

Université de Montréal

**Reproduction et échanges génétiques horizontaux chez
les champignons mycorhiziens à arbuscules**

par

Julie Marleau

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. sc.
en sciences biologiques

Décembre 2010

© Julie Marleau, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Reproduction et échanges génétiques horizontaux chez les champignons mycorhiziens à
arbuscules

Présenté par :

Julie Marleau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Marc St-Arnaud, président-rapporteur

Mohamed Hijri, directeur de recherche

Anja Geitmann, membre du jury

Résumé

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) ont une structure génétique très particulière et certains aspects de leur génétique sont encore incompris et peu documentés. Les CMA se reproduisent par voie asexuée à l'aide de spores multinucléées. Dans cette étude, j'ai cherché à comprendre les mécanismes de l'hérédité génétique des noyaux par la voie de la reproduction asexuée chez les CMA. La première étape était de déterminer le contenu en noyaux des spores matures, ainsi que celui des spores en formation. Des analyses statistiques ont été utilisées pour vérifier le type de relation entre le nombre de noyaux et le diamètre des spores. Quatre espèces du genre *Glomus* ont été observées au microscope confocal. Les résultats démontrent une hétérogénéité entre les spores dans leur contenu en noyau pour un même diamètre en plus d'une relation positive entre le nombre de noyau et le diamètre de la spore. Afin de vérifier le contenu en noyaux dans les phases extraracinaires, trois différentes structures du mycélium ont été observées au microscope confocal. Aucune structure n'a été retrouvée avec un seul noyau, ce qui permet de conclure que les CMA ne possèdent vraisemblablement pas de stade uninucléé dans leurs phases extraracinaires. Pour étudier l'hérédité des noyaux, deux différentes approches ont été utilisées: (i) *Glomus irregulare* a été mis sur milieu complémenté avec de l'aphidicoline pour inhiber la mitose. Des observations au microscope confocal ont permis de dénombrer les noyaux qui sont issus des hyphes et non des mitoses. Les résultats indiquent que la population de noyaux présents dans les spores matures provient d'une migration massive de noyaux à l'intérieur des spores en formation suivie d'un nombre faible de mitoses. (ii) La deuxième approche est l'observation microscopique en temps-réel de spores en formation de *G. diaphanum* qui a permis de confirmer cette affirmation, car il a été possible de voir plusieurs noyaux entrer dans la spore.

Dans la dernière partie de cette étude, je me suis intéressée aux échanges génétiques horizontaux chez les CMA qui sont possibles grâce aux anastomoses. Quatre isolats de l'espèce *G. irregulare* ont été croisés en co-culture par couple de deux isolats (six croisements) pour permettre une proximité propice aux anastomoses et aux échanges

génétiques. Ces croisements ont été maintenus pendant deux ans en culture par le repicage des racines colonisées. Des spores des deux différents isolats ont été confrontées sur eau gélatinée, afin d'observer la formation d'anastomose. Un pourcentage de 13% de formation de fusions d'hyphes pour une des confrontations suggère que l'échange des marqueurs parentaux a pu avoir lieu entre les deux isolats grâce aux anastomoses. Un marqueur moléculaire mitochondrial nommé Indel 5 a été développé et utilisé pour l'analyse des spores filles. Ce marqueur possède entre les isolats une délétion de 39 pb et la différence entre les isolats est facilement détectable sur gel d'électrophorèse après amplification PCR. Le génotypage par PCR des spores individuelles a montré que certaines des spores filles issues du croisement possèdent un des deux marqueurs parentaux alors que d'autres spores ont un génotype qui semble posséder les deux marqueurs. Même si la fusion d'hyphes entre spores en germination est possible, d'autres recherches devront être réalisées pour confirmer qu'un échange génétique est possible entre deux isolats très éloignés géographiquement.

Le fait qu'il n'existe aucun stade uninucléé au cycle de vie des CMA et qu'il y ait une migration massive de noyaux lors de la formation des spores permet de limiter la dérive génétique lors de la reproduction asexuée. Les anastomoses, quant à elles, permettent de rétablir la diversité génétique. Ces deux particularités de la génétique des CMA ont été fort importantes au cours de leur évolution pour permettre de maintenir une variabilité génétique élevée et permettre ainsi une grande adaptation à différents type d'habitats.

Mots-clés : Champignons mycorhiziens à arbuscules; variabilité génétique; échanges génétiques; noyaux multigénomiques; reproduction asexuée; anastomoses; microscopie confocale

Abstract

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) have a particular and complex genetic structure. Yet, many aspects of their genetics are still misunderstood and poorly documented. These organisms reproduce by asexual multinucleate spores. In this study, I investigated the mechanisms of genetic inheritance of nuclei through asexual reproduction in AMF. First, I determined the number of nuclei in mature and juveniles spores; I used statistical analysis to determine the relationship between the number of nuclei and the spore diameter. Four species from the genus *Glomus* were observed with a confocal microscope. The results showed that the number of nuclei has a significant positive relationship with spore diameter and more importantly, surprising heterogeneity in the number of nuclei among sister spores was found. To determine the number of nuclei in extraradical phases, three different structures from the mycelia were carefully examined with a confocal microscope. All the structures possessed more than one nucleus and showed that AMF probably lack a single-nucleus stage during their extraradical phases. To study the nuclei's heritage, two different approaches were used: (i) *Glomus irregulare* was grown on medium complemented with aphidicolin to inhibit the mitosis. Observations with a confocal microscope permit to count the nuclei that come from the hyphae and not from the mitosis. The results showed that massive nuclear migration and mitosis are the mechanisms by which AMF spores are formed. (ii) The second approach confirm these results because with time-laps live cellular imaging of young spores of *Glomus diaphanum* it was possible to see many nuclei to get in the spores.

In a second part of this thesis, I studied horizontal gene exchanges among AMF isolates through anastomoses. Thus, four isolates of the species *G. irregulare* were used in *in vitro* crossing experiments, in total six combinations using two isolates per crossing experiment. These crossing co-cultures were maintained over two years by subculturing. Spores of two different isolates were confronted *in vitro* prior to observation of anastomoses. 13% of spores formed anastomoses suggesting the occurrence of genetic exchange between two isolates. A mitochondrial molecular marker referred as Indel 5, was

used to genotype individual spores of crossing progenies. A 39 bp deletion occurs in the marker among different isolates and is clearly discriminated by PCR. PCR patterns showed that some spores seem to have both parental markers demonstrating that genetic exchange could occur between the two isolates used in crossing experiment. Even though hyphal fusions occur between germinating spores, subsequent research needs to be done to confirm genetic exchange among different isolates from different geographic areas.

The finding that AMF lack a single nuclear stage in their extraradical phases and that mitosis and nuclear migration are the mechanisms by which AMF spores are formed reduce genetic drift that acts on these organisms during asexual reproduction. Anastomoses are likely a mechanism that maintains the genetic diversity in AMF. These genetic characteristics of AMF were very important during their evolution to maintain a high genetic variability that allows their adaptation to many different ecosystems.

Keywords: Arbuscular Mycorrhizal Fungi; Genetic polymorphism; Horizontal Genetic Exchange; Asexual reproduction; Multinucleate and Multigenomic organisms; Anastomoses; Confocal microscopy

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvi
Avant-propos.....	1
Chapitre 1 <u>Introduction générale</u>	2
1.1 Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA).....	2
1.2 Les avantages de la symbiose.....	2
1.3 Évolution et taxonomie des CMA.....	4
1.4 La morphologie et la reproduction des CMA.....	6
1.5 La génétique des CMA.....	9
1.5.1 Variabilité génétique.....	9
1.5.2 Recombinaison.....	11
1.5.3 Organisation génomique: hétérocaryotie ou homocaryotie?.....	13
1.6 Les anastomoses.....	16
1.7 Les objectifs.....	20
1.7.1 Objectif général.....	20
1.7.2 Objectifs spécifiques.....	20
Chapitre 2 <u>Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi</u>	22
2.1 Abstract.....	23
2.1.1 Background.....	23
2.1.2 Results.....	23

2.1.3	Conclusions.....	23
2.2	Background.....	24
2.3	Methods.....	26
2.3.1	Fungal material.....	26
2.3.2	Confocal microscopy.....	26
2.3.3	Aphidicolin experiments.....	27
2.3.4	Spore selection and measurement over time.....	28
2.3.5	Viability of spores.....	28
2.3.6	Germination potential of spores.....	28
2.3.7	AM fungal extraradical mycelium.....	29
2.3.8	Statistical analyses.....	29
2.4	Results.....	30
2.4.1	Live cell imaging of AM fungal spores.....	30
2.4.2	Heterogeneity of the number of nuclei per spores.....	34
2.4.3	Mechanism of spore formation in <i>G. irregulare</i> and <i>G. diaphanum</i>	35
2.4.4	Spore formation over time and spore viability.....	37
2.4.5	Nuclear stage of extraradical phase.....	39
2.5	Discussion.....	40
2.6	Conclusions.....	44
2.7	List of abbreviations.....	44
2.8	Acknowledgements.....	44
2.9	Additional files.....	45
Chapitre 3	<u>Anastomoses et échanges génétiques entre différents isolats de <i>Glomus irregulare</i></u>	51
3.1	Résumé.....	52
3.2	Introduction.....	52
3.3	Méthodes.....	54
3.3.1	Matériel fongique et co-culture.....	54
3.3.2	Marqueurs moléculaires.....	55

3.3.3	Formation d'anastomoses	55
3.3.4	Échange génétique	55
3.4	Résultats	56
3.4.1	Marqueurs génétiques parentaux.....	56
3.4.2	Échange génétique	58
3.4.3	Anastomoses	57
3.5	Discussion	61
3.5.1	Marqueurs génétiques parentaux.....	61
3.5.2	Échange génétique	63
3.5.3	Anastomoses	62
3.6	Conclusion	67
	Conclusion générale	68
	Références	69

Liste des tableaux

Table 2.1: A, Spore volume increase of <i>in vitro</i> differentiated spores of <i>G. irregulare</i> over time (n=25); B, Percent spore viability and percent spore germination of <i>in vitro</i> differentiated spores of <i>G. irregulare</i> over time (n = 25, for each selected age category).....	39
Table 2.2: Number of nuclei in the different architectural structure forming the extraradical mycelium of <i>G. diaphanum</i> (n = 21 spores, 20 RH and 22 FB). This table differ from the publish one.	40
Tableau 3.1 : Pourcentage de germination, d'anastomoses, d'incompatibilité végétative et pourcentage de couple n'ayant eu aucun contact ou aucune réaction au contact pour trois différentes combinaisons de spores en germination provenant de différents isolats ou du même isolat. Le pourcentage d'anastomose a été obtenu par absence ou présence de fusion d'hyphe par couple et non par contact d'hyphe.	61

Liste des figures

- Figure 1.1:** Les trois structures du mycélium des CMA sont présentes sur cette image prise au microscope électronique à balayage. S: spore, R: *runner hyphae*, F: *fine branching*. L'échelle est de 30 μm 7
- Figure 1.2:** Photographie prise au microscope confocal à balayage laser de spores de *Glomus diaphanum* colorées au sytogreen. Les points de couleur dans les spores sont des noyaux d'ADN. Les couleurs sont artificielles et sont indexées par le programme du microscope selon la position du noyau dans l'axe des z dans la spore. 8
- Figure 1.3:** Anastomose entre deux individus différents du même isolat de l'espèce *Glomus irregulare*. Un groupe de spores et une spore ont été déposés sur gel pour germination. L'échelle est de 100 μm 17
- Figure 2.1: Live cellular imaging of AM fungi.** Spore of *G. diaphanum* visualized by confocal microscope showing 208 nuclei stained with SytoGreen fluorescent dye. **A**, 2D (x, y) merged image where nuclei are shown as green spots. **B**, 2D (y, z) merged digital image colour-indexed on z-depth from red to violet. **C**, 2D (x, y) merged digital image colour-indexed: red colour on the bottom and violet on the top to facilitate nuclear counting. Panels **A** and **C** are a maximum intensity projection of 260 optical sections with z-resolution of 0.15 μm . Scale bar represents 10 μm 31
- Figure 2.2: Number of nuclei per spore.** The number of nuclei in juvenile and mature spores plotted against spore diameter of *G. diaphanum* ($y = -162.53 (P = 0.00) + 5.76x (P = 0.00), R^2 = 0.57$). The diameter of spores plotted against the number of nuclei per spore. **A**, *G. irregulare* (n = 113); **B**, *G. aggregatum* (n = 105) and **C**, *G. cerebriforme* (n = 60). *G. cerebriforme* spores had the smallest number of nuclei per spore and were also the smallest in size, while *G. diaphanum* spores had the largest number of nuclei per spore. There is a positive linear relation between the number of nuclei per spore and spore diameter: *G. irregulare* ($y = -81.09 + 3.91x, R^2 = 0.3583$), *G. aggregatum*

($y = -45.69 + 2.65x$, $R^2 = 0.5252$) and *G. cerebriforme* ($y = -21.35 + 1.66x$, $R^2 = 0.3425$). All slopes were statistically significant at $p < 0.05$ 33

Figure 2.3: Heterogeneity of the number of nuclei per spore. The number of nuclei per spore compared with spore diameter grouped by classes for four AM fungal taxa. Coefficients of variation are shown in bold on the top of error bars. 34

Figure 2.4: Time-lapse series on AM fungal live spores. Panels represent 5 min intervals in a time-lapse sequence monitoring nuclear migration into a developing spore of *G. diaphanum* by confocal microscopy. SytoGreen stained nuclei move unidirectionally into the spore. Images were acquired on xyt mode. Arrowheads indicate the first (white) and second (red) nucleus entering the spore. Note that some nuclei are out of focus in the xy optical section and can be difficult to visualize. Scale bar on the top-left panel represents 10 μm . Numbers on the top left of each panel are minutes. 36

Figure 2.5: Spore development over time. **A** and **B**, Intercalary swellings along the double-walled hypha give rise to a spore primordium (arrow in **A**). **C** and **D**, 15 day-old juvenile spore with subtending hypha and a septum in the mother hypha (arrow in **C**). **E** and **F**, Intercalary 30 day-old spores with subtending hypha and bi-layered spore wall. **G**, Crushed 60 day-old spore with subtending hypha and separating spore wall layers. The apical portion of the mother hypha has emptied, septated and detached from the spore (arrow in **E**). **H**, 60 day-old spore observed with a confocal microscope. **I** and **J**, 90 day-old mature spore still attached to subtending hyphae. The images in panels **A**, **C**, **E**, **G** and **I** were taken by a differential interference contrast microscope. The projection of z-stack in panels **B**, **D**, **F**, **H** and **J** were taken by a confocal microscope where nuclei were stained with SytoGreen fluorescent dye. Scale bars represent 10 μm . **K**, Spore diameter plotted against spore age using a quadratic model ($y = -0,0107x^2 + 2,1243x + 5,9132$)..... 38

Figure 3.1: Marqueurs parentaux amplifiés avec amorces Indel 5 à partir de l'ADN total de chaque isolat de *Glomus irregulare*. puit **1**, DAOM 197198, puit **2**, DAOM 234328, puit **3**, DAOM 240415, puit **4**, témoin négatif. **M**, Marqueurs de poids moléculaires *1 kb DNA ladder plus*. 57

- Figure 3.2:** Alignement de séquences d'ADN d'un intergène du génome mitochondrial de trois isolats de *Glomus irregulare*. **1** DAOM 197198 (Québec, Canada) **2** DAOM 240415 (Manitoba, Canada) **3** DAOM 234328 (Finlande). 57
- Figure 3.3:** Gel d'électrophorèse des produits PCR de l'amplification avec amorces Indel 5 de l'ADN total des spores filles issues de la co-culture DAOM 240415 et 234328. Premier puit: Marqueurs de poids moléculaires *1 kb DNA ladder plus*, dernier puit : témoin négatif, autres puits : spores individuelles. 58
- Figure 3.4:** Anastomose entre deux individus différents du même isolat DAOM 197198 de l'espèce *Glomus irregulare*. Un groupe de spores et une spore ont été déposés sur gel pour germination. L'échelle est de 100 μm 59
- Figure 3.5:** Anastomose entre des hyphes appartenant à la même spore de l'isolat DAOM 197198 de l'espèce *Glomus irregulare*. L'échelle est de 20 μm 60
- Figure 3.6:** Anastomose entre des hyphes appartenant à la même spore de l'isolat DAOM 197198 de l'espèce *Glomus irregulare*. L'échelle est de 50 μm 60
- Additional file 2.1 – Video:** Example of a z-stack series of *Glomus diaphanum* live spore observed with a confocal microscope. Nuclei were visualized as large green spots with SytoGreen fluorescent dye, while mitochondria are shown as small green spots. The movie was acquired at 1 frame every 0.15 μm for a total of 260 frames and displayed at a rate of 5 frames/sec..... 45
- Additional file 2.2 – Video:** 3D reconstruction of 260 optical sections with z-resolution of 0.15 μm , showing a full turn of *G. diaphanum* live spore with nuclei color indexed. The movie is displayed at a rate of 5 frames/sec. 45
- Additional file 2.3 - Supplementary figure:** Merged image of 100 optical sections of sister spores of *G. diaphanum* showing heterogeneity of nuclear content. Nuclei were stained with SytoGreen fluorescent dye. Scale bar represents 47.62 μm 45
- Additional file 2.4 - Supplementary figure:** The mean number of newly produced spores plotted against time (days) of *G. irregulare* treated with aphidicolin diluted in DMSO

or DMSO alone as a control on six replicates each. Red and blue curves represent aphidicolin and control treatments, respectively.....	46
Additional file 2.5 - Supplementary figure: The number of nuclei per spore plotted against the diameter of spores of <i>G. irregulare</i> treated with aphidicolin (red squares, n = 22) and the control (blue triangles, n = 68).....	47
Additional file 2.6 – Video: Time-lapse series on <i>G. diaphanum</i> live spore. Nuclei were visualized as large green spots with SytoGreen fluorescent dye, while mitochondria were stained with MitoTracker and are shown as small red spots. The movie was acquired at 1 frame every 5 min for a total of 90 min and displayed at a rate of 5 frames/sec.....	47
Additional file 2.7 - Supplementary figure: Merged image of 150 optical sections of non-germinating spore of <i>G. diaphanum</i> showing nuclei in a degenerating phase. Nuclei were stained with SytoGreen fluorescent dye. Scale bar represents 19.71µm.	47
Additional file 2.8 - Supplementary figure: <i>G. diaphanum</i> spore observed with confocal microscope where nuclei were visualized by SytoGreen fluorescent dye (green spots) showing direct connection of spore and the subtending hyphal cytoplasm (arrows). A , xy focal plane; B , yz projection; and C , xz projection. Scale bar in panel A represents 17.93 µm.	48
Additional file 2.9 - Supplementary text and references: AM fungal spore development of <i>G. irregulare</i> over time, viability and germination rates.....	48
Additional file 2.10 - Supplementary figure: Cell wall structure of <i>G.irregulare</i> spores of different ages. A , Open 30 day-old spore with subtending hypha, outside hyaline spore wall and inside pale yellow pigmented spore wall. B , Closer view of 60 day-old spore wall with bi-layered outer walls and laminated inner wall. C , Walls of 90 day-old mature spore with bi-layered outer wall and multi-laminated inner wall. Images were taken with DIC optical microscope. A , Scale bar represents 20 µm. B , C , Scale bars represent 10 µm.....	50

Liste des abréviations

2D: deux dimensions

3D: trois dimensions

ADN: acide désoxyribonucléique

AFLP: amplified fragment length polymorphism

AMF: arbuscular mycorrhizal fungi

bp: base pairs

°C: degrés Celsius

cDNA: complementary desoxyribonucleic acid

CMA: champignons mycorrhiziens à arbuscule

DAOM : Herbar national de mycologie, Ottawa

DAPI: 4, 6-diamidino-2-phenylindole

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNA: desoxyribonucleic acid

DO: densité optique

FB: fine branching

FISH: fluorescence *in situ* hybridization

G.: *Glomus*

Gig.: *Gigaspora*

GINCO: Glomeromycota *in vitro* collection

HHM: hyphal healing mechanism

ITS: internal transcribed spacer

Kb: kilobases

LSU rDNA: large subunit ribosomal DNA

M: minimal (medium)

Ma: millions d'années

Mb: millions base pairs

ml: millilitre

mm: millimètre

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-yl,2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)

n: nombre

nm: nanomètre

NPI: native plants incorporated

pb: paire de base

PCR: polymerase chain reaction

PLS: polymerase 1-like sequence

PVLG: polyvinylique-lacto-glycerol

RAPD: random amplification of polymorphism DNA

RFLP: restriction fragment length polymorphism

RH: runner hyphae

Ri T-DNA: transferred DNA of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*

SSCP: single strand conformation polymorphism

UV: ultraviolet

μM: micromole

μm: micromètre

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. Mohamed Hijri pour ses conseils, son optimisme, sa patience envers moi et tout le temps qu'il a pris pour m'aider techniquement, pour m'aider à planifier mes expériences ou pour corriger et réviser mes textes. J'aimerais aussi remercier Dr. Marc St-Arnaud, car, même s'il n'a pas été mon co-directeur de recherche, il en a joué le rôle en m'aidant avec les statistiques et avec les programmes de références bibliographiques et en me donnant de précieux conseils. Je tiens à remercier le FQRNT pour la bourse de maîtrise qu'ils m'ont octroyée ainsi que le département de biologie pour leur bourse de fin de maîtrise.

Je tiens aussi à remercier Kevin Coquart et Mélodie Moody pour leur aide technique ainsi que Rachid Lalhali pour son aide avec les statistiques. Je veux aussi remercier Rabah Zerzour qui m'a souvent aidée à régler des problèmes informatiques et microscopiques. Merci aux étudiants de l'IRBV et au personnel pour tout l'aide qu'ils ont pu m'apporter au cours de ces trois années.

Finalement merci à tout le laboratoire Hijri, nouveaux ou plus anciens étudiants : Erin, Eva, Nadia, Julie, Youssef, Rachid, Saad, Denis et Maryam. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous, chacun de vous apportant de la bonne humeur et une force au labo. Merci pour votre aide technique et morale.

Avant-propos

Au cours de ma maîtrise, j'ai écrit un article scientifique qui a été soumis et accepté pour révision au journal BMC Evolutionary Biology, c'est pourquoi ce mémoire a été écrit par article. L'article a été révisé et retourné à la revue et est actuellement en attente pour l'acceptation finale. Cet article traite de la reproduction et de l'accumulation de noyaux à l'intérieur des spores formées lors de la reproduction asexuée chez les champignons mycorhiziens à arbuscules. La version de l'article révisée est présentée au deuxième chapitre.

Le premier chapitre est une revue de littérature sur des aspects généraux des champignons mycorhiziens à arbuscules, sur leur génétique et leur capacité à former des anastomoses.

Le troisième et dernier chapitre est un article qui traite des résultats que j'ai obtenus sur les échanges horizontaux et les anastomoses. Les résultats ne sont pas assez concluants ni suffisants pour que cet article soit soumis à une revue scientifique. Il amène toutefois une bonne réflexion et des suggestions pour des recherches futures sur les anastomoses.

Chapitre 1 Introduction générale

1.1 Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Les symbioses mycorhiziennes sont très répandues dans les divers écosystèmes de la terre. On les retrouve dans tous les types de milieux aussi bien des déserts que des forêts tropicales ou tempérées. Ces symbioses sont des associations bénéfiques pour les deux partenaires qui impliquent un champignon et les racines d'une plante, d'où le terme mycorhize (origine gréco-latine : *mukes* et *rhiza* veulent dire champignon et racine respectivement). Il existe plusieurs types de mycorhizes impliquant différents champignons et différentes plantes hôtes (Fortin *et al.*, 2008). Seuls représentants fongiques du groupe, les champignons mycorhiziens à arbuscules font partie des mycorhizes arbusculaires ou endomycorhizes. Ce sont de loin les plus répandus et ils forment des mycorhizes avec plus de 80% des espèces de plantes vasculaires (Smith & Read, 1997).

1.2 Les avantages de la symbiose

Les champignons mycorhiziens à arbuscules apportent énormément d'avantages aux plantes. Ils permettent une meilleure nutrition minérale dont le phosphore (Harrison *et al.*, 2002; Helgason & Fitter, 2005; Feddermann *et al.*, 2010), l'azote (Subramanian & Charest, 1999; Hawkins *et al.*, 2000; Hamel, 2004; Toussaint *et al.*, 2004; Tanaka & Yano, 2005) et d'autres cations essentiels tels que le zinc, le cuivre, le manganèse et le fer (Liu *et al.*, 2000). Le phosphore est un ion qui est naturellement peu disponible pour les plantes, car il se retrouve en complexe insoluble avec d'autres ions chargés positivement tel que le fer, l'aluminium et le calcium (Helgason & Fitter, 2005). Les CMA ont l'avantage d'exploiter un très grand volume de sol grâce à leurs hyphes extraracinaires qui peuvent aller chercher une plus grande surface de contact que ceux des racines des plantes. Cela permet ainsi d'augmenter considérablement l'absorption des minéraux et de l'eau. Ces hyphes extraracinaires favorisent l'agrégation des particules du sol grâce à la glomaline tout en améliorant son aération (Rillig & Mummey, 2006). Un autre avantage de la

symbiose pour les plantes hôtes est une protection accrue contre les pathogènes et les ravageurs qui s'attaquent à leurs racines (St-Arnaud & Vujanovic, 2007).

En retour le champignon reçoit tout son carbone de la plante sous forme de glucose, produit de la photosynthèse (Bago *et al.*, 2000). Les CMA sont des biotrophes obligatoires, ils ont besoin d'un partenaire végétal pour subvenir à leur nutrition et accomplir leur cycle de développement. Toutefois, la seule phase dans leur cycle de vie où le champignon ne dépend pas de la plante hôte est celle de la germination des spores (Bago *et al.*, 2000), car elles utilisent leurs réserves en carbone accumulées lors de leur développement. Durant cette phase de germination qui peut durer jusqu'à 3 à 4 semaines, les hyphes arrivent à proximité d'une racine et changent de morphologie par une ramification prononcée, stimulées par des exsudats racinaires (Harrison, 2005). Une fois en contact avec la racine, les hyphes forment des appressoria qui pénétreront les racines par pression mécanique. Le champignon colonise la racine et forme des hyphes dans les espaces intercellulaires du cortex racinaire. Le champignon colonise les cellules corticales de la racine sans toutefois pénétrer la membrane plasmique pour former l'organe d'échange de la symbiose; l'arbuscule. C'est par cette structure que se fait l'échange de carbone, de phosphore et des autres minéraux (Harrison, 2005).

Il y a de forts intérêts à étudier et à utiliser les CMA en agriculture en tant que biofertilisants. Leur application à grande échelle permet de réduire l'utilisation et la dépendance des fertilisants chimiques qui sont souvent associés à de graves problèmes environnementaux. L'utilisation intensive des fertilisants chimiques engendre la pollution des eaux de surface et des nappes phréatiques. Cette pollution entraîne la prolifération des algues bleues toxiques dans les lacs. En effet, les fertilisants chimiques amènent une concentration élevée en phosphore ou d'autres types de micronutriments, ce qui favorise la croissance de certains organismes comme les algues mais qui nuit à d'autres organismes comme les CMA. Effectivement, dans de telles situations, la colonisation des racines par le champignon et son système d'hyphes extraracinaires est moins efficaces (Liu *et al.*, 2000). Afin d'améliorer le potentiel des CMA en agriculture, il serait envisageable d'incorporer dans les inoculants commerciaux d'autres microorganismes qui agissent en synergie avec les CMA (Barea *et al.*, 1997) comme les bactéries solubilisatrices de phosphore (Toro *et*

al., 1997) et les bactéries fixatrices d'azote (Barea *et al.*, 2002). Il faut toutefois améliorer nos connaissances pour bien choisir l'isolat ou l'espèce de champignon mycorhizien à arbuscule selon le type de plant que l'on veut produire, car il est connu que certaines combinaisons de CMA et de plantes hôtes sont plus bénéfiques que d'autres (Munkvold *et al.*, 2004; Avio *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2006; Feddermann *et al.*, 2010). Dans certains cas, une mauvaise combinaison peut même avoir un effet négatif sur la croissance des plants (Smith & Read, 1997). Il est donc plus que nécessaire de connaître la génétique et la reproduction de ces champignons afin de pouvoir maximiser leurs effets positifs sur la croissance et la santé des plants destinés à l'agriculture, la foresterie et l'horticulture.

1.3 Évolution et taxonomie des CMA

Leur succès évolutif à pouvoir coloniser autant de plantes hôtes et autant d'écosystèmes est expliqué par le fait que les CMA sont apparus probablement avant les plantes terrestres il y a au moins 460 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000a; Redecker *et al.*, 2000b). Ceci supporte l'hypothèse que les CMA ont contribué significativement à la colonisation terrestre par des plantes primitives et à l'évolution et à la diversification des plantes vasculaires.

La datation de l'apparition des CMA a été permise grâce à des études fossiles et des études d'horloges moléculaires. Il avait été émis comme hypothèse que les CMA dataient du début du dévonien (400 Ma), car plusieurs structures fongiques retrouvées dans des fossiles étaient semblables à des structures endosymbiotiques. C'est toutefois par un fossile d'*Aglaophyton major*, une plante terrestre du début du dévonien, que l'hypothèse a été confirmée. Des arbuscules et des hyphes cénocytiques identiques à ceux d'aujourd'hui sont présents à l'intérieur du cortex de la plante fossile (Remy *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1995). Quelques années plus tard, d'autres fossiles plus anciens ont été découverts, ce qui a permis de repousser l'origine des CMA à au moins 460 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000a). Toutes ces données fossiles viennent confirmer les données moléculaires qui datent l'origine des CMA entre 353 et 462 millions d'années (Simon *et al.*, 1993). L'apparition des plantes vasculaires était reconnue pour dater du début du silurien (443 Ma), mais une découverte récente de spores fossiles typiques des plantes vasculaires

déplace leur apparition à environ 450 millions d'années (Stemans *et al.*, 2009). Les premières plantes primitives à avoir colonisé la terre seraient apparues il y a 475 millions d'années (Kenrick & Crane, 1997). Les CMA sont donc la première lignée à avoir formé des symbioses avec les plantes (Redecker *et al.*, 2000a) et ils sont probablement apparus avant les premières plantes primitives terrestres. Ces faits supportent l'hypothèse que les CMA ont joué un rôle important dans leur colonisation terrestre. De plus, la plupart des familles de plantes ont coévolué avec les CMA, ce qui indique que les premières associations ont dû se faire tôt au cours de leur évolution. Quelques familles de plantes comme les Brassicacées, les Cruciféracées et plusieurs espèces des Cypéracées ne forment pas de mycorhize avec les CMA. Il est fort probable que ces plantes ont perdu la possibilité de former des mycorhizes avec les CMA, puisqu'ils ont évolué à partir de lignée de plantes qui sont mycorhizées (Sanders, 2002; Wang & Qiu, 2006).

Les CMA ont connu beaucoup de changement en taxonomie, ne faisant pas exception à la règle en systématique. La problématique est universelle, le vivant a été largement classifié selon la morphologie dans le passé. Les CMA étaient classifiés, plus spécifiquement, selon les caractères structuraux et morphologiques de leurs spores. En 2006, un peu moins de 200 espèces avaient été décrites avec le type de formation de la spore et les caractéristiques de sa paroi (Redecker & Raab, 2006). Certaines études affirment que ce nombre est largement sous-estimé (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2002). En 2010, le nombre d'espèces décrites est monté à 219 (Stockinger *et al.*, 2010). Au départ, les CMA étaient classés dans le phylum des Zygomycètes (Morton & Benny, 1990; Rosendahl *et al.*, 1994; Morton & Redecker, 2001). Puis, des analyses moléculaires utilisant des gènes ribosomiaux ont démontré que les CMA seraient plutôt le groupe frère des Basidiomycètes et des Ascomycètes, déplaçant ainsi les CMA dans un nouveau phylum monophylétique, les Glomeromycota (Schüssler *et al.*, 2001). Tout récemment, une étude a utilisé des séquences mitochondriales au lieu de séquences nucléaires pour inférer une phylogénie. Les résultats démontrent que le genre *Glomus* serait plutôt le groupe frère des *Mortierella*, plaçant ainsi le genre *Glomus* dans le phylum des Zygomycètes (Lee & Young, 2009). Puisqu'il a été démontré à plusieurs reprises que les Gloméromycètes sont monophylétiques (Gehrig *et al.*, 1996; Redecker *et al.*, 2000b;

Schüssler *et al.*, 2001; James *et al.*, 2006), les auteurs concluent prudemment qu'il serait fort possible après vérification de remettre tout le groupe des Glomeromycota avec les Zygomycètes (Lee & Young, 2009). Quelques années avant cette étude, Redecker et Raab (2006) critiquaient les phylogénies inférées qui plaçaient les Glomeromycota comme groupe frère des Basidiomycota et des Ascomycota. Ils affirmaient que ces phylogénies n'étaient pas toujours bien supportées et que, de plus, elles indiquaient que les Zygomycètes ne seraient peut-être pas si éloignés des Mortierellales, des Chytridiomycota et des Glomeromycota.

Les CMA ont connu plusieurs changements non seulement au niveau de l'embranchement mais aussi à tous les autres niveaux taxonomiques. Par exemple, au niveau de l'espèce, l'isolat le plus étudié des CMA (DAOM 197198) était connu comme étant un isolat appartenant à l'espèce *Glomus intraradices*. Dernièrement, cet isolat a été reconnu comme faisant partie plutôt de l'espèce *Glomus irregulare* (Stockinger *et al.*, 2009; Sokolski *et al.*, 2010). Une étude a démontré que le genre le plus large du phylum des Glomeromycota, *Glomus*, qui regroupe plus de 70 espèces (Redecker & Raab, 2006), n'est pas monophylétique (Schwarzott *et al.*, 2001). De toute évidence, il reste encore beaucoup de travail à faire avant de pouvoir reconstituer l'histoire naturelle des CMA. Plusieurs autres phylogénies devront être inférées à l'aide de différents marqueurs.

1.4 La morphologie et la reproduction des CMA

Les CMA sont des êtres multinucléés et ils ont une morphologie rudimentaire quoique peu commune. Ils sont formés d'hyphes cénocytiques qui ne possèdent pas de septa ce qui permet aux noyaux de bouger librement dans le mycélium (Bago *et al.*, 1999). Leur morphologie a peu évolué depuis leur apparition puisque les arbuscules qu'on retrouve dans les fossiles datant de plus de 400 millions d'années ressemblent à ceux que nous pouvons observer aujourd'hui dans les organismes vivants (Remy *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1995). Les CMA possèdent trois structures différentes dans leur mycélium : les *fine branching* (FB), les *runner hyphae* (RH) et les spores (Figure 1.1). Les RH et les FB sont deux types différents d'hyphes. Les *runner hyphae* sont plus épais, droits et peu ramifiés, alors que les *fine branching* sont plus minces et très ramifiés. Lors de la germination des

spores, on retrouvera beaucoup plus de RH que de FB. Une explication possible de cette différence est que les RH augmentent les chances de rencontre avec une racine d'une plante, car ils sont plus longs et parcourent beaucoup plus de distance que les FB. Lors de la phase extraracinaire, après infection de la racine, on retrouve ces deux structures dans le mycélium environnant les racines. Les RH permettent de s'aventurer loin des racines en formant une structure de base pour le réseau mycélien. Les FB sont formés par les ramifications de plus en plus petites des RH. Le rôle des FB est encore incertain, mais il a été suggéré que leur forme ramifiée permette une surface d'échange accrue avec le milieu extérieur comme le font les arbuscules (Juge *et al.*, 2009).

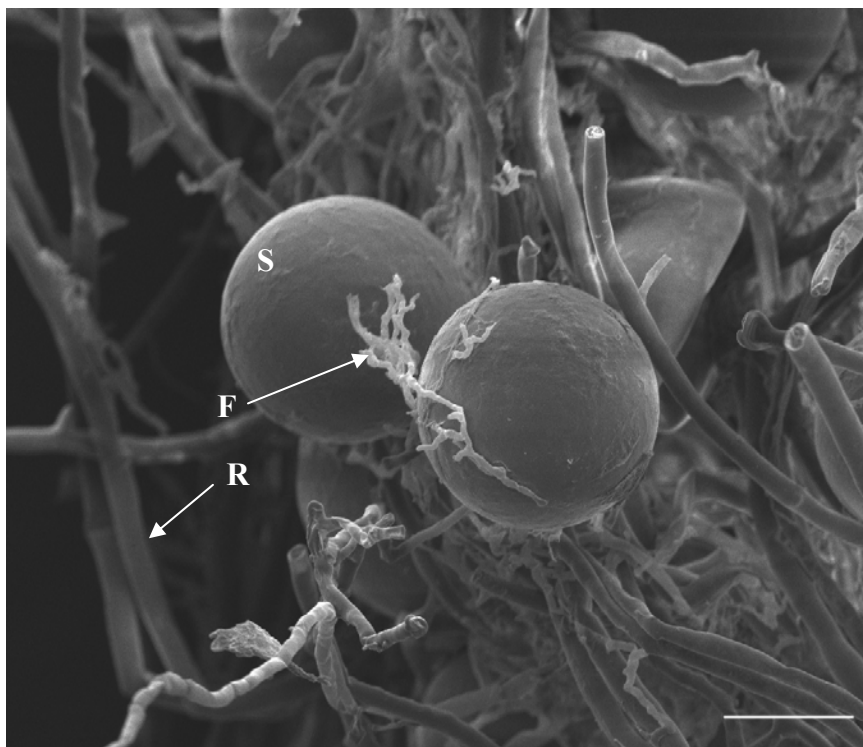


Figure 1.1: Les trois structures du mycélium des CMA sont présentes sur cette image prise au microscope électronique à balayage. S: spore, R: *runner hyphae*, F: *fine branching*. L'échelle est de 30 μm .

Les spores sont produites par les CMA pour assurer leur descendance au moyen de la reproduction asexuée. La reproduction sexuée n'a jamais été observée et des études confirment que les CMA sont des anciens asexués (Gandolfi *et al.*, 2003; Normark *et al.*, 2003). Elles sont de forme glomoïde (sphérique) ou acaulosporoïde (forme ovale, allongée), mais certaines espèces sont dimorphiques et possèdent donc les deux types de spore comme l'espèce *Archaeospora leptoticha* (Redecker & Raab, 2006). La paroi de la spore est chitineuse et la forme, la couleur et la taille varient en fonction des espèces. La taille peut varier de quelques dizaines de micromètres à un demi-millimètre. Chez les CMA, les spores sont multinucléées et le nombre de noyaux par spore varie selon les espèces (Figure 1.2), il est d'environ 800 chez *Scutellospora castanea* (Hosny *et al.*, 1998) et jusqu'à 35 000 chez *Gigaspora decipiens* (Viera & Glenn, 1990). Quelques études traitent du mécanisme de la formation de la spore, mais une seule étude traite de l'accumulation des noyaux à l'intérieur des spores en formation (Jany & Pawlowska, 2010).

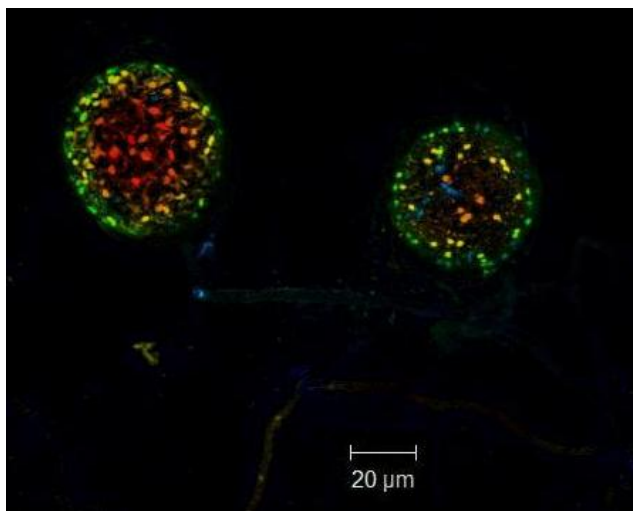


Figure 1.2: Photographie prise au microscope confocal à balayage laser de spores de *Glomus diaphanum* colorées au sytochrome green. Les points de couleur dans les spores sont des noyaux d'ADN. Les couleurs sont artificielles et sont indexées par le programme du microscope selon la position du noyau dans l'axe des z dans la spore.

1.5 La génétique des CMA

1.5.1 Variabilité génétique

Les données actuelles sur la génétique des Glomeromycota sont fragmentaires, limitées et convergent vers une structure génétique très compliquée et unique dans le monde vivant. En effet, Hepper *et al.* (1988) et Rosendahl & Sen (1992) ont observé que différentes isoformes enzymatiques existent entre isolats de la même espèce, provenant de différents continents (Hepper *et al.*, 1988; Rosendahl & Sen, 1992). Des recherches portant sur l'ADN amplifié à l'aide des amorces aléatoires par la technique RAPD ont révélé des variations entre espèces et isolats (Wyss & Bonfante, 1993). L'hétérogénéité génétique entre spores a été montrée par plusieurs auteurs avec des approches très différentes. Sanders *et al.* (1995) ont utilisé l'amplification par PCR de l'ITS, couplée à l'analyse des sites de restriction (PCR-RFLP) sur *Glomus mosseae* et ont révélé un profil de restriction différent pour une dizaine de spores amplifiées individuellement (Sanders *et al.*, 1995). Rosendahl & Taylor (1997) ont utilisé la méthode AFLP consistant à hydrolyser l'ADN de spores individuelles avec deux enzymes de restriction *Eco* RI et *Mse* I, puis à relier des adaptateurs *Eco* RI et *Mse* I comprenant quelques nucléotides supplémentaires, ensuite, à amplifier ces fragments avec des amorces marquées au phosphate ³²P d'une longueur d'environ 21 pb, comprenant en 3' trois nucléotides aléatoires. L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide permet alors de détecter de nombreux fragments variables. Toutes les spores analysées révèlent une différenciation génétique, même si elles proviennent d'un même pot de culture (Rosendahl & Taylor, 1997).

Il a été établi plusieurs fois chez *Glomus mosseae* qu'il existe une hétérogénéité génétique au sein des spores (Sanders *et al.*, 1995; Lloyd-Macgilp *et al.*, 1996; Sanders *et al.*, 1996). Dans la première étude (Sanders *et al.*, 1995), les produits amplifiés avec les amorces universelles ITS1 et ITS4 sont hydrolysés avec *Hinf* I et *Taq* I. La somme des longueurs des fragments est parfois plus élevée que la longueur totale du produit ITS amplifié, égale à 600 pb. Des clones des produits ITS amplifiés ont été séquencés et confirment bien l'existence de deux séquences ITS au sein d'une même spore. Un résultat semblable sur *G. mosseae* et *Scutellospora castanea* a été obtenu par la même méthode de

clonage de produits obtenus à partir de la même spore (Lloyd-Macgilp *et al.*, 1996; Hijri *et al.*, 1999). De plus, il apparaît que les substitutions nucléotidiques, portant sur 22 sites, sont plus fréquemment observées entre isolats qu'à l'intérieur des isolats. Cependant, la diversité entre certaines espèces, notamment *G. dimorphicum* et *G. fasciculatum*, n'est pas plus grande que celle que l'on trouve à l'intérieur de *G. mosseae* (Lloyd-Macgilp *et al.*, 1996). Zézé *et al.* (1997) ont utilisé une approche comprenant l'amplification des séquences d'ADN de minisatellites avec des amorces M13. Les séquences minisatellites sont modérément répétées dans le génome et organisées en tandem, avec des motifs de répétition qui varie entre 5 et 100 pb (Lohe *et al.*, 1993). Ces auteurs ont montré également une hétérogénéité entre les spores et à l'intérieur des spores chez *Gigaspora margarita* (Zézé *et al.*, 1997).

Donc la variation génétique à l'intérieur d'un même individu d'une même espèce et entre différents isolats n'est plus à démontrer. Considérant leur origine ancienne et le fait qu'ils ne font que de la reproduction asexuée (Gerdemann & Trappe, 1974), la question se pose à savoir comment ils ont fait pour maintenir une diversité génétique si élevée.

Compte tenu de la grande variabilité des marqueurs nucléaires, il est difficile d'en trouver qui permettent de discriminer entre les isolats, les espèces et de classer ces dernières. Le génome mitochondrial des CMA est plus homogène que le génome nucléaire. C'est ce que nous indique le premier séquençage complet du génome mitochondrial de *Glomus intraradices* réalisé par Lee et Young (2009). De ce fait, des marqueurs mitochondriaux sont de plus en plus utilisés pour les études en génétique. Le génome mitochondrial est identique au sein d'une population de mitochondries à l'intérieur d'un même individu contrairement aux populations de noyaux qui possèdent des génomes différents (voir section 1.5.3). Il a été démontré que le gène de la grande sous-unité ribosomale des mitochondries ne possède pas de variabilité (Raab *et al.*, 2005). Des différences dans les marqueurs mitochondriaux entre les différents isolats et espèces permettront de les identifier et de les quantifier (Lang & Hijri, 2009). Ces marqueurs nous ont d'ailleurs déjà permis de changer la phylogénie des CMA, en ramenant tout le phylum avec les Zygomycètes. Les Glomeromycètes était placés auparavant comme groupe frère des Dycaria (Ascomycota et Basidiomycota) (Lee & Young, 2009).

1.5.2 Recombinaison

Comme beaucoup d'autres aspects de la génétique des CMA, la recombinaison est un phénomène peu connu chez ces organismes. La recombinaison est un mécanisme important qui permet des réarrangements génétiques, créant ainsi de la variabilité génétique. Elle permet aussi de purger les mutations délétères. Que les CMA soient des organismes purement clonaux dépourvus de recombinaison contredit les lois de l'évolution. Normalement, l'existence de ces microorganismes aurait été vouée à l'échec, mais pourtant ils ont connu un important succès évolutif en colonisant presque tous les écosystèmes possibles et plus de 80% des plantes y vivant. Néanmoins, certaines études semblent démontrer la possibilité que la recombinaison ait lieu à l'intérieur ou entre les divers noyaux qui partagent le même cytoplasme. Cela ne peut être encore affirmé avec certitude, car trop d'études se contredisent jusqu'à maintenant. De plus, les analyses pour déterminer la présence de recombinaison sont variables d'une étude à l'autre.

Dans une étude réalisée par Rosendahl and Taylor (1997), le degré d'association entre marqueurs AFLP, significativement différent de zéro (Hypothèse nulle d'association aléatoire), a permis de conclure qu'il n'y a pas ou très peu de recombinaison chez les CMA, ce qui caractérise les organismes se reproduisant de manière clonale. Kuhn *et al.* (2001) ont démontré que les différentes variantes présentes dans les noyaux sont le résultat d'accumulation de mutations chez des organismes dépourvus de sexualité et que si la recombinaison existe, elle serait un phénomène rare qui ne permettrait pas de purger toutes ces mutations. Croll *et al.* (2009) ont étudié l'échange génétique de différents isolats à l'aide de marqueurs AFLP. Chez la progéniture des isolats croisés, certains marqueurs parentaux ne sont plus observables alors que de nouveaux marqueurs qui ne sont pas présents chez les parents le sont, ce qui pourrait être expliqué par de la recombinaison. Cependant, les auteurs ne présentent pas des résultats qui prouvent que la recombinaison est possible entre différents noyaux, car ils expliquent que ces observations peuvent être causées par une baisse de la fréquence des marqueurs. Toutefois, ils n'excluent pas la possibilité que la recombinaison puisse exister au sein des CMA. À l'opposé une étude réalisée sur deux espèces du genre *Glomus* affirme que tous les résultats d'analyse faits entre loci présents à l'intérieur de différentes populations ne peuvent pas être expliqués par

une reproduction exclusivement asexuée et que cette diversité génétique ne peut pas provenir seulement de l'accumulation de mutations dans le génome. Les auteurs concluent que la présence de cette diversité provient en partie de la recombinaison (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001). Une autre étude a utilisé sept différentes analyses pour déterminer la présence de recombinaison chez les CMA. Les résultats des analyses démontrent que la recombinaison a de forte chance de se produire chez ces organismes, quoique les auteurs précisent qu'il pourrait s'agir de recombinaison ancienne ou d'une variabilité d'une autre provenance. Les auteurs proposent que la recombinaison pourrait provenir de la conversion des gènes ou du *crossing-over* lors de la mitose, deux mécanismes qui ne sont pas associés à la sexualité (Gandolfi *et al.*, 2003). Stukenbrock et Rosendahl (2005) ont quant à eux déterminé qu'il n'y avait pas de recombinaison dans des populations de plusieurs espèces du genre *Glomus*, car après analyse de plusieurs loci de spores individuelles, les génotypes étaient semblables (Stukenbrock & Rosendahl, 2005). La plus récente étude portant sur la recombinaison a été faite par Croll et Sanders (2009) qui ont utilisé 11 loci polymorphiques chez 40 populations de *Glomus sp.* pour déterminer 18 génotypes dans ces populations et procéder à plusieurs types d'analyse. Ils ont trouvé de nombreuses évidences que de la recombinaison pourrait avoir lieu chez certains génotypes, alors que d'autres génotypes ne démontrent aucune recombinaison et une évolution purement clonale (Croll & Sanders, 2009).

Dans cette section, la présence de recombinaison chez les CMA a été discutée. Si elle existe, cela serait une explication de la grande variabilité génétique qui est retrouvée au sein de ces champignons en plus de l'accumulation de mutations. L'échange génétique horizontal par les anastomoses serait une autre explication de cette variabilité. Ce sujet est traité au point 1.6 de ce chapitre.

1.5.3 Organisation génomique: hétérocaryotie ou homocaryotie?

Il n'est plus à démontrer qu'il existe un polymorphisme génétique élevé chez les CMA, mais comment toute cette variabilité est-elle répartie au sein du champignon, au sein des spores? Deux hypothèses ont été proposées et le débat a été animé par de nombreuses recherches pour discriminer entre les deux scénarios. La première possibilité est celle de l'homocaryotie, c'est-à-dire que tous les noyaux sont identiques et que chaque noyau possède tous les allèles différents. Pour ce faire, soit les noyaux seraient polyploïdes et les chromosomes homologues porteraient des allèles différents, soit les noyaux seraient haploïdes et les allèles différents seraient sur le même chromosome, mais sur des gènes dupliqués. L'autre possibilité est celle de l'hétérocaryotie, c'est-à-dire que les noyaux sont différents et portent des allèles différents, ce qui ferait des CMA des êtres multigénomiques. Les études qui sont en faveur de l'hétérocaryotie sont nombreuses (Bever & Morton, 1999; Hijri *et al.*, 1999; Kuhn *et al.*, 2001; Hijri & Sanders, 2004; Bever & Wang, 2005; Hijri & Sanders, 2005; Croll & Sanders, 2009). La première étude (Bever & Morton, 1999) a montré que la taille et la forme des spores chez *Scutellospora pellucida* étaient causées par la ségrégation de noyaux différents lors de la formation des spores. Une autre étude (Kuhn *et al.*, 2001) a démontré à l'aide de l'hybridation *in situ* avec fluorescence (FISH) que deux variantes de l'ITS2 se retrouvaient dans des noyaux différents chez *Scutellospora castanea*. Il avait été démontré auparavant que ces deux variantes se retrouvaient dans des spores individuelles chez cette espèce (Hijri *et al.*, 1999). Six variantes de l'ITS avaient été trouvées et cinq paires d'amorces avaient été utilisées pour analyser le profil des spores. Les résultats démontraient que les spores avaient des contenus différents, ne possédant pas les mêmes combinaisons d'ITS. Cependant, les auteurs ne pouvaient pas conclure à l'hétérocaryotie avec ces données, car il est possible que les noyaux soient identiques malgré un polymorphisme des gènes ribosomiaux, un phénomène connu chez les eucaryotes (Hijri *et al.*, 1999). L'étude de Kuhn *et al.* (2001) vient apporter une évidence directe et complémentaire avec l'hybridation double des deux sondes sur des noyaux différents. Toutefois, une étude de Pawlowska et Taylor (2004) contredit les conclusions hétérocaryotiques. Ils ont trouvé que les 13 variantes du gène PLS (POL1-like sequence), un gène homologue de la sous-unité alpha de l'ADN polymérase de

la levure, chez une spore de *Glomus etunicatum* étaient toutes transmissibles à la génération suivante. Ce gène étant généralement en simple copie chez les autres eucaryotes, ils concluaient alors que le génome des CMA était polyploïde (au moins 13N) et que leur variabilité génétique était répartie sur des chromosomes homologues dans des noyaux homocaryotiques (Pawlowska & Taylor, 2004). Deux autres études appuient l'hypothèse de l'homocaryotie, mais la variabilité, au lieu d'être distribuée entre les chromosomes homologues, est distribuée dans des séquences répétées apparues par duplication (Rosendahl & Stukenbrock, 2004; Stukenbrock & Rosendahl, 2005). Stukenbrock et Rosendahl (2005) affirment que leurs résultats de SSCP ne sont pas cohérents avec l'hypothèse hétérocaryotique, car ils retrouvent le même patron de SSCP pour différentes spores et il est selon eux improbable que le même assortiment de noyaux différents se retrouve dans chacune des spores analysées. Hijri et Sanders (2004) ont étudié la taille du génome et la ploïdie chez *Glomus intraradices*, une espèce parente de *Glomus etunicatum*. Les analyses avec la cinétique de réassociation et la cytométrie en flux ont permis de déterminer que la taille du génome de *G. intraradices* est d'environ 16,54 Mb et qu'il est haploïde. De plus, comparativement aux tailles des génomes haploïdes des autres champignons ou des autres eucaryotes, il est beaucoup trop petit pour que la variabilité observée soit due à une ploïdie élevée (Hijri & Sanders, 2004). Hijri et Sanders (2005) ont par la suite mené une étude semblable, mais sur *Glomus etunicatum*, pour prouver que cette espèce n'est pas polyploïde tel que stipulé par Pawlowska et Taylor (2004). Ils ont voulu vérifier quelle serait la taille du génome haploïde chez *Glomus etunicatum* si son génome était bien de 13N et ils ont trouvé une valeur de 2,88 Mb, ce qui est improbable puisque cette taille est plus petite que celle de tous les autres eucaryotes et de la plupart des procaryotes. Ils ont aussi démontré que les noyaux ne possèdent que deux variantes du gène PLS, une autre donnée qui confirme que *Glomus etunicatum* possède un génome haploïde, car les autres variantes doivent être obligatoirement distribuées dans des noyaux différents (Hijri & Sanders, 2005). Bever et Wang (2005) sont aussi en désaccord avec les conclusions de Pawlowska et Taylor (2004) sur l'organisation génétique des CMA. Ils suggèrent que la variabilité constante observable de génération en génération est non pas expliquée par un arrangement homocaryotique mais plutôt par un arrangement hétérocaryotique où la perte de variation due à la ségrégation des noyaux serait rétablie par

la fusion d'hyphe. Par exemple, leurs simulations montrent que pour un champignon haploïde et avec une perte de variabilité de 40% due à la dérive et un taux de 10% de fusion d'hyphes, ils arrivent aux mêmes résultats que Pawlowska et Taylor (2004), c'est-à-dire que les 13 variantes d'un gène sont transmises à la génération suivante (Bever & Wang, 2005). Ces simulations expliquent par le fait même les résultats de Stukenbrock et Rosendahl (2005). Pawlowska et Taylor (2005) ont répliqué que Bever et Wang (2005) appuyaient leur modèle en citant des études qui présentent seulement des fusions d'hyphes fonctionnelles entre mycélia de même isolat alors qu'aucune étude n'a prouvé que des fusions d'hyphes étaient possibles entre différents isolats (Pawlowska & Taylor, 2005). Quelques années plus tard, Croll *et al* (2009) viennent invalider cet argument en démontrant qu'il est effectivement possible d'obtenir des fusions d'hyphes entre des individus différents et permettre un échange génétique (Croll *et al.*, 2009). Bever (2008) a fait une revue de littérature sur l'organisation génétique des CMA et il amène un argument simple mais très pertinent en faveur de l'hétérocaryotie. Puisque les CMA n'ont pas de stade uninucléé dans leur cycle de vie, alors les mutations individuelles formeront inévitablement une population de noyaux différents (Bever, 2008). Rosendahl (2008), quant à lui, critiquait qu'on ne retrouvait pas de preuve en faveur de l'hétérocaryotie lorsqu'on regardait l'expression des gènes (Rosendahl, 2008). Récemment, Boon *et al* (2010) ont démontré le contraire en étudiant pour la première fois la variabilité génétique au niveau du transcriptome. Ils ont utilisé les séquences génomiques de deux gènes, la grande sous-unité ribosomale (LSU rDNA) et la sous-unité alpha de l'ADN polymérase (PLS), et de leur expression génique (cDNA). Ils ont trouvé que la variabilité du génome était aussi présente une fois transcrit. De plus, toutes les variantes transcrites du gène LSU et une des deux variantes du gène PLS sont fonctionnelles indiquant que la variabilité génétique observée dans le génome n'est pas seulement constituée de pseudogènes (Boon *et al.*, 2010).

1.6 Les anastomoses

Un mécanisme qui permet de maintenir la variabilité génétique des AMF est vraisemblablement les anastomoses. Une anastomose est la fusion somatique de deux hyphes du même mycélium ou de deux mycélia différents représentant deux individus différents (Figure 1.3). L'anastomose est un phénomène très répandu chez les champignons filamenteux. Elle a été observée dans les hyphes végétatifs des Ascomycètes (Glass *et al.*, 2000; Hickey *et al.*, 2002; Sbrana *et al.*, 2007) et des Basidiomycètes (Ainsworth & Rayner, 1986; McCabe *et al.*, 1999). Chez les champignons mycorhiziens à arbuscules, elle a été observée au départ chez plusieurs espèces de *Glomus* mais non chez *Gigaspora rosea* et *Scutellospora castanea* en phase présymbiotique (Giovannetti *et al.*, 1999). D'autres études se sont penchées sur les différences entre les familles des Gigasporaceae (*Gigaspora* et *Scutellospora*) et des Glomaceae (*Glomus*) dans leur capacité à faire des anastomoses en phase symbiotique. Les études ont révélé que les espèces étudiées de la famille des Gigasporaceae forment la plupart du temps des anastomoses sur le même hyphe et rarement à partir de deux hyphes différents alors que les Glomaceae forment la totalité de leurs anastomoses sur des hyphes différents (de la Providencia *et al.*, 2005; Voets *et al.*, 2006). De plus, les Glomaceae peuvent former des anastomoses sur des réseaux mycéliens différents, ce qui n'est pas le cas chez les Gigasporaceae (Voets *et al.*, 2006). Les premières études sur les anastomoses des CMA n'ont reporté que des fusions d'hyphes entre des individus du même isolat dans le genre *Glomus* (Giovannetti *et al.*, 1999; Giovannetti *et al.*, 2001; Giovannetti *et al.*, 2003), mais récemment il a été démontré que des anastomoses et des échanges génétiques étaient possibles entre différents isolats chez *Glomus intraradices* (Croll *et al.*, 2009). Toutefois, aucune anastomose n'a été observée entre deux espèces différentes (Giovannetti *et al.*, 1999), mais on ne peut encore éliminer l'hypothèse selon laquelle un échange de noyaux puisse se faire entre deux espèces différentes (Rodriguez *et al.*, 2004). Néanmoins, il est connu que de l'incompatibilité végétative peut même avoir lieu dans des isolats d'une même espèce de différentes régions géographiques (Giovannetti *et al.*, 2003). Cette incompatibilité est caractérisée par la rétraction du protoplasme et la formation d'un septum à l'approche d'un hyphe d'un autre individu, ce qui empêche la formation d'anastomose (Giovannetti *et al.*,

2003). Parfois, les isolats de la même espèce sont tellement distants qu'aucun phénomène de reconnaissance n'est observable, que ce soit par des réactions de compatibilité ou d'incompatibilité végétative (Cárdenas-Flores *et al.*, 2010).

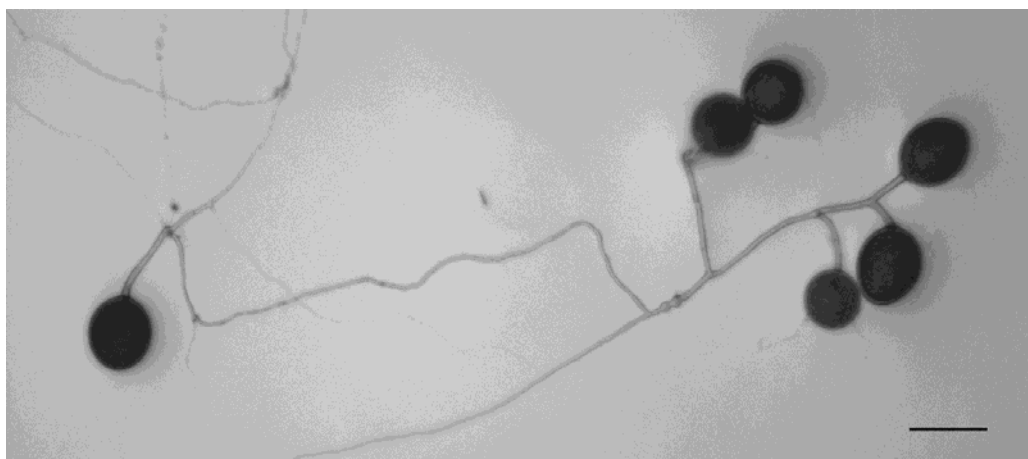


Figure 1.3: Anastomose entre deux individus différents du même isolat de l'espèce *Glomus irregulare*. Un groupe de spores et une spore ont été déposés sur gel pour germination. L'échelle est de 100 μm .

Les études qui ont été réalisées sur les anastomoses sont réalisées soit en phase présymbiotique, en observant des spores mises en germination (Giovannetti *et al.*, 1999; Giovannetti *et al.*, 2003; Croll *et al.*, 2009; Cárdenas-Flores *et al.*, 2010), soit en phase symbiotique, en observant les interactions des hyphes extraracinaires (Giovannetti *et al.*, 2001; de Souza & Declerck, 2003; Giovannetti *et al.*, 2004; de la Providencia *et al.*, 2005; Voets *et al.*, 2006). La capacité des spores en germination à fusionner avec des hyphes différents s'explique comme étant un moyen pour la spore de rejoindre un réseau mycélien compatible qui colonise déjà les racines d'une plante hôte, s'assurant ainsi sa propre colonisation avec un partenaire végétal (Giovannetti *et al.*, 1999). En phase symbiotique, il est assumé que l'anastomose permet le maintien de l'homéostasie à l'intérieur de la colonie, la communication intra-mycélienne et assure la translocation des nutriments et de

l'eau dans tout le réseau mycélien (Glass *et al.*, 2004). L'anastomose participe aussi à un mécanisme de réparation du réseau mycélien qu'on nomme HHM pour *hyphal healing mechanism* (Bago *et al.*, 1999). Les hyphes endommagés sont réparés grâce aux anastomoses qui forment un pont entre eux, ce qui permet de garder le réseau interconnecté. Des plantes de différentes espèces, genres et familles peuvent être reliées ensemble par les anastomoses via le réseau d'hyphes souterrain du même isolat chez *Glomus mosseae*. Ce réseau d'hyphes peut devenir considérable et relier des plantes de toute une communauté (Giovannetti *et al.*, 2004). Ce phénomène pourrait avoir des conséquences importantes sur le cycle des minéraux et sur leur absorption pour la communauté des plantes. Un réseau plus large résulterait pour la plante en une plus grande disponibilité des minéraux et à une meilleure distribution des ressources et des organelles en cas de régions affectées par différents stress (Jakobsen, 2004). Puis, il a été démontré qu'un plus grand réseau mycélien augmente la biomasse totale chez *Medicago sativa* (Avio *et al.*, 2006). Contrairement aux espèces du genre *Glomus*, les Gigasporaceae n'utilisent pas les anastomoses pour former un réseau plus large, car ils ne forment jamais d'anastomose avec des réseaux mycéliens du même isolat (Voets *et al.*, 2006). Ils possèdent des hyphes plus épais et miseraient plutôt sur un réseau plus robuste qu'ils réparent en cas d'endommagements à l'aide des anastomoses impliquant le HHM. Les Glomaceae ont développé une stratégie évolutive différente en formant plus d'anastomoses que la famille des Gigasporaceae et en ayant un réseau mycélien plus large (de la Providencia *et al.*, 2005). Les anastomoses entre différents réseaux mycéliens et la diversité génétique qui en résulte peuvent expliquer le peu de spécificité qu'ont les CMA pour leurs hôtes (Sanders, 2003).

Que ce soit durant la phase présymbiotique ou symbiotique du cycle de vie des CMA, l'anastomose serait un moyen efficace pour les échanges et les brassages génétiques en permettant le passage de noyaux d'un individu à l'autre provenant du même isolat ou de différents isolats (Giovannetti *et al.*, 1999; Giovannetti *et al.*, 2001; Croll *et al.*, 2009). Toutefois, puisque les anastomoses sont plus fréquentes sur des hyphes de même isolat qu'avec des isolats différents (Croll *et al.*, 2009), il est probable que la principale fonction des anastomoses n'est pas celle des échanges génétiques mais plutôt celle de la

maintenance du réseau mycélien en interconnectant les hyphes ensemble et en réparant ceux endommagés pour former un réseau plus large. Malgré tout, les anastomoses peuvent avoir un effet important sur la génétique des CMA même si ce n'est pas la principale fonction des anastomoses (Young, 2009). En effet, Croll *et al* (2009) ont démontré qu'un échange génétique était possible entre différents isolats chez *Glomus intraradices*. Les neuf progénitures de deux co-cultures contenant des paires de différents isolats ont reçu des marqueurs génétiques (AFLP) des deux parents malgré le fait que la fréquence des anastomoses entre les isolats était faible (0 à 10.3%). Ces échanges génétiques ont apporté un changement phénotypique variable chez la progéniture dans la densité des hyphes et la production des spores, des caractères qui sont normalement fortement héréditaires sur plusieurs générations de sous-culture (Croll *et al.*, 2009).

Puisque les anastomoses permettent l'échange de noyaux différents, ils permettent aussi l'échange de génomes mitochondriaux différents (Young, 2009). Pourtant, il a été démontré que le génome mitochondrial est homogène et ne possède pas de génomes différents comme c'est le cas pour le génome nucléaire. Deux explications sont proposées : l'existence d'un mécanisme de transmission comme chez la levure ou une ségrégation des génomes due à un goulot d'étranglement (Lee & Young, 2009).

Peu de recherches se sont penchées sur le phénomène des anastomoses jusqu'à maintenant. Il est difficile de faire des affirmations générales sur les anastomoses, car beaucoup de facteurs varient dans les études comme le nombre d'échantillons et les espèces utilisées, la phase du cycle de vie (présymbiotique ou symbiotique), le système expérimental, etc. Il existe parfois des incohérences dans les interprétations de certaines études. Par exemple, Bever et Morton (1999) déduisent que la distribution de la taille et de la forme des spores des nouvelles générations chez *Scutellospora pellucida* serait causée par une ségrégation différente des noyaux hétérocaryotiques et que la variation serait rétablie par des échanges génétiques causés par les anastomoses. Pourtant, aucune fusion d'hyphes n'a été observée chez le genre *Scutellospora* entre différentes spores ou différents réseaux mycéliens, la plupart des anastomoses se produisant sur le même hyphe impliquant le HHM (Giovannetti *et al.*, 1999; Voets *et al.*, 2006). Il est évident que d'autres

recherches seront nécessaires pour comprendre la fonction des anastomoses chez les CMA et de leurs conséquences sur la génétique et l'écologie de ces symbiontes obligatoires.

1.7 Les objectifs

1.7.1 Objectif général

Durant ma maîtrise, j'ai cherché à approfondir les connaissances sur les flux génétiques des CMA, c'est-à-dire les flux génétiques verticaux via la reproduction asexuée et les flux génétiques horizontaux entre individus qui sont possibles grâce aux anastomoses afin d'avoir une meilleure compréhension de leur génétique.

1.7.2 Objectifs spécifiques

1.7.2.1 Reproduction sporale

Mon premier objectif était de chercher à élucider l'origine des noyaux d'une spore lors de sa formation. Je cherchais à savoir si les noyaux présents dans la spore mature proviennent d'un seul noyau qui s'est divisé de nombreuses fois ou s'il y a un nombre plus élevé de noyaux qui migrent vers la spore en formation via les hyphes. Trois hypothèses ont été émises sur l'origine des noyaux dans une spore en formation. La première est qu'un seul noyau entre dans la spore et subit de nombreuses mitoses. La seconde est qu'un faible nombre de noyaux entre dans la spore et subit quelques mitoses et la dernière hypothèse est qu'un grand nombre de noyaux entre dans la spore et ne subit aucune mitose. D'autres structures fongiques seront observées au microscope afin de déterminer si les CMA possèdent un stade uninucléé dans leur cycle de vie. Le contenu en noyau de spores de différents âges, de différents diamètres et de différentes espèces a été examiné.

1.7.2.2 Échange génétique

Mon deuxième objectif consiste à étudier les échanges génétiques entre individus du même isolat et de différents isolats de la même espèce chez *G. irregulare* via les anastomoses. Les spores individuelles de *Glomus irregulare* seront mises en germination par couples pour créer une promiscuité entre elles afin de permettre leur rencontre et la fusion d'hyphes. Après avoir démontré la formation d'anastomose, je chercherai un marqueur moléculaire ayant de la variabilité génétique entre les différents isolats afin de pouvoir les différencier les uns des autres. Les différents isolats seront mis en culture ensemble, deux par deux, afin qu'ils puissent faire des anastomoses et donc un échange de noyaux. La nouvelle génération de spores sera analysée afin de vérifier si elle possède les deux marqueurs des deux isolats parentaux, ce qui démontrerait que le flux génétique par les anastomoses permet de maintenir une variabilité génétique chez les champignons mycorhiziens à arbuscules.

Chapitre 2 Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi

Julie Marleau¹, Yolande Dalpé^{1,2}, Marc St-Arnaud¹, Mohamed Hijri^{1§}

¹ Université de Montréal, Département de sciences biologiques, Institut de recherche en biologie végétale, 4101 rue Sherbrooke Est, QC, H1X 2B2, Canada

² Agriculture and Agri-Food Canada, 960 Carling Ave. Ottawa, On, K1A 0C6, Canada.

2.1 Abstract

2.1.1 Background

A conventional tenet of classical genetics is that progeny inherit half their genome from each parent in sexual reproduction or a complete genome in an asexual process. The transmission of hereditary characteristics from parent organisms to their offspring is therefore predictable, although several exceptions are known. Heredity in microorganisms, however, can be very complex and even unknown as it is the case for coenocytic organisms such as arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. This group of fungi are plant-root symbionts, ubiquitous in most ecosystems, that reproduce asexually via multinucleate spores and for which sexuality has not yet been observed.

2.1.2 Results

We examined the number of nuclei per spore of four AM fungal taxa using high Z-resolution live confocal microscopy and found that the number of nuclei was correlated with spore diameter. We show that AM fungi have the ability, through the establishment of new symbioses, to pass hundreds of nuclei to subsequent generations of multinucleated spores. More importantly, we observed surprising heterogeneity in the number of nuclei among sister spores and show that massive nuclear migration and mitosis are the mechanisms by which AM fungal spores are formed. We followed spore development of *Glomus irregulare* from hyphal swelling to spore maturity and found that the spores reached mature size within 30 to 60 days, and that the number of nuclei per spores increased over time.

2.1.3 Conclusions

In contrast to all other known organisms, in which all somatic nuclei derive from a single progenitor nucleus, no single-nucleus stage was observed during their extraradical phases. This indicates that genome transmission by sporulation does not appear to constitute a strong genetic bottleneck. This previously undescribed, non-conventional

process of heredity has fascinating implications for the diversity of modes of evolution in eukaryotes.

2.2 Background

The arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are a group of root-inhabiting, symbiotic organisms that are widely distributed geographically and are among the most common soil fungi. AM fungi form symbioses with the roots of approximately 80% of all vascular plant species (Smith & Read, 2008). These fungi offer a wide variety of host benefits, the most well-known being an increase of mineral uptake, particularly of phosphorus (Helgason & Fitter, 2005), a better drought tolerance through increased water uptake (Augé, 2001; Augé, 2004) and a higher resistance to root pathogens (Helgason & Fitter, 2005). Mycorrhizal plants also experience improved nodule function in the case of legumes (Barea *et al.*, 2002) and better soil structure, due to the ability of the fungi to bind soil particles and decrease soil erosion (Rillig & Mummey, 2006).

AM fungi have existed unchanged morphologically for at least 460 million years, despite lacking sexual reproduction (Redecker *et al.*, 2000a). AM fungi are coenocytic organisms that have evolved to be multigenomic, possessing a large amount of genetic variation for ribosomal DNA (Sanders *et al.*, 1995; Lloyd-Macgilp *et al.*, 1996; Hijri *et al.*, 1999; Lanfranco *et al.*, 1999; Kuhn *et al.*, 2001), non-coding regions (Pawlowska & Taylor, 2004) and also for protein-coding genes (Kuhn *et al.*, 2001; Hijri & Sanders, 2005; Hijri *et al.*, 2007) not only between individuals, but among nuclei within an individual (one ‘individual’ refers here to a single spore). Reproduction occurs by asexual spores that contain hundreds or even thousands of nuclei (Viera & Glenn, 1990; Bécard & Pfeffer, 1993), and these spores are the only form under which species can be identified morphologically, although AM fungi can be also identified using molecular markers. The ability of spores to germinate is a prerequisite for the establishment of mycorrhizal symbiosis for many AM fungal taxa, and the developmental process leading to the accumulation of nuclei within spores has been recently reported to occur by the transport of numerous nuclei into the developing spore in the AM fungus *Glomus etunicatum* (Jany

& Pawlowska, 2010) However, the developmental process involving nuclear division by mitosis within spores is not known. Fungal mitosis has been accurately described and illustrated mainly in ascomycetes and basidiomycetes and was shown to be usually intranuclear (reviewed in Aist & Morris, 1999), because the nuclear envelope is thought to remain intact, often until anaphase. Coenocytic fungi such as zygomycetes also generally have an intranuclear mitosis, although study of this is complicated by the coexistence of numerous nuclei within a common cytoplasm and mitosis phases that are not easily distinguished from one another, and exceptions have been reported in *Basidiobolus ranarum* (Tanaka, 1970).

To the best of our knowledge, mitosis has never been described in AM Fungi, although many mitosis inhibitors have been successfully tested with these organisms. For example, aphidicolin, which is a specific DNA polymerase α inhibitor that blocks the cell cycle at early S phase, was used to study nuclear division in AM fungi during *in vitro* development (Bécard & Pfeffer, 1993). Carbendazim, which prevents microtubule formation and inhibits mitosis in fungal cells, was also used to investigate phosphorus transport and succinate dehydrogenase activity in three AM Fungi (Kling & Jakobsen, 1997). We chose the use of aphidicolin in our experiment because it has been shown to efficiently inhibit mitosis in AM fungi without any effect on spore germination (Bécard & Pfeffer, 1993).

To investigate the mechanisms of AM fungal spore formation and by extension, the amount of genetic material inherited by AM fungal offspring, we first counted the number of nuclei in live spores belonging to four different AM fungal taxa. All these taxa were grown in *in vitro* culture with *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA transformed-carrot roots and were examined using confocal microscopy with a high z-resolution for three-dimensional (3D) reconstructions, which allows a direct counting of nuclei and visualization of their 3D architecture. We addressed five specific questions: 1) What is the correlation between spore diameter and the number of nuclei per spore? 2) Is there any heterogeneity in the number of nuclei among spores of similar diameter? 3) What is the mechanism of spore formation in the AM fungus *G. irregulare*? 4) What is the minimum number of nuclei required to make up a viable spore and regulate its ability to germinate

and to establish a functional symbiosis in the AM fungus *G. irregulare*? 5) Does the extraradical phases of AM fungi lack a single nuclear stage? These questions are of fundamental importance to our comprehension of AM fungal reproduction by sporulation, and their answers will bring a new level of knowledge to AM fungal genetics and evolution. Insight into AM fungal genetics is the cornerstone on which understanding the role of mycorrhizal symbiosis in nature will be based.

2.3 Methods

2.3.1 Fungal material

The four AM fungal species, *Glomus irregulare* (isolate DAOM-197198, previously known as *G. intraradices* (Sokolski *et al.*, 2010)), *G. cerebriforme* (DAOM-227022), *G. aggregatum* (strain 2101-sp) and *G. diaphanum* (DAOM-229456) used in our studies, were obtained from the Glomeromycota *In vitro* Collection (GINCO). These strains were co-cultured with Ri T-DNA-transformed carrot roots (*Daucus carota* L.). AM fungal strains and transformed carrot roots were cultured and maintained on a minimal (M) medium (Bécard & Fortin, 1988) solidified with 0.4 w/v gellan gum at 25°C.

2.3.2 Confocal microscopy

Arbuscular mycorrhizal fungal spores were freshly collected from plates by dissolving the gellan gum in citrate solution (Doner & Bécard, 1991), washed with sterile water and immediately stained with 2% (v/v) of SytoGreen 13 live fluorescent dye (Invitrogen, Canada), for 30 min at room temperature and in darkness. Stained spores were mounted in an 80% glycerol solution and visualized using a Zeiss LSM 5 DUO confocal microscope equipped with Piezo (xy) stage. Specimens were imaged with an objective LCI Plan-Neofluotar 63x (NA 1.3) in water and glycerine immersion and using an argon laser at 488 nm. For each specimen, z-stacks (approximately 150 optical sections depending on the spore size, with an interval of 0.2 μ m) were recorded. Z-stacks were then merged into

2D images in which optical sections were colour indexed in order to facilitate manual counting of nuclei. Time-lapse experiments were performed using (x,y,t) mode and 10 optical sections were collected at each 5 min interval for each serie.

2.3.3 Aphidicolin experiments

Two compartment 100 x 15 mm Petri dishes (St-Arnaud *et al.*, 1996) were used in this experiment with the AM fungus *G. irregulare*. One compartment was filled with 25 ml M medium to the top level of the dividing wall, while the other compartment was filled with only 10 ml M medium lacking sugar and complemented axenically with 150 μ M aphidicolin (Bécard & Pfeffer, 1993) in DMSO (Sigma, Canada) after it had been autoclaved and allowed to cool to 45°C. After solidification of the medium, an additional 1 ml sugarless M medium containing aphidicolin was deposited on the dividing wall in the sugarless compartment, placed at an angle in order to form a bridge and facilitate hyphal crossing between the two compartments but without continuous connection between growth media (St-Arnaud *et al.*, 1996). Control plates were prepared in the same conditions, except the second compartment was filled with sugarless M medium complemented with an equal volume of DMSO only. *G. irregulare* colonized transformed carrot roots were added to the compartment containing sugar. Plates were then incubated in the dark at 25°C until the mycelium had crossed the dividing wall and grown on the second compartment. The cultures were examined weekly. The number of newly formed spores was counted weekly on the second compartment containing aphidicolin or DMSO as a control. After 3 months of culture, spores from this compartment were collected by dissolving the gel, rinsed with sterile water and stained with SytoGreen as described above. Spores were examined as described in the confocal microscope section.

2.3.4 Spore selection and measurement over time

Hyphal swellings differentiated along AM fungal mycelium filaments on the fungal side of two-compartmented plates were pen marked on the plate bottom and their development followed under episcopic light with a dissecting microscope (Nikon SMZ 10A). Twenty-five marked 15, 30, 60 and 90 day-old spores, respectively, were recovered manually from the fungal colonies and mounted on microscopic slides in PVLG mounting medium (Omar *et al.*, 1978). Cross diameters of mounted spores were measured at magnification 600X (Nikon Eclipse 800), photographed (Digital camera Nikon Coolpix 950) and spore wall development sequentially described.

2.3.5 Viability of spores

Spore viability was estimated by the MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) vital stain procedure (An & Hendrix, 1988). Using separate cavity slides, 25 spores were subjected to MTT treatment for 40 hours to allow maximum staining response. Treated spores were observed under dissecting microscope. Red and blue stained spores were considered viable. At 15 days old, the majority of spore primordia tested positive for viability and the level of viability remained unchanged throughout the spore maturation period (15-90 days old). The high level of viability and the uniformity of results may be attributed to the fact that spores were produced *in vitro*, under uniform environmental conditions and with no growth constraints. As such, the fungal material may have been less susceptible to mortality or abortion compared to spores isolated directly from soil (Meier & Charvat, 1993).

2.3.6 Germination potential of spores

Twenty-five spores of each selected age category (15, 30, 60, 90 days) were extracted from two-compartmented *in vitro* culture, deposited on H₂O agar medium (pH 6.0) and incubated for a maximum of 30 days at 27°C in darkness. Spores bearing

germinating hyphae longer than 150 μm were considered germinated. Thirty day-old spores already showed a 40% germination potential and the capacity to regenerate an *in vitro* functioning colony when associated with transformed carrot roots. This germination potential, whatever the level of spore maturity, never reached more than 50% of the spores, even in those considered viable according to the MTT staining test. The 30 days incubation period chosen may not have been sufficient to demonstrate the full germination capability. However, most of the spore germination observed occurred in the first 3-6 days after incubation, indicating a sufficient maturity to undergo the germination process.

2.3.7 AM fungal extraradical mycelium

The extraradical symbiotic mycelium of AM fungi exhibits three distinguishable morphological structures: large-diameter relatively unbranched thick-walled hyphae called runner hyphae (RH) (Friese & Allen, 1991), small-diameter thin-walled branched hyphae called arbuscule-like structures (Mosse, 1959) or fine branching (FB) (Juge *et al.*, 2009) and spores. To assess for the presence of uninucleate structures, the mycelium of *G. diaphanum* was carefully examined. Mycelia samples were harvested from five different plate cultures by dissolving the gellan gum in citrate buffer (Doner & Bécard, 1991), washed with sterile water and immediately stained with 10 μM SytoGreen 13 for 60 min at 35°C in the dark. Stained mycelia were mounted in 50% glycerol solution on a glass plate and 20-22 RH, FB and spores were randomly chosen and visualized using a Zeiss confocal microscope as described above. The nuclei were counted and the volume was calculated from the diameter (for all structures) and length (for RH and FB).

2.3.8 Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using the using JMP 7.0 and Statgraphics Plus v3 statistical software. Since no transformation produced a normal distribution of the residuals, Kruskal-Wallis non-parametric one-way analysis of variance by ranks were conducted to determine the effect of aphidicolin on spore diameter and number of nuclei

per spore, and to compare the number of nuclei between morphological structures of *G. diaphanum* symbiotic extraradical mycelia, while *a posteriori* comparisons between means were done using **Tukey-Kramer** honestly significant difference tests. In order to determine the relationship between the number of nuclei per spore and the diameter of spores, a linear regression model ($y = ax + b$) was fitted to the number of nuclei (y) with respect to spore diameter (x) for each AM fungal species.

2.4 Results

2.4.1 Live cell imaging of AM fungal spores

We used a novel high-accuracy method for determining the number of nuclei in live spores (Figure 2.1, Additional Files 1 and 2). For example, in 166 live spores of *G. diaphanum*, we found that the number of nuclei per spore ranged from 20 to 748 for diameters of 33 to 109 μm , respectively. Figure 2.2 shows the diameter of spores plotted against the number of nuclei per spore of *G. diaphanum* ($n = 166$); *G. irregulare* ($n = 113$); *G. aggregatum* ($n = 105$) and *G. cerebriforme* ($n = 60$). *G. cerebriforme* spores had the fewest nuclei per spore and were also the smallest in size, while *G. diaphanum* spores had the greatest number of nuclei per spore. We found a significant positive linear relation between the number of nuclei in a given spore and its diameter showing relationship between variables for all AM fungal taxa: *G. irregulare* ($y = -81.09 + 3.91x$, $R^2 = 0.3583$), *G. aggregatum* ($y = -45.69 + 2.65x$, $R^2 = 0.5252$) and *G. cerebriforme* ($y = -21.35 + 1.66x$, $R^2 = 0.3425$). All slopes were statistically significant at $p = 0.05$.

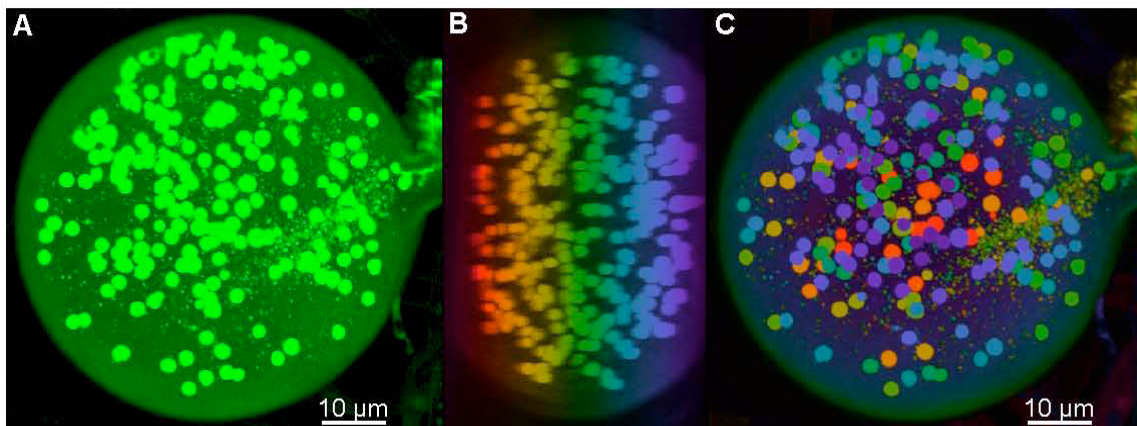


Figure 2.1: Live cellular imaging of AM fungi. Spore of *G. diaphanum* visualized by confocal microscope showing 208 nuclei stained with SytoGreen fluorescent dye. **A**, 2D (x, y) merged image where nuclei are shown as green spots. **B**, 2D (y, z) merged digital image colour-indexed on z-depth from red to violet. **C**, 2D (x, y) merged digital image colour-indexed: red colour on the bottom and violet on the top to facilitate nuclear counting. Panels **A** and **C** are a maximum intensity projection of 260 optical sections with z-resolution of 0.15 μm. Scale bar represents 10 μm.

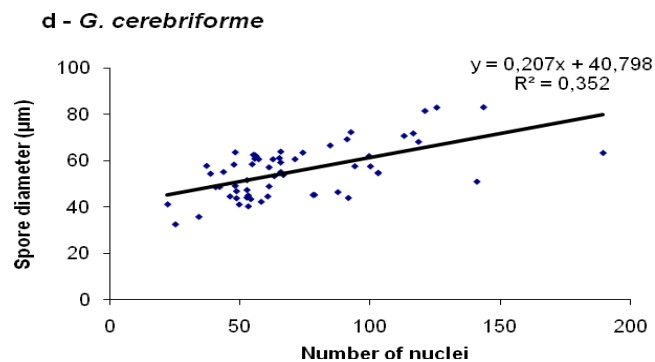
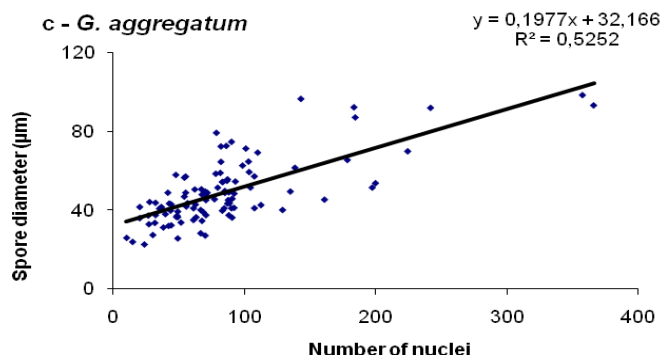
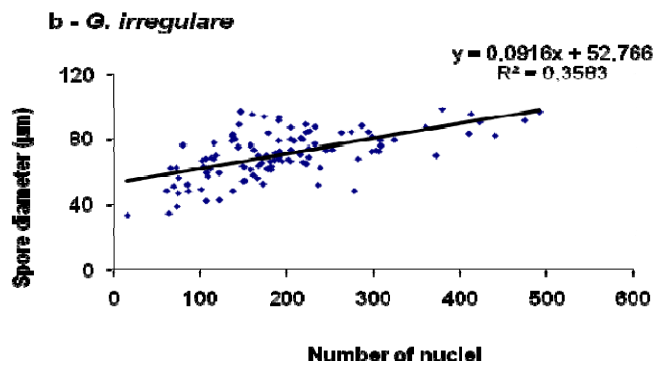
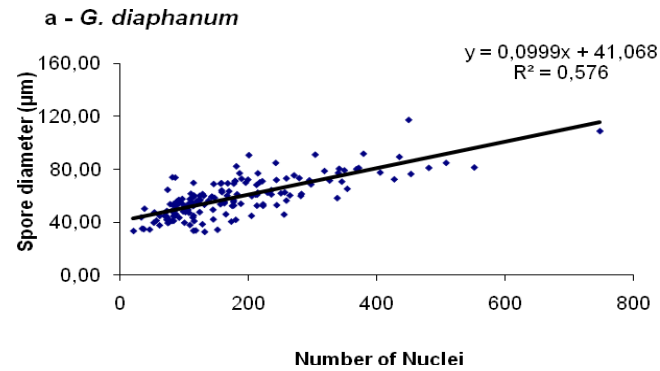


Figure 2.2: Number of nuclei per spore. The number of nuclei in juvenile and mature spores plotted against spore diameter of *G. diaphanum* ($y = -162.53 (P = 0.00) + 5.76x (P = 0.00), R^2 = 0.57$). The diameter of spores plotted against the number of nuclei per spore. **A**, *G. irregulare* (n = 113); **B**, *G. aggregatum* (n = 105) and **C**, *G. cerebriforme* (n = 60). *G. cerebriforme* spores had the smallest number of nuclei per spore and were also the smallest in size, while *G. diaphanum* spores had the largest number of nuclei per spore. There is a positive linear relation between the number of nuclei per spore and spore diameter: *G. irregulare* ($y = -81.09 + 3.91x, R^2 = 0.3583$), *G. aggregatum* ($y = -45.69 + 2.65x, R^2 = 0.5252$) and *G. cerebriforme* ($y = -21.35 + 1.66x, R^2 = 0.3425$). All slopes were statistically significant at $p < 0.05$.

2.4.2 Heterogeneity of the number of nuclei per spores

We also compared the number of nuclei per spore and the spore diameter of different classes for each of our four AM fungal taxa. We found a high heterogeneity in the number of nuclei per spore of the same diameter classes (Figure 2.3 and Additional File 2.3). For example, the number of nuclei in *G. irregulare* spores varied by a factor of nearly 5 in the diameter class 94-103 μm .

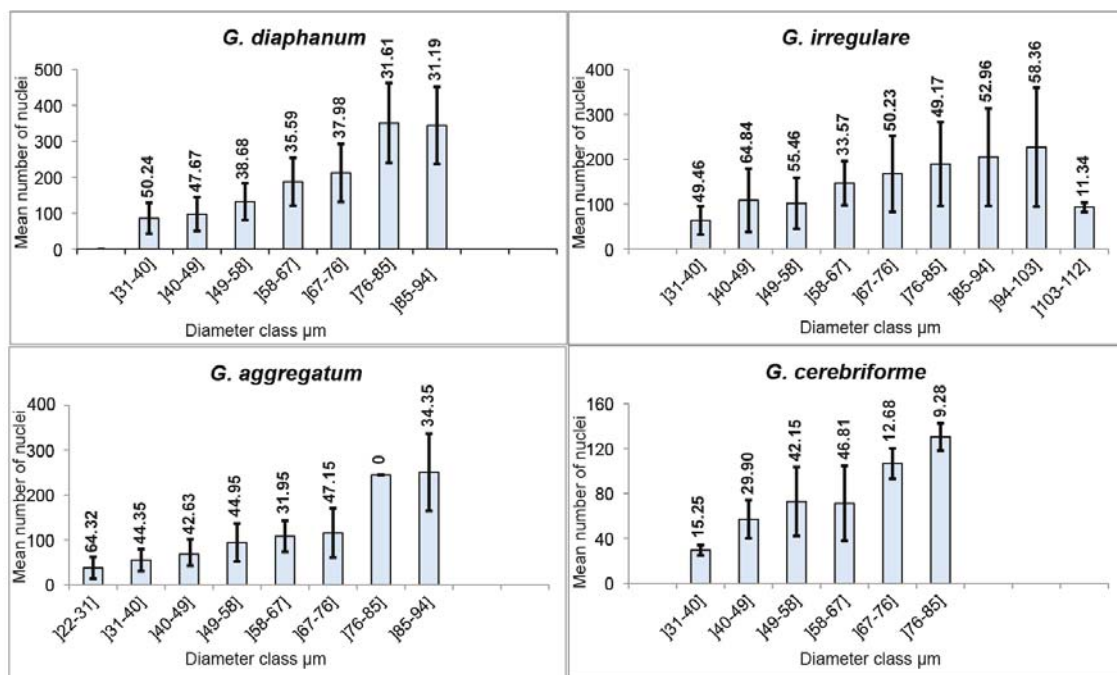


Figure 2.3: Heterogeneity of the number of nuclei per spore. The number of nuclei per spore compared with spore diameter grouped by classes for four AM fungal taxa. Coefficients of variation are shown in bold on the top of error bars.

2.4.3 Mechanism of spore formation in *G. irregulare* and *G. diaphanum*

We used two independent, but complementary, imaging experiments to examine the nuclear inheritance process. In a two-compartmented *in vitro* system (St-Arnaud *et al.*, 1996), *G. irregulare* was grown on transformed carrot roots that were restricted to one compartment (proximal). Only the fungus was permitted to grow on to the second compartment (distal) containing the same media lacking the sugar and complemented with aphidicolin, a inhibitor of mitosis (Bécard & Pfeffer, 1993). The formation of spores over time was monitored in the distal compartment. We found that while aphidicolin did not inhibit spore formation or hyphal growth, the number of newly produced spores was reduced by 14-fold in comparison to the control (Additional File 2.4). We then examined the number of nuclei per spore and the diameter of spores that were produced in the distal compartment for both aphidicolin and control treatments. The aphidicolin had no significant effect on the spore diameter ($W = 782$, $p = 0.753$), but reduced the number of nuclei per spore by 67.2% ($W = 1207.5$, $p = 0.00001$) (Additional File 2.5). On average, nuclear number per spore was 55.2 ± 40.3 SE, ($n = 22$) and 168.3 ± 90.7 SE, ($n = 165$) for aphidicolin and control treatments, respectively.

To confirm this nuclear migration we next made direct observations of individual nuclei in live cells in real time. Time-lapse series taken with a confocal microscope of *G. diaphanum* spores clearly showed nuclear migration from the hypha into the developing spores (Figure 2.4 and Additional File 2.6).

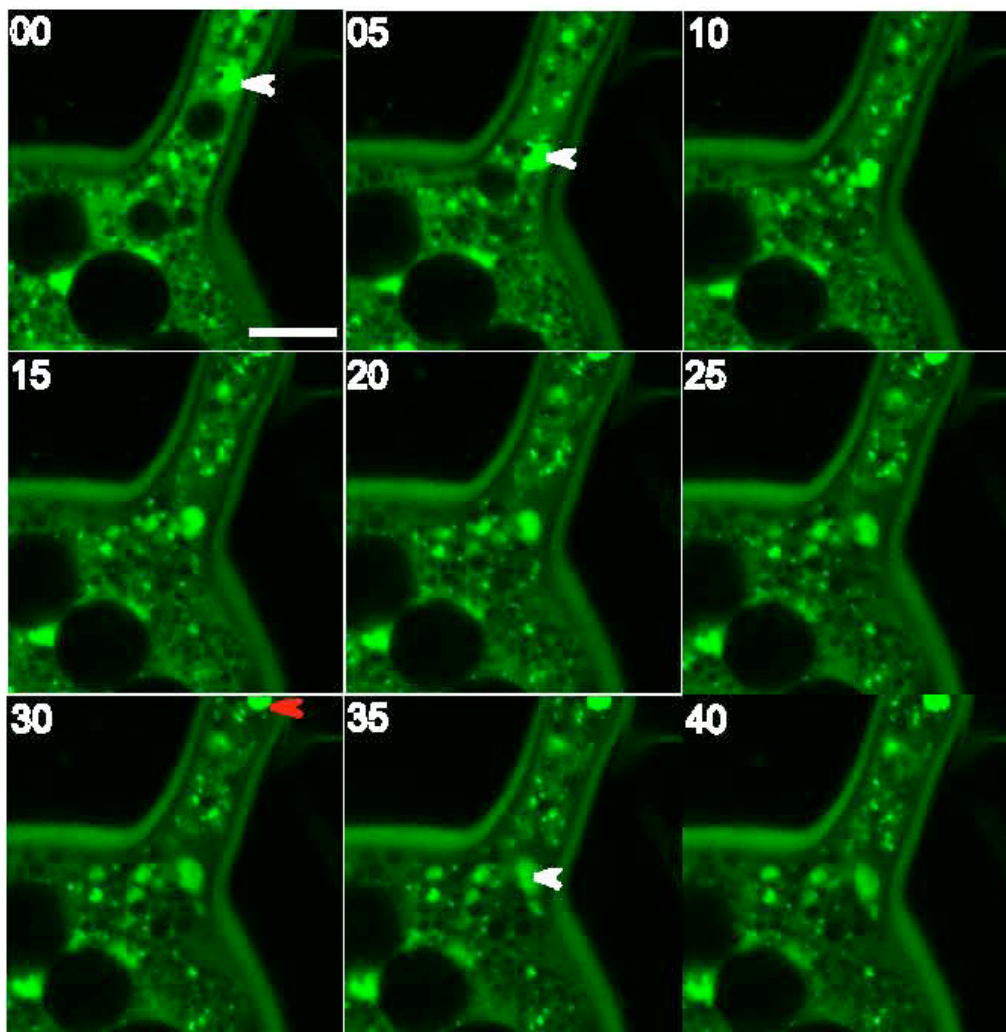


Figure 2.4: Time-lapse series on AM fungal live spores. Panels represent 5 min intervals in a time-lapse sequence monitoring nuclear migration into a developing spore of *G. diaphanum* by confocal microscopy. SytoGreen stained nuclei move unidirectionally into the spore. Images were acquired on xyt mode. Arrowheads indicate the first (white) and second (red) nucleus entering the spore. Note that some nuclei are out of focus in the xy optical section and can be difficult to visualize. Scale bar on the top-left panel represents 10 μm . Numbers on the top left of each panel are minutes.

2.4.4 Spore formation over time and spore viability

We followed spore formation of the AM fungus *G. irregulare* over time for 120 days using optical microscopy (Figure 2.5). We began with spore primordia (time 0) (Figure 2.5A-B) and followed their development process at different intervals (0, 15, 30, 60 and 90 days; Figure 2.5A-J). We found that fast spore growth occurred during the first 30 days after hyphal swelling, with a 10-fold increase in spore volume between 15 and 30 days of growth (Table 2.1) and that spore size increased slow down during the subsequent 60 days. In addition, an increase of the number of nuclei per spore over time was observed when the number of nuclei was assessed by confocal microscopy (Figure 2.5B, D, F, H and J). More importantly, while approximately 90% of the spores, from 15 days old and older, were viable as assessed by vital dye staining, only spores that were at least 30 days old were able to germinate and to regenerate an *in vitro* functioning colony when associated with transformed carrot roots (Table 2.1). The number of nuclei in these 30 day-old spores ranged from 65 to 222 with a mean of 153.3 ± 46.2 SE ($n = 18$). The number of nuclei in 15 day-old spores, that were viable but could not germinate, ranged from 16 to 101 with a mean of 65.09 ± 32.1 SE ($n = 11$). We examined the number of nuclei in mature spores that failed to germinate and observed that many of them contain no nuclei or degenerating nuclei (Additional File 2.7). However, some non-germinating spores had the same number of nuclei as others that were able to germinate.

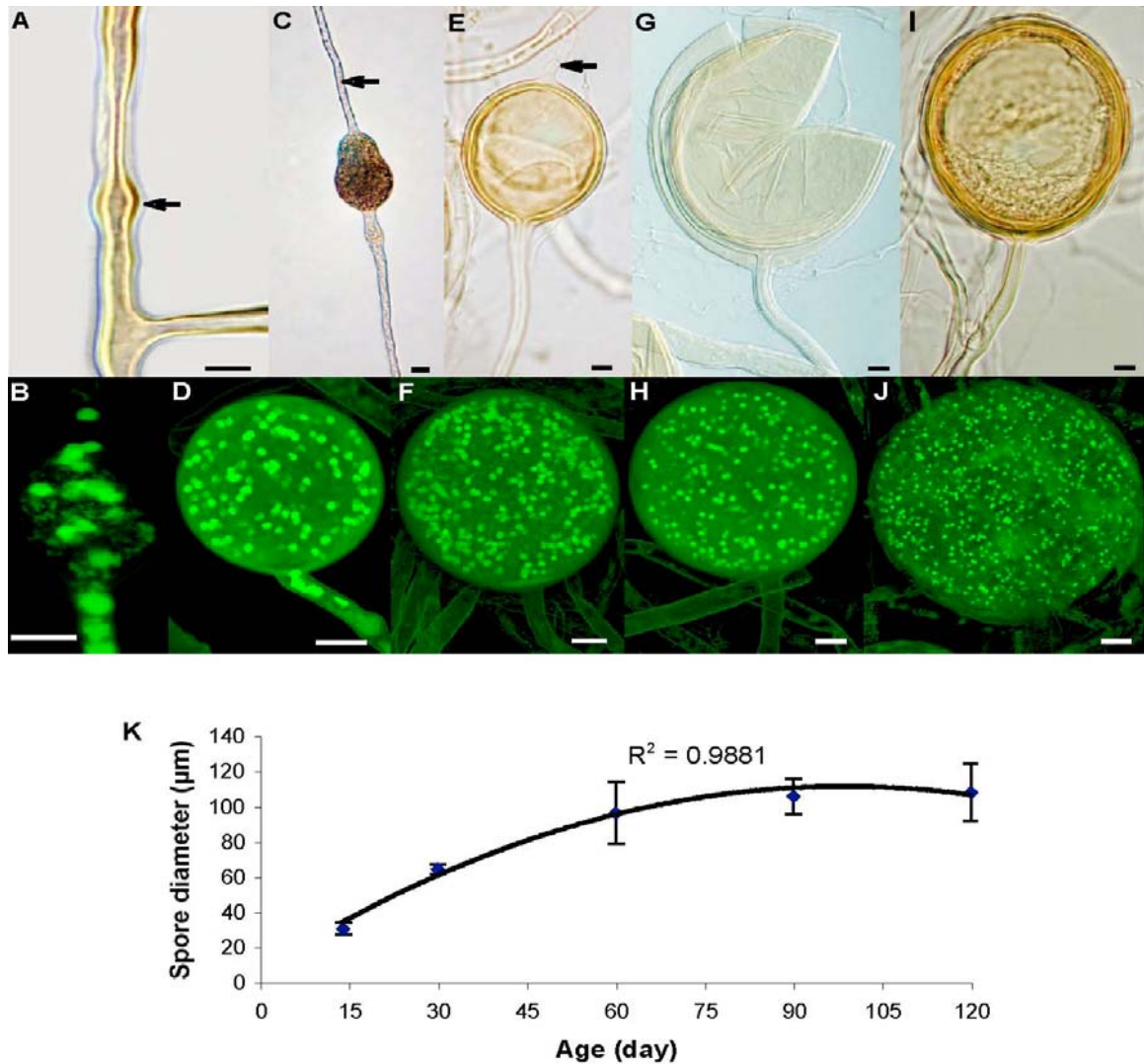


Figure 2.5: Spore development over time. **A** and **B**, Intercalary swellings along the double-walled hypha give rise to a spore primordium (arrow in **A**). **C** and **D**, 15 day-old juvenile spore with subtending hypha and a septum in the mother hypha (arrow in **C**). **E** and **F**, Intercalary 30 day-old spores with subtending hypha and bi-layered spore wall. **G**, Crushed 60 day-old spore with subtending hypha and separating spore wall layers. The apical portion of the mother hypha has emptied, septated and detached from the spore (arrow in **E**). **H**, 60 day-old spore observed with a confocal microscope. **I** and **J**, 90 day-old mature spore still attached to subtending hyphae. The images in panels **A**, **C**, **E**, **G** and **I** were taken by a differential interference contrast microscope. The projection of z-stack in panels **B**, **D**, **F**, **H** and **J** were taken by a confocal microscope where nuclei were stained with

SytoGreen fluorescent dye. Scale bars represent 10 μm . **K**, Spore diameter plotted against spore age using a quadratic model ($y = -0,0107x^2 + 2,1243x + 5,9132$).

Table 2.1: A, Spore volume increase of *in vitro* differentiated spores of *G. irregulare* over time (n=25); B, Percent spore viability and percent spore germination of *in vitro* differentiated spores of *G. irregulare* over time (n = 25, for each selected age category).

Age of spores	Mean spore diameter (μm)	Spore volume (μm^3)	Viability (%)	Germination (%)
14 days	30.4	15 000	90	0
30 days	64.2	139 000	90	40
60 days	96	460 000	90	38
90 days	105.7	610 000	95	50

2.4.5 Nuclear stage of extraradical phase

A careful examination of spores, runner hyphae and fine branchings from five independent extraradical symbiotic mycelia of *G. diaphanum* has shown that the number of nuclei per mycelium biomass changed with the morphological structure. There were more nuclei per spore than the numbers observed in 100 μm of either runner hyphae or fine branchings, a length containing the same volume as the spore volume. However, considering their small diameter, the density of nuclei per volume of mycelium was significantly higher in the runner hyphae and fine branchings compared with spores (Table 2.2). Density is the division of number of nuclei by the volume for the same architectural structure. Volumes of a spore and hyphae (RH and FB) were calculated with these equations: $\frac{4}{3} \pi r^3$ and $2\pi r^2 * L$ respectively. The formation of septae was not observed in runner hyphae but was noted in 32% of the fine branchings, with numbers of nuclei varying from 0 to 18.5 per 100 μm of hyphal length. Interestingly, compartments containing only a single nucleus were never observed.

Table 2.2: Number of nuclei in the different architectural structure forming the extraradical mycelium of *G. diaphanum* (n = 21 spores, 20 RH and 22 FB). This table differ from the publish one.

Architectural structure ¹	Diameter × length ² (μm)	Nb of nuclei	Density ³ (μm ³)
Spore	72.6	282 / spore	0.001407 a
RH	6.9 × 157.3	10.3 / 100 μm	0.001378 b
FB	3.3 × 131.0	5.8 / 100 μm	0.003391 b

¹ Structures are spores, runner hyphae (RH) and fine branching (FB).

² Diameter (all) and length (RH, FB) or the structure portion used to count the nuclei.

³Density of nuclei followed with a different letter are significantly different between structures by a **Tukey-Kramer** HSD test.

2.5 Discussion

The number of nuclei in spores has been previously estimated by several methods with widely divergent results (Viera & Glenn, 1990). For example, using a model in which nuclei occur as a single layer around the periphery of the cytoplasm (Burggraaf & Beringer, 1987), the number of nuclei in *Gigaspora margarita* spores was estimated at about 20,000, while a different method based on digital image measurements estimated the number of nuclei per spore to be about 2,000 (Bécard & Pfeffer, 1993). Here we used confocal microscopy with a high z-resolution for three-dimensional (3D) reconstructions, which allow a direct counting of nuclei and visualization of their 3D architecture in live spores. As far as we know, this is a novel rapid and high-accuracy method for determining the number of nuclei per spore in AM fungi. Recently, Jany and Pawlowska have reconstructed 3D images of the AM fungus *G. etunicatum* using deconvolution, a computational based-method used to reduce out-of-focus fluorescence in 3D microscope images (Jany & Pawlowska, 2010).

We found a surprisingly high heterogeneity in the number of nuclei per spore of different diameter classes. The number of nuclei in *G. irregulare* spores varied by about 5-fold in the diameter class 94-103 μm . Our results show clearly that spores of the AM fungi used here do not have a constant number of nuclei per spore.

We used two independent but complementary imaging experiments based on aphidicolin treatment and time-lapse live cellular imaging to examine the nuclear inheritance process in *G. irregulare* and *G. diaphanum*. We used *G. irregulare* in aphidicolin treatment because it is fast growing under *in vitro* culture. However, *G. diaphanum* was chosen for time-lapse experiments because its spores contained the higher number of nuclei. When tested on AM fungal spores, aphidicolin did not inhibit spore germination of the AM fungus *Gig. margarita*, but rapidly reduced the rate of hyphal growth and arrests growth after four days, owing to efficient inhibition of DNA synthesis (Bécard & Pfeffer, 1993). We tested aphidicolin on yeast cells and found that no mitosis occurred in samples where media were complemented with aphidicolin whereas optical density (DO) increased over time in samples without aphidicolin (data not shown). When spore formation was monitored over time in the distal compartment, we found that aphidicolin did not inhibit spore formation or the hyphal growth, but the number of newly produced spores was dramatically reduced. Aphidicolin had no significant effect on the spore diameter ($F_{1.88} = 0.02$, $P = 0.90$), but reduced the number of nuclei per spore by approximately three-fold ($F_{1.88} = 15.18$, $P \leq 0.0002$). Since the nuclei observed in the spores differentiated in the distal compartment (containing aphidicolin) could not have been produced by mitosis in the newly formed spores, they must have migrated from the proximal compartment, through hyphae, into the developing spore. Considering that the average nuclear number per spore treated with aphidicolin was approximately three times less than that of the control, it suggests that during spore development at least one mitotic cycle occurs, allowing a duplication of the migrated nuclei. To confirm this nuclear migration, we made direct observations of individual nuclei in live cells in time-lapse. Time-lapse series taken with a confocal microscope of the AM fungus *G. diaphanum* spores clearly show nuclear migration from the hypha into the developing spores. In total, we observed 534 live AM fungal spores of four taxa, all of which showed continuous

connections between hyphal and spore cytoplasm without any apparent septa (Additional File 2.8). These results support the hypothesis that AM fungal spores are formed by a massive nuclear migration and are in agreement with results reported using *G. etunicatum* (Jany & Pawlowska, 2010). Interestingly, these nuclei could potentially carry different genomes, as there is considerable evidence suggesting that AMF contain populations of genetically different nucleotypes coexisting in a common cytoplasm (Kuhn *et al.*, 2001; Hijri & Sanders, 2005; Hijri *et al.*, 2007; Angelard *et al.*, 2010; Boon *et al.*, 2010; Cárdenas-Flores *et al.*, 2010). In addition, genetic exchange has only recently been demonstrated to occur among AM fungal isolates that are genetically distinct (Croll *et al.*, 2009). Furthermore, recent results demonstrated that genetic exchange and segregation in AM fungi significantly affect the plant response (Angelard *et al.*, 2010).

Taken together, our results clearly point to nuclear migration and mitosis is the mechanism by which AM fungal spores accumulate up to thousands of nuclei. However, one potential consequence of this mechanism is the loss of the genetic diversity by drift-driven processes. During sporulation, the evolutionary process of change in the nucleotype frequencies (or genome frequencies) of a nuclear population from one generation to the next is due to the phenomenon of probability, in which pure chance events determine which nuclei within the overall nuclear population will be carried forward while others disappear. Two strategies could be envisaged to counter a potential loss of genetic diversity in AM fungi, either a selective sampling of certain nucleotypes from the overall population, or random selection coupled with a mechanism to ensure that spores contain adequate numbers of nuclei. Although previous models have demonstrated that hyphal fusion and nuclear exchange are important mechanism for the maintenance of high nuclear diversity (Bever & Wang, 2005), this has been also reported to occur between genetically different isolate of the AM fungus *G. intraradices* (Croll *et al.*, 2009). Recombination has been reported to occur in AM fungi (Croll & Sanders, 2009) but at low frequency and it is thus unlikely to contribute significantly in maintaining the unusual high genetic diversity observed frequently within AM fungal isolates (Kuhn *et al.*, 2001; Boon *et al.*, 2010).

We asked, what is the minimum number of nuclei to make up a viable spore and ensure its ability to germinate? To address this question, we followed spore formation of the AM fungus *G. irregulare* over time for 120 days using optical microscopy. We examined the number of nuclei in mature spores that failed to germinate and observed that some of them had the same number of nuclei as others that were able to germinate. However, while it is possible that spore germination requires a minimum number of nuclei, this minimum number may vary due to other factors such as spore maturity or dormancy. Contrary to *G. etunicatum* where spores reached the mature size within 2–3 days (Jany & Pawlowska, 2010), *G. irregulare* isolate DAOM-197198 spores reached their mature size within 30 to 60 days (Fig. 2.5 and Additional Files 2.9 and 2.10). This is surprising, because *G. irregulare* is a very fast growing AM fungus and therefore used as commercial inoculant sold worldwide. The *G. etunicatum* isolate NPI used in our laboratory has an extreme slow growth rate.

The high levels of within-individual genetic variation combined with the large number of nuclei in AM fungal spores may thus be the evolutionary strategy adapted by AM fungi in order to reconcile their multigenomic organization with the need to remain adaptable to diverse micro-environmental changes.

We examined various stages during the extraradical phases of *G. irregulare* including the symbiotic phase (running hyphae, branching hyphae and developing spores) and the resting phase (mature spores) and did not observe any structure with a single nucleus (Table 2.2). Although our observations were based on *in vitro* laboratory cultures, a single cell with a single nucleus has also never been found in nature, even though AM fungi are well studied in natural ecosystems. If sexual reproduction exists in Glomeromycota, it should be extremely marginal and would not contribute to the maintenance of genetic diversity in nature since asexual reproduction clearly dominates the lifecycle of these organisms. It has been hypothesized that auxiliary cells in *Gigaspora* species might represent vestiges of relict reproductive structures (Morton & Benny, 1990) but without evidences of caryogamy. Tommerup (Tommerup, 1988; Tommerup & Sivasithamparam, 1990) has reported the formation of what was interpreted as zygosporangia in *Gigaspora decipiens* in 0.24% of hyphal contacts in a monosporal-grown mycelium,

while all other contacts resulted in vegetative growth with or without anastomosis formation. Except for this case, to our knowledge gametangial formation has never been reported elsewhere despite many descriptions of the extramatrical mycelia architecture (Friese & Allen, 1991; Bago *et al.*, 1998; Giovannetti *et al.*, 1999; Giovannetti *et al.*, 2001) and an extensive literature on intraradical colonization (Dodd *et al.*, 2000; Dickson *et al.*, 2007).

2.6 Conclusions

The finding that AM fungi lack a single nuclear stage brings a new level of understanding to the processes that govern this major eukaryotic symbiosis and to how genetic drift and selection act on these organisms. Understanding AM fungal reproduction and genetics is important in management of crop nutrition and fertilizer reduction via those beneficial fungal plant symbionts, and clearly, new conceptual and genetic tools will have to be developed to address the evolution of these multigenomic organisms.

2.7 List of abbreviations

AM fungi, Arbuscular Mycorrhizal Fungi; 3D, three-dimensional; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide); RH, runner hyphae; FB, fine branching; DMSO, Dimethyl sulfoxide; DAOM, National Mycological Herbarium.

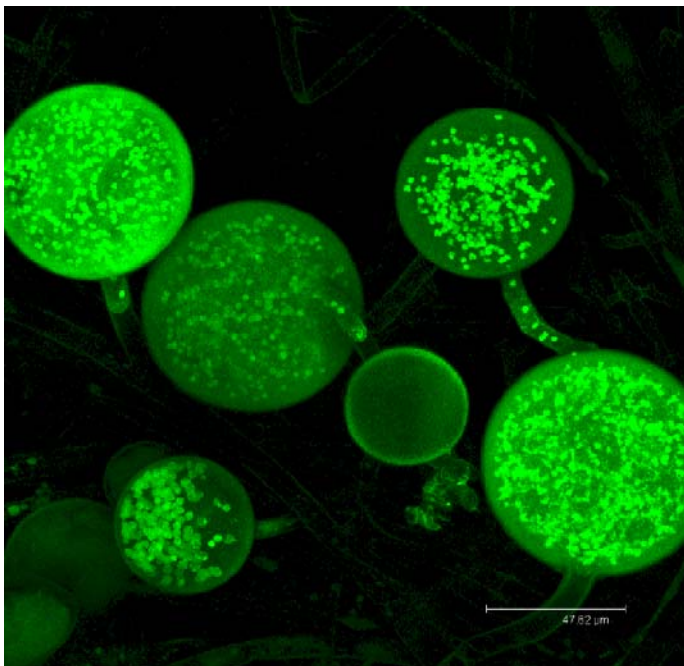
2.8 Acknowledgements

This work was supported by NSERC discovery grant to MH. We thank the Canada Foundation for Innovation (CFI) grant to MH for the confocal microscopy facility and FQRNT for award of a scholarship to JM. We thank Dr I.R. Sanders for allowing part of this work to be conducted in his lab at the University of Lausanne. We also thank K. Coquart for technical assistance, Dr R. Lahlali for assistance on statistics, Dr D. Morse, Dr. C. Cameron and Dr. R. Maranger for comments and discussions.

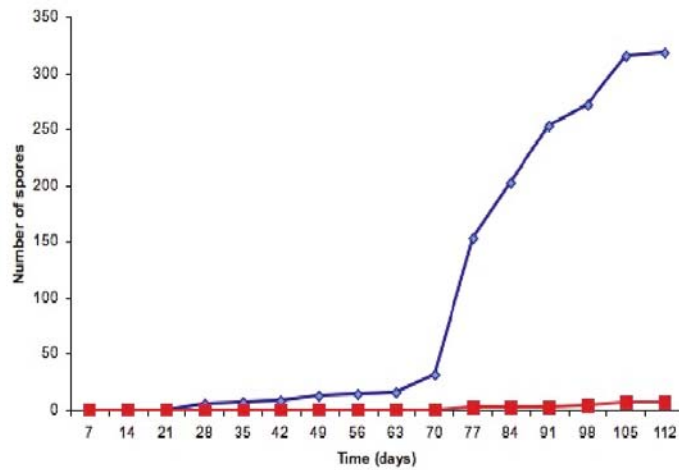
2.9 Additional files

Additional file 2.1 – Video: Example of a z-stack series of *Glomus diaphanum* live spore observed with a confocal microscope. Nuclei were visualized as large green spots with SytoGreen fluorescent dye, while mitochondria are shown as small green spots. The movie was acquired at 1 frame every 0.15 μm for a total of 260 frames and displayed at a rate of 5 frames/sec.

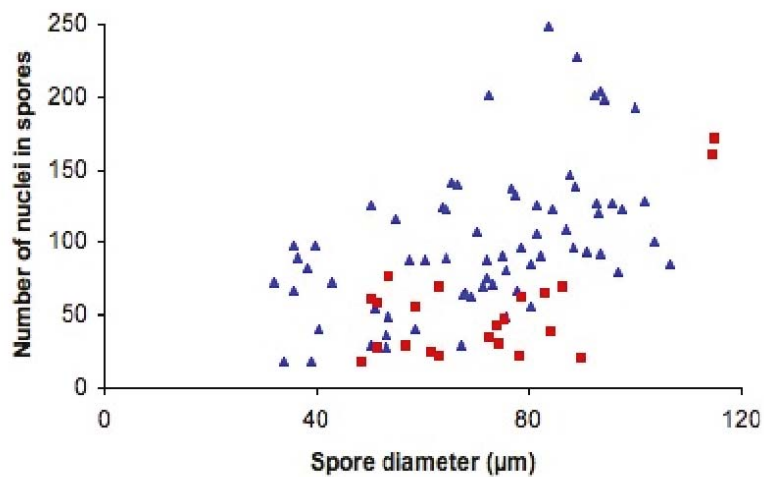
Additional file 2.2 – Video: 3D reconstruction of 260 optical sections with z-resolution of 0.15 μm , showing a full turn of *G. diaphanum* live spore with nuclei color indexed. The movie is displayed at a rate of 5 frames/sec.



Additional file 2.3 - Supplementary figure: Merged image of 100 optical sections of sister spores of *G. diaphanum* showing heterogeneity of nuclear content. Nuclei were stained with SytoGreen fluorescent dye. Scale bar represents 47.62 μm .

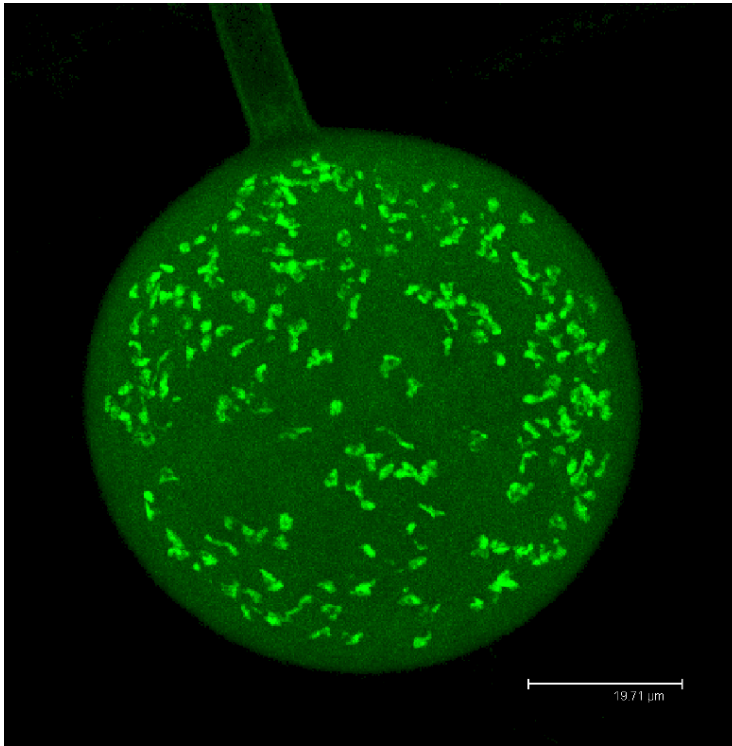


Additional file 2.4 - Supplementary figure: The mean number of newly produced spores plotted against time (days) of *G. irregulare* treated with aphidicolin diluted in DMSO or DMSO alone as a control on six replicates each. Red and blue curves represent aphidicolin and control treatments, respectively.

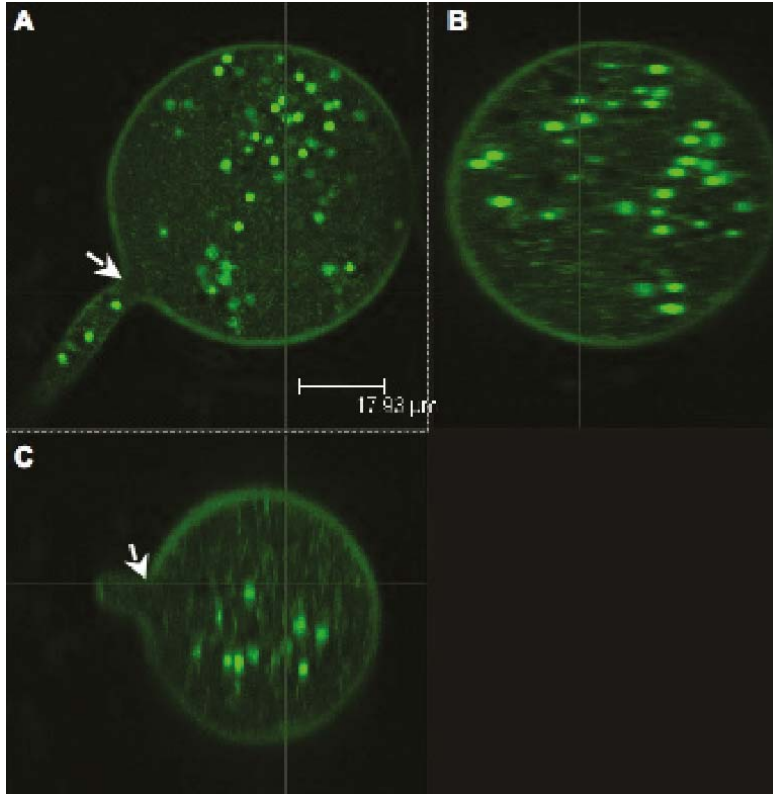


Additional file 2.5 - Supplementary figure: The number of nuclei per spore plotted against the diameter of spores of *G. irregulare* treated with aphidicolin (red squares, n = 22) and the control (blue triangles, n = 68).

Additional file 2.6 – Video: Time-lapse series on *G. diaphanum* live spore. Nuclei were visualized as large green spots with SytoGreen fluorescent dye, while mitochondria were stained with MitoTracker and are shown as small red spots. The movie was acquired at 1 frame every 5 min for a total of 90 min and displayed at a rate of 5 frames/sec.



Additional file 2.7 - Supplementary figure: Merged image of 150 optical sections of non-germinating spore of *G. diaphanum* showing nuclei in a degenerating phase. Nuclei were stained with SytoGreen fluorescent dye. Scale bar represents 19.71 μm.



Additional file 2.8 - Supplementary figure: *G. diaphanum* spore observed with confocal microscope where nuclei were visualized by SytoGreen fluorescent dye (green spots) showing direct connection of spore and the subtending hyphal cytoplasm (arrows). **A**, xy focal plane; **B**, yz projection; and **C**, xz projection. Scale bar in panel A represents 17.93 μm .

Additional file 2.9 - Supplementary text and references: AM fungal spore development of *G. irregulare* over time, viability and germination rates.

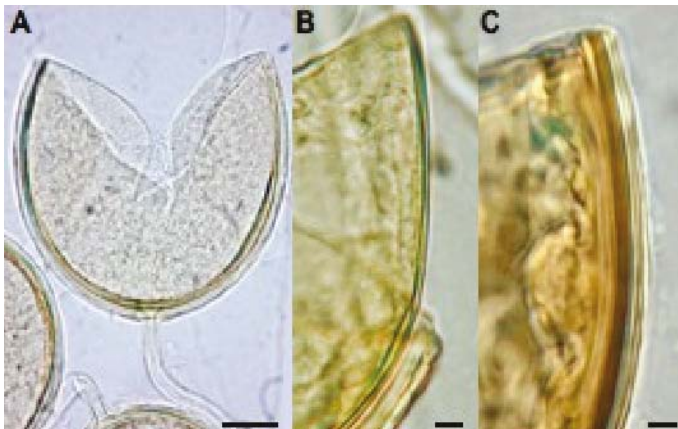
AM fungi were propagated under *in vitro* conditions on root-organ cultures. Gel plugs (10 mm diameter) from a growing culture of *G. irregulare* (DAOM 197198) bearing spores and mycelium were transferred to Petri plates containing a Minimal (M) medium (1 solidified with 4g L-1 Gel Gro TM (ICN Biomedicals, Inc, Irvine, California USA), at the rate of one plug per plate for a total of 10 plates. In each bi-compartmented Petri plate, a *Daucus carota* L. transformed root was deposited in the vicinity of the gel plug and

inverted cultures were incubated at 28°C in darkness until propagation in the distal section of the culture.

Spore selection and measurement over time. The diameter of globose juvenile to mature *G. irregulare* spores isolated from field soil ranged from 50 to 130 µm with a mean value of 92-95 µm (Blaszkowski *et al.*, 2008). *In vitro* differentiated spores reached a similar range of spore diameter. The original description of *G. irregulare* Blaszk., Wubet, Renker & Buscot (2008) characterized spores as ovoid, to irregular, pale yellow, 60-130 X 80-240 µm in diameter, surrounded by two hyaline semi-permanent walls covering a laminated inner wall reactive to Melzer's reagent (Blaszkowski *et al.*, 2008).

Architectural hyphae of *G. irregulare* colonies, also called runner hyphae and their ramifications of 7-12 µm diameter are surrounded by a bi-layered wall (1.0 - 1.8 µm thick). Intercalary swellings along those hyphae give rise to spore primordia (Fig. 2.5A). Their early detection was considered to be time 0 of spore ontogeny observations. The spore primordia rapidly increase in diameter, fed by a continuous cytoplasm flow (Fig. 2.5C). This corresponds to stage 1 of spore differentiation (Friese & Allen, 1991). At 15 days old, still attached to their mother hyphae, juvenile spores, 24-36 µm in diameter, usually differentiated a thin inner wall in addition to their original double hyphal wall, for a total wall thickness of 1.5 µm (Fig. 2.5C). The new differentiated inner wall corresponds to the first lamination of the laminated wall seen on mature spores. This corresponds to the beginning of stage 2 of spore differentiation (Stürmer & Morton, 1997). Concurrently to inner wall differentiation, spores continue to increase in diameter via the constant inflow from the fungal colony through the mother hyphae. Between 15 and 30 days, 3 to 4 laminations are newly cumulated to the inner spore wall. Spore diameter doubled to attain 59-70 µm, with a spore wall between 2.3 and 3.1 µm thick. At the proximal side of the spore, the subtending hyphae that link the spore to the fungal colony slowly compacted from flare to cylindrical shape and were gradually lined at the pore level by the newly differentiated inner wall laminations. After 30 days of growth, subsequent spore development consisted essentially of the synthesis of additional laminations (Additional File 2.10A) and the slight thickening of the median wall. At 60 days old, spores attained

almost their maximum size (77-115 μm in diameter). On crushed spores, outer and median walls readily separated from the inner laminated wall (Additional File 2.10B) and often appeared as an empty hyaline shell. With spore maturation, up to twelve successive laminations could be detected in 90 day-old spores (Additional File 2.10C). With age, spore volume increased slowed down with as a result the gradual compaction of the newly differentiated laminations of the inner spore wall.



Additional file 2.10 - Supplementary figure: Cell wall structure of *G.irregulare* spores of different ages. **A**, Open 30 day-old spore with subtending hypha, outside hyaline spore wall and inside pale yellow pigmented spore wall. **B**, Closer view of 60 day-old spore wall with bi-layered outer walls and laminated inner wall. **C**, Walls of 90 day-old mature spore with bi-layered outer wall and multi-laminated inner wall. Images were taken with DIC optical microscope. **A**, Scale bar represents 20 μm . **B, C**, Scale bars represent 10 μm .

**Chapitre 3 Anastomoses et échanges génétiques entre
différents isolats de *Glomus irregulare***

3.1 Résumé

Des marqueurs mitochondriaux ont été développés pour étudier les échanges génétiques chez différents isolats de *Glomus irregulare* provenant de différentes régions géographiques. Pour étudier les anastomoses, des spores en germination ont été confrontées pour dénombrer les fusions d'hyphes entre différents isolats et à l'intérieur du même isolat. Le pourcentage de fusions d'hyphes le plus élevé (49%) a été retrouvé pour les spores appartenant au même isolat, alors que des pourcentages de 9% et 13% ont été retrouvés pour deux confrontations entre différents isolats. Des croisements d'isolats ont été faits par la mise en culture *in vitro* de paires d'isolats qui ont été repiqués sur une période de deux ans. La progéniture de la troisième génération a été analysée pour deux marqueurs mitochondriaux. Dans la plupart des cas, les spores possédaient l'un ou l'autre des marqueurs parentaux. Les résultats ne peuvent confirmer qu'un échange génétique des génomes mitochondriaux a eu lieu entre différents isolats malgré la présence de fusions d'hyphes entre eux. D'autres analyses devront être faites pour vérifier la possibilité d'un échange génétique entre deux isolats différents provenant de différentes régions géographiques.

3.2 Introduction

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sont des biotrophes obligatoires qui forment des symbioses avec plus de 80% des plantes terrestres (Smith & Read, 1997), seules quelques familles de plantes n'étant pas colonisables par les CMA (Wang & Qiu, 2006). Cette symbiose est essentielle à la survie des CMA puisqu'ils obtiennent la totalité de leur carbone par leur partenaire végétal (Bago *et al.*, 2000). Le champignon, grâce à son réseau d'hyphes extraracinaires, puise plus loin dans le sol les minéraux et l'eau comparativement aux racines des plantes, permettant ainsi d'augmenter les ressources nutritionnelles de leur hôte, notamment en phosphore (Helgason & Fitter, 2005). Les plantes sont ainsi plus résistantes aux stress hydriques (Augé, 2004). De plus, le champignon protège les racines des plantes contre plusieurs types de pathogènes et de ravageurs (St-Arnaud & Vujanovic, 2007).

Les CMA sont des êtres asexués et multinucléés qui sont apparus il y a plus de 460 millions d'années (Redecker *et al.*, 2000a). Il est fort probable qu'ils ont joué un rôle important dans la colonisation terrestre des plantes. Il était acquis que les CMA faisaient partie du phylum monophylétique des Glomeromycota et étaient le groupe frère des Basidiomycota et des Ascomycota (Schüssler *et al.*, 2001), mais dernièrement des études ont contredit ces phylogénies, suggérant de remettre les CMA avec le phylum polyphylétique des Zygomycota (Lee & Young, 2009). Les CMA possèdent des hyphes cénocytiques dans lesquels des centaines de noyaux peuvent bouger librement (Bago *et al.*, 1999). Plusieurs études ont démontré que ces noyaux sont hétérocaryotiques, mais cette conclusion ne fait pas encore l'unanimité chez les chercheurs (Pawłowska, 2005; Young, 2008). Une grande variabilité génétique a été retrouvée au sein de spores individuelles dans les séquences ribosomales et les gènes codant des protéines (Sanders *et al.*, 1995; Lloyd-Macgilp *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 2001). Cette diversité génétique, selon l'hypothèse hétérocaryotique, est répartie entre les différents noyaux présents dans le mycélium (Kuhn *et al.*, 2001). Même si les spores héritent beaucoup de noyaux provenant du mycélium lors de leur formation (Marleau *et al.*, in press), il est fort plausible de croire qu'une dérive génique ait lieu malgré tout (Sanders, 2002), tous les génomes ne pouvant pas se retrouver dans chacune des spores produites comme l'a démontré Cárdenas-Flores *et al* (2010).

Cárdenas-Flores *et al* (2010) ont étudié des lignées clonales différentes qui proviennent toutes de la même culture mère de l'isolat DAOM 197198. Ils ont observé que la fréquence d'anastomose était plus élevée à l'intérieur d'une même lignée clonale qu'entre différentes lignées clonales. Ils concluaient qu'il était possible que cela soit dû à la dérive génique. Les anastomoses seraient un mécanisme pour rétablir cette diversité génétique perdue, en permettant le passage de noyaux porteurs de différents génomes d'un individu à l'autre. Chez le même isolat, il est connu que des anastomoses soient possibles entre spores en germination et entre réseaux mycélien représentant la phase présymbiotique et la phase symbiotique du champignon respectivement (Giovannetti *et al.*, 1999; Giovannetti *et al.*, 2001). Jusqu'à tout récemment, il était assumé que des anastomoses entre différents isolats étaient impossibles ou qu'en cas de fusion elle était suivi d'un

mécanisme d'incompatibilité végétative. Néanmoins, Croll *et al* (2009) ont mené la première étude qui a permis de démontrer le contraire en observant des échanges génétiques entre différents isolats chez *Glomus intraradices*.

Cette étude a été menée dans le but de vérifier, tout comme l'étude de Croll *et al* (2009), que des anastomoses et des échanges génétiques entre isolats génétiquement différents sont possibles mais avec des isolats qui sont encore plus éloignés géographiquement et en utilisant des marqueurs mitochondriaux. Le système expérimental est semblable à celui de Croll *et al* (2009). Le pourcentage d'anastomose en phase présymbiotique a été noté pour différentes combinaisons d'isolats, puis des co-cultures ont été faites. Cependant, au lieu d'extraire l'ADN de tout le mycélium d'une culture inoculée d'une spore individuelle provenant des co-cultures, l'ADN total de spores individuelles a été amplifiée pour vérifier la présence des marqueurs parentaux.

3.3 Méthodes

3.3.1 Matériel fongique et co-culture

Quatre isolats différents de *G. irregulare* ont été utilisés pour les co-cultures; un isolat provenant de Finlande (DAOM 234328), et trois isolats provenant du Canada (Quetico, Ontario (DAOM 213198), Pont-Rouge, Québec (DAOM 197198), Dufrost, Manitoba (DAOM 240415). Les isolats ont été obtenus de la collection GINCO (Glomales *in vitro* Collection) et ont été mis en culture avec des racines de carottes (*Daucus carota L.*) transformées avec le plasmide Ri d'*Agrobacterium rhizogenes* sur milieu M solidifié avec du gellan gum et maintenu à 25°C dans des boîtes de pétri. Un morceau de racine colonisé avec un des quatre isolats de *Glomus irregulare* a été mis en culture avec un autre morceau de racine colonisé avec un autre isolat sur milieu M. Six paires d'isolats différents ont été mis en co-culture et ont été maintenu à 25°C sur milieu M solidifié avec du gellan gum dans des grosses boîtes de pétri. Les cultures ont été repiquées au six mois, sur une période de deux ans.

3.3.2 Marqueurs moléculaires

Sept marqueurs moléculaires potentiels ont été découverts avec l'alignement des génomes mitochondriaux de deux isolats différents de *Glomus irregulare* (Franz Lang, communication personnelle), un provenant du Canada (DAOM 197198) et l'autre de Suisse (isolat 494 (Lee & Young, 2009)). Chaque isolat utilisé pour les co-cultures a été analysé pour ces sept différentes régions mitochondriales. Des PCR ont été faites sur l'ADN total de chaque isolat qui avait préalablement été amplifié avec le *whole genome amplification kit* (GE healthcare). Deux marqueurs qui présentaient des insertions/délétions (Indel 1 et Indel 5) entre différents isolats ont été sélectionnés. Les marqueurs Indel 5 de trois isolats ont été séquencés puis des alignements de séquences ont été faits.

3.3.3 Formation d'anastomoses

Des spores ont été extraites à partir du gel des cultures parentales avec une solution citrate (Doner & Bécard, 1991). Des couples de spores de deux différents isolats, (DAOM 240415 et 234328) et (DAOM 197198 et 234328), et du même isolat (DAOM 197198 et 197198) ont été placés sur eau gélifiée avec du Gellum gum dans des pétris et maintenus à 25 °C. Après germination et croissance des spores pour une période d'un mois, les spores ont été observées au microscope optique (Nikon TE 2000).

3.3.4 Échange génétique

Le génome de 10 spores individuelles de la troisième génération de deux co-cultures, (DAOM 234328 et 240415) et (DAOM 197198 et 234328), a été amplifié par le *whole genome amplification kit* (GE healthcare) et des PCR ont été faites sur l'ADN amplifié pour les deux marqueurs avec les amorces suivantes : Indel 1F 5'-CTA GAG GGC CCC AGT GCT ATG GA-3', Indel 1R 5'-TTC TGA CAT CTC TAG TAC GGC CT-3',

Indel 5F 5'-ATT GAG CGA GCA GGG TCT ATG G-3', Indel 5R 5'-AGT GTG CAG GTT ACA CCA ACG G-3'. Les conditions d'amplification étaient : une dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles de dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'hybridation de 30 secondes à 60°C et d'élongation d'une minute à 72°C, puis d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

3.4 Résultats

3.4.1 Marqueurs génétiques parentaux

Des comparaisons de séquences ont été faites entre l'isolat du Québec, DAOM 197198, et celui de Suisse, l'isolat 494 (Lee & Young, 2009), dans leur génome mitochondrial. Sept régions contenant du polymorphisme ont été retrouvées entre les deux génomes au niveau des séquences intergéniques. Des amorces ont été conçues pour les sept régions et ont été testées sur les isolats utilisés dans cette étude. L'ADN total de l'isolat DAOM 213198 a été mal amplifié et les amplifications PCR faites sur cet ADN n'ont pas fonctionné. Les résultats des amplifications PCR ont révélé que deux régions étaient variables entre l'isolat de Finlande et ceux du Canada (amorces Indel 1 et Indel 5). La figure 3.1 présente un gel d'électrophorèse des produits PCR obtenus avec les amorces de l'Indel 5 pour les trois isolats. Il est possible d'y observer que les deux isolats du Canada possèdent des fragments de la même longueur et que ces fragments sont plus petits que le fragment amplifié de l'isolat de Finlande. Ces marqueurs ont été sélectionnés pour la suite de cette étude. Le marqueur Indel 5 des trois isolats a été cloné et séquencé puis des alignements de séquences ont été faits. Les séquences des isolats du Canada sont identiques. Ces séquences, lorsque comparées à celle de l'isolat de la Finlande, révèlent une délétion ou insertion de 39 paires de bases entre elles (Figure 3.2).

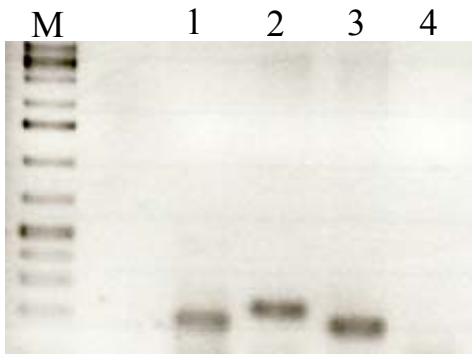


Figure 3.1: Marqueurs parentaux amplifiés avec amorces Indel 5 à partir de l'ADN total de chaque isolat de *Glomus irregulare*. puit **1**, DAOM 197198, puit **2**, DAOM 234328, puit **3**, DAOM 240415, puit **4**, témoin négatif. **M**, Marqueurs de poids moléculaires *1 kb DNA ladder plus*.

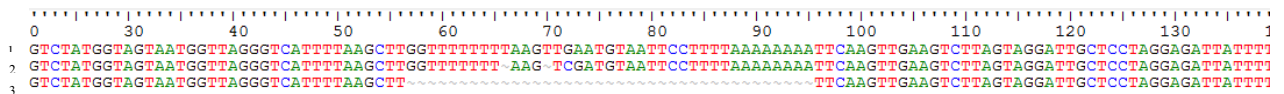


Figure 3.2: Aligement de séquences d'ADN d'un intergène du génome mitochondrial de trois isolats de *Glomus irregulare*. **1** DAOM 197198 (Québec, Canada) **2** DAOM 240415 (Manitoba, Canada) **3** DAOM 234328 (Finlande).

3.4.2 Échange génétique

Dix spores de chaque co-culture pour lesquels les isolats présentaient des marqueurs génétiques variables (DAOM 197198 et 234328 et DAOM 240415 et 234328) ont été amplifiées avec le *whole genome amplification kit*. Des amplifications PCR ont été réalisées sur ces spores pour les marqueurs Indel 1 et Indel 5. Après migration sur gel d'électrophorèse, il était possible d'observer le nombre et la taille des fragments amplifiés et constater que les spores ne contenaient qu'un seul marqueur, un des deux marqueurs parentaux, à l'exception de l'amplification PCR avec amorces Indel 5 pour la co-culture

DAOM 240215 et 234328 (Figure 3.3). Certaines spores possèdent deux fragments amplifiés (Figure 3.5: puits 4 à 7 et puit 9).

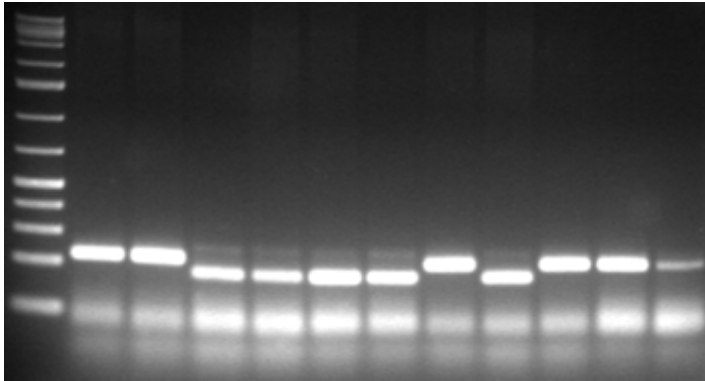


Figure 3.3: Gel d'électrophorèse des produits PCR de l'amplification avec amorces Indel 5 de l'ADN total des spores filles issues de la co-culture DAOM 240415 et 234328. Premier puit: Marqueurs de poids moléculaires *1 kb DNA ladder plus*, dernier puit : témoin négatif, autres puits : spores individuelles.

3.4.3 Anastomoses

Des couples de spores ont été déposés sur de l'eau gélifiée pour germination. Les spores du couple provenaient du même isolat DAOM 197198 ($n = 220$) ou d'isolats différents, DAOM 197198 et 234328 ($n = 126$) et DAOM 240415 et 234328 ($n = 115$). Les pourcentages d'anastomose ont été déterminés par l'observation des spores sous un microscope optique (Figure 3.4). Les pourcentages de fusion d'hyphe, d'incompatibilité végétative, de germination et le pourcentage de cas sans réaction au contact ou sans contact sont présentés dans le Tableau 3.1. L'incompatibilité végétative se produit au contact ou à l'approche d'un hyphe d'un autre individu et est caractérisée par la rétraction du protoplasme et la formation d'un septum alors que lorsqu'il n'y eu aucune réaction au contact c'est qu'il n'y a eu aucune transformation physiologique d'une des deux hyphe. Le pourcentage d'anastomose a été obtenu par absence ou présence de fusion d'hyphe par

couple et non par contact d'hyphes. La combinaison d'isolat qui a obtenu le plus haut pourcentage de fusion d'hyphes (49%) est celle où les deux spores provenaient du même isolat (DAOM 197198). Les autres pourcentages de fusion d'hyphes sont de 13% et 9% pour la combinaison de différents isolats, DAOM 197198 et 234328 et DAOM 240415 et 234328 respectivement. Aucune réaction d'incompatibilité végétative n'a été observée dans les trois combinaisons d'isolats. Les pourcentages des cas où il n'y a eu aucun contact ou aucune réaction au contact est de 51%, 87% et 91% pour DAOM 197198, DAOM 197198 et 234328 et DAOM 240415 et 234328 respectivement. Le pourcentage de germination varie selon les combinaisons d'isolats, il est de 99% pour le DAOM 197198, 79% pour la combinaison des isolats DAOM 240415 et 234328 et 70% pour la combinaison des isolats DAOM 197198 et 234328. Chez les couples de spores des isolats DAOM 197198 et 234328, 34% des spores des couples qui n'ont pas fait de fusion d'hyphes entre eux, ont fait des fusions d'hyphes sur leur propre hyphe. Pour les isolats DAOM 240415 et 234328, ce pourcentage est de 24% et pour l'isolat DAOM 197198, il est de 77% (Figure 3.5 et 3.6).

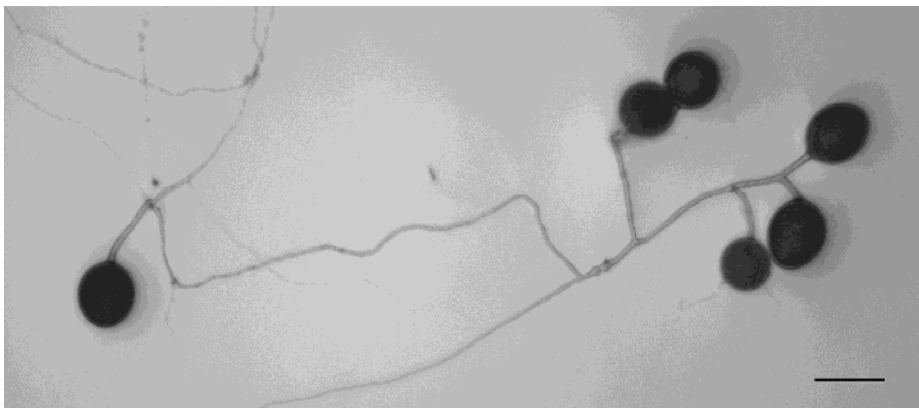


Figure 3.4: Anastomose entre deux individus différents du même isolat DAOM 197198 de l'espèce *Glomus irregulare*. Un groupe de spores et une spore ont été déposés sur gel pour germination. L'échelle est de 100 μm .

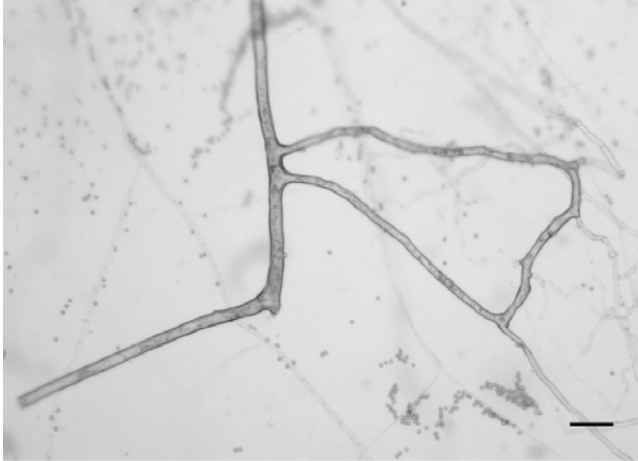


Figure 3.5: Anastomose entre des hyphes appartenant à la même spore de l'isolat DAOM 197198 de l'espèce *Glomus irregulare*. L'échelle est de 20 μm .

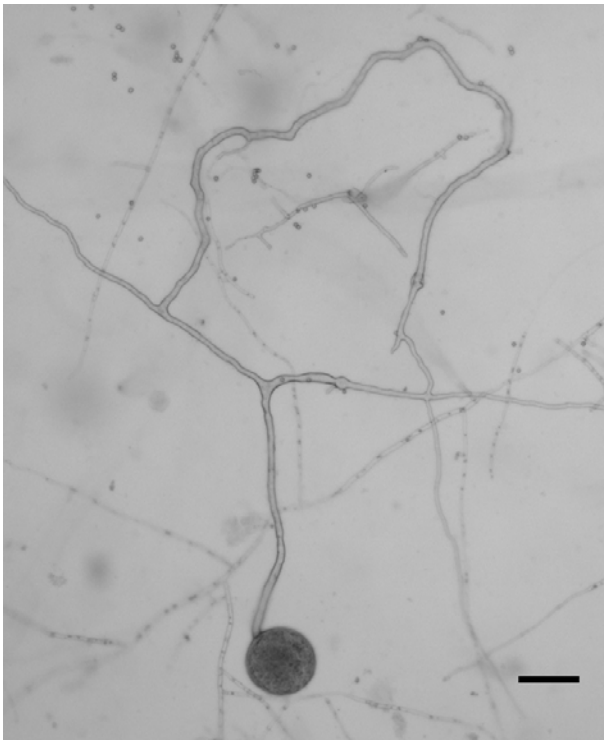


Figure 3.6: Anastomose entre des hyphes appartenant à la même spore de l'isolat DAOM 197198 de l'espèce *Glomus irregulare*. L'échelle est de 50 μm .

Tableau 3.1 : Pourcentage de germination, d'anastomoses, d'incompatibilité végétative et pourcentage de couple n'ayant eu aucun contact ou aucune réaction au contact pour trois différentes combinaisons de spores en germination provenant de différents isolats ou du même isolat. Le pourcentage d'anastomose a été obtenu par absence ou présence de fusion d'hyphe par couple et non par contact d'hyphes.

Co-culture (DAOM)	% FP	% In	% SR	% Germination
197198 et 234328	13	0	87	70
240215 et 234328	9	0	91	79
197198 et 197198	49	0	51	99

FP: Fusion parfaite entre deux spores de différents isolats

In: Incompatibilité végétative

SR: Sans réaction au contact ou sans contact

3.5 Discussion

3.5.1 Marqueurs génétiques parentaux

Compte tenu de la grande variabilité des marqueurs nucléaires et de la difficulté d'identifier les isolats et les espèces à l'aide de ceux-ci, la recherche de marqueurs génétiques chez les isolats de *Glomus irregulare* a été conduite sur le génome mitochondrial. Le génome mitochondrial des CMA est plus homogène que le génome nucléaire. C'est ce que nous a indiqué le premier séquençage complet du génome mitochondrial de *Glomus intraradices* réalisé par Lee et Young (2009). Il a aussi été démontré que le gène de la grande sous-unité ribosomale des mitochondries ne possède pas de variabilité intraspécifique (Raab *et al.*, 2005). Le génome mitochondrial est identique au sein d'une population de mitochondries à l'intérieur d'un même individu contrairement aux populations de noyaux qui possèdent des génomes différents. Deux hypothèses sont proposées: l'existence d'un mécanisme de transmission comme chez la levure ou une

ségrégation des génomes due à un goulot d'étranglement (Lee & Young, 2009). Ces marqueurs nous ont d'ailleurs déjà permis de changer la phylogénie des CMA, en ramenant le phylum des Glomeromycota avec les Zygomycètes au lieu d'être le groupe frère des Dycaria (Ascomycota et Basidiomycota) (Lee & Young, 2009). Les analyses de séquences entre les génomes mitochondriaux d'isolats de *G. irregulare* ont permis de trouver des marqueurs génétiques qui différencient les isolats du Canada avec celui de la Finlande. Puisque les anastomoses permettent l'échange de noyaux différents, ils permettent aussi l'échange de génomes mitochondriaux différents (Young, 2009), alors si des anastomoses sont possibles entre les différents isolats de cette étude, il y a de fortes possibilités qu'un échange de matériel génétique soit possible entre eux.

3.5.2 Échange génétique

Dix spores ont été prises de la co-culture DAOM 197198 et 234328 pour l'analyse de leur profil génétique pour les deux marqueurs. Aucun échange génétique ne semble avoir eu lieu entre les isolats, car pour chaque marqueur les spores filles de ces co-cultures contenaient seulement un des deux marqueurs parentaux. L'absence de spores filles présentant les deux marqueurs parentaux n'indique pas nécessairement qu'il n'y a pas eu d'échange génétique entre les isolats, car un échange protoplasmique peut avoir eu lieu mais en faible quantité et les mitochondries de l'autre isolat n'auraient pas été partagées dans toutes les nouvelles spores formées. Les 10 spores de la co-culture DAOM 240415 et 234328 pour le marqueur Indel 1 présentent seulement un des deux marqueurs parentaux. Pour le marqueur Indel 5, certaines spores présentent deux fragments amplifiés sur le gel d'électrophorèse (Figure 3.3), néanmoins cela ne semble pas être les deux fragments des marqueurs parentaux, car le plus grand fragment est un peu plus grand que le marqueur parental. De plus, le témoin négatif contient un fragment, ce qui ne devrait pas être le cas. Toutefois, de la contamination a dû être faite avec de l'ADN d'une des spores filles, car le fragment amplifié est de la même taille qu'un des marqueurs parentaux. D'autres analyses devront être effectuées pour confirmer l'échange de matériel génétique entre ces isolats.

3.5.3 Anastomoses

Aucun mécanisme d'incompatibilité végétative n'a été observé entre les différents croisements de spores individuelles (Tableau 3.1). Cárdenas-Flores *et al* (2010) avançaient qu'il était possible que des isolats génétiquement très différents ne se reconnaissent pas du tout, que ce soit au niveau de la fusion d'hyphe ou de l'incompatibilité végétative. Croll *et al* (2009) suggéraient à leur tour que l'incompatibilité végétative pouvait être un processus graduel selon la distance génétique des isolats impliqués. Dans ce cas, on pourrait alors observer avec deux individus identiques du même isolat des fusions parfaites et aucune incompatibilité végétative, dans la situation inverse, on pourrait observer avec deux isolats génétiquement très éloignés, seulement des réactions d'incompatibilité végétative (ou aucune réaction de reconnaissance), et entre ces deux scénarios, toute la gamme des possibilités. Précisons que 100% des contacts menant à des fusions d'hyphes parfaites ou 100% des contacts menant à des réactions d'incompatibilité ne sont pas des extrêmes envisageables, car aucune étude ne rapporte des pourcentages plus élevés que 90% de fusion d'hyphes ou de plus de 51% d'incompatibilité végétative. La différence des pourcentages résulte en contact avec aucune réponse cellulaire (Giovannetti *et al.*, 1999; Giovannetti *et al.*, 2003). Aucune réaction d'incompatibilité n'a été rapportée entre deux espèces différentes de CMA appuyant les hypothèses amenées ici. Dans l'étude menée par Giovannetti *et al* (2003), aucune fusion d'hyphes n'a été observée, que des réactions d'incompatibilité ayant été observées entre des isolats de l'espèce *G. mosseae* de régions géographiques très éloignées. Les isolats n'étaient pas assez similaires pour faire des fusions d'hyphes mais pas assez éloignés pour n'observer aucune réponse dans l'incompatibilité végétative, pourtant les isolats étaient pour la plupart très éloignés, 2 provenaient de la Grande-Bretagne, 2 des États-Unis, un de la Syrie et un de la France. Dans mon étude, j'ai aussi utilisé des isolats de régions géographiques très éloignées de l'espèce *G. irregulare*, trois isolats proviennent du Canada (Manitoba, Ontario et Québec) et un de la Finlande. Néanmoins, des fusions d'hyphes ont été observées malgré cette distance géographique entre deux isolats du Canada et celui de la Finlande et aucune réaction d'incompatibilité végétative n'a été observée. La diversité génétique n'est pas

nécessairement corrélée avec la distance géographique quoiqu'il soit évident que ce soit un facteur important dans la diversification des espèces. Dans une autre étude impliquant des croisements entre différents isolats de *G. intraradices* provenant du même champ agricole, les isolats n'étaient séparés que par 30 à 85 mètres et des réactions d'incompatibilité végétative ont été observées ainsi qu'un faible nombre d'anastomoses (Croll *et al.*, 2009). Dans mon étude, le pourcentage d'anastomose (Tableau 3.1) a été obtenu par absence ou présence de fusion d'hyphe par couple de spores et non par contact d'hyphe comme on retrouve dans les publications présentées dans cet article. Jusqu'à 13% de fusions d'hyphe ont été observées entre l'isolat du Canada (Québec) et l'isolat de la Finlande. Si le pourcentage avait été calculé selon le nombre de fusions d'hyphe par contact d'hyphe, ce pourcentage aurait été plus élevé. Toutefois, l'activité de la déshydrogénase succinate n'a pas été vérifiée afin de visualiser la bonne continuité du cytoplasme dans les fusions d'hyphe et leur viabilité (Giovannetti *et al.*, 1999; Giovannetti *et al.*, 2001). Si l'on compare ces résultats avec ceux de Croll *et al* (2009), il est surprenant d'observer une si forte fréquence de fusions d'hyphe entre l'isolat du Canada et celui de la Finlande (\approx 13%), car des isolats appartenant au même champ agricole ont eu un pourcentage de fusion d'hyphe plus faible avec un maximum de 10,3% de fusions d'hyphe. De plus, si des fusions d'hyphe sont possibles entre des isolats du même champ et des isolats de différents continents, si des incompatibilités végétatives ont lieu entre des isolats du même champ, il serait logique d'en retrouver aussi entre des isolats de différents continents. Cardenas-Flores *et al* (2010), ont aussi confronté l'isolat DAOM 197198 du Canada (Québec) avec un isolat des îles Canaries et ils n'ont observé aucune fusion d'hyphe et aucune incompatibilité végétative, les deux isolats ne se reconnaissant à aucun niveau. Ce manque d'observation d'anastomoses entre ces isolats pourrait tout simplement être dû à l'échantillonnage, puisque Cárdenas-Flores *et al* (2010) ont utilisé un faible nombre de spores. En comparant avec les autres études, il aurait été plus probable de ne retrouver entre les isolats du Canada et celui de la Finlande aucune fusion d'hyphe avec ou sans réaction d'incompatibilité. Les quatre études comparées ici sur l'incompatibilité végétative et les anastomoses rapportent des observations qui ont été faites sur des spores en germination, c'est-à-dire des spores qui étaient en phase présymbiotique. Cela devrait permettre

d'uniformiser les résultats entre les études, mais d'autres facteurs, autres que la phase du cycle de vie du champignon, peuvent influencer les résultats comme l'âge de la culture et les conditions de croissance. Les isolats et les espèces choisies peuvent aussi posséder des réponses physiologiques différentes face à la reconnaissance d'un autre champignon. L'anastomose n'est pas un phénomène tout ou rien, il n'est pas toujours évident de trancher entre fusion parfaite, fusion avec post-incompatibilité ou contact sans réaction, alors il est possible que l'observateur soit une source considérable de variation entre les études.

Le pourcentage d'anastomoses pour les couples de spores appartenant au même isolat (DAOM 197198) est beaucoup plus élevé que les autres combinaisons, il est de 49% et, comme expliqué plus haut, ce pourcentage est sous-évalué. De plus, aucune réaction d'incompatibilité végétative n'a été observée. Ces résultats sont plus probables, car les individus impliqués dans les confrontations de spores ont une génétique similaire. De plus, ces résultats sont plus semblables à ceux des autres études. Cárdenas-Flores *et al* (2010), qui ont utilisé le même isolat (DAOM 197198) dans leur étude, ont obtenu un pourcentage d'anastomose de 69% en phase présymbiotique. D'autres études ont aussi trouvé des pourcentages d'anastomoses assez élevés pour d'autres espèces de la famille des Glomaceae impliquant le même isolat lors de la phase présymbiotique. Giovannetti *et al* (2003) ont trouvé que six isolats de *G. mosseae* peuvent faire des fusions d'hyphes dans 60 à 85% des contacts d'hyphes à l'intérieur du même isolat. Giovannetti *et al* (1999) ont trouvé un pourcentage d'anastomose de 40%, 34%, 90% pour *G. mosseae*, *G. caledonium* et *G. intraradices* respectivement. Croll *et al* (2010) ont trouvé des pourcentages plus faibles d'anastomose, variant de 45,8 à 51%, pour différents isolats de *G. intraradices* provenant de la Suisse. Aucune incompatibilité végétative n'a été rapportée dans ces études. La variation dans le pourcentage de fusion d'hyphes peut être influencée par les mêmes facteurs que ceux mentionnés pour les confrontations de spores impliquant deux isolats différents.

Dans cette étude, il a aussi été vérifié que les spores en germination de *G. irregulare* pouvaient faire des anastomoses sur les hyphes provenant de la même spore. Ces résultats ne sont pas présentés dans le Tableau 3.1. Seules les spores qui n'ont pas fait

d'anastomoses entre elles ont été observées pour les anastomoses entre deux hyphes provenant de la même spore. Chez les couples de spores des isolats DAOM 197198 et 234328, 34% des spores des couples qui n'ont pas fait de fusion d'hyphes entre eux, ont fait des fusions d'hyphes sur leur propre hyphe. Pour les isolats DAOM 240415 et 234328, ce pourcentage est de 24% et, pour l'isolat DAOM 197198, il est de 77%. Les pourcentages varient beaucoup entre les trois croisements. Il se pourrait que cette variation soit causée par les isolats utilisés ou l'âge de la culture. Un mécanisme de reconnaissance pourrait aussi causer cette variation. Les individus, reconnaissant l'autre spore du couple comme étant génétiquement différent, inhiberaient la formation d'anastomose inhibant du même coup les anastomoses sur eux-mêmes. Ceci expliquerait pourquoi les couples de spores provenant du même isolat ont obtenu le pourcentage d'anastomose le plus élevé et les couples de spores provenant de différents isolats les pourcentages d'anastomose les plus faibles. Giovannetti *et al* (1999) ont étudié le même phénomène sur deux isolats de *Glomus mosseae*, trois isolats de *Glomus caledonium* et deux isolats de *Glomus intraradices*. Ils ont obtenu des pourcentages d'anastomoses par contact d'hyphes qui varient aussi entre les isolats de chaque espèce mais la variation n'est pas aussi forte que celle présentée ici.

En phase présymbiotique, les spores en germination des Glomaceae peuvent former des anastomoses sur eux-mêmes ou sur d'autres spores en germination, alors qu'en phase symbiotique, deux études ont observé que la totalité des anastomoses se font sur des hyphes différents (de la Providencia *et al.*, 2005; Voets *et al.*, 2006). Cette particularité permettrait au CMA de faire probablement plus d'échanges génétiques avec des individus différents en phase symbiotique qu'en phase présymbiotique. Cette différence dans la capacité à faire des anastomoses est probablement due à une différence de fonction selon la phase du cycle de vie du champignon. Par conséquent, l'activation et l'inhibition des gènes impliqués dans les anastomoses doivent être différentes selon la phase du cycle de vie. En phase présymbiotique, la possibilité des spores en germination à fusionner avec d'autres hyphes permettrait d'assurer leur colonisation avec une plante hôte via un réseau d'hyphes extraradicaux, toutefois il n'a pas encore été confirmé qu'une spore en germination pouvait rejoindre un réseau mycélien par fusion d'hyphes (Giovannetti *et al.*, 1999). En phase

symbiotique, les anastomoses permettraient d'augmenter la taille de réseau mycélien en se liant à d'autres réseaux, permettant parfois d'interconnecter plusieurs types de plantes ensemble (Giovannetti *et al.*, 2004; Voets *et al.*, 2006).

3.6 Conclusion

Peu de recherches se sont penchées sur le phénomène des anastomoses chez les CMA jusqu'à maintenant. Il est difficile de faire des affirmations générales sur ce qui a été fait sur les anastomoses, car beaucoup de facteurs varient entre les études comme le nombre d'échantillons, les espèces utilisées, la phase du cycle de vie (présymbiotique ou symbiotique), le système expérimental, etc. De nombreux sujets restent à être explorés, par exemple, peu de recherches se penchent sur la phylogéographie des CMA ou sur leur mode de dispersion en tant que populations ou espèce. Leur structure et leur variabilité génétique compliquent les analyses en systématique. Comment explique-t-on la présence de la même espèce sur des continents différents? Il serait intéressant d'approfondir cet aspect en lien avec leur capacité à se reconnaître comme organismes compatibles ou non, résultant en fusion d'hyphes ou en incompatibilité végétative.

Il existe parfois des incohérences dans les interprétations de certaines études portant sur les anastomoses. Par exemple, Bever et Morton (1999) déduisent que la distribution de la taille et de la forme des spores des nouvelles générations chez *Scutellospora pellucida* serait causée par une ségrégation différente des noyaux hétérocaryotiques et que la variation serait rétablie par des échanges génétiques causés par les anastomoses. Pourtant, aucune fusion d'hyphes n'a été observée chez le genre *Scutellospora* entre différentes spores ou différents réseaux mycéliens, la plupart des anastomoses se produisant sur le même hyphe impliquant le HHM (Giovannetti *et al.*, 1999; Voets *et al.*, 2006). Il est évident que d'autres recherches seront nécessaires pour comprendre la fonction des anastomoses chez les CMA et de leurs conséquences sur la génétique et l'écologie de ces symbiontes obligatoires.

Conclusion générale

La génétique des CMA est encore très peu connue pour l'instant. Plusieurs recherches devront encore être faites pour comprendre leur organisation génomique, leur variabilité génétique, leur taxonomie, leur reproduction etc. Une connaissance générale plus approfondie sur la génétique des CMA permettra d'accélérer les recherches dans plusieurs domaines notamment en biodiversité, en écologie et en agriculture. Des marqueurs pourront être développés afin de déterminer rapidement les populations ou les espèces présentes dans les sols et de quantifier leur biomasse. Une connaissance plus approfondie résultera aussi en une meilleure compréhension de la notion d'espèce, de population et d'individu chez ces importants symbiotes.

Durant ma maîtrise, j'ai étudié les flux génétiques chez les CMA, c'est-à-dire la reproduction asexuée par les spores et les échanges génétiques par les anastomoses. Le contenu génétique des spores matures et juvéniles a été observé à l'aide de la microscopie confocale. Chez les spores matures de quatre espèces, une relation positive a été retrouvée entre le nombre de noyaux et le diamètre de la spore en plus d'une hétérogénéité au sein des spores pour un même diamètre. Les spores en formation de la phase extraracinaire, ainsi que les RH et les FB, sont des structures qui ne possèdent pas de stade uninucléé durant cette phase de leur cycle de vie. Il a aussi été démontré que les noyaux présents dans les spores proviennent d'une migration massive de noyaux dans la spore en formation et est suivie d'un faible nombre de mitoses. Les anastomoses ont été étudiées chez quelques isolats de la même espèce à l'aide de marqueurs mitochondriaux qui ont été développés à cette fin. Des anastomoses ont été observées entre différents isolats, mais il n'a pas pu être démontré qu'un échange génétique a eu lieu entre eux.

Les différents aspects de la génétique des CMA sont loin d'être compris et acceptés par tous les chercheurs de ce domaine d'étude, mais puisque les CMA sont maintenant bien reconnus pour leur importance écologique et économique et qu'ils sont, par conséquent, de plus en plus étudiés, leur génétique sera certainement mieux comprise dans un futur proche.

Références

- Ainsworth AM, Rayner ADM. 1986.** Responses of living hyphae associated with self and non-self fusions in the Basidiomycete *Phanerochaete velutina*. *Journal of General Microbiology* **132**: 191-201.
- Aist JR, Morris NR. 1999.** Mitosis in filamentous fungi: How we got where we are. *Fungal Genetics and Biology* **27**: 1-25.
- An ZQ, Hendrix JW. 1988.** Determining viability of Endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* **80**: 259-261.
- Angelard C, Colard A, Niculita-Hirzel H, Croll D, Sanders IR. 2010.** Segregation in a Mycorrhizal Fungus Alters Rice Growth and Symbiosis-Specific Gene Transcription. *Current Biology* **20**: 1216-1221.
- Augé RM. 2001.** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42.
- Augé RM. 2004.** Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science* **84**: 373-381.
- Avio L, Pellegrino E, Bonari E, Giovannetti M. 2006.** Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytologist* **172**: 347-357.
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Piché Y. 1998.** Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* **90**: 52-62.
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000.** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* **124**: 949-958.
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Piché Y. 1999.** Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo two-photon microscopy. *Protoplasma* **209**: 77-89.
- Barea JM, Azcón-Aguilar C, Azcón R 1997.** Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In A. C. Gange V. K. Brown. *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. London: Blackwell science. 65-77.
- Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 2002.** Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 343-351.
- Bécard G, Fortin JA. 1988.** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**: 211-218.

- Bécard G, Pfeffer PE. 1993.** Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* **174**: 62-68.
- Bever JD 2008.** Genomic organization and mechanisms of inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi: contrasting the evidence and implications of current theories. In: A. Varma ed. *Mycorrhiza-Genetics and molecular biology, eco-function, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics*: Springer, 135-148.
- Bever JD, Morton J. 1999.** Heritable variation and mechanisms of inheritance of spore shape within a population of *Scutellospora pellucida*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *American Journal of Botany* **86**: 1209.
- Bever JD, Wang M. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi: hyphal fusion and multigenomic structure. *Nature* **433**: E3-4; discussion E4.
- Blaszkowski J, Czerniawska B, Wubet T, Schäfer T, Buscot F, Renker C. 2008.** *Glomus irregulare*, a new arbuscular mycorrhizal fungus in the *Glomeromycota*. *Mycotaxon* **106**: 247-267.
- Boon E, Zimmerman E, Lang BF, Hijri M. 2010.** Intra-isolate genome variation in arbuscular mycorrhizal fungi persists in the transcriptome. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 1519-1527.
- Burggraaf AJP, Beringer JE 1987.** Nuclear division and VA-mycorrhizal in-vitro culture. In: D. M. Sylvia, L. L. Hung, J. H. Graham eds. *Mycorrhizae in the next decade: Practical applications and research priorities; Proceedings of the 7th North American conference on mycorrhizae*. Gainesville: University of Florida, 190.
- Cárdenas-Flores A, Draye X, Bivort C, Cranenbrouck S, Declerck S. 2010.** Impact of multispores in vitro subcultivation of *Glomus* sp. MUCL 43194 (DAOM 197198) on vegetative compatibility and genetic diversity detected by AFLP. *Mycorrhiza* **20**: 415-425.
- Croll D, Giovannetti M, Koch AM, Sbrana C, Ehinger M, Lammers PJ, Sanders IR. 2009.** Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **181**: 924-937.
- Croll D, Sanders IR. 2009.** Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus - art. no. 13. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 15.
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernández F, Delmas NS, Declerck S. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist* **165**: 261-271.
- de Souza FA, 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**: 1004-1012.

- Dickson S, Smith FA, Smith SE. 2007.** Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next? *Mycorrhiza* **17**: 375-393.
- Dodd JC, Boddington CL, Rodriguez A, Gonzalez-Chavez C, Mansur I. 2000.** Mycelium of Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant and Soil* **226**: 131-151.
- Doner LW, Bécard G. 1991.** Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnology Techniques* **5**: 25-28.
- Feddermann N, Finlay R, Boller T, Elfstrand M. 2010.** Functional diversity in arbuscular mycorrhiza - the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology* **3**: 1-8.
- Fortin JA, Plenchette C, Piché Y. 2008.** *Les mycorhizes- la nouvelle révolution verte*. Québec: Quae et multimondes 148 p.
- Friese CF, Allen MF. 1991.** The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia* **83**: 409-418.
- Gandolfi A, Sanders IR, Rossi V, Menozzi P. 2003.** Evidence of recombination in putative ancient asexuals. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 754-761.
- Gehrig H, Schüssler A, Kluge M. 1996.** *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 71-81.
- Gerdemann JW, Trappe JM. 1974.** The endogonaceae in the pacific northwest. *Mycologia memoir* **5**: 1-76.
- Giovannetti M, Azzolini D, Citernesi AS. 1999.** Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5571-5575.
- Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP. 2001.** The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* **151**: 717-724.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Strani P. 2004.** Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* **164**: 175-181.
- Giovannetti M, Sbrana C, Strani P, Agnolucci M, Rinaudo V, Avio L. 2003.** Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 616-624.
- Glass NL, Jacobson DJ, Shiu PKT. 2000.** The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* **34**: 165-186.

- Glass NL, Rasmussen C, Roca MG, Read ND. 2004.** Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends in Microbiology* **12**: 135-141.
- Hamel C. 2004.** Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on N and P cycling in the root zone. *Canadian Journal of Soil Science* **84**: 383-395.
- Harrison MJ. 2005.** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology* **59**: 19-42.
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu J. 2002.** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**: 2413-2429.
- Hawkins HJ, Johansen A, George E. 2000.** Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226**: 275-285.
- Helgason T, Fitter A. 2005.** The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologist* **19**: 96-101.
- Hepper CM, Sen R, Azconaguilar C, Grace C. 1988.** Variation in certain isozymes amongst different geographical isolates of the vesicular arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus clarum*, *Glomus monosporum* and *Glomus mosseae*. *Soil Biology & Biochemistry* **20**: 51-59.
- Hickey PC, Jacobson DJ, Read ND, Glass NL. 2002.** Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* **37**: 109-119.
- Hijri M, Hosny M, van Tuinen D, Dulieu H. 1999.** Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) is structured within multinucleate spores. *Fungal Genetics and Biology* **26**: 141-151.
- Hijri M, Niculita H, Sanders IR. 2007.** Molecular characterization of chromosome termini of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (Glomeromycota). *Fungal Genetics and Biology* **44**: 1380-1386.
- Hijri M, Sanders IR. 2004.** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 253-261.
- Hijri M, Sanders IR. 2005.** Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* **433**: 160-163.
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H. 1998.** Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* **41**: 422-428.
- Jakobsen I. 2004.** Hyphal fusion to plant species connections - giant mycelia and community nutrient flow. *New Phytologist* **164**: 4-7.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schussler A, Longcore**

- JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lucking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. 2006.** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822.
- Jany JL, Pawlowska TE. 2010.** Multinucleate spores contribute to evolutionary longevity of asexual Glomeromycota. *American Naturalist* **175**: 424-435.
- Juge C, Coughlan AP, Fortin JA, Piché Y 2009.** Growth and branching of asymbiotic, pre-symbiotic and extraradical AM fungal hyphae : clarification of concepts and terms. In: D. P. Khasa, Y. PichéA. P. Coughlan eds. *Advances in Mycorrhizal Science and Technology*. Ottawa: NRC research press, in press.
- Kenrick P, Crane PR. 1997.** The origin and early evolution of plants on land. *Nature* **389**: 33-39.
- Kling M, Jakobsen I. 1997.** Direct application of carbendazim and propiconazole at field rates to the external mycelium of three arbuscular mycorrhizal fungi species: Effect on P-32 transport and succinate dehydrogenase activity. *Mycorrhiza* **7**: 33-37.
- Koch AM, Croll D, Sanders IR. 2006.** Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecology Letters* **9**: 103-110.
- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR. 2001.** Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **414**: 745-748.
- Lanfranco L, Delpero M, Bonfante P. 1999.** Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* **8**: 37-45.
- Lang BF, Hijri M. 2009.** The complete *Glomus intraradices* mitochondrial genome sequence - a milestone in mycorrhizal research. *New Phytologist* **183**: 4-6.
- Lee J, Young JPW. 2009.** The mitochondrial genome sequence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of *Glomus*. *New Phytologist* **183**: 200-211.
- Liu A, Hamel C, Hamilton RI, Ma BL, Smith DL. 2000.** Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. *Mycorrhiza* **9**: 331-336.
- Lloyd-Macgilp SA, Chambers SM, Dodd JC, Fitter AH, Walker C, Young JPW. 1996.** Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **133**: 103-111.

- Lohe AR, Hilliker AJ, Roberts PA. 1993.** Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**: 1149-1174.
- Marleau J, Dalpé Y, St-Arnaud M, Hijri M. in press.** Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Evolutionary Biology*.
- McCabe PM, Gallagher MP, Deacon JW. 1999.** Microscopic observation of perfect hyphal fusion in *Rhizoctonia solani*. *Mycological Research* **103**: 487-490.
- Meier R, Charvat I. 1993.** Reassessment of tetrazolium bromide as a viability stain for spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *American Journal of Botany* **80**: 1007-1015.
- Morton JB, Benny GL. 1990.** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, 2 new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and 2 new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* **37**: 471-491.
- Morton JB, Redecker D. 2001.** Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* **93**: 181-195.
- Mosse B. 1959.** Observations on the extra-matrical mycelium of a vesicular-arbuscular endophyte. *Transactions of the British Mycological Society* **42**: 439-448.
- Munkvold L, Kjoller R, Vestberg M, Rosendahl S, Jakobsen I. 2004.** High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **164**: 357-364.
- Normark BB, Judson OP, Moran NA. 2003.** Genomic signatures of ancient asexual lineages. *Biological Journal of the Linnean Society* **79**: 69-84.
- Omar MB, Bolland L, Heather WA. 1978.** Permanent mounting medium for fungi. *Stain Technology* **53**: 293-294.
- Pawlowska TE. 2005.** Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* **251**: 185-192.
- Pawlowska TE, Taylor JW. 2004.** Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **427**: 733-737.
- Pawlowska TE, Taylor JW. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi - Hyphal fusion and multigenomic structure - Reply. *Nature* **433**: E4-E4.
- Raab PA, Brennwald A, Redecker D. 2005.** Mitochondrial large ribosomal subunit sequences are homogeneous within isolates of *Glomus* (arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomeromycota*). *Mycological Research* **109**: 1315-1322.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000a.** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**: 1920-1921.
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD. 2000b.** Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **14**: 276-284.

- Redecker D, Raab P. 2006.** Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* **98**: 885-895.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994.** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 11841-11843.
- Rillig MC, Mummey DL. 2006.** Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* **171**: 41-53.
- Rodriguez A, Clapp JP, Dodd JC. 2004.** Ribosomal RNA gene sequence diversity in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Journal of Ecology* **92**: 986-989.
- Rosendahl S. 2008.** Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **178**: 253-266.
- Rosendahl S, Dodd JC, Walker C 1994.** Taxonomy and phylogeny of the Glomales. In: S. GianinazziH. Schüepp eds. *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*: Birkhäuser Verlag, 1-12.
- Rosendahl S, Sen R. 1992.** Isozyme analysis of mycorrhizal fungi and their mycorrhiza. *Methods in Microbiology* **24**: 169-194.
- Rosendahl S, Stukenbrock EH. 2004.** Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Molecular Ecology* **13**: 3179-3186.
- Rosendahl S, Taylor JW. 1997.** Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP(TM). *Molecular Ecology* **6**: 821-829.
- Sanders IR. 2002.** Ecology and evolution of multigenomic arbuscular mycorrhizal fungi. *American Naturalist* **160 Suppl 4**: S128-141.
- Sanders IR. 2003.** Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Trends in Plant Science* **8**: 143-145.
- Sanders IR, Alt M, Groppe K, Boller T, Wiemken A. 1995.** Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* **130**: 419-427.
- Sanders IR, Clapp JP, Wiemken A. 1996.** The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems - a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **133**: 123-134.
- Sbrana C, Nuti MP, Giovannetti M. 2007.** Self-anastomosing ability and vegetative incompatibility of *Tuber borchii* isolates. *Mycorrhiza* **17**: 667-675.
- Schüssler A, Schwarzott D, Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.

- Schwarzott D, Walker C, Schüssler A. 2001.** *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**: 190-197.
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M. 1993.** Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69.
- Smith SE, Read DJ. 1997.** *Mycorrhizal symbiosis*. San Diego and London: Academic press 605.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal symbiosis*. Amsterdam: Academic press 787 p.
- Sokolski S, Dalpé Y, Séguin S, Khasa D, Lévesque A, Piché Y. 2010.** Conspecificity of DAOM 197198, the model arbuscular mycorrhizal fungus, with *Glomus irregulare*: molecular evidence with three protein-encoding genes. *Botany* **88**: 829-838.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1996.** Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research* **100**: 328-332.
- St-Arnaud M, Vujanovic V 2007.** Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. In: C. HamelC. Plenchette eds. *Mycorrhizae in crop production*. Binghamton, NY: Haworth Food and Agricultural Products Press, 67-122.
- Stemans P, Le Herisse A, Melvin J, Miller MA, Paris F, Verniers J, Wellman CH. 2009.** Origin and Radiation of the Earliest Vascular Land Plants. *Science* **324**: 353-353.
- Stockinger H, Kruger M, Schüssler A. 2010.** DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **187**: 461-474.
- Stockinger H, Walker C, Schussler A. 2009.** 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **183**: 1176-1187.
- Stürmer SL, Morton JB. 1997.** Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. *Mycologia* **89**: 72-81.
- Stukenbrock EH, Rosendahl S. 2005.** Clonal diversity and population genetic structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) studied by multilocus genotyping of single spores. *Molecular Ecology* **14**: 743-752.
- Subramanian KS, Charest C. 1999.** Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered conditions. *Mycorrhiza* **9**: 69-75.
- Tanaka K. 1970.** Mitosis in the fungus *Basidiobolus ranarum* as revealed by electron microscopy. *Protoplasma* **70**: 423-440.

- Tanaka Y, Yano K. 2005.** Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. *Plant Cell and Environment* **28**: 1247-1254.
- Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H. 1995.** Fossil arbuscular mycorrhizae from the early devonian
Mycologia **87**: 560-573.
- Tommerup IC 1988.** The vesicular-arbuscular mycorrhizas. In: D. S. Ingram P. H. William eds. *Advance in Plant Pathology*. San Diego: Academic Press.
- Tommerup IC, Sivasithamparam K. 1990.** Zygosporangia and asexual spores of *Gigaspora decipiens*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycological Research* **94**: 897-900.
- Toro M, Azcón R, Barea J. 1997.** Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (^{32}P) and nutrient cycling. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4408-4412.
- Toussaint JP, St-Arnaud M, Charest C. 2004.** Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology* **50**: 251-260.
- Vandenkoornhuyse P, Husband R, Daniell TJ, Watson IJ, Duck JM, Fitter AH, Young JP. 2002.** Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology* **11**: 1555-1564.
- Vandenkoornhuyse P, Leyval C, Bonnin I. 2001.** High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity* **87**: 243-253.
- Viera A, Glenn MG. 1990.** DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycologia* **82**: 263-267.
- Voets L, de la Providencia IE, Declerck S. 2006.** Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytologist* **172**: 185-188.
- Wang B, Qiu YL. 2006.** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299-363.
- Wyss P, Bonfante P. 1993.** Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycological Research* **97**: 1351-1357.
- Young JPW. 2008.** The genetic diversity of intraterrestrial aliens. *New Phytologist* **178**: 465-468.
- Young JPW. 2009.** Kissing cousins: mycorrhizal fungi get together. *New Phytologist* **181**: 751-753.

Zézé A, Sulistyowati E, Ophel-Keller K, Barker S, Smith S. 1997. Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by M13 minisatellite-primed PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 676-678.