

Biodiversité et variabilité génétique des Glomales associés à *Acacia albida* Del. au Sénégal

Tahir Abdoulaye Diop,
Microbiologiste

Philippe Simoneau,
Biologiste

Yolande Dalpé,
Mycologue/taxonomiste

Christian Plenchette,
Agronome

Désiré Georges Strullu,
Physiologiste

■ Introduction

Les mycorhizes vésiculaires arbusculaires (MVA) sont des associations symbiotiques entre les racines des plantes cultivées ou non et les filaments mycéliens des champignons Zygomycètes de l'ordre des Glomales. Les Glomales peuvent conquérir des sites écologiques très contrastés, allant des zones humides aux zones sèches, probablement à cause de leur biotrophie obligatoire. Cette association mutualiste permet, dans des conditions favorables de culture, un développement optimal des partenaires symbiotiques. Ainsi, la symbiose joue-t'elle un rôle important dans la restauration des sols dégradés, dans l'alimentation hydrique et la prophylaxie des plantes contre les agents pathogènes (Strullu *et al.*, 1991 ; Diop, 1996). Hétérotrophes, ces micro-organismes telluriques tirent de la plante hôte les ressources énergétiques et carbonées dont ils ont besoin pour accomplir leur cycle biologique (germination, croissance, reproduction.).

Dans les régions sahéliennes d'Afrique, les effets de la sécheresse et de la surexploitation des ressources végétales ont abouti à une fragilisation et à un appauvrissement des sols. La dégradation du couvert végétal pour des usages domestiques affecte les champignons arbusculaires. De plus, l'apport d'intrants chimiques dans une agriculture destinée à nourrir une population à forte croissance démographique se fait le plus souvent en l'absence d'étude d'impact sur les micro-organismes associés (Baylis, 1975). Il est pourtant admis que l'optimum de développement des champignons symbiotiques se situe dans les sols déficients en phosphore, azote, potassium, conditions caractéristiques des régions sahéliennes. Il est par conséquent important de prendre en considération les champignons mycorhiziens pour un meilleur équilibre des terres.

Au Sénégal, l'étude de la biodiversité des Glomales reste le parent pauvre de l'écologie microbienne. La valeur agronomique relative des isolats indigènes est inconnue. Les travaux sur la mycorhization ont longtemps été réalisés avec des Glomales d'origine tempérée. L'étude taxonomique est encore un goulot d'étranglement du fait de leur biotrophie obligatoire. Elle se fait sur des spores multinucléées qui se forment de manière asynchrone durant leur cycle de développement (Strullu *et al.*, 1997). Les critères taxonomiques en vigueur (couleur des spores ou sporocarpes, taille et nombre de membranes des spores, forme de rattachement de l'hyphe) discriminent plusieurs Zygomycètes symbiotiques. D'après Morton et Benny (1990), l'ordre des Glomales est subdivisé en deux sous-ordres, celui des *Glominae* (avec les familles des *Glomaceae* et des *Acaulosporaceae*) et celui des *Gigasporinae* (avec la famille des *Gigasporaceae*).

Le caractère symbiotique obligatoire des champignons MVA rend difficile leur identification par des critères uniquement morphologiques. En complément, des études de caractérisation moléculaire sont effectuées pour analyser la variabilité génétique des Glomales. Le principe de l'approche moléculaire de détection et d'identification est basé sur l'amplification *in vitro* de l'ADN de régions variables du génome. Parmi les régions utilisables en taxonomie moléculaire, l'unité de transcription des ARN ribosomiques est celle qui a retenu le plus l'attention des taxonomistes moléculaires. Cette unité de transcription, répétée de nombreuses fois dans le

génomique, est constituée par les gènes codant les ARN 18S, 25S et 5,8S et par une région ITS (internal transcribed spacer) transcrite éliminée lors de la maturation des ARN ribosomiques. Les régions ITS amplifiées présentent des polymorphismes de séquences permettant de détecter les variabilités génétiques des champignons, en particulier des champignons ectomycorhiziens (Gardes *et al.*, 1991 ; 1993 ; Henrion *et al.*, 1994). L'utilisation d'amorces universelles pour étudier le polymorphisme des régions ITS présente néanmoins un risque d'amplifications parasites, ce qui explique probablement le peu d'études moléculaires réalisées à ce jour pour cette région chez les champignons MVA. Des amorces spécifiques ont été surtout utilisées pour étudier une partie du génome de ces microsymbiotes (Simon *et al.*, 1992). Cependant, le taux de variabilité relativement faible de cette région peut être un obstacle pour une identification fine des champignons MVA à l'aide de techniques simples.

Dans cette étude, nous avons d'abord caractérisé morphologiquement les Glomales du Sénégal associés à *A. albida*, préservé la qualité de l'incoculum selon une méthode de culture continue monoxénique et finalement montré que, sous certaines conditions, l'amplification des régions ITS est un outil valable pour la caractérisation de champignons MVA cultivés *in vitro* et en serre.

Matériels et méthodes

Dynamique saisonnière des Glomales au Sénégal

La dynamique de la population de Glomales est étudiée en saison humide et sèche dans les parcs à *A. albida*. Des prélèvements de sols et de racines fraîches sont effectués dans deux localités de la zone sahélienne (Diokoul et Louga) et dans deux autres de la zone soudano-guinéenne (Djinaki et Kabrousse). Pour chaque site, la distribution horizontale est suivie grâce à des prélèvements à 2 mètres de la

rhizosphère de 15 arbres, et la distribution verticale grâce à des forages effectués à 10 m d'un arbre adulte. Le système racinaire pivotant de l'arbre descend jusqu'au niveau des nappes phréatiques situées entre 1,50 et 4,50 m dans les localités soudano-guinéennes et entre 16,50 et 35 m dans les sahéliennes. Le nombre total de spores pour 100 g de sol est évalué par comptage sous la loupe binoculaire après tamisage humide. La viabilité des spores est estimée en trempant les spores dans un colorant vital MTT, 3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényltétrazolium bromide, selon les conditions décrites par An et Hendrix (1988). Le degré de colonisation des racines d'acacia est évalué après éclaircissement au KOH à 90 °C pendant 1 heure et coloration au bleu trypan (Phillips et Hayman, 1970).

Culture et caractérisation morphologique des Glomales associés à A. albida

Les différents isolats MVA récoltés sont multipliés en serre en association avec des semis de poireau (*Allium porum* L.) et d'*A. albida*. La culture a été réalisée dans des pots en plastique contenant du "Terragreen" (Oil-Try Company, Chicago, USA) stérilisé (121 °C pendant 1 h). A la plantation, un engrais ("osmocote" : 18N/6P/12K) est ajouté dans chaque pot. Les semis sont arrosés avec de l'eau distillée. Le dispositif est placé en serre avec une photopériode de 16 h et une température de 24 °C. Au bout de 6 mois de culture, les racines des plantes hôtes sont bien colonisées par les différents isolats MVA (% d'infection supérieur à 50 % dans tous les pots). Les spores sont récoltées par tamisage humide (500 µm - 50 µm) et conservées au froid.

Des cultures monosporales des isolats MVA les plus représentatifs sont réalisées dans des petits godets (Somapo-Sopirec, Diemeringer, France) contenant du "Terragreen" stérile, le poireau constituant la plante piège. Les plantes sont cultivées en chambre de culture suivant les conditions suivantes : photopériode de 12 h avec une température de 27 °C le jour et 24 °C la nuit et une humidité relative de 70 %. Après 6 mois de culture, les spores sont récoltées par tamisage humide.

Les spores issues de cette culture monosporale sont caractérisées par les critères morphologiques. Sous le microscope, on mesure les

diamètres de cinquante spores, on note la couleur, l'épaisseur de la paroi, le nombre de couches qui forment la paroi, la dimension des hyphes suspenseurs, leur diamètre, leur mode d'attachement, l'épaisseur des parois de l'hyphes suspenseur, quelquefois les ornements des spores. Il est aussi utile d'observer des spores jeunes autant que matures pour arriver à détecter l'ensemble des parties qui forment la paroi totale. Le genre est déterminé à partir de ces données. Quant aux espèces, leurs clés d'identification sont pratiquement inexistantes. Une clé basée sur la morphologie pariétale (Dalpé *et al.*, en préparation) permet cependant de classer certaines d'entre elles. L'identification proprement dite se fait en consultant les descriptions originales des espèces MVA connues à ce jour et recensées par Berch (1988) et Schenk et Pérez (1990).

Constitution de collections in vitro de Glomales par culture continue

Les propagules (spores isolées, sporocarpes, formes intraracinaires des *Glomus* : vésicules isolées ou fragments de 0,5 cm de long issus de cultures monosporales) sont utilisées comme inoculum pour les cultures axéniques. La désinfection superficielle des propagules prélevées est réalisée suivant le protocole de Diop *et al.* (1994). L'extraction des vésicules se fait sous la hotte en dilacérant délicatement les cellules des fragments mycorrhiziens avec des aiguilles fines stériles. La germination des propagules, disposées sur des membranes de cellophane découpées et stériles, est réalisée sur des milieux gélosés (0,8 % Bacto-agar Difco) à l'obscurité et à 27 °C.

Les racines isolées transformées de carotte et non transformées de tomate sont utilisées comme partenaire végétal. L'entretien de ces racines se fait à l'obscurité par des subcultures régulières des parties apicales dans le milieu de Strullu et Romand (1986). L'établissement de la mycorhization se fait en inoculant de façon dirigée une propagule prégermée à côté d'une racine isolée d'environ 7 cm de long avec quelques ramifications latérales. La culture se fait dans des boîtes de Petri (9 cm de diamètre) contenant 40 ml de milieu SR modifié (Diop, 1995).

Caractérisation génétique des Glomales

Amplification enzymatique *in vitro*

L'utilisation de la PCR dans le domaine des mycorhizes MVA est récente, ce qui explique l'absence de conditions expérimentales standardisées. De plus, plusieurs auteurs ont mentionné la présence d'inhibiteurs de la Taq DNA polymérase dans les extraits de champignons MVA (Sanders *et al.*, 1995 ; Wyss et Bonfante, 1993). Nous avons, dans un premier temps, mis au point des conditions d'extraction permettant une bonne amplification des séquences d'ADN cibles. Les amorces utilisées dans cette étude sont complémentaires de régions de l'ADN génomique où sont situés les gènes codant les ARN ribosomiques (ARNr). Nous avons utilisé des amorces universelles ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) et des amorces spécifiques VANS1-NS21 (Simon *et al.*, 1992).

Des spores de champignons MVA, obtenues soit à partir des cultures monospores en serre [*Gigaspora margarita* 124; *Glomus caledonium* (122, 130 et 134), *Glomus mosseae* 120 et *Glomus aggregatum* 132, *Glomus* sp. 135], soit à partir des cultures axéniques en boîtes de Petri (*Glomus mosseae* FT SR 103, *Glomus caledonium* 113, *Glomus fasciculatum* FT SR 105), sont utilisées pour l'extraction d'ADN. Les spores provenant des cultures en conditions non axéniques subissent préalablement une désinfection superficielle. Elles sont placées dans des microtubes à centrifuger et mises en suspension dans une solution de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 7,2, EDTA 50 mM 3 %, SDS 50 mM 1 %, 2-mercaptoéthanol). Les suspensions de spores sont placées au four à micro-ondes pendant 30 secondes, puis à 80 °C pendant 10 minutes après dilution avec du tampon de lyse (Goodwin et Lee, 1993). Les extraits sont déprotéinisés par addition d'un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 : 24 : 1) puis l'ADN est précipité par 2 volumes d'éthanol en présence d'acétate de sodium et d'un "entraîneur" inerte. Après lavage, les culots d'ADN sont séchés, remis en suspension dans un tampon contenant du NaCl (100 mM), puis traités au 2-butoxyéthanol de façon à éliminer les contaminants polyphénoliques et polysaccharidiques (Manning, 1991).

Le milieu réactionnel (volume final de 50 μ l) contient l'ADN fongique, les amorces (80 pmol de chaque), des dNTP (200 μ M), du $MgCl_2$ (1,5 mM), un tampon permettant une activité maximale de l'enzyme (Tris HCl 75 mM pH9, $(NH_4)_2SO_4$ 20 mM, Tween 20 à 0,01 %) et de la Taq Polymérase. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur programmé : après une dénaturation initiale (95 °C, 3 min), 30 cycles de dénaturation (95 °C, 1 min 30 s)/hybridation des amorces (50 °C, 30s)/élongation (72 °C, 2 mn) sont effectués et suivis d'une élongation finale (72 °C, 15 mn). La taille et la pureté des fragments d'ADN amplifiés sont vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (1,2 %). La migration des échantillons s'effectue à 50 volts pendant 30 mn et les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière UV après coloration au bromure d'éthidium.

Analyse sélective et analyse des régions ITS

L'utilisation des régions produites *in vitro* n'étant pas toujours possible (souche ne sporulant pas ou peu *in vitro* par exemple), nous avons réalisé une amplification sélective en deux étapes de la région ITS des champignons MVA à partir de spores obtenues en serre. Pour cela, une première amplification MVA-spécifique a été réalisée en utilisant la paire d'amorces VANS1-ITS4. Ceci permet une amplification de l'ensemble du gène codant le petit ARN ribosomique ainsi que l'intégralité de la région ITS. La taille importante de l'amplifiat (supérieure à 2 kpb) impose une augmentation de la durée de l'étape d'élongation (4 mn) et une diminution du nombre de cycle (25). Une partie aliquote est ensuite réamplifiée à l'aide d'amorce ITS1-ITS4 dans des conditions standards. Afin de mettre en évidence un éventuel polymorphisme dans les séquences des régions ITS amplifiées, les produits d'amplification par ITS1-ITS4 obtenus à partir de différentes préparations d'ADN de spores MVA ont été digérés par des enzymes de restriction à coupure fréquente (*Hinf* I) dans les conditions optimales décrites par les fournisseurs. Les fragments de restriction obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose Nusieve (FMC Bioproducts) 3,5 % dans du TAE (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM) à 5 volts/cm pendant 5 heures (gel 20 x 20 cm) ou pendant 1 heure (gel 12 x 6 cm). La visualisation des fragments d'ADN est effectuée sous lumière UV après coloration au bromure d'éthidium.

Analyse d'une portion amplifiée de l'ARN 18S par formation d'hétéroduplex

Le couple d'amorces VANS1-NS21 offre la possibilité d'amplifier en une seule étape et de façon MVA-spécifique une partie du gène codant l'ARN 18S. A cet égard le choix de cette région semble s'imposer pour une identification simple et rapide des champignons MVA cultivés ou non en conditions axéniques. Toutefois, à la vue des séquences actuellement disponibles dans les banques de données, il apparaît que le degré de variabilité de la région amplifiée est très faible. De ce fait, une simple comparaison de profils de restriction ne permet pas une distinction non ambiguë des différentes espèces MVA. Pour pallier cet inconvénient, nous avons analysé les variations de séquence de la région amplifiée par VANS1-NS21 par la technique des hétéroduplex (Delwart *et al.*, 1993). Pour cela, les amplifiats obtenus à partir des différents extraits de spores sont mélangés deux à deux et ajustés à 100 mM en NaCl. Après une dénaturation (98 °C, 3 mn), les ADN sont placés à 4 °C pendant une heure puis les homo- et hétéroduplex formés sont séparés par électrophorèse en condition non dénaturante dans un gel de polyacrylamide 5 % (acrylamide : bisacrylamide, 28 : 2). Pour faciliter la comparaison entre les différentes séquences, il est préférable de réaliser les confrontations entre des séquences équivalentes présentant un pourcentage d'homologie inférieur à 98 %. Les confrontations sont donc réalisées de préférence en mélangeant l'amplifiat obtenu pour une souche de *Glomus* à tester avec celui provenant de *Gi. margarita* 124.

Résultats et discussion

Statut mycorhizien de l'Acacia albida

Cette étude montre que les racines de l'*A. albida* sont associées à différentes espèces de champignons MVA dans les zones sahélienne et soudano-guinéenne du Sénégal. Cette association se manifeste depuis les horizons superficiels des sols jusqu'au niveau des nappes

phréatiques. Aussi bien en surface qu'en profondeur, les Glomales des genres *Glomus* et *Gigaspora* sont prépondérants. Le potentiel mycorhizien (nombre et viabilité des spores, infection des racines) est présent aux stades jeune et adulte de l'arbre, indépendamment des saisons et des caractéristiques pédologiques des sols. Les localités de la zone soudano-guinéenne (Djinaki et Kabrousse) ont plus de propagules mycorhiziennes que celles de la zone sahélienne (Louga et Diokoul). Les nombres des spores collectées et viables sont plus importants pendant la saison des pluies que pendant la saison sèche (environ 108 % de plus pour le nombre total de spores et 262 % de plus de spores viables). En outre, ces propagules sont plus nombreuses dans la rhizosphère des jeunes acacias que dans celle des acacias âgés. Dans les horizons de sols profonds, les spores diminuent en nombre mais présentent un taux de viabilité élevé. La diminution des propagules MVA en profondeur est liée en grande partie à la moindre quantité de matière organique. Les coupes histologiques des racines colorées montrent la présence de structures caractéristiques des Glomales. Dans chaque zone écoclimatique, les pourcentages de colonisation racinaire sont similaires et dépassent 50 % des racines observées. Différentes espèces de champignons MVA appartenant à l'ordre des Glomales (Morton et Benny, 1990) ont été identifiées. Le tableau 1 présente la collection de souches entretenues *in vivo*.

Culture continue des Glomales d'Acacia albida

Glomus mosseae

La coculture *in vitro* d'une vésicule isolée de *G. mosseae* d'une racine transformée de carotte aboutit à une importante production de champignon. L'inoculum mère (vésicule) émet en général 2 à 5 hyphes de germination qui s'orientent souvent dans la même direction que la racine, puis se développent des hyphes secondaires plus fins d'orientation quelconque. A partir d'un mois de culture, un mycélium dense non septé couvre toute la gélose et le nombre de spores produites peut dépasser plus de 6000 dans certaines boîtes de Petri. Les spores apparaissent isolées ou groupées le long des hyphes. Des paquets de 30 à 50 spores sont régulièrement produits

Champignons MVA	Caractéristiques	Localisation		Référence
<i>Glomus mosseae</i>	Sporocarpes contenant 10-20 spores entourées d'un périidium jaune et épais. Spores dorées à foncées ou jaune pales.	Diokoul	0,15 m	120
		Kabrousse	1,50 m	126
<i>Glomus caledonium</i>	Spores isolées et sporocarpes en majorité. Sporocarpes formées de 10-25 spores entourées d'un périidium cotonneux blanchâtre. Spores à paroi externe nettement hyaline facilement séparable de la paroi principale.	Diokoul	16,50 m	121
		Djinaki	0,15 m	127
		Louga	0,15 m	130
		Djinaki	4,50 m	129
<i>Glomus fasciculatum</i>	Spores isolées reliées par des filaments jaune doré. Trois parois dont l'intérieur membranaire détectable sous coloration au Melzer.	Louga	0,15 m	123
		Louga	34 m	133
<i>Glomus aggregatum</i>	Spores isolées rattachées par un filament, jaune pales à dorées, souvent difformes, tuberculeuses.	Kabrousse	0,15 m	125
		Djinaki	4,50 m	128, 131
		Louga	0,15 m	132
<i>Glomus</i> sp.		Diokoul	0,15 m	135
<i>Gigaspora margarita</i>	Grosses spores isolées colorées en rose par une contamination bactérienne n'entraînant pas de baisse de viabilité.	Louga	34 m	124

Tableau 1

Fiche descriptive et localisation des champignons MVA du Sahel mis en collection *in vivo*.

dans les thalles du champignon. Sous la loupe binoculaire, les contacts racinaires (appressorium) et les vésicules intraracinaires sont facilement visibles alors que la détection des arbuscules n'est possible qu'après coloration des racines. Les subcultures à partir des spores et fragments de mycorhizes obtenus *in vitro* montrent un développement identique à celui de la culture de *G. mosseae*. Certains thalles isolés ont une capacité de croissance et produisent des hyphes mycéliennes comparables à ceux issus d'une vésicule isolée, mais la production de spores néoformées a été relativement faible et ne dépassait pas une centaine après 3 mois de culture.

Glomus fasciculatum

Le nombre moyen d'hyphes de germination d'une vésicule de *G. fasciculatum* est identique à celui d'une vésicule de *G. mosseae*. Les cultures réalisées en présence de racines isolées transformées

de carotte et non transformées de tomate donnent une production similaire de champignon. Les hyphes fongiques, de 4 à 6 μm de diamètre, produisent des thalles en grand nombre, environ une trentaine de ces structures fongiques sont constituées au bout de 3 jours de culture. La production des spores se fait préférentiellement dans les thalles du champignon avec une densité de plus de 100 spores par thalle, ce qui conduit à la formation de près de 10 000 spores dans une boîte de Petri après 3 mois de culture. L'importance de la production de spores matures réduit les délais de subcultures du champignon. Ainsi, des subcultures réalisées à partir des spores néoformées de 3 semaines, transmettent la mycorhization à cent pour cent, le champignon développe les mêmes structures que celles observées dans les premières cultures.

Glomus caledonium

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

Glomus aggregatum

Un fragment racinaire de poireau colonisé par *G. aggregatum* permet la multiplication *in vitro* du champignon en association avec des racines isolées de tomate. Les hyphes rectilignes originaires en grande partie des vésicules internes, riches en lipides, se développent au hasard sur la gélose qu'elles couvrent complètement au bout d'un mois de culture. Cependant, ce développement extensif du mycélium s'accompagne d'un nombre réduit de thalles qui apparaissent généralement après 6 semaines de culture. Des spores isolées de 30 à 80 μm de diamètre se forment en majorité le long de grêles hyphes secondaires. En moyenne, près de 700 spores sont produites à la surface et dans la gélose après 3 mois de culture. Des

condensations d'hyphes sont visibles parfois par grappes à l'extrémité des parties mortes du partenaire végétal et attestent du mode de vie saprophytique de *G. aggregatum*. Au microscope inversé, quelques vésicules intraracinaires sont visibles et les racines colorées montrent une dominance de structures arbusculaires. Les subcultures réalisées à partir de fragments de mycorhizes conservent le même développement mycélien que la culture du champignon, mais la sporulation est plus tardive.

Gigaspora margarita

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

Par des subcultures, en utilisant soit des spores matures, soit des fragments mycorhiziens produits en conditions axéniques, on arrive à constituer une collection de souches MVA. Le tableau 2 résume les différents isolats MVA produits par ces méthodes de culture et maintenus dans la collection "Forme Intraracinaire *In Vitro* d'Arbusculo-Mycorhizes (FINTRAVAM)". Cette collection est actuellement maintenue en boîtes de Petri.

Analyse PCR

Des résultats positifs n'ont été obtenus que sur les extraits d'ADN purifiés par un traitement au 2-butoxyéthanol. Après ce traitement, l'amplification en présence des amorces ITS1-ITS4 se traduit par la présence de 2 bandes à 580 pb et 600- 630 pb lorsque l'ADN est extrait à partir des spores récoltées en serre (fig. 1A), alors que seule la bande 580 pb est visible lorsque des spores MVA produites *in*

Espèce	Référence	Origine	Inoculum mère	Particularités
<i>Glomus mosseae</i>	FT SR 103	Kabrousse 1,50 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>Glomus mosseae</i>	FT SR 104	Diokoul 0,15 m	Forme intraracinaire	Culture
<i>Glomus fasciculatum</i>	FT SR 105	Louga 0,15 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>Glomus fasciculatum</i>	FT SR 106	Louga 34 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>Glomus aggregatum</i>	FT SR 107	Louga 0,15 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>Glomus aggregatum</i>	FT SR 108	Djinaki 4,50 m	Forme intraracinaire	Culture et subcultures
<i>Glomus caledonium</i>	110	Kabrousse 0,15 m	Spores	Culture
<i>Glomus caledonium</i>	111	Djinaki 4,50 m	Spores	Culture
<i>Glomus caledonium</i>	112	Louga 0,15 m	Spores	Culture
<i>Glomus caledonium</i>	113	Diokoul 16,50 m	Spores	Culture
<i>Gigaspora margarita</i>	109	Louga 34 m	Spores	Culture

Tableau 2

Principales souches MVA mises en collection *in vitro*.

in vitro sont utilisées (fig. 1B). La taille des régions ITS amplifiées à partir des spores MVA est en accord avec les résultats obtenus dans la littérature pour des génomes végétaux ou fongiques (Gardes et Bruns, 1993; Henrion *et al.*, 1994). Toutefois, généralement, un seul produit d'amplification est obtenu pour les régions ITS avec la plupart des champignons ou végétaux testés. Les résultats obtenus avec les spores produites axéniquement semblent montrer que les amplifiats de taille supérieure à 600 pb proviennent d'un contaminant. L'amplification en présence de VANS1-NS21 génère à chaque fois une bande de 550 pb environ (résultat non présenté) comme cela était attendu (Simon *et al.*, 1992).

Analyse des produits d'amplification par l'endonucléase Hinf 1

Pour l'ensemble des extraits testés, cette méthode de double amplification permet l'obtention d'une seule bande à environ 580 pb pour les champignons du genre *Glomus* et à 500 pb pour *Gigaspora* (fig. 2). L'analyse des produits de digestion obtenus par l'endonu-

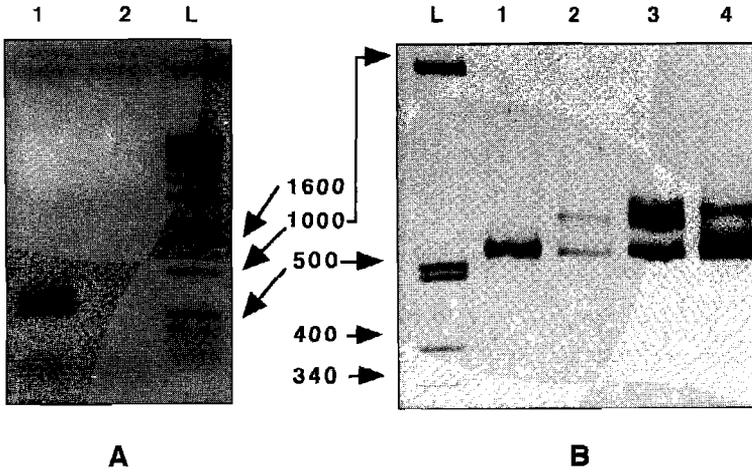


Figure 1

Amplification avec les amorces ITS 1 et ITS 4.

A - ADN extrait à partir d'une suspension de spores de *Glomus sp.* purifiée (piste 1) ou non (piste 2) par le 2-butoxyéthanol, et amplifié par les amorces ITS1 et ITS4. Analyse sur gel d'agarose 1,2 %.

B - ADN extrait à partir de spores obtenues *in vitro* (piste 1) ou en serre (pistes 2 à 4) et amplifié par les amorces ITS1 et ITS4. Analyse sur gel Nusieve 3,5 %. Pistes L : échelle de taille ; les tailles des principaux marqueurs sont indiquées en pb.

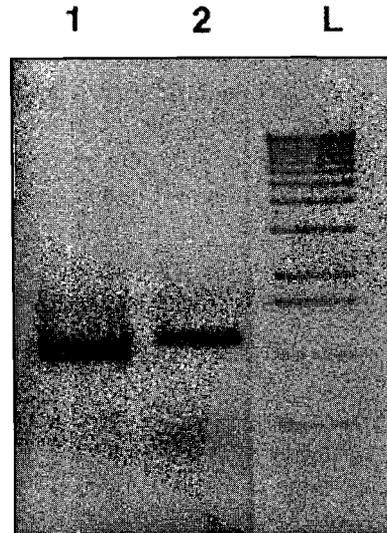


Figure 2

Amplification sélective de la région ITS.

ADN extrait à partir de *Gigaspora margarita* 124 (piste 1) ou de *Glomus sp.* (piste 2) et amplifié en deux étapes par les amorces VANS1 et ITS4. Analyse sur gel d'agarose 1,2 %.

Piste L : échelle de taille.

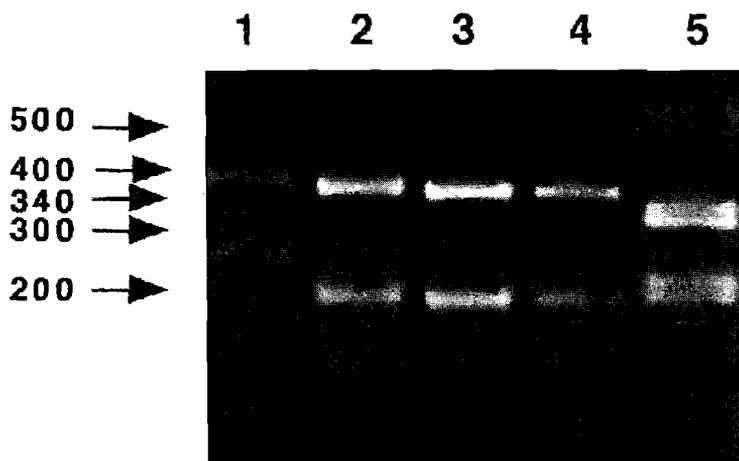


Figure 3

Profil de restriction *Hinf I* de la région ITS de quelques champignons MVA.

Les régions ITS amplifiées spécifiquement à partir de *Glomus caledonium* R11.1 (piste 1), *G. caledonium* M2.1 (piste 2), *G. mosseae* 120 (piste 3), *G. mosseae* FT SR 103 (piste 4) ou *Gigaspora margarita* 124 (piste 5) ont été digérées par *Hinf I*, puis analysées sur gel Nusieve 3,5 %. Les tailles des principaux marqueurs de l'échelle sont indiquées en pb.

cléase *Hinf I* (fig. 3) montre que les deux isolats de *G. mosseae* testés (120 et FT SR 103) donnent des profils identiques, avec deux bandes à environ 340 pb et 180 pb. L'isolat *G. caledonium* 134 génère par contre un profil différent avec deux bandes à environ 360 pb et 220 pb. Ces résultats sont en accord avec ceux de Sanders *et al.* (1995). L'analyse par l'enzyme *Hinf I* de la région ITS amplifiée à partir de l'isolat 122 de *G. caledonium* semble indiquer que cet isolat appartient en fait à l'espèce *G. mosseae*. En effet, ainsi que le suggèrent Sanders *et al.* (1995), la diversité observée dans la région ITS des champignons MVA semble représentative de leur diversité interspécifique plutôt que de leur diversité intraspécifique. Les produits de restriction de l'amplifiat obtenu à partir de *Gi. margarita* 124 présentent 4 bandes dont les tailles sont respectivement : 310 pb, 300 pb, 200 pb et 190 pb. Il est probable que ces différents produits proviennent de deux régions ITS co-amplifiées d'environ 500 pb chacune. Ceci peut traduire la présence soit de deux types de séquences ITS à l'intérieur d'un même génome, soit de deux types

de noyaux différents chez les spores MVA. Des résultats similaires ont été observés pour certaines espèces végétales appartenant aux familles des Rosacées et Brassicacées (Campbell *et al.*, 1993; Capesius, 1993). L'existence de deux régions ITS différentes bien que présentant un fort degré d'homologie a été par ailleurs montrée chez *G. mosseae* (Sanders *et al.*, 1995).

Migration des hétéroduplex

Durant la migration, les hétéroduplex sont ralentis du fait de la présence de zones non parfaitement appariées ; le rapport entre les distances de migration des hétéroduplex et des homoduplex est proportionnel au pourcentage d'homologie entre les séquences confrontées. La figure 4A (comparer les puits 1 et 3 avec le puits 2) montre que les séquences confrontées présentent un pourcentage d'homologie appréciable.

Les résultats ainsi obtenus avec plusieurs souches de champignons MVA sont représentés sur la figure 4. Sur la base du rapport de la distance moyenne de migration des hétéroduplex et des homoduplex, mais aussi de la résolution des deux hétéroduplex formés pour chaque confrontation, 5 groupes d'homologie peuvent être établis : groupe I : *Gigaspora margarita* 124 ; groupe II : *Glomus mosseae* 120 et FT SR 103, *Glomus caledonium* 130 et 122 ; groupe III : *Glomus fasciculatum* FT SR 105 ; groupe IV : *Glomus sp* MR, *Glomus aggregatum* 132 ; groupe V : *Glomus caledonium* 134. Ces résultats confirment donc la filiation de l'isolat 134 de *G. caledonium* avec l'espèce *G. mosseae* prédite par l'analyse de restriction de la région ITS. Il convient également de noter que mis à part le cas particulier des *G. caledonium*, les différentes espèces morphologiques sont placées dans des groupes différents. La méthode d'analyse par hétéroduplex des séquences amplifiées est facile à mettre en œuvre en routine, et permet de mettre en évidence un polymorphisme non détectable par RFLP. De plus, cette méthode permet une évaluation directe du pourcentage d'homologie entre deux fragments d'ADN sans nécessiter leur séquençage.

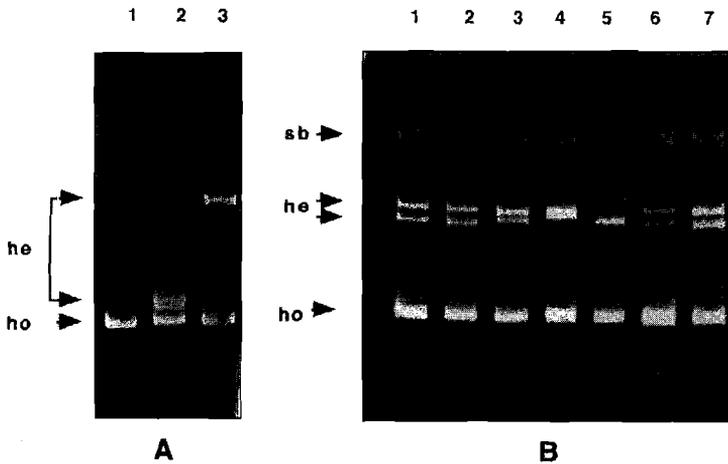


Figure 4

Analyse de migration des hétéroduplex.

Les hétéroduplex (he) ont été formés en mélangeant deux à deux les régions de l'ARN 18S amplifiées par VANS1 et NS21 à partir d'ADN provenant de champignons MVA puis séparés des homoduplex (ho) et ADN simple brin (sb) par électrophorèse en gel de polyacrylamide 5 % non dénaturant.

A - Confrontations *Gigaspora margarita* 124/ *Glomus aggregatum* 132 (piste 1); *Glomus* sp.135/*Glomus caledonium* 130 (piste 2), *Gigaspora margarita* 124/ *Glomus* sp 135 (piste3).

B - Confrontations *Gigaspora margarita* 124/*Glomus caledonium* 130 (piste 1); *Gigaspora margarita* 124/ *Glomus caledonium* 122 (piste 2); *Gigaspora margarita* 124/ *Glomus caledonium* 134 (piste 3); *Gigaspora margarita* 124/ *Glomus* sp 135 (piste 4); *Gigaspora margarita* 124/ *Glomus fasciculatum* FT SR 105 (piste 5); *Gigaspora margarita* 124/ *Glomus mosseae* 120 (piste6) et *Gigaspora margarita* 124/ *Glomus mosseae* FT SR 103 (piste 7).

Conclusion

Les études histologiques du système racinaire pivotant de la légumineuse arborescente *Acacia albida* montrent que la mycorhization est effective jusqu'à 4,5 m dans les régions soudano-guinéennes et à plus de 35 m dans les régions typiquement sahéliennes du Sénégal. C'est la première fois qu'une telle distribution en profondeur est mentionnée dans l'histoire des symbioses végétales. Ceci a montré les grandes possibilités d'adaptation de ces symbiotes obli-

gatoires que ne peuvent dévoiler les investigations généralement réalisées sur des plantes à système racinaire peu profond tel celui des graminées. La caractérisation par les critères morphologiques montre la diversité des espèces MVA d'*A. albida*. Les champignons appartiennent à l'ordre des Glomales selon la description de Morton et Benny (1990). Les genres *Glomus* et *Gigaspora* sont prépondérants aussi bien en surface qu'en profondeur des sols des différentes zones écoclimatiques du Sénégal.

Le développement intense des champignons sur milieu SR modifié (Diop, 1995), en présence de racines isolées, confirme les résultats déjà obtenus avec ce milieu et montre qu'il renferme les éléments nutritifs nécessaires à la culture et à la multiplication des champignons MVA. La culture continue des souches MVA par des subcultures sur le milieu SR modifié permet d'avoir une production régulière d'inoculum et surtout de maintenir pour la première fois la permanence *in vitro* des souches MVA du Sahel. Il devient alors possible de vérifier si une souche conserve ou non son potentiel infectieux au cours de multiples repiquages et même d'approfondir au niveau moléculaire la notion de permanence génétique. La culture continue *in vitro* des souches sahéniennes d'*A. albida*, en plus de permettre d'évaluer la qualité de l'inoculum, ouvre des possibilités de production sans contaminants. Il convient maintenant d'adapter ces systèmes pour étudier en conditions contrôlées le rôle des partenaires symbiotiques en situation de stress.

Les travaux d'identification des champignons MVA par les outils de la biologie moléculaire nous ont permis de mettre au point une méthode d'extraction d'ADN bien adaptée à l'étude de ces biotrophes obligatoires et de sélectionner une paire d'amorces amplifiant la région ITS pour l'étude de la variabilité des espèces. L'étude du polymorphisme des régions ITS et d'une portion de l'ARN 18S amplifiées à partir de différentes spores a confirmé la diversité révélée par les études morphologiques des champignons MVA d'*A. albida*. Ces régions semblent donc appropriées pour étudier, dans les conditions que nous avons décrites, la variabilité génétique des champignons MVA à partir de suspensions sporales ou de fragments racinaires mycorhizés. Ces marqueurs moléculaires peuvent permettre de réaliser un diagnostic rapide de la qualité des souches maintenues *in vitro* dans des cultures et subcultures par rapport à la souche monosporale ou monovésicule d'origine.

Bibliographie

- AN (Z. Q.), HENDRIX (J. W.), 1988 - Determining the viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia*, 80 : 259-261.
- BAYLIS (T. S.), 1975 - "The magnoloid mycorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it." In *Endomycorrhizas*. (F. E.) Sanders, (B.) Mosse, (P. P.) Tinker éd. Academic Press, New York and London : 410-416.
- BERCH (S.), 1988 - Compilation of the *Endogonaceae*. Mycologue, Waterloo, Canada.
- CAMPBELL (C. S.), BALDWIN (B. G.), DONOGHUE (M. J.), WOJIECHOWSKI (M. F.), 1993 - Toward a phylogeny of *Amelanchier* (*Rosaceae* : *Maloideae*) : evidence from sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA (nr DNA). *Am. J. Bot.*, 80 : abstract 398.
- CAPESIUS (I.), 1993 - Sequence of the 5S rRNA gene from *Brassica nigra* and its relation to other 5S rRNA genes from the *Brassicaceae*. *J. Plant Physiol.*, 142 : 112-114.
- DELWART (E. L.), SHPAER (E. G.), LOUWAGIE (J.), MC CUTCHAN (F. E.), GREZ (M.), RÜBSAMEN-WAIGMANN (H.), MULLIS (J. I.), 1993 - Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay : analysis of HIV-1 env genes. *Science*, 262 : 1257-1261.
- DIEM (H. G.), GUEYE (I.), GIANINAZZI-PEARSON (V.), FORTIN (J. A.), DOMMERGUES (Y. R.), 1981 - Ecology of VA mycorrhizae in the tropics : the semi-arid zone of Senegal. *Acta œcol., œcol. Plant*, 2 : 53-62.
- DIOP (R.), 1994 - *Mycorrhizes et mycorrhization d'Acacia seyal en zones salines*. Mémoire de certificat d'études supérieures en Agriculture-Environnement, ENSSAA, Dijon, France, 40 p.
- DIOP (T. A.), 1995 - *Ecophysiologie des mycorrhizes à vésicules et arbuscules associés à Acacia albida Del. dans les zones sahélienne et soudano-guinéenne du Sénégal*. Thèse de doctorat, Univ. d'Angers, France, 165 p.
- DIOP (T. A.), 1996 - Les mycorrhizes à vésicules et arbuscules. *J Fac Sci Dakar, Univ. Cheikh Anta Diop*, 2 : 49-64.
- DIOP (T. A.), PLENCHETTE (C.), STRULLU (D. G.), 1994 - Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza*, 5 : 17-22.
- GARDES (M.), BRUNS (T. D.), 1993 - ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2 : 113-118.
- GARDES (M.), WHITE (T. J.), FORTIN (J. A.), BRUNS (T. D.), TAYLOR (J. W.), 1991 - Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.*, 69 : 180-190.
- GOODWIN (D. C.), LEE (S. B.), 1993 - Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechn.*, 15 : 438-444.
- HENRION (B.), CHEVALIER (G.), MARTIN (F.), 1994 - Typing truffle species by PCR

- amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.*, 98 : 37-43.
- HEWITT (G. M.), JOHNSTON (A. W. B.), YOUNG (J. P. W.), 1991 - *Molecular techniques in taxonomy*. Springer Verlag, Berlin.
- MANNING (K.), 1991 - Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Analytical Biochem.*, 195 : 45-50.
- MORTON (J. B.), BENNY (G. L.), 1990 - Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes) : a new order, Glomales, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* 37 : 471-491.
- PHILLIPS (J. M.), HAYMAN (D. S.), 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.
- SAMBROOK (J.), FRITSCH (E. F.), MANIATIS (T.), 1989 - *Molecular cloning : A laboratory manual*, 2nd ed° Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New-York.
- SANDERS (U. R.), ALT (M.), GROPPE (K.), BOLLER (T.), WIEMKEN (A.), 1995 - Identification of ribosomal DNA polymorphism among spores and within spores of the Glomales : Application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi communities. *New Phytol.*, 130 : 419-427.
- SCHENCK (N. C.), PÉREZ (Y.), 1990 - *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*, 1st ed° Synergetic Publications, Gainesville, Florida, 245 p.
- SIMON (L.), LALONDE (M.), BRUNS (T.), 1992 - Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Env. Microbiol.*, 58 : 291-295.
- STRULLU (D. G.), DIOP (T.), PLENCHETTE (C.), 1997 - Réalisation de collections in vitro de *Glomus intraradices* (Schenck et Smith) et *Glomus versiforme* (Karsten et Berch) et proposition d'un cycle de développement. *CRAS, Paris*, 320 : 41-47.
- STRULLU (D. G.), PERRIN (R.), PLENCHETTE (C.), GARBAYE (J.), 1991 - *Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées*. Lavoisier, Paris, 256 p.
- STRULLU (D. G.), ROMAND (C.), 1986 - Méthode d'obtention d'endomycorhies à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. *CRAS, Paris*, 303 : 245-250.
- WHITE (T. J.), BRUNS (T.), LEE (S.), TAYLOR (J.), 1990 - "Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics." *In* PCR protocol : a guide to methods and applications. MA Innis, (D. H.) Gelfand, (J. J.) Sninsky, (T. J.) White édés, Academic Press, New-York : 315-322.
- WYSS (P.), BONFANTE (P.), 1993 - Amplification of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycol. Res.*, 97 : 1351-1357.