

	Pages
INTRODUCTION
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....
I.- Notion de mycorhizes
1.1.- Morphologie et nutrition
1.2.- Cycle de développement
1.3.- Influence de la température sur la germination des propagules mycorhizien....
1.4.- Effets bénéfiques de l'inoculation des champignons mycorhiziens sur les plantes cultivées.....
1.5.-Rôle dans l'amélioration de la nutrition phosphatée.....
1.6.- Protection phytosanitaire.....
1. 7.- Mycorhizes et stress environnementaux
II.- Méthodes de production d'inoculum
2.1.- Culture in vivo.....
2.1.1- Culture sur sol préparé.....
2.1.2- Culture en pots
2.1.3- Culture aéroponique.....
2.1.4- Culture hydroponique.....
2.2.- Culture in vitro
2.2.1-Culture axénique
a) Culture à partir de spores

b) Culture à partir de vésicules.....	
c) Culture de racines isolées.....	
2.2.2- Culture monoxénique.....	
a) Choix de l'inoculum.....	
b) Etablissement de la symbiose mycorhizienne.....	

MATERIEL ET METHODES.....

I- Sites d'étude	
II- Matériel fongique	
2.1-Production d'inoculum.....	
2.2-Bullage, Conditionnement et conservation	
2.2.1- Bullage	
2.2.2- Conditionnement et conservation	
III- Matériel végétal	
IV-Dispositif expérimental	
V- Paramètres mesurés	

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I.- Impact des différentes souches sur le poids de la matière sèche de la	
Partie aérienne des plants de <i>Acacia nilotica</i>	
1.1-Impact de <i>Glomus aggregatum</i>	
1.2-Impact de <i>Glomus intraradices</i>	
1.3-Impact de <i>Glomus mosseae</i>	
II.- effet des différentes souches sur la croissance en hauteur des plants de <i>Acacia nilotica</i> ...	
2.1- Effet de <i>Glomus aggregatum</i>	
2.2- Effet de <i>Glomus intraradices</i>	

2.3- Effet de <i>Glomus mosseae</i>	
III.- Influence des différentes souches sur la mycorhization de <i>Acacia nilotica</i>	
3.1- Mycorhization des racines de <i>Acacia nilotica</i> par <i>Glomus aggregatum</i>	
En fonction du mode de conditionnement et de conservation	
3.2- Mycorhization des racines de <i>Acacia nilotica</i> par <i>Glomus intraradices</i>	
En fonction du mode de conditionnement et de conservation	
3.3- Mycorhization des racines de <i>Acacia nilotica</i> par <i>Glomus mosseae</i>	
En fonction du mode de conditionnement et de conservation	
IV.- Influence des différentes souches sur la nutrition minérale de <i>Acacia nilotica</i>	
4.1- Influence des souches sur la teneur en azote des plants de <i>Acacia nilotica</i>	
4.1.1- Influence de <i>Glomus aggregatum</i>	
4.1.2-Influence de <i>Glomus intraradices</i>	
4.1.3- Influence de <i>Glomus mosseae</i>	
4.2.- Influence des souches sur la teneur en phosphore des plants de <i>Acacia nilotica</i>	
4.2.1.- Influence de <i>Glomus aggregatum</i>	
4.2.2- Influence de <i>Glomus intraradices</i>	
4.2.3- Influence de <i>Glomus mosseae</i>	
4.3.- Influence des souches sur la teneur en potassium des plants de <i>Acacia nilotica</i>	
4.3.1- Influence de <i>Glomus aggregatum</i>	
4.3.2- Influence de <i>Glomus intraradices</i>	
4.3.3- Influence de <i>Glomus mosseae</i>	
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	
ANNEXES	

INTRODUCTION

Les propagules fongiques des champignons mycorhiziens arbusculaires (MA) sont soit sous forme de mycélium ou spores libres dans le sol, soit de vésicules ou de fragments de racines associés au champignon MA. Chacune de ces formes offre des potentialités susceptibles de provoquer la germination du champignon MA et l'infection de la plante. Cependant, les spores de certains champignons à MA ont une période de dormance qui peut s'étendre de quelques semaines à plusieurs mois selon l'espèce ou le mode de conservation (Tommerup, 1983). De ce fait, la culture et l'entretien et la conservation fiable des cultures fongiques est important aussi bien pour la recherche que pour l'usage des champignons au niveau commercial. La réussite de la culture dépend infiniment des plantes, du champignon et des propriétés physiques et chimiques du sol ou le substrat (Smith et Read, 1997).

Afin de bénéficier de propagules avec un potentiel infectieux bien préservé, des conditions de conservation appropriées sont essentielles pour les collections de culture fongiques.

Diverses techniques telles que le stockage sec, la lyophilisation, la cryopréservation avec ou sans cryoprotectant, ont été développées pour la préservation à long terme des champignons MA ; mais les investigations ont impliqué différentes espèces fongiques et conditions de conservation de sorte qu'il soit difficile de normaliser un procédé.

Par exemple, Young (1982) rapporta que quelques propagules de champignons MA sont capables de germer et de coloniser des racines des plantes d'essai biologique après une période de 2 à 28 ans de conservation dans les sols secs maintenus à une certaine température. Le lot de spore utilisé au cours de cette étude inclus les représentants des espèces de *Glomus*, de *Acaulospora*, de *Gigaspora*, et de *Sclerocystis*.

Pour quelques espèces (*Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices*, *Acaulospora longula*) il a été démontré que les spores ont différentes réponses à la durée de conservation et la disponibilité de l'eau dans le sol (Douds et Schenk, 1991). Ce qui reflète la complexité des problèmes de conservation des champignons mycorhiziens dans le sol.

Ferguson et Woodhead (1982) ont conseillé de stocker les pots de culture dans du sol sec à 3-6°C. Cependant, Siquera et al (1985) ont proposé que la méthode la plus simple et la plus réussie pour conserver des champignons MA a été de laisser les spores dans du sol

partiellement sec, et de garder l'échantillon entier dans un récipient en plastique scellé à 4-6°C.

Des auteurs ont montré que le traitement par stockage prolongé dans le sol sec à 25-30°C suivi d'un bref traitement au froid à 4°C avant prégermination, a augmenté la germination des spores de *Glomus clarum* sur eau d'agar (Louis et Lim, 1987) .

Il a également été rapporté que des espèces de *Glomus clarum* survivent mieux à la conservation en milieu humide que dans le sable ou le sol sec (Draft et al, 1987). Mugnier et Mosse (1987) ont stockés des sporocarpes de *Glomus mosseae* pendant 4 années à 4°C dans une atmosphère moite, tandis que Afek et al (1994) constataient que l'inoculum sec (mélange des racines, du sol et des spores) de *G. mosseae* était efficace une fois stocké pendant 4 ou 8 semaines à 24°C, ou au-dessous de 10°C.

Certains champignons MA ne peuvent être cryopreserveds par les techniques standard. Les meilleures méthodes de cryoprotection et de cryopreservation sont avérées être le séchage du sol dans des pots de culture et la congélation (pendant 3 mois) des spores in situ, et cela dans le sol dans lequel elles ont été produites (Douds et Schenk, 1990). Ce procédé est satisfaisant pour quelques espèces représentatives de cinq genres de champignons MA. Saphir et al (1990) ont suggéré le stockage du sol de l'inoculum à -10°C pendant 28 à 58 jours, afin d'améliorer et de synchroniser la germination de spore de *Glomus mosseae* et de *Glomus fasciculatum*.

Quand des cultures in vitro de *Glomus intraradices* sont lentement refroidies avant la congélation la majorité contient des hyphes actifs, tandis qu'on élimine l'activité hyphale presque totalement par la congélation dans les cultures non-prérefrigérées (Addy et al, 1990). Ces différents travaux montrent que la viabilité et l'efficacité des propagules mycorhiziennes varient selon les souches et les modes de conservation. Cependant il s'avère difficile de tirer des conclusions générales au sujet de l'effet des conditions de stockage, sur le potentiel infectieux des différentes souches fongiques de champignons MA et les formes d'inoculum à partir de ces informations.

Le but du présent travail est :

- d'une part de mettre au point un protocole simple pour la conservation à long terme des propagules mycorhiziennes afin de garantir une réserve et une source alternative d'approvisionnement pour le début de cultures.
- et d'autres parts d'évaluer l'efficacité de ces propagules en conditions naturelles.

Introduction

Les résultats seront discutés dans un contexte de domestication et de valorisation de l'inoculum MA dans les itinéraires techniques agricoles au Sénégal.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.- NOTION DE MYCORHIZES

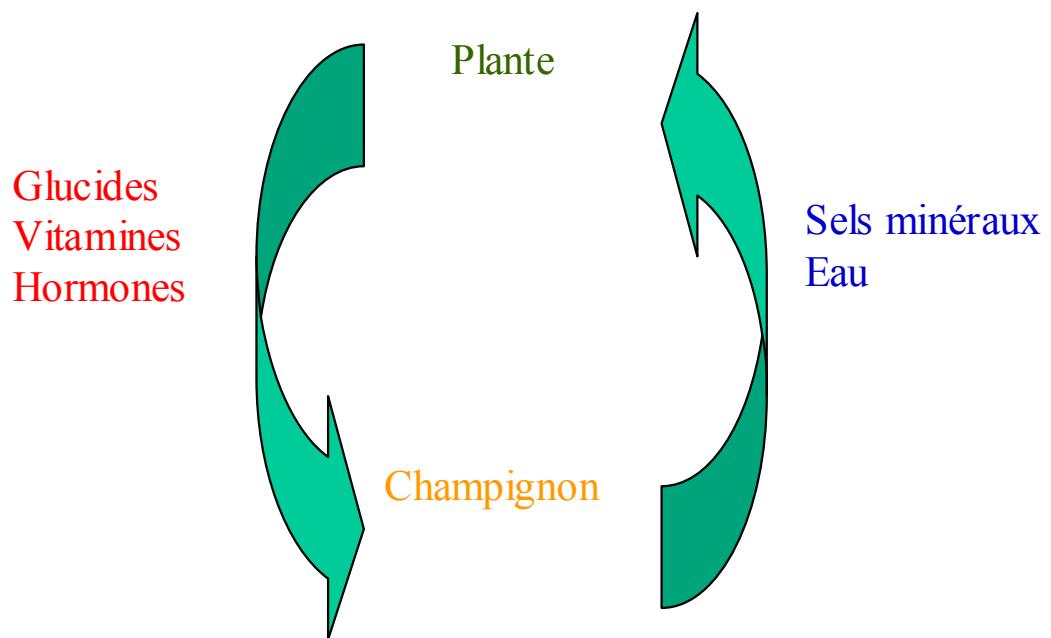
Le terme "mycorhizes" (du grec *mukes* : champignon et *rhiza* : racines) fut à l'origine crée par le phytopathologiste Allemand Frank en 1885. Ce sont des associations symbiotiques durables entre les racines des Végétaux supérieurs et le Mycélium (ensemble d'hyphes) filamentueux des champignons telluriques. Il s'agit d'une union mutualiste basée sur des échanges à bénéfices réciproques entre les deux partenaires symbiotiques. L'état de mycorhization est très répandu si bien que dans la nature il constitue la règle (Gerdemann, 1968) et intéresse environ 95% des plantes supérieures. Selon des critères morphologiques et anatomiques les mycorhizes sont réparties en trois groupes : les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes et les endomycorhizes.

Concernant les endomycorhizes ou champignons mycorhiziens arbusculaires (MA), il se forme des spores souterraines dont la germination produit un hyphe mycélien capable d'infecter les racines des végétaux. Le transfert des éléments nutritifs du champignon vers les cellules de la racine de la plante est possible grâce aux arbuscules fortement ramifiés qui constituent le site d'échange situé entre la plante et le champignon. Les vésicules quand à eux sont des structures en forme de sac, qui stockent le phosphore sous forme de phospholipides. (Voir figure 1).

Cette forme d'association est plus connue sous le nom de symbiose mycorhizienne arbusculaire, (Dommergues et Mangenot, 1970), la plante assure l'approvisionnement en photosynthétats du symbioète et le champignon mycorhizien améliore la nutrition hydrominérale de la plante hôte (voir figure 2). Caractérisés par une biotrophie obligatoire (Hepper, 1987), les champignons mycorhiziens arbusculaires ne peuvent se développer qu'en présence de racines de la plante hôte et sous des conditions climatiques favorables. ; Jusqu'à ce jour il est quasi impossible d'obtenir leur culture pure. La croissance et le développement du champignon nécessiteraient de manière indispensable plusieurs éléments nutritifs fournis par le partenaire végétal. Pour accomplir son cycle de développement, le champignon aurait besoin de conditions physico-chimiques propres à la culture *in vivo* et qui seraient pour autant essentiels pour la culture pure. Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes stimulent la croissance hyphale *in vitro*. L'impossibilité de cultiver le champignon MA sans la plante hôte serait attribuée également selon une hypothèse à une perte d'une partie de son

matériel génétique au cours de l'évolution, le rendant dépendant du métabolisme de la plante verte .

Les champignons MA sont également caractérisés par une absence de spécificité d'hôtes ce qui est à l'origine de leur ubiquité. Ils se retrouvent sous tous les climats, dans tous les écosystèmes et ce, indépendamment du type de sol, de la végétation ou des conditions de croissance. Cela explique le fait que la symbiose mycorhizienne arbusculaire s'étend des pôles aux tropiques à l'exception de quelques familles végétales comme les crucifères et les chénopodiacées qui sont dépourvues de mycorhizes (Hirrel et al.,). Cette particularité tout à fait remarquable constitue une différence fondamentale par rapport aux autres symbioses et justifie leur adaptation à des climats très contrastés (Gerdemann, 1968; Mosse, 1973) ou à des milieux désertiques, salés (Khan, 1974) ou métallifères (Morton, 1986). Un champignon isolé à partir de racines d'une plante ou de spores de sa rhizosphère peut facilement être associé non seulement à des espèces appartenant au même genre (Molina et al, 1978) mais aussi à d'autres plantes de genres ou de familles différents (Plenchette et al, 1982).



Relation entre plante et champignon symbiotique

1.1- Morphologie et nutrition

Les champignons mycorhiziens arbusculaires développent dans le sol un réseau important de filaments microscopiques : les hyphes. Lorsque ces filaments entrent en contact avec une jeune racine, ils s'y faufilent entre les cellules corticales et se propagent rapidement en différenciant des arbuscules intracellulaires et dans certains cas, des vésicules intercellulaires. On parle de champignons à arbuscules en référence à la forme des structures qu'ils différencient dans les racines. Des spores sont également différencierées soit dans le sol et dans les racines; elles servent d'organes de réserve et de propagation ainsi que de structure de référence pour l'identification des espèces. On ne possède à ce jour aucun indice sérieux quant à la sexualité des champignons MA.

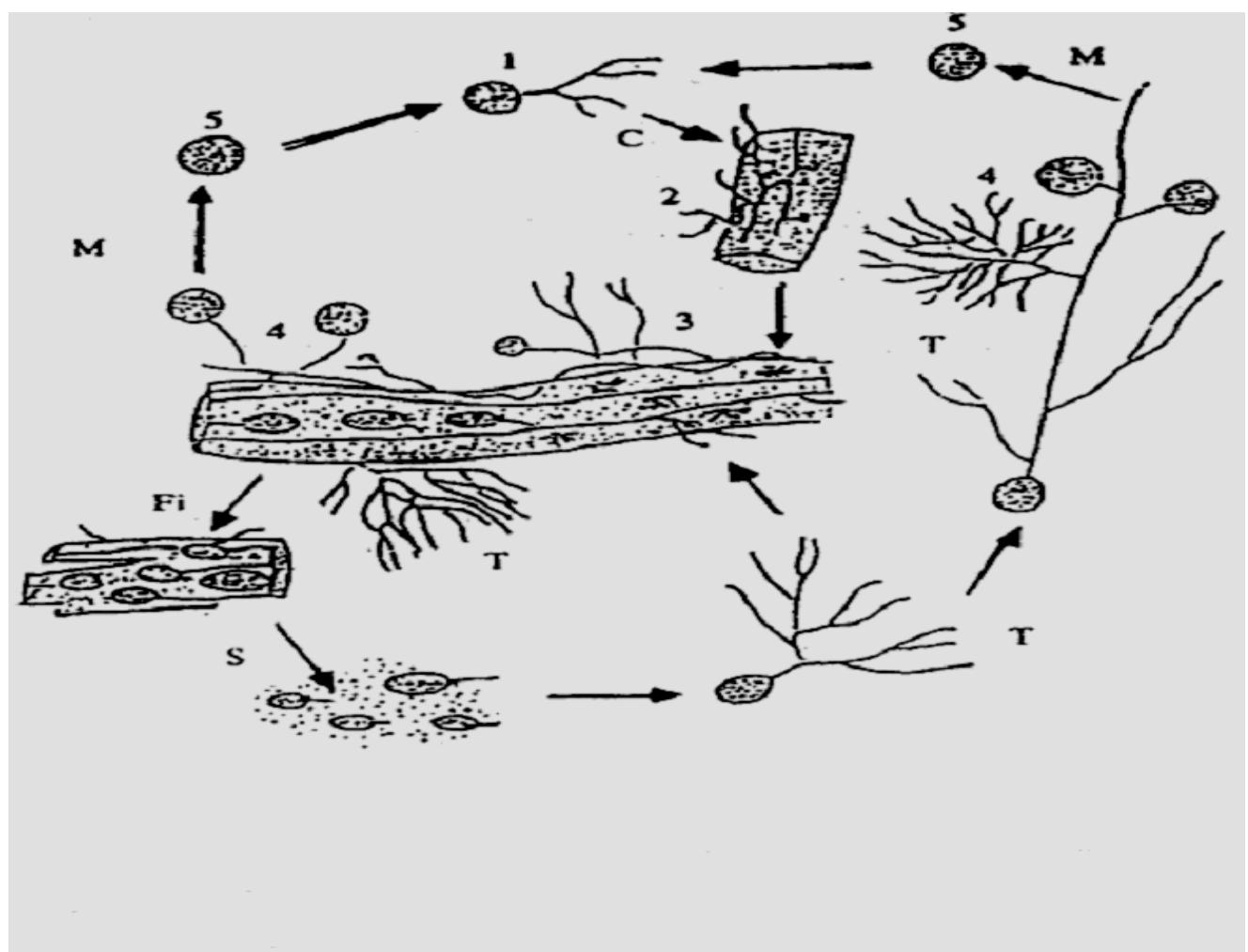
Le contact étroit créé entre la plante et le champignon par le biais du réseau filamentous constitue le siège d'échanges nutritifs grâce aux arbuscules permettant la survie et la croissance des deux partenaires. D'une part, le champignon largement dispersé dans le sol par le biais de son important réseau de filaments, a accès à un volume de sol plus important que le système racinaire lui-même. Les filaments fongiques servent donc de « pompe » pour diriger vers la racine un supplément d'eau et de sels minéraux auquel celle-ci n'aurait pas normalement accès. En échange, le champignon reçoit de la plante des éléments métabolisés qu'il s'avère incapable de synthétiser lui-même, tels que sucres, acides aminés et métabolites secondaires.

1.2- Cycle de développement

La culture *in vitro* en présence de champignons mycorhiziens en présence de racines isolées a permis de mieux connaître leur cycle de développement (Bédard et Piché, 1992 ; Diop et al., 1992 ; Strullu et al., 1997).

Cycle de développement des Glomus

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



dans les cellules corticales et se transforment en vésicules. La mycorhize ainsi constituée produit un réseau extra matriciel qui serait à l'origine de chlamydospores selon plusieurs auteurs.

Après la maturation (M) ces spores sont disséminées dans le sol et seront à l'origine de promycélium de départ. Lorsque les racines ou les tissus corticaux vieillissent, les vésicules libérées dans le sol se développent en saprophytes (S). Le mycélium continue de croître dans les conditions naturelles grâce à la constitution du réseau extra-matriciel représentant le thalle (T). Ce thalle possède des capacités d'assimilation et de croissance. La multiplication végétative est alors réalisée grâce à des chlamydospores (4). Après maturation (M) et libération, les chlamydospores redeviennent aptes à réinfecter les racines en produisant un promycélium (1).

1.3.- Influence de la température sur la germination des propagules mycorhiziennes

L'environnement dans lequel sont conservées les propagules de champignons MA joue un rôle essentiel pour leur survie et leur efficacité dans la symbiose. Il est donc indispensable de maîtriser l'ensemble des paramètres qui interviennent dans le conditionnement et déterminent le comportement futur de l'inoculum.

Parmi ces paramètres, la température occupe une place de choix. Ce qui justifie les nombreux travaux effectués en vue de mieux comprendre le rôle de ce facteur dans la conservation des propagules.

Schenk et al., (1975) ont étudiés les effets de la température sur la germination des spores et la mycorhization en conditions axéniques. Ce qui a permis de montrer la préférence des températures élevées (34°C) pour *Gigaspora coralloidea* et *Gigaspora heterogama* et des températures basses (5°C) pour *Glomus mosseae*.

Le stockage des spores des champignons MA dans le sol à 5°C est une manière commune de préserver ces champignons. Cette méthode est satisfaisante pour *Glomus intraradices* (Schenk et Smith) mais pas pour *Glomus margarita* (Becker et Hall), *Glomus mosseae* (Nicholson et Gedermann) (Gedermann et trappe), et *Acaulospora longula* (Spain et Schenk). L'incubation pour 47h dans le tréhalose a conféré une mesure de protection contre les effets néfastes pouvant affecter la germination de spores de *Glomus margarita* précédemment congelées.

La meilleure méthode de cryoprotection et de cryopréservation s'est avérée être le séchage lent des sols dans des pots de culture et la congélation des spores par le procédé *in situ*.

La méthode la plus généralement utilisée de maintien du potentiel germinatif des champignons MA est la culture continue dans des pots contenant du sol avec une plante hôte. Mais cette méthode est un travail qui nécessite beaucoup de temps et de l'espace et peut ne pas maintenir la variabilité génétique des champignons rassemblés dans un champ.

Les spores de champignons MA sont généralement stockées à 4-5°C dans des pots de culture contenant du sol sec (Siquera et al., 1985). Les cultures de *Glomus fasciculatum* ont été stockées avec succès pendant 4 années dans le sol sec à 3-5°C (Ferguson et Woodhead, 1982). Cependant l'inoculum issu du stockage frais et sec n'est pas efficace à tous les coups.

Mugnier et Mosse (1987) ont stocké les sporocarpes de *Glomus mosseae* pendant 4 années à 4°C dans des solutions salines très saturées qui maintiennent une grande humidité relative.

Les spores des habitats tropicaux survivent mieux au stockage dans des sables ou sols humide que dans les sables ou sols secs (Draft, Spencer et Thomas, 1987).

Les essais pour préserver ces champignons dans l'azote liquide n'ont pas réussi (Sylvia, 1984). L'étape de lyophilisation simple a été efficace seulement pour les espèces ayant des spores emmurées, épaisses (Dalpé, 1987). La basse congélation des pots de culture contenant du sol, du sol avec de la kaolinite, ou la kaolinite à -40°C suivi rapidement de la congélation à -196°C, a été testée pour préserver le potentiel infectieux de champignon MA colonisés dans des morceaux de racines, mais les solutions cryoprotectives étaient inefficaces (Tommerup et Bett, 1985).

Tommerup (1988) a conservé avec succès les spores et les hyphes de champignons MA par séchage et stockage sous vide. Cependant, Tommerup (1988), déclare que la cryopréservation peut être le choix final dans les méthodes de conservation mais il y a peu d'études visant à développer ceci comme procédé courant pour les champignons MA.

1.4.- Effets bénéfiques de l'inoculation des champignons mycorhizienne sur les plantes cultivées

Les effets bénéfiques des champignons MA sur les plantes cultivées sont largement démontrés notamment par le biais de l'amélioration de la nutrition phosphatée, de l'absorption du potassium, de l'azote et des oligo-éléments tel que le cuivre, le zinc et le souffre (Cooper et Tinker, 1978 ; Strullu et al., 1981 ; Francis et al., 1986 ; Declerck et al., 1994).

Ces effets résultent de l'intense exploration du sol par les hyphes fongiques pour prélever les ressources hydrominérales (Gianinazzi Pearson et Diem, 1982).

En effet, de nombreux travaux ont mis en évidence le rôle bénéfique des associations mycorhiziennes dans la nutrition hydrominérale et la protection phytosanitaire des plantes (azcō-Aguilar et Barea, 1992 ; Lindermann, 1992).

1.5.- Rôle dans l'amélioration de la nutrition phosphatée

Le phosphore participe à plusieurs processus physiologiques au sein de la plante comme la floraison, la fructification, le transfert d'énergie et la fonction chlorophyllienne (Camiré, 1987).

Le sol contient du phosphore sous divers états et en grande quantité mais seulement une très petite partie est assimilable par les plantes. De plus, le phosphore est connu comme étant moins mobile que les éléments majeurs (Gianinazzi Pearson et Gianinazzi, 1976 ; Harley et Smith, 1983). Selon Harley et Smith, 1983, une carence en phosphore est observée dans de nombreux sols tropicaux entraînant une limitation de la croissance chez les plantes.

Les racines constituant l'interface entre les besoins de la plante et la disponibilité du sol en éléments nutritifs, n'explorent qu'une partie de ce dernier, la rhizosphère. Il se produit alors une zone d'épuisement autour de la racine et un transfert d'ions est indispensable pour réapprovisionner la solution du sol. L'absorption du phosphore est facilitée par les hyphes mycéliens des champignons MA qui prospectent au-delà de la zone d'épuisement des racines. Par ailleurs, les hyphes fongiques sont capables de jouer un rôle très important dans l'accumulation et l'absorption du phosphate du fait qu'elles peuvent prélever rapidement le phosphate à partir des solutions peu concentrées en phosphate de potassium (Harley et McCready, 1952 ; Harley, 1978 ; Strullu et al ,1986). Le phosphore est ainsi accumulé sous forme de polyphosphates dans les vacuoles du champignon.

1.6.-Protection phytosanitaire :

Le rôle protecteur des mycorhizes contre les phytopathogènes a été mis en évidence (Perrin, 1991) et dépendrait du niveau de phosphore dans le sol (Davies et al, 1979 ; Smith, 1998).

Des études ont montré des effets soit néfastes (Schoenbeck, 1980), soit bénéfiques (Feldemann et al, 1990) de la mycorhization sur les maladies de la partie aérienne des plantes.

L'infection mycorhizienne permet une atténuation des effets produits sur la plante par des nématodes phytoparasites du système racinaire (Sikora et Schoenbeck, 1975 ; Schenk et Kellam, 1978).

Jusqu'à présent, aucune étude n'a mentionné un effet direct de prédation ou d'antibiose sur les interactions MA et organismes pathogènes. D'après Meyer et Lindermann (1986),

l'aptitude prophylactique serait due à une modification à la fois qualitative et quantitative de l'exudation racinaire.

L'effet protecteur est dépendant de la nature du symbiose. Les champignons mycorhiziens renforcent la résistance et favorisent la croissance des cultures. En effet, la gravité des maladies des plantes mycorhizées est presque toujours réduite. Par exemple : les endomycorhizes permettent une réduction de la gravité des pourritures racinaires produites par *Phytophthora spp*. Elles sont évoquées dans différentes revues de synthèse (Schoenbeck 1979, Dehne 1982, Garcia Garrido et Ocampo 1987).

Des études ont montré que les plantes mycorhizées comptent moins d'organismes pathogènes dans leur rhizosphère que celles qui ne le sont pas (Baker et Cook, 1974).

On ne connaît pas de façon précise le rôle des mycorhizes dans cette protection. Des hypothèses sont avancées pour expliquer ces phénomènes : l'action directe sur les bactéries, les champignons et les virus pathogènes ; la modification de la microflore environnante et la stimulation des mécanismes de défense.

On pense que la mycorhization agirait comme une vaccination en préparant la plante à réagir plus vite à l'attaque du pathogène. Quoiqu'il en soit, les mycorhizes jouent un rôle protecteur incontestable comme antagoniste d'autres espèces en empêchant leur pénétration et en s'opposant à leur rôle de pathogène.

1.7.-Mycorhizes et stress environnementaux

La plante mycorhisée s'avère mieux nourrie et mieux adaptée à son environnement. Elle acquiert ainsi une protection accrue contre les stress environnementaux, notamment la sécheresse (Subramanian et al., 1995), le froid (Charest et al., 1993 ; Paradis et al., 1995) la salinité élevée (Young et al., 1995), la pollution (Leyval et al., 1994 ; Stetty et al., 1995).

Les plantes mycorhizées résistent mieux à la transplantation et répondent de façon plus favorable au stress hydrique. Les champignons endomycorhiziens, *Glomus intraradices* et *Glomus albidum* ont montré un effet positif sur la croissance de *Manihot esculenta*. Les plantes de manioc endomycorhizées montrent une résistance plus grande au stress hydrique que les témoins non mycorhyzés (Subramanian et al., 1995).

Globalement les plantes mycorhizées voient leur croissance et leur santé améliorée et acquièrent du coup une protection accrue contre les conditions environnementales défavorables à leur survie.

Les mycorhizes contribuent de plus à l'équilibre des terres en influençant particulièrement leur structure (Miller et Jastrow, 1992). Les substances polysaccharidiques (stockées en

générale dans les vacuoles) avec les composés aromatiques et les cations libérés par les mycorhizes cimentent les particules d'argile et les débris organiques donnant ainsi des macro-agrégats stables.

II.-METHODES DE PRODUCTION D'INOCULUM

2.1.-Culture in vivo

Il s'agit là de systèmes de culture ouverts. Plusieurs types de propagules (spores, hyphes, vésicules intraracinaires) peuvent servir à produire des mycorhizes à vésicules et arbuscules de façon isolée ou bien avec des mélanges de substrats contenant des spores ou des racines colonisées. La densité d'inocula si critique soit-elle dépend du bon ouvrage du chercheur (Diop, 1990). Une constante pour ces types de culture est le choix d'une plante mycotrophe comme partenaire végétal. Parmi les méthodes de culture, nous distinguons:

2.1.1- La culture sur sol préparé

Elle est l'une des plus efficaces et se fait traditionnellement à même le sol préalablement fumigé ou stérilisé. Cette méthode très usitée dans les pays en voie de développement du fait de son coût peu élevé, permet de produire de l'inoculum en grande quantité souvent utilisé comme biofertilisant.

2.1.2- La culture en pots

Elle permet de produire de l'inoculum MA dans des contenants avec un substrat préalablement stérilisé (Turface, sable ou vermiculite), une plante piège et de l'inoculum MA sous forme de fragments de mycorhizes ou d'entités sporales.

2.1.3- La culture aéroponique:

Développée par Zobel et al., (1976) puis perfectionnée par Hung et Sylvia (1988); Elle consiste à vaporiser de façon mécanique et constante une solution nutritive (Hoagland) sur des racines afin de fournir à ces dernières une humidité et une aération adéquate.

2.1.4- La culture hydroponique:

Il existe deux systèmes de culture qui reposent sur le même principe de renouvellement de la solution nutritive. D'une part la culture hydroponique classique utilisée par Ojala et Jarell (1980) avec comme substrat de la silice imbibée de solution nutritive de Hoagland et un recyclage quotidien d'éléments nutritifs. D'autre part la culture sur film nutritif qui consiste à produire des MA sur des plateaux inclinés dans lesquels on note une perpétuelle recirculation de la solution nutritive de Hoagland sans azote (Mosse et Thompson, 1984). Ces systèmes nécessitent pour être bien exploités, une bonne connaissance scientifique des partenaires symbiotiques ainsi qu'une surveillance accrue des éventuels contaminants.

2.2- Culture in vitro

Ce sont des systèmes de culture en milieu fermé. La culture in vitro des champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules se heurte à une difficulté énorme : la nécessité de maîtriser les besoins nutritionnels des deux organismes (le champignon et le végétal) très éloignés d'un point de vue systématique.

Dans ces types de culture on distingue : les cultures fongiques monoxéniques (avec un seul organisme étranger, la racine isolée) et les cultures axéniques ou culture pure de champignons (spores, vésicules ou mycélium) ou de racines sans d'autres organismes étrangers (Strullu et al., 1997).

2.2.1- Culture axénique

La culture pure ou axénique massive constitue actuellement le verrou biotechnologique que les microbiologistes cherchent à faire sauter. Cependant l'impossibilité de cultiver les champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules sans la plante hôte constitue la complication majeure à la réussite de ces cultures.

a) Culture à partir de spores

Les premières synthèses axéniques ont été réalisées chez le fraisier et le pommier par Mosse (1959) à partir de spores pré germées en conditions axéniques sur agar. Les réserves sporales peuvent maintenir une croissance limitée des hyphes germinatifs pendant une semaine avant l'apparition des septations (Hepper, 1983). Certains flavonoïdes (Morandi, 1989; Chabot et al., 1992) et composés volatils particulièrement le CO₂ (Bécard et Piché, 1989a) peuvent maintenir une culture axénique des spores pendant plus de trois mois. Le système ensuite été

simplifié lorsqu'on a réussi à associer des spores de *Glomus mosseae* à des racines excisées de trèfle et de tomate(Hepper et Mosse,1975,1980 ;Mosse et Hepper,1975) sur agar puis des synthèses ont été réalisées en milieu liquide (Mac Donald,1981 ;St John et al.,1981).Plus récemment des spores ont pu être associées à des racines (tomate et carotte) transformées par le plasmide *d'Agrobacterium rhizogenes* (Mugnier et Mosse,1987 ; Bécard et Fortin,1988).

La culture *in vitro* de *Glomus* par la forme intraracinaire seule ou en association avec des racines excisées de tomate ou de carotte a montré un important potentiel de production de propagules MA et révélé différents aspects du mode de vie biotrophique des *Glomus*. Par exemple : par des subcultures régulières en conditions axéniques, les champignons MA isolés *d'Acacia albida* sont maintenues en culture continue permettant de créer des banques de champignons.

Des sections de racines mycorhizées sénescentes de 2 espèces de champignons MA (*Glomus intraradices* et *Glomus versiforme*) ont formé, *in vitro* des structures extraracinaires dans 2 milieux différents (eau gélosée et milieu minimal M) au bout de 3 mois de culture en l'absence de l'hôte végétal. Une soixantaine de spores viables a pu être obtenue avec *Glomus intraradices*. Ces spores étaient capables de compléter leur cycle de vie en les réassociant à des racines d'explants de tomate. Le développement du mycélium et la sporulation obtenus à partir de fragments de mycorhizes sénescents dans des milieux pauvres ont montré l'importance des facteurs abiotiques pour le succès de la culture *in vitro* des formes intraracinaires des champignons MA (Diop et al., 1994 a).

Ces différentes synthèses axéniques produisent des spores et il a été démontré avec *Gigaspora margarita* qu'il été possible de maintenir ces cultures pendant une très longue période (Diop et al. ,1992).

b) Culture à partir de vésicules

Les vésicules présentes dans le cortex de la racine mycorhisée sont des organes de réserve capables de reproduire la symbiose et dans bien des cas, l'inoculât sous forme de racines mycorhizées se révèle plus actif que les spores. Cependant les racines stériles peuvent héberger d'autres champignons que les champignons MA et après plusieurs tentatives d'isolement plus ou moins fructueuses (Barrett, 1961 ; Gerdemann, 1968), ce sont les travaux de Strullu et Rolland (1986,1987) qui ont aboutit à la mise au point d'un standard pour l'isolation des mycéliums en conditions axéniques, soit à partir de racines mycorhizées, soit à partir de vésicules isolées. Ces mycéliums ont été réassociés *in vitro* à des racines de tomates.

Cette méthode a permis récemment d'obtenir la production de plusieurs milliers de spores axéniques (Diop et al., 1994). Actuellement on développe un standard de culture associant *in vitro* une seule vésicule à une racine excisée. Ce standard vise à permettre, d'une part la purification des souches et leur maintien en culture permanente, et d'autre part, la production de matériel axénique pour la caractérisation du génome et de l'état symbiotique en biologie moléculaire (Simon et al., 1992, 1993a, 1993b ; Simoneau et al., 1994).

c) Culture de racines isolées

L'utilisation des racines excisées en tant que partenaire hôte dans la symbiose des champignons MA a été proposée la première fois par Mosse et Hepper (1975). Les racines isolées peuvent être propagées sans interruption dans différents milieux solides et liquides avec une reproductibilité élevée. Des racines clonales d'environ 15 plantes ont été établies (Butcher, 1980), et cette liste a été agrandie pendant les dernières décennies.

Le déclenchement des racines isolées exige le pré germination de graines dans des surfaces précédemment stérilisées avec les désinfectants classiques (hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène).

La transformation des racines par l'ADN de transfert (T-DNA: transfer-DNA) du plasmide Ri (Root inducing) d'*Agrobacterium rhizogenes*, bactérie responsable de la maladie du "hairy root" offrent des possibilités intéressantes de production axénique et à plus grande échelle d'inocula endomycorhiziens. Ces racines transformées présentent des caractéristiques tumorales, en particulier une potentialité de croissance supérieure aux racines normales. *In vitro*, les racines transformées se caractérisent morphologiquement par leurs nombreuses ramifications latérales, leur développement homogène, l'abondance de leurs poils absorbants et leur tendance à pousser horizontalement. Elles poussent de manière indéfinie sur des milieux nutritifs simples sans phytohormones, liquides ou gélosés; en boîte de Pétri ou en fermentateurs. Leur croissance peut être extrêmement rapide. Elles apparaissent idéales pour étudier les symbiotes obligatoires (Rajnchapel-Messaï, 1989).

2.2.2- Culture monoxénique

Le système de culture monoxénique comprend : le choix de l'inoculum de départ approprié et son isolation, et l'établissement de la symbiose c'est-à-dire l'association de l'inoculum à une plante hôte mycotrophe sur le milieu de croissance synthétique.

a. Choix de l'inoculum :

En général, les spores et les racines mycorhizées utilisées pour initier les cultures monoxéniques proviennent de plantes pièges cultivées sous conditions contrôlées de serre sur du sol naturel ou en présence de propagules isolées de champignon MA. Les systèmes de culture hydro et aéroponique peuvent également servir à la production d'inoculum. Pour la phase intraracinaire du champignon MA, on recommande souvent d'utiliser le poireau (*Allium porrum*) comme plante piége en raison de sa croissance rapide et son caractère mycotrophe marqué. Les jeunes racines de poireaux sont également translucides sous binoculaire, rendant les vésicules facilement discernables.

Les spores et les racines mycorhizées de la plante piége sont récoltées sur un tamis. Les spores sont examinées sous binoculaire et récoltées après plusieurs isolations dans l'eau. Les vieilles spores et les débris sont éliminés. Les racines sont observées sous binoculaire. En pratique, les racines mycorhizées turgescentes, jeunes et blanches (contenant de nombreuses vésicules) sans contaminants de surface discernables et sans blessures sont sélectionnées. L'utilisation des fragments racinaires contenant des vésicules est plus recommandée. C'est notamment le cas pour certains genres de *Glomus*, *Acaulospora* et *Entrophospora*. Pour les espèces appartenant au genre *Gigaspora* et *Scutellospora* (qui ne contiennent pas de vésicules), les spores sont préférées.

b. Etablissement de la symbiose mycorhizienne

Les spores présentant une germination et les fragments racinaires mycorhizés montrant une croissance hyphale sont réassociés avec une racine hôte sur le milieu de culture synthétique: le milieu Strullu-Romand modifié (SRM), (Declerck et al., 1998 modifié de Strullu et Romand, 1986) ou le milieu minimum M (Bécard and Fortin, 1998). En général, la propagule est transférée dans une boîte de Pétri près d'une zone en croissance active de la racine (Declerck et al., 1998), ou en transférant une racine hôte en croissance active à proximité de la propagule. Une sporulation est observée après plusieurs semaines ou mois suivant la souche considérées.

Des espèces appartenant à *Gigaspora* (Bécard et Piché, 1989; Diop et al., 1992), *Glomus* (St Arnaud et al., 1996; Strullu et al., 1997; Declerck et al., 1998, Gryndler et al., 1998; De Souza and Berbara, 1999; Pawlowska et al., 1999; Declerck et al., 2000b), *Acaulospora* (Dalgé and Declerck, 2002), *Scutellospora* (de Souza and Declerck, 2003; Declerck et al., 2004) et *Sclerocystis* sont cultivés avec succès suivant cette méthodologie. L'amélioration continue des techniques résulte en un nombre croissant d'espèces disponibles. De cette façon, il est possible

de créer une collection monoxénique de ces symbiotes (*Glomeromycota IN vitro collection - GINCO*).

Bien que la culture *in vitro* soit un système artificiel, ce peut être un outil valable pour étudier l'aspect fondamental et pratique de la symbiose de MA, complétant les approches expérimentales. Le développement du mycélium extraradical dans des conditions aseptiques est souvent accompagné par la production de prétendu arbuscule comme les structures (ALS) (Bago et al., 1998a) ou des structures absorbantes embranchantes (BAS) (Bago et al., 1998b). Les auteurs suggèrent l'implication possible d'ALS/BAS dans les emplacements d'échange entre les champignons MA et les plantes de hôtes.

En faisant la synthèse de plusieurs travaux réalisés en conditions naturelles et contrôlées, Diop (1995) a proposé un modèle d'extraction, de purification, de conservation de germplasme fongique (voire figure). Ce modèle permet d'assurer la permanence génétique des champignons MA et d'avoir du matériel pour les études appliquées et fondamentales.

Les propagules produites (les spores, les hyphes, les racines infectées) peuvent germer et réinfecter de nouvelles plantes efficientes .L' encapsulation stabilise les propriétés biologiques des racines mycorhziennes et des vésicules ou spores isolées (Strullu et al., 1991; Declerck et al., 1996b).Cet immobilisation préservent également l'infectiosité des propagules de MA en culture *in vitro* ou des essais *in vivo*.

La figure 4 r eprésente un modèle d'extraction, de purification, de conservation de germplasme .Les champignons MA peuvent être isolés de la rhizosphère des arbres au niveau de la nappe phréatique à des profondeurs pouvant atteindre 35m (1). Les spores sont soit multipliées en serre en combinaison avec une plante mycotrophe (2) ou cultivées en conditions monoxéniques en présence de racines isolées (3,4) ; elles peuvent aussi être associer à une plante hôte (5). Les formes intraracinaire des champignons MA (6,7) peuvent être utilisées comme inoculum de départ pour obtenir des cultures monoxéniques (8) dans les milieux M de (Bécard et Fortin, 1988) ou MSR de (Diop, 1995). Ainsi par cette technique, plusieurs générations de champignons MA sont obtenues par repiquage tous les quatre mois avec une transmission totale de la mycorhization : sans perte de viabilité (9). Même les pertes susceptibles de se produire peuvent être annihiler par une introduction dans le milieu d'une plante mycotrophe (10). Dans les systèmes de culture In vitro, l'utilisation de "sunbag" est une autre alternative pour l'obtention d'une production massale de spores exemptes d'une quelconque contamination (11).

MATERIEL ET METHODES

I.- Site d'étude

Le travail a été réalisé dans un premier temps au laboratoire (LBC) pour l'isolement des souches fongiques et leur conditionnement dans différentes étuvées selon les températures requises et dans un second temps en serre dans le jardin botanique du Département de Biologie végétale de la faculté des sciences et techniques de Dakar pour une éventuelle inoculation. Cependant le sol a été préalablement stérilisé par autoclavage (120°C pendant 1H 30mns) puis refroidit et mis dans des gaines de 1,5 kg pour éviter toute contamination extérieure qui pourrait affecter l'effet de l'inoculation mycorhizienne.

II.- Matériel fongique (voire photos)

Le matériel fongique utilisé est constitué de trois espèces de champignons du genre *Glomus*. Il s'agit de :

Glomus aggregatum (Schenke & Smith emend. Koske) (DAOM 227 128) : les spores sont quelquefois solitaires mais le plus souvent en petites grappes, sphériques à ovoïdes jaunes pales à dorées. Le diamètre des spores varie entre 30 et 210 µm. Dans quelques cas on observe la présence d'une structure sporale à l'intérieur d'une spore (Koske, 1984). La paroi sporale est formée de 1 à 2 groupes et l'hyphe suspenseur est souvent droit ou courbé.

Glomus mosseae (T.H. Nicholson & Gerd. Gerd & Trappe) (DAOM 227 131) : le nom *Glomus mosseae* a été donné à ce champignon pour rendre hommage à Barbara Mosse qui en 1962 a réalisé la première culture aseptique de spores en présence de racines isolées sur gélose (Langley & al., 1983). Les spores isolées de couleur jaunes à dorées sont globuleuses ou ovoïdes avec un diamètre pouvant varier de 100 à 320µm. L'hyphe suspenseur en entonnoir est caractéristique.

Glomus intraradices (Schenk & Smith) (DAOM 197 198) : Les spores sont soit en agrégats pourvues d'hypbes ou solitaires dans le sol et sont parfois même formées dans les racines. À l'étape juvénile, elles sont hyalines, jaune pâle à jaune grisonnant ; mais à maturité elles présentent une teinte verdâtre et sont de forme globuleuse à subglobuleuse. Leur diamètre est compris entre 30 et 120 µm.

Ces souches appartiennent à la collection du Laboratoire de Biotechnologies des Champignons (LBC) du Département de Biologie Végétale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

2.1- Production d'inoculum

Les souches utilisées comme source d'inoculum sont multipliées séparément en serre dans des pots en plastiques de capacité 1.5kg. La plante ayant servi de plante piège est le maïs (*Zea mays L.*), le substrat de culture est constitué de sable grossier de plage pauvre en phosphore préalablement lavé à l'eau courante et stérilisé à 120°C pendant 2h.

Les plants sont arrosés tous les 15 jours avec 100ml d'une solution nutritive de Long Ashton (voire annexe) (Hewit, 1966). Après trois mois de culture le substrat de culture et la partie racinaire du maïs infectée par la souche appropriée sont minutieusement récoltés et conservés au frais jusqu'à leur utilisation.

Composition du sable de plage

Caractéristiques physico-chimiques du sable de plage (Diop, 2003)

argile	Limon	limon	sable	sable	matière	C	P	N	C/N	pH
fin		grossier	fin	grossier	organique	(%)	ppm	(%)		eau
			(%)	(%)						
0,0	0,00	0,00	0,16	98,2	0,00	<0,08	16,00	0,073	Faible	8.50

2.2.- Bullage, Conditionnement et conservation

2.2.1- Bullage

L'extraction des spores se fait par tamisage humide selon la méthode de Gerdemann et Nicolson, (1963). Le substrat contenant les propagules mycorhiziennes (fragments de mycorhizes, spores, hyphes) est d'abord placé dans un grand bêcher puis rincé abondamment à l'eau de robinet. Après avoir laissé décanter pendant quelques secondes, la suspension sporale est versée dans un tamis à mailles très fines (32µ ou 50µm) pouvant retenir les spores. L'eau est alors filtrée et le résidu contenu dans le tamis versé dans un petit bêcher. L'opération de rinçage, de décantation et de tamisage humide est répétée trois fois afin de

récupérer le plus de spores possible. Le substrat tamisé sera ensuite réparti dans des tubes de centrifugation (tubes Corex). Une solution de saccharose à 60% est ajoutée dans chaque tube. Ces tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 8000 tours par minute à une température de 4°C.

Après centrifugation de la suspension sporale, il sera observé deux phases distinctes dans chaque tube de centrifugation : un liquide en suspension clair contenant les spores prélevé à l'aide d'une pipette et une phase solide plus dense constituée de débris divers accumulée au fond des tubes qui sera jetée. Les spores contenues dans le liquide en suspension sont placées sur un tamis à mailles fines (50µm) et rincées abondamment avec de l'eau afin de les débarrasser de l'excès de saccharose puis elles subissent un dernier rinçage avec de la solution physiologique additionnée d'antibiotiques. Elles sont conservées au froid à 4°C dans des tubes fermés avec la solution physiologique jusqu'à utilisation.

La sélection des fragments mycorhizés s'effectue à la loupe binoculaire. Les segments de racine sélectionnés sont ceux montrant la présence de vésicules. Ces segments sont sectionnés et mis dans des tubes eppendorf contenant du liquide physiologique et conservés au froid.

2.2.2- Conditionnement et conservation

Dans nos travaux, le conditionnement consiste à conserver les propagules mycorhiziennes (spores et fragments mycorhizés) dans un substrat sous une gamme de température allant de -4 à 45°C.

- **Le substrat** : Nous avons deux types de substrat

Le son de riz

Le son de riz mélangé avec de la gomme arabique

Pour la préparation de la gomme nous procédons de la sorte :

Dans 100ml d'eau distillée chaude nous malaxons 60g de gomme en poudre ce qui nous permet d'obtenir une solution de gomme relativement homogène. C'est ainsi que pour une quantité de gomme nous ajoutons une quantité de son de riz ce qui nous permet d'avoir un autre substrat.

- **températures** : les différentes températures testées sont les suivantes :

-20°C

0°C

4°C

25°C

35°C

45°C

- **propagules** : deux types de propagules sont utilisés : les spores et les fragments mycorhizés

Ce dispositif peut être qualifié de factoriel puisque toutes les combinaisons de facteurs s'y retrouvent.

A la loupe, les propagules mycorhiziennes sont récupérées à l'aide d'une micropipette en raison de 20 pour les spores et 3 pour les fragments mycorhizés et déposées dans le substrat contenu dans des boites de pétri. Pour chaque température nous effectuons 5 répétitions.

Les boites de pétri sont ensuite conservées aux températures pré requises pour une durée de deux mois.

III.- Matériel végétal

Des graines *d'Acacia nilotica var adansoni* fournies par la direction des semences (Pronasef) ont été utilisées. Au laboratoire les graines subissent une scarification chimique dans de l'acide sulfurique pendant 1H30, puis elles sont rincées abondamment à l'eau afin de les débarrasser des traces d'acide avant d'être imbibées dans de l'eau stérilise pendant 24h .A l'issue de ce traitement, les graines sont déposées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose (0,8%) et placées à une température de 35°C à l'obscurité pour la prégermination

Au bout de 48h, les plantules sont transférées en serre pour l'inoculation avec les propagules préalablement conditionnées à différentes températures.

IV.- Dispositif expérimental

L'inoculation a été effectuée au moment de la transplantation en serre. Le dispositif expérimental utilisé est de type factoriel faisant intervenir 3 facteurs que sont : la température, le substrat et les propagules. Les plantes sont disposées dans un système totalement randomisé avec 4 répétitions par traitement. Elles sont maintenues en culture pendant 3 mois. L'abri est éclairé par la lumière du jour avec une photopériode approximative de 12h et une température de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Les plants sont régulièrement arrosés à l'eau de robinet et maintenues à la capacité du champ.

V.- Paramètres mesurés

Afin de détecter l'impact de l'inoculation sur les plants de *Acacia nilotica*, un suivi de l'évolution de la croissance des plants est effectué à l'aide de mesure de leur taille tous les 15 jours pendant 3 mois.

À la récolte, la biomasse aérienne a été séchée pendant 72 h à l'étuve à 75°C afin de déterminer le poids sec aérien.

Pour estimer l'infection mycorhizienne arbusculaire, des prélèvements de racines sont effectués. Les racines séparées de leur partie aérienne sont soigneusement rincées à l'eau de robinet pour éliminer les particules adhérentes de sable. Elles sont ensuite éclaircies au KOH 10% et colorées au bleu Trypan (0,05%) selon la méthode de Philips et Haymans (1970).

Le taux de mycorhization est par la suite évalué par la méthode de Gridline intersect method (Giovannetti and Mosse, 1980).

Pour la nutrition minérale, l'azote total a été dosé selon la méthode de Kjeldahl, le phosphore selon la méthode au métavanadate et molybdate d'ammonium (Jakson) et le potassium par photométrie au niveau du laboratoire d'analyses des sols de la Compagnie Sucrière Sénégalaise (C.S.S.), Richard Toll, Sénégal.

La méthode de Green Line permettra par la suite de déterminer l'intensité de la mycorhization

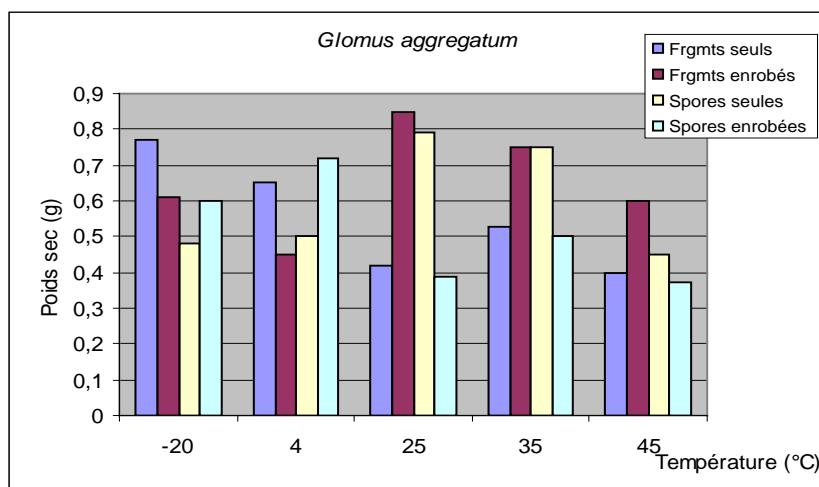
Résultats et Discussions

I.-Impact des différentes souches sur le poids de matière sèche de la partie aérienne des plants de *Acacia nilotica*

1.1-Impact de *Glomus aggregatum*

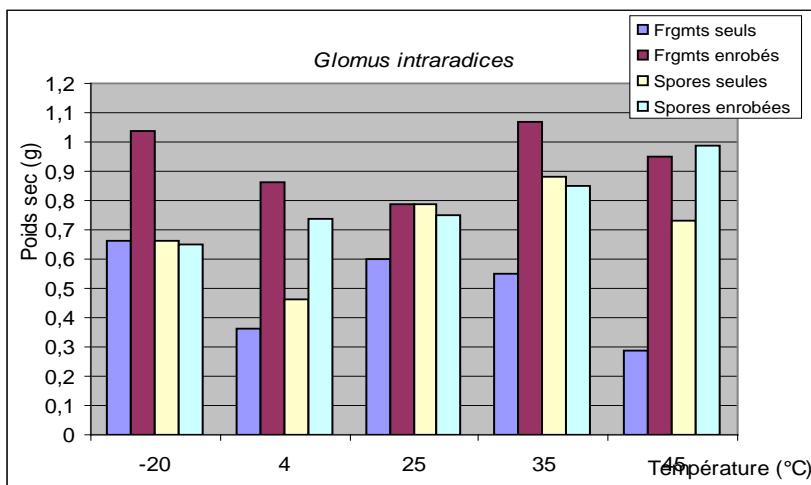
A la température de -20, la meilleure production de biomasse est observée avec l'inoculation avec les fragments racinaires mycorhizés non enrobés alors que les plants les moins développés ont été observés lorsque l'inoculum est constitué de spores non enrobées.

A la température de conservation 4°C, les biomasses les plus importantes ont été retrouvées avec l'inoculation avec les spores enrobées. De poids secs relativement très faibles de moins de 0.3 g ont obtenu lorsque l'inoculum est composé de spores enrobées. Les meilleurs rendements avec l'inoculation avec cette souche quel que soit le traitement considéré sont obtenus au niveau de l'inoculation avec le non enrobage des fragments mycorhizés et les spores non enrobées à la température de 25°C alors qu'aucune différence significative n'est notée entre l'effet de l'inoculation avec les fragments racinaires non enrobés et celui de l'inoculation avec des spores enrobées. Lorsque la température de conservation est de 35°C, le non enrobage des fragments ainsi les spores non enrobées induisent toujours les meilleurs rendements avec un poids sec moyen de 0.75 g. Avec l'inoculation avec les spores enrobées, induits par les autres types d'inoculum. A la température 45 °C de conservation de l'inoculum, seuls les fragments mycorhizés permet une production de matière satisfaisante ; le poids sec moyen observé avec les autres inocula reste faible et aucune différence significative n'est notée entre leurs effets respectifs sur la production de biomasse des plants d'*Acacia nilotica*.



1.2-Impact de *Glomus intraradices*

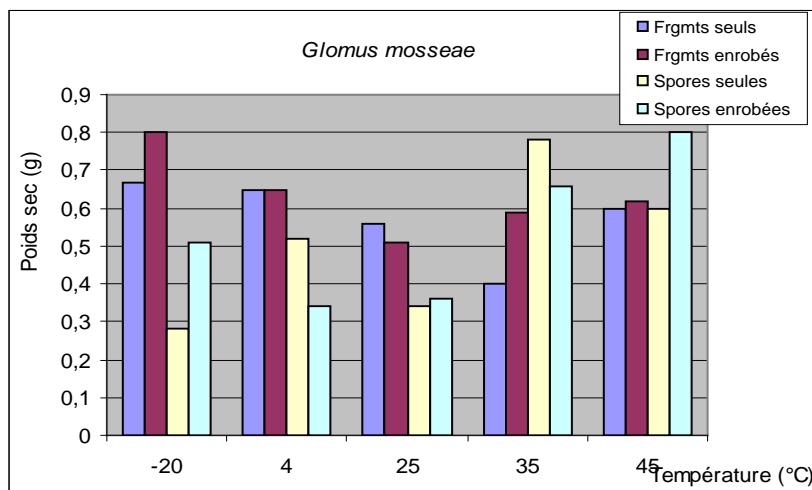
Avec cette souche, l'enrobage des fragments stimule considérablement la production de matière. En effet le moyen poids sec moyen des plants avec ce traitement est plus de 1 g et moins de 0.7 g avec les autres types d'inoculum. Lorsque la température de conservation est de 4°C, les fragments enrobés permettent une plus grande stimulation de biomasse. Les biomasses obtenues avec l'inoculation par les propagules non enrobées sont les moins importants observés avec cette souche à cette température. Lorsque la température monte à 25°C, aucune différence sur la biomasse n'est notée entre les plants inoculés par des spores enrobées ou non ou par des fragments mycorhizés enrobés. A cette température de conservation, l'inoculum formé de fragments non enrobés induisent les poids secs les plus faibles. A la température de 35°C, les fragments enrobés induisent considérablement une stimulation de la production de biomasse comparativement aux autres types d'inoculum. L'inoculum constitué de fragments seuls restent comme avec les températures les plus basses le moins stimulant. Ce même inoculum a également induit l'effet le moins positif sur la production des parties aériennes (0.3 g de poids sec moyen) quand la température de conservation monte à 45 °C . A cette température, l'enrobage permet une meilleure stimulation du développement en biomasse des plants d'*Acacia nilotica* dont le poids sec moyen dépasse 0,9 g.



1.3-Impact de *Glomus mosseae*

Avec l'inoculation avec les fragments racinaires enrobés et conservés à -20°C, le poids sec moyen est plus important comparativement à celui obtenu avec l'inoculation avec les autres types de propagules. La biomasse la moins importante est observée avec les spores non enrobées ; le poids sec moyen des plants est moins de 0.3 g. Une augmentation de la température de l'inoculum à 4° C, entraîne une diminution de l'effet stimulant des fragments racinaires mycorhizés enrobés sur le poids de matière des plants comparativement aux observations faites à -20° C. Les plus faibles biomasses sont enregistrées avec l'inoculation avec des spores enrobées qui induisent des poids secs moyens environ de 0,3 g alors qu'avec tous les autres inocula, la valeur de cette variable est de plus de 0,5 g.

L'augmentation de la température de 10°C entraîne une stimulation de l'inoculum constitué de spores seules sur la biomasse. Avec ce type d'inoculum, on assiste à une augmentation de plus du double du poids sec comparativement aux valeurs obtenues à la température de conservation 25° C . Avec la conservation à 45°C, les meilleures productions des parties aériennes des plants ont été constatées avec l'enrobage des spores avec lequel les poids sec moyen des plants passe à 0,8 g. Aucune différence significative n'est notée entre les effets respectifs de l'inoculum constitué de fragments racinaires mycorhizés enrobés ou non et spores seules. Le poids sec moyen des plants obtenu avec ces propagules est environ de 0,6 g alors que lorsque l'inoculum est constitué de spores enrobées la production des parties aériennes augmente jusqu'à 0,8 g de poids sec.

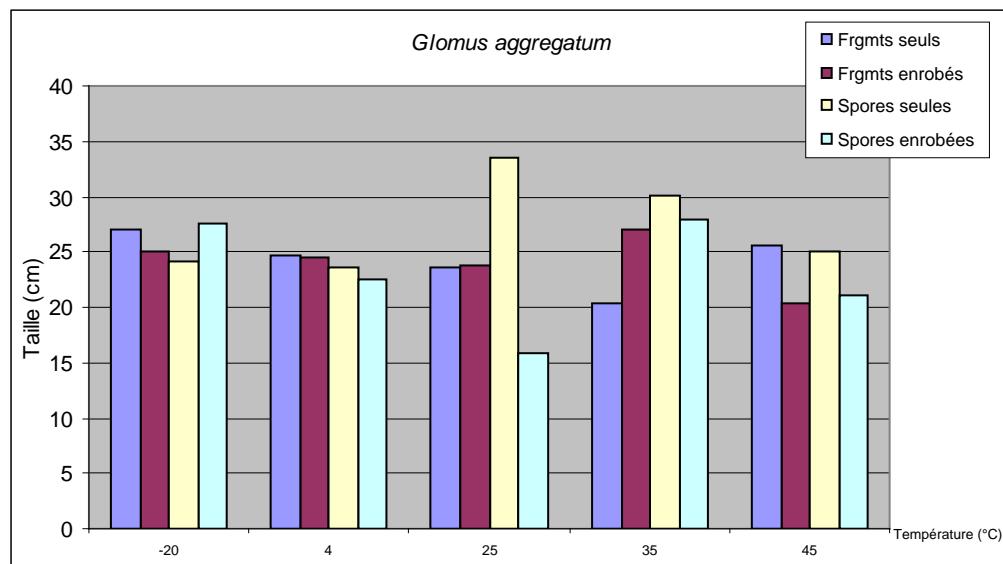


II.- Effet des différentes souches sur la croissance en hauteur des plants de *Acacia nilotica*

2.1-Effet de *Glomus aggregatum*

Les plants inoculés avec les spores enrobées et les fragments racinaires non enrobés conservées à -20°C, ont une taille moyenne un peu plus importante que celle des plants inoculés avec les autres inocula conservés à la même température. A la température de 4°C, la croissance en hauteur des plants n'est pas très importante quelle que soit la propagule enrobée ou non, testée et aucune différence significative n'est notée sur le développement en croissance des plants en fonction du type d'inoculum. Si on augmente la température de conservation jusqu'à 25°C, l'inoculum constitué de spores non enrobées devient très efficace sur la croissance en hauteur des plants. Par contre, les plants inoculés avec ces propagules enrobées conservées à cette même température ont présenté un développement en hauteur très faible comparativement aux autres traitements. L'augmentation de la température à 35°C, a entraîné une diminution d'efficacité sur la croissance en hauteur de l'inoculum non enrobé alors qu'avec l'enrobage la taille moyenne des plants augmente considérablement.

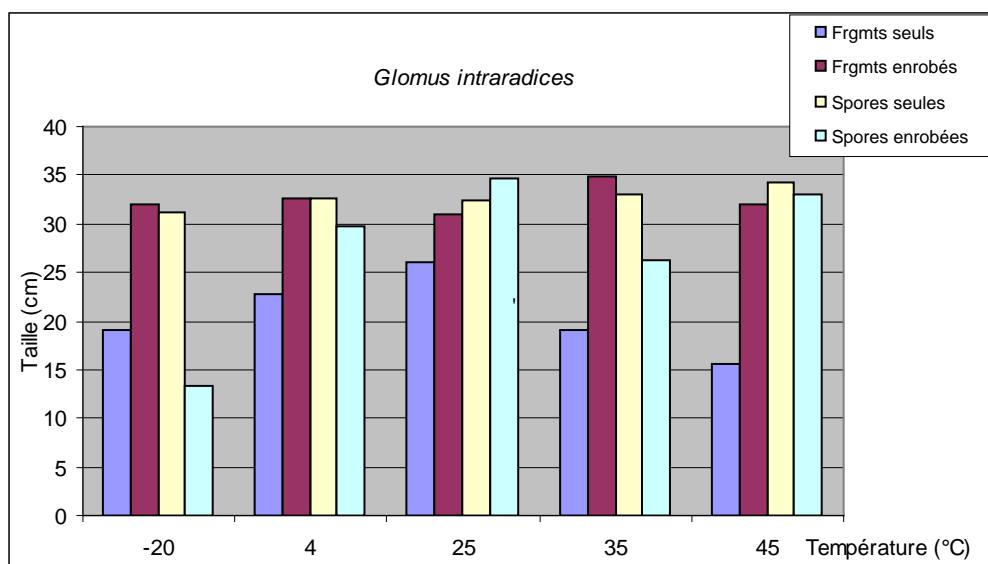
A la température de conservation 45°C, seuls les fragments racinaires mycorhizés non enrobés présentent une efficacité plus importante comparativement aux résultats obtenus à 35°C alors qu'on note une diminution des tailles moyennes des plants inoculés avec les autres inocula.



2.2-Effet de *Glomus intraradices*

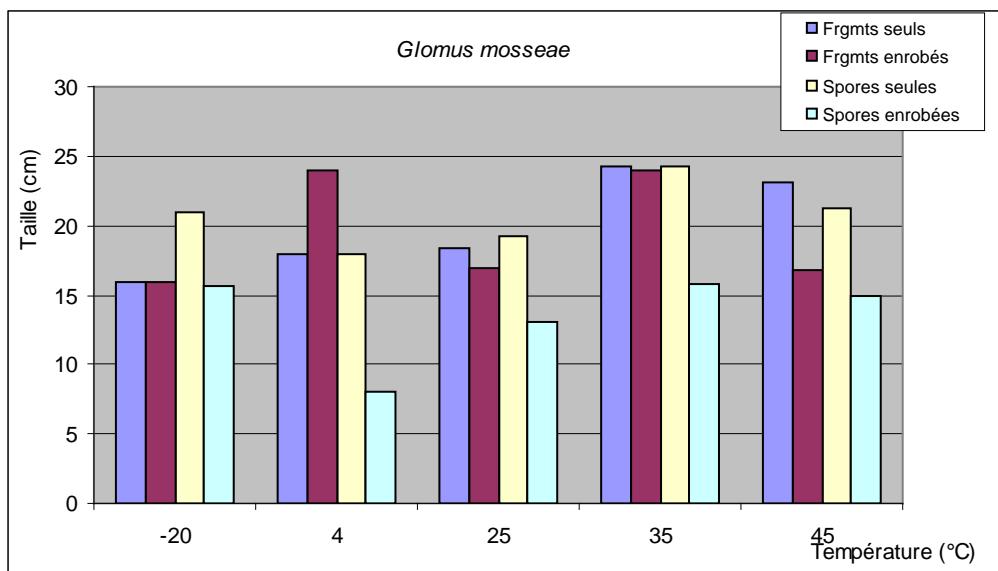
De très faibles croissances en hauteur des plants sont observées avec l'inoculation avec les fragments racinaires non enrobées ou les spores enrobées conservés à – 20°C. Une différence de plus de 10 cm est notée entre la tailles moyennes des plants inoculés avec ces types d'inocula et celles des plants inoculés avec les fragments enrobés ou spores enrobées.

A la température de conservation 4°C, une bonne stimulation de la croissance est observée surtout chez les plants inoculés avec les spores enrobées. On note même une augmentation légère du développement en hauteur des plants dont l'inoculation a été effectuée avec des fragments racinaires mycorhizés non enrobés. Quand la température de conservation passe à 25°C, tous les types d'inoculum stimulent la croissance en hauteur avec des tailles allant même jusqu'à 35 cm. Une augmentation de 10°C a entraîné une baisse de l'efficacité sur le développement en hauteur des plants inoculés avec des inocula constitués de fragments seuls ou de spores enrobées ; une diminution même de plus de 7 cm est notée chez ces plants. L'augmentation de la température de conservation à 45°C a permis une plus grande efficacité des spores enrobées sur la croissance bien qu'avec les autres types d'inocula on n'ait pas noté de variation considérable comparativement aux résultats obtenus avec la température de conservation 35°C.



2.3-Effet de *Glomus mosseae*

Aux conditions de conservation basses températures (-20°C), la taille moyenne des plants inoculés avec des spores non enrobées est de plus de 20 cm alors que les plants inoculés avec les autres types d'inoculum ont des tailles environ de 15 cm. A la température 4°C, la taille des plants inoculés avec les fragments racinaires mycorhizés passe à plus de 23 cm alors que les plants inoculés avec des propagules non enrobées ne présentent aucune différence de taille. Les tailles les plus faibles (environ 8 cm) sont enregistrées avec les plants inoculés avec les spores enrobées. Avec une augmentation de la température de conservation jusqu'à 25°C, l'inoculum constitué de fragments enrobés devient moins efficace sur le développement en hauteur des plants. Une augmentation d'efficacité des spores enrobées est notée à cette température comparativement aux résultats obtenus à 4°C. Un développement en hauteur important des plants est noté à 35°C et ceci quel soit le type de propagule considéré. La taille des plants inoculés avec les fragments racinaires enrobés ou non et les spores seules atteignent environ 24 cm et ceux inoculés avec les spores enrobées plus de 13 cm. Cependant, une augmentation de 10°C, entraîne une baisse de l'efficacité des inocula constitués des fragments racinaires et des spores non enrobées. Seules les spores enrobées résistant à cette température, maintiennent le même niveau d'efficacité sur le développement en hauteur des plants de *Acacia nilotica*.



III.- Effets des différentes souches sur la mycorhization de *Acacia nilotica* (Voir tableaux)

3.1-Mycorhization des racines de *Acacia nilotica* par *Glomus aggregatum* en fonction des modes de conditionnement et de conservation

Quelque soit la température de conservation, l'enrobage des fragments mycorhiziens induit la meilleure infection de *Acacia nilotica*.

Aux températures de conservation (-20°C, 4°C, 25°C et 45°C), toutes les autres propagules ont des influences similaires sur la mycorhization ce qui n'est pas le cas à 35°C.

3.2- Mycorhization des racines de *Acacia nilotica* par *Glomus intraradices* en fonction des modes de conditionnement et de conservation

Entre -20 et 35°C, le mode de conditionnement entraîne une colonisation racinaire similaire avec une nette prédominance des fragments enrobés suivie des autres propagules.

Par ailleurs, à 45°C, ceux sont les spores enrobées qui induisent une stimulation de la mycorhization plus significative.

3.3- Mycorhization des racines de *Acacia nilotica* par *Glomus mosseae* en fonction des modes de conditionnement et de conservation

A 4°C, 25°C, et 45°C, on ne note aucune différence significative sur la colonisation racinaire de *Acacia nilotica* quelque soit le mode de conditionnement. Cependant, aux températures -20°C et 35°C, l'enrobage des spores est moins favorable à l'établissement de la symbiose.

IV.- Influence des différentes souches sur la nutrition minérale des plants de *Acacia nilotica*

4.1-Influence des souches sur la teneur en azote des plants de *Acacia nilotica*

4.1.1-Influence de *Glomus aggregatum*

Au niveau des plants inoculés avec des inocula conservés à -20°C, les teneurs en azote les plus importantes (26 mg) sont trouvées au niveau des plants inoculés avec des fragments racinaires mycorhizés non enrobés. Une différence de teneur de plus de 5 mg est observée chez les plants inoculés avec les autres types d'inocula.

Quand la température de conservation augmente à 4°C, les plants inoculés avec les spores enrobées et les fragments racinaires non enrobés présentent les teneurs les plus élevées avec respectivement comme valeurs 25 mg et 22,75 mg. De très faibles teneurs d'azote (en moyenne 8,75 mg) sont obtenues avec l'inoculation avec l'enrobage des fragments racinaires mycorhizés. Avec une conservation de l'inoculum à 4°C, l'inoculation avec les fragments enrobés ou les spores seules induisent les plus importantes teneurs comparativement à celles obtenues au niveau des plants inoculés avec les autres inocula. La même tendance est quasiment maintenue quand la température de conservation est de 35°C. En effet, des va inoculation avec les fragments enrobés ou les spores non enrobées. Les plus faibles teneurs (17leurs moyennes de plus de 26 mg sont observées avec l',5 mg) sont trouvées chez les plants inoculés avec les spores enrobées. Si on augmente la température de conservation de 10°C, on note d'une manière générale une diminution de la teneur des plants en azote avec des valeurs un peu plus élevées chez les plants inoculés avec les fragments racinaires non enrobés.

4.1.2-Influence de *Glomus intraradices*

Une teneur moyenne de plus de 36 mg est observée au niveau des plants inoculés avec les fragments racinaires mycorhizés. Une différence de moins de 13 mg sur la teneur en azote des plants inoculés avec les autres inocula est observée comparativement à cel le des plants inoculés avec les fragments racinaires mycorhizés. Lorsque l'inoculum est conservé à 4°C,

les plus grandes quantités d'azote sont trouvées avec l'enrobage des fragments mycorhizés (30 mg en moyenne) alors que les plants inoculés avec les fragments racinaires non enrobées ont les teneurs les plus faibles (12 mg en moyenne).

A une température de conservation de 25°C, la plus faible teneur en azote est observée chez les inoculés avec les fragments racinaires non enrobés (21 mg) et aucune différence entre les teneurs en azote des plants inoculés avec les autres inocula n'est notée.

Avec une augmentation de la température de conservation de 10 °C, de fortes teneurs (plus de 37 mg) sont enregistrées chez les inoculés avec les fragments enrobées ou avec spores non enrobées ; avec cependant une différence moyenne au moins de 10 mg est observée chez les inoculés avec fragments non enrobés

4.1.3-Influence de *Glomus mosseae*

Avec cette souche, l'inoculation avec des fragments racinaires mycorhizés conservés à -20°C ont induit au niveau des plants les plus fortes teneurs d'azote comparativement aux plants inoculés avec des spores. L'augmentation de la température jusqu'à 4°C n'a pas permis de déceler de différence significative entre les teneurs en azote des plants inoculés avec fragments racinaires enrobés ou pas ou avec spores seules. Une petite diminution de cette teneur est observée chez les plants inoculés avec des spores enrobées conservées à cette température. Après une conservation de l'inoculum sous une température de 25°C, les spores enrobées ou ont induit des teneurs de plus de 23 mg ; la plus faible est obtenue chez les plants inoculés avec les fragments racinaires non enrobés (14 mg en moyenne). A la température de conservation de 45°C, les propagules enrobées ont permis des teneurs d'environ de plus de 28 mg ; avec les plants inoculés avec les autres propagules, on note des teneurs de 21 mg.

4.2-Influence des souches sur la teneur en phosphore des plants de *Acacia nilotica*

4.2.1-Influence de *Glomus aggregatum*

Les mêmes teneurs de phosphore sont trouvées au niveau des plants inoculés avec les propagules enrobées conservées à -20°C pendant 3 mois. A cette température de conservation, les quantités de P les plus importantes ont été enregistrées chez les inoculés avec les fragments racinaires non enrobés. A la température de 4°C, l'inoculation avec des spores

enrobées permet d'obtenir les plus grandes teneurs (3,60 mg en moyenne) alors que les plus faibles sont notées au niveau des plants inoculés avec des fragments racinaires enrobés. Lorsque les fragments racinaires sont enrobés et conservés sous une température de 25°C, les plants présentent les plus fortes teneurs de phosphore (4,25 mg en moyenne) comparativement aux autres types d'inocula conservés à la même température. Après une conservation sous une température de 35°C, les teneurs de P les plus importantes sont notées au niveau des plants inoculés avec des fragments enrobés ou avec des spores non enrobées (3,75 mg en moyenne) ; les plus faibles teneurs étant trouvées au niveau des plants inoculés avec des spores enrobées. Pour une conservation à une température plus élevée (45°C), les fragments seuls induisent les plus fortes teneurs de P (3 mg en moyenne) au niveau des plants. Il est constaté une différence au moins de 1 mg de cette teneur au niveau des plants inoculés avec les autres types d'inoculum conservés à cette même température.

4.2.2-Influence de *Glomus intraradices*

Une teneur relativement élevée en P au niveau des plants est obtenue avec l'inoculation avec des fragments enrobés conservés à une température de -20°C, les plants inoculés avec les autres inocula conservés à la même température enregistrent des teneurs inférieures de P au moins de 1,5 mg. Après une conservation sous une température de 4°C, les plants inoculés avec les fragments ou spores enrobés montrent des teneurs moyennes de P largement supérieures à celles des plants inoculés avec les autres inocula conservés à la même température. A 25°C de température de conservation, les inocula constitués de spores enrobées ou non ou de fragments enrobés présentent les plus fortes teneurs de P (au moins 3,75 mg en moyenne) comparativement aux plants inoculés avec des fragments non enrobés dont la teneur en P est en moyenne de 3 mg. Avec une augmentation de la température de conservation à 35°C, les plus fortes teneurs de P (5,35 mg) ont été trouvées au niveau des plants inoculés avec des fragments enrobés ou avec des spores non enrobées ; les plants inoculés avec des fragments non enrobés présentant les plus faibles teneurs (2,74 mg). A 45°C, les inocula enrobés ont induit des teneurs au moins de 4,5 mg au niveau des plants, les fragments non enrobés ayant induit les teneurs les plus faibles (1,45mg).

4.2.3-Influence de *Glomus mosseae*

Une teneur de P en moyenne de 4 mg est mesurée au niveau des plants inoculés avec les fragments enrobés et elle représente la plus élevée trouvée chez les plants inoculés avec des inocula conservés sous la température de -20°C. Les teneurs de P les plus faibles sont notées chez les inoculés avec des spores non enrobées (1,4 mg en moyenne). Par contre, après une conservation sous une température de 4°C, les propagules non enrobées

4.3-Influence des souches sur la teneur en potassium des plants de *Acacia nilotica*

4.3.1-Influence de *Glomus aggregatum*

Au niveau des plants inoculés avec des inocula conservés à -20°C, les teneurs en azote les plus importantes (26 mg) sont trouvées au niveau des plants inoculés avec des fragments racinaires mycorhizés non enrobés. Une différence de teneur de plus de 5 mg est observée chez les plants inoculés avec les autres types d'inocula.

Quand la température de conservation augmente à 4°C, les plants inoculés avec les spores enrobées et les fragments racinaires non enrobés présentent les teneurs les plus élevées avec respectivement comme valeurs 25 mg et 22,75 mg. De très faibles teneurs d'azote (en moyenne 8,75 mg) sont obtenues avec l'inoculation avec l'enrobage des fragments racinaires mycorhizés. Avec une conservation de l'inoculum à 4°C, l'inoculation avec les fragments enrobés ou les spores seules induisent les plus importantes teneurs comparativement à celles obtenues au niveau des plants inoculés avec les autres inocula. La même tendance est quasiment maintenue quand la température de conservation est de 35°C. En effet, des va inoculation avec les fragments enrobés ou les spores non enrobées. Les plus faibles teneurs (17leurs moyennes de plus de 26 mg sont observées avec 1,5 mg) sont trouvées chez les plants inoculés avec les spores enrobées. Si on augmente la température de conservation de 10°C, on note d'une manière générale une diminution de la teneur des plants en azote avec des valeurs un peu plus élevées chez les plants inoculés avec les fragments racinaires non enrobés.

4.3.2-Influence de *Glomus intraradices*

Une teneur moyenne de plus de 36 mg est observée au niveau des plants inoculés avec les fragments racinaires mycorhizés. Une différence de moins de 13 mg sur la teneur en azote des plants inoculés avec les autres inocula est observée comparativement à cel le des plants inoculés avec les fragments racinaires mycorhizés. Lorsque l'inoculum est conservé à 4°C,

les plus grandes quantités d'azote sont trouvées avec l'enrobage des fragments mycorhizés (30 mg en moyenne) alors que les plants inoculés avec les fragments racinaires non enrobés ont les teneurs les plus faibles (12 mg en moyenne). A une température de conservation de 25°C, la plus faible teneur en azote est observée chez les inoculés avec les fragments racinaires non enrobés (21 mg) et aucune différence entre les teneurs en azote des plants inoculés avec les autres inocula n'est notée.

Avec une augmentation de la température de conservation de 10 °C, de fortes teneurs (plus de 37 mg) sont enregistrées chez les inoculés avec les fragments enrobées ou avec spores non enrobées ; avec cependant une différence moyenne au moins de 10 mg est observée chez les inoculés avec fragments non enrobés. Après une conservation à 45°C, les plants inoculés avec les propagules enrobées ont présenté les teneurs en azote les plus importantes (plus de 31 mg en moyenne). De très faibles teneurs en azote sont notées chez les plants inoculés avec les fragments racinaires non enrobés.

4.3.3-Influence de *Glomus mosseae*

Avec cette souche, l'inoculation avec des fragments racinaires mycorhizés conservés à -20°C ont induit au niveau des plants les plus fortes teneurs d'azote comparativement aux plants inoculés avec des spores. L'augmentation de la température jusqu'à 4°C n'a pas permis de déceler de différence significative entre les teneurs en azote des plants inoculés avec fragments racinaires enrobés ou pas ou avec spores seules. Une petite diminution de cette teneur est observée chez les plants inoculés avec des spores enrobées conservées à cette température. Après une conservation de l'inoculum sous une température de 25°C, les spores enrobées ou pas ont induit des teneurs de plus de 23 mg ; la plus faible est obtenue chez les plants inoculés avec les fragments racinaires non enrobés (14 mg en moyenne). A la température de conservation de 45°C, les propagules enrobées ont permis des teneurs d'environ de plus de 28 mg ; avec les plants inoculés avec les autres propagules, on note des teneurs de 21 mg.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude a permis de mettre au point des méthodes de préservation et de conditionnement de différentes propagules mycorhiziennes. Les paramètres mesurés nous ont édifiés sur les potentialités de mise en place d'unité de production d'inoculum au Sénégal.

Ainsi la gamme de température testée, supporte la conservation de l'inoculum et surtout maintient un fort taux de viabilité des propagules mycorhiziennes.

Aussi, cette étude a montré que les contraintes thermiques ne sont pas très importantes pour la culture des champignons symbiotiques. C'est ce qui explique sans doute leur ubiquité remarquable : dans la nature, l'état de mycorhization est la règle.

Les méthodes de conditionnement (enrobage par la gomme arabique ou non) permettent aussi aux propagules mycorhiziennes arbusculaires de conserver leur efficacité et leur agressivité même si on a noté une réponse génétique dans leur réactivité.

Des réponses positives ont été enregistrées sur les paramètres de mycorhization, de rendement et de nutrition de *Acacia nilotica* en conditions naturelles après trois mois de culture.

Il serait cependant intéressant de voir la réponse de ces propagules issues des méthodes de conditionnement proposées en conditions de stress abiotique (hydrique et salin) et biotiques (attaques parasitaires) et sur d'autres spéculations.

L'utilisation de la gomme arabique pour le conditionnement est moins coûteuse que l'enrobage par les billes d'alginate. Ceci offre aussi des possibilités réelles de valorisation de la filière gommeraie (*Acacia senegal* et *Sterculia setigera*).

Cette étude est la première au Sénégal concernant les conditions d'assurer la permanence génétique du géromplasm des champignons mycorhiziens et leur efficience. Ces résultats offrent des bases réelles de mise en place d'unités de production d'inoculum fiables en Afrique.

- ADDY H.D., BOSWELL E.P., KOIDE R.P. (1998).** Low temperature acclimation and freezing resistance of extraradical VA mycorrhizal hyphae. *Mycol.Res.* 102: 582-586.
- BAGO B., AZCON-AGUILAR C., PICHE Y. (1998a).** Architecture and development dynamics of the external mycelium of the arbuscular fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic culture conditions. *Mycology* 90: 52-62.
- BAGO B., AZCON-AGUILAR C., GOULET A. PICHE Y. (1998b).** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 139: 375-388.
- BAKER K.F., COOK R.J (1974).** Biological control of plant pathogens. St Paul: Am.Phytopathol.Soc.433pp
- BAREA J.M., AZCÓN R., AZCÓN-AGUILAR C. (1992).** Vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen fixing systems. In: Varma A, Norris JR, Read DJ (eds). Methods in microbiology, Vol 24: Experiments with Mycorrhizae. Academic Press, New York, pp 391-415.
- BARRET J.T. (1961).** Isolation, culture and host relation of the phycomycetoid vesicular- arbuscular mycorrhizal endophyte Rhizophagus, *Rec.Adv.in Bot.* , 2: 1725.
- BECARD G., FORTIN J.A. (1988).** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New phytologist* 108 : 211-218
- BECARD G., PICHE Y. (1989).** Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied And Environmental Microbiology*, 55, pp. 2320-2325.
- BECARD G., PICHE Y. (1989 a).** Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl. Environm. Microbiol.* 55: 2320-2325.
- BECARD G., DOUDS D. D., PFEFFER P. E. (1992).** Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *ppl. Environ. Microbiol.*, 58: 821-825.
- CAMIRE C. (1987).** Note de cours sur la pédologie forestière. Université Laval.
- CHAREST C.Y. DALPE, A. BROWN (1993).** The effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae and chilling on two hybrids of Zea mays L. , *Mycorrhiza*, 4: 89-92.
- CHABOT S., BEL-RHLID R., CHENNEVERT R., PICHE Y. (1992).** Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂ enriched conditions. *New. Phytol.* 122: 461-467.

- CRANENBROUCK S., VOETS L., BIVORT C., RENARD L., STRULLU D.G., DECLERCK S. (2005).** Methodologies for successful aseptic growth of arbuscular mycorrhizal fungi on root-organ cultures. In: Declerck S., Strullu D.G and Fortin J.A. (eds.) *In vitro culture of mycorrhizas*. Heidelberg, Springer-verlag.
- DALPÉ Y., DECLERCK S. (2002).** Development of *Acaulospora rehmii* spore and hyphal swellings under root-organ culture. *Mycologia*, 94, pp.850-855.
- DALPE Y., (1987).** Spore viability of some endogonaceae submitted to a single stage lyophilisation. In: Proceedings of the seventh North American on Mycorrhiza (Ed. By D. M. Sylvia, L. L. Hung and J. H. Graham), p. 279. 3-8 May 1987. Gainesville, FL, USA.
- DAVIES R.M. , MENGE J.A. , ERWIN D.C. (1979).** Influence for *Glomus fasciculatum* and soil phosphorus on *Verticillium* wilt of cotton. *Phytopathology* 69: 453-456.
- DECLERCK S., CRANENBROUCK S., DALPÉ Y., SEGUIN S., GRANDMOUGIN-FERJANI A., FONTAINE J., SANCHOLLE M. (2000b).** *Glomus proliferum* sp. Nov.: a description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. *Mycologia*, 92, pp. 1178-1187.
- DECLERCK S., D'OR D., BIVORT C., DE SOUZA F.A. (2004).** Development of extraradical mycelium of *Scutellospora reticulata* under root-organ culture: spore production and function of auxiliary cells. *Mycological Research*, 108, pp. 84-92.
- DECLERCK S., RISÈDE J.M., DELVAUX B. (2002).** Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with in vitro monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Horticulturae*, 93, pp. 301-309
- DECLERCK S., STRULLU D.G., PLENCHETTE C. (1998).** Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*, 90, pp. 579-585.
- DECLERCK S., STRULLU D.G., PLENCHETTE C., GUILLEMETTE T. (1996).** Entrapment of *in vitro* produced spores of *Glomus versiforme* in alginate beads: *in vitro* and *in vivo* inoculum potentials. *Journal of Biotechnology*, 48, pp. 51-57.
- DECLERCK S., STRULLU D.G., PLENCHETTE C. (1996 b).** In vitro mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol. Res.* 100.
- DECLERCK S., DEVOS B., DEVAUX B., PLENCHETTE C. (1994).** Growth response of micropropagated banana plants to VAM inoculation. *Fruits* 49: 103-109.
- DEHNE H.W. (1982).** Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathologische Zeitung*, 72, 1115-1119.
- DE SOUZA F.A., BERBARA R.L.L. (1999).** Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri t-DNA transformed roots. *Mycologia*, 91, pp. 343-350.

- DE SOUZA F.A., DECLERCK S. (2003).** Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulata* in monoxenic culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycologia*, 95, pp. 1004-1012.
- DIOP T. A., PLENCHETTE C. STRULLU D. G. (1994 a).** *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. *Symbiosis*, 17: 217-227.
- DIOP T. A. (1995).** Ecophysiologie des mycorhizes à vésicules et arbuscules associés *Acacia albida* Del. dans les zones sahéliennes et soudano-guinéennes du S énégala. Thèse de doctorat, Univ. d'Angers, France, 165p.
- DIOP T. A., BECARD G., PICHE Y. (1992).** Long term *in vitro* culture of an endomycorrhizal Fungu, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots carrot. *Symbiosis*, 12: 249-259.
- DIOP T.A. (1990).** Méthodes axéniques de production d'inocula endomycorhiziens à vésicules et arbuscules : étude avec le *Gigaspora margarita*. M Sc Thesis, Univ. Laval, Québec, Canada.
- DRAFT M.J., SPENCER, D., THOMAS G.E. (1987.)** infectivity of vesicular arbuscular mycorrhizal inocula after storage under various environmental conditions. *Transactions of the British Mycological Society* 88: 21-27.
- DOMMERGUES Y., MANGENOT F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (eds.) Paris, 477p.
- DOUDS D.D.JR. , SCHENK N.C. (1990).** Cryopreservation of spores of vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist* 115: 667-674.
- DOUDS D.D.JR., SCHENK N.C. (1991).** Germination and hyphal growth of VAM fungi during and after storage in soil at five matrix potentials. *Soil Biology and Biochemistry* 23:177-183.
- FRANCIS R., FINLAY R.D., READ D.J. (1986).** Vesicular-arbuscular in natural vegetation systems. IV. Transfer of nutrient in inter and intra-specific combination of host plants. *New Phytologist* 102: 103-111.
- FRANK A. (1877).** Über die biologischen verhältnisse des thallus einiger Krustenflechten. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 2, pp. 123-200.
- FERGUSON J.J., WOODHEAD S.H. (1982).** Production of endomycorrhizal inoculum. A. Increase and maintenance of vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi. In: Methods and principles of mycorrhizal Research (Ed.by. N.C. Schenk), pp 47 -54. American Phytopatological Society, St Paul, MN, USA.

- FELDEMANN F. , JUNQUEIRA N.T.V. , LIEBEREI R. (1990).** Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhiza as a factor of intergrated plant protection. Prague, August. Agricultures and Ecosystems 28.
- GARCI GARRIDO J.M., OCAMPO J.A. (1987).** Interaction entre mycorrizas VA y organismos patogenos de plantas. An. Edafol. Agrobiolog., 56, 1233-1245.
- GERDEMANN J. W., TRAPPE J. M. (1974).** Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Mem.* 5: 1-76.
- GERDEMANN J.W., NICHOLSON TH. (1963).** Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soils by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol soc* 46: 235-244.
- GERDEMANN J. W., (1968).** Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Ann. Rev. Phytopathol.* 6: 397-418.
- GIANINAZZI S., GIANINAZZI -PEARSON V., DIEM H. G. (1982).** Endomycorrhizae in the tropics. In Dommergues, Y.R., Diem, H.G. (ed.). *Microbiology of tropical soils and plant Productivity*, Junk, the hague, pp 209-251.
- GIANINAZZI PEARSON V., GIANINAZZI S.(1976).** Enzimatic studies on the metabolism of vesicular arbuscular mycorrhiza. I. Effect of mycorrhiza formation and phosphorus nutrition on soluble phosphatase activities
- GRYNDLER M., HRSELOVA H., CHVATALOVA I. ,VOSATKA M. (1998).** *In vitro* proliferation of *Glomus fistulosum* intraradical hyphae from mycorrhizal root segments of maize. *Mycological Research*, (9) 102, pp. 1067-1073.
- HARLEY J.L., SMITH S.E. (1983).** Mycorrhizal symbiosis. Academic Press Inc., London and New-York. 483 p.
- HARLEY J.L. (1978).** Nutrient absorption by ectomycorrhizas. *Physiol. Veg.*, 16, 533-545.
- HARLEY J.L., MC CREADY C.C. (1952).** Uptake of phosphate by escised mycorrhizas of the beech. II. Distribution of phosphate between host and fungus. *New Phytol.*, 51, 56-64.
- HEPPER C.M. , B. MOSSE (1980).** Vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ cultures, in tissue culture methods for plant phytologists, Blackwell Sci.Pub. ,Oxford, pp.167-171.
- HEPPER C.M., B. MOSSE (1975).** Techniques used to study the interaction between Endogone and plant roots, in Endomycorrhizas, F.E Sanders, B. Mosse and P.B. Tinker (éds), Academic Press, London, pp. 65-75.
- HEPPER C. M. (1983).** Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in vitro. *New. Phytol.* 93: 537-542.

- HEPPER C. M. (1987).** VAM spore germination and hyphal growth *in vitro*-prospects for axenic culture. In 7th NACOM, mycorrhizae in the next decade, practical application and research priorities (Ed. by D. M. Sylvia, L. L. Hung & J. H. Graham), pp. 172-174 University of Florida, Gainesville.
- HIRREL M.C., MEHRAVAN H., GERDEMANN J.W. (1978).** Vesicular arbuscular mycorrhizea in the Chenopodiaceae and Crucifereae: do they occur? *Can. J. Bot.* 56: 2813-2817.
- HUNG L.L.L., SYLVIA D.M. (1988).** Production of vesicular arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture, *Appl. Environ.* 54: 353-357.
- KHAN A. G., (1974).** The occurrence of mycorrhizas in halophytes, hydrophytes and xerophytes and of endogones spores in adjacent soils. *J. Gen. Microbiol.*, 81: 7-14.
- LINDERMANN R.G. (1992).** Vesicular arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions, dans Mycorrhizae in sustainable Agriculture, G.J. bethlenfalvay et R.G. Linderman (éds), ASA special publication n°24, Madison, Wisconsin, pp. 45-70.
- LOUIS I., LIM G. (1987).** Spores density and root colonisation of vesicular-arbuscular Mycorrhizas in tropical soil, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88: 267-324.
- MAC DONALD (1981).** Routine production of axenic vesicular-arbuscular mycorrhizas, *New Phytol.* , 89: 87-93.
- MEYER J.R., LINDERMANN R.G. (1986).** Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology Biochemistry* 18: 191-196
- MILLER, R.M., JASTROW, J.D. (1992).** The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. In bethlenfalvay, G.J. and Linderman, R.G. (ed.). Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA Special Publication? Madison, Wisconsin, USA. pp. 1-27.
- MOLINA R., TRAPPE J.M., STRICKLER G.S. (1978).** *Can. J. Bot.* 56., 1691-1695.
- MORANDI D. (1989).** Effects of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavanoid accumulation in soybean roots. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 697-701.
- MORTON J.B. (1986).** Three new species of Acaulospora (Endogonaceae) from high aluminium, low pH soils in West Virginia, *Mycologia*, 78: 641-648.
- MORTON J., BENNY G. (1990).** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycètes) : a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, 37: 471-491.

- MOSSE B., HEPPEL C. M. (1975).** Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ culture. *Physiological Plant Pathology*, 5: 215-223.
- MOSSE B. (1973).** Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annu.Rev. Phytopatol.* 11: 171.
- MOSSE B. (1959).** The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an Endogone sp. Causing vesicular mucorrhizae, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 42: 273-286.
- MOSSE B., J.P. THOMPSON (1984).** Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. *Can. J. Bot.* 62: 1523-1530.
- MUGNIER J., MOSSE B. (1987).** Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Infection in Transformed Root-Inducing T-DNA Roots Grown Axenically. *Phytopathology*, 77: 1045-1050.
- OJALA J. C., JARREL W. M. (1980).** Hydroponic sand culture systems for mycorrhizal research. *Plant and Soil*, 57: 297-303.
- PARADIS R., DALPE, Y., CHAREST C. (1995).** The combined effect of arbuscular mycorrhizas and short-term cold exposure on wheat. *New Phytol.* 129: 637-642.
- PAWLOWSKA T.E., DOUDS D.D., CHARVAT I. (1999).** *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycological Research*, 103, pp. 1549-1556.
- PERRIN R. (1991).** Mycorhizes et protections phytosanitaires. In : les mycorhizes des Arbres et des plantes cultivées. Strullu D.G., Perrin R., Plenchette C., Garbaye J. eds. Technique et documentation, Lavoisier, Paris, France. Pp. 93-130.
- PEYRONEL B., FASSI B., FONTANA A., TRAPPE J.M., (1969).** Terminology of mycorrhizae. *Mycologia*, 61, 410-411.
- PIROZYNSKI K. A., DALPE Y. (1989).** Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis*, 7: 1-36.
- PLENCHETTE C., DECLERCK S., DIOP T.A., STRULLU D.G. (1996).** Infectivity of monoaxenic subcultures of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-T-DNA-transformed carrot root. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, pp. 545-548.
- PLENCHETTE C., FURLAN V., FORTIN J. A. (1982).** Effects of different Endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107: 535-538.

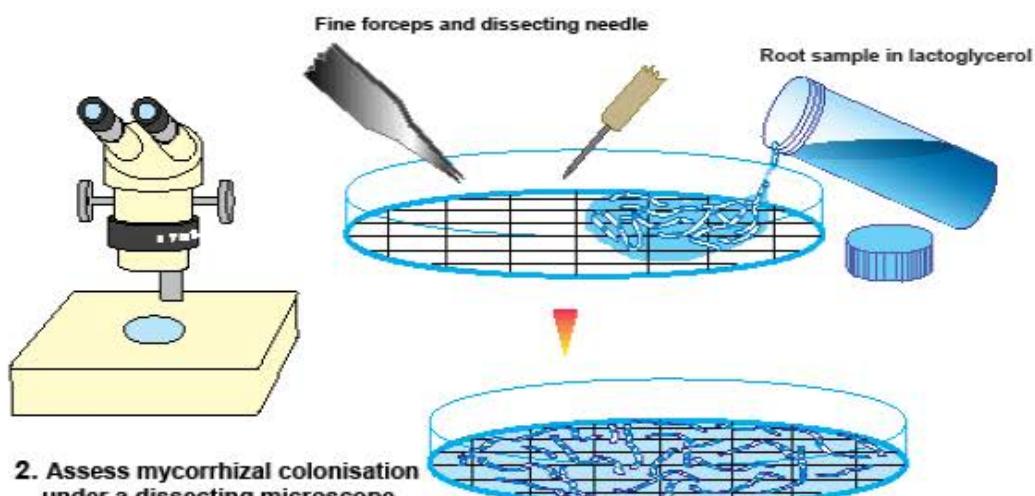
- RAJNCHAPEL-MESSAI J. (1989).** "Racines". Un nouveau scénario. Biofutur Mars 1989, pp 18-23.
- SAPHIR G.R. , COLEY S.C. , SIQUIERA J.O. , CALSON P.S.(1990).** Improvement and synchronization of VA mycorrhiza fungal spore germination by short-term cold storage. *Soil Biology and Biochemistry* 22:109-111.
- SCHENCK N. C., SMITH G. S. (1981).** Distribution and occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on Florida agricultural crops. *Soil and Crop Sci. Soc. Florida* 40, 171-175.
- SCHENK N.C., SMITH G.S. (1982).** Responses of six species of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and their effects on soybean at four soil temperature. *New Phytol.*, 92-93.
- SCHENCK N.C. , KELLAM M.K. (1978).** The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on disease development. *Fla. Agric. Exp. Stn. Bull.* 799.
- SCHENCK N., GRAHAM S. O., GREEN N. E. (1975).** Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, Vol. 67, No. 6: 1189-1192.
- SCHOENBECK F. (1979).** Endomycorrhiza in relation to plant diseases. In: *Soil-borne plant pathogens*, eds. Schippers B., Gams W., Academic Press, New York, 271-280.
- SCHOENBECK F. (1980).** Endomychorrhiza: Ecology, Function and phytopathology aspects. *Forum Microbiol* 3: 90-96
- SHETTY K.G., B.A.D. HETRICK, D.A.H. FIGGE, A.P. SCHWAB (1994).** Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. *Environ. Pollut.* 86: 181-188.
- SIKORA R.A., SCHOENBECK F. (1975).** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza (*Endogone mosseae*) on population dynamics of the root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne halpa*). VIII Int. Congr. Plant. Protoc. Moscou. 5: 158.
- SIMON L., LALONDE M., BRUNS T., (1992).** Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* 58: 291-295.
- SIMON L., BOUSQUET J., LEVESQUE R.C, LALONDE M. (1993a).** Origine et diversification des mycorhizes endomycorrhizales et coïncidence avec les plantes vasculaires terrestres. *Nature*, 363 : 67-69.

- SIMON L., LEVESQUE R.C, LALONDE M., (1993b).** Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent Single-Strand Conformation Polymorphism-Polymerase Chain Reaction, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 4211-4215.
- SIMONEAU P., LOUISI-LOUIS N.L., PLENCHETTE C., STRULLU D.G. (1994).** Accumulation of symbiosis-related (SR)-polypeptides in RI T-DNA transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae, *Applied Environ. Microbiol.*, 60: 1810-1813.
- SMITH G.C. (1998).** The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi with soil borne nematodes and fungi. *Phytopathology* 78: 371-374.
- SMITH S.E., READ D.J. (1997).** Mycorrhizal symbiosis. San Diego, CA, USA, Academic Press. Soil, 165: 261-274.
- ST-ARNAUD M., HAMEL C., VIMARD B., CARON M., FORTIN J.A. (1996).** Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research*, 100, pp. 328-332.
- ST JOHN T.V., (1980).** Root size, root hairs and mycorrhizal infection: a re-examination of Baylis's hypothesis with tropical trees. *New Phytologist* 84: 483-487.
- STRULLU D.G., DIOP T.A., 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. Comptes Rendus de l'Academie des sciences 320 : 41-47.
- STRULLU D. G., ROMAND C. (1986).** Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. C. R. Acad. Sci Paris, t. 303, Série III, No 6 245-250.
- STRULLU D. G., ROMAND C. (1987).** Culture axénique de vésicules isolées à partir d'endomycorhizes et ré-association *in vitro* à des racines de tomates. C. R. Acad. Sci. Paris, t. 305, Série III, p. 15-19.
- STRULLU D.G., GOURET J.P. (1981).** Microanalyse des granules vacuolaires des ectomycorhizes, endomycorhizes et endomycothalles. *Physiologie végétale* 19 :367-378.
- STRULLU D. G., PERRIN R., PLENCHETTE C., GARBAYE J. (1991).** Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. Lavoisier, Paris.
- SUBRAMANIAN K.S., CHAREST C. (1995).** Influence of arbuscular mycorrhizae on the metabolism of maize under drought stress. *Mycorrhiza* ,5 : 273-278.

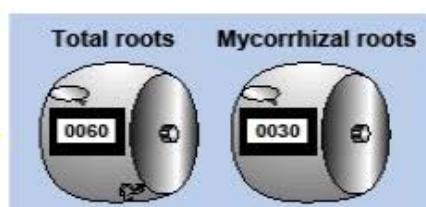
- SYLVIA D.M., GIBSON J., HUBELL D.H.,(1984).** Production of inocula of VA mycorrhizal fungi. In: Applications of Mycorrhizal Fungi in Crop Production (Ed. By J.J. Ferguson), pp. 8-16. University of Florida, Gainesville, FL.
- TOMMERUP I.C.,(1988).** Long term preservation by L -drying and storage of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Transactions of the British Mycological Society 90, 585-591.
- TOMMERUP I.C., BETT K.B. (1985).** Cryopreservation of genotypes of VA mycorrhizal fungi. In: Proceedings of the sixth Nord American Conference on Mycorrhiza. (Ed. By R. Molina) , p. 235, 25-29 June Bend, OR, USA.
- TOMMERUP I.C. (1983).** Spore dormancy in vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi . Transaction of the British Mycological Society 81: 37-45.
- YOUNG J.L. (1982).** Survival of endomycorrhizal spores/ propagules during long term air-dry storage. Agronomy Abstract 199.
- ZOBEL R. W., TREDICI P. D., TORREY J. G. (1976).** Method for growing plants aeroponically. *Plant Physiology*, 57: 344-346.

THE GRIDLINE INTERSECTION METHOD

1. Randomly disperse cleared and stained roots in dish with grid lines



2. Assess mycorrhizal colonisation under a dissecting microscope



3. Follow all horizontal and vertical lines. Count intersects with roots and mycorrhizas separately

