

Méthodes de conservation hors sol des champignons mycorhizogènes à arbuscules et effets de la dessiccation et de la température sur leur survie

Catherine Kuszala¹, Vivienne Gianinazzi-Pearson

Résumé : L'importance écologique des champignons mycorhizogènes à arbuscules (MA) en tant que promoteurs de croissance des plantes est reconnue, mais ceux sont des biotrophes obligatoires et par conséquent ils ne sont pas cultivables sans la plante hôte. La connaissance de leur sensibilité à réagir aux différents modes de conservation hors sol est fragmentaire et limitée. Le but de cette étude était d'améliorer notre compréhension du comportement de ces champignons MA et d'aider au choix des conditions de stockage les plus appropriées. Des études ont été menées sur le maintien du pouvoir mycorhizogène de 22 isolats (19 espèces) dans les genres *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* et *Scutellospora* après conservation hors sol dans différentes conditions : à sec ou dans de l'eau osmosée, à des températures positives (+4°C, température ambiante, +27°C et +37°C) ou négatives (dans de l'azote liquide, -80°C et -18°C) ou lyophilisé. La méthodologie utilisée pour tester les moyens de conservation est la reproduction du cycle complet du champignon par ré-inoculation à des plantules exemptes de mycorhize. Les résultats de survie différaient selon l'espèce fongique considérée. Les champignons ont montré une gamme de tolérance à la dessiccation et à la dépendance à l'eau, en fonction de la durée et de la température de conservation. Cette méthodologie a permis de mettre en évidence une alternance de périodes mycorhizogènes et non-mycorhizogènes chez certains, ce qui pourrait suggérer un cycle de dormance/ non-dormance pour quelques espèces. La sensibilité différentielle des espèces de champignons MA aux conditions de stockage, indique des stratégies de survie différentes et une adaptation édaphique. Ces informations peuvent aider à affiner les conditions de leur stockage hors plante.

Mots clés : champignon mycorhizogène à arbuscules, conservation, survie

Introduction

Les champignons mycorhizogènes à arbuscules (MA) (Glomeromycota : Schüssler *et al.*, 2001) colonisent une vaste gamme taxonomique de plantes herbacées et ligneuses dans presque tous les habitats terrestres et climats. Ils forment des associations symbiotiques avantageuses contribuant significativement à la nutrition minérale des plantes, à leur résistance aux stress biotiques et abiotiques, et peuvent stabiliser des agrégats de sol (Smith et Read, 2008). Ils ont donc un intérêt agronomique en tant que promoteurs de croissance (**photo 1**) et pour les services écologiques qu'ils fournissent (Gianinazzi 2010 *et al.*,). Ce sont des symbiotes obligatoires qui ne peuvent se reproduire qu'en colonisant les racines des plantes.

Photo 1 : poireau mycorhizé (A) et non mycorhizé (B)



¹ UMR1088 PME -Plante-microbe-environnement - INRA - F-21065 Dijon Cedex

☎. +33 (0) 3 89 63 34 48 ✉ Catherine.Kuszala@dijon.inra.fr

Ils se reproduisent végétativement en formant des spores asexuées multinucléées sur le réseau mycélien se développant dans le sol et, plus rarement, dans les racines. Les spores peuvent se former séparément, en grappe ou dans des sporocarpes morphologiquement distincts. Quand les conditions de sol sont favorables, les spores germent et leurs hyphes poussent jusqu'aux racines de l'hôte à coloniser.

La germination des spores a été examinée avec une vaste gamme de champignons MA : sur agar, sur des membranes, dans des sols. On sait que la germination des spores est influencée par des facteurs comme le pH, la température, le traitement thermique et la composition du milieu (Giovannetti, 2000). En plus, Tommerup (1983) a suggéré l'existence d'une dormance en examinant la capacité de germination des populations de spores nouvellement formées. Elle a supposé que les spores de l'espèce utilisée étaient naturellement dormantes lors de leur formation initiale. Les périodes de dormance pouvaient s'étendre de quelques semaines à plusieurs mois selon l'espèce ou l'isolat. D'autres études ont montré qu'un stockage au froid des champignons pouvait synchroniser la germination des spores (Safir *et al.*, 1990) ou que le traitement par le froid pouvait lever leur dormance (Juge *et al.*, 2002).

Le pouvoir mycorhizogène des propagules (spores, hyphes, racines mycorhizées) peut être affecté par différents facteurs de conservation, et les différents sols et conditions de culture peuvent influencer la mycorhization et le fonctionnement symbiotique. Les effets de sécheresse ou de dessiccation du sol sur le comportement de ces champignons ont été résumés par Augé (2001). Leur survie a principalement été étudiée dans des sols, sur différents supports (Daft *et al.*, 1987, Douds et Schenck, 1990, Morton *et al.*, 1993) ou plus rarement *ex-situ*, et cela avec différents moyens de conservation comme la lyophilisation (Dalpé, 1987) et la cryopréservation (Declerck et Coppenolle, 2000). En général, les informations sur l'effet des conditions de stockage des champignons MA sur leur viabilité sont fragmentaires. La survie de quelques champignons maintenus dans l'unité, et faisant partie de la collection IBG (International Bank for the Glomeromycota), a été étudiée dans des fractions de sol tamisé sous l'eau courante (Kuszala *et al.*, 2001). Il nous a paru utile d'affiner leurs conditions de stockage pour une meilleure connaissance de leur réponse aux différentes conditions mais aussi pour améliorer la connaissance de leur survie dans leur niche écologique naturelle.

Le but de ce travail a été de comparer les effets de différents moyens de conservation *ex-situ* sur la viabilité de ces champignons. La survie a été évaluée en fonction de leur pouvoir mycorhizogène, par inoculation à des plantules.

1. Matériel et méthodes

1.1 Origine et production des champignons

Toutes les cultures proviennent de la collection IBG maintenue dans l'unité Plante-microbe-environnement du centre Inra de Dijon. Les cultures utilisées étaient gardées dans des pots individuels sur un seul plant de poireau ou de trèfle. Les champignons, les plantes hôtes et les sols utilisés sont listés dans le **tableau 1** (en annexe). Les plantes ont été cultivées soit en serre soit dans des chambres climatisées: photopériode 16 heures, 60-70% humidité relative, 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ illumination et températures 22°C/19°C (jour/nuit) sauf les plantes inoculées avec *Gl. clarum* et deux cultures de *Gi. candida* qui étaient à 27°C/25°C (jour/nuit). Les pots étaient arrosés tous les jours avec de l'eau osmosée et une fois par semaine avec la solution nutritive modifiée (P/10) de Long Ashton (Hewitt, 1966).

1.2 Préparation des champignons

Les sols de support des plantes mycorhizées (**figure 1**) avec les différents isolats de champignon, âgées de 6 à 11 mois ont été tamisés sous l'eau courante (**figure 2**) selon la technique décrite par Kuszala *et al.* (2001). Selon les espèces, des spores, des sporocarpes, du mycelium et / ou des racines mycorhizées ont été collectés afin de servir comme inoculum. Les racines ont été abondamment lavées; un échantillon a été traité dans une solution à 10% d'hydroxyde de potassium pendant 1 heure 30 à 90°C, rincées à l'eau puis colorées avec du bleu de trypan (0,5‰ dans du lactoglycerol et eau) pendant 15 minutes à 90°C et observées au microscope. Les racines étaient mycorhizées à plus de 50%. Les spores (**photo 2A**), les sporocarpes et le mycelium ont été séparés des débris, contrairement à la technique décrite par Kuszala *et al.* (2001), et lavés à l'eau osmosée.

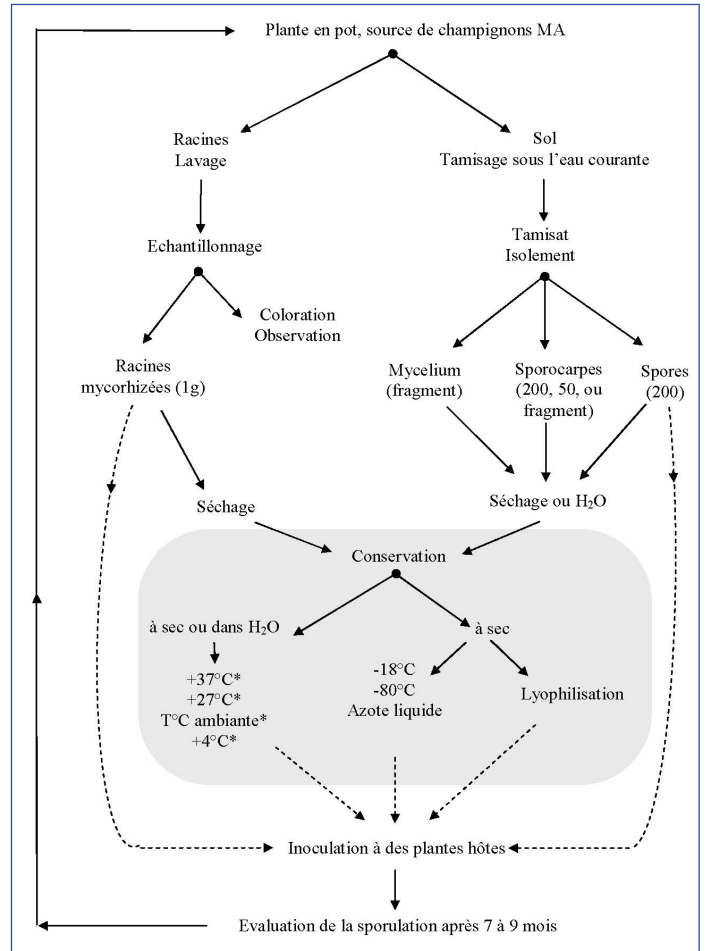
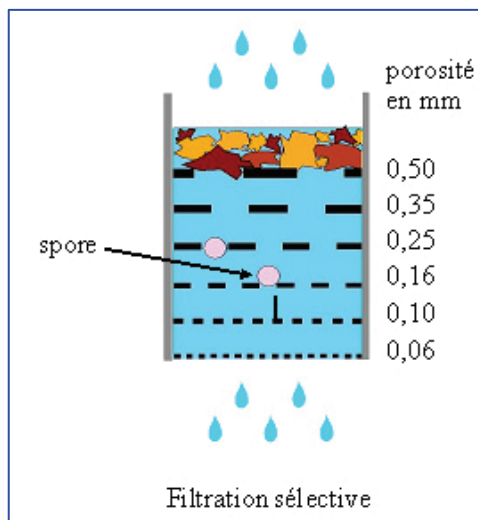


Figure 1 : schéma du protocole utilisé dans l'étude de la conservation *ex-situ* des champignons MA. (* : suivi morphologique des spores si conservation dans H₂O)

Figure 2 : schéma du système de lavage et de fractionnement sur tamis des spores en fonction de leur taille

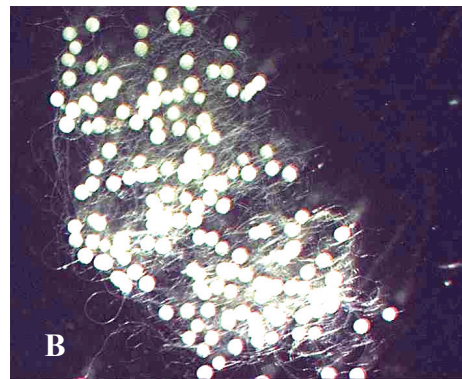
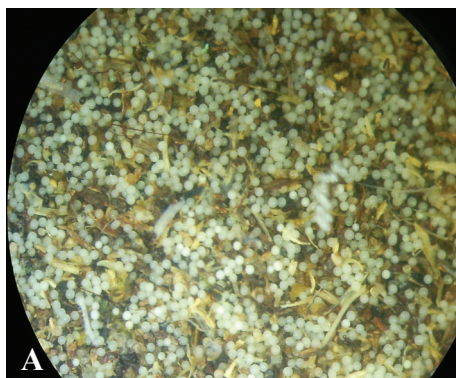


Photo 2 : *Gi. candida* : spores blanches dans un tamisat (A) et spores germées (B) dans de l'eau osmosée après conservation à température ambiante pendant 9 mois.

1.3 Conservation des champignons *ex-planta* et *ex-situ*

Dans le matériel collecté (**figure 1**), nous avons isolé mycelium, spores et sporocarpes. Chaque forme de propagule constitue l'inoculum mycorhizogène servant à inoculer (mycorhizer) des plantes hôtes. Pour leur conservation à sec, les propagules ont été mis sur papier filtre, séchés à la température ambiante dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml puis mis à conserver à +4°C, à la température ambiante (+18-24°C), à +27°C, à +37°C, à -18°C, à -80°C, dans de l'azote liquide ou lyophilisés 48 heures (dans des récipients en verre), puis gardés à la température ambiante. Pour la conservation dans de l'eau, chaque inoculum a été mis dans un ml d'eau osmosée dans un tube Eppendorf en plastique de 1,5 ml puis conservé à +4°C, à la température ambiante, à +27°C ou à +37°C. La taille d'un inoculum (à sec ou dans un ml d'eau osmosée) utilisé par traitement, par période et par plante inoculée a été soit de 200 spores, soit de 50 sporocarpes (*Gl. mosseae*), ou de 200 sporocarpes (*Gl. coronatum*), ou des fragments de sporocarpe (*Gl. versiforme*), ou fragment de mycelium (*Gl. intraradices*, *Gl. mosseae*).

1.4 Conservation des champignons *in-planta*

Les racines mycorhizées (**figure 1**), destinées à être utilisées comme inoculum mycorhizogène, ont été divisées en fragments, mises dans des sacs en plastique (8 cm × 12 cm) ouverts, séchées à l'air une semaine à la température ambiante puis mises à +4°C, à température ambiante, à +27°C, à +37°C, à -18°C, à -80°C ou lyophilisées (dans des récipients en verre) 48 heures, puis gardées à la température ambiante. La taille d'un inoculum par sac en plastique, par traitement, par période et par plante hôte était de 1g de racines fraîches mycorhizées.

1.5 Mise en évidence de la viabilité des propagules

Le pouvoir mycorhizogène de chaque inoculum stocké ou non a été vérifié par inoculation à des plantules (après réhydratation à la température ambiante avec de l'eau osmosée dans le cas d'un stockage à sec). Tous les inocula ont été introduits dans le même sol stérile et à la même espèce de plante que la source. Les sols (**tableau 1**) ont été gamma irradiés (dose minimale garantie 6,7kGy) et stérilisés pendant deux heures à 180°C avant remplissage des pots de plastics de 400 ml, puis arrosés abondamment. L'inoculum est placé sur le petit système racinaire d'une plantule (obtenue à partir d'une graine désinfectée en surface et mise à germer 9 jours) au moment de sa transplantation. Après 7 à 9 mois de culture, les sols ont été tamisés. La viabilité des champignons a été considérée comme positive suite à une mycorhization des racines de la plante hôte (observée après coloration au bleu de trypan comme décrit ci-dessus) et la formation de nouvelles spores et/ou de sporocarpes. Pour certains inocula à base de spores conservés dans de l'eau, un pourcentage de germination a été noté, sous loupe binoculaire.

2. Résultats

2.1 Pouvoir mycorhizogène des champignons après conservation

Plusieurs profils de survie ont été observés parmi les espèces et isolats de champignons étudiés (**tableaux 2a, 2b et 2c**). Nous n'avons pas observé de sporulation après inoculation de plante avec des spores conservées à sec pour les *Gigaspora*, les *Scutellospora*, *Gl. deserticola*, des sporocarpes (sauf à 4°C) et des spores de *Gl. versiforme* ou du mycelium de *Gl. intraradices*, quel que soit la température de conservation, ou après lyophilisation. Nous n'avons pas observé de sporulation après inoculation de plante avec des spores de *Gl.*

claroideum BEG 31 conservées à sec à températures positives (sauf 27°C). Nous avons observé de sporulation après inoculation de plantes avec des propagules séchés des autres champignons MA. Les plantes inoculées avec les différents propagules de chaque espèce conservées dans de l'eau à températures positives étaient mycorhizées (ayant pour effet la production de nouvelles spores), sauf celles inoculées avec les propagules des *Acaulospora*, *Gl. versiforme* et *Gl. coronatum* conservés à 37°C pendant un mois.

2.2 Pouvoir mycorhizogène de spores après conservation à températures positives

Les **tableaux 3 et 4** regroupent les résultats du pouvoir mycorhizogène de spores de *Ac. laevis* BEG 13, *Ac. longula*, *Gi. candida*, *Sc. castanea* et *Gl. geosporum*, fraîchement extraites ou après conservation à sec ou dans de l'eau osmosée pour différentes périodes et températures. Nous avons observé des résultats négatifs successifs et permanents :

- 1- avec des spores de *Ac. laevis* conservées dans de l'eau à 37°C au-delà de 22 jours. A la même température les spores conservées à sec ont gardé leur pouvoir mycorhizogène pendant plus de 12 mois (**tableau 2a**) ;
- 2- avec des spores de *Ac. longula* conservées dans de l'eau à 4°C plus de 5 mois. Au cours des 4 mois nous avons observé la germination des spores et à la même température les spores conservées à sec ont gardé leur pouvoir mycorhizogène pendant plus de 12 mois (**tableau 2a**) ;
- 3- avec des spores de *Gi. candida* et *Sc. castanea* conservées au sec alors que les spores de ces champignons conservées dans de l'eau ont gardé leur pouvoir mycorhizogène pendant plusieurs mois avec cependant des irrégularités. Avec *Gl. geosporum* nous avons observé des irrégularités dans le pouvoir mycorhizogène des spores après conservation au sec.

2.3 Pouvoir mycorhizogène des propagules provenant d'un même pot en réponse à un stockage à sec ou dans de l'eau osmosée.

Le **tableau 5** montre les résultats de survie de propagules de différents genres inoculés à des plantes hôtes, à intervalle d'un mois après conservation : à sec pour les spores de *Ac. scrobiculata*, de spores et de racines mycorhizées de *Gl. geosporum*, et dans de l'eau osmosée pour des spores de *Sc. castanea*. A certains intervalles, les champignons n'ont pas produit de nouvelles spores.

Le **tableau 6** compare les résultats de survie des propagules conservés à sec à ceux conservés dans de l'eau pour différentes espèces de *Glomus*. Excepté 3 mois à 37°C avec *Gl. claroideum* BEG 14, nous pouvons constater que la mycorhization de toutes les plantes inoculées avec des inocula conservés dans de l'eau ont donné naissance à des spores. Par contre, celles inoculées avec des inocula conservés à sec n'ont pas toutes été mycorhizées.

2.4 Effet de la température sur la germination des spores de *Gi. candida*

Les **figures 3 (A et B) et 4** montrent les effets de la température (température de croissance de la plante mycorhizée source et température de conservation des spores engendrées par cette mycorhization) sur *Gi. candida*. Les spores ont été conservées dans de l'eau osmosée et tous les mois examinées pour le taux de germination avant inoculation à une plantule (température de croissance jour/nuit 22°C/19°C). Le pouvoir mycorhizogène n'a pas été influencé: tous les lots de 200 spores ont mycorhizé les plantules inoculées avec formation de nouvelles spores.

Les **figures 3A et 3B** montrent les effets de la température de croissance des plantes mycorhizées sources (sources jour/nuit 27°C/25°C âgées de 7 et 9 mois et sources jour/nuit 22°C/19°C âgées de 9 et 11 mois) sur la germination des spores. Les spores de *Gi. candida* ont été conservées dans de l'eau osmosée à 27°C (**figure 3A**) et à 37°C (**figure 3B**). Un pourcentage de germination plus faible a été observé avec les spores en provenance des pots plantes mycorhizées sources jour/nuit 27°C/25°C, comparé à ceux provenant des sources jour/nuit 22°C/19°C. Les spores en provenance des pots de plantes mycorhizées sources jour/nuit 27°C/25°C étaient plus fortement inhibées par conservation à 27°C (**figure 3A**). Celles conservées à 37°C (**figure 3B**) ont présenté une période de latence d'un mois avant de germer. La **figure 4** montre les effets de la température sur la germination des spores de *Gi. candida* récoltées dans un pot ayant contenu une plante mycorhizée âgée de 7 mois, température de croissance jour/nuit 27°C/25°C. Des lots de spores ont été conservés dans de l'eau osmosée à 4°C, à T°C ambiante, à 27°C et à 37°C. A 4°C nous n'avons pas observé de germination. Après 2 et 3 mois à 27°C le pourcentage de germination est considérablement réduit comparé aux taux observés à la T°C ambiante et à 37°C.

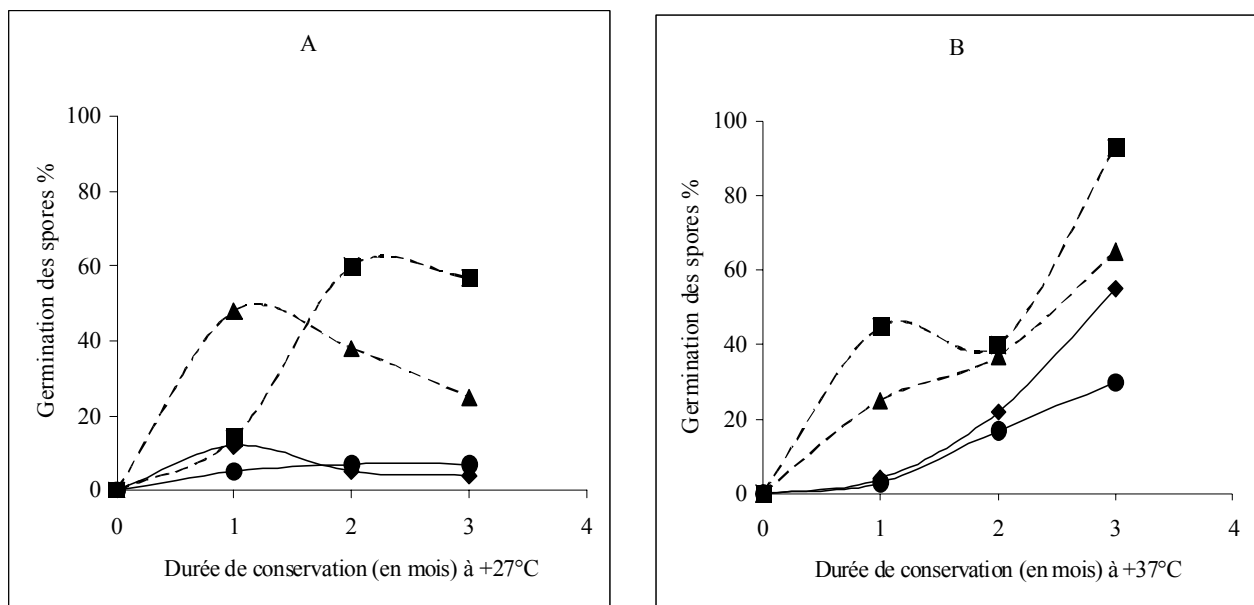


Figure 3 : germination de spores de *Gi. candida* en relation avec la température de croissance de la plante source : chambres climatisées à (jour/nuit) 22°C/19°C (---) et 27°C/25°C (—).

Chaque mois les spores sont examinées pour leur pourcentage de germination ; chaque marque représente 200 spores dans un ml d'eau osmosée.

Spores engendrées par des plantes mycorhizées âgées de :

- 11 mois (■) et 9 mois (▲) ayant poussées à 22°C/ 19°C (jour/ nuit)
- 7 mois (◆) et 9 mois (●) ayant poussées à 27°C/ 25°C (jour/ nuit)

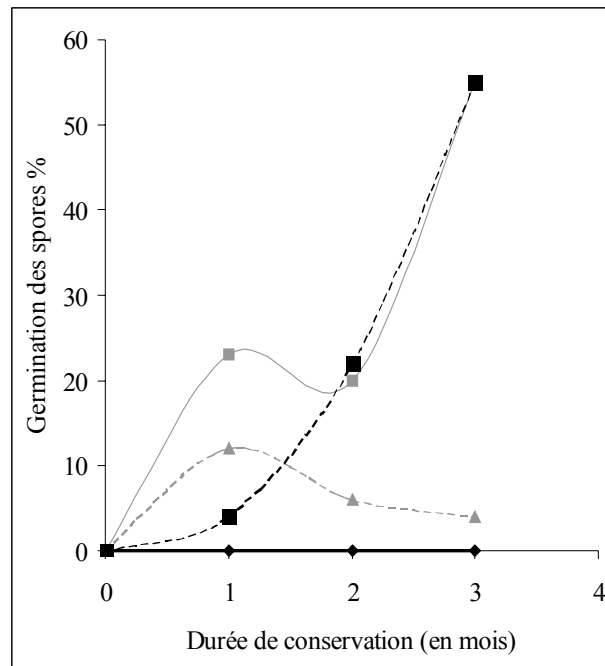


Figure 4 : effets de la température sur la germination des spores. Des spores fraîches de *Gi. candida* ont été conservées dans de l'eau osmosée à 4°C (◆), température ambiante (■), 27°C (▲), ou 37°C (■) puis tous les mois inoculées à des plantes hôtes (chambre climatisée jour/ nuit 22°C/19°C). Les spores ont été engendrées par une plante mycorhizées âgée de 7 mois, chambre climatisée jour/ nuit 27°C/25°C. Chaque marque représente 200 spores dans un ml d'eau osmosée.

3. Discussion

Des comportements de survie, hors sol, divers ont été observés parmi les 22 champignons MA étudiés. L'eau s'est révélé d'une importance critique pour la survie des champignons MA ; la plupart conservés dans de l'eau osmosée aux températures positives étaient mycorrhizogènes. Dans de l'eau les spores MA germent en l'absence d'une plante hôte, et certains sont capables de germinations multiples. Par contre, certains (les *Gigaspora*, les *Scutellospora*, *Gl. deserticola*, sporocarpes et les spores de *Gl. versiforme* ou mycelium de *Gl. intraradices*) étaient sensibles à la dessiccation et n'étaient pas mycorrhizogènes après lyophilisation ou conservation à sec, quelle que soit la température de stockage. Cependant, il est à noter que *Gi. candida*, *Gi. rosea*, *Gl. versiforme* et *Sc. nodosa* stockés *ex-situ* à sec à 4°C ou congelés dans un tamisat contenant des débris de sol conservent leur viabilité (Kuszala *et al.*, 2001). Les propagules des autres espèces testées conservées à sec, congelées ou non, étaient mycorrhizogènes donc tolérants à ces conditions. La congélation permet une viabilité et une stabilité à long terme, et cette tolérance pourrait donner un avantage à certaines espèces dans les sols sous climats secs.

Les résultats avec *Gl. intraradices* montrent que les spores formées dans la phase intraradicale de ce champignon sont tolérantes à la dessiccation à 4°C et à température ambiante, tandis

que celles de sa phase extraradicale ne le sont pas. Ainsi, *Gl. intraradices* peut survivre à la dessiccation grâce à sa phase intraradicale. La sensibilité différente entre les formes d'inoculum d'une même espèce peut avoir des implications écologiques importantes dans la survie et la distribution du champignon.

Selon les conditions de stockage nous avons obtenu des irrégularités dans le pouvoir mycorhizogène des champignons. Pour les vérifier nous avons examiné le comportement des propagules produits par le champignon colonisant une même plante. La comparaison des propagules conservées à sec ou dans de l'eau osmosée, et l'inoculation de plantes hôtes à intervalles mensuels, indique des périodes non-mycorhizogènes et qui coïncident pour l'inoculum conservé à sec. Ces observations suggèrent l'existence de périodes alternées mycorhizogènes et non-mycorhizogènes, que nous interprétons par la présence d'un cycle dormance/non-dormance en réponse aux signaux endogènes et environnementaux (l'historique des pots sources, les conditions de stockage et la durée). L'inaptitude des spores dormantes à mycorhizer les plantes peut être un facteur qui contribue aux irrégularités dans les résultats. Cette possibilité du cycle dormance / non-dormance par des tests de mycorhization doit être confirmée par plus d'investigations.

Dans le suivi de germination des spores de *Gi. candida* en fonction de la température (température de croissance des plantes en pot source de champignons et température de stockage des spores extraites), tous les échantillons étaient mycorhizogènes. La comparaison de l'effet de la température de croissance des plantes mycorhizées sources sur la germination ultérieure des spores produites, indique que les spores provenant de sources ayant séjourné à 27°C/25°C (jour/ nuit) germent moins à 27°C (température de conservation), ce qui pourrait résulter d'un phénomène de dormance. Après conservation prolongée dans de l'eau osmosée à température ambiante ou à 27°C, la capacité mycorhizogène des spores de *Gi. candida* est maintenue plus de 10 mois malgré une germination continue. Logi et al. (1998) ont montré que les spores de *Gl. caledonium* restait viable 6 mois après leur germination sur agar. Ils ont conclu qu'en l'absence d'un signal de la plante, les hyphes fongiques subissaient un arrêt programmé de croissance des spores et une redistribution des ressources, permettant le maintien à long terme de la viabilité et la capacité à coloniser une plante hôte.

Davantage de recherches seront nécessaires, mais ces expériences indiquent que la combinaison de la température de croissance des plantes mycorhizées sources, de la température de stockage et de sa durée, peut avoir un impact sur la germination des spores et la colonisation des racines de plante-hôtes.

Conclusion

Cette étude montre que les champignons MA diffèrent dans leur réponse aux conditions de conservation et que celles-ci peuvent affecter leur comportement au niveau du pouvoir mycorhizogène et de la germination des spores. Nous avons suggéré l'existence de cycles de dormance / non-dormance des spores résultant de l'interaction des conditions de croissance de la plante mycorhizée source avec les conditions de stockage. Cette sensibilité différentielle aux conditions de conservation semble indiquer l'existence de stratégies de survie variables selon les champignons qui pourraient jouer un rôle déterminant dans leur distribution géographique et édaphique. Ces résultats nous informent aussi sur la conservation des champignons MA *ex-situ* et nous permettent d'affiner leur gestion en collections car en l'absence de racines ils sont non cultivables.

Remerciements : Nous remercions A. Colombet de son aide dans l'entretien des plantes.

Bibliographie

- Augé R.M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42.
- IBG <http://www.kent.ac.uk/bio/beg> .
- Daft M.J., Spencer D., Thomas G.E. (1987) Infectivity of vesicular arbuscular mycorrhizal inocula after storage under various environmental conditions. *Transactions of the British Mycological Society* 88: 21-27.
- Dalpe Y. (1987) Spore viability of some Endogonaceae submitted to a single stage lyophilisation. In: *Proceedings of the Seventh North American Conference on Mycorrhiza* (Ed. by D. M. Sylvia, L. L. Hung ,and J.H. Graham), p. 279. 3-8 May 1987. Gainesville, FL, USA.
- Declerck S., Angelo-Van Coppenolle M.G. (2000) Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 148: 169-176
- Douds D.D.Jr., Schenck N.C. (1990) Cryopreservation of spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 667-674.
- Gianinazzi S., Gollotte A., Binet MN., van Tuinen D., Redecker D., Wipf D. (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519-530.
- Giovannetti M. (2000) Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. pp. 47-68. In: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Eds: Y Kapulnick and DD Douds Jr. Kluwer Academic Press.
- Hewitt E.J. (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Technical Communications* 22, 2nd ed. Revised. Commonwealth Agricultural Bureau, London.
- Juge C., Samson J., Bastien C., Vierheilig H., Coughlan A., Piche Y. (2002) Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* BEG 141: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza* 12: 37-42.
- Kuszala C., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (2001) Storage conditions for the long-term survival of AM fungal propagules in wet sieved soil fractions. *Symbiosis* 30, 287-299.
- Logi C., Sbrana C., Giovannetti M. (1998) Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3473-3479.
- Morton J.B., Bentivenga S.P., Wheeler, W.W. (1993) Germplasm in The International Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48:491-528.
- Smith S.E., Read D.J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd ed. Academic Press, London.

- Safir G.R., Coley S.C., Siqueira J.O., Carlson P.S. (1990) Improvement and synchronization of VA mycorrhiza fungal spore germination by short-term cold storage. *Soil Biology and Biochemistry* 22: 109-111.
- Schüssler A., Schwarzott D., Walker C. (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421.
- Tommerup I.C. (1983) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 81: 37-45.

ANNEXES

Espèce de champignon	ID ¹ code	Origine	Plante ²	Milieu de culture ³	µm	FC ⁷ µm
<i>Acaulospora lacunosa</i> Morton	BEG 78	USA	Trèfle	Sol acide	100 < FC < 160	
<i>Ac. laevis</i> Gerdemann & Trappe	BEG 13	UK	Trèfle	Sol acide	160 < FC < 250	
<i>Ac. laevis</i> Gerdemann & Trappe	BEG 26	China	Trèfle	Sol acide	160 < FC < 250	
<i>Ac. longula</i> Spain & Schenck	BEG 8	UK	Trèfle	Sol acide	60 < FC < 100	
<i>Ac. scrobiculata</i> Trappe	BEG 33	UK	Trèfle	Sol acide	100 < FC < 160	
<i>Gigaspora candida</i> Bhattacharjee, Mukerji ⁴	BEG 17	Taiwan	Poireau	Sol basique	160 < FC < 250	
<i>Gi. rosea</i> Nicolson & Schenck	BEG 9	USA	Poireau	Sol basique ⁶	160 < FC < 250	
<i>Glomus caledonium</i> (Nicol. & Gerd.) Trappe & Gerd	BEG 20	UK	Poireau	Sol basique	160 < FC < 250	
<i>Gl. claroideum</i> Schenck & Smith	BEG 14	Denmark	Poireau	Sol basique	100 < FC < 250	
<i>Gl. claroideum</i> Schenck & Smith	BEG 23	Czech Rep.	Poireau	Sol basique	100 < FC < 250	
<i>Gl. claroideum</i> Schenck & Smith ⁵	BEG 31	Finland	Trèfle	Sol acide	100 < FC < 250	
<i>Gl. clarum</i> Nicolson & Schenck	BEG 142	Brazil	Trèfle	Sol acide	100 < FC < 250	
<i>Gl. coronatum</i> Giovannetti	BEG 22	Australia	Poireau	Sol basique	160 < FC < 250	
<i>Gl. deserticola</i> Trappe, Blossand, Menge	BEG 73	USA	Poireau	Sol basique	60 < FC < 100	
<i>Gl. fasciculatum</i> (Thaxter) Gerd. & Trappe emend.	BEG 53	Canada	Poireau	Sol basique	60 < FC < 160	
<i>Gl. geosporum</i> (Nicol. & Gerd.) Walker	BEG 11	UK	Poireau	Sol basique	160 < FC < 250	
<i>Gl. intraradices</i> Schenck & Smith	BEG 141	France	Poireau	Sol basique		
<i>Gl. mosseae</i> (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe	BEG 12	UK	Poireau	Sol basique	100 < FC < 250	
<i>Gl. versiforme</i> (Karsten) Berch	BEG 47	USA	Poireau	Sol basique	100 < FC < 160	
<i>Scutellospora castanea</i> Walker	BEG 1	France	Poireau	Sol basique	250 < FC < 350	
<i>Sc. calospara</i> Walker	BEG 32	UK	Trèfle	Sol acide	100 < FC < 160	
<i>Sc. nodosa</i> Blaszkowski	BEG 4	UK	Trèfle	Sol acide	100 < FC < 250	

Tableau 1 : détails des isolats de champignons, des plantes hôtes et des milieux de culture.

¹ Les détails des isolats IBG peuvent être consultés sur <http://www.kent.ac.uk/bio/beg/>

² Poireau: *Allium porrum* L. cv. Electra, trèfle: *Trifolium repens* L. cv. Dipex.

³ Sol basique: terre argileuse, pH (H₂O) 8, 24 ppm Olsen P; sol acide: terre, pH (H₂O) 4.9, 11.6 ppm Olsen P; ⁴ Tewarii & Skoropad ; ⁵ Walker et Vestberg ; ⁶ ou Terragreen: OIL DRI[®] Typ III R US - Special, CONEX GmbH.

FC⁷ : fraction collectée contenant le plus grand nombre de spores

Champignons	Inocula	Lyoph.		N liq.		-80 °C		-18 °C		+4°C		T°C ambiante		+27°C		+37°C	
		sec	sec	sec	sec	sec	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec
<i>Ac. lacunosa</i>	spores	+8*	+16	+13*	+7	+10	+1*	+9*	+5	-7*	-1*	+1*	-1*	+1*			
<i>Ac. laevis</i> ¹	spores	+20	+39	+26	+39	+12	+39	+12	+10	+11	-1	+13	-1	+13			
"	racines			+7*			+6*										
<i>Ac. laevis</i> ²	spores	+26	+15	+15	+9*	+17	+26	+12*	+9	+10	-1*	+7	-1*	+7			
<i>Ac. longula</i>	spores	+15	+15	+12*	+29	+4	+14	+14	+9	+9	-1	+7	-1	+7			
"	racines						+6*	+14									
<i>Ac. scrobiculata</i>	spores	+21	+21	+12	+6*	+18	+10	+15	+9	+9	-1	+7	-1	+7			
<i>Gi. candida</i>	spores	-2*	-2*			+4	-1	+13	+11	-1*	+4		+4				
<i>Gi. rosea</i>	spores	-8*	-8*	-7	-8*	+7	-1*	+13	+2	-1*	+3	-1*	+3	-1*			
<i>Sc. calospora</i>	spores					+8	-1*	+12	+8	-1*	+1*		+1*				
<i>Sc. castanea</i>	spores		-5*	-5*	-5*	+10	-1*	+11	+10	-1*	+4	-1*	+4	-1*			
<i>Sc. nodosa</i>	spores	-2*	-2*	-2*	-3*	+12	-1*	+10	+10	-1*	+2	+2	+2	+2			

Tableau 2-a : durée maximale (en mois) testée et survie détectée (+) ou non (-) selon les conditions.

(taille de l'inoculum conservé à sec ou dans un ml d'eau osmosée et inoculé à une plante: 200 spores; 1g de racines mycorrhizées)

*Une seule répétition

*Ac. laevis*¹ BEG 13; *Ac. laevis*² BEG 26

Champignons	Inocula	Lyoph.	-80 °C		-18 °C		+4°C		T°C ambiante		+27°C		+37°C	
			sec	sec	sec	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec
<i>Gl. caledonium</i>	spores	+14	-9	+31*	+14	+24	+24	+24	+18*	+14*	+14	+14	+2	+5
"	racines			+8*	+1*					+8*				
<i>Gl. claroideum</i> ¹	spores	-8	-10	+29	+16	+15	+11	+12	+12	+3	+12	+12	+2	+4
"	racines	-3		+27	+14		+4			+1*	+2*		+2	
<i>Gl. claroideum</i> ²	spores	-12*				+14	+7	+14*	+14*	+1*	+8	-1	+1	+1*
"	racines	+2*		+10	+12*		+7*			+10				
<i>Gl. claroideum</i> ³	spores	+17*	+17*	+17	+17	+18	-1	+16	+16	-1*	+16	+2	+1	-1
"	racines	+25*		+16	+6		+6			+4*				
<i>Gl. clarum</i>	spores	+9*			+3*	+6*					+9		+3	-3*
<i>Gl. coronatum</i>	spores	+19*	-13*		+13*				+17*				-1*	+2
"	sporocarpes	+19	-12	+22	+14	+17	+10*	+13	+13	-12*	+5*	+5*	-1*	+2
<i>Gl. deserticola</i>	spores					+3	-1	+7*	+7*	-1*	+10		+2	
<i>Gl. fasciculatum</i>	spores					+16	+1*				+2*		+1*	
"	racines	+26		+13*	+8*		-1							
<i>Gl. geosporum</i>	spores	+35	+14*	+31	+30	+30	+30	+30	+30	+30	+17	+18	+2	+14
"	racines	+7*		+12	+12*		+20			+15	+5			+4
<i>Gl. intraradices</i>	mycelium		-12*	-12*	-12*	+16	-1	+16	+16	-1	+7*		+2	
"	racines	+6*		+8	+18*		+10			+3				

Tableau 2-b : durée maximale (en mois) testée et survie détectée (+) ou non (-) selon les conditions.

(taille de l'inoculum conservé à sec ou dans un ml d'eau osmosée et inoculé à une plante: 200 spores; 200 sporocarpes de *Gl. coronatum*; 1g de racines mycorhizées; fragment de mycelium)

*Une seule répétition

*Gl. claroideum*¹ BEG 14; *Gl. claroideum*² BEG 23; *Gl. claroideum*³ BEG 31.

Champignons	Inocula	Lyoph.	N liq.		-80 °C		-18 °C		+4°C		T°C ambiante		+27°C		+37°C		
			sec	sec	sec	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O
<i>Gl. mosseae</i>	spores	-9	+14	+14	+10	+17	+8	+17	+17	+12	+12	+12	+12	+2	+2	+2	+2
"	sporocarpes	+18	+28	+18	+28	+17	+12	+17	+15	+12	+12	+12	+12	+2	+2	+4	+4
"	racines	+13	+8*	+8*	+12												
"	mycelium	+28	+28	+21	+28	+15	+10	+11	+12	+10	+10	+8	+2	+3	+3	+3	+3
<i>Gl. versiforme</i>	spores	-7	-9*	-7	-9*	+16	-2	+16*	-1*	+16	+16	-1*	-1	-1	-1	-1	-1
"	sporocarpes	-25*	-13*	-13*	-13*	+26	+13	+16	-4*	+12	-3	-1	-2*				

Tableau 2-c : durée maximale (en mois) testée et survie détectée (+) ou non (-) selon les conditions.

(taille de l'inoculum conservé à sec ou dans un ml d'eau osmosée et inoculé à une plante: 200 spores; 50 sporocarpes de *Gl. mosseae* ; fragment de sporocarpes de *Gl. versiforme* ; 1g de racines mycorrhizées; fragment de mycelium sans sporocarpe)

*Une seule répétition

Champignons Températures de conservation	<i>Gi. candida</i>				<i>Ac. longula</i> +4°C		<i>Ac. laevis</i> +37°C	
	+4°C	T°C ambiante	+27°C	+37°C				
Conditions de conservation	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec
	Durées de conservation							
Fraîches		16/17			3/3		6/6	
1 jour			1/1				1/1	
2 jours			0/1				1/2	
17 jours		0/1					0/2	
22 jours							0/1	
1 mois	5/6	0/1	3/3	6/6	0/1	9/9	2/2	2/2
2 mois	4/5		3/3	7/7		7/8	2/2	2/3
3 mois	4/4		5/5	8/8	0/1	8/8	3/3	1/1
4 mois	1/4		3/3	7/7		3/3	1/1	2/2
5 mois	0/5		2/2	6/7			0/1	2/4
6 mois	0/3	0/1	3/3	4/4	0/1		0/1	1/1
7 mois			1/1	3/4			0/3	1/1
8 mois			1/1	1/1			0/2	1/1
9 mois			2/2	2/2			0/1	1/1

Tableau 3 : résultats (exprimés en nombre de plantes mycorhizées ayant donné naissance à des spores /nombre de plantes inoculées) du pouvoir mycorhizogène des spores de *Gi. candida*, *Ac. longula* et *Ac. laevis* BEG 13 avant et après conservation à sec ou dans de l'eau osmosée selon la température et la durée. (taille de l'inoculum: 200 spores à sec ou dans un ml d'eau osmosée par plante)

Champignons de conservation	<i>Sc. castanea</i>				<i>Gl. geosporum</i>			
	+4°C	T°C ambiante	+27°C	+37°C	+4°C	T°C ambiante	+27°C	+37°C
Conditions de conservation	H ₂ O sec	H ₂ O sec	H ₂ O sec	H ₂ O sec	H ₂ O sec	H ₂ O sec	H ₂ O sec	H ₂ O sec
Durées de conservation								
Fraîches 4 heures		6/12			8/8			
1 mois	3/4 0/1	3/3 0/1	2/4 0/1	4/5 0/1	1/1	3/3	2/2	2/4 3/4
2 mois	2/4	2/3 0/1	2/3	1/5	1/1	3/3	2/2	1/4 4/6
3 mois	1/2	1/2	1/2	2/3	1/1	1/1	1/1	0/1 1/1
4 mois	3/5	2/3	4/5	1/2		1/1	0/1	0/1 1/2
5 mois	2/2	0/1 0/1	1/2			1/1	1/1	0/2
6 mois	2/2	1/1	1/1			1/1	0/1	0/1
7 mois	3/3	2/2	2/2			1/1	1/1	
8 mois	1/5	1/2	3/4			1/1	0/1	
9 mois	0/3	0/1	1/2		1/1	1/1	0/1	
10 mois	1/1	2/2	1/1		1/1	1/1	0/1	
12 mois					1/1	1/1	1/1	
14 mois					1/1	1/1	1/1	
17 mois					1/1	1/1	1/1	1/1
18 mois						1/1	1/1	
30 mois					1/1	1/1	1/1	

Tableau 4 : résultats (exprimés en nombre de plantes mycorhizées ayant donné naissance à des spores /nombre de plantes inoculées) du pouvoir mycorhizogène des spores de *Sc. castanea* et *Gl. geosporum* avant et après conservation à sec ou dans de l'eau osmosée selon la température et la durée (taille de l'inoculum : 200 spores à sec ou dans un ml d'eau osmosée par plante).

Champignons Plantes sources (âges) Propagules Conditions de conservation	<i>Sc. castanea</i>		<i>Ac. scrobiculata</i>		<i>Gl. geosporum</i>	
	D (10 mois) spores H ₂ O	T°C +27°C +37°C ambiante	A (8 mois)	B (9 mois) spores sec	C (9 mois)	E (9 mois) spores racines sec
Températures de conservation	+4°C	T°C	+4°C	+4°C	+37°C	+37°C
Durées de conservation (mois)						
Fraîches						
1	+	+	+	nd	+	+
2	+	+	+	nd	-	nd
3	-	-	+	nd	+	+
4	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	nd	+	-
6	+	+	nd	nd	-	nd
7	+	+	-	nd	+	+
8			-	nd	nd	
9			-	nd	nd	
10			+	+	nd	

Tableau 5 : production (+) ou non (-) de nouvelles spores.

Les plantes hôtes ont été inoculées chaque mois avec des propagules de *Gl. geosporum*, *Ac. scrobiculata* ou *Sc. castanea* avant et après conservation. (taille de l'inoculum par température, par durée de conservation et par plante hôte inoculée : 200 spores conservées à sec ou dans un ml d'eau osmosée, ou 1 g de racines mycorhizées)

nd: non déterminé

Espèces fongiques Plantes sources	<i>Gl. mosseae</i> F		<i>Gl. claroideum</i> G				<i>Gl. geosporum</i> H	
	mycelium +27°C		+4°C	T°C ambiante	+27°C	+37°C	spores +27°C	
Températures de conservation	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec	H ₂ O	sec
Conditions de conservation								
Durées de conservation (mois)								
Fraîches								
1			+		+		+	+
2		+	+	-	+		+	+
3		+	+	+	+		+	+
4			+		+		+	+
5							+	+
6	+						+	-
7							+	+
8		+					+	-

Tableau 6 : production (+) ou non (-) de nouvelles spores. Les plantes ont été inoculées tous les mois avec *Gl. claroideum* BEG 14, *Gl. geosporum* ou *Gl. mosseae* avant et après conservation.

(taille de l'inoculum conservé à sec ou dans un ml d'eau osmosée: 200 spores ou fragment de mycelium, par traitement, par durée et par plante hôte inoculée)

F, G et H : plantes sources âgées de 8 mois.

