques ont fait de l'Uvitex2B un marqueur histologique de la symbiose mycorhizienne permettant l'acquisition d'images de très grande qualité soit avec le microscope confocal ou à épifluorescence. Grâce à cette coloration nous avons mis en évidence une colonisation de type ARUM pour l'ensemble de souches testées sur *C. equisetifolia*. Au niveau des structures fongiques (hyphes, vésicules et arbuscules) aucune différence morphologique notable n'a pu être observée entre les plantes inoculées avec le COS et celles inoculées avec le COA. Par contre les plantes inoculées avec le COS montrent des taux de colonisation plus importants. Ce résultat suggère que les souches fongiques du COS seraient plus agressives et cela résulterait en un prélèvement plus efficace des nutriments.

La double inoculation avec *Frankia* et le COS ou le COA ne donne pas un résultat similaire concernant le taux de colonisation de la plante par le champignon. L'augmentation du taux de colonisation suite à la double inoculation *Frankia* et COA et la diminution de ce taux de colonisation chez les plantes inoculées avec le COS et *Frankia* serait liée au type

d'interaction entre ces deux microorganismes. Des études ont montré une interaction positive de ces deux microorganismes entraînant une réponse plus importante au niveau de l'infection de la racine comparée à la réponse obtenue si l'un des partenaires est inoculé à la plante isolément (Gardner, 1986 ; Subba-Rao et Rodriguez-Barrueco, 1995; Shah *et al.*, 2006 et Elumalai et Raaman, 2009). Toutefois, on pourrait penser à une différence de compatibilité entre la souche *Frankia* et les champignons du COS. Ces résultats montrent une réponse différentielle suivant le complexe symbiotique ayant servi d'inoculum.

Des différences entre le COS et le COA ont également été mises en évidence en utilisant des marqueurs histochimiques et moléculaires de la fonctionnalité symbiotique. Le métabolisme actif des structures fongiques est plus important chez les plantes inoculées avec le COS où une intensité SDH plus importante a été trouvée comparée aux plantes inoculées avec le COA. Ce nombre de structures fongiques plus actives chez les plantes inoculées avec le COS pourrait expliquer la croissance plus importante de ces plantes (chapitre 3). Puisque l'activité SDH est un bon indicateur de la viabilité des structures fongiques (Kough *et al.*, 1987, Smith et Dickson, 1991) une activité SDH élevée chez les plantes inoculées avec le COS confirme l'efficacité de la symbiose mycorhizienne chez ces plantes et est en corrélation avec la croissance plus importante de ces plantes inoculées avec le COS. Parallèlement, d'autres tests histochimiques utilisant l'ALP un marqueur de l'activité phosphatase confirment l'efficacité de la symbiose mycorhizienne chez les plantes inoculées avec le COS où l'on trouve une activité ALP plus importante. Ces résultats sont positivement corrélés au transport de Pi plus important chez les plantes inoculées avec le COS avec une forte expression du gène *CePT4* gène codant un transporteur symbiotique de Pi chez *C. equisetifolia*. Inversement, les tests histochimiques avec la DAB, un marqueur de la sénescence des structures fongiques montrent un nombre élevé de structures fongiques en sénescence chez les plantes inoculées avec le COA. Cette dégénérescence importante des structures fongiques pourrait expliquer le faible métabolisme actif trouvé chez ces plantes et aussi, leur croissance moins importante. Ces résultats suggèrent que la symbiose mycorhizienne serait moins efficace chez les souches fongiques présentes dans le COA. Cependant, un nombre plus faible de structures en sénescence a été trouvé chez les plantes inoculées avec le COS. Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence de structures fongiques particulièrement des arbuscules ayant une durée de vie plus longue comparé aux arbuscules formés suite à l'inoculation par le COA. Puisque les structures visualisées par la DAB sont souvent des arbuscules produisant d'abondantes espèces actives d'oxygène Vierheilig *et al.*, (2005), une activité DAB importante correspondrait à une production d'espèces actives

d'oxygène (EAO) importante. Cette production d'EAO est souvent liée à des réactions de défense. Dans ce cas, on pourrait penser que l'activité DAB plus importante chez les plantes inoculées avec le COA et *Frankia* serait liée à un surplus de bactéries dans ce complexe induisant la production d'EAO. Chez les plantes inoculées avec le COA où la production d'EAO dans les arbuscules est importante, un transport de Pi moins élevé a été noté avec une expression de *CePT4* plus faible. Les arbuscules étant des sites d'échanges entre la plante et les champignons, une accumulation d'EAO dans ces structures réduirait donc fortement les échanges entre les deux partenaires. Les échanges plus importants notés chez les plantes inoculées avec le COS et correspondant à une expression plus forte du transporteur de Pi ; *CePT4* dans les racines mycorhizées par les champignons du COS est positivement corrélable à la croissance de ces plantes, aux taux de colonisation par le champignon, aux teneurs en N et Pi des parties aériennes et au métabolisme des structures fongiques (l'activité SDH plus importante et l'activité DAB plus faible). Ce résultat montre encore l'agressivité des souches fongiques d'origine sénégalaise et leur meilleure performance en termes de fonctionnalité de la symbiose mycorhizienne qui se traduit par une meilleure nutrition et une meilleure croissance des plantes. .

Contrairement à l'expression forte du gène *CePT4* dans les racines de plantes inoculées avec le COS, les gènes (*Ce12*, *CeHB* et *NIF*) impliqués dans la symbiose fixatrice d'azote sont fortement exprimés dans les racines des plantes inoculées avec le COA. Par contre, leur expression est très faible chez les plantes inoculées avec le COS à deux mois après inoculation. Cependant, les teneurs en N trouvées chez les plantes inoculées avec le COS à 6 mois après inoculation sont plus élevées (chapitre 3). Ce résultat suggère qu'au-delà de deux mois après inoculation avec le COS, des teneurs en N élevées peuvent être trouvées dans les parties aériennes des plantes. Cette quantité d'N importante dans les parties aériennes pourrait être liée au transport d'ammonium par les champignons (Lopez-Pedrosa *et al.*, 2006). Des transporteurs d'ammonium fongiques codés par des gènes similaires à *GintAMT1* (Lopez-Pedrosa *et al.*, 2006) pourraient être à l'origine de cette absorption d'azote.

7° CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1) Conclusion Générale

Cette étude qui visait à : 1) déterminer la diversité des souches fongiques présentes dans les complexes microbiens et leur influence sur la communauté bactérienne du sol 2) étudier l'impact de ces complexes sur la croissance de la plante et sur la diversité fonctionnelle de la microflore tellurique et 3) comprendre le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne et fixatrice d'azote à permis de dire que :

- Les spores présentes dans les deux complexes sont de deux genres, le genre *Scutellospora* et le genre *Glomus*. Cependant la caractérisation génétique de cette diversité avec des racines de *C. equisetifolia* mycorhizées par les complexes symbiotiques, permet de conclure que ces racines sont majoritairement mycorhizées par des souches du genre *Glomus*.
- Parallèlement, les analyses de la diversité génétique des souches fongiques conduit à dire que les complexes microbiens contiendraient des communautés de champignons différentes ; les clones de champignons MA présents dans le COA étant plus variables. L'inoculation avec ce complexe a entraîné une variabilité plus importante de la communauté bactérienne dans le sol.
- L'inoculation avec les complexes symbiotiques stimule la croissance des plantes, augmente le taux de mycorhization, les teneurs en N et en Pi dans les parties aériennes ainsi que la biomasse des plantes. Toutefois, l'impact de l'inoculation sur ces paramètres est plus important chez les plantes inoculées avec le COS où une corrélation positive est notée entre la croissance des plantes, le métabolisme actif des structures fongiques, le transport de Pi et la fonctionnalité des arbuscules.
- L'inoculation avec les complexes symbiotiques a modifié la diversité fonctionnelle des microorganismes dans le sol. Une activité microbienne totale plus importante a été notée chez les plantes inoculées comparées aux plantes non inoculées. Cette inoculation a aussi modifié l'activité catabolique des microorganismes dans le sol. Ainsi dans le sol des plantes inoculées avec le COS, une équitabilité catabolique plus élevée a été obtenue comparée aux plantes inoculées avec le COA où elle serait plus faible. Cette équitabilité catabolique plus élevée dans le sol des plantes inoculées avec le COS traduirait un environnement plus équilibré.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le COS serait constitué par une communauté de champignons MA agressifs qui en association avec *C. equisetifolia* conduirait à une symbiose mycorhizienne plus efficace. De plus, ce complexe provoquerait l'établissement d'une population bactérienne qui aurait une diversité catabolique élevée renforçant la

stabilisation de l'écosystème. Ces résultats suggèrent que le COS est plus efficace en association avec *C. equisetifolia* et pourrait être largement utilisé dans les programmes de revégétalisation avec cet arbre tropical.

2) PERSPECTIVES

Ce travail a montré que l'inoculation avec le complexe symbiotique d'origine sénégalaise a donné des résultats escomptés. Les champignons MA et la communauté bactérienne de ce complexe jouent un rôle considérable dans l'amélioration de la croissance de *C. equisetifolia*. Par ailleurs, il serait intéressant d'effectuer des études complémentaires afin de mieux caractériser ce complexe symbiotique microbien :

- faire une caractérisation morphologique des spores par des observations de la structure de leur membrane au microscope
- séquencer après étude de la diversité bactérienne par DGGE les bandes de souches de bactéries obtenues pour mieux caractériser la communauté bactérienne dans le sol
- isoler et caractériser les souches de *Frankia* présentes dans l'inoculum
- faire des cultures *in vitro* des champignons d'origine sénégalaise sur des racines de carottes transformées pour obtenir des souches pures de champignons
- faire des inoculations aux champs avec les souches pures de champignons MA d'origine sénégalaise
- répéter les expérimentations sur deux années
- élargir l'étude de la fonctionnalité de la symbiose avec d'autres marqueurs moléculaires impliqués dans la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne
- tester des sols de plusieurs origines avec des caractéristiques physico-chimiques différentes
- effectuer une caractérisation physico chimique du sol d'Australie.

8° REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

“A”

- Abd-Alla MH (1994)** Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae* phosphatases. *Biology and Fertility of Soils* 18: 216-218.
- Abdel-Fattah GM (2001)** Measurement of the viability of arbuscular-mycorrhizal fungi using three different stains; relation to growth and metabolic activities of soybean plants. *Microbiological Research* 156: 359-367.
- Adam G, Duncan H (2001)** Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 943-951.
- Alexander T, Toth R, Meier R, Weber HC (1989)** Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean and tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhizae in grasses. *Canadian Journal of Botany* 67: 2505-2513.
- Akiyama K, Hayashi H (2006)** Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of Botany* 97: 925-931.
- Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H (2005)** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
- Aliasgharzadeh N, Saleh Rastin N, Towfighi H, Alizadeh A (2001)** Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of the Tabriz Plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. *Mycorrhiza* 11: 119-122.
- Altieri MA (1999)** The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment* 74: 19-31.
- Ames RN (1989)** Mycorrhiza development in onion in response to inoculation with chiün-decomposing actinomycetes. *New Phytologist* 112: 423-427.
- Amir H, Pineau R (1998)** Effects of metals on the germination and growth of fungal isolates from New Caledonian ultramafic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 2043-2054.
- Andrade G, Mihara KL, Linderman RG (1998)** Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant Soil* 202: 89-96.
- Arahou M, Diem HG (1997)** Iron deficiency induces cluster (proteoid) root formation in *Casuarina glauca*. *Plant Soil* 196: 71-79.
- Artursson V, Finlay RD, Jansson JK (2006)** Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8:1-10.

- Assigbetse K, Gueye M, Thioulouse J, Duponnois R (2005)** Soil bacterial diversity responses to root colonization by an ectomycorrhizal fungus are root-dependent. *Microbial Ecology* 50: 350-359.
- Augé RM (2004)** Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science* 84: 373-381.
- Augé RM (2001)** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- Augé RM, Duan X (1991)** Mycorrhizal and non-hydraulic root signals of soil drying. *Plant Physiology* 97: 821-824.
- Augé RM, Schekel KA, Wample RL (1986)** Greater leaf conductance of well-watered VA mycorrhizal rose plants is not related to phosphorus nutrition. *New Phytologist* 103: 107-116.
- Azcon-Aguilar C, Palenzuela J, Roldan A, Bautista S, Vallejo R et Barea JM (2003)** Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology* 22: 29-37.
- Azcon-Aguilar C, Diaz-Rodriguez RM, Barea JM (1986)** Effect of soil microorganisms on spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Transactions of the British Mycological Society* 86: 337-340.

“B”

- Bâ AM, Thoen D (1990)** First syntheses of ectomycorrhizas between *Afzelia africana* Sm. (Caesalpinioideae) and native fungi from West Africa. *New Phytologist* 103: 441-448.
- Bâ AM, Sougoufara B, Thoen D (1987)** The triple symbiosis of *Casuarina equisetifolia* in Senegal. In: Sylvia DM, Hung LL, Graham JH (Eds.), *Mycorrhizae in the next decade*, Gainesville, USA, University of Florida, p. 121.
- Bååth E, Hayman DS (1984)** No effect of VA mycorrhiza on red core disease of strawberry. *Transactions of the British Mycological Society* 82: 534-536.
- Bååth E, Hayman DS (1983)** Plant growth responses to vesicular–arbuscular mycorrhiza. XIV. Interactions with *Verticillium* wilt on tomato plants. *New Phytologist* 95: 419-426.
- Bago B, Vierheilig H, Piché Y, Azcón-Aguilar C (1996)** Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytologist* 133: 273-280.
- Baker DD, Mullin BC (1992)** Actinorhizal symbioses. In G Stacey, Burris RH and Evans HJ (eds), *Biological nitrogen fixation*, 259-292. Chapman and Hall, New York, NY.

- Baker DD, Schwintzer CR (1990)** Introduction. In: Schwintzer CR, Tjepkema JD (eds) The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Academic, New York, pp 3-13.
- Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner J (1986)** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 36: 86-93.
- Baldrian P (2003)** Interaction of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme and Microbial Technology 32:78-91.
- Bandou E, Lebailly F, Muller F, Dulormne M, Toribio A, Chabrol J, Courtecuisse R, Plenchette C, Prin Y, Duponnois R, Thiao M, Sylla S, Dreyfus B, Ba AM (2006)** The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. Mycorrhiza 16: 559-565.
- Barker SJ, Tagu D (2000)** The Roles of Auxins and Cytokinins in Mycorrhizal Symbioses. Journal of Plant Growth Regulation. 19: 144-154.
- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C (2004)** Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. Canadian Journal of Botany 82: 1186-1197.
- Béreau M, Gazel M, Garbaye J (1997)** Les symbioses mycorrhiziennes des arbres de la forêt tropicale humide de Guyane française. Canadian Journal of Botany 75: 711-716.
- Besserer A, Puech-Pagès V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G, Séjalon-Delmas N (2006)** Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. PLoS Biology 4: 1239-1247.
- Bever JD (2002)** Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. Proceedings of the Royal Society 269: 2595-2601.
- Bever JD, Westover KM, Antonovics J (1997)** Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feed-back approach. Journal of Ecology 85: 561-573.
- Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA (1996)** Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. Journal of Ecology 3: 205-214.
- Bidartondo MI (2005)** The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. New Phytologist 167: 335-352.
- Biermann BJ, Linderman RG (1983)** Effect of container plant growth medium and fertilizer phosphorus on establishment and host growth response to vesicular arbuscular mycorrhizae. Journal of the American Society of Horticultural Science 108: 962-971.
- Bisby FA, Roskov YR, Ruggiero MA, Orrell TM, Paglinawan LE, Brewer PW, Bailly N, van Hertum J (2007)** Species 2000 and ITIS catalogue of life: 2007 annual checklist.

- Digital resource at [www.catalogue of life.org/annual-checklist/2007/](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2007/). Species 2000, Reading, UK.
- Björkman E (1960)** *Monotropa hypopithys* L.-an epiparasite on tree roots. *Plant Physiology* 13: 308-327.
- Boivin C, Denarie J (1998)** "La symbiose rhizobiums légumineuses : gènes et signaux de nodulation en perspective." *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 13: 226-232.
- Blee KA, Anderson AJ (1996)** Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenk & Smith. *Plant Physiologist* 110: 675-688.
- Boland DJ, Brooker MIH, Chippendale GM, Hall N, Hyland BPM, Johnston RD, Kleinig DA, Turner JD (1994)** *Forest trees of Australia*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Bonfante P, Genre A (2010)** Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis *Nature* 4: 1-11.
- Bonfante P, Anca IA (2009)** Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology* 63: 363-383.
- Bonfante P (2001)** At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma-membrane and cytoskeleton. In: Esser, K., Hock, B. (Eds.), *The Mycota IX*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 45-61.
- Bonfante-Fasolo P, Gianinazzi-Pearson V, Martinengo L (1984)** Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the Ericaceae. IV. Comparison of infection by *Pezizella ericae* in host and non host-plants. *New Phytologist* 98: 329-333.
- Borowicz VA (2001)** Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations? *Ecology* 82: 3057-3068.
- Bourke RM (1985)** Food, coffee and Casuarina: an agroforestry system from the Papua New Guinea highlands. *Agroforestry Systems* 2: 273-279.
- Bowen GD (1994)** The ecology of ectomycorrhiza formation and functioning. *Plant and Soil* 159: 61-67.
- Bray EA (2004)** Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55: 2331-2341.
- Brown MF, King EJ (1991)** Morphology and histology of vesicular arbuscular mycorrhizae. In NC Schenk, ed, *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. APS Press, St. Paul, pp 15-21.
- Brulé C, Frey-Klett P, Pierrat JC, Courrier S, Gérard F, Lemoine MC, Rousselet JL, Sommer J, Garbaye J (2001)** Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus

- Laccaria bicolor* and effect of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biology and Biochemistry 33: 1683-1694.
- Brundrett MC (2002)** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytologist 154: 275-304.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Malajczuk N (1996)** Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32. Canberra, Australia. Australian Center for International Agricultural Research. 374 p.
- Brundrett MC, Abbott LK (1994)** Mycorrhizal fungal propagules in the Tawah forest. I. Seasonal study of inoculum levels. New Phytologist 127: 539-546.
- Brundrett M, Melville L, Peterson L (1994)** Practical Methods in Mycorrhizal Research. Mycologue Publications Ltd*, Waterloo (*Kendrick, 1992).
- Brundrett M (1991)** Mycorrhizas in natural ecosystems. Advances in Ecological Research 21: 171-313.
- Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL (1984)** A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Canadian Journal of Botany 62: 2128-2134.
- Budi SW, van Tuinen D, Martinotti G, Gianinazzi S (1999)** Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soil borne fungal pathogens. Applied and Environmental Microbiology 65: 5148-5150.
- Bücking H, Abubaker J, Govindarajulu M, Tala M, Pfeffer PE, Nagahashi G, Lammers P, Shachar-Hill Y (2008)** Root exudates stimulate the uptake and metabolism of organic carbon in germinating spores of *Glomus intraradices*. New Phytologist 180: 684-695.
- Bun-ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y (1991)** The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. Molecular and Cellular Biology 11: 3229-3238.

“C”

- Callaham D, DelTredici P, Torrey JG (1978)** Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in Comptonia. Science 199: 899-902.
- Callaway RM, Ridenour WM (2004)** Novel weapons: Invasive success and the evolution of increased competitive ability. Frontiers in Ecology and the Environment 2: 436-443.
- Caravaca F, Barea JM, Palenzuela J, Figuerola D, Alguacil MM, Roldán A (2003)** Establishment of shrub species in a degraded semi arid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. Applied Soil Ecology 22: 103-111.

- Casida LE Jr (1982)** *Ensifer adhaerens* gen. Nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. International Journal of Systematic Bacteriology 32: 339-345.
- Castle WS (2008)** Field guide to identify the common Casuarina (Australian pine) species in Florida. HS 1140, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Cérémonie H, Debellé F, Fernandez MP (1999)** Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and rhizobia Nod factor. Canadian Journal of Botany 77: 1293-1301.
- Chabaud M, Venard C, Defaux-Petrus A, Bécard G, Barker DG (2002)** Targeted inoculation of *Medicago truncatula* *in vitro* root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 156: 265-273.
- Charpentier M, Bredemeier R, Wanner G, Takeda N, Schleiff E, Parniske M (2008)** *Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. The Plant Cell 12: 3467-3479.
- Chen C, Gao M, Liu J, Zhu H (2007)** Fungal symbiosis in rice requires an ortholog of a legume common symbiosis gene encoding a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. Plant Physiology 145: 1619-1628.
- Chen WM, Leevens S, Lee TM, Coenye T, De Vos P, Mergeay M, Vandamme P (2001)** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1729-1735.
- Chen TL, Brundrett MC, Dell B (2000)** Effects of ectomycorrhizas and vesicular - arbuscular mycorrhizas, alone or in competition, on root colonisation and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. New Phytologist 146: 545-556.
- Chilvers GA, Lapeyrie FF, Horan DP (1987)** Ectomycorrhizal Vs endomycorrhizal fungi within the same roots system. New Phytologist 107: 441-448.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979)** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18: 5294-5299.
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH (1995)** Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. New Phytologist 130: 259-265.
- Clark RB, Zeto SK (2000)** Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. Journal of Plant Nutrition 23: 867-902.
- Colla G, Rouphael Y, Cardarelli M, Tullio M, Rivera CM, Rea E (2008)** Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. Biology and Fertility of Soils 44: 501-509.

- Cook CE, Whichard LP, Turner B, Wall ME (1966)** Germination of witchweed (*Striga Lutea* Lour): isolation and properties of a potent stimulant. *Science* 154: 1189-1190.
- Coombes RD, Haveland-Smith RB (1982)** A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Research* 98: 101-248.
- Cornet F, Diem HG (1982)** Etude comparative de l'efficacité des souches de *Rhizobium* d'*Acacia* isolées de sols du Sénégal et effet de la double symbiose *Rhizobium-Glomus mossae* sur la croissance de *Acacia holosericea* et *A. raddiana*. *Bois et forêts des Tropiques* 198: 3-15.
- Corradi N, Hijri M, Fumagalli L, Sanders IR (2004)** Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) harbour ancient fungal tubulin genes that resemble those of the chytrids (Chytridiomycota). *Fungal Genetics and Biology* 41: 1037-1045.
- Cox G, Tinker PB (1976)** Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: A quantitative ultrastructural study. *New Phytologist* 77: 371-378.
- Culhane AC, Perriere G, Considine EC, Cotter TG, Higgins DG (2002)** Between-group analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 1600-1608.
- Cullimore JV, Ranjeva R, Bono JJ (2001)** Perception of lipo-chitoooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science* 6: 24-30.

“D”

- Dabire AP, Hien V, Kisa M, Bilgo A, Sangare KS, Plenchette C, Galiana A, Prin Y, Duponnois R (2007)** Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. *Mycorrhiza* 17: 537-545.
- Davies Jr FT, Svenson SE, Cole JC, Phavaphutanon L, Durray SA, Olalde Portugal V, Meier CE (1996)** Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiology* 16: 985-993.
- Davies Jr FT, Potter JR, Linderman RG (1992)** Mycorrhiza and repeated drought exposure affect resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *Journal Plant Physiology* 139: 289-294.
- Dawson JO (1986)** Actinorhizal plants: Their use in forestry and agriculture. *Outlook on Agriculture* 15: 202-208.
- de Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM (1989)** Occurrence of nodulation in the *Leguminosae*. *New Phytologist* 111: 607-619.

- de Lajudie P, Laurent -Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collin MD, Krester K, Dreyfus B, Gillis M (1998)** *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Bacteriology* 48: 1277-1290.
- de Oliveira VL, Garbaye J (1989)** Les microorganismes auxiliaires de l'établissement des symbioses ectomycorhiziennes. *European Journal of Forest Pathology* 19: 54-64.
- Dean DR, Bolin J, Zheng L (1993)** Nitrogenase metalloclusters: structure, organization and synthesis. *Journal of Bacteriology* 175: 6735-6744.
- Debellé F, Rossenberg C, Bono JC (2007)** Calcium and Nod Signaling. *Medecine/Science. EDK*.
- Degens BP, Schipper LA, Sparling GP, Duncan LC (2001)** Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1143-1153.
- Degens BP, Harris JA (1997)** Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 1309-1320.
- Dehne HW (1982)** Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. The american phatogens. The american Phytopatholhical Society 78: 1115-1119.
- Dell B, Malajczuk N, Bougher NL, Thomson G (1994)** Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma* ectomycorrhizas formed *in-vivo* with *Allocasuarina*, *Casuarina* and *Eucalyptus*. *Mycorrhiza* 5: 129-138.
- Dénarié J, Debelle F, Prome JC (1996)** Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* 65: 503-535.
- Deveau A, Palin B, Delaruelle C, Peter M, Kohler A, Pierrat JC, Sarniguet A, Garbaye J, Martin F, Frey-Klett P (2007)** The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist* 175: 743-755.
- Dexheimer J, Gerard J, Leduc JP, Chevalier G (1985)** Etude ultrastructurale comparée des associations symbiotiques mycorhiziennes *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia clavaryi* et *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia leptoderma*. *Canadian Journal of Botany* 63: 582-591.
- Dickson S, Smith FA, Smith SE (2007)** Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza* 17: 375-393.
- Dickson S (2004)** The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 163: 187-200.

- Diem HG (1996)** Mycorrhizae of actinorhizal plants. *Acta Botanica Gallica* 143: 581-592.
- Diem HG, Dommergues YR (1990)** Current and potential uses and management of Casuarinaceae in the tropics and subtropics. In: Schwintzer CR, Tjepkema JD (eds) *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Academic, New York, pp 317-342.
- Diouf D, Duponnois R, Ba AT, Neyra M, Lesueur D (2005)** Symbiosis of *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium* with mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium* spp. improves salt tolerance in greenhouse conditions. *Functional plant biology* 32: 1143-1152.
- Doyle JJ (1998)** Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plants Science* 3: 473-478.
- Dotzler N, Krings M, Taylor TN, Agerer R (2006)** Germination shields in *Scutellospora* (Glomeromycota: Diversisporales, Gigasporaceae) from the 400 million-year-old Rhynie chert. *Mycological Progress* 5: 178-184.
- Dreyfus B, Garcia JL, Gillis M (1988)** Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem - nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38: 89-98.
- Duchesne LC, Ellis BE, Peterson RL (1989)** Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Puxillus incolutus*: contribution of oxalic acid. *Canadian Journal of Botany* 67: 2726-2730.
- Ducousso M, Thoen D (1991)** Les types mycorrhiziens des *Acacieae*. in: *Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi-arides*. Groupes d'Etude de l'Arbre. Paris, France. pp: 175-182.
- Duddridge JA, Malibari A, Read DJ (1980)** Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287: 834-836.
- Duhoux E, Nicole M (2004)** Associations et interaction chez les plantes. Ed. DUNOD, Paris 165 p.
- Duponnois R, Galiana A, Prin Y (2008)** The mycorrhizosphere effect: a multitrophic interaction complex improves mycorrhizal symbiosis and plant growth. In: *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (eds); Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp: 227-238.
- Duponnois R (2006)** Mycorrhiza Helper Bacteria: Their ecological impact in mycorrhizal symbiosis. In: *Handbook of Microbial Biofertilizers*. Rai MK (ed); Food Products Press, Binghamton NY. pp: 117-135.
- Duponnois R, Kisa M (2006)** The possible role of trehalose in the mycorrhiza helper effect. *Canadian Journal of Botany* 84: 1005-1008.
- Duponnois R, Colombet A, Hien V, Thioulouse J (2005a)** The Mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial

- activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*. Soil Biology and Biochemistry 37: 1460-1468.
- Duponnois R, Founoune H, Masse D, Pontanier R (2005b)** Inoculation of *Acacia holosericea* with ectomycorrhizal fungi in a semi-arid site in Senegal: growth response and influences on the mycorrhizal soil infectivity after 2 years plantation. Forest Ecology and Management 207: 351-362.
- Duponnois R, Diedhiou S, Chotte JL, Sy MO (2003)** Relative importance of the endomycorrhizal and/or ectomycorrhizal associations in *Allocasuarina* and *Casuarina* genera. Canadian Journal of Microbiology 50: 691-696.
- Duponnois R, Plenchette C, Bâ AM (2001)** Growth stimulation of seventeen fallow leguminous plants inoculated with *Glomus aggregatum* in Senegal. European Journal of Soil Biology 37:181-186.
- Duponnois R, Founoune H, Bâ AM, Plenchette C, El jafaari S, Nyera M, Ducousso M (2000)** Ectomycorrhization of *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don by *Pisolithus spp.* in Senegal : effet on plant growth and on the roots- knot nematode *Meloidogyne javanica*. Annals of Forest Science 57: 345-350.
- Duponnois R, Garbaye J, Bouchard D, Churin JL (1993)** The fungus-specificity of mycorrhization helper bacteria (MHBs) used as an alternative to soil fumigation for ectomycorrhizal inoculation of bare-root *Douglas-fir* planting stocks with *Laccaria laccata*. Plant and Soil 157: 257-262.
- Duponnois R (1992)** Les bactéries auxiliaires de la mycorrhization du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) par *Laccaria laccata* souche S238. Thèse de l'Université Nancy 1. 245p.
- Duponnois R, Garbaye J (1991)** Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir *Laccaria laccata* symbiosis: effects *in vitro* and in glasshouse conditions. Annals of Forest Science 48: 239-251.
- Duponnois R, Garbaye J (1990)** Some mechanisms involved in growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by bacteria. Canadian Journal of Botany 68: 2148-2152.
- Dutra PV, Abad M, Almela V, Agusti M (1996)** Auxin interaction with the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith improves vegetative growth of two citrus rootstocks. Scientia Horticulturae. 66: 77-83.

"E"

- Eardly BD, Wang F, Whittam TS, Selander RK (1995)** Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Applied and Environmental Microbiology 61: 507-512.
- Ek M, Ljungquist PO, Stenström E (1983)** Indole-3-Acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. New Phytologist 94: 401-

407.

El-Lakany MH (1991) *Casuarina glauca* - A Hardy Tree with Many Attributes. NFT Highlights. NFTA. 91-05.

Elumalai S, Raaman N (2009) *In vitro* synthesis of *Frankia* and mycorrhiza with *Casuarina equisetifolia* and ultrastructure of root system. Indian Journal of Experimental Biology 47: 289-297.

Estaun V, Save R, Biel C (1997) AM inoculation as a biological tool to improve plant revegetation of a disturbed soil with *Rosmarinus officinalis* under semi-arid conditions. Applied Soil Ecology 6: 223-229.

Evelin H, Kapoor R, Giri B (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. Annals of Botany 104: 1263-1280.

“F”

Fall A, Fall S, Cissé I, Badiane AN, Diao MB, Fall CA (2001) Cités horticoles en sursis? L'agriculture urbaine dans les grandes Niayes au Sénégal. 120p.

Farmer MJ, Li X, Feng G, Zhao B, Chatagnier O, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D (2007) Molecular monitoring of field-inoculated AMF to evaluate persistence in sweet potato crops in China. Applied Soil Ecology 35: 599-609.

Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditengou FA, Legue V (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and Arabidopsis through auxin transport and signaling. Plant Physiology 151: 1991-2005.

Fontaine MS, Young PH, Torrey JG (1986) Effects of long-term preservation of *Frankia* strains on infectivity, effectivity and *in vitro* nitrogenase activity. Applied and Environmental Microbiology 51: 694-698.

Forrester DI, Bauhus J, Cowie AL, Vanclay JK (2006) Mixed-species plantations of *Eucalyptus* with nitrogen-fixing trees: a review. Forest Ecology and Management 233: 211-230.

Fortin JA, Plenchette C, Piché Y (2008) Les mycorhizes, la nouvelle révolution verte. (Eds. Multimondes et Quae), 131p.

Founoune H, Duponnois R, Meyer JM, Thioulouse J, Masse D, Chotte JL, Neyra M (2002) Interactions between ectomycorrhizal symbiosis and fluorescent *pseudomonads* on *Acacia holosericea*: isolation of Mycorrhiza Helper Bacteria (MHB) from a Soudano-Sahelian soil. FEMS Microbiology Ecology 41: 37-46.

Founoune H, Duponnois R, Bâ AM, El Bouami F (2001) Influence of the dual arbuscular endomycorrhizal / ectomycorrhizal symbiosis on the growth of *Acacia holosericea* (A.

- Cunn. ex G. Don) in glasshouse conditions. *Annals of Forest Sciences* 59: 93-98.
- Franche C, Laplaze L, Duhoux E, Bogusz D (1998)** Actinorhizal symbioses: recent advances in plant molecular and genetic transformation studies. *Critical Reviews in Plants Sciences* 17: 1-28.
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M (2007)** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22-36.
- Frey-Klett P, Chavatte M, Clausse ML, Courrier S, Le Roux C, Raaijmakers J, Martinotti MG, Pierrat JC, Garbaye J (2005)** Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165: 317-328.
- Frey-Klett P (1996)** Ecologie d'un *Pseudomonas* fluorescent auxiliaire de la mycorhization du Douglas. Thèse de Doctorat, Université de Paris XI-Orsay, Paris, France 221p.
- Frey B, Schuepp H (1993)** Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytologist* 124: 221-230.
- Fu D, Uauy C, Distelfeld A, Blechl A, Epstein L, Chen X, Sela H, Fahima T, Dubcovsky J (2009)** A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323: 1357-1360.

“G”

- Gage DJ (2004)** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 280-300.
- Galiana A, Balle P, N’Guessan Kanga A, Domenach AM (2002)** Nitrogen fixation estimated by the ¹⁵N natural abundance method in *Acacia mangium* Willd. Inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and grown in silvicultural conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 251-262.
- Gallaud I (1905)** Etudes sur les mycorrhizes endotrophs. *Revue Générale de botanique* 17:4-48, 66-83, 123-135, 223-239, 313-325, 425-433, 479-500.
- Garbaye J (1994)** Helper Bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128: 197-210.
- Garbaye J, Duponnois R (1992)** Application des BAM (Bactéries Auxilliaires de la Mycorhization) à l’inoculation du Douglas par *Laccaria laccata* S238 en pépinière forestière. *Revue Forestière Française* 44: 491-500.
- Garbaye J, Bowen GD (1989)** Stimulation of mycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytologist* 112: 383-388.

- Garbaye J, Bowen GD (1987)** Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. Canadian Journal of Forest Research 17: 941-943.
- Garcia C, Roldan A, Hernandez T (1997)** Changes in microbial activity after abandonment of cultivation in a semiarid Mediterranean environment. Journal of Environmental Quality 26: 285-291.
- Gardner IA (1986)** Mycorrhizae of actinorhizal plants. MIRCEN. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 2: 147-160.
- Gay G (1990)** Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in de-rooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. Canadian Journal of Botany 68:1265-1270.
- Gemma JN, Koske RE (1988)** Seasonal variation in spore abundance and dormancy of *Gigaspora gigantea* and in mycorrhizal inoculum potential of a dune soil. Mycologia 80: 211-216.
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P (2008)** Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. The Plant Cell 20: 1407-1420.
- Genre A (2005)** Signaling Events in Arbuscular Mycorrhizas: Host plant cell response. Thèse de Doctorat Université de Torino, Italie 106 p.
- Genre A, Chabaud M, Timmers T, Bonfante P, Barker DG (2005)** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. The Plant Cell 17: 3489-3499.
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963)** Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of British Mycological Society 46: 235-244.
- Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Peret B, Laplaze L, Franche C, Parniske M, Bogusz D (2008)** *SymRK* defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with AM fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 4928-4932.
- Ghosh M, Thangamani D, Thapliyal M, Yasodha R, Gurumurthi (2004)** Purification of antifungal protein against blister bark pathogen of *Casuarina equisetifolia* J. R. Forster et G. Forster. Acta Botanica Croatica 63: 75-81.
- Giovannetti M, Mosse B (1980)** An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. New Phytologist 84: 489-500.
- Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Dexheimer J (1979)** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localisation of acid

and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) New Phytologist 82: 127-132.

Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre J C, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck W L, Chang W-S, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Verméglio A, Médigue C, Sadowsky M (2007) Legumes Symbioses: Absence of *Nod* Genes in Photosynthetic Bradyrhizobia. Science 316: 1307-1312.

Giri B, Kapoor R, Mukerji KG (2003) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. Biology and Fertility of Soils 38: 170-175.

Glassop D, Smith S, Smith F (2005) Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. Planta 222: 688-698.

Göhre V, Paszkowski U (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. Planta 223: 1115-1122.

Gollotte A, van Tuinen D, Atkinson D (2004) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. Mycorrhiza 14:111-117.

Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. Agriculture, Ecosystems and Environment 113: 17-35.

Grace C, Stribley DP (1991) A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycological Research 95: 1160-1162.

Graham JH, Menge JA (1982) Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on take-all disease of wheat. Phytopathology 72: 95-98.

Graham JH, Leonard RT, Menge JA (1981) Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. Plant Physiology 68: 548-552.

Grime JP, Mackey JML, Hillier SH, Read DJ (1987) Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. Nature 328: 420-422.

Grimsrud PA, den Os D, Wenger CD, Swaney DL, Schwartz D, Sussman MR, Ané JM, Coon JJ (2010) Large-Scale Phosphoprotein Analysis in *Medicago truncatula* Roots Provides Insight into *in Vivo* Kinase Activity in Legumes Plant Physiology 152: 19-28.

- Groth M, Takeda N, Perry J, Uchida H, Dräxl S, Brachmann A, Sato S, Tabata S, Kawaguchi M, Wang TL, Parniske M (2010)** NENA, a *Lotus japonicus* Homolog of Sec13, Is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and *Rhizobia* but dispensable for cortical endosymbiotic development. *The Plant Cell* 22: 2509-2526.
- Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, Dynowski M, Ludewig U, Bonfante PA (2009)** Mycorrhizal-Specific Ammonium Transporter from *Lotus japonicus* Acquires Nitrogen Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology* 150: 73-83.
- Guillemin JP, Orozco MO, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1995)** Influence of phosphate fertilization on fungal alkaline phosphatase and succinate dehydrogenase activities in arbuscular mycorrhiza on soybean and pineapple. *Agriculture Ecosystems and Environment* 53: 63-69.
- Güimil S, Chang H-S, Zhu T, Sesma A, Osbourn, Roux C, Ioannidis V, Oakeley EJ, Docquier M, Descombes P, Briggs SP, Paszkowski U (2005)** Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8066-8070.

“H”

- Habte M, Manjunath A (1991)** Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. *Mycorrhiza* 1: 3-12.
- Hamel C, Fyles H, Smith DL (1990)** Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three different vital stains. *New Phytologist* 115: 297-302.
- Harley JL, Smith SE (1983)** Mycorrhizal symbiosis. Academic Press Inc., London and New-York. 483p.
- Harisaranraj R, Babu SS, Suresh K (2010)** Antimicrobial Properties of Selected Indian Medicinal Plants Against Acne-Inducing Bacteria. *Ethnobotanical Leaflets* 14: 84-94.
- Harrison MJ (2005)** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59: 19-42.
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J (2002)** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell* 14: 2413-2429.
- Harrison MJ (1999)** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 361-389.
- Harrison MJ, Van Buuren ML (1995)** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626-629.

- Hause B, Mrosk C, Isayenkov S, Strack D (2007)** Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry* 68: 101-110.
- Hause B, Fester T (2005)** Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* 221: 184-196.
- Hawkins HJ, Johansen A, George E (2000)** Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by fungi. *Plant and Soil* 226: 275-285.
- He XH, Critchley C (2008)** *Frankia* Nodulation, Mycorrhization and Interactions between *Frankia* and Mycorrhizal Fungi in *Casuarina* Plants. In: Mycorrhiza 3; Ajit Varma (eds); Springer Berlin chap VI; (Biomedical and life Sciences) 767-781.
- He X, Nara K (2007)** Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective and sustainable pathway to curb human malnutrition? *Trends in Plant Science* 12: 331-333.
- Heggo A, Angle JS, Chaney RL (1990)** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 865-869.
- Heinemeyer O, Insam H, Kaiser EA, Walenzik G (1989)** Soil microbial biomass and respiration measurements: an automated technique based on infrared gas analysis. *Plant and Soil* 116: 77-81.
- Helgason T, Watson IJ, Young JPW (2003)** Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *FEMS Microbiology Letters* 229: 127-132.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998)** Ploughing Up the Wood-Wide Web? *Nature* 394: 431-431.
- Hijikata N, Murase M, Tani C, Ohtomo R, Osaki M, Ezawa T (2010)** Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 186: 285-289.
- Hirrel MC (1981)** The effect of sodium and chloride salts on the germination of *Gigaspora margarita*. *Mycologia* 73: 610-617.
- Hoagland DR, Arnon DI (1938)** The water culture method for growing plant without soil. Californie Agricultural Experiment Station Circular 347, University of California, College of Agriculture, Berkeley, CA, USA.
- Hobbie SE (1992)** Effects of plant species on nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 336-339.
- Hochoer V, Auguy F, Argout X, Laplaze L, Franche C, Bogusz D (2006)** Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root. *New Phytologist* 169: 681-688.

Hooper DU, Chapin FS, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, Lawton JH, Lodge D M, Loreau M, Naeem S, Setälä H, Symstad AJ, Vandermeer J, Wardle DA (2005) Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75: 3-35.

Huang S, Spielmeyer W, Lagudah ES, James RA, Platten JD, Dennis ES, Munns R (2006) A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiology* 142: 1718-1727.

“I”

IARC (1999) International Agency for Research on Cancer monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 29.

IARC (1987) International Agency for research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Suppl 7. Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Vol. 1 to 42.

Imaizumi-Anraku H, Takeda N, Parniske M, Hayashi M, Kawasaki S (2005) *Castor* and *Pollux*, the Twin Genes that Are Responsible for Endosymbioses in *Lotus japonicus*. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* 41: 195-197.

Isayenkov S, Fester T, Hause B (2004) Rapid determination of fungal colonization and arbuscule formation in roots of *Medicago truncatula* using real-time (RT) PCR. *Journal of Plant Physiology* 161: 1379-1383.

“J”

Jabaji-Hare SH, Perumalla CJ, Kendrick WB (1984) Autofluorescence of vesicles, arbuscules and intercellular hyphae of a vesicular-arbuscular fungus in leek (*Allium porrum*) roots. *Canadian Journal of Botany* 62: 2665-2669.

Jacobsen-Lyon K, Ostergaard Jensen E, Jorgensen JE, Marcker KA, Peacock WJ, Dennis ES (1995) Symbiotic and nonsymbiotic hemoglobin genes of *Casuarina glauca*. *The Plant Cell* 7: 213-223.

Jahromi F, Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2008) Influence of salinity on the *in vitro* development of *Glomus intraradices* and on the *in vivo* physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microbial Ecology* 55: 45-53.

Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E (2002) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234.

Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet - Marel JC, Gillis M (1997) Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium hualini*, *Rhizobium ciceri*,

- Rhizobium méditerranéum*, and *Rhizobium trianshanense* to *Mesorhizobium gen. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology. 47: 895-898.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ (2007a)** A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 1720-1725.
- Javot H, Pumplin N, Harrison M (2007b)** Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. Plant, Cell and Environment 30: 310-322.
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM (2003)** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Biology and Fertility of Soils 37: 1-16.
- Jentschel K, Thiel D, Rehn F, Ludwig-Müller J (2006)** Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in *Tropaeolum majus* during early stages of colonization. Physiologia Plantarum. 129: 320-333.
- Jerlin R, Srimathi P (1997)** Grading and storage potential of *Casuarina equisetifolia* seeds. Annals of Forest Science 5: 103-106.
- Johansen A, Finlay RD, Olsson PA (1996)** Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. New Phytologist 133: 705-712.
- Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004)** Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. FEMS Microbiology Ecology 48: 1-13.
- John MK (1970)** Colorimetric determination of phosphorus in soil and plant material with ascorbic acid. Soil Science. 68: 171-177.
- Johnson NC, Graham JH, Smith, FA (1997)** Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum New Phytologist 135: 575-585.
- Johnson LAS (1988)** Notes on Casuarinaceae III: the new genus *Ceuthostoma*. Telopea 3: 133-137.
- Johnson LAS (1982)** Notes on Casuarinaceae II. Journal of Adelaide Botanical Garden 6: 73-87.
- Johnson LAS (1980)** Notes on Casuarinaceae I. Telopea 2: 83-84.
- Jordan DC (1984)** « *Rhizobiaceae* conn 1938, 321 AL » in Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 1 st éd. (N. R) Krieg, (J.G) Holt éd. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 234-256.
- Jordan DC (1982)** Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium gen. nov.*, a genus of low-growing, root nodule bacteria from leguminous plants.

International Journal of Systematic Bacteriology 32: 136-139.

“K”

- Kanamori N, Heegaard Madsen L, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, Jensen TH, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J (2006)** A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺-spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 359-364.
- Kang JG, Van Iersel MW (2004)** Nutrient solution concentration affects shoot:root ratio, leaf area ratio, and growth of subirrigated salvia (*Salvia splendens*). *Hort Science* 39: 49-54.
- Karabaghli-Degron C, Sotta B, Bonnet M, Gay G, Le Tacon F (1998)** The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist* 140:723-733.
- Karandashov V, Nagy R, Wegmüller S, Amrhein N, Bucher M (2004)** Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 6285-6290.
- Ker K, Charest C (2010)** Nickel remediation by AM-colonized sunflower. *Mycorrhiza* 20: 399-406.
- Khade SW, Rodrigues BF (2009)** Applications of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10: 337-354.
- Khan AG (1971)** Occurrence of *Endogone* spores in West Pakistan soils. *Transactions of the British Mycological Society*. 56: 217-224.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954)** Two simple media for the demonstration of pyocyanine and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Kisa M, Sanon A, Thioulouse J, Assigbetse K, Sylla S, Spichiger R, Dieng L, Berthelin J, Prin Y, Galiana A, Lepage M, Duponnois R (2007)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis counterbalance the negative influence of the exotic tree species *Eucalyptus camaldulensis* on the structure and functioning of soil microbial communities in a sahelian soil. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 32-44.
- Kistner C, Parniske M (2002)** Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *TRENDS in Plant Science* 7: 511-518.
- Kjoller R, Rosendahl S (2001)** Molecular diversity of glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field grown

peas. Mycological Research 105: 1027-1032.

Klironomos JN (2003) Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. Ecology 84: 2292-2301.

Kondas S (1983) *Casuarina equisetifolia* a multipurpose tree cash crop in India. In: Midgley SJ, Turnbull YW, Johnson RD (eds) *Casuarina Ecology, Management and Utilization*. CSIRO, Australia, pp 66-67.

Kosuta S, Hazledine S, Sun J, Miwa H, Morris RJ, Downie JA, Oldroyd GED (2008) Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 9823-9828.

Kosuta S, Chabaud M, Loughon G, Gough C, Dénarié J, Barker DG, Becard G (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. Plant Physiology 131: 952-962.

Kough JL, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1987) Depressed metabolic activity of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide applications. New Phytologist 106: 707-715.

“L”

Lal R (1996) Deforestation and land-use effects on soil degradation and rehabilitation in western Nigeria. III. Runoff, soil erosion and nutrient loss. Land Degradation and Development 7: 99-119.

Lambers H, Raven JA, Shaver GR, Smith SE (2008) Plant nutrient acquisition strategies change with soil age. Trends in Ecology and Evolution 23: 95-103.

Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pearse SJ, Veneklaas EJ (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. Annals of Botany 98: 693-713.

Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, van Breemen N (2001) Linking plant to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. Trends in Ecology and Evolution 16: 248-255.

Laplaze L, Duhoux E, Franche C, Frutz T, Svistoonoff S, Bisseling T, Bogusz D, Pawlowski K (2000) *Casuarina glauca* prenodule cells display the same differentiation as the corresponding nodule cells. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 107-112.

Lechevalier MP (1994) Taxonomy of the genus *Frankia*, (Actinomycetales). International Journal of Systematic Bacteriology 44: 1-8.

Leggewie G, Willmitzer L, Riesmeier JW (1997) Two cDNAs from potato are able to

- complement a phosphate uptake deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* 9: 381-392.
- Lewis G, Schrire B, MacKinder B, M Lock (2005)** Legumes of the world. Royal Botanical Gardens, Kew, UK.
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K (1997)** Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7: 139-153.
- Leyval C, Weissenhorn I, Berthelin J, Dexheimer J (1994)** Influence des métaux lourds sur la germination des spores de champignons endomycorhiziens à arbuscules dans les sols. *Acta Botanica Gallica* 141: 523-528.
- Lin DX, Wang ET, Tang H, Han TX, He YR, Guan SH, Chen WX (2008)** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 58: 1409-1413.
- Linderman RG (1992)** Vesicular–arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. Pages 45–70 in G. J. Bethlenfalvay and R. G. Linderman, editors. *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
- Linderman RG (1988)** Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366-371.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ (2007)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50: 529-544.
- Liu XF, Culotta VC (1999)** Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Smf1p, a member of the Nramp family of metal transporters. *Journal of Molecular Biology* 289: 885-891.
- Liu C, Muchhal US, Uthappa M, Kononowicz AK, Raghothama KG (1998a)** Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiology* 116: 91-99.
- Liu H, Trieu AT, Blaylock LA, Harrison MJ (1998b)** Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: Regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 14-22.
- Lopez-Bucio J, de la Vega OM, Guevara-Garcia A, Herrera-Estrella L (2000)** Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotechnology* 18: 450-453.
- Lopez-Pedrosa A, Gonzalez-Guerrero M, Valderas A, Azcon-Aguilar C, Ferrol N (2006)** *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in

the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. Fungal Genetics and Biology 43: 102-110.

Lovelock CE, Wright SF, Clark DA, Ruess RW (2004). Soil stocks of Glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. Journal of Ecology 92: 278-287.

“M”

MacDonald RM, Lewis M (1978) The occurrences of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. New Phytologist 80: 135-141.

Maeda D, Ashida K, Iguchi K, Chechetka SA, Hinjikota A, Okusako Y, Deguchi Y, Izui K Hata S, (2006) Knockdown of an arbuscular mycorrhiza inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis. Plant and Cell Physiology 183: 807-817.

Maiden JH (1889) The useful native plants of Australia, Turner and Henderson, Sydney, Australia 696 p.

Maiden JH (1913) The flora of New South Wales, vol 5, Government Printer, Sydney, Australia.

Maillet F, Poinot V, Andre O, Puech-Page V, Haouy1 A, Gueunier M, Cromer L, Giraudet D, Formey D, Niebel1 A, Martinez EA, Driguez H, Bécard G, Dénarié J (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. Nature 469: 58-64.

Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 1140-1148.

Manga AGB (2005) Biodiversité des champignons mycorrhiziens arbusculaires d'*Acacia seyal* Del. et évaluation de leur potentialités symbiotiques en milieu salé. Thèse de L'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 118p.

Mantelin S, Fisher-Le Saux M, Zakhia F, Bena G, Bonneau S, Jeder H, de Lajudie P, Cleyet-Marcel JC (2006) Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyensis* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassiccearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 827-839.

Marmeisse R, Guidot A, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combiér JP, Melayah D, Fraissinet-Tachet L, Debaud JC (2004) *Hebeloma cylindrosporum* - A model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. New Phytologist 163: 481-

498.

- Marschner P, Timonen S (2005)** Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology* 28: 23-36.
- Marschner P, Yang CH, Lieberei R, Crowley DE (2001)** Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1437-1445.
- Marschner B, Crowley DE, Higashi RM (1997)** Root exudation and physiological status of root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant and soil* 189: 11-20.
- Marschner P, Crowley DE (1996)** Physiological activity of a bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* (strain 2-79) in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Soil Biology and Biochemistry* 28: 869-876.
- Marschner H (1995)** Mineral Nutrition of Higher Plants, ed. Academic Press
- Marschner H, Dell B (1994)** Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159: 89-102.
- Marx DH (1972)** Ectomycorrhizae as Biological Deterrents to Pathogenic Root Infections. *Annual Review of Phytopathology* 10: 429-454.
- Marx DH (1969)** The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections: I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Matson PA, Parton WJ, Power AG (1997)** Agriculture intensification and ecosystems properties. *Science* 277: 504-508.
- Mayo K, Davis R, Motta J (1986)** Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia* 78: 426-431.
- McEwan NR, Wheeler CT (1997)** An improved method for screening *Frankia* viability in strain *CcI3*. *Experimental Biology* 13: 1-4.
- McGee PA, Smith SE (1990)** Activity of succinate dehydrogenase in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after enzymic digestion from roots of *Allium porrum*. *Mycological Research* 94: 305-308.
- McLachlan KD (1980)** Acid phosphatase activity of intact roots and phosphorus nutrition in plants. I. Assay conditions and phosphatase activity. *Australian Journal of Agricultural Research* 31:429-440.
- Meyer JR, Linderman RG (1986)** Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 191-196.

- Midgley SJ, Turnbull JW, Johnston RD (1983)** *Casuarina*: ecology, management and utilisation. CSIRO Forest Research, Melbourne, Australia.
- Miller RM, Reinhardt DR, Jastrow JD (1995)** External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103: 17-23.
- Miller RM, Jastrow JD (1990)** Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interaction with soil aggregation. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 579-584.
- Modjo HS, Hendrix JW (1986)** The mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* as a cause of tobacco stunt disease. *Phytopathology* 76: 688-691.
- Mohanan C, Sharma JK (1993)** Diseases of *Casuarina equisetifolia* in India. *Commonwealth Forestry Reviews* 72: 48-52.
- Moiroud A (1996)** Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes. *Acta Botanica Gallica* 143: 651-661.
- Moldenhauer J, Moerschbacher BM, Van der Westhuizen AJ (2006)** Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) development in resistant and susceptible wheat cultivars. *Plant Pathology* 55: 469-474.
- Morandi D (1996)** Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions and their potential role in biological control. *Plant and Soil* 185: 241-251.
- Morton JB, Bentivenga SP, Bever JD (1995)** Discovery, measurement, and interpretation of diversity in symbiotic endomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 73S: 25-32.
- Morton JB (1990)** Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro-and microevolutionary processes. *Mycoraxon* 37: 493-515.
- Mosse B (1962)** The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal of General Microbiology* 27: 509-520.
- Mosse B (1959)** The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Transactions of the British Mycological Society* 42: 273-286.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C (2001)** Nodulation of legumes by members of the subclass of protoeubacteria. *Nature* 411: 948-950.
- Moussain D, Pintro PM, Quiquampoix H (1997)** Le rôle des mycorhizes dans la nutrition phosphatée des arbres forestiers. *Revue Forestière Française* XLIX. 67-81.
- Moynahan OS, Zabinski CA, Gannon JE (2002)** Microbial community structure and carbon-utilization diversity in a mine tailings revegetation study. *Restoration Ecology*. 10: 77-87.

- Mozafar A, Ruh R, Klingel P, Gamper H, Egli S, Frossard E (2002)** Effect of heavy metal contaminated shooting range soils on mycorrhizal colonization of roots and metal by leek. *Environmental Monitoring and Assessment*. 79: 177-191.
- Muchovej JJ, Muchovej RMC, Goncalves EJ (1991)** Effect of kind and method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the VA mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. *Plant and Soil* 132: 47-51.
- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW (2002)** Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. *The Plant Journal* 31: 341-353.
- Muok BO, Ishii T (2006)** Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth and nutrient uptake of *Sclerocarya birrea* under water stress, salt stress and flooding. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 75: 26-32.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993)** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environment Microbiology* 59: 695-700.

“N”

- Nagy R, Vasconcelos MJ, Zhao S, McElver J, Bruce W, Amrhein N, Raghothama KG, Bucher M (2006)** Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.). *Plant Biology* 8: 186-197.
- Nagy R, Karandashov V, Chague V, Kalinkevich K, Tamasloukht M, Xu G, Jakobsen I, Levy AA, Amrhein N, Bucher M (2005)** The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant Journal* 42: 236-250.
- National Research Council (1984)** Casuarinas: nitrogen-fixing trees for adverse sites. Office of International Affairs, Washington DC, the United States of America.
- Navazio L, Baldan B, Moscatiello R, Zuppini A, Woo SL, Mariani P, Lorito M (2007)** Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biology* 7: 41-49.
- Neuhauser C, Fargione JE (2004)** A mutualism-parasitism continuum model and its application to plant mycorrhizae. *Ecological Modelling* 177: 337-352.
- Newbery DM, Alexander IJ, Thomas DW, Gartlan JS (1988)** Ectomycorrhizal rain-forest legumes and soil phosphorus in Korup National Park, Cameroon. *New Phytologist* 109: 433-450.

- Newsham KK, Fitter AH, Watterson AR (1995)** Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *Journal of Ecology* 83: 991-1000.
- Nicodemus A, Varghese M, Nagarajan B (2001)** Genetic improvement of *Casuarina equisetifolia* through selection and breeding. In: Gurumurthi K, Nicodemus A, Siddappa (Eds.) *Casuarina in India: Improvement and Utilization*. Institute of Forest Genetics and Tree Breeding, Coimbatore, India. pp 3-13.
- Nicolson TH (1959)** Mycorrhizae in the gramineae. I. Vesicular-arbuscular endophytes, with special reference to the external phase. *Transactions of the British Mycological Society* 42: 421-438.
- Niemi K, Salonen M, Ernstsén A, Heinonen-Tanski H, Häggman H (2000)** Application of ectomycorrhizal fungi in rooting of Scots pine fascicular shoots. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1221-1230.
- Normand P, Lapierre P, Tisa LS, Gogarten JP, Alloisio N, Bagnarol E, Bassi CA, Berry AM, Bickhart DM, Choise N, Couloux A, Cournoyer B, Cruveiller S, Daubin V, Demange N, Francino MP, Goltsman E, Huang Y, Kopp OR, Labarre L, Lapidus A, Lavire C, Marechal J, Martinez M, Mastrorunzio JE, Mullin BC, Niemann J, Pujic P, Rawnsley T, Rouy Z, Schenowitz C, Sellstedt A, Tavares F, Tomkins JP, Vallenet D, Valverde C, Wall LG, Wang Y, Medigue C, Benson DR (2007)** Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Research* 17: 7-15.
- Normand L, Bärtschi H, Debaud JC, Gay G (1996a)** Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus pinaster* and *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Plant Physiology* 98:759-766.
- Normand P, Orso S, Cournoyer B, Jeannin P, Chapelon C, Dawson J, Evtushenko L, Misra AK (1996b)** Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of family Frankiaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:1-9.
- Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M, Simonet P (1996c)** ITS analysis of prokaryotes, p. 1-12. In Akkermans DL, van Elsas JD and de Bruijn EI (ed.), *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Normand P, Cournoyer B, Nazaret S, Simonet P (1992)** Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* Vol. 111 pp.119-124.
- Nyc JF (1967)** A repressible acid phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27: 183-188.

“O”

Obertello M, Sy MO, Laplaze L, Santi C, Svistoonoff S, Auguy F, Bogusz D, Franche C

- (2003) Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and genomics. *African Journal Biotechnology* 2: 528-538.
- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, Gough C (2005)** Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the *DMI1/DMI2* signalling pathway. *The Plant Journal* 44: 195-207.
- Olayinka A, Babalola GO (2001)** Effects of Copper Sulphate Application on Microbial Numbers and Respiration, Nitrifier and Urease Activities, and Nitrogen and Phosphorus Mineralization in an Alfisol. *Biological Agriculture and Horticulture* 19: 1-8.
- Oldroyd GED, Downie JA (2006)** Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Current Opinion Plant Biology* 9: 351-357.
- Olivera M, Tejera N, Iribarne C, Ocana A, Liuch C (2004)** Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum* 121: 498-505.
- Olsen SR, Cote CV, Watanabe FS, Dean LA (1954)** Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. U.S.D.A. Circular 939, 8 p.
- Onguene NA, Kuyper TW (2001)** Mycorrhizal associations in the rain forest of South Cameroon. *Forest Ecology and Management* 140: 277-287.
- Osundina MA (1997)** Nodulation and growth of mycorrhizal *Casuarina equisetifolia* J.R and G. First in response to flooding. *Biology and Fertility of Soils* 26: 95-99.
- Ouahmane L, Revel JC, Hafidi M, Thioulouse J, Prin Y, Galiana A, Dreyfus B, Duponnois R (2009)** Responses of *Pinus halepensis* growth, soil microbial catabolic functions and phosphate-solubilizing bacteria after rock phosphate amendment and ectomycorrhizal inoculation *Plant and soil* 320: 169-179.
- Ouahmane L, Hafidi M, Thioulouse J, Ducousso M, Kisa M, Prin Y, Galiana A, Boumezzough A, Duponnois R (2007)** Improvement of *Cupressus atlantica* Gaussen growth by inoculation with native arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Applied Microbiology* 103: 683-690.
- Ouahmane L, Hafidi M, Plenchette C, Kisa M, Boumezzough A, Thioulouse J, Duponnois R (2006)** *Lavendula* species as accompanying plants in *Cupressus* replanting strategies: effect on plant growth, mycorrhizal soil infectivity and soil microbial catabolic diversity. *Applied Soil Ecology* 34: 190-199.
- Ozkaynak E, Finley D, Solomon MJ, Varshavsky A (1987)** The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO Journal* 6: 1429-1439.

“p”

- Paradis R, Dalpé Y, Charest C (1995)** The combined effect of arbuscular mycorrhizas and short-term cold exposure on wheat. *New Phytologist* 129: 637-642.
- Parniske M (2008)** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews. Microbiology* 6: 763-775.
- Parekh J, Jadeja D, Chandra S (2005)** Efficacy of aqueous and methanolic extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity, *Turkish Journal of Biology* 29: 203-210.
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP (2002)** Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13324-13329.
- Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S, Iaccarino M (2004)** Organogenesis of legume root nodules. *International Review of Cytology* 234: 201-262.
- Pattinson GS, Hammill KA, Sutton BG, McGee PA (1999)** Simulated fire reduces the density of arbuscular mycorrhizal fungi at the soil surface *Mycological Research* 103: 491- 496.
- Pearse AGE (1972)** *Histochemistry, Theoretical and Applied*, vol. 2, 3rd ed. Baltimore: Williams &Wilkins.
- Pennanen T, Frostegard A, Fritze H, Baath E (1996)** Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 420-428.
- Péret B, Svistoonoff S, Laplaze L (2009)** When plants socialize symbioses and root development. *Annual Plant Reviews* 37: 209-238.
- Perotto S, Martino E (2001)** Molecular and cellular mechanisms of heavy metal tolerance in mycorrhizal fungi: what perspectives for bioremediation? *Minerva Biotechnologica* 13: 55-63.
- Perotto S, Bonfante P (1997)** Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends in Microbiology* 5: 496-503.
- Perry DA, Meyer MM, Egeland D, Rose SL, Pilz D (1982)** Seedling growth and mycorrhizal formation in clearcut and adjacent undisturbed soils in Montana: a greenhouse bioassay. *Forest Ecology and Management*. 4: 261-273.
- Pfeffer PE, Douds DD, Bécard G, Shachar-Hill Y (1999)** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 120: 587-598.

- Phillips JM, Hayman DS (1970)** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Pinyopusarerk K, Turnbull JW, Midgley SJ (1996)** Recent Casuarina Research and Development: Proceedings of the Third International Casuarina Workshop, Da Nang, Viet Nam, 4-7 Mar 1996. CSIRO Forestry and Forest Products, Canberra, Australia pp.
- Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, G Berta, C Mougél, D van Tuinen (2007)** *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist* 176: 197-210.
- Plaza G, Lukasik W, Ulfig K (1998)** Effect of cadmium on growth of potentially pathogenic soil fungi. *Mycopathologia* 141: 93-100.
- Plenchette C, Dupponois R (2005)** Growth response of the salt brush *Atriplex numularia* L. to inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Journal of Arid Environments* 61: 535-540.
- Plenchette C, Strullu DG (1995)** Mycorhizes et agriculture intégrée: standards expérimentaux. In : Fortin, J.A., C. Charest and Y. Piché (eds) *La symbiose mycorhizienne. Etats des connaissances*. Editions Orbis, Frelighsburg Québec, Canada. 125-144.
- Porter WM, Robson AD, Abbott LK (1987)** Field survey of the distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil pH. *Journal of Applied Ecology* 24: 659-662.
- Prin Y, Rougier M (1987)** Preinfection events in the establishment of *Alnus-Frankia* symbiosis: study of the root hair deformation step. *Plant Physiology* 6: 99-106.
- Pumplin N, Harrison MJ (2009)** Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* 151: 809-819.

“R”

- Rae AL, Cybinski DH, Jarmey JM Smith FW (2003)** Characterization of two phosphate transporters from barley; evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. *Plant Molecular Biology* 53: 27-36.
- Rajendran K, Devaraj P (2004)** Biomass and nutrient distribution and their return of *Casuarina equisetifolia* inoculated with biofertilizers in farmland. *Biomass Bioenergy* 26:235-249.
- Rambelli A (1973)** The Rhizosphere of Mycorrhizae. in: Marks GL, Koslowski TT (eds):

- Ectomycorrhizae, their ecology and physiology. Academic Press, New York. pp 299-343.
- Ramos AC, Façanha AR, Feijo JA (2008)** Proton (H^+) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 178: 177-188.
- Ranjard L, Poly F, Lata JC, Mougel C, Thioulouse J, Nazaret S (2001)** Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communities by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4479-4487.
- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N, Bucher M (2001)** A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414: 462-470.
- Read DJ, Birch CPD (1988)** The effects and implications of disturbance of mycorrhizal mycelial systems. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 94: 13-24.
- Reddell P, Yun Y, Shipton WA (1997)** Cluster roots and mycorrhizae in *Casuarina cunninghamiana*: their occurrence and formation in relation to phosphorus supply. *Australian Journal of Botany* 45: 41-51.
- Reddell P, Bowen GD, Robson M (1986)** Nodulation of Casuarinaceae in relation to host species and soil properties. *Australian Journal of Botany* 34: 435-444.
- Redecker D, Hijri M, Dulieu H, Sanders IR (1999)** Phylogenetic analysis of a dataset of fungal 5.8S rDNA sequences shows that highly divergent copies of internal transcribed spacers reported from *Scutellospora castanea* are of ascomycete origin. *Fungal Genetic Biology* 28: 238-244.
- Remigi P, Faye A, Kane A, Deruaz M, Thioulouse J, Cissoko M, Prin Y, Galiana A, Dreyfus B, Duponnois R (2008)** The exotic legume tree species *Acacia holosericea* alters microbial soil functionalities and the structure of the arbuscular mycorrhizal community. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1485-1493.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994)** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11841-11843.
- Resh SC, Binkley D, Parrotta JA (2002)** Greater soil carbon sequestration under nitrogen-fixing trees compared with *Eucalyptus* species. *Ecosystems* 5: 217-231.
- Riedlinger J, Schrey SD, Tarkka MT, Hampp R, Kapur M, Fiedler HP (2006)** Auxofuran, a novel substance stimulating growth of fly agaric, produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* Ach 505. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3550-3557.
- Rillig MC, Lutgen ER, Ramsey PW, Klironomos JN, Gannon JE (2005)** Microbiota accompanying different arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence soil aggregation. *Pedobiologia* 49: 251-259.

- Rillig MC (2004)** Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* 84: 355-363.
- Rivas R, Velázquez E, Willems A, Vizcaíno N, Subba-Rao NS, Mateos PF, Gillis M, Dazzo FB, Martínez-Molina E (2002)** A new species of *Devosia* That Forms a Unique Nitrogen-Fixing Root-Nodule Symbiosis with the Aquatic Legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5217-5222.
- Rockwood DL, Huffman JB, Conde LF (1983)** Potential of *Casuarina* spp for biomass production in Florida. *Silvicultura* 8: 376-377.
- Roesti (2005)** Bacterial community associated with the rhizosphere of wheat: interactions with arbuscular mycorrhizal fungi and selection of plant growth promoting rhizobacteria for the increase of wheat growth and soil health in Indian marginal rainfed fields. Thèse de Doctorat. University of Neuchâtel, Institute of Botany. Suisse 206 p.
- Rose S (1980)** Mycorrhizal associations of some actinomycete nodulated nitrogen fixing plants. *Canadian Journal of Soil Science* 58:1449-1454.
- Rousseau JVD, Sylvia DM, Fox AJ (1994)** Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytologist* 128: 639-644.
- Rozema J, Arp W, Van Diggelen J, Van Esbroek M, Broekman R, Punte H (1986)** Occurrence and ecological significance of vesicular-arbuscular mycorrhiza in the salt marsh environment. *Acta Botanica Neerlandica* 35: 457-467.
- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Aroca R (2006)** Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? *New Phytologist* 171: 693-698.
- Ruiz-Lozano (2003)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13: 309-317.
- Rundel PW (1989)** Ecological success in relation to plant form and function in the woody legumes. In Stirton CH and Zarucchi JL (eds.). *Advances in legume biology, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Gardens* 29: 377-398.
- Rutto KL, Mizutani F, Kadoya K (2002)** Effect of root-zone flooding on mycorrhizal and non-mycorrhizal peach (*Prunus persica* Batsch) seedlings. *Scientia Horticulturae* 94: 285-295.

“5”

- Saito K, Yoshikawa M, Yano K, Miwa H, Uchida H, Asamizu E, Sato S, Tabata S, Imaizumi-Anraku H, Umehara Y, Kouchi H, Murooka Y, Szczyglowski K, Downie JA, Parniske M, Hayashi M, Kawaguchi M (2007)** Nucleoporin 85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus*

- japonicus*. The Plant Cell 19: 610-624.
- Saito M (1995)** Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* (Becker and Hall). New Phytologist 129: 425-431.
- Saitou N, Nei M (1987)** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.
- Salzer P, Bonanomi A, Beyer K, Vögeli R, Aeschbacher RA, Lange J, Wiemken A, Kim D, Cook DR, Boller T (2000)** Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation and pathogen infection. Molecular Plant-Microbe Interactions 13:763-777.
- Salzer P, Corbiere H, Boller T (1999)** Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. Planta 208: 319-325.
- Sanders IR, Croll D (2010)** Arbuscular Mycorrhiza: The Challenge to Understand the Genetics of the fungal Partner. Annual Review of Genetics 44: 271-292.
- Sannazzaro AI, Echeverria M, Albertó EO, Ruiz OA, Menéndez AB (2007)** Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. Plant Physiology and Biochemistry 45: 39-46.
- Sanon A, Martin P, Thioulouse J, Plenchette C, Spichiger R, Lepage M, Duponnois R (2006)** Displacement of an herbaceous plant species community by Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Gmelina arborea*, an exotic tree, grown in a microcosm experiment. Mycorrhiza 16: 125-132.
- Schnürer J, Rosswall T (1982)** Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Applied and Environmental Microbiology 6: 1256-1261.
- Schrey SD, Schellhammer M, Ecke M, Hampp R, Tarkka MT (2005)** Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytologist 168: 205-216.
- Schüßler A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D (2006)** Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. Nature 444: 933-936.
- Schüßler A (2002)** Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of arbuscular mycorrhiza fungi and *Geosiphon pyriformis*. Plant and Soil 244:75-83.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001)** A new phylum, the Glomeromycota phylogeny and evolution. Mycological Research 105: 1413-1421.
- Schwarzott D, Walker C, Schüßler A (2001)** *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is non-monophyletic. Molecular Phylogenetics and Evolution 21: 190-197.

- Schwencke J (1991)** Rapid, exponential growth and increased biomass yield of some *Frankia* strains in buffered and stirred mineral medium (BAP) with phosphatidylcholine. *Plant and Soil* 137: 37-41.
- Seck PA (1985)** Approvisionnement de Dakar en légumes à partir de la Zone des Niayes, Institut sénégalais de recherches agricoles/ Centre pour le développement de l'horticulture.
- Seddas PMA, Arias CM, Arnould C, van Tuinen D, Godfroy O, Benhassou HA, Gouzy J, Morandi D, Dessaint F, Gioaninazzi-Pearson V (2009)** Symbiosis-related plant genes modulate molecular responses in an arbuscular mycorrhizal fungus during early root interactions. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 22: 341-351.
- Selosse MA, Cameron D (2010)** Introduction to a Virtual Special Issue on mycoheterotrophy: New Phytologist sheds light on non-green plants. *New Phytologist* 186: 267-270.
- Selosse MA, Roy M (2009)** Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science* 14: 64-70.
- Selosse MA, Richard F, He X, Simard SW (2006)** Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology and Evolution* 21: 621-628.
- Selosse MA, Le Tacon F (1999)** Les champignons dopent la forêt. *La Recherche*. 319: 33-35.
- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG (1995)** Partitioning of Intermediary Carbon Metabolism in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Leek. *Plant Physiology* 108: 7-15.
- Shah SK, Shah RP, Xu LH, Aryal UK (2006)** Biofertilizers: an alternative source of nutrients for sustainable production of tree crops. *Journal of Sustainable Agriculture* 29: 85-95.
- Sharmah D, Jha DK, Pandey RR (2010)** Molecular approaches in arbuscular mycorrhizal research: a review. *Journal of Phytology* 2 (7): 75-90.
- Sheng M, Tang M, Chan H, Yang B, Zhang F, Huang Y (2008)** Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* 18: 287-296.
- Siciliano V, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, de Wit PJGM, Bonfante P (2007)** Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology* 144: 1455-1466.
- Sieverding E (1991)** Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza management in tropical agrosystems, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ). Eschborn, Germany, 371pp.

- Silvester WB (1977)** Dinitrogen fixation by plant associations excluding legumes. *In* Hardy R and Silvester W (eds), A treatise of dinitrogen fixation, Section IV: Agronomy and Ecology, p. 141-90, John Wiley and Sons, New York.
- Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R (1997)** Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579-582.
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993)** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Simonet O, Grosjean MC, Misra AK, Nazaret S, Cournoyer B, Normand P (1991)** *Frankia* Genus-Specific Characterization by Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3278-3286.
- Smith FA, Smith SE (1997)** Transley Review N° 96. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 133: 373-388.
- Smith SE, Smith FA (1990)** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist* 114: 1-38.
- Smith SE, Read DJ (2008)** Mycorrhizal Symbiosis, Third Edition, Academy Press.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2004)** Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162: 511-524.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003)** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* 133: 16-20.
- Smith SE, Read DJ (1997)** Mycorrhizal Symbiosis, eds Academic Press.
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V (1990)** Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L. effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology* 17: 177-188.
- Smith SE, Dickson S (1991)** Quantification of active vesicular-arbuscular mycorrhizal infection using image analysis and other techniques. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 637-648.
- Soltis DE, Soltis PS, Morgan DR, Swensen SM, Mullin BC, Dowd JM, Martin PG (1995)** Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 2647-2651.
- Soumaré MD, Mnkeni PNS, Khouma M (2004)** Effects of Ramial Chipped Wood and Litter Compost of *Casuarina equisetifolia* Tomato Growth and Soil Properties in Niayes, Senegal. *In* Bationo A. Managing Nutrient Cycles to Sustain Soil Fertility in Sub-Saharan Africa. Triscope consulting Publishers. 502p
- Sprent JI, Sprent P (1990)** Nitrogen-fixing organisms: pure and applied aspects. London:

Chapman and Hall. 356p.

Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczylowski K, Parniske M (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417: 959-962

St Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA (1995) Altered growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Chrysanthemi* in an in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing in *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza* 5: 431-438.

Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, May GD (2006) Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 110-121.

Strullu (1991) Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Techniques et documentation. Lavoisier Paris. 242 p.

Subba-Rao NS, Rodriguez-Barrueco C (1995) *Casuarinas*. Lebanon, NH, USA: Science Publishers.

Sunita D, Hippalgaonkar KV (1995) The occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils of Konkan and Solapur. In. *Mycorrhiza: Biofertilizers for the future* proceedings of the Third National conference on mycorrhiza. Eds: Alok Adholeya and Sujan Singh, New Delhi. pp 3-7.

Svistoonoff S, Laplaze L, Auguy F, Runions J, Duponnois R, Haseloff J, Franche, Bogusz D (2003) *Cg12* expression is specifically linked to infection of root hairs and cortical cells during *Casuarina glauca* and *Allocasuarina verticillata* actinorhizal nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 600-607.

Swensen SM (1996) The evolution of actinorhizal symbioses: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *American Journal of Botany* 83: 1503-1521.

Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, De Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C, Dreyfus B (2001) Methylophilic *Methylobacterium* Bacteria Nodulate and Fix Nitrogen in Symbiosis with Legumes. *Journal of Bacteriology* 183: 214-220.

“T”

Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau A, Roux C, Bécard G, Franken P (2003) Root factors induce mitochondrial related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology* 131: 1468-1478.

Tarka MT, Frey-Klett P (2008) Mycorrhiza Helper Bacteria. En *Mycorrhiza*. A. Varma (Ed). Springer- Verlag Berlin Heidelberg. pp 113-132.

- Taubert P (1894)** *Leguminosae* Interfamilie *Papilionatae*, In Engler and K. Prantl *Die. Natürlichen Pflanzenfamilien* III. pp.184-385.
- Tellal M, Qarro M, Arahou M, Abourouh M, Tellal R, Rhazi L, Douira A (2008)** Effet de l'actinomycète *Frankia* sur la croissance et la fixation de l'azote de *Casuarina glauca* et *Casuarina cunninghamiana*. *Sécheresse* 19: 211-216.
- Thoen D, Sougoufara B, Dommergues Y (1990)** *In vitro* mycorrhization of *Casuarina* and *Allocasuarina* species by *Pisolithus* isolates. *Canadian Journal Botany* 68: 2537-2542.
- Thoen D, Ba AM (1989)** Ectomycorrhizae and putative ectomycorrhizal fungi of *Afzelia africana* Sm. and of *Uapaca guineensis* Müll. Arg. in southern Senegal. *New Phytologist* 113: 549-559.
- Thomas L, Mallesha BC, Bagyaraj DJ (1994)** Biological control of damping-off of cardamom by the VA mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. *Microbiological Research* 149: 413-417.
- Tian CY, Feng G, Li XL, Zhang FS (2004)** Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline on salinity tolerance of plants. *Applied Soil Ecology* 26: 143-148.
- Tian C, He X, Zhong Y, Chen J (2002)** Effects of VA mycorrhizae and *Frankia* dual inoculation on growth and nitrogen fixation of *Hippophae tibetana*. *Forest Ecology and Management*. 170: 307-312.
- Tisdall JM, Oades JM (1979)** Stabilization of soil aggregations of a silty clay loam soil by mycorrhizal onion roots. *Soil Sciences Society of American Journal* 50: 1494-1499.
- Tisserant B, Brenac V, Requena N, Jeffries P, Dodd JC (1998)** The detection of *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) forming mycorrhizas in three plants, at different stages of seedling development, using mycorrhiza-specific isozymes. *New Phytologist* 138: 225-239.
- Tisserant B, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, Gollotte A (1993)** *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research* 97: 245-250.
- Titze JF, Van Der Pennen E (1983)** Provisory list of diseases of *Casuarina* species. In: Proc. Int. Workshop on *Casuarina* ecology, management and utilization. Canberra, Australia, 225-272.
- Tobar RM, Azcón R, Barea JM (1994)** The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. *Mycorrhiza* 4: 105-108.
- Toljander JF, Santos-González JC, Tehler A, Finlay RD (2008)** Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 323-338.

- Toljander JF, Lindahl BD, Paul LR, Elfstrand M, Finlay RD (2007)** Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 295-304.
- Toljander JF, Artursson V, Paul LR, Jansson JK, Finlay RD (2006)** Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS Microbiology Letters* 254: 34-40.
- Toro M, Azcon R, Barea JM (1998)** The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of *Rhizobium* genotype, mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorus acquisition by *Medicago sativa*. *New Phytologist* 138: 265-273.
- Toth R, Miller RM (1984)** Dynamics of arbuscule development and degeneration in a *Zea mays* mycorrhiza. *American Journal of Botany* 71: 449-460.
- Traquair JA (1995)** Fungal biocontrol of root diseases: endomycorrhizal suppression of cylindrocarpon root rot. *Canadian Journal of Botany* 73: S89-S95.
- Troelstra SR, Wagenaar R, Smant W, Peters BAM (2001)** Interpretation of bioassays in the study of interactions between soil organisms and plants: involvement of nutrient factors. *New Phytologist* 150:697-706.
- Trouvelot S, van Tuinen D, Hijri M, Gianinazzi-Pearson V (1999)** Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. *Mycorrhiza* 8: 203-206.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986)** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. In *Proceedings of the 1st ESM*. INRA Press, Paris, pp 217-221.

“U”

- Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J (2005)** *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends Plant Science* 10: 222-228.
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, Pierrat JC, Mustain C, Frey-Klett P (2007)** Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the soil bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 3019-3027.

“V”

- Vaast P, Caswell-Chen EP, Zasoski RJ (1998)** Influences of a root-lesion nematode,

- Pratylenchus coffeae*, and two arbuscular mycorrhizal fungi, *Acaulospora mellea* and *Glomus clarum*, on coffee (*Coffea arabica* L.). *Biology and Fertility of Soils* 26: 130-135.
- Van Aarle IM, Olsson PA, Söderström B (2001)** Microscopic detection of phosphatase activity of saprophytic and arbuscular mycorrhizal fungi using a fluorogenic substrate. *Mycologia* 93: 17-24.
- Van Berkum P, Eardly BD (2002)** The aquatic budding Bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1132-1236.
- van der Heijden MGA, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998a)** Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79: 2082-2091.
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998b)** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- van Ghelue M, Lovaas E, Ringo E, Solheim B (1997)** Early interaction between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain Arl3. Production and specificity of root hair deformation factors. *Physiologia Plantarum* 99: 579-587.
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V (1998)** Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* 7:879-887.
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003)** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource. *New Phytologist* 157: 423-447.
- Vance C (2001)** Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant Physiology* 127: 390-397.
- Vance CP (1998)** Legume symbiotic nitrogen fixation: argonomic aspects. In *The Rhizobiace: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykas JJ. eds, pp 509-30. Kluvier Academic Publishers.
- Vasanthakrishna M, Bagyaraj DJ, Nirmalnath PJ (1994)** Responses of *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Glomus fasciculatum* and/or *Frankia*. *Forest Ecology and Management* 68: 399-402.
- Versaw WK (1995)** A phosphate-repressible, high-affinity phosphate permease is encoded by the pho-5⁺ gene of *Neurospora crassa*. *Gene* 153: 135-139.
- Vessey JK, Pawlowski K, Bergman B (2004)** Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil* 266: 205-230.
- Vierheilig H, Schweigerb P, Brundrett M (2005)** An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum* 125:

393-404.

- Vierheilig H, Knoblauch M, Juergensen K, van Bel A, Grundler MW, Piche Y (2001)** Imaging arbuscular mycorrhizal structures in living roots of *Nicotiana tabacum* by light, epifluorescence and confocal laser scanning microscopy. *Canadian Journal of Botany* 79: 231-237.
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y (1998)** Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 5004-5007.
- Villenave C, Leye K, Chotte JL, Duponnois R (2003)** Nematofauna associated with the mycorrhizosphere and hyphosphere of *Glomus intraradices* and exotic or native leguminous plant species mycorrhizal formation in West Africa. *Biology and Fertility of Soils* 38: 161-169.
- Vivas A, Azcon R, Biro B, Barea JM, Ruiz-Lozano JM (2003a)** Influence of bacterial strains isolated from lead-polluted soil and their interactions with arbuscular mycorrhizae on the growth of *Trifolium pratense* L. under lead toxicity. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 577-588.
- Vivas A, Marulanda A, Ruiz-Lozano JM, Barea JM, Azcón R (2003b)** Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza* 13: 249-256.
- Vivas A, Voros I, Biro B, Campos E, Barea JM, Azcón R (2003c)** Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environment Pollution* 126: 179-189.
- Volpin H, Elkind Y, Okon Y, Kapulnik Y (1994)** A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiology* 104: 683-689.

“W”

- Wachsmuth ED (1988)** A comparison of the highly selective fluorescence staining of fungi in tissue sections with Uvitex 2B and Calcofluor White M2R. *Histochemical Journal* 20: 215-221.
- Walker C, Giovannetti M, Avio L, Citerinesi AS, Nicolson TH (1995)** A new fungal species forming arbuscular mycorrhizas: *Glomus viscosum*. *Mycological Research* 99: 1500-1506.
- Wall LG (2000)** The actinorhizal symbiosis. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 167-182.
- Wang B, Qiu YL (2006)** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.

- Wang FY, Liu RJ, Lin XG, Zhou JM (2004)** Arbuscular mycorrhizal status of wild plants in saline-alkaline soils of the Yellow River Delta. *Mycorrhiza* 14: 133-137.
- Wang GM, Stribley DP, Tinker PB, Walker C (1993)** Effects of pH on arbuscular mycorrhiza. I. Field observations on the long-term liming experiments at Rothamsted and Woburn. *New Phytologist* 124: 465-472.
- Watt JM, Breyer-Brandwijk MG (1962)** The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. 2nd ed. E. & S. Livingstone, Ltd., Edinburgh and London.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991)** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology* 173: 697-703.
- Wegmüller S, Svistoonoff S, Reinhardt D, Stuurman J, Amrhein N, Bucher M (2008)** A transgenic dTph1 insertional mutagenesis system for forward genetics in mycorrhizal phosphate transport of *Petunia*. *The Plant Journal* 54: 1115-1127.
- West AW, Sparling GP (1986)** Modification to the substrate-introduced respiration method to permit measurements of microbial biomass in soils of differing water contents. *Journal of Microbiological Methods* 5: 177-189.
- White C, Gadd GM (1986)** Uptake and cellular distribution of copper, cobalt and cadmium in strains of *Saccharomyces cerevisiae* cultured on elevated concentrations of these metals. *FEMS Microbiology Ecology* 38: 277-283.
- Wilkinson KG, Dixon KW, Sivasithamparam K (1989)** Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytologist* 112: 429-435.
- Wilson KL, Berendsohn WG (2005)** IOPI global plant checklist: Casuarinaceae. International Organization for Plant Information (IOPI). Royal Botanic Gardens, Sydney NSW 2000, Australia (<http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/iopi/iopihome.htm>).
- Wilson KL, Johnson LAS (1989)** Casuarinaceae. In: George AS (ed) *Flora of Australia*, vol 3 Hamamelidales to Casuarinales. Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia, pp 1-219.
- Wright DP, Scholes JD, Read DJ, Rolfe SA (2005)** European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. *New Phytologist* 167: 881-896.
- Wright SF, Upadhyaya A (1996)** Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* 161: 575-586.
- Wu B, Hogetsu T, Isobe K, Ishii R (2007)** Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert on the southeast slope of Mount Fuji. *Mycorrhiza* 17: 495-506.

“X”

Xavier LJC, Germida JJ (2003) Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 471-478.

Xie ZP, Staehelin C, Vierheilig H, Wiemken A, Jabbouri S, Broughton WJ, Vogeli-Lange R, Boller T (1995) Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiology* 108: 1519-1525.

“Y”

Yamato M, Ikeda S, Iwase K (2008) Community of arbuscular mycorrhizal fungi in coastal vegetation on Okinawa Island and effect of the isolated fungi on growth of sorghum under salt-treated conditions. *Mycorrhiza* 18: 241-249.

Yano K, Yoshida S, Müller J, Singh S, Banba M, Vickers K, Markmann K, White C, Schuller B, Sato S, Asamizu E, Tabata S, Murooka Y, Perry J, Wang TL, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Parniske M (2008) CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Science. The United States of America* 105: 20540-20545.

“Z”

Zaid EH, Arahou M, Diem HG, Morabet R (2003) Is Fe deficiency rather than P deficiency the cause of cluster root formation in *Casuarina* species? *Plant and Soil* 248: 229-235.

Zhang SJ, Lin YM, Zhou HC, Wei SD, Lin GH, Ye GF (2010) Antioxidant Tannins from Stem Bark and Fine Root of *Casuarina equisetifolia*. *Molecules* 15: 5658-5670.

Zhong C, Zhang Y, Chen Y, Jiang Q, Chen Z, Liang J, Pinyopusarerk K, Franche C, Bogusz D (2010) *Casuarina* research and applications in China. *Symbiosis* 50: 107-114.

Zhu YG, Miller RM (2003) Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends in Plant Science* 8: 407-409.

Zuccarini P, Okurowska P (2008) Effects of mycorrhizal colonization and fertilization on growth and photosynthesis of sweet basil under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 31: 497-513.

Zurdo- Piñeiro JL, Rivas R, Trujillo ME, Vizcaíno N, Carrasco JA, Chamber M, Palomares A, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E (2007) *Ochrobactrum cytisi* sp. nov. isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 784-788.

9° ANNEXES

Annexes : Figure

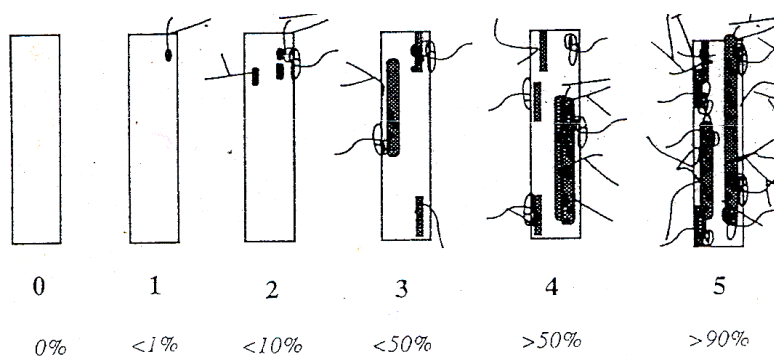


Figure 29. Notation de l'infection mycorhizienne (classe 0 à classe 5). D'après Trouvelot *et al.*, (1986)

La fréquence et l'intensité de mycorhization sont calculées selon les formules suivantes:

$$F\% = (\text{nombre de fragments mycorhizés} / \text{nombre total de fragments observés}) \times 100$$

$$I\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / \text{nombre total de fragments observés}$$

n_5 = nombre de fragments notés 5 ; n_4 = nombre de fragments notés 4 ; n_3 = nombre de fragments notés 3 ; n_2 = nombre de fragments notés 2 ; n_1 = nombre de fragments notés 1

Annexes : Tableaux

Tableau 4. Caractéristiques Physico-chimiques du sol de Sagalkam

pH	Argile	Limon fin	Limon grossier	Sable fin	Sable grossier	Azote total	Carbone total	P total	P assim. (Olsen <i>et al.</i> , 1954)
H ₂ O	%	%	%	%	%	%	%	P mg/kg	P mg/kg
5,3	3,6	0,00	0,8	55,5	39,4	0.02	0,17	39	4,8

Tableau 5. Composition du milieu H.

Pour 1 Litre :

Macroéléments		Microéléments	
K ₂ SO ₄	0,109 g	H ₃ BO ₃	0,715 mg
MgSO ₄	0,123 g	MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,452 mg
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ , 7 H ₂ O	0,029 g	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,055 mg
CaSO ₄ , 2H ₂ O	0,086 g	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,02 mg
FeNaEDTA (0,2%)	0,063 g	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,006 mg

Ajout de 8 g.L⁻¹ d'agar (Bactoagar Difco) si le milieu est gélosé.

Le pH est ajusté à 5,6 avec une solution de KOH à 0,1M.

Tableau 6. Liste des amorces**LISTE AMORCES****Amorces pour étudier la diversité des champignons MA**

Noms des amorces	Séquence de l'amorce	Longueur	Références
LR1	5' GCA-TAT-CAA-TAA-GCG-GAG-GA 3'	20	Farmer <i>et al.</i> , (2007)
NDL22	5' TGG-TCC-GTG-TTT-CAA-GAC-G 3'	19	van Tuynen <i>et al.</i> , (1998)
FLR3	5' TTG-AAA-GGG-AAA-CGA-TTG-AAG-T 3'	22	van Tuynen <i>et al.</i> , (1998)
FLR4	5' TAC-GTC-AAC-ATC-CTT-AAC-GAA 3'	21	Gallotte <i>et al.</i> , (2004)

Amorces pour l'étude de la diversité de la communauté bactérienne totale**DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)**

F 338 GC	5'CGC-CCG-CCG-CGC-GCG-GCG-GGC-GGG-GCG-GGG-GCA-CGG-GGG-GAC-TCC-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG 3'	60	Muyzel <i>et al.</i> , (1993)
R 518	5'ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GG 3'	17	

ARISA (Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

S-D-Bact-1522-b-S-20	5'-TGCGGCTGGATCCCCCTCCTT-3'	20	Normand <i>et al.</i> , (1996c) ; Ranjard <i>et al.</i> , (2001)
L-D-Bact-132-a-A-18	5'-CCGGGTTTCCCCATTTCGG-3'	18	

Amorces pour l'étude de la diversité de la communauté de *Pseudomonas*

rD1	5' AAG-CTT-AAG-GAG-GTG-ATC-CAG-CC 3'	23	Weisburg <i>et al.</i> , (1991)
fd1	5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG 3	20	
FGPS1509	5' AAG-GAG-GGG-ATC-CAG-CCG-CA 3'	20	Normand <i>et al.</i> , (1992)
16S-1080r	5' GGG-ACT-TAA-CCC-AAC-ATC-T 3'	19	Sy <i>et al.</i> , (2001)

Amorces utilisées dans l'étude de l'expression des gènes marqueurs

PCR

CePT4 F	5' CCG-GGA-TGG-GGT-TTT-TTA- CGG-AT 3'	23	Simonet <i>et al.</i> , (1991)
CePT4 R	3' TAC- AAA -CAG -TAG-CGC -AAC- CAC -CC 5'	23	
CeHB F	5' ATG -GCT -TTG -ACA -GAG- AAG -C 3'	19	
CeHB R	3' GTT -CCG -ACT -CTA -CTT- TCT -TAT -T 5'	22	
Ce12 F	5' CTG -CAA -ATC -CTA- ACA -TCA -CCT -TTG 3'	24	
Ce12 R	3' CTG -CTA -CTT -CAA -GTT -CTC -CCC -G 5'	22	
CeUbiF	5' AGA -AGG- AGT -CCA -CCC -TCC -ACC 3'	21	
CeUbiR	3' TCC -CCT -CCG -TAC- GTC- TAA -AAG- C 5'	22	
CePT4 F	5' CCG -GGA -TGG- GGT -TTT- TTA- CGG -AT 3'	23	
CePT4 R	3' TAC- AAA -CAG -TAG-CGC -AAC- CAC -CC 5'	23	
CeHB F	5' ATG -GCT -TTG -ACA -GAG- AAG -C 3'	19	
CeHB R	3' GTT -CCG -ACT -CTA -CTT- TCT -TAT -T 5'	22	
Ce12 F	5' CTG -CAA -ATC -CTA- ACA -TCA -CCT -TTG 3'	24	
Ce12 R	3' CTG -CTA -CTT -CAA -GTT -CTC -CCC -G 5'	22	
CeUbiF	5' AGA -AGG- AGT -CCA -CCC -TCC -ACC 3'	21	
CeUbiR	3' TCC -CCT -CCG -TAC- GTC- TAA -AAG- C 5'	22	
NifHF FGPH19	5'-TAC-GGC-AAG-AGG-TGG-TCG-AAT-TCA-G-3'	25	
NifHFGPH273'	3'-CTT-CAG-TCG-ACC-GAC-CGG-GCC-TC-5'	23	

qPCR

qCePT4 F	5' TGG-CGT-ATC-GTG-CTT-ATG 3'	18
qCePT4 R	3' GGT-TCT-CCT-TGT-CCT-ATT-CA 5'	20
qCeHB F	5' ACA-GTC-TTC-GTC-TCT-TTG-CCT-TG 3'	23
qCeHB R	3' CTT-CGT-CGT-GGT-CTT-AGG-TTC-A 5'	22
qCe12 F	5' ATG-GTA-AAG-GAA-CAG-CAA-GAG G 3'	22
qCe12 R	3' GCT-ATA-CGA-AGA-CTA-CAA-GAA-CG 5'	23
qCeUbiF	5' GCG-AAG-ACG-GAG-TAC-AAG-G 3'	19
qCeUbiR	3' GGT-AGG-AGG-TTG-ACG-AAG-G 5'	19
qCeNifF	5' CGA -CAA-CGA -CAT -GAA -GAC-C 3'	19
qCeNifR	3' CTC-TCG-TAG- TAG-CCG-TTC 5'	18

Equipe
Rhizogénèse**Tableau 9.** Composition Bleu de Trypan.

Type de Colorant	Composés Chimiques	Méthodes	Temps	Structures ciblées	Caractéristiques
Bleu de Trypan	-Bleu de trypan - Acide acétique	1) Éclaircir les racines avec du KOH 10% 2) Colorer les racines avec du Bleu de trypan 0,1% + acide acétique 5% à 90°C	- Varie en fonction de l'âge des racines -60min	- Tissus fongiques	- quantification des mycorhizes

Tableau 10. Composition du milieu King B

Pour 1 litre

Casamino acid	10 g
Saccharose	10 g
Tyrosine	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 g
Glycérol	10 ml
Agar	18 ml
Eau stérile	qsp 1000 ml

Stériliser à 120 °C pendant 20 min

Tableau 11. Composés organiques utilisés pour établir les profils cataboliques des sols.

Substrats organiques	Concentration (mM)	Substrats organiques	Concentration (mM)
Acides aminés		Acides organiques	
Glutamine	15	Ac. pantholeique	100
Proline	15	Ac. oxalique	100
Leucine	15	Ac. keto-glutarique	100
Tyrosine	15	Ac. malonique	100
Lysine	15	Ac. tartarique	100
Serine	15	Ac. succinique	100
Histidine	15	Ac. quinique	100
Ac. Glutamique	15	Ac. malique	100
Cysteine	15	Ac. fumarique	100
Asparagine	15	Ac. citrique	100
Arginine	15	Ac. ascorbique	100
		Ac. gallique	100
Alcools		Carbohydrates	
Mannitol	100	Maltose	75
Sorbitol	100	Sucrose	75
Meso-inositol	100	Glucose	75
		Mannose	75
Amides			
Amidon	15		
Glucosamine	15		

Tableau 12. Composition du milieu TCP (Tricalcique Phosphate).

Pour 1 litre

Ca ₃ (PO ₄) ₂	4 g
NH ₄ Cl	5 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 g
Agar	20 g
Glucose	10 g
Eau stérile	qsp 1000 ml

Tableau 13. Composition du milieu Lipolytique.

Pour 1 litre

1 % Tween 20 (v/v)	10 ml
Peptone	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,1 g
Agar	20 g
Eau stérile	qsp 1000 ml

Stériliser à 120 °C pendant 20 min

Tableau 14. Composition du milieu CAS modifié (Chrome Azurol S) : Pour 500 ml

Annexe 9 :**1. Solution CAS**

CAS	0,03025 mg
Eau stérile	qsp 25 ml
Solution de Fe^{3+} (1Mm $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 Mm HCl)	5 ml

2. Solution HDTMA

HDTMA	0,03645 g
Eau stérile	qsp 20ml

3. Solution Tampon KH_2PO_4 / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 6,8 pour 350 ml du mélange**a. Solution Phosphate Monopotassique (KH_2PO_4)**

KH_2PO_4	1,850 g
Eau stérile	qsp 204ml

b. Solution Phosphate Disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,326 g
Eau stérile (qsp)	196 ml

4. Agar

7,5 g

5. Eau stérile

qsp 500 ml

Stériliser à 120 °C pendant 20 min

Tableau 24. Composition du milieu BAP.

Pour 1 Litre :

Macroéléments		Microéléments		Vitamines	
NH ₄ Cl	0,267 g	CoSO ₄ , H ₂ O	0,001 mg	Panthothénate de calcium	10 µg
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,05 g	H ₃ BO ₃	2,86 mg	Riboflavine	10 µg
CaCl ₂ , H ₂ O	0,01 g	MnCl ₂ , 4H ₂ O	1 ,81 mg	Acide nicotinique	50 µg
Propionate Na	0,48 g	ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,22 mg	Pyridoxine	50 µg
Fe,Na ₂ EDTA	7,34 mg	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,08 mg	Thiamine	11 µg
		Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,025 mg	Acide folique	10 µg

- Le pH a été ajusté à 6,7
- Le milieu a été autoclaver à 120 °C pendant 20 min puis
- Pendant l'ensemencement de la culture, 20 ml de MES-TRIS ainsi que 260 µl de phosphatidylcholine ont été ajoutés a milieu a été autoclavé à 120°C pendant 20 min

Tableau 25. Coloration des racines mycorhizées avec l'Encre/ vinaigre.

Type de Colorant	Composés Chimiques	Méthodes	Temps	Structures ciblées	Caractéristiques
encre/ vinaigre	- encre -vinaigre	1) Éclaircir les racines avec du KOH 10% 2) Incuber les racines dans de l'encre 5% dilué dans 5% d'acide acétique à 95°C 3) Rincer les racines dans de l'eau distillée acide	-varie en fonction de l'âge des racines - 3min au moins - total 30min	- Tissus fongiques	- quantifications des structures fongiques

Tableau 26. Coloration des racines mycorhizées avec du Bleu d'aniline.

Type de Colorant	Composés Chimiques	Méthodes	Temps	Structures ciblées	Caractéristiques
Bleu d'aniline	-Bleu d'aniline	1) Éclaircir les racines avec du KOH 10% 2) Rincer dans l'eau distillée 2) Colorer les racines avec du Bleu d'aniline 0,05%	-varie en fonction de l'âge des racines - 3min - 60min	- Tissus fongiques	- quantifications des structures fongiques

Tableau 27. Coloration des racines mycorhizées avec du Wheat Germ Agglutinin (WGA).

Type de Colorant	Composés Chimiques	Méthodes	Temps	Structures ciblées	Caractéristiques
WGA	- Formaline - Acide acétique - Alcool - WGA-Alexa -Fluor 488 conjugate (Molecular Probes)	1) Fixer les racines dans une solution de Formaline + acide acétique + Alcool 2) Éclaircir les racines avec du KOH 10% à 55°C 2) Incuber les racines dans du WGA-Alexa - Fluor 488 - Pour une meilleure coloration l'étape 3 peut être effectuée : 3) Colorer les racines dans de l'acide fuschine (10 µg /ml) incuber dans du tampon phosphate saline	- 14H - 2H - 14H - 5min	- Tissus fongiques	- Études cytologiques et morphologiques

Tableau 28. Coloration des racines mycorhizées avec du Nitro Blue Tetrazolium (Succinate

Dehydrogenase).

Type de Colorant	Composés Chimiques	Méthodes	Temps	Structures ciblées	Caractéristiques
NBT	-Chloral hydrate 20% - KOH 5% - NBT 4mg/ml -Tampon Tris Hcl 0,2M pH 7,4 -Sodium Succinate 2,5M - Mgcl 2 5mM -HO ₂	1) Incuber les racines dans une solution NBT 2) Rincer plusieurs fois avec de l'eau distillée 3) Éclaircir les racines dans du Chloral hydrate 20% 60-100°C 4) Rincer 3 fois à l'eau distillée 4) Incuber dans du KOH 5% à 55°C	- overnight -15min -overnight Total: 2jours	-Structures fongiques actives : hyphes, vésicules, arbuscule et spore	-détection des structures fongiques actives

Solution NBT- Succinate : (10ml)

- NBT 4mg/ml	2,5ml
-Tampon Tris Hcl 0,2M pH 7,4	2,5ml (pH 7,4)
-Sodium Succinate 2,5M	1ml
- Mgcl ₂ 5mM	1ml
- HO ₂	3ml

Tableau 29. Coloration des racines mycorhizées avec du Fast Blue RR (Alcaline phosphatase).

Type de Colorant	Composés Chimiques	Méthodes	Temps	Structures ciblées	Caractéristiques
Fast blue RR	-Tris Acide Citrique 0,05M pH 9,2 -Sorbitol 0,05% -Cellulase 15 Unités /ml -Pectinase 15 Unités /ml -Tampon Tris 0,05M pH 9,2 -Fast Blue RR salt 1mg/ml - α naphthyl acide phosphate 1mg/1ml - Mg cl ₂ 6HO ₂ 1mg/ml - Mn cl ₂ 4HO ₂ 0,8mg/ml -Hypochlorite de Na 1%	1) Incuber les racines dans la solution d'éclaircissement : Tampon ALP à la T° ambiante 2) Rincer à l'eau déminéralisée 3) Incuber les racines dans la solution de coloration à la T° ambiante 4) Rincer avec de l'eau 5) Incuber dans de l' Hypochlorite de Na à la T° ambiante 6) Rincer avec de l'eau	-2H -overnight -5min	-Structure où l'activité phosphatase est exprimée (Hyphes , arbuscule)	-marqueur de l'activité phosphatase - marqueur du transport de Pi

Tampon d'éclaircissement ALP :

-Tris Acide Citrique 0,05M
 -Sorbitol 0,05%
 -Pectinase 15 Unités /ml
 -Fast Blue RR salt 1mg/ml

Tampon de coloration ALP :

-Tampon Tris 0,05M pH 9,2
 -Fast Blue RR salt 1mg/ml
 - α naphthyl acide phosphate 1mg/1ml
 - Mg cl ₂ 6HO₂ 1mg/ml
 - Mn cl ₂ 4HO₂ 0,8mg/ml

Tableau 30. Coloration des racines mycorhizées avec une solution de Diaminobenzidine

(DAB).

Type de Colorant	Composés Chimiques	Méthodes	Temps	Structures ciblées	Caractéristiques
DAB	-Tampon DAB(1mg/1ml) -Mes NaOH 10mM -Phosphate K organique 0,5mM -KNO3 2mM -Acide lactique 40% - Ethanol 95%	1) Incuber dans du DAB 22° C 2) Incuber les racines dans de l'éthanol 95% à 100°C 3) Rincer les racines dans de l'eau 4) Monter les racines entre lame et lamelle avec de l'acide lactique 40%	- 12 H -5min - Total: 13H	Arbuscules dégénérés	-Détection des structures fongiques en senescence

Tampon DAB:

-1mg/1ml DAB tamponner avec du Mes NaOH 10mM pH 5,6 dissout dans une solution contenant :

- Phosphate K organique 0,5mM
- KNO3 2mM

Title: *Casuarina* tree species in Africa: ecological role and interaction with arbuscular and ectomycorrhizal symbionts.

Nathalie Diagne^{1, 2, 3}, Diegane Diouf^{1, 2}, Sergio Svistoonoff³, Aboubacry Kane^{1, 2}, Kandioura Noba¹, Claudine Franche³, Didier Bogusz³ and Robin Duponnois⁴

¹ Département de Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop (UCAD), BP 5005, Dakar, Sénégal

² Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, Centre de Recherche de Bel Air, BP 1386, Dakar, Sénégal

³ Groupe Rhizogenèse, Unité mixte de Recherche Diversité et Adaptation des Plantes Cultivées (DIAPC), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 avenue Agropolis, BP 5045, 34394 Montpellier, Cedex 5, France

⁴ Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), TA10/J, IRD, UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/SUP-AGRO/UM2 34398 Campus International de Baillarguet, Montpellier, Cedex, France

*corresponding author: Present address is IRD. Laboratoire Ecologie & Environnement (Unité associée au CNRST, URAC 32) Faculté des Sciences Semlalia. Université Cadi Ayyad. Marrakech. Maroc Tel/Fax: +212 5 24 43 76 65. E-mail Robin.Duponnois@ird.fr

Abstract:

Soil degradation induce micronutrient deficiency particularly phosphorus and nitrogen. It reduces natural vegetation and increase land erosion. To rehabilitate degraded ecosystems, exotic trees were introduced in these areas. Generally, Australian trees are often use. Among them, *Casuarina*, well adapted trees to drought and saline conditions. These plants establish symbiosis with *Frankia* a soil nitrogen fixing bacteria. Moreover, plants of *Casuarinaceae* family form tripartite symbiosis with ectomycorrhizal and endomycorrhizal fungi. The relationship between *Casuarina* and these microorganisms such as *Frankia* and mycorrhizal fungi improve plant growth by increasing nutrient availability. *Casuarina* trees are widely used in Africa where they play an important ecological role. In addition to the rehabilitation of degraded lands, these trees evolved in dunes fixation, in reclamation of polluted sites and they produce a high quality wood. They are widespread in African countries; more than twenty zones. The introduction of exotic trees has a positive effect for countries development as they increase the livelihood and improve the local economies. In the study, we will expose the geographical distribution of *Casuarina* in Africa, its economical, ecological uses and the interaction between *Casuarina*, arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal symbionts.

Key Words: *Casuarina*, Ecosystem degradation, arbuscular mycorrhizal fungi,

I Introduction

Demographic explosion and rapid urbanization are major threats in Africa. They enhance population dependencies on natural ecosystems. Overexploited ecosystems are degraded and this degradation is accompanied by the reduction of soil fertility. Introduction of nitrogen fixing and mycorrhizal plants species is a promising approach to increase soil fertility (Dommergues et al. 1999). Among these species, exotic trees such as Casuarina plants are widespread in tropical zones where they play an important role due to the relationship with soil bacteria and mycorrhizal fungi. These microorganisms increase plant growth development (Sougoufara et al. 1990; Duponnois et al. 2003; Zhong et al. 2010) and they also improve nutrients availability for the plant host particularly P and N₂ and in return, they benefit of plant carbohydrates (Smith and Read, 2008, He and Critchley, 2008).

The name of Casuarina plant is from the Malay word 'kasuari' due to the resemblance of the twigs and the plumage of the cassowary bird, (Boland et al. 1994). *Casuarinaceae* family is formed approximately by 97 species, 18 for Casuarina genera, 18 for Ceuthostoma, 59 for Allocasuarina and 2 for Gymnostoma (Wilson and Johnson, 1989; Bisby et al. 2007). *C. equisetifolia*, *C. glauca* and *C. cunninghamia* were the most plants species established in several zones in Africa except in Zimbabwe where *C. junghuhniana* and *C. decaisneana* were introduced (NRC, 1984). *C. equisetifolia* is the most widespread and well-known member of the family Casuarinaceae (NRC, 1984). Casuarina trees are found in hot and frost climatic zone (NRC, 1984) on subtropical and tropical lands. They grow in areas with average rainfall ranged from 200 mm to 5000 mm, at altitudes between 0 and 1800 m above sea level. Casuarina species are among the fastest-growing trees and grow up to 2-3 m/year when young, and can reach a height of 20-30 m (NRC, 1980). The wood is dense, hard and smokeless, with a high quality charcoal, burns with great heat even when green and has low ash content (NRC, 1984). *C. equisetifolia* is called the best firewood in the world (Midgley et al. 1983, NRC, 1984, Chudnoff, 1984, El-Lakany et al. 1990). Evaluation of the calorific value of the wood arises 5000 kcal/kg and that of the charcoal exceeds 7 000 kcal/kg.

Beside these great interests, Casuarina is also used in the reclamation of salt-affected land, the protection against wind, the stabilization of sand dunes, the production of firewood and timber. However, up to now, little is known about Casuarina distribution in Africa and their potential benefits for the rehabilitation of degraded lands and the management of soil fertility. This review is focused on: 1) the Casuarina distribution and ecology in Africa, 2) their uses

and 3) the importance of the symbiosis relationship between *Casuarina* plants, arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi.

II Geographic distribution of *Casuarina equisetifolia* and their ecological importance in Africa

1 Geographic distribution of *Casuarina* in Africa

Casuarina is widely distributed in Africa. It was planted in Benin, Burkina Faso, Cameroon, Central African Republic, Tchad, Congo, Cote d'Ivoire, Democratic Republic of Congo, Djibouti, Egypt, Eritrea, Ethiopia, Gabon, Gambia, Ghana, Guinea, Guinea-Bissau, Kenya, Liberia, Madagascar, Mali, Mauritania, Niger, Nigeria, Senegal, Sierra Leone, Somalia, South Africa, Sudan, Tanzania, Togo, Uganda and Zimbabwe (AFTD). In certain zones, *Casuarina* is widely used like in Senegal, Egypt, Benin, Kenya, South Africa, and Madagascar while in others African countries, its uses are very limited and sometimes just for decoration. Selection of introduced species is based on: climatic conditions of the area such as the proximity of the sea, the wind, the soils erosion and the lack of fertility of the plantation sites (Roy-Noel, 1974).

2 Importance of *Casuarina* plantation in Africa

Casuarina plantations were established in the Niayes region in Senegal along the western coast between Dakar and St-Louis, in the Mediterranean Coast, the Nile Delta and Valley in Egypt, the Sémé zone localized in Benin between Cotonou and Porto Novo and the coastal dunes of KwaZulu-Natal in South Africa. They are widely used in these countries where they play a major role in maintaining ecosystems fertility.

The Niayes region plantation in Senegal with only *Casuarina equisetifolia* specie, stabilizes coastal sand dunes and acts as a windbreaker (Maheut and Dommergues, 1959; Cisse and Gourbiere, 1993). Their plantations produce high quantity of litter which is used as biofertilizer by farmer. Leaf litter is estimated to $3.3 \text{ t ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ for plantation between 6-34 years old (Mailly and Margolis, 1992). Extensively used in compost, the litter reduces the use of chemical products and involved in soil fertility enhancement. The addition of the litter compost to the sand soil improved vegetable growth and yield (Soumaré, 2004); similar positive effect was obtaining by adding the ramial chipped wood. The positive role of *C. equisetifolia* has previously showed by Diallo et al. (2005). Their authors have found a high content of N mineral in *C. equisetifolia* amendment soil and a net mineralization in a soil

firstly influenced by *C. equisetifolia*.

In this country *Casuarina* is not widely used for wood production but the dead branches are collected by the local populations for domestic uses such as firewood (Cisse and Gourbiere, 1993). In Senegal, *C. equisetifolia* can be found along the streets and beaches as ornamental tree.

Casuarina are established in Egypt to protect the desert highways. In this country, they are mostly used for their important ecological roles: crops protection, shelterbelt; irrigation stabilization, drainage canal banks, land reclamation and buildings protection (Rockwood, 1991). In the Nile Delta and Valley, *Casuarina* trees were established to provide shade, to limit the borders effects and to act as a windbreaker. *Casuarina* have also a considerable economical role in Egypt, it is used for fuel timber and charcoal production. Plants are extensively used in manufacturing particle boards; they provide wood for industries. Biomass productivity of 12-year-old irrigated plantations was estimated at 496 t/ha of which wood volume was 294 m³/ha (Megahed and El-Lakany, 1986). In Egypt, used as a shelterbelt in intercropping condition, *C. glauca* increase the yield of crops sheltered (El-Sayed et al. 1983).

In Benin, *C. equisetifolia* plantation plays an important role; it is used by local people as fuelwood and timber (Buffe, 1962). A ten years old *C. equisetifolia* plantation established near the sea produced around 200 stere/ha (Bøffe, 1961).

In Kenya, *Casuarina* has been grown mainly for poles and acts as ornamentals while firewood, charcoal and windbreak being minor uses. The major use of *Casuarina* is for local construction such as tourist hotels, villas and home Mbuvi (personal communication).

In South Africa, *Casuarina* is used for reclaiming mined land and rehabilitated the coastal dunes of KwaZulu-Natal. Two thirds of the area was revegetated with *C. equisetifolia* for the development of a local charcoal industry (Van Aarde et al. 1996a; 1996b).

In Madagascar, *C. equisetifolia* were planted in Ivoloina region for the production of improved seeds to be used in afforestation programs. *C. cunninghamiana* were established in Mahelia zone for the same purposes (Chaix and Ramamonjisoa, 2001).

Taken together, these data confirmed the ecological role of *Casuarina* in Africa. However, several studies showed that *Casuarina* growth is strong when they are associated with mycorrhizal fungi (Shah et al. 2006; He and Critchley, 2008; Elumalai and Raaman, 2009). The plant height, the biomass and the stem girth were higher with *Casuarina* plants inoculated compare to those not inoculated (Vasanthakrishna et al. 1995). Therefore, to sustainable *Casuarina* plantation and improve their yield it is important to understand the relationship

between this plant and the mycorrhiza fungi.

III Symbiotic relationship between *C. equisetifolia*, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and ectomycorrhizal (EMF)

Mycorrhizal infection of the endophyte depends on the habitat of the host, the prevailing environmental conditions and associated plant species.

The ability of Casuarinaceae trees to form ectomycorrhiza was more common with the genus *Allocasuarina* than the genus *Casuarina* (Thoen et al. 1990, Duponnois et al. 2003) however, the both symbionts ectomycorrhizal and endomycorrhizal can occur in the same plant host like *C. equisetifolia* (Bâ et al. 1987; Wang and Qiu, 2006).

1 *Casuarina equisetifolia* and arbuscular mycorrhizal fungi

Positive effect of *Casuarina* species is particularly influenced by their ability to form a symbiotic relationship with the arbuscular mycorrhizal fungi. AMF enhance plant growth (Smith and Read, 2008) by increasing nutrient available via the network hyphae which extensively involved in nutrient uptake. Experiment from Ducousso et al. (2001) revealed that AMF infection frequency and intensity depend on host site plantation. In Algeria desert, *C. equisetifolia* was found to be associated with endomycorrhizal fungi (Mejstřík and Cudlín, 1983). Several studies showed that endomycorrhizal fungi are more frequent and are generally found in *Casuarina* species growing in dry conditions (Subba-Rao and Rodriguez-Barrueco 1995; Smith and Read, 1997). Inoculation with AMF increase plant height, biomass and Pi content compared to uninoculated plants (Vasanthakrishna and Bagyaraj, 1993, Vasanthakrishna et al. 1994; 1995, Smith and Read, 2008). AMF induce a better *Casuarina* development (Sah et al. 2007, He and Critchley, 2008, Elumalai and Raaman, 2009, Zhong et al. 2010). Among 13 symbiotic fungi, *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum*, *G. versiforme* and *Acaulospora laevis* were evaluated to be the most effective AMF in association with *C. equisetifolia* (Vasanthakrishna and Bagyaraj, 1993; Vasanthakrishna et al. 1995).

Although inoculation with AMF increase plant growth, the better growth and development was obtained when plants were inoculated with both AMF and the actinomycete *Frankia*. Many studies have shown that the symbiotic relationship between actinorhizal plants and AMF enhances phosphorus uptake and improve nitrogen fixation by increasing the nodulation (Shah et al. 2007). It has been shown by Diem and Gautier, (1982) that inoculation with *G. mosseae* and crushed nodules containing the soil bacteria *Frankia* significantly improved plant growth and nodulation. In recent studies, Shah et al. (2007) showed that nodules, nodule dry

materials and nitrogenase activity were greatly increased in *C. equisetifolia* after inoculation with *G. fasciculatum*. Importance of AMF was also noted by Muthukumar and Udaiyan, (2010) who reported that seedlings inoculated with *Frankia* and *G. geosporum* had more, and heavier nodules compared to seedlings inoculated with *Frankia* alone. Dual inoculation enhanced the *Casuarina* growth more than single inoculation. However the effect of *G. fasciculatum* is greater than those of *Frankia* (Vasanthakrishna et al. 1994).

Arbuscular mycorrhizal association improves also the plant tolerance under stress environments; they confer a resistance to biotic and abiotic stresses to their host plants (Zhong et al. 2010). Limit tolerance to flooding was according to AMF infection (Rutto et al. 2002). *C. equisetifolia* mycorrhizal seedlings were better adapted to flooding condition than non inoculated seedling (Osundina, 1997). In the same experiment, the author showed that arbuscular mycorrhizal infection is essential for nodulation of *Casuarina* in flooded soils. AMF increase *C. equisetifolia* biomass by improving his drought tolerance (Zhang et al. 2010) despite limited effect of plant growth in drought conditions. This mechanism is possible by using a range of biochemical and physiological responses such as a lower permeability of plasma membrane induced by the AMF, a high soluble sugar and a strong P concentration for the plant. Moreover, AMF protect the host plant from pathogens (Dehne, 1982; Liu et al, 2007; Sayeed and Siddiqui, 2008). In association with *C. equisetifolia*, AMF can involved in mine reclaimed.

However, AMF colonization may be reduced in disturbances conditions (Brundrett, 1991) and a moderate AMF colonization level was obtained in naturally revegetated coal mine with *C. equisetifolia* (Kumar et al. 2003).

2 *Casuarina equisetifolia* and ectomycorrhizal fungi

In addition to the symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi, *Casuarina* species are generally associated to ectomycorrhizal fungi (Wang and Qiu, 2006). The ability to form ectomycorrhizal is more common with the genus *Allocasuarina* than with the genus *Casuarina* (Thoen et al. 1990; Duponnois et al. 2003). Infection of *Casuarina* plants with ectomycorrhizal fungi would also depend on the endophyte. It was observed by Theodorou and Reddell, (1991) that, *Amanita* sp. formed ectomycorrhiza on *A. littoralis* and *C. cunninghamiana* but not on *C. equisetifolia*. On *Casuarina*, some ectomycorrhizal fungi are unable to colonize the rhizosphere in glasshouse experiments while effective colonization was obtained with *Allocasuarina* and *Eucalyptus* using the same strains fungal (Dell et al. 1994; Duponnois et al. 2003). Sometime relationship between *Casuarina* and ectomycorrhizal not

succeded. Example, infection with *Scleroderma* induce the seedlings death (Dell et al. 1994). In another case, the missing of specific ectomycorrhizal structures was noted after infection (Duponnois et al. 2003, Elumanai et al. 2009). However, inoculation with ectomycorrhizal fungus increases the diameter and height of *C. equisetifolia* seedlings (Zhong et al. 2010). The same author showed that, the intensity of ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata* is higher with *C. equisetifolia* than with *C. cunninghamiana* (Theodourou and Reddel, 1991). Inoculation with ectomycorrhizal significantly increase shoot dry weight (Dell et al. 1994). The association between the ectomycorrhizal fungi and *C. equisetifolia* was higher under fields, a 100% distribution of these fungi was found while its distribution under *C. junghuhniana* plantation is only 80% (IFGTB/RP-25/2002-2007).

Dual inoculation ectomycorrhizal and *Frankia* improve plant development (Elumalai and Raaman, 2009). Ectomycorrhizal infections increase the plant biomass significantly when the seedlings were grown with *Frankia*. With the common mycorrhizal network (Selosse et al. 2006), inoculation with ectomycorrhiza could increase the biomass and the N accumulation in N₂-fixing *Casuarina* and in non N₂-fixing *Eucalyptus*. N accumulation was greatest in nodulated mycorrhizal *Casuarina*/mycorrhizal *Eucalyptus* pairs, less in nonnodulated mycorrhizal *Casuarina*/mycorrhizal *Eucalyptus* pairs, and least in nonnodulated nonmycorrhizal *Casuarina*/nonmycorrhizal *Eucalyptus* pairs (He et al. 2004).

It's well know that ectomycorrhizal fungi improve plant resistance to stresses (Smith and Read, 2008). Zhong et al. (2010) showed that the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus tinctorius* increase *Casuarina* salt tolerance. Their microorganisms increase plant resistance to pathogens by providing a physical barrier and preventing their access to the plant root (Marx, 1972; Duchesne et al. 1989; Duponnois et al. 2000; Claridge, 2002)

3 ° Interaction ectomycorrhizal and endomycorrhizal in *Casuarina* development

A tripartite relation between plants, EMF and AMF was already described with *Casuarina* species (Tableau 1) particularly in *C. cunninghamiana* and *C. equisetifolia* (Bâ et al. 1987; Wang and Qiu, 2006). Ectomycorrhizal are frequently associated with *Allocasuarina*, than *Casuarina* genera (Thoen et al. 1990; Duponnois et al. 2003). A total of 50% *Casuarina* plants species are associated with EMF, around 25% with AMF while 25 % of *Casuarina* species form both symbioses (Wang and Qiu, 2006). Colonization with ectomycorrhizal and endomycorrhizal not occur at the same moment, first establishment of endomycorrhizal fungi was related following by the colonization with ectomycorrhizal. However, ectomycorrhizal sheath act as barrier for endomycorrhizal infection and could promote the reduction of their

colonization while pre-existing colonization with AMF had no difficulty to EMF infection (Chilvers et al. 1987). Dual inoculation ectomycorrhiza and endomycorrhiza increase *Casuarina* development (Elumanai and Raaman, 2009). Under glasshouse conditions, a better plant height, collar diameter and biomass were found in *C. junghuhniana* plants with dual inoculation (IFGTB/RP-25/2002-2007). Triple inoculation ectomycorrhizal, endomycorrhizal and *Frankia* increase significantly colonization and infection; inoculation with these three microorganisms improve the shoot length and the root length (Elumalai and Raaman, 2009). Nevertheless antagonism effect was observed when both symbionts were inoculated and generally it results to high ectomycorrhizal colonization (Duponnois et al. 2003). Chen et al. (2000) showed that the presence of ectomycorrhizal fungi *Laccaria* can reduce the arbuscular mycorrhizal colonization.

IV ° Conclusion

This study illustrates *Casuarina* importance in Africa. Widely use as a windbreaker to stabilize moving soil, to reclaim saline and polluted soils, to produce fuelwood and timber, *Casuarina* acts also as ornamental tree along streets. It can be considered such as model for plants resistance to drought and saline Africa conditions. Among several plants species *Casuarina* is more adapted to disturbed soil in this area (Maheut and Dommergues, 1959). The strong adaption is particularly due to the tetrapartite relationship between *Casuarina*, endomycorrhizal and ectomycorrhizal fungi and the soil bacteria *Frankia*. However, to regulate *Casuarina* establishment and improve their production, limits such as pest would be overcome; example, avoid the escaping into natural area like the situation which happen in Florida where *C. equisetifolia* and *C. cunninghamiana* are became undesirable weeds (NRC, 1984). Also, the better understand of *Casuarina* allelopathic action induce by the needles fallen on the forest floor and formed thick layer (Mailly and Margolis, 1992) may give a lot of information about what prevent seeds germinating under *Casuarina* plantation. Up to now, little is know about released substances by needles which limit *Casuarina* regeneration by seeds even these substances reduce competition between others species.

Table 1: AM and EM able to form mycorrhiza in *Casuarinas* plants

AM fungal species	EM fungal species
<i>Acaulospora laevis</i> Gerdemann and Trappe	<i>Aminata</i> sp.
<i>Glomus albidum</i> Walker and Rhodes	<i>Elaphomyces</i> sp.
<i>G. claroideum</i> Schenck and Smith	
<i>G. clarum</i> Nicolson and Schenck	<i>Hysterangium</i> sp.
<i>G. fasciculatum</i> (Thaxter Sensus Gerdemann) Gerdemann and Trappe	<i>Laccaria laccate</i> (Scop ex Fr.) Bk. and Br.
<i>G. geosporum</i> (Nicolson and Gerdemann) Walker	<i>Paxillus involutus</i> (Batch ex Fr.) Fr
<i>G. intraradices</i> Schenck and Smith	<i>P. albus</i> IR100 Bougher and Smith
<i>G. macrocarpum</i> (Nicolson and Gerdemann) Gerdemann and Trappe	<i>Pisolithis tinctorius</i> (Pers.) Coker and Couch
<i>G. monosporum</i> Gerdemann and Trappe <i>Scleroderma</i> sp.	
<i>G. mossae</i> (Nicolson and Gerdemann) Gerdemann and Trappe	<i>Rhizopogon luteolus</i> Fr. and Nord
<i>G. rubiforme</i> (Gerdemann and Trappe) Almeida and Schenck	<i>Suillus granulatus</i> (L. ex Fr.) Kuntze
<i>G. versiforme</i> (Karsten) Berch	<i>S. piperatus</i> (Bull ex Fr.) O. Kuntze
<i>Gigaspora margarita</i>	<i>Scleroderma</i> sp.
<i>Scutellospora</i> sp.	<i>Thelephora terrestris</i> (Ehrh.) Fr.

Sources: In He and Critchley, 2008

V° References

V° References

- Bâ, A.M., Sougoufara, B., Thoen, D., 1987. The triple symbiosis of *Casuarina equisetifolia* in Senegal. In: Sylvia, D.M., Hung, L.L., Graham, J.H. (Eds.), *Mycorrhizae in the next decade*, Gainesville, USA, University of Florida, p. 121.
- Bisby, F.A., Roskov, Y.R., Ruggiero, M.A., Orrell, T.M., Paglinawan, L.E., Brewer, P.W., Bailly, N., van Hertum, J., 2007. Species 2000 and ITIS catalogue of life: 2007 annual checklist. Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2007/. Species 2000, Reading, UK.
- Brundrett, M.C., 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. In *Advances in Ecological Research* (Macfayden, A., Begon, M., Fitter, A. H., Eds); pp 71-313.
- Bøffe, J., 1961. Les plantations de *Casuarina equisetifolia* (filao) dans le Sud-Dahomey - Direction des Eaux et Forêts/CTFT: Expériences et travaux de reboisement forestier et de restauration des sols - Nogent-sur-Marne (France).
- Boland, D. J., Brooker, M.I.H., Chippendale. G.M., Hall. N., Hyland, B.P.M., Johnston, R.D., Kleinig, D.A., Turner, J.D., 1994. *Forest trees of Australia*. CSIRO, Melbourne, Australia.
- Buffe, J., 1962. Les plantations de *Casuarina equisetifolia* (Filao) dans le Sud-Dahomey. *Bois et Forêts des Tropiques*. 84: 13-20.
- Chaix, G., Ramamonjisoa, L., 2001. Seeds production for Madagascar Afforestation. *Bois et Forêts des Tropiques*. N 269.
- Chen, Y.L., Brundrett, M.C., Dell, B., 2000. Effects of ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone and in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. *New. Phytol.* 146: 545-556.
- Chilvers, G.A., Lapeyrie, F.F., Horan, D.P., 1987. Ectomycorrhizal Vs endomycorrhizal fungi within the same roots system. *New. Phytol.* 107: 441-448.
- Chudnoff, M., 1984. *Tropical Timbers of the World*. Agricultural Handbook 607. USDA Forest Service, Washington DC. 466 p.
- Cisse, M., Gourbière, F., 1993. Décomposition de la litière de Filao (*Casuarina equisetifolia* forst) au senegal. *Activité de la microfaune détritivore*. Dakar: ORSTOM 71p.
- Claridge, A.W., 2002. Ecological role of hypogeous ectomycorrhizal fungi in Australian forests and woodlands. *Plant. Soil.* 244: 291-305.
- Dell, B., Malajczuk, N., Bougher, N.L., Thomson, G., 1994. Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma* ectomycorrhizas formed in vivo with *Allocasuarina*, *Casuarina* and *Eucalyptus* Mycorrhiza. 5: 129-138.
- Dehne, H. W., 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathol.* 72: 1115-1982.

- Diem, H.G., Gautier, D., 1982. Effet de l'infection endomycorhizienne (*Glomus mosseae*) sur la nodulation et la croissance de *Casuarina equisetifolia*, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris) 294. (serie 3) 215-218.
- Dommergues, Y.R., Duhoux, E., Diem, H.G., 1999. Les arbres fixateurs d'azote : caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux ; avec référence particulière aux zones subhumides et arides. Garry F. collection, Cirad/Editions Espaces 34/FAO/IRD (eds.), Impression Dumas, St. Etienne, France. pp : 499.
- Duchesne, L.C., Ellis, B.E., Peterson, R.L., 1989. Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Puxillus incolutus* : contribution of oxalic acid. Can. J. Bot. 67: 2726-2730.
- Ducousso, M., Abourouh, M., Arahou, M., Tellal, M., Nourissier-Mountou, S., Dreyfus, B., Prin, Y., 2001. Mycorrhizal habit of *Casuarina cunninghamiana* and *C. glauca* in Central Morocco In : 12th International Meeting on Frankia and Actinorhizal Plants, 17-21 June 2001, Carry-le-Rouet.
- Duponnois, R., Founoune, H., Bâ, A.M., Plenchette, C., El jafaari, S., Nyera, M., Ducousso, M., 2000. Ectomycorhization of *Acacia holosericea* A. Cunn. ex G. Don by *Pisolithus* spp. in Senegal : effet on plant growth and on the roots- knot nematode *Meloidogyne javanica*. Ann. Sc. For. 57: 345-350.
- Duponnois, R., Diedhiou, S., Chotte, J.L., Sy, M.O., 2003. Relative importance of the endomycorrhizal and/or ectomycorrhizal associations in *Allocasuarina* and *Casuarina* genera. Can. J. Microbiol. 50: 691-696.
- El-Lakany, M.H., Turnbull, J.W., Brewbaker, J.L., 1990. Advances in *Casuarina* research and utilization. Proc. 2nd Internat. Casuarina Workshop, Jan. 15-20, Desert Development Ctr., Cairo, Egypt.
- El-Sayed, A.B., Omran, T.A., Khalil, A.E., 1983. Biomass characteristics of young *casuarina* plantations in northwestern region of Egypt. Alex. J. Agric. Res 31:411-422.
- Elumalai, S., Raaman, N., 2009. *In vitro* synthesis of *Frankia* and mycorrhiza with *Casuarina equisetifolia* and ultrastructure of root system. Indian, Journ. Exp. Biol. 47: 289-297.
- He, X.H., Critchley C., Ng, H., Bledsoe, C.S., 2004. Reciprocal N ($^{15}\text{NH}_4^+$ or $^{15}\text{NO}_3^-$) transfer between non-N₂-fixing *Eucalyptus maculate* and N₂-fixing *Casuarina cunninghamiana* linked by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. New. Phytol. 163:629-640.
- He, X.H., Critchley, C., 2008. *Frankia* Nodulation, Mycorrhization and Interactions Between *Frankia* and Mycorrhizal Fungi in *Casuarina* Plants. In: Mycorrhiza 3; Ajit Varma (eds); Springer Berlin chap VI ; (Biomedical and life Sciences). 767-781.
- Institute of Forest Genetics and Tree Breeding Coimbatore (Projet 8). Selection of potential mycorrhizas and other beneficial microbes for the reclamation of bauxite mine spoils [IFGTB/RP-10a/2002-2005]. Annual Report 2004-2005.

- Institute of Forest Genetics and Tree Breeding Coimbatore (Project 5): Studies on mycorrhizal fungi (biofertilizers) and their application in nursery and field [IFGTB/RP-25/2002-2007]. Annual Report 2004-2005.
- Kumar, A., Raghuwanshi, R., Upadhyay, R.S., 2003. Vesicular-arbuscular mycorrhizal association in naturally revegetated coal mine spoil. *Trop. Ecol.* 44: 253-256.
- Liu, J., Maldonado-Mendoza, I., Lopez-Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D., Harrison, M.J., 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J* 50: 529-544.
- Maheut, J., Dommergues, Y., 1959. La fixation par le reboisement des dunes de la presqu'île du Cap Vert et l'évolution biologique des sols. *Bois et Forêts Tropiques*. 63: 3-16.
- Mailly, D., Margolis, H. A., 1992. Forest floor and mineral soil development in *Casuarina equisetifolia* plantations on the coastal sand dunes of Senegal. *For. Ecol. Manage.* 55: 1-4.
- Marx, D.H., 1972. Ectomycorrhizae as Biological Deterrents to Pathogenic Root Infections. *Annu. Rev. Phytopathol.* 10: 429-454.
- Megahed, M.H., El-Lakany, M.H., 1986. Biomass characteristics of young *Casuarina* plantations in northwestern region of Egypt. *Alex. J. Agric. Res.* 31: 411-422.
- Mejstřík, V.K., Cudlín, P., 1983. Mycorrhiza in some plant desert species in Algeria. *Plant Soil* 71: 363-366
- Midgley, S.J., Turnbull, J.W., Johnston, R.D., 1983. *Casuarina*: ecology, management and utilisation. CSIRO Forest Research, Melbourne, Australia.
- Muthukumar, T., Udaiyan, K., 2010. Growth response and nutrient utilization of *Casuarina equisetifolia* seedlings inoculated with bioinoculants under tropical nursery conditions. *New. Forests* 40: 101-118.
- National Research Council 1984. *Casuarinas: nitrogen-fixing trees for adverse sites*. Office of International Affairs, Washington DC, USA.
- Osundina, M.A., 1997. Nodulation and growth of mycorrhizal *Casuarina equisetifolia* J.R and G. First in response to flooding. *Biol. Fertil. Soils.* 26: 95-99.
- Roy-Noel, J., 1974. Recherches sur l'écologie des Isoptères de la presqu'île du Cap-Vert (Sénégal). Introduction et première partie: le milieu. *Bulletin de l' J. F. A. N* 36, série. A: 291-378.
- Rockwood, D.L., 1991. Difficult Sites Are Home to *Casuarina*. *NFT Highlights*. NFTA 91-05, July 1991.

- Rutto, K.L., Mizutani, F., Kadoya, K., 2002. Effect of root-zone flooding on mycorrhizal and non-mycorrhizal peach (*Prunus persica* Batsch) seedlings. *Sci. Hort.* 94: 285-295.
- Shah, S.K., Shah, R.P., Xu, H.L., Aryal, U.K., 2006. Biofertilizers: An Alternative Source of Nutrients for Sustainable Production of Tree Crops. *J. Sustain. Agr.* 29: 85-95.
- Sayeed, M., Siddiqui, Z.A., 2008. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Potential Bioprotectants against Plant Pathogens. *Mycorrhizae: Sustainable. Agric. For.* 61-97.
- Selosse, M.A., Richard, F., He, X., Simard, S.W., 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends. Ecol. Evol.* 22: 621-628.
- Smith, S.E., Read, D.J., 1997. Mycorrhizal symbiosis (2nd eds.). Academic, San Diego, USA
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. Mycorrhizal symbiosis, Academic Press.
- Sougoufara, B., Danso, S.K.A., Diem, H.G., Dommergues, Y.R., 1990. Estimating N₂ fixation and N derived from soil by *Casuarina equisetifolia* using labelled ¹⁵N Fertilizer: Some problems and solutions. *Soil. Biol. Biochem.* 22: 695-701.
- Soumaré, M.D., Mnkeni, P.N.S., Khouma, M. 2004. Effects of Ramial Chipped Wood and Litter Compost of *Casuarina equisetifolia* Tomato Growth and Soil Properties in Niayes, Senegal. In Bationo, A., Managing Nutrient Cycles to Sustain Soil Fertility in Sub-Saharan Africa. Triscope consulting Publishers. 502pp.
- Subba-Rao, N.S., Rodriguez-Barrueco, C., 1995. *Casuarinas*. Science Publishers, Lebanon, N.H.
- Theodorou, C., Reddell, P., 1991. *In vitro* synthesis of ectomycorrhizas on *Casuarinaceae* with range of mycorrhizal fungi. *New. Phytol.* 118:279–288.
- Thoen, D., Sougoufara, B., Dommergues, Y., 1990. Invitro mycorrhization of *Casuarina* and *Allocasuarina* species by *Pisolithus* isolates. *Can. J. Bot.* 68: 2537–2542.
- Van Aarde, R.I., Coe, M., Niering, W.A., 1996a. On the rehabilitation of the coastal dunes of KwaZulu-Natal. *S. Afr. J. Sci.* 92: 122-124.
- Van Aarde, R.J., Ferreira, S.M., Kritzinger, J.J., van Dyk, P.J., Vogt, M., Wassenaar T.D., 1996b. An evaluation of habitat Rehabilitation on coastal dunes forest in northern Kwazulu-Natal, South Africa. *Restor. Ecol.* 4: 334-345.
- Vasanthakrishna, M., Bagyaraj, D.J., 1993. Selection of efficient VA mycorrhizal fungi for inoculating *Casuarina equisetifolia*. *Arid. Soil. Res. Rehabil.* 7:377–380.
- Vasanthakrishna, M., Bagyaraj, J.D., Nirmalnath, P.J., 1994. Responses of *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Glomus fasciculatum* and/or *Frankia*. *For. Ecol. Manag.* 68: 399-402.
- Vasanthakrishna, M., Bagyaraj, J.D., Nirmalnath, P.J., 1995. Selection of efficient VA mycorrhizal fungi for *Casuarina equisetifolia*- second screening. *New Forest.* 9: 157-

- Wang, B., Qiu, Y.L., 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299–363.
- Wilson, K.L., Johnson, L.A.S., 1989. *Casuarinaceae*. In: George AS (eds), *Flora of Australia*, vol 3 Hamamelidales to Casuarinales. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Zhang, Y., Zhong, C. L., Chen, Y., Chen, Z., Jiang, Q.B., Wu, C., Pinyopusarerk, K., 2010. Improving drought tolerance of *Casuarina equisetifolia* seedlings by arbuscular mycorrhizas under glasshouse conditions. *New Forests* DOI 10.1007/s11056-010-9198-8
- Zhong, C., Zhang, Y., Chen, Y., Jiang, Q., Chen, Z., Liang, J., Pinyopusarerk, K., Franche, C., Bogusz, D., 2010. *Casuarina* research and applications in China. *Symbiosis* 50: 107 - 114

Characterization of endomycorrhizal strains from *Casuarina equisetifolia* to be used for reforestation and rehabilitation of degraded ecosystems in Senegal

Nathalie Diagne^{*1,2,3}, Sergio Svistoonoff³, Claudine Franche³, Aboubacry Kane^{1,2},
Didier Bogusz³, Diegane Diouf^{1,2} and Robin Duponnois^{2,4}

¹ Département de Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop (UCAD), BP 5005, Dakar, Sénégal

² Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, Centre de Recherche de Bel Air, BP 1386, Dakar, Sénégal

³ Groupe Rhizogenèse, Unité mixte de Recherche Diversité et Adaptation des Plantes Cultivées (DIAPC), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911 avenue Agropolis, BP 5045, 34394 Montpellier, Cedex 5, France

⁴ Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM), TA10/J, IRD, UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/SUP-AGRO/UM2 34398 Campus International de Baillarguet, Montpellier, Cedex, France

*corresponding author email: nathalie.diagne@ird.fr

Abstract: In recent decades, the loss of ecosystem productivity has been accelerated in the Sahelian zone. This decrease is caused by human and natural effects, which result in deforestation and degradation of tropical lands. It has been demonstrated that fast-growing trees such as Australian species could promote the rehabilitation of degraded West African lands. Similarly, *Casuarina equisetifolia* an Australian native tree was established in Senegal. *Casuarina* plantation plays an important role in stabilizing coastal dunes, helping to protect adjacent agricultural areas by acting as a windbreak. *C. equisetifolia* develops nitrogen fixing nodules in association with the soil actinomycete *Frankia* and a mycorrhizal symbiosis in association with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). It has been previously demonstrated that actinorhizal and AMF symbiosis enhance *Casuarina* species development. The symbiotic relationship between AMF and *Casuarina* species improve phosphate and nitrogen uptake. Fungal symbionts significantly improve the development of *C. equisetifolia*. The aim of this study was to assess the effects of fungal strains collected in Australia the *C. equisetifolia* origin zone and strains collected in Senegal where *C. equisetifolia* was introduced. *C. equisetifolia* plants were inoculated with Senegalese, Australian strains and/or *Frankia*

bacteria *CcI3*. After growing in the greenhouse, plants were harvested and parameters like shoot and root biomass, and arbuscular mycorrhizal colonization were assessed. In parallel, we analysed the expression of marker genes encoding a mycorrhizal phosphate transporter, an hemoglobin gene, a marker gene involved in *Frankia* infection and a marker gene encoding the nitrogenase. We evaluated the activity of mycorrhiza using histochemical techniques. Our results showed that Senegalese strains have a positive effect on *C. equisetifolia* growth and this correlates with an increased expression of symbiotic marker genes and with increased metabolic activity. Our work will help to select the most efficient fungal strains to be used for the rehabilitation of Senegalese soils.

Key Words: *Casuarina equisetifolia*; Australian fungus; Senegalese fungus; histochemical marker; gene marker.

1 Introduction

In West Africa, ecosystem fertility decrease every year. The degradation of the ecosystem is generally due to natural and/or anthropological effects. To restore soil fertility in these areas, applications of chemical fertilizers are often used. However, these chemical products are expensive and not ecofriendly. An alternative strategy to increase soil fertility is the use of symbiotic fungi and bacteria. These microorganisms improve the plant growth by enhancing the uptake of nutrients and water. Several Australian trees were introduced in West Africa. They are characterized by their fast growth even on poor and disturbed soils. It has been demonstrated that Australian species could promote the rehabilitation of degraded ecosystems. In Senegal, *Casuarina equisetifolia* was established in the Niayes region through a reforestation program that began in 1948. This plantation is localized in the North littoral of Senegal between Dakar (West of Senegal) and St Louis (Nord of Senegal). It plays an important role in stabilizing coastal dunes, helping to protect adjacent agricultural areas by acting as a windbreak. The Niayes region production contributes to about 65 % of the national vegetable production (BA, 1991). The rehabilitation program of Sahelian zone was performed using tree species able to achieve a symbiotic relationship with mycorrhizal fungus and nitrogen-fixing bacteria. *C. equisetifolia* forms a symbiosis with: ectomycorrhizal (EM) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Our study was carried out with arbuscular mycorrhizal fungi, which are obligate biotrophs being unculturable in the absence of plants host (Declerck *et al.*, 2005). AMF symbiosis is a symbiotic relationship between the plant and the fungus of the Glomeromycota phylum (Schüssler *et al.*, 2001). This symbiosis is the most widespread and the oldest association dated back to the Devonian (Smith and Read, 2008).

AMF are associated with the roots of about 80 % plant species. As a result of this symbiosis, the fungi delivers inorganic phosphate (Pi), nitrogen and other micronutrients, in turn it receives carbohydrates from plant (Smith and Read 2008). AMF may consume up to 20 % of total net plant photosynthetic carbon (Jacobson and Rosendahl, 1990). In addition to their biological fertilizers role, AMF increase plants production and also confer resistance against abiotic and biotic stresses (Evelin *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Duponnois *et al.*, (2003) demonstrated that the inoculation of *Casuarina glauca* and *Allocasuarina verticillata* with *Glomus intraradices* increased plant shoot biomass respectively 1.8 and 2.6 times. *Casuarina* also forms a symbiotic relationship with the soil actinomycete *Frankia*. With their nitrogen-fixing ability *Casuarina* trees increase the nitrogen content in soil. Forrester *et al.* (2006) demonstrated that *Casuarina* contributes to N uptake and increases indirectly the amount of nitrogen available to non-fixing trees planted in mixed plantations. Similar results were obtained by Dommergues and Subba-Rao, (2000), who have shown that the total biomass of non Nitrogen-fixing *Eucalyptus robusta* was higher when planted with *C. equisetifolia* than when planted alone. In an attempt to restore degraded ecosystems in Senegal, *C. equisetifolia* was introduced in the Niayes region (Senegal).

The aim of this work is to study the effects of Australian and Senegalese fungal inoculation on *C. equisetifolia* growth and characterize the basis of differences obtained by using molecular and histochemical markers.

2 Material and methods

2.1 Plant, fungi and bacteria

Seeds of *C. equisetifolia* were collected in Notto Gouye Diama (North of Thies Senegal). Australian fungi were collected in Queensland under *Casuarina* plantation and Senegalese fungi were collected under Bel-Air *Casuarina* plantation (Dakar). Fungal inoculum was prepared by extracting spores from a three months maize trap. A sandy sterile soil was inoculated with the trap soil containing propagules. For the actinorhizal symbiosis, plants were inoculated with the *Frankia CcI3*. The experiment was carried out in greenhouse. After 6 months period, 8 plants for each treatment were harvested and parameters like growth shoot and root biomass and mycorrhizal colonization were assessed. Histochemical activities and molecular analyses were carried out with plant growing in greenhouse during 4 months using 3 pooled plants.

2.2 Histochemical activities

After harvested, viable mycorrhiza roots were gently washed with tap water. Three plants were pooled to evaluate the metabolic activity in mycorrhizal roots using histochemical techniques. All metabolically active AMF structures (Hyphae, vesicle, spores and arbuscules) were evaluated in roots by staining with Nitro Blue Tetrazolium (NBT) as described by Vierheilig *et al.*, (2001; 2005). In order to evaluate the senescence of mycorrhizal structures, roots were stained with the Diaminobenzidine (DAB) as described by Vierheilig *et al.*, (2001). The intensities of metabolically active AMF structures and clumped structures were assessed using Trouvelot method (Trouvelot *et al.*, 1986).

2.3 Expression of marker genes

Expression of molecular markers was used to compare the effect of Australian and Senegalese fungus using the half part of the 3 pooled plants and 3 replicates were carried out to analyse the expression of marker genes.

For each symbiosis, a marker gene was isolated. For the mycorrhizal symbiosis, we isolated the *CePT4* gene encoded a phosphate transporter specifically expressed in mycorrhizal roots. As markers of the actinorhizal symbiosis we isolated *Ce12*, an ortholog of *Cg12* a marker gene expressed specifically during *Frankia* infection (Svistoonoff *et al.*, 2003) and *CeHB* an ortholog of *CgHb*, a symbiotic hemoglobin gene expressed in nodules (Jacobsen-Lyon *et al.*, 1995). Finally, we used the *Frankia* gene *nifH* encoding the nitrogenase (Normand *et al.*, 2007).

As an internal control gene, we isolated a gene coding an ubiquitin which is expressed constitutively. After harvesting, plants material was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The total RNA of mycorrhizal and nodulated roots was extracted using the ultracentrifugation method based on sedimentation of RNA through the cesium chloride as described by Chirgwin *et al.*, (1979). RNA was purified using the Turbo DNase- free TM to remove contaminating genomic DNA (Udvardi *et al.*, 2008). The reverse transcriptase and the Real-Time PCR were carried out as described by Gherbi *et al.*, (2008). The results were standardized with *CeUbi* expression level (Hochoer *et al.*, 2006).

3 Results

Our results showed that inoculation with Australian and Senegalese fungal strains significantly stimulated *C. equisetifolia* growth and mycorrhizal colonization in greenhouse conditions. The histochemical studies carried out with the mycorrhizal roots to evaluate the

metabolic activity using enzyme such as succinate dehydrogenase (SDH) showed metabolically AMF structures active within roots. These observations are only possible when the roots were stained with the Nitro Blue Tetrazolium which reacts with the succinate dehydrogenase enzyme. Stronger metabolic activity in AMF was found within mycorrhizal plants roots inoculated with Senegalese fungi. Staining with the Diaminobenzidine allowed the visualization of clumped structures. A higher DAB activity was observed in roots which contained the lowest SDH metabolic activity AMF. In parallel, qPCR analysis showed an higher expression level of *CePT4* in plants inoculated with Senegalese fungi compared to those inoculated with Australian fungi. The expression of marker gene involved in actinorhizal symbiosis showed that expression of *Ce12*, *CeHB* and *nifH* marker genes involved in the actinorhizal symbiosis was up regulated in mycorrhizal roots inoculated with Australian fungus. Co inoculation with fungi and bacteria increased *Ce12* and *nifH* expression in roots.

4 Discussion

Our study showed that inoculation with mycorrhizal fungi increased *C. equisetifolia* growth. This effect could be attributed to the fungus strains which improve nutrient uptake and directly increase *Casuarina* growth (Seddas *et al.*, 2009). Our results showed that, the fungi inoculation increased the shoot biomass. Similar results were obtained by Rajendra *et al.*, (2004) who demonstrated that the inoculation with AMF increased the biomass and the growth of *C. equisetifolia*. This positive effect is probably due to the enhancement of shoot branching. The important branching could be attributed to an effectiveness of the mycorrhizal symbiosis which enhances the amount of nutrient uptakes by the fungus. It's well known that AMF with their phosphatase enzyme activities can enhance Pi availability for roots. Soluble Pi is directly absorbed and transported to the periarbuscular membrane by fungi before being released to the plant through a plant specific phosphate transporter.

The positive effect of fungal strains on *C. equisetifolia* development is also correlated with an increased metabolic activity in mycorrhizal roots staining with SDH. SDH is a tricarboxylic acid cycle enzyme present in AMF cycle and it reacts with the Nitro Blue Tetrazolium resulting in insoluble dark blue-purple formazan clearly distinguished in roots (Vierheilig *et al.*, 2005). Inoculation with Senegalese fungi showed the highest metabolic activity in roots; due to the presence of many viable arbuscules. It has been demonstrated that the amount of living arbuscules could reflect a surface area for nutrient exchange between living symbionts and symbiotic efficiency (Smith and Dickson, 1991). The efficiency of mycorrhizal symbiosis

in plants inoculated with Senegalese fungi is also probably linked with the low number of senescent structures within the roots. In opposite, a higher DAB activity was observed in plants inoculated with Australian fungi and Vierheilig *et al.*, (2001) demonstrated that their clumped structures are collapsed arbuscules detected through the presence of H_2O_2 . Alexander *et al.*, (1988); Blee and Ander-son, (1996) have demonstrated that H_2O_2 induction occurred in the later stages of arbuscule life cycle when they degenerate. These results could explain the basis of differences obtained between plants inoculated either with Senegalese or Australian strains. Our results also suggest that the inoculation with Australian fungi and *CcI3*, results in an earlier arbuscules development which would cause their rapid degeneration compared to plants inoculated only with Australian fungi.

Since *CePT4* encodes a symbiotic phosphate transporter, the higher *CePT4* expression in mycorrhizal roots inoculated with Senegalese fungi would results in a higher level of Pi which is linked to the effectiveness of mycorrhizal symbiosis. In *Medicago truncatula*, this phosphate transporter is localized in the periarbuscular membrane and its expression is probably coordinated to arbuscular development and degeneration (Harrison *et al.*, 2002, Pumplin and Harrison, 2009). It has been demonstrated that optimal Pi absorption occurs in mature arbuscules (Pumplin and Harrison, 2009). In *C. equisetifolia*, *CePT4* is also probably a marker of functional symbiosis and allows a continuous arbuscules development; Javot *et al.*, (2007) showed that without this mycorrhiza specific phosphate transporter, arbuscules die prematurely. Recent studies showed that, the arbuscule lifetime is influenced by their ability to deliver phosphate (Javot *et al.*, 2007). The mutation of *MtPT4* results in a premature degradation of arbuscules (Javot *et al.*, 2007) demonstrating a correlation between *MtPT4* expression and the metabolic activity in roots. The post regulation of *CePT4* expression obtained in mycorrhizal roots with Australian fungi, corresponding to a lower metabolic activity and a higher DAB activity within these roots may be related to a weaker effectiveness of the mycorrhizal symbiosis.

The expression levels of the molecular markers involved in actinorhizal symbiosis is higher in mycorrhizal roots inoculated with Australian fungus compared with roots inoculated with Senegalese fungi. Since the fungal inoculum was collected under *Casuarina* plantation, inoculum from Australia (the native region) may be associated with more efficient bacteria. The efficiency of these *Frankia* induce a better actinorhizal symbiosis development and hence increase the expression of molecular markers involved in this symbiosis like *Ce12*, *CeHb* and *NifH*.

Despite these positive effects, the best *C. equisetifolia* development occurred in plants

inoculated with Senegalese fungi. This result suggests that under the conditions tested the enhancement of the mycorrhizal symbiosis has a stronger effect on plant growth than the enhancement of the actinorhizal symbiosis.

5 Conclusion

Our results show that Senegalese fungi have higher positive effect on *C. equisetifolia* growth probably because these strains are already adapted to the local conditions. The marker genes isolated allow studying the molecular basis of growth enhancement by AMF or *Frankia*.

Acknowledgments

We would like to thank C. Ndiaye, C. Ouattara, D. Moukouanga, F. Auguy, V. Vaissayre, and J. Bonneau for help with plant care. This work was funded by the IRD and grants from Département Soutien et Formation des communautés scientifiques du Sud (DSF/IRD).

References

- Alexander T, Meier R, Toth R, Weber H C. 1988. Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol*, 110: 363-370.
- Ba Maty Diao. 1991. Les systèmes d'élevage dans la zone des Niayes. ISRA Etudes et Documents, Vol 4: 14.
- Blee K A, Anderson A J. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenk & Smith. *Plant Physiol*, 110: 675-688.
- Chirgwin J M, Przybyla A E, MacDonald R J and Rutter W J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem*, 18: 5294-5299.
- Declerck S, Strullu D G, Fortin J A. 2005. *In vitro* culture of mycorrhizas. In: Varma A (ed) *Soil biology*, Springer Berlin. vol 4, pp 388-400.
- Dommergues Y R and Subba-Rao N S. 2000. Introduction of N₂-fixing trees in non-N₂-fixing tropical plantations. In: Subba-Rao N S, Dommergues Y R (eds) *Microbial interactions in agriculture and forestry*, Science Publishers, Enfield, N.H, USA, pp 131-154.
- Duponnois R, Diedhiou S, Chotte J L and Sy M O. 2003. Relative importance of the endomycorrhizal and/or ectomycorrhizal associations in *Allocasuarina* and *Casuarina* genera. *Can J Microbiol*, 50: 691-696.

- Evelin H, Kapoori R and Giri B. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany*, 104: 1263-1280.
- Forrester D I, Bauhus J, Cowie A L and Vanclay J K. 2006. Mixed-species plantations of *Eucalyptus* with nitrogen-fixing trees: a review. *For Ecol Manage*, 233: 211-230.
- Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Peret B, Laplaze L, Franche C, Parniske M, Bogusz D. 2008. *SymRK* defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with AM fungi, *rhizobia* and *Frankia* bacteria. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 105: 4928-4932.
- Harrison M J, Dewbre G R, Liu J. 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*, 14: 2413-2429.
- Hocher V, Auguy F, Argout X, Laplaze L, Franche C and Bogusz D. 2006. Expressed sequence-tag analysis in *Casuarina glauca* actinorhizal nodule and root. *New Phytol*, 169: 681-688.
- Jacobsen I, Rosendahl L. 1990. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol*, 115: 77-83.
- Jacobsen-Lyon K, Jensen E O, Jørgensen J, Marcker K A, Peacock W J and Dennis E S. 1995. Symbiotic and Nonsymbiotic Hemoglobin Genes of *Casuarina glauca*. *The Plant cell*, 7: 213-223.
- Javot H, Penmetsa R V, Terzaghi N, Cook D R and Harrison M J. 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 1720-1725.
- Li R, Jiang Y, Xu J, Zhou B, Ma C, Liu C, Yang C, Xiao Y, Xu Q and Hao L. 2010. Synergistic Action of Exogenous Salicylic Acid and Arbuscular Mycorrhizal Fungus Colonization in *Avena nuda* Seedlings in Response to NO₂ Exposure. *Bull Environ Contam Toxicol*, 84: 96-100.
- Normand P, Lapierre P, Tisa L S, Gogarten J P, Alloisio N, Bagnarol E, Bassi C A, Berry A M, Bickhart D M, Choisine N, Couloux A, Cournoyer B, Cruveiller S, Daubin V, Demange N, Francino M P, Goltsman E, Huang Y, Kopp O R, Labarre L, Lapidus A, Lavire C, Marechal J, Martinez M, Mastrorunzio J E, Mullin B C, Niemann J, Pujic P, Rawnsley T, Rouy Z, Schenowitz C, Sellstedt A, Tavares F, Tomkins J P, Vallenet D, Valverde C, Wall L G, Wang Y, Medigue C and Benson D R. 2007. Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome research*, 17: 7-15.
- Pumplin N, Harrison M J. 2009. Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol*, 151: 809-819.
- Rajendra K and Devaraj P. 2004. Biomass and nutrient distribution and their return of *Casuarina equisetifolia* inoculated with bio-fertilizers in farm land. *Biomass and*

- Bioenergy, 26: 235-249.
- Schüßler A, Schwarzott D and Walker C. 2001. A new phylum, the Glomeromycota phylogeny and evolution. *Mycol Res*, 105: 1414-1421.
- Seddas P M A, Gianinazzi-Pearson V, Schoefs B, Küster H, and Wipf D. 2009. Communication and signaling in the plant-fungus symbiosis: The mycorrhiza. In: *Plant-Environment Interactions from Behavioral Perspective*. F. Baluska, ed. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 47-71.
- Smith S E, Dikson S. 1991. Quantification of active vesicular-arbuscular mycorrhizal infection using image analysis and other techniques. *Aust J Plant Physiol*, 18: 637-648.
- Smith S E and Read D J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*, Academic Press.
- Svistoonoff S, Laplaze L, Auguy F, Runions J, Duponnois R, Haseloff J, Franche C and Bogusz D. 2003. *Cg12* expression is specifically linked to infection of root hairs and cortical cells during *Casuarina glauca* and *Allocasuarina verticillata* actinorhizal nodule development. *Mol Plant Microbe Interact*, 16: 600-607.
- Trouvelot A, Kough J and Gianinazzi-Pearson V. 1986. Evaluation of VA infection levels in root systems. Research for estimation methods having a functional significance. In *Proceedings of the 1st ESM*. INRA Press, Paris, pp 217-221.
- Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi (Eds), *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. INRA-Press, Paris, pp. 217-221.
- Udvardi M K, Czechowski T and Scheible W. 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, 20: 1736-1737.
- Vierheilig H, Knoblauch M, Juergensen K, van Bel A, Grundler M W and Piche Y. 2001. Imaging arbuscular mycorrhizal structures in living roots of *Nicotiana tabacum* by light, epifluorescence and confocal laser scanning microscopy. *Can J Bot*, 79: 231-237.
- Vierheilig H, Schweigerb P and Brundrett M. 2005. An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiol Plant*, 125: 393-404.

Uvitex2B: a rapid and efficient stain for detection of arbuscular mycorrhizal fungi within plant roots

Nathalie Diagne · Jacques Escoute · Marc Lartaud · Jean Luc Verdeil ·
Claudine Franche · Aboubacry Kane · Didier Bogusz · Diegane Diouf ·
Robin Duponnois · Sergio Svistoonoff

Received: 17 June 2010 / Accepted: 20 December 2010
© Springer-Verlag 2011

Abstract The study of arbuscular mycorrhiza often requires the staining of fungal structures using specific dyes. Fluorescent dyes such as acid fuchsin and wheat germ agglutinin conjugates give excellent results, but these compounds are either hazardous or very expensive. Here, we show that a safer and inexpensive dye, Uvitex2B, can be efficiently used to stain intraradical fungal structures formed by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in three plant species:

carrot, *Casuarina equisetifolia*, and *Medicago truncatula*. The intensity and stability of Uvitex2B allow the acquisition of high-quality images using not only confocal laser scanning microscopy but also epifluorescence microscopy coupled with image deconvolution. Furthermore, we demonstrate that Uvitex2B and β -glucuronidase staining are compatible and can thus be used to reveal arbuscular mycorrhizal structures in the context of promoter activation analysis.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00572-010-0357-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Diagne · A. Kane · D. Diouf
Département de Biologie Végétale,
Université Cheikh Anta Diop (UCAD),
BP 5005, Dakar, Senegal

N. Diagne
e-mail: nathalie.diagne@ird.fr

A. Kane
e-mail: abou@refer.sn

D. Diouf
e-mail: diegane.diouf@ucad.edu.sn

N. Diagne · A. Kane · D. Diouf · R. Duponnois
Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD,
Centre de Recherche de Bel Air,
BP 1386, Dakar, Senegal

R. Duponnois
e-mail: robin.duponnois@ird.fr

N. Diagne · C. Franche · D. Bogusz · S. Svistoonoff (✉)
Groupe Rhizogénèse, Unité Mixte de Recherche Diversité et
Adaptation des Plantes Cultivées (DIAPC),
Institut de Recherche pour le Développement (IRD),
911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5,
France
e-mail: sergio.svistoonoff@ird.fr

C. Franche
e-mail: claudine.franche@ird.fr

D. Bogusz
e-mail: didier.bogusz@ird.fr

J. Escoute · M. Lartaud · J. L. Verdeil
Plateau d'Histocytologie et d'Imagerie Végétale, MRI/ CIRAD/
BIOS/UMR DAP,
Avenue Agropolis,
34398 Montpellier Cedex 5, France

J. Escoute
e-mail: jacques.escoute@cirad.fr

M. Lartaud
e-mail: lartaud@cirad.fr

J. L. Verdeil
e-mail: jean-luc.verdeil@cirad.fr

R. Duponnois
Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
(LSTM), TA10/J, IRD,
UMR 113 CIRAD/INRA/IRD/SUP-AGRO/UM2,
34398, Campus International de Baillarguet,
Montpellier Cedex 5, France

Keywords Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) · Uvitex2B · Confocal laser scanning microscopy (CLSM) · *ProMtEnod11::gus*

Introduction

Arbuscular mycorrhiza (AM) is a symbiotic association involving the vast majority of land plants and fungi from the phylum Glomeromycota. The development of the symbiosis leads to the colonization of the root cortex and, most of the time, to the formation of branched structures, the arbuscules, within the cortical cells. This extensive branching allows the development of a huge exchange surface between the plant and the fungal partners, allowing the transfer of minerals and water to the plant partner in exchange of sugars (Smith and Read 2008). Because the number, longevity, and morphology of arbuscules are linked to the functionality of the symbiosis (Smith and Read 2008), the evaluation of these parameters is an essential tool in AM research. Although AM can be detected in intact unstained roots in certain cases, the vast majority of studies performed on AM are based on the observation and quantification of stained material (Vierheilig et al. 2005). A variety of staining techniques are used to detect and quantify arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in roots (Vierheilig et al. 2005), the most widespread being trypan blue (Phillips and Hayman 1970), based on root clearing and subsequent staining with a trypan blue solution. A similar method using chlorazol black E is also often used to stain intraradical structures and allows the visualization of arbuscules with great detail (Brundrett et al. 1984). However, trypan blue and chlorazol black E are hazardous; both stains have been listed as carcinogens (IARC 1987; IARC 1999). A cheaper and nontoxic staining method giving excellent results is the use of ink/vinegar staining developed by Vierheilig et al. (1998). More recently, the observation of mycorrhizal structures was improved by the use of fluorescent dyes in combination with confocal laser scanning microscopy (CLSM), allowing the visualization of mycorrhizal structures at higher resolution without mechanical sectioning (Czymbek et al. 1994). With the exception of *Gigaspora gigantea*, which is strongly autofluorescent (Genre et al. 2008), a staining procedure is required to visualize most AM fungi. A commonly used technique is based on acid fuchsin, a red fluorescent dye, which binds to fungal structures. However, acid fuchsin also binds to root tissues, the staining procedure is time consuming, and in addition, it is a hazardous dye (Combes and Haveland-Smith 1982). A more specific method to detect AMF is based on wheat germ agglutinin (WGA), conjugated with a fluorophore. WGA is a lectin that specifically binds to chitin molecules

present in the fungal cell wall (Vierheilig et al. 2005). Because it yields high-contrast images of intraradical AM structures, this technique is particularly suited for the analysis of plant mutants that show alterations in AM development (Javot et al. 2007). However, WGA conjugates are relatively expensive and unstable dyes.

Here, we report the development of a cheaper and less toxic technique to visualize AM structures inside roots, based on Uvitex2B. Uvitex2B is a fluorescent brightener similar to calcofluor white; it is extensively used in the paper and textile industries to whiten and prevent “yellowing” of papers and fabrics. Uvitex2B binds to β -1-4-polysaccharides as those found in chitin and cellulose and produces an intense white–blue fluorescence when excited with UV light. These properties allow the rapid detection of a wide variety of parasitic fungi, making Uvitex2B staining a widely used technique in human clinical mycology and parasitology (Wachsmuth 1988). Uvitex2B has also been used with plants, mostly to detect pathogenic fungi (Fu et al. 2009; Moldenhauer et al. 2006) and, more recently, to study the colonization of poplar roots by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Felten et al. 2009). In all these studies, high-quality images were obtained in combination with CLSM, allowing the observation of fungal structures with great detail. Uvitex has already been used to stain extraradical AM fungi such as *Glomus coronatum* (Giovannetti et al. 1991), *Glomus mosseae* (Giovannetti et al. 1993), and *Glomus viscosum* (Walker et al. 1995), but the possibility to use this staining technique to visualize fungal structures inside the root is not mentioned. Here, we tested Uvitex2B on three plant species colonized by *Glomus intraradices*: two species frequently used on AM studies—the model legume *Medicago truncatula* and carrot (*Daucus carota*)—and, in addition, an actinorrhizal tree on which we are currently working, *Casuarina equisetifolia*. We show that the Uvitex2B staining can be used in combination with CLSM and that good-quality images can also be obtained with epifluorescence microscopy if a deconvolution algorithm is applied. Using transgenic *M. truncatula* plants expressing a β -glucuronidase (*gus*) gene in mycorrhiza, we also demonstrate that Uvitex2B and GUS staining are compatible.

Materials and methods

Plant material and AM inoculation

The starting cultures of *D. carota*/*G. intraradices* DAOM 197198 were provided by G. Bécard (Laboratory of Cell Surfaces and Plant Signalling, UMR CNRS-Paul Sabatier University, Toulouse, France). Carrot roots inoculated with *Glomus clarum* DAOM 234281 were kindly provided by Y.

Table 1 Assessment of optimal staining time of *C. equisetifolia*, *M. truncatula*, and carrot roots with Uvitex2B

Uvitex2B concentration (%)	Staining time (min)	AM staining	Background
0.005	5	–	–
	15	+	–
	30 ^a	++	–
	60	++	+
	120	++	+++
0.01	5	+	+
	15	++	+
	30	++	+
	60	++	+
	120	++	+++
0.05	5	++	++
	15	++	++
	30	++	++
	60	++	+++
	120	++	+++

^a indicates the best combination

Prin and Caroline Bournaud (Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Baillarguet, France). Seeds of *C. equisetifolia* were collected in Notto Gouye Diamo (Senegal). The *M. truncatula* transgenic line L416, containing the 2.3-kb 5' upstream region of the *MtEnod11* gene, fused to the β -glucuronidase (=ProMtEnod11::gus), described in Charron et al. (2004), was provided by D. Barker (Laboratory of Plant–Microbe Interactions, UMR INRA/CNRS (441/2594), Castanet Tolosan, France). *M. truncatula* and *C. equisetifolia* plantlets were grown from seeds and inoculated with *G. intraradices*, as described (Gherbi et al. 2008); roots were harvested at least 5 weeks after inoculation. Plants were grown in a culture chamber at 25°C, with an 18/6-h photoperiod. Carrot roots were grown in two-compartment plates and kept in the dark at 25°C, as described (Douds 2002). Roots were harvested from 3-month-old plates.

Staining procedures

Roots were gently washed with water and cleared with 10% KOH (w/v) at 90°C for 2 h (carrot and *M. truncatula*) or 12 h (*C. equisetifolia*). Uvitex2B was purchased from Polysciences Europe (Eppenheim, Germany). Staining with Uvitex2B was carried out at 90°C for 5 to 120 min, with aqueous solutions of Uvitex2B ranging from 0.005% to 0.05% (w/v). Roots were rinsed with water and incubated for 12 h in water to eliminate the excess Uvitex2B. Staining with trypan blue (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was performed in parallel, as described (Gherbi et al. 2008). Histochemical GUS assays using X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronic acid cyclohexylammonium salt; Duchefa Biochemie BV, The Netherlands) were

performed for 24 h at 37°C on *M. truncatula* roots, as described (Svistoonoff et al. 2004). Roots were fixed in an ethanol–acetic acid solution (1:1) for 12 h, then cleared and stained with Uvitex2B, as described above.

Microscopy

Roots were mounted in Hoyer's solution (chloral hydrate/gum arabic/glycerol/water [100:7.5:5:30]). For the establishment of the staining procedure, samples were observed using a DMRB microscope (Leica) using an A filter (excitation, 340–380 nm; stop, 425 nm; Leica). Images of roots stained for GUS activity were acquired with an MP5 cooled camera (Qimaging, Surrey, BC, Canada) and QcapturePro software (Qimaging). Confocal imaging was performed using a 510 META confocal microscope (Zeiss) and LSM 510 software with a Plan Apochromat $\times 63/1.4$ oil objective. Two independent acquisitions were performed, one at 405/420–480 (excitation/emission) for Uvitex2B and one at 488/530 LP for autofluorescence, with pinhole sizes of 102 and 100 μ m, respectively. High-quality epifluorescence imaging was carried out on a DM6000B microscope (Leica) equipped with a C4742-80-12AG ORCA–ER camera (Hamamatsu) with a $\times 63$ oil objective using Velocity 5 (Perkin–Elmer, Waltham, MA) software. Acquisitions were performed with an A4 filter (Leica) for DAPI (excitation BP, 360/40 nm/stop, 400 nm/emission BP, 470/40 nm) or I3 filter (Leica) for FITC (excitation BP, 470/40 nm/stop, 510 nm/emission LP, 515 nm). Image deconvolution was carried out with Velocity 5 software. An iterative restoration was performed (confidence limit, 99%; iteration limit, 25), using a calculated point spread function. Images were assembled using Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

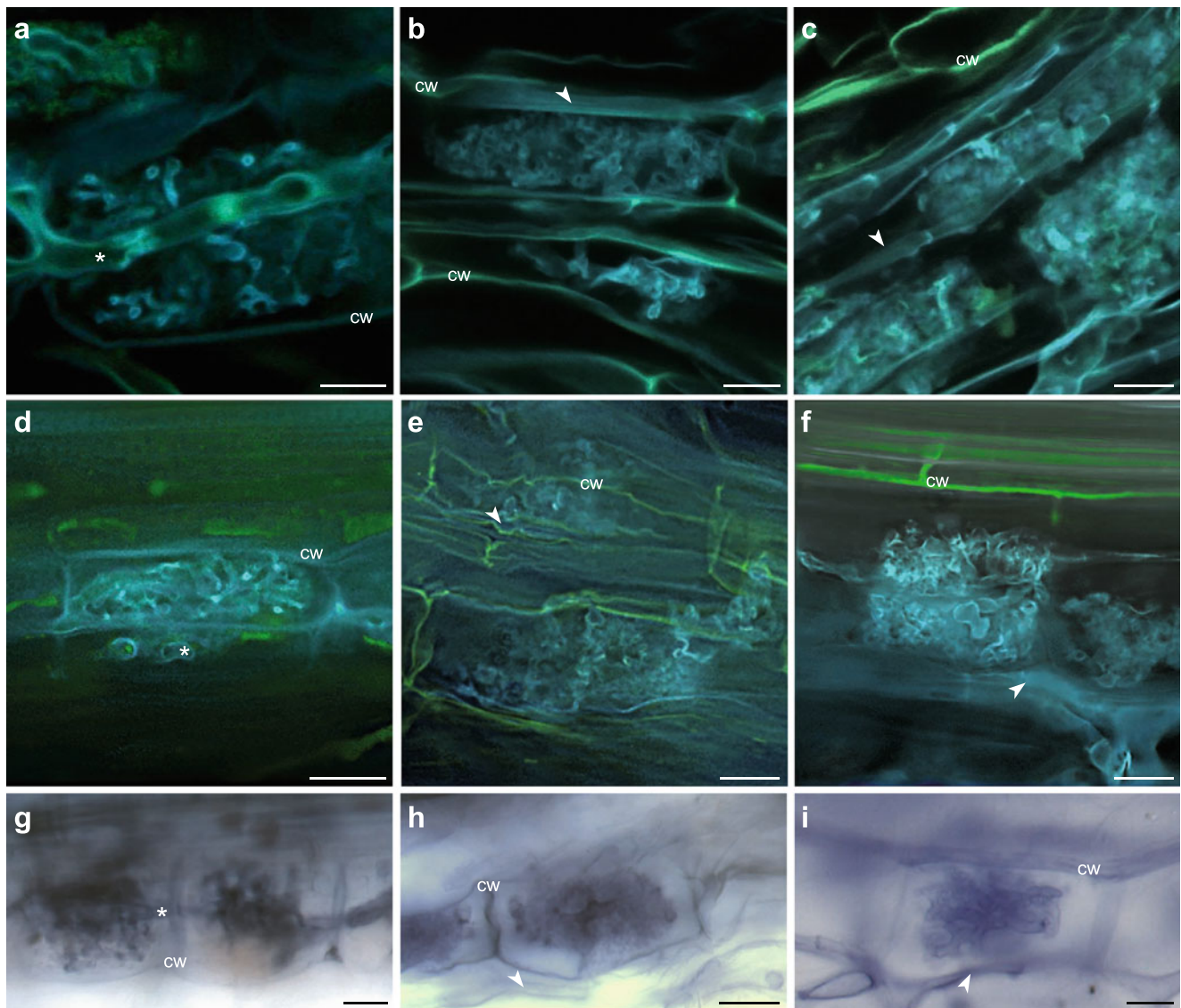


Fig. 1 Carrot, *C. equisetifolia*, and *M. truncatula* roots (first, second, and third columns, respectively) colonized by *G. intraradices*. **a–f** Images of roots stained with Uvitex2B, acquired using CLSM (**a–c**) or epifluorescence microscopy (**d–f**). Uvitex2B fluorescence acquired with the DAPI filter is shown in *blue*, and cell wall autofluorescence

acquired with the FITC filter is shown in *green*. Epifluorescence images were reconstructed from z series using a deconvolution algorithm. **g–i** Images of roots stained with trypan blue acquired with brightfield microscopy. *cw* cell wall, *asterisk* intracellular hyphae, *arrows* intercellular hyphae. Bar=10 μ m

Results

Optimization of AM staining using Uvitex2B

In order to evaluate the concentration and incubation time needed to obtain the best staining with Uvitex2B, cleared samples of carrot, *C. equisetifolia*, and *M. truncatula* were incubated for 5–120 min with different concentrations of Uvitex2B (Table 1). Although AM structures could be stained at all concentrations if samples were left for more than 15 min, increased concentrations or longer incubation times resulted in higher levels of background. The best compromise was obtained with 0.005% Uvitex2B for 30 min (arrow).

Imaging AM structures with CLSM

Carrot, *C. equisetifolia*, and *M. truncatula* roots inoculated with *G. intraradices* were stained with Uvitex2B, and CLSM images were acquired using a 405 diode to excite Uvitex2B (Fig. 1a–c). As shown in Fig. 1a–c, the combination of Uvitex2B staining with CLSM allowed the visualization of fungal structures with great detail and higher resolution, compared to the classic trypan blue staining (Fig. 1g–i). To visualize plant structures, a second image was acquired sequentially with a 488-nm argon laser. However, only in *C. equisetifolia* were the levels of autofluorescence high enough to allow a clear distinction

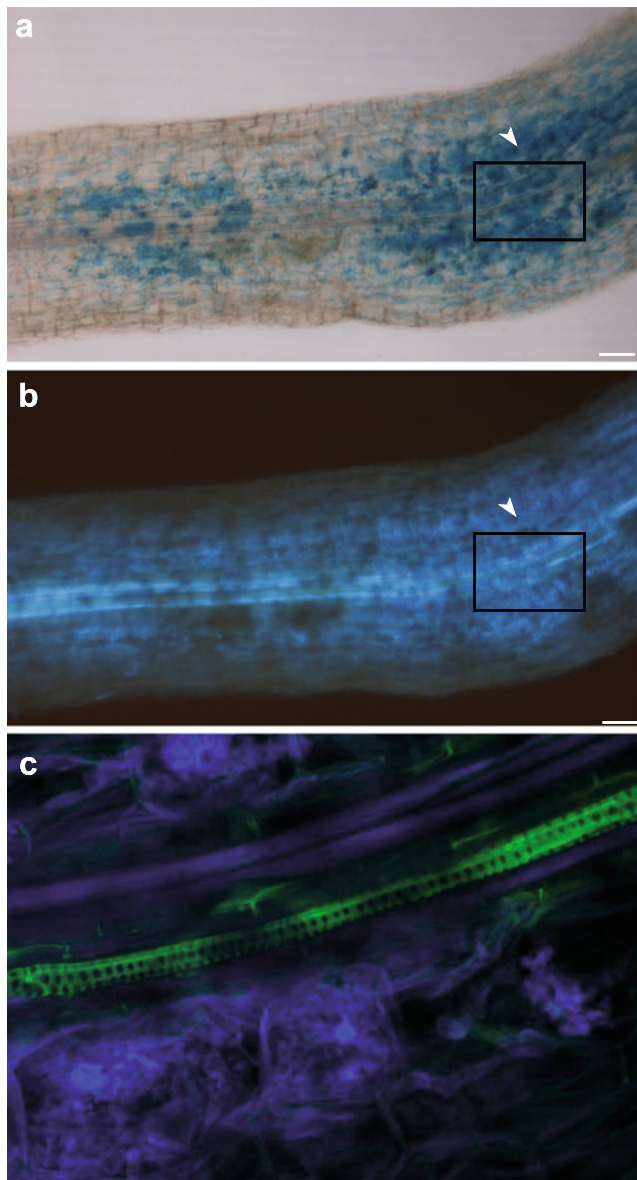


Fig. 2 Histochemical localization of β -glucuronidase activity in roots of *M. truncatula* transformed with a *MtEnod11::gus* fusion stained with Uvitex2B. **a** GUS activity observed with brightfield microscopy. **b** The same root observed with epifluorescence microscopy (DAPI filter). Fungal structures can be observed within the root in cortical cells. Autofluorescence is also detected in vascular tissues. A zone with strong GUS activity is indicated (arrow). **c** Image acquired using CLSM, showing a zone with high levels of GUS activity. **a**, **b** bar=100 μ m, **c** bar=10 μ m

of the plant cell walls (Fig. 1a–c). In all three species, a low level of blue autofluorescence was detected in plant cell walls. Similar results were obtained with carrot roots inoculated with *G. clarum* (data not shown).

In addition to high resolution, CLSM offers the possibility to explore fluorescent objects in three dimensions. This feature is particularly useful to analyze the colonization of the root cortex by AMF: depending on the plant and fungal

species, the colonization is mainly intercellular, and only arbuscules develop inside the cells (=Arum-type), or intracellular, with almost no intercellular filaments and coiled hyphae or small arbuscules arising from the intracellular hyphae (=Paris-type). In the carrot inoculated with *G. intraradices*, the sequential observation of the z series (Fig. S1a) allows the distinction of an intracellular pattern of colonization and the development of small arbuscules from the central intracellular hyphae, the features of a Paris-type mycorrhiza (Smith and Read 2008). In contrast, for *C. equisetifolia*, intercellular hyphae are very common; arbuscules fill the whole cell and are connected to the extracellular hyphae at their bases; those are typical features of an Arum-type mycorrhiza (Fig. S1b; Smith and Read 2008).

High-quality images can be obtained with epifluorescence

In order to evaluate an alternative method for obtaining good-quality images, z series of images were acquired with a motorized epifluorescence microscope and processed with a deconvolution algorithm. Deconvolution is a mathematical operation used in image restoration to recover an object from an image that is degraded by blurring and noise, using a point spread function (PSF). The PSF is a model of how one point is imaged by the microscope and is obtained through a theoretical calculation based on optical parameters such as the medium refraction index, the numerical aperture, and the wavelength of the emitted light. As shown in Fig. 1d–f, this technique yielded very good results, allowing the visualization of arbuscules with great detail, compared with nondeconvoluted images (Fig. S2).

Uvitex2B staining is compatible with GUS staining

A widely used technique to study gene expression patterns is based on the analysis of plants containing a promoter::gus fusion. To evaluate whether Uvitex2B staining is compatible with GUS staining, we used transgenic *M. truncatula* plants containing a *ProMtEnod11::gus* fusion. *MtEnod11* is a cell wall repetitive proline-rich protein from *M. truncatula* widely used as a marker of symbiotic interaction since it is highly expressed in the context of the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti* but also with AMF, during all stages of AM colonization (Chabaud et al. 2002). Roots colonized with *G. intraradices* were first stained with X-gluc to reveal GUS activity and, subsequently, with Uvitex2B. As shown in Fig. 2, GUS activity and intraradical fungal structures can be detected in the same root. The accumulation of X-gluc crystals is particularly high in the zone of the root where arbuscules are present. First staining with X-gluc does not seem to reduce the fluorescence of the following staining with Uvitex2B.

Discussion

Uvitex has already been used to stain several species of AMF, in particular, to visualize anastomosis of fungal filaments (*G. mosseae*; Giovannetti et al. 1993) and the cell wall of fungal spores in *G. viscosum* (Walker et al. 1995) and *G. coronatum* (Giovannetti et al. 1991). Here, we show that it can also be used to stain intraradical structures.

The main disadvantage of the Uvitex2B staining is the need to clear the root tissues to visualize intraradical AMF structures. Here, the clearing process was performed with KOH at 90°C, and incubation times ranging from 2 to 12 h were needed in order to obtain satisfactory results. As a consequence, the Uvitex2B technique can only be used to visualize fixed dead material. When long incubation times are required, another consequence is a deformation of root cells such as the one obtained for *C. equisetifolia* samples. Like for other AM-staining techniques, the best results are obtained when fine, relatively transparent roots are analyzed. Despite the above inconvenience, Uvitex2B offers a series of advantages compared to other staining methods:

1. It is a fluorophore, and can thus be used in combination with CLSM to obtain high-resolution images of internal structures, and its blue fluorescence offers an increased theoretical resolution compared to red fluorophores. In addition, it can be excited with the 405 diode, available in most modern CLSMs. Compared to WGA-based methods, Uvitex2B is less expensive but has the disadvantage of being less specific because Uvitex2B also binds to the plant cell wall. However, in roots of woody plants such as *C. equisetifolia*, it is usually very difficult to distinguish between the fluorescence of a specific dye such as WGA-488 and the strong autofluorescence of plant cell walls (N. Diagne, unpublished). The Uvitex2B method may therefore be particularly well suited for the observation of AM in species showing high levels of autofluorescence.
2. Uvitex2B fluorescence is very intense and fades less than other fluorochromes of the same family (Wachsmuth 1988). Very weak excitation is therefore needed, allowing the acquisition of multiple images of the same object and the construction of z series. A deconvolution algorithm is then sufficient to reduce noise considerably and obtain images of high resolution, comparable with CLSM.
3. Provided the samples are protected from light, Uvitex2B staining is stable; in our hands, it has not faded in over 12 months of storage at 25°C.
4. No carcinogenic effects or reproductive toxicity has been shown to date, according to the manufacturer's material safety data sheet. Diluted Uvitex2B solutions employed to stain AMF are therefore relatively safe, in

comparison with other dyes such as acid fuchsin or trypan blue, two possible carcinogens (Combes and Haveland-Smith 1982; IARC, 1987).

5. Uvitex2B is compatible with GUS staining; it can be used instead of WGA conjugates when high-quality images are required in combination with gene expression studies.

Acknowledgments We are grateful to G. Bécard for providing *G. intraradices* starting cultures and C. Bournaud for providing carrot roots colonized with *G. clarum*. We would like to thank D. Moukouanga, V. Vaissayre, and J. Bonneau for their help with plant care and histochemical staining. We also thank E. Duhoux and Y. Prin for their critical reading of the manuscript. This work was funded by the IRD and CIRAD and grants from the Département Soutien et Formation des Communautés Scientifiques du Sud (DSF/IRD).

References

- Brundrett MC, Piche Y, Peterson RL (1984) A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Can J Bot* 62:2128–2134
- Chabaud M, Venard C, Defaux-Petras A, Bécard G, Barker DG (2002) Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 156:265–273
- Charron D, Pingret J, Chabaud M, Journet E, Barker DG (2004) Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium* nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca²⁺ spiking and specific ENOD gene expression. *Plant Physiol* 136:3582–3593
- Combes RD, Haveland-Smith RB (1982) A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenyl-methane and xanthene dyes. *Mutat Res Rev Genet Toxicol* 98:101–243
- Czymmek KJ, Whallon JH, Klomparens KL (1994) Confocal microscopy in mycological research. *Exp Mycol* 18:275–293
- Douds DD (2002) Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. *Mycorrhiza* 12:163–167
- Felten J, Kohler A, Morin E, Bhalerao RP, Palme K, Martin F, Ditegou FA, Legue V (2009) The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiol* 151:1991–2005
- Fu D, Uauy C, Distelfeld A, Blechl A, Epstein L, Chen X, Sela H, Fahima T, Dubcovsky J (2009) A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323:1357–1360
- Genre A, Chabaud M, Faccio A, Barker DG, Bonfante P (2008) Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20:1407–1420
- Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Péret B, Laplace L, Franche C, Parniske M, Bogusz D (2008) *SymRK* defines a common genetic basis for plant root

- endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4928–4932
- Giovannetti M, Avio L, Salutini L (1991) Morphological, cytochemical, and ontogenetic characteristics of a new species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Can J Bot* 69:161–167
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citerinesi AS (1993) Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytol* 123:115–122
- IARC (1987) International Agency for Research on Cancer monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs, volumes 1 to 42, supplement 7
- IARC (1999) International Agency for Research on Cancer monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 29
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ (2007) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:1720–1725
- Moldenhauer J, Moerschbacher BM, Van der Westhuizen AJ (2006) Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici) development in resistant and susceptible wheat cultivars. *Plant Pathol* 55:469–474
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158–161
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, New York
- Svistoonoff S, Laplaze L, Liang J, Ribeiro A, Gouveia MC, Auguy F, Fevereiro P, Franche C, Bogusz D (2004) Infection related activation of the cg12 promoter is conserved between actinorhizal and legume-rhizobia root nodule symbiosis. *Plant Physiol* 136:3191–3197
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol* 64:5004–5007
- Vierheilig H, Schweiger P, Brundrett M (2005) An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiol Plant* 125:393–404
- Wachsmuth ED (1988) A comparison of the highly selective fluorescence staining of fungi in tissue sections with Uvitex 2B and Calcofluor White M2R. *Histochem J* 20:215–221
- Walker C, Giovannetti M, Avio L, Citerinesi AS, Nicolson TH (1995) A new fungal species forming arbuscular mycorrhizas: *Glomus viscosum*. *Mycol Res* 99:1500–1506

Nom et prénom : DIAGNE Nathalie

Titre de la thèse : Diversité, fonctionnement et incidence sur la symbiose actinorhizienne des champignons mycorhiziens associés aux *Casuarina equisetifolia* dans leur zone endémique et dans leur zone d'introduction

Résumé :

Depuis plusieurs décennies, des essences forestières à croissance rapide ont été introduites en Afrique de l'Ouest afin de réhabiliter des milieux dégradés, c'est le cas de *Casuarina equisetifolia*, un arbre australien introduit au Sénégal. Une technique utilisée pour améliorer la croissance des arbres plantés est l'inoculation avec des champignons mycorhiziens, généralement faite avec des souches présentes dans la zone d'introduction ou connues pour leur agressivité vis à vis de la plante hôte. Cependant, l'effet de l'inoculation est très variable selon la souche utilisée, et il n'existe aucune étude sur l'efficacité de l'inoculation avec des souches issues de la zone d'origine de l'arbre introduit. Or ces souches peuvent être potentiellement intéressantes car dans ce cas une co-évolution longue entre les deux partenaires symbiotiques peut aboutir à une optimisation de la symbiose. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'impact sur la croissance et sur la communauté bactérienne du sol des complexes microbiens (champignons arbusculaires et *Frankia*) associés à *C. equisetifolia* dans sa zone d'origine (Australie) et dans sa zone d'introduction (Sénégal) selon trois approches: (1) en étudiant la diversité des champignons endomycorhiziens et de la communauté microbienne associée aux *C. equisetifolia* dans leur zone d'origine et d'introduction, (2) en explorant l'impact de ces complexes symbiotiques sur la croissance de *C. equisetifolia* et la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes du sol (3) en caractérisant la fonctionnalité de la symbiose mycorhizienne et actinorhizienne chez *C. equisetifolia* inoculé avec un complexe microbien d'origine australienne ou sénégalaise. Nos résultats montrent que la composition de la communauté fongique et son impact sur la communauté bactérienne du sol est variable suivant les origines des sols, mais qu'une diversité accrue est observée pour les échantillons australiens. Nous avons aussi montré que l'inoculation a un effet positif sur la croissance de *C. equisetifolia* et modifie la diversité structurale et fonctionnelle de la communauté microbienne tellurique ; cet effet positif sur la croissance est plus marqué chez les plantes inoculées avec l'inoculum sénégalais, où le métabolisme est plus actif et le transport symbiotique de phosphate plus accru.

Mots clés : *Casuarina equisetifolia*, Mycorhizes à arbuscules, *Frankia*, Diversité, Communauté bactérienne

Name and first name: DIAGNE Nathalie

Thesis title: Diversity, functioning and impact on actinorhizal symbioses of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Casuarina equisetifolia* in its endemic region and in its introduction region

Summary:

In recent decades, fast-growing trees were introduced in West Africa to recover degraded lands; an example is *Casuarina equisetifolia*, an Australian tree widely planted in Senegal. In order to improve plant growth trees are often inoculated with mycorrhizal fungi but generally poor attention has been given to the strains, despite the fact that huge variations in the effect on plant growth promotion can be observed between different strains. Strikingly, no study comparing the effect of local strains with strains coming from the zone of origin of the introduced tree has ever been performed, although these could be potentially very interesting because a long co-evolution between the plant and its fungal partner may have taken place in the zone of origin resulting in an optimization of the symbiosis. In this work we focused on the impact of microbial complexes (arbuscular mycorrhiza and *Frankia*) associated with *C. equisetifolia* in its zone of origin (Australia) and in its zone of introduction (Senegal) following three approaches: (1) by studying the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and the microbial community associated with *C. equisetifolia* in its zone of origin and in its zone of introduction (2) by exploring the impact of a Senegalese or an Australian inoculum on the growth of *C. equisetifolia* and on the catabolic diversity of soil microbial communities (3) by characterizing the functionality of the mycorrhizal and actinorhizal symbioses performed by *C. equisetifolia* treated with the Australian or Senegalese inoculum. Our results show that the origin of the inocula has an impact on the composition of the microbial community, and that more diversity is found among Australian samples. We have also shown that regardless of its origin, the inoculum has a growth promoting effect, and provokes significant changes in the structural and functional diversity of soil microbial community. This growth promoting effect is increased in plants treated with Senegalese inoculum where a more active metabolism and an increased symbiotic phosphate transfer are also present.

Keys words: *Casuarina equisetifolia*, Arbuscular mycorrhizal, *Frankia*, Diversity, Bacteria community