



HAL
open science

Caractérisation taxonomique des champignons mycorhiziens à arbuscules natifs des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie ; analyse de leur synergie permettant l'adaptation des plantes à ces milieux extrêmes

Thomas Crossay

► **To cite this version:**

Thomas Crossay. Caractérisation taxonomique des champignons mycorhiziens à arbuscules natifs des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie ; analyse de leur synergie permettant l'adaptation des plantes à ces milieux extrêmes. Sciences agricoles. Université de Nouvelle Calédonie, 2018. Français. NNT : 2018NCAL0003 . tel-02934111v2

HAL Id: tel-02934111

<https://unc.hal.science/tel-02934111v2>

Submitted on 24 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de la Nouvelle-Calédonie
Ecole doctorale du Pacifique ED469
Institut des Sciences Exactes et Appliquées
Doctorat Science en microbiologie des sols

Thèse présentée par

Thomas CROSSAY

Pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de l'Université de la Nouvelle-Calédonie
Spécialité : Microbiologie des sols

**Caractérisation taxonomique des champignons
mycorhiziens à arbuscules natifs des sols
ultramafiques de Nouvelle-Calédonie ; analyse de
leur synergie permettant l'adaptation des plantes
à ces milieux extrêmes.**

Sous la direction du **Pr. AMIR Hamid**

Thèse soutenue publiquement le 26 février 2018 devant le jury composé de :

| | | |
|----------------------|--|--------------------|
| F. Stefani | Dr. Chercheur, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa | Rapporteur |
| M. St Arnaud | Professeur, Université de Montréal | Rapporteur |
| Y. Cavaloc | Maitre de conférences, Université de la Nouvelle-Calédonie | Examineur |
| V. Burtet-Sarramegna | Maitre de conférences, Université de la Nouvelle-Calédonie | Examinatrice |
| M. Ducouso | Dr. Chercheur, Cirad, Montpellier | Examineur |
| D. Redecker | Professeur, Université de Bourgogne | Examineur |
| H. Amir | Professeur, Université de la Nouvelle-Calédonie | Directeur de thèse |

Remerciements

En préambule de ce manuscrit, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail. Je tiens à remercier le professeur Hamid Amir, avec toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ma part cela a été un réel plaisir de pouvoir travailler ensemble. Je tiens à remercier sincèrement le professeur Dirk Redecker, qui s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de cette thèse, je le remercie pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer. Pour finir, je remercie tous les membres de l'équipe du laboratoire pour leur aide, leur bonne humeur et mon intégration rapide au sein du laboratoire.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Remerciements..... | 2 |
| Table des matières..... | 3 |
| Index des figures..... | 8 |
| Index des tableaux..... | 13 |
| Abréviations..... | 14 |
| Lexique..... | 15 |
| Introduction générale..... | 16 |
| I. Contexte général..... | 17 |
| II. Problématique et objectifs de la thèse..... | 19 |
| Chapitre 1 Synthèse bibliographique..... | 22 |
| I. Situation des champignons mycorhiziens dans le monde vivant..... | 23 |
| A. Généralités sur les champignons..... | 24 |
| 1. Position phylogénétique des champignons au sein du monde du Vivant.... | 24 |
| 2. Taxonomie et phylogénie des champignons..... | 25 |
| 3. Mode de vie des champignons, focus sur les champignons symbiotiques. | 27 |
| B. Les différentes symbioses mycorhiziennes..... | 28 |
| II. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)..... | 32 |
| A. Cycle de vie et structure des CMA..... | 32 |
| 1. Cycle de vie des CMA..... | 32 |
| 2. Structure des CMA..... | 33 |
| B. Taxonomie et phylogénie des CMA..... | 35 |
| 1. Evolution de la taxonomie et de la phylogénie des CMA..... | 35 |
| 2. Systématique et phylogénie actuelle..... | 37 |
| C. Génétique des CMA..... | 38 |
| III. Quelques techniques utilisées pour l'étude des CMA..... | 40 |
| A. Techniques d'isolement et de culture des CMA..... | 41 |
| 1. Techniques d'isolement des CMA..... | 41 |
| 2. Techniques de cultures des CMA..... | 42 |
| B. Techniques utilisées pour l'identification taxonomique et l'étude de la diversité des CMA..... | 44 |

| | |
|---|-----|
| 1. Identification morphologique des CMA..... | 45 |
| 2. Les méthodes basées sur la morphologie pour l'étude de la diversité des CMA..... | 46 |
| 3. Les méthodes moléculaires..... | 48 |
| IV. Fonctions des champignons mycorhiziens à arbuscules et leur utilisation comme biostimulant des plantes..... | 53 |
| A. Fonctions des CMA..... | 53 |
| 1. Nutrition minérale des plantes..... | 54 |
| 2. Tolérance des plantes aux stress biotiques..... | 57 |
| 3. Tolérance des plantes au stress abiotiques ; focus sur les métaux lourds..... | 59 |
| 4. Complémentarité fonctionnelle des CMA..... | 63 |
| B. Utilisation des CMA..... | 67 |
| 1. Utilisation des CMA en agronomie..... | 67 |
| 2. Utilisation des CMA en restauration écologique..... | 71 |
| V. Le contexte néo-calédonien..... | 73 |
| A. Contexte géographique et climatique..... | 73 |
| B. Contexte géologique..... | 74 |
| C. Les milieux ultramafiques et les CMA..... | 75 |
| D. La restauration écologique des sites miniers dégradés de Nouvelle-Calédonie..... | 79 |
| Bibliographie..... | 82 |
| Chapitre 2..... | 113 |
| Isolement et identification de différentes espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie..... | 113 |
| Introduction au Chapitre 2..... | 114 |
| A new family, Pervetustaceae with a new genus, <i>Pervetustus</i> , and <i>P. simplex</i> sp. nov (Paraglomerales), and a new genus, <i>Innospora</i> with <i>I. majewskii</i> comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina..... | 116 |
| Abstract..... | 116 |
| Introduction..... | 117 |
| Materials and Methods..... | 118 |
| Taxonomy..... | 120 |
| Erection of a new genus in the Paraglomeraceae..... | 120 |
| Erection of a new family and a new genus in the Paraglomerales..... | 122 |
| Acknowledgements..... | 127 |
| References..... | 127 |

| | |
|---|------------|
| Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia..... | 130 |
| Abstract..... | 132 |
| Introduction..... | 132 |
| Materials and Methods..... | 133 |
| Results..... | 136 |
| General discussion..... | 145 |
| Acknowledgements..... | 145 |
| References..... | 145 |
| Supplementary data..... | 148 |
| Taxonomic description of <i>Claroideoglosum etunicatum</i> <i>nc</i>..... | 155 |
| Chapitre 3 | 158 |
| Développement d'une méthode d'identification des champignons mycorrhiziens à arbuscules à partir des spores, par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS)..... | 158 |
| Introduction au Chapitre 3 | 159 |
| New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS..... | 161 |
| Abstract..... | 161 |
| Introduction | 162 |
| Results..... | 166 |
| Discussion | 170 |
| Materials and Methods..... | 170 |
| References..... | 174 |
| Acknowledgement..... | 176 |
| Author contributions..... | 176 |
| Supplementary information..... | 176 |
| Chapitre 4 | 177 |
| Complémentarité des fonctions de différentes espèces de champignons mycorrhiziens à arbuscules des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie, dans la croissance et l'adaptation des plantes | |
| Introduction au Chapitre 4 | 177 |
| The combination of several native arbuscular mycorrhizal isolates belonging to different taxa, in the same <i>inoculum</i>, improve the efficiency of mycorrhizal symbiosis of two plant species growing on a New Caledonian ultramafic soil | 179 |
| Abstract..... | 179 |
| Introduction | 179 |
| Material and methods | 182 |

| | |
|--|------------|
| Results..... | 188 |
| Discussion | 199 |
| References..... | 203 |
| Supplementary data | 208 |
| Conclusion générale de la thèse..... | 220 |
| Bibliographie..... | 224 |
| Annexe 1 | 225 |
| Caractéristiques morphologiques et taxonomie des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)..... | 225 |
| Introduction..... | 226 |
| Matériel et Méthodes | 227 |
| Analyse bibliographique..... | 227 |
| Isolats de Champignons mycorhiziens à arbuscules utilisés pour les photographies | 228 |
| Analyse phylogénétique..... | 229 |
| Résultats et Discussion | 229 |
| Analyses phylogénétiques des Glomeromycota | 229 |
| Diversisporales | 232 |
| Diversisporaceae..... | 232 |
| <i>Diversispora</i> | 234 |
| <i>Tricispora</i> | 236 |
| <i>Otospora</i> | 236 |
| <i>Redeckera</i> | 239 |
| Acaulosporaceae | 241 |
| <i>Acaulospora</i> | 252 |
| Sacculosporaceae..... | 245 |
| <i>Sacculospora</i> | 245 |
| Pacisporaceae | 246 |
| <i>Pacispora</i> | 247 |
| Gigasporaceae | 248 |
| <i>Scutellospora</i> | 250 |
| <i>Gigaspora</i> | 251 |
| <i>Dentiscutata</i> | 252 |
| <i>Intraornatospora</i> | 254 |
| <i>Cetraspora</i> | 255 |
| <i>Racocetra</i> | 256 |

| | |
|-------------------------------------|-----|
| Glomerales | 258 |
| Glomeraceae | 258 |
| <i>Glomus (sensu stricto)</i> | 260 |
| <i>Glomus (sensu lato)</i> | 261 |
| <i>Funneliformis</i> | 263 |
| <i>Septoglomus</i> | 265 |
| <i>Rhizophagus</i> | 267 |
| <i>Sclerocystis</i> | 270 |
| <i>Dominikia</i> | 272 |
| <i>Kamienskia</i> | 273 |
| Claroideoglomeraceae | 275 |
| <i>Claroideoglomus</i> | 276 |
| <i>Entrophospora</i> | 277 |
| Archaeosporales | 279 |
| Archaeosporaceae | 280 |
| <i>Archaeospora</i> | 281 |
| <i>Palaeospora</i> | 282 |
| Ambisporaceae | 283 |
| <i>Ambispora</i> | 283 |
| Geosiphonaceae | 285 |
| <i>Geosiphon</i> | 285 |
| Paraglomerales | 286 |
| Paraglomeraceae | 286 |
| <i>Paraglomus</i> | 286 |
| <i>Innospora</i> | 288 |
| Pervetustaceae | 289 |
| <i>Pervetustus</i> | 289 |
| Conclusion | 290 |
| Bibliographie | 293 |

Index des figures

Chapitre 1 Synthèse bibliographique

Figure. 1 : Phylogénie des Eucaryotes, des Opisthocontes et des Fungi modifiée à partir de (Blackwell et al. 2012 ; Hibbett et al. 2013 ; Burki et al. 2014 ; Boudouresque et al. 2015 ; Spatophora et al. 2016 ; 2017).....25

Figure 2. Cycle de vie et structure d'un CMA (*Claroideoglossum etunicatum* nc) isolé d'un sol ultramafique en Nouvelle-Calédonie et cultivé *in vitro* sur un milieu MSR avec des racines de chicorée Ri-T-DNA.....33

Chapitre 2

A new family, Pervetustaceae with a new genus, *Pervetustus*, and *P. simplex* sp. nov. (Paraglomerales), and a new genus, *Innospora* with *I. majewskii* comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina

Fig. 1. A 50% majority rule consensus phylogram inferred from a Bayesian analysis of SSU-ITS-LSU nrDNA sequences of *Innospora majewskii* comb. nov. and *Pervetustus simplex* gen. and sp. nov., five known *Paraglossum* spp. and six species of the families Ambisporaceae, Archaeosporaceae and Geosiphonaceae of the Glomeromycotina with seven species of the families Endogonaceae and Mortierellaceae as outgroup.....121

Figs 2–7. *Pervetustus simplex*. 2. Intact spores. 3, 4. Spore wall layers (swl) 1 and 2 and subtending hyphal wall layer (shwl) 2; shwl1 is completely sloughed. 5. Spore wall layers (swl) 1 and 2. 6. Spore wall layers (swl) 1 and 2 and subtending hyphal wall layers (shwl) 1 and 2. 7. Spore wall layers (swl) 1 and 2 and subtending hyphal wall layer (shwl) 2; shwl1 is completely sloughed; note the septum (s) in the lumen of the subtending hypha.....124

Figs 8–11. Mycorrhizal structures of *Pervetustus simplex* in roots of *Plantago lanceolata* stained in 0.1% Trypan blue. 8. Arbuscules (a) and arbuscular trunk (t) developed from parent hypha (ph). 9. Arbuscules (a), Y-shaped branch (Yb), straight hypha (sh), and coil (c). 10. Extraradical hyphae (eh) on the root surface. 11. Extraradical hyphae (eh) and spore (sp).....126

Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia

Figs. 1 A–J *Acaulospora saccata* spores. **A.** Intact spores. **B.** Intact spore (S) with sporogenous hyphae (SH) in root organ culture. **C.** Runner hyphae (RH) with hyphal swelling (HS) in root organ culture. **D.** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2) and inner wall 1 and 2 (Iw1, Iw2). **E.** Inner wall 1 layer 1 (Iw1L1), inner wall 2 layer 1 and 2 (Iw2L1, Iw2L2). **F.** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2) and inner wall 1 layer 1 (Iw1L1), inner wall 2 (IW2). **G.** Spore (S) and runner hyphae (RH) on root organ culture. **H.** Germinal tube (GT) of spore (S). **I. J.** Mycorrhizal structures of *A. saccata* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1 % trypan blue: arbuscules (Ar) and vesicles (Ve).....137

Figs. 2 A–I *Acaulospora fragilissima* spores. **A.** Intact spores. **B.** Intact spore (S) with sporogenous hyphae on root organ culture. **C.** Runner hyphae (RH) on root organ culture. **D.** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2) and inner wall 1 (Iw1). **E.** Inner wall 1 and 2 (Iw1, Iw2). **F. G.** Inner wall 1 layer 1 and 2 (Iw1L1, Iw1L2); Inner wall 2 layer 1 and 2 (Iw2L1, Iw2L2). **H.** Mycorrhizal structures of *A. fragilissima* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1 % trypan blue: arbuscules (Ar). **I.** Germinal tube (GT) of spore (S).....138

Fig. 3 ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequences of *Acaulospora saccata* and *Acaulospora fragilissima* and 31 known species of AMF, including *Claroideoglossum claroideum* as outgroup.....140

- Figs. 4 A-I** *Scutellospora ovalis* spores. **A.** Intact spores. **B.** Germinal tube (GT) of spore and ramification of hyphae on root organ culture. **C.** Spore wall (Sw), sporogenous cell (sc), germinal tube (GT) and inner wall (Iw). **D.** Germination shield (GS) with two germination holes (GH). **E.** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2) and inner wall 1 (Iw1). **F.** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2) and inner wall 1 layer 1 and 2 (IW1L1, IW1L2). **G.** Germinal tube (GT) through spore germination shield (GS). **H.** Sporogenous cell closed by a plug. **I.** Mycorrhizal structures of *Scutellospora ovalis* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1 % trypan blue: arbuscules(Ar).....141
- Fig 5.** Maximum likelihood analysis of LSU rDNA sequences of *Scutellospora ovalis* including twelve known species of AMF, including *Pacispora scintillans* as outgroup.....142
- Figs. 6 A-I** *Rhizophagus neocaledonicus* spores. **A.** Intact spores. **B.** Intact spore (S) on root organ culture and runner hyphae (RH) on root organ culture. **C.** Spore (s), germinal tube (GT) and runner hyphae (RH) on root organ culture. **D.** Spore (s) with subtending hyphae (SH). **E.** Spore wall (Sw). **F. G.** Spore wall layers 1, 2 and 3 (SwL1, SwL2 and SwL3). **H. I.** Mycorrhizal structures of *R. neocaledonicus* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1 % trypan blue: arbuscules (Ar), spore (S) and intraradical hyphae (IRH).....143
- Fig. 7** ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequence of *Rhizophagus neocaledonicus* and 24 known species of AMF, including *Claroideoglomus claroideum* as outgroup.....144

Supplementary data

- Fig. S1** ML analysis of LSU rDNA sequence of *Acaulospora saccata* and *Acaulospora fragilissima* and 31 known species of AMF, including *Claroideoglomus claroideum* as outgroup.....148
- Fig. S2** ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequences of *Acaulospora saccata* and *Acaulospora fragilissima* and 31 known species of AMF, including two nearest environmental sequences and *Claroideoglomus claroideum* as outgroup.....149
- Fig. S3** Partial phylogenetic trees of LSU rDNA obtained by Bayesian analysis over 10⁷ generations using the General Time Reversible Model in MrBayes 3.2.....150
- Figs. S4 A. C. E.** *Scutellospora ovalis* spores. **B. D. F.** *Scutellospora calospora* BEG32 spores. **A. B.** Intact spores. **C. D. E. F.** Spore wall (Sw), inner wall 1 (Iw1) and inner wall 2 (Iw2).....151
- Fig. S5** ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequence of *Rhizophagus neocaledonicus* and 24 known species of AMF, including three nearest environmental sequences and *Claroideoglomus claroideum* as outgroup.....152

Taxonomic description of *Claroideoglomus etunicatum nc*

- Figs. 1 A-G** *Claroideoglomus etunicatum nc* spores. **A.** Intact spores. **B.** Intact spore (S) on root organ culture and runner hyphae (RH) on root organ culture. **C.** Spore wall (Sw) and septum (Se) inside subtending hyphae. **D.** Spore wall layers 1, 2, 3 and 4 (SwL1, SwL2, SwL3 and SwL4). **E.** Juvenile spore (S) and runner hyphae (RH) on root organ culture. **D.** Spore (s) with subtending hyphae (SH). **F. G.** Mycorrhizal structures of *C. etunicatum nc* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1 % trypan blue: arbuscules (Ar), and vesicle (Ve).....156
- Fig. 2** ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequence of *Claroideoglomus etunicatum nc* and 7 known species of AMF, including *Glomus macrocarpum* as outgroup.....157

Chapitre 3

New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS

- Figure 1.** Phylogenetic tree of partial 18S-5.8S-partial 28 S rDNA sequences of 19 Glomeromycota isolates. Maximum likelihood (ML) analysis including *Endogone pisiformis* as outgroup.....163
- Figure 2.** Limit of MALDI-TOF mass spectra detection using (A) 10, (B) 5, (C) 4, (D) 2 and (E) 1 crushed spores to extract *Scutellospora ovalis*.....164
- Figure 3.** Comparison of mass spectra of two replicates each of mature and juvenile spores of *F. mosseae* BEG12. (A, B) Mature spores of *F. mosseae* BEG12; (C, D) juvenile spores of *F. mosseae* BEG12; (E, F) mix of juvenile and mature spores of *F. mosseae* BEG12.....165
- Figure 4.** Comparison of MALDI-TOF mass spectra of: (A) *Gigaspora rosea* BEG9; (B) *Gigaspora margarita* BEG34; (C) *Gigaspora candida* BEG17; (D) *Scutellospora ovalis* ; and (E) *Scutellospora calospora* BEG32.....166
- Figure 5.** Main Spectrum Patterns of: (A) *Gigaspora rosea* BEG9; (B) *Gigaspora margarita* BEG34; (C) *Gigaspora candida* BEG17; (D) *Scutellospora ovalis*; and (E) *Scutellospora calospora* BEG32. Peaks were labelled if they had a minimum of 20% relative intensity.....167
- Figure 6.** Three-dimensional principal component analysis (PCA) plot of 20 available spectra (replicates) of different species isolates of: (A) Gigasporaceae: *G. rosea* BEG9 in red; *G. margarita* BEG34 in yellow; *G. candida* BEG17 in green; *S. ovalis* in pink; and *S. calospora* BEG32 in blue. (B) Acaulosporaceae: *A. saccata* in yellow and *A. fragilissima* in red. (C) Glomeraceae: *R. neocaledonicus* in pink; *R. clarus* BEG248 and *R. clarus* BEG149 in blue; *R. clarus* BEG142 in yellow; *F. coronatum* BEG22 in red; *F. mosseae* in green. (D) Claroideoglomeraceae: *C. etunicatum* BEG247 in yellow; *C. etunicatum nc* in blue; *C. claroideum* BEG31 in red; *C. claroideum* BEG23 and *C. claroideum* BEG14 in green.....168
- Figure 7.** Cluster analysis of MALDI-TOF-MS of selected MSP references. Distance is displayed in relative units. Distance levels below 500 (represented by the red line) were considered reliably classified to the same species³¹.....168
- Figure 8.** Example using R (version 3.3.2³⁰) MSP importation data based on a mixed-species sample. The unknown sample (red) is matched to MSP reference spectra (blue). (A) *G. margarita* MSP in blue versus mixed-species sample (*G. rosea* BEG9/*G. margarita* BEG34). (B) *G. rosea* BEG9 MSP in blue versus mixed-species sample (*G. rosea* BEG9/*G. margarita* BEG34).....171
- Figure 9.** Replicate (n = 2) MALDI-TOF mass spectra of six spores of *Claroideoglomerus etunicatum nc* (A, B) grown on ultramafic soil and (C, D) commercial compost, all collected on humid soil of pure and fresh “living culture” with (E, F) two spectra used for MSP reference obtained after three-month storage of dry ultramafic soil.....172
- Figure 10.** Replicate (n = 2) MALDI-TOF mass spectra of six spores of *Claroideoglomerus etunicatum nc* (A, B) grown on ultramafic soil and (C, D) commercial compost, all collected on humid soil of pure and fresh “living culture” with (E, F) two spectra used for MSP reference obtained after three-month storage of dry ultramafic soil.....173

Chapitre 4

The combination of several native arbuscular mycorrhizal belonging to different taxa, in the same *inoculum*, improve the efficiency of mycorrhizal symbiosis of two plant species growing on a New Caledonian ultramafic soil

- Fig. 1.** *Metrosideros laurifolia* (a) and *Sorghum vulgare* (a') (uninoculated versus fungal mix 5 for *M. laurifolia* and mix 3 for *S. vulgare*) after 7 months of growth on ultramafic substrate for *M. laurifolia* and 4 months for *S. vulgare*. The biomass of their respective shoot and root (b: *M. laurifolia* and b': *S. vulgare*) were measured as dry weight tissue expressed in g. Each dead plant was represented with “+” and each flowering plant was represented with “*”.....179

| | |
|--|-----|
| Fig. 2. <i>Metrosideros laurifolia</i> (a) and <i>Sorghum vulgare</i> (b) mycorrhizal colonization for each fungal treatment after 8 months of growth on ultramafic substrate for <i>M. laurifolia</i> and 5 months for <i>S. vulgare</i> | 190 |
| Fig. 3. Major element content in plant shoots and roots of <i>M. laurifolia</i> and <i>S. vulgare</i> expressed as mg kg ⁻¹ , or g kg ⁻¹ of dry weight tissue. (a) Nitrogen (N); (b), Phosphorus (P); (c): Potassium (K); (d), Calcium (Ca) and (e), Magnesium (Mg)..... | 196 |
| Fig. 4. Metal contents in plant shoot and roots of <i>M. laurifolia</i> and <i>S. vulgare</i> expressed as mg kg ⁻¹ of dry weight tissue. (a) Iron (Fe); (b), Chromium (Cr); (c), Cobalt (Co); (d), Manganese (Mn) and (e), Nickel (Ni). Bars represent means and error bars represent standard error of means (n = 5)..... | 197 |
| Fig. 5. Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Classification on Principal Component (HCPC). PCA and HCPC were performed with 34 variables (Biomass (dry weight tissue of shoot (MSPA) and roots (MSPR), fresh weight tissue of shoot (MFPA) and roots (MFPR)), intensity of mycorrhization (M), arbuscule abundance in mycorrhizal parts of root fragments (Arb), arbuscule abundance in roots system (Arb Gen), total sporulation (Spore Tot), major element content in shoot (ie. N, F) and roots (ie. N, R) (N, P, K, Ca, Mg, Ca/Mg, C, Na) and metal content in shoot (ie. Co, F) and roots (ie. Co, R) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) using R software with the 'FactoMineR' package. HCPC used euclidian distances for calculating dissimilarities between observations and average method to define cluster..... | 198 |

Supplementary data

| | |
|---|-----|
| Fig. S1. Plant height (cm) along experiments (days). Data are means ± standard error of means (n = 10)..... | 199 |
| Fig. S2. Photographs of <i>Metrosideros laurifolia</i> and <i>Sorghum vulgare</i> (for each AMF treatments) after 7 months of growth on ultramafic substrate for <i>M. laurifolia</i> and 4 months for <i>S. vulgare</i> | 215 |

Annexe 1. Caractéristiques morphologiques et taxonomie des champignons mycorrhiziens à arbuscules (CMA)

| | |
|--|-----|
| Figure 1. Analyse phylogénétique des Glomeromycota. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-5.8S-LSU de l'ANDr de 158 espèces de Glomeromycota..... | 231 |
| Figure 2. Analyse phylogénétique des Diversisporaceae. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences (SSU-ITS1-5.8S-ITS2)-LSU de l'ANDr de 15 espèces du genre <i>Diversispora</i> , une espèce du genre <i>Tricispora</i> , une espèce du genre <i>Otospora</i> , quatre espèces du genre <i>Corymbiglomus</i> et une séquence du genre <i>Redeckera</i> . <i>Pacispora scintillans</i> est utilisé comme groupe externe..... | 233 |
| Figure 3. Photographies des spores de <i>Diversispora spurca</i> (reference accession HA567)..... | 235 |
| Figure 4. Photographie de <i>Corymbiglomus corymbiforme</i> | 239 |
| Figure 5. Photographies de sporocarpes et de spores de <i>Redeckera megalocarpum</i> | 240 |
| Figure 6. Analyse phylogénétique des Acaulosporaceae, Sacculosporaceae et Pacisporaceae. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ANDr de 33 espèces du genre <i>Acaulospora</i> , deux espèces du genre <i>Sacculospora</i> et une espèce du genre <i>Pacispora</i> | 242 |
| Figure 7. Photographies des spores d' <i>Acaulospora laevis</i> (reference accession AU211)..... | 243 |
| Figure 8. Photographies des spores de <i>Sacculospora baltica</i> | 246 |
| Figure 9. Photographies des spores de <i>Pacispora scintillans</i> | 247 |

| | |
|---|-----|
| Figure 10. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr de 6 espèces du genre <i>Gigaspora</i> , deux espèces du genre <i>Paradentiscutata</i> , une espèce du genre <i>Intraornata</i> , 4 espèces du genre <i>Dentiscutata</i> , trois espèces du genre <i>Cetraspora</i> , 8 espèces du genre <i>Racocetra</i> , une espèce du genre <i>Bulbospora</i> et 7 espèces du genre <i>Scutellospora</i> | 249 |
| Figure 11. Photographies des spores de <i>Scutellospora calospora</i> BEG32..... | 250 |
| Figure 12. Photographies des spores de <i>Gigaspora rosea</i> BEG9..... | 252 |
| Figure 13. Photographies des spores de <i>Dentiscutata erythropha</i> (reference accession MA453B).... | 253 |
| Figure 14. Photographies des spores de <i>Cetraspora pellucida</i> (reference accession FL966)..... | 256 |
| Figure 15. Photographies des spores de <i>Racocetra coralloidea</i> (reference accession CA260)..... | 257 |
| Figure 16. Analyse phylogénétique des Glomeraceae. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr de 12 espèces du genre <i>Septoglosum</i> , 4 espèces du genre <i>Funnelformis</i> , deux espèces du genre <i>Glomus</i> , 12 espèces du genre <i>Dominikia</i> , 3 espèces du genre <i>Kamienskia</i> , une espèce du genre <i>Sclerocystis</i> et 12 espèces du genre <i>Rhizophagus</i> . Une espèce du genre <i>Claroideoglosum</i> a été utilisé comme groupe externe..... | 259 |
| Figure 17. Photographies de <i>Glomus tetrastratosum</i> (Blaszkowski et al. 2015c)..... | 261 |
| Figure 18. Photographies des spores de <i>Funnelformis mosseae</i> BEG12..... | 264 |
| Figure 19. Photographies des spores de <i>Septoglosum constrictum</i> (reference accession KS890).... | 266 |
| Figure 20. Photographies des spores de <i>Rhizophagus clarus</i> BEG149..... | 269 |
| Figure 21. Photographies des spores de <i>Sclerocystis coremioides</i> BEG250..... | 271 |
| Figure 22. Photographies des spores de <i>Dominikia disticha</i> | 273 |
| Figure 23. Photographies des spores de <i>Kamienskia bistrata</i> | 274 |
| Figure 24. Analyse phylogénétique des Claroideoglomeraceae. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr de 7 espèces du genre <i>Claroideoglosum</i> et une espèce du genre <i>Entrophospora</i> . Une espèce du genre <i>Glomus</i> a été utilisée comme groupe externe..... | 276 |
| Figure 25. Photographies des spores de <i>Claroideoglosum claroideum</i> BEG23..... | 277 |
| Figure 26. Photographies des spores d' <i>Entrophospora infrequens</i> (reference accession AZ237).... | 278 |
| Figure 27. Analyse phylogénétique des Archaeosporales et des Paraglomérales. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr de 6 espèces du genre <i>Archaeospora</i> , une espèce du genre <i>Paleospora</i> , une espèce du genre <i>Geosiphon</i> , 4 espèces du genre <i>Ambispora</i> , 5 espèces du genre <i>Paraglosum</i> , une espèce du genre <i>Innospora</i> et une espèce du genre <i>Pervetustus</i> . Une espèce du genre <i>Sphaerocreas</i> , et 4 espèces du genre <i>Endogone</i> ont été utilisées comme groupe externe..... | 280 |
| Figure 28. Photographies des spores <i>Archaeospora trappei</i> (reference accession AU219)..... | 282 |
| Figure 29. Photographies des spores d' <i>Ambispora leptoticha</i> (reference accession FL130A)..... | 284 |
| Figure 30. Photographies des spores de <i>Paraglosum occultum</i> (reference accession CL700)..... | 287 |
| Figure 31. Photographies des spores d' <i>Innospora majewskii</i> | 288 |
| Figure 32. Photographies des spores de <i>Pervetustus simplex</i> nc..... | 290 |

Index des tableaux

Chapitre 3

New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS

Table 1. Spore identification of 19 isolates of AMF by MALDI-TOF-MS biotyper: Bruker real-time analysis of log MP scores.....169

Table 2. Time and estimated cost analysis for rDNA sequencing from one isolate using conventional Sanger sequencing versus MALDI-TOF-MS biotyping.....174

Chapitre 4

The combination of several native arbuscular mycorrhizal belonging to different taxa, in the same *inoculum*, improve the efficiency of mycorrhizal symbiosis of two plant species growing on a New Caledonian ultramafic soil

Table 1. Specificity and length of the expected fragment with primers developed for identification of AM fungi in plant roots.....187

Table 2. AMF spore production in soil (spore number in 1 g of soil) for each fungal treatment on *M. laurifolia* and *S. vulgare*.....191

Table 3. Detection of AMF by PCR on pure spores and on roots of *M. laurifolia* and *S. vulgare*. Positives detections were labelled with "+", negatives detections were labelled with "-", grey squares indicate when species were detected in soil (spores) by morphological analysis and were not recovered by PCR in roots.....192

Supplementary data

Table 1: Plant height data values along experiments expressed in cm.....208

Table 2: Plant growth data values: shoot and root biomasses expressed in g dry weight.....216

Table 3. Frequency, intensity of mycorrhization and percentage of arbuscules within infected areas of roots.....217

Table 4. Plants shoot and roots tissue mineral analysis: essential element for plant mineral nutrition: N, P, K, Ca and Mg. (a) *Metrosideros laurifolia*, (b) *Sorghum vulgare*.....218

Table 5. Plants shoot and roots tissue mineral analysis: metal content: Fe, Co, Cr, Mn, Ni and translocation factor (TF). (a) *Metrosideros laurifolia*, (b) *Sorghum vulgare*.....219

Liste des abréviations

ADN (DNA) : Acide désoxyribonucléique / Deoxyribonucleic acid
ADNr (rDNA) : Acide désoxyribonucléique ribosomique / Ribosomal deoxyribonucleic acid
ARN (RNA) : Acide ribonucléique / Ribonucleic acid
ARNr (rRNA) : Acide ribonucléique ribosomique / Ribosomal ribonucleic acid
As : Arsénique
BAS: Branched absorbing structure / Structure d'absorption ramifié
Cd : Cadmium
Ca : Calcium
CMA (AMF) : Champignons mycorrhiziens à arbuscules / Arbuscular mycorrhizal fungi
Co : Cobalt
Cr : Chrome
Cu : Cuivre
COI : Gène mitochondrial codant pour la Cytochrome c Oxidase I
DGGE : Electrophorèse sur gel avec gradient dénaturant
ICP-OES: Inductive Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry / Plasma à couplage inductif par spectrométrie d'émission optique
ITS : Internal transcribed spacer / Espaceur transcrit interne
K : Potassium
LSU : Large subunit ribosomal ribonucleic acid / Gène codant pour la grande sous-unité ribosomique nucléaire
MA: Million d'années
MALDI-TOF-MS : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight-Mass Spectrometer / Désorption-ionisation laser assistée par matrice - Spectromètre de masse à temps de vol
Mg : Magnésium
MIR : Mycorrhiza-induced resistance / Résistance induite par les mycorhizes
Mn : Manganèse
mtLSU : The mitochondrial large subunit gene / Gène codant pour la grande sous-unité ribosomique mitochondriale
N : azote
NH₄ : Ammonium
Ni : Nickel
P : phosphore
PCA : Principal Component Analysis / Analyse en composantes principales
PCR : Polymerase chain reaction / Amplification par réaction de polymérisation en chaîne
Pi : Phosphate inorganique
PT : Phosphate transporter / Transporteurs de phosphore
RFLP : Restriction fragment length polymorphism / Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RPB 1 : Large subunit of RNA polymerase II / Gène codant pour la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II
T-RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments terminaux de restriction
S : Soufre
SNP : Single-nucleotide polymorphism / Polymorphisme d'un seul nucléotide
SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism / Polymorphisme de conformation simple brin
SSU : Small subunit (ribosomal ribonucleic acid) / Petite sous-unité ribosomique (sous-entendu nucléaire)
TAM : Transporteurs d'ammonium induits par les mycorhizes
TGGE : Temperature gradient gel electrophoresis / Electrophorèse sur gel à gradient de température
Zn : Zinc

Lexique

Abiotique : Non vivant.

Agriculture : Culture des sols afin d'obtenir les produits d'alimentation.

Arbuscule : Structure symbiotique d'échange en forme d'arbuste se formant au sein des cellules racinaires de la plante hôte suite à la pénétration non dégradante d'un hyphe de champignon mycorhizien à arbuscule.

Biotique : Se dit des facteurs liés à l'activité des êtres vivants dans un biotope.

Biotrophe : Se nourrissant aux dépens d'un être vivant.

Biocénose : Composante vivante de l'écosystème. Ensemble des organismes vivants interactifs (plantes, animaux, micro-organismes) coexistant dans un espace défini.

Biotope : Composante abiotique de l'écosystème (revient à la notion de niche écologique).

Communauté : Ensemble des espèces coexistant dans un environnement.

Ecosystème : Système écologique complexe d'interactions entre la biocénose et le biotope qui le composent.

Edaphique : Relatif aux rapports entre les êtres vivants et les sols (pH, humidité, concentrations en élément minéraux, etc...).

Locus : Position précise d'un gène sur un chromosome.

Phylogénie : science qui reconstitue les relations de parenté entre les taxons.

Restauration écologique : Processus d'assister l'auto-régénération des écosystèmes qui ont été dégradés, endommagés ou détruits.

Rhizosphère : zone du sol directement sous l'influence des racines (des molécules exsudées par les racines), et qui va affecter l'activité microbienne.

Services écosystémiques : Ensemble des services rendus par les écosystèmes à l'Humanité et plus globalement à la biosphère.

Systématique : C'est un prolongement de la taxonomie, la systématique est la science pure de la classification des taxons, via un système permettant de les dénombrer et surtout de les classer en les organisant dans un certain ordre, sur la base de principes logiques.

Taxonomie : C'est une branche de la biologie, qui a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons afin de les identifier.

Ultramafique : Péridotites ou roches issues de l'altération de la péridotite, comme la serpentine. Ultramafique signifie une faible concentration en silice (moins de 45% de la masse) et une forte présence de minéraux riches en fer et magnésium (plus de 90%).

Introduction générale

I. Contexte général

La consommation en ressources primaires (minérales, eau, végétaux) ne cesse d'augmenter avec le développement technologique, économique et l'expansion industrielle et démographique. La croissance de la société et de la civilisation s'appuie fortement sur l'exploitation minière et l'exploitation agricole pour trouver les ressources indispensables à leur confort et à leurs besoins. D'un côté l'exploitation minière détruit les écosystèmes présents sur les zones exploitées, ce qui conduit à la disparition de nombreuses populations animales, végétales et microbiennes, menaçant certaines espèces de disparition. Pour éviter cette perte de biodiversité, des programmes de restauration écologique doivent être mis en place. D'un autre côté, l'agriculture moderne privilégie l'apport de phosphore et d'autres éléments essentiels sous leurs formes minérales, rapidement assimilables par les plantes ainsi que l'utilisation de pesticides aux dépens d'autres méthodes plus respectueuses de l'environnement. Par conséquent certaines ressources naturelles s'épuisent devant une consommation grandissante des sociétés contemporaines et des problèmes sanitaires et environnementaux liés aux méthodes utilisées par l'industrie minière et agricole émergent. Par exemple, le phosphate est une ressource fossile utilisée massivement en agriculture et dans une moindre mesure pour la restauration écologique. Si le rythme d'extraction actuel se maintient, les réserves mondiales de phosphate seront épuisées d'ici 2100 (Cordell et al. 2009). Des solutions alternatives doivent être développées pour réduire cette consommation effrénée de phosphate et éviter une famine mondiale (FAO, 2014). Notre civilisation en pleine croissance démographique entraîne également une demande croissante en matière première et en énergie. Pour parvenir à répondre à cette demande croissante, une augmentation constante du rythme d'extraction par l'industrie minière des ressources minérales issues des gîtes métallifères est nécessaire (Harrison & Rajakaruna 2011). La plupart des gîtes métallifères se trouve dans les manteaux d'altération latéritique de la ceinture tropicale. C'est le cas notamment en Nouvelle-Calédonie où les sols ultramafiques issus de ces manteaux d'altération ont des teneurs élevées en métaux et des carences en éléments essentiels pour les plantes. Ces conditions édaphiques extrêmes engendrent une biodiversité exceptionnelle (Barthlott et al. 1996 ; Brooks 1987 ; Proctor 2003), dont une partie est en danger d'extinction en raison de pressions anthropiques diverses (Myers et al. 2000). L'industrie minière, notamment, détruit ces écosystèmes, induisant une perte de biodiversité, et la pollution des rivières et des océans. De plus, les organismes vivants dans des conditions environnementales extrêmes comme celles des milieux ultramafiques ont des traits uniques et sont donc

extrêmement intéressants pour la découverte d'organismes ayant des intérêts biotechnologiques. Il est impératif de mettre en place des mesures de préservation et restauration écologique pour protéger et conserver la biodiversité de ces écosystèmes, afin de limiter entre autres, les pollutions engendrées par l'érosion et le lessivage des sols. Pour restaurer ces écosystèmes dégradés, les processus écologiques initiaux doivent être étudiés afin de pouvoir reconstituer une interface entre les sols et les plantes proche de l'origine du point de vue de son fonctionnement (Dobson 2008).

Pour développer une agriculture et restaurer ces écosystèmes de façon durable, il est impératif d'utiliser des techniques efficaces et respectueuses de l'environnement, en limitant ou en n'utilisant pas d'intrant chimique tel que le phosphore ou les pesticides. Une des solutions les plus prometteuses pour l'agriculture et la restauration écologique des milieux dégradés est l'utilisation des champignons mycorhiziens. En effet ces champignons ont prouvé leur efficacité dans des contextes agronomiques et écologiques en limitant les apports d'intrants chimiques (pesticides, N, P, K) et en conférant aux plantes une meilleure nutrition minérale et une tolérance aux stress biotiques et abiotiques du milieu. Parmi les associations plantes-champignons, la plus fréquente est la symbiose mycorhizienne à arbuscules : la majorité des espèces végétales sont associées, au niveau de leur racine, avec des champignons du groupe des Gloméromycètes. Cette symbiose est retrouvée sur tous les continents des îles subarctiques à la Péninsule antarctique et dans tous les écosystèmes terrestres (Newsham et al. 2009 ; Smith et Read 2008). La quasi-universalité de cette symbiose tient au bénéfice nutritionnel que les plantes en retirent depuis plus de 400 millions d'années. En effet les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) auraient permis de promouvoir l'apparition de racines chez les plantes (Fortin et al. 2015), ce qui aurait permis la conquête des milieux terrestres par les plantes permettant ainsi de transformer les milieux terrestres en milieux fertiles, c'est-à-dire en sol vivant. On doit à ces tout premiers sols l'établissement graduel des végétaux et, conséquemment, l'existence du monde vivant, animal aussi bien que végétal, sur la surface terrestre (Fortin et al. 2015). De même que les animaux ne peuvent correctement digérer leur bol alimentaire qu'en étant associés à une flore microbienne présente dans leur tube digestif, les plantes, à part quelques exceptions, ne peuvent efficacement retirer les sels minéraux du sol qu'en étant associées à des champignons mycorhiziens. La symbiose mycorhizienne à arbuscule est invisible à l'œil nu. Aussi nous ne nous doutons pas de l'abondance de cette symbiose dans notre environnement : un cm³ de sol de prairie renferme plusieurs dizaines de mètres d'hyphes (Ji et al. 2013). Le champignon forme un réseau

mycélien à l'extérieur des racines, explorant le sol et puisant eau et sels minéraux, particulièrement le phosphore et dans une moindre mesure l'azote. Ces éléments, présents dans le sol mais sous forme peu mobile (P) ou peu abondante (N), sont transférés à la plante hôte en contrepartie de glucose (issu de la photosynthèse) et de lipide (Keymer et al. 2017). Près de 20% du carbone photosynthétique est transféré au champignon symbiotique (Jakobsen & Rosendahl 1990). Dans la nature 90% du phosphore et 60% de l'azote présents dans les plantes sont issus de l'activité de ces champignons (Smith et Read 2008). En étendant la capacité d'exploration des racines dans le sol, le réseau mycélien améliore la nutrition minérale et hydrique des plantes.

II. Problématique et objectifs de la thèse

Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) sont potentiellement des outils de biotechnologie. Il a été montré qu'un fort taux de succès sur la promotion de la croissance des plantes est obtenu avec ces champignons lorsqu'ils sont introduits dans des milieux similaires à ceux de leur origine (Caravaca et al. 2003 ; Calvente et al. 2004 ; Marulanda et al. 2007 ; Shen & Wang 2011). De plus il a été prouvé récemment que les souches de CMA isolées dans des milieux originaux (caractéristiques édaphiques et climatiques spécifiques) sont des écotypes adaptés ayant des capacités physiologiques uniques pour faire face aux conditions extrêmes qui règnent dans leurs milieux (Lopez-Gutierrez et al. 2008). En Nouvelle-Calédonie, sur les sols ultramafiques le rapport Ca/Mg est déséquilibré, il y a présence de fortes concentrations de métaux lourds et une faible disponibilité en phosphore dans ces sols. Il est donc raisonnable de penser que les CMA provenant de ces milieux originaux ont des traits uniques et des propriétés physiologiques adaptées à ces conditions. Ces symbiotes sont donc des organismes d'étude d'un grand intérêt pour être utilisés en tant que biostimulant des plantes en vue d'une restauration écologique des sites miniers dégradés.

Récemment, les stratégies d'utilisation de souches microbiennes, y compris de CMA, pour stimuler les plantes consistaient généralement à sélectionner une souche unique très performante. Cependant, depuis peu de temps, les conceptions écologiques ont évolué et la vision écosystémique prédominante suppose une conception plus complexe des interactions au sein des biocénoses (Berruti et al. 2016 ; Van der Heijden et al. 2015 ; 2016). Les essais réalisés jusqu'à présent avec les CMA, sur sol ultramafique en Nouvelle-Calédonie, utilisaient généralement un seul isolat. Des essais récents avec 3 isolats de 2 espèces différentes ont

donné des résultats intéressants en condition expérimentale (Gensous 2014) et surtout sur le terrain (Amir et al. 2014b) suggérant des fonctions complémentaires de ces isolats.

L'objectif de cette thèse est de clarifier le lien entre la complexité des communautés de CMA et l'efficacité de la symbiose mycorhizienne en termes de croissance et d'adaptation de la plante hôte. Dans cette optique, l'hypothèse centrale qui est testée est la suivante : les différents taxons de CMA natifs des milieux ultramafiques ont des propriétés physiologiques différentes leur permettant d'exercer des fonctions complémentaires vis-à-vis de la plante hôte. Dans le milieu ultramafique, les contraintes sont nombreuses ; chaque CMA pourrait avoir des propriétés lui permettant de réduire une ou quelques contraintes. Les effets simultanés de plusieurs CMA taxonomiquement bien différents pourraient alors permettre de réduire la totalité des contraintes et permettre ainsi à la plante de s'adapter et se développer de façon optimale dans ces sols extrêmes. Pour atteindre l'objectif fixé ci-dessus, il importe d'abord d'obtenir suffisamment d'isolats aussi différents que possible (plusieurs familles), puis de les cultiver pour les caractériser. Cette caractérisation vise non seulement à les identifier aussi précisément que possible, mais aussi à connaître leurs particularités morphologiques et écologiques afin de les relier aux fonctions qu'elles révéleront.

Pour répondre à ces objectifs, un travail minutieux de description des isolats les plus originaux a permis la découverte de cinq espèces nouvelles de CMA. Au cours de ces travaux, j'ai été confronté à la complexité des méthodes d'identification de ces symbiotes, ce qui m'a amené à tester d'autres techniques, aboutissant à la mise au point d'une méthode d'identification précise et routinière pour l'identification des CMA. Les différents isolats identifiés et cultivés en laboratoire ont ensuite été testés en conditions expérimentales afin d'évaluer leurs fonctions individuelles et collectives au sein des plantes hôtes. Ce type d'étude pourrait ainsi contribuer à l'utilisation des services écosystémiques des CMA pour pallier aux dégâts engendrés par l'activité minière sur les sols ultramafiques et d'une façon plus générale, à la correction des distortions induites par l'homme au sein des écosystèmes naturels ou agricoles.

Le premier chapitre de cette thèse est une synthèse bibliographique axée sur les points développés dans les différents chapitres. Le deuxième chapitre a pour objectif d'isoler, de cultiver et d'identifier des CMA provenant de milieux ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. Le troisième chapitre de cette thèse proposera de développer une méthode précise et routinière pour l'identification des spores de CMA. Le quatrième chapitre a pour objectif d'évaluer en conditions expérimentales les fonctions individuelles et collectives, au sein de la symbiose

mycorhizienne, des différents isolats identifiés dans le deuxième chapitre. Un article de synthèse sur la taxonomie des Glomeromycota (Annexe 1) a également été réalisé afin de faire le point sur i) l'historique de la taxonomie des CMA, ii) la diversité taxonomique des CMA, iii) les caractères morphologiques utilisés pour l'identification des CMA, iv) l'affiliation phylogénétique de chacune des espèces de CMA décrites et v) le nombre d'espèces de CMA décrites jusqu'à aujourd'hui. Cet article a été placé en annexe, parce qu'il n'entre pas directement dans le plan de thèse.

Chapitre 1 Synthèse bibliographique

I. Situation des champignons mycorhiziens dans le monde vivant

Plusieurs études menées ces dernières décennies indiquent que le fonctionnement des écosystèmes est positivement lié à la diversité végétale (Ehrlich 1981 ; Lefcheck et al. 2015). Contrairement aux plantes, les connaissances concernant les relations entre la diversité microbienne et le fonctionnement de l'écosystème restent limitées, en particulier dans les environnements terrestres (Bell et al. 2005 ; Peter et al. 2011). Les communautés microbiennes jouent un rôle clé dans le maintien de multiples fonctions et services écosystémiques, incluant le cycle des nutriments, la production primaire, la décomposition de la litière et la régulation du climat (Van der Heijden et al. 2008 ; Wagg et al. 2014). Parmi les divers processus écosystémiques sur Terre, la productivité des plantes et le cycle des nutriments sont parmi les plus importants pour le bien-être humain et plus globalement pour l'existence de la biosphère (Bodelier et al. 2011 ; Bardgett et al. 2014). En raison d'une augmentation continue de la croissance démographique mondiale (World Bank 2008), une augmentation de la production végétale et une intensification de l'utilisation des terres sont à prévoir pour soutenir la demande future en nourriture et en fibres végétales (Wall et al. 2010). Comprendre les facteurs contrôlant les multiples fonctions liées à la production végétale et au cycle des éléments nutritifs dans un environnement en évolution est donc essentiel pour préserver et gérer les écosystèmes naturels dominés par l'homme. La diversité microbienne du sol joue un rôle clé dans le maintien de la multifonctionnalité (définie comme la capacité d'un écosystème à fournir plusieurs fonctions et services) de l'écosystème en permettant des processus tels que la décomposition de la litière et la minéralisation de la matière organique (Hooper et al. 2000 ; Wardle et al. 2004) qui permettent le transfert de matière et d'énergie entre les différentes communautés d'organismes présents au sein de l'écosystème (Hooper et al. 2000 ; Wardle et al. 2004). De plus, plusieurs études expérimentales et observationnelles démontrent que les relations entre la biodiversité (c'est-à-dire les microbes et les plantes) et le fonctionnement de l'écosystème sont linéaire (Reich et al. 2012 ; Mora et al. 2014). Delgado-Baquerizo et al. (2016), font passer un message clair aux scientifiques, décideurs, éducateurs et aux organisations impliquées dans la compréhension des schémas de biodiversité, des micro-organismes et du fonctionnement des écosystèmes : « les pertes de diversité microbienne dérivées des activités humaines et du changement climatique réduiront les taux de maintien des multiples fonctions et services écosystémiques ». Les résultats de cette étude soulignent la nécessité de développer des approches et des politiques pour protéger la

diversité microbienne du sol. En effet l'agriculture intensive et l'exploitation minière contribuent aux changements climatiques et à l'épuisement du potentiel biologique des sols et sont directement liés à la modification des communautés de micro-organismes du sol. Il est capital de préserver la multifonctionnalité de ces écosystèmes terrestres pour les générations futures.

Les champignons jouent des rôles essentiels dans la biosphère notamment dans les cycles géochimiques comme celui de l'azote (Boer & Kowalchuk 2001) ou celui du carbone (Hogberg & Hogberg. 2002). Ils sont essentiels au recyclage des nutriments dans tous les habitats terrestres, car ils sont les principaux décomposeurs des débris végétaux, tels que la cellulose et la lignine. Les champignons sont retrouvés de manière abondante dans les sols, jusqu'à 200 mètres d'hyphes fongiques dans 1g de sol (Leake et al. 2004). En tant qu'hétérotrophes opportunistes, ils ont développé des hyphes pour pénétrer des substrats solides et produire des spores pour une dispersion à longue distance. Ils causent de nombreuses maladies des plantes et des animaux, mais ils ont également établi des symbioses mutualistes avec un large éventail d'organismes : cyanobactéries et algues vertes (chez les lichens), bryophytes, ptéridophytes, gymnospermes et angiospermes (chez les mycorhizes : acquisition des éléments nutritifs pour les plantes) (Smith & Read 2008), et coléoptères, diptères, homoptères, hyménoptères et insectes isoptères. Les champignons sont aussi connus en tant que parasites ou agents pathogènes, ils sont bien équipés pour pénétrer les organismes hôtes et libérer des spores qui seront transmises efficacement d'un hôte à l'autre, et de nombreuses espèces produisent des composés toxiques (mycotoxines). Certains champignons peuvent également affecter la santé humaine de diverses manières.

A. Généralités sur les champignons

1. Position phylogénétique des champignons au sein du monde du Vivant

Le Vivant est divisé en trois domaines : *les archées, les bactéries (procaryote : organisme constitué d'une seule cellule dont le noyau, dépourvu de membrane, est constitué d'un chromosome) et les eucaryotes* (Hug et al. 2016). Les eucaryotes sont divisés en 10 règnes : les Archaeplastida, les Rhizaria, les Alveolata, les Stramenopiles, les Haptobionta, les Discicristates, les Excavates, les Opisthokonta, les Amoebozoa et les Cryptobionta (Boudouresque 2015 ; Fig. 1).

Le règne des **Opisthokonta** est composé des animaux (Metazoa) et des champignons, ainsi que plusieurs lignées de protistes hétérotrophes, c'est le règne le plus diversifié avec approximativement 1350000 espèces. Les animaux émergent d'un groupe paraphylétique de protistes, comprenant les choanoflagellés (par exemple, *Monosiga*), les Filasterea (par exemple, *Capsaspora*) et les *Ichthyosporea* (*Sphaeroforma*) (Steenkamp et al. 2006 ; Ruiz-Trillo et al. 2008 ; Shalchian-Tabrizi et al. 2008 ; del Campo & Ruiz-Trillo 2013). Les Fungi et les Nucleariidea forment un groupe frère au groupe des Animaux (Baldauf 1999; Baldauf & Palmer 1993). Ainsi les animaux et les Fungi appartiennent au règne des Opisthokonta (Baldauf 1999) au sein du domaine des Eucaryotes (Fig. 1).

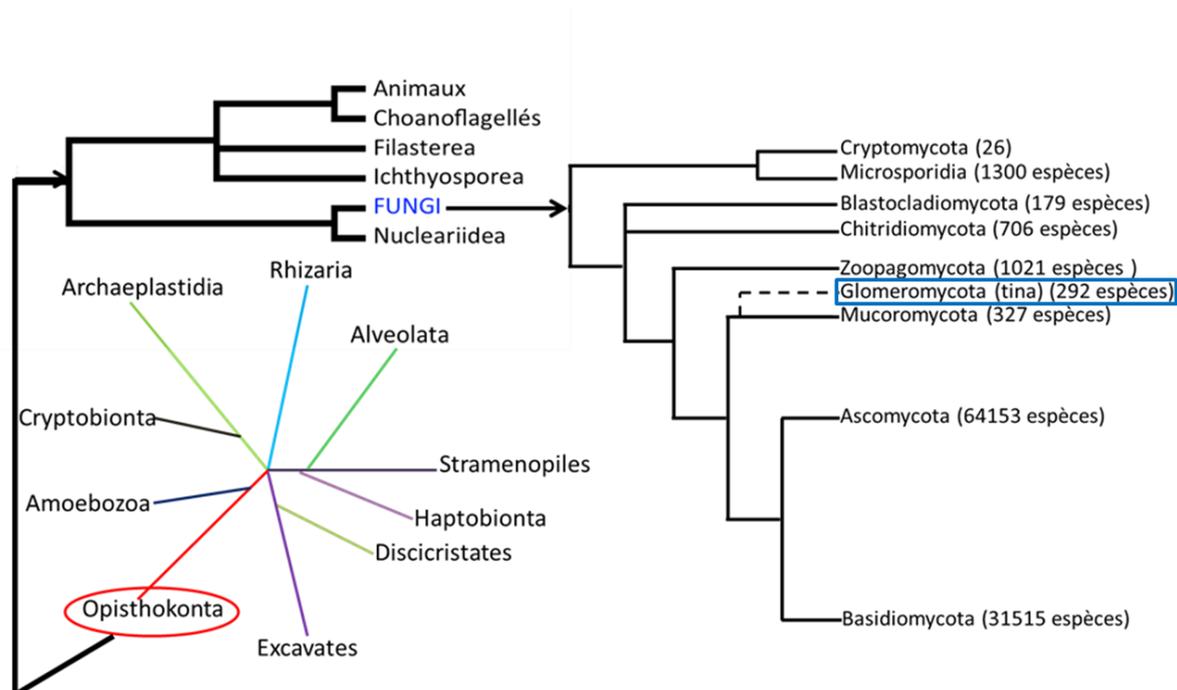


Figure. 1 : Phylogénie des Eucaryotes, des Opisthocontes et des Fungi modifiée à partir de (Blackwell et al. 2012 ; Hibbett et al. 2013 ; Burki et al. 2014 ; Boudouresque et al. 2015 ; Spatophora et al. 2016 ; 2017). La branche en pointillés indique que la position phylogénétique de ce groupe reste incertaine, elle peut être placée parmi les Mucoromycota ou dans un embranchement proche des Mucoromycota.

2. Taxonomie et phylogénie des champignons

Les champignons sont divisés en 7 embranchements d'après l'étude récente de Spatophora et al. 2017 : les Cryptomycota/Microsporidia, les Blastocladiomycota, les Chitridiomycota, les Zoopagomycota, les Mucoromycota, les Ascomycota et les Basidiomycota.

Les lignées basales Cryptomycota, Microsporidia, Chytridiomycota et Blastocladiomycota sont des champignons caractérisés par un stade « zoospore » pendant une partie de leur vie, ils sont dit « zoosporiques ». Seules les lignées basales ont des spores pouvant avoir un flagelle (implanté à l'arrière de la cellule), ce flagelle permet d'assurer une mobilité en milieu aquatique. Cependant il existe des exceptions, certaines espèces de ces différents embranchements sont munies de plusieurs flagelles alors que d'autres n'en possèdent pas. Tous les autres embranchements du groupe des champignons ne possèdent pas de flagelle, il y aurait donc eu une perte de flagelle au cours de l'évolution des champignons (Boudouresque 2015 ; Spatophora et al. 2016 ; 2017).

D'après les dernières études (Spatophora et al. 2016 ; 2017) les zygomycètes forment un groupe paraphylétique et sont maintenant classés en trois embranchements : les **Zoopagomycota**, **Mucoromycota** et les **Glomeromycota**. En 2016 Spatafora et al. réalisent une étude phylogénétique basée sur plusieurs gènes de champignons appartenant aux Zygomycètes et délimitent deux embranchements les **Zoopagomycota**, **Mucoromycota** et un sous embranchement des Mucoromycota, les Glomeromycotina. Ce placement des Glomeromycota comme sous embranchement des Mucoromycota semble prématuré (communication pers. Pr. Redecker). La plupart des zygomycètes (**Zoopagomycota**, **Mucoromycota**, **Glomeromycota**) sont caractérisés par des hyphes coenocytiques et des sporanges à reproduction asexués, mais certaines lignées sont caractérisées par des hyphes cloisonnées ou compartimentées et forment des conidies. Les Zoopagomycota, Mucoromycota et les Glomeromycota sont caractérisés par la perte du flagelle fongique et la conquête du milieu terrestre (champignons filamenteux). On suppose que cette perte de flagelle dans le groupe des Fungi correspond à la transition d'un environnement aquatique à un environnement terrestre (Boudouresque 2015 ; Spatophora et al. 2016 ; 2017).

Les Glomeromycota représentent les organismes communément appelés champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), tous les membres de cet embranchement forment des mycorhizes arbusculaires dans les cellules des plantes à l'exception d'une espèce *Geosiphon pyriformis*, un symbiote de cyanobactéries (Redecker & Schüßler 2014). Les mycorhizes arbusculaires sont les formes les plus communes de mycorhizes sur la planète, et leurs structures (arbuscules) ont été retrouvées sur les premiers fossiles de plantes terrestres (Pirozynski & Dalpe 1989 ; Taylor et al. 1995 ; Redecker et al. 2000a, b), confirmant l'ancestralité de cette symbiose. Une des hypothèses avancées par plusieurs chercheurs est que ces champignons auraient permis aux végétaux aquatiques d'évoluer en plantes

vasculaires (Bidartondo et al. 2011 ; Field et al. 2015). Morphologiquement, ils ressemblent aux zygomycètes, avec la présence d'hyphe coenocytique et des spores qui ressemblent aux azygospores. Ces spores sont formées de manière asexuée et de façon intercalaire ou terminale sur l'hyphe, elles peuvent également être formées à partir d'une cellule bulbeuse sporogène (Gerdemann & Trappe 1974). La reproduction sexuée n'a jamais été observée pour ce groupe et très-peu sont cultivés en culture pure, ce qui empêche l'analyse de caractères morphologiques traditionnellement utilisés dans les classifications.

Le sous-règne des **Dikarya** regroupe deux embranchements les Ascomycota et les Basidiomycota, ces champignons possèdent des hyphes cloisonnées à intervalle régulier. Les Dikarya tirent leurs noms du fait qu'ils produisent généralement des dicaryons, c'est-à-dire des cellules qui contiennent deux noyaux haploïdes différents (Spatophora et al. 2016 ; 2017).

3. Mode de vie des champignons, focus sur les champignons symbiotiques

Les champignons sont chimio-hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils puisent leur énergie à partir des molécules carbonées récupérées dans leur environnement puisqu'ils ne sont pas capables de les produire. Ils possèdent différents modes de vie directement liés à leurs modes de nutrition et à leurs environnements.

Les champignons saprophytes se nourrissent de la matière organique morte (bois, feuilles, cadavres) et permettent sa dégradation. Ils habitent les sols des champs et des forêts. Les champignons saprophytes, représentent jusqu'à 24 % du volume du sol et 1 g de sol renferme jusqu'à 4 km d'hyphe en forêt naturelle, ce sont les premiers décomposeurs de la matière morte avec les bactéries. En se nourrissant de matière végétale et animale en décomposition, ils participent à l'équilibre biologique des sols où ils transforment la matière organique en matière minérale, renouvelant ainsi l'humus. Ces champignons jouent donc un rôle essentiel de décomposeurs, et les vastes réseaux formés par leurs hyphes jouent également un rôle fondamental dans le maintien de la microstructure des sols et notamment dans la stabilité des agrégats, la circulation et la mise à disposition de nombreux éléments minéraux ou organiques (Rodriguez & Redman 1997).

Les champignons parasites se nourrissent au dépend d'un autre organisme vivant (plante, animal, champignon), le champignon parasite a un effet négatif sur son hôte pouvant aller jusqu'à la mort de celui-ci. Certaines espèces peuvent même être considérées comme

carnivores puisqu'elles capturent et digèrent leurs proies, souvent des nématodes (Kerry 2000). Néanmoins ces champignons ont un grand intérêt puisqu'ils permettent de réguler l'équilibre des populations dans les écosystèmes.

Les champignons commensaux tirent profit de leurs hôtes sans leur nuire ni leur apporter d'avantage, par exemple ils se servent de leurs hôtes comme support, ils peuvent aussi devenir parasite opportuniste si leur hôte est affaibli.

Les champignons symbiotiques, sont associés de façon durable avec un autre organisme, ils peuvent être pathogènes, commensaux ou mutualistes (Martin & Schwab 2012). L'origine de la symbiose végétale a permis la colonisation du milieu terrestre, en effet la première symbiose a eu lieu entre une algue et un champignon et a permis de développer une flore pionnière du milieu terrestre : les lichens. Les lichens ont été la seule forme de vie végétale terrestre pendant plusieurs millions d'années, ils sont apparus il y a environ 600 MA. A cette époque l'émergence et l'érosion des continents ont provoqués des dépôts sédimentaires, les rivières et les estuaires se sont alors chargés en sédiments et ont permis l'émergence d'algues vivant en eaux peu profondes. Ensuite ces sédiments se sont asséchés et une partie de ces algues ont évolué en bryophytes. Avec l'assèchement des sédiments, pour ces plantes dépourvues de racines il devenait de plus en plus dur de puiser l'eau et les nutriments nécessaires à leurs survies. C'est à ce moment que la symbiose mycorhizienne à arbuscules (Glomeromycota) serait apparue. Des fossiles d'arbuscules, sur les premières plantes ayant un système racinaire, ont été retrouvés et datés à 400 MA (Redecker et al. 2000). Les premières plantes qui ont été colonisées par les CMA sont des bryophytes puis les fougères, les gymnospermes et les angiospermes. L'établissement de cette symbiose a joué un rôle primordial dans l'évolution des plantes vasculaires et a conduit à la prolifération de centaines de milliers de nouvelles espèces de plantes. Les autres types de symbiose mycorhizienne (les ectomycorhizes, les ect-endomycorhizes, les mycorhizes arbutoïdes, les mycorhizes monotropoïdes, les mycorhizes éricoïdes, les mycorhizes orchidoïdes, les mycorhizes sébacinoïdes) seraient apparus il y a environ 250 MA (Fortin et al. 2015).

B. Les différentes symbioses mycorhiziennes

H. Anton de Bary en 1869 a décrit le terme « symbiose » comme une interaction intime de long terme entre deux ou plusieurs espèces biologiquement distinctes, pouvant aller du mutualisme au parasitisme. En 1885 Bernhard Frank identifie des structures fongiques

dans les racines d'un pin, il invente alors le terme « Mykorrhizen » pour nommer ces structures. Le terme « Mykorrhizen » est un terme grec, qui signifie « champignon des racines ». Bernhardt Frank décrit la morphologie de ces structures ainsi que leurs rôles physiologiques (Strack & Fester 2006). En 1991 Allen définit la mycorhize comme une symbiose mutualiste entre une plante et un champignon au niveau des racines de la plante. Dans un premier temps un transfert d'énergie de la plante au champignon serait réalisé et ensuite des ressources inorganiques seraient allouées par le champignon à la plante. Plus tard, Smith & Read (2008) utilisent également le terme de mycorhize, uniquement, pour des associations mutualistes. Les mycorhizes se trouvent dans de nombreux environnements, et leur succès écologique reflète un haut degré de capacité d'adaptation génétique et physiologique (Bonfante & Anca 2009). La Paléobotanique date ces associations à l'ère du Dévonien (~400 million années). Ces associations symbiotiques auraient joué un rôle prédominant dans l'évolution des plantes aquatiques en plantes terrestres (vascularisation). Environ 6000 espèces mycorhiziennes, appartenant aux embranchements des Gloméromycota, des Ascomycota et des Basidiomycota, ont été dénombrées, les nouvelles techniques moléculaires ont fortement contribué à l'identification de ces différentes espèces (Bonfante & Anca 2009). Les champignons qui colonisent les systèmes racinaires sont associés avec 85% (Brundrett & Tedersoo 2018) des plantes terrestres. Ils établissent des relations intimes et stables qualifiées de symbiose mutualiste connue sous le nom de mycorhizes. Ces symbioses génèrent un énorme réseau d'hyphe dans le sol, qui va s'associer à la communauté végétale et permettre l'apport de nutriments aux plantes (Cardon & Whitbeck 2007) améliorant ainsi leurs croissances et leurs résistances aux stress. L'association mycorhizienne est l'association la plus importante dans les différents écosystèmes de notre planète en terme d'individus concernés et en terme d'impact sur les écosystèmes (Mohammadi 2011 ; Lalitha et al. 2017). Actuellement 8 types de mycorhizes sont reconnues : les ectomycorhizes, les ect-endomycorhizes, les mycorhizes arbutoïdes, les mycorhizes monotropoïdes, les mycorhizes éricoïdes, les mycorhizes orchidoïdes, les mycorhizes sébacinoïdes et les endomycorhizes (Smith & Read 2008 ; Fortin et al. 2015).

Les ectomycorhizes (du grec "ecto", signifie extérieur) sont très représentées que ce soit dans les forêts boréales, tempérées ou tropicales. Elles représentent 30% de la biomasse microbienne du sol dans les forêts. Les ectomycorhizes sont des champignons appartenant à l'embranchement des Ascomycota et Basidiomycota et sont en interactions avec des plantes ligneuses de gymnospermes (ex : Pinaceae) et d'angiospermes (ex : Dipterocarpaceae, Fagaceae, Salicaceae et Myrtiliaceae). Les ectomycorhizes entourent la racine de la plante hôte

avec leur mycélium et forment une structure appelée manchon mycélien ou manteau. Le mycélium ne pénètre pas la paroi cellulaire mais entoure les différentes cellules du cortex racinaire de la plante ; l'ectomycorhize colonise donc l'espace intercellulaire du cortex racinaire de la plante afin de former un manchon pseudo-parenchymateux. Ce réseau d'hyphes est appelé « réseau de Hartig », c'est le haut lieu des échanges nutritif entre les deux partenaires. Le mycélium du champignon va également se développer dans le sol afin d'absorber les nutriments disponibles. Ces nutriments seront soit assimilés et utilisés par le champignon ou transmis à la plante *via* le champignon (Smith & Read 2008 ; Fortin et al. 2015).

Chez les ect-endomycorhizes le manchon mycélien est réduit voire absent, en revanche, le réseau de Hartig est bien développé mais à la différence des ectomycorhizes les hyphes pénètrent dans les cellules du cortex racinaire de la plante. Une espèce de champignon peut être ectomycorhizienne sur une espèce de plante et être ect-endomycorhizienne sur une autre espèce de plante. Les ect-endomycorhizes sont retrouvées seulement chez certaines familles de plantes (ex : Pinaceae) et appartiennent à l'embranchement des Ascomycota (genre *Wilcoxina*) (Smith & Read 2008 ; Fortin et al. 2015).

Les **mycorhizes arbutoïdes** font partie des Basidiomycota et sont en interaction avec quelques espèces de la famille des Ericaceae. Elles possèdent un manchon mycélien mince, des hyphes extra-racinaires et un réseau de Hartig bien développé, les hyphes pénètrent à l'intérieur des cellules pour former des pelotons (Mohammadi 2011).

Les mycorhizes monotroïdes possèdent des hyphes qui forment un réseau de Hartig. Certaines hyphes de ce réseau pénètrent les cellules corticales entraînant une invagination de la paroi de ces cellules végétales. Des protubérances dans les cellules corticales les plus externes se forment et permettent les transferts de nutriments. Ce type de symbiose n'est formé que par un nombre limité de Basidiomycota et seulement chez les espèces de plantes du genre *Monotropa* appartenant aux Ericacées. Au lieu de produire leur énergie par la photosynthèse, les espèces du genre *Monotropa*, sont hétérotrophes (dépourvue de chlorophylle) et vivent en parasite. Plus précisément, les *Monotropa* parasitent la relation symbiotique mutualiste entre une ectomycorhize et son hôte (conifère). Les *Monotropa* arrivent à récupérer les sucres issus de l'arbre *via* le mycélium du champignon (Smith & Read 2008 ; Fortin et al. 2015).

Les mycorhizes éricoïdes, ce type de symbiose concerne 5% des espèces de plantes appartenant aux Ericacées et une dizaine d'espèces de champignons appartenant à

l'embranchement des Ascomycota. Les champignons développent un mycélium intracellulaire et forment des pelotons dans le cortex racinaire des Ericacées. Le champignon va permettre l'apport de nutriments et va apporter une protection contre les pathogènes et les métaux lourds (Smith & Read 2008 ; Fortin et al. 2015).

Les mycorhizes orchidoïdes, ce type de symbiose concerne 10 % des espèces de plantes appartenant aux Orchidées et des champignons appartenant à l'embranchement des Basidiomycota. Les champignons développent un mycélium intracellulaire et forment des pelotons dans le cortex racinaire des orchidées. Le champignon va permettre la nutrition saprophyte de l'orchidée (hétérotrophe) et va apporter une protection contre les pathogènes (Smith & Read 2008 ; Fortin et al. 2015).

Les mycorhizes sébacinoïdes, le champignon *Piriformospora (Serendipita) indica* a été découvert et isolé à partir d'une spore de champignon mycorhizien à arbuscule (*Funneliformis mosseae*) dans le désert du Thar en Rajasthan en Inde (Verma et al. 1998). Ce champignon est un Basidiomycota ayant des propriétés symbiotiques. *P. indica* appartient aux Sébacinacées et peut être cultivé en culture pure et produire des spores asexuées. Il permet de promouvoir la croissance des plantes en général. Il n'a pas de spécificité d'hôte, il envahit le cortex racinaire, pénètre à l'intérieur des cellules, forme des enroulements de mycélium et sporule abondamment dans les cellules des racines (Fortin et al. 2015).

Les endomycorhizes ou mycorhizes à arbuscules, sont retrouvées chez 72% des espèces végétales vasculaires terrestres (Brundrett & Tedersoo 2018). Cette symbiose est retrouvée chez les mousses, les hépatiques, les fougères, les lycopodes, les conifères et chez la majorité des plantes à fleurs, mono et dicotylédones. Ces champignons font exclusivement partie de l'embranchement des Glomeromycota, ce sont des champignons pour la plupart microscopiques. Le mycélium pénètre dans les cellules corticales de la racine de l'hôte et forme des arbuscules, des vésicules et des pelotons dans la cellule végétale. Les échanges nutritifs entre les deux partenaires, sont réalisés au niveau des arbuscules. Le champignon prospecte le sol *via* son mycélium et capture des éléments minéraux nécessaires à la plante ; en échange de ces éléments minéraux transmis à la plante, la plante va transmettre du sucre au champignon et des lipides pour qu'il puisse se développer et accomplir son cycle de vie (symbiose obligatoire) (Keymer et al. 2017). Le champignon sporule dans le sol ou dans les racines et confère à la plante une résistance aux stress biotiques et abiotiques (Fortin et al. 2015).

II. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

A. Cycle de vie et structure des CMA

1. Cycle de vie des CMA

Les CMA sont des biotrophes obligatoires : un partenaire végétal est nécessaire pour leur nutrition et accomplir leur cycle de développement. La germination des spores présentes dans le substrat (sol) dure 3 à 4 semaines (Fig. 2A). Les hyphes issus des spores germées arrivent à proximité d'une racine et changent de morphologie par une ramification prononcée, stimulée par des exsudats racinaires tels que les strigolactones (Fig. 2B, C) (Harrison et al. 2005). En réponse à cette stimulation par la plante, les CMA vont également relâcher des facteurs « Myc » dans le sol qui vont entraîner l'activation de la voie de signalisation de la symbiose chez la plante (Delaux et al. 2013) et provoquer une augmentation de la formation de racines latérales de la plante (Olah et al. 2005 ; Genre et al. 2013). Une fois en contact avec la racine, les hyphes forment des appressoriums qui pénétreront l'épiderme des racines (rhizoderme) par pression mécanique (Fig. 2D). Le champignon colonise alors la racine et forme des hyphes dans les espaces intercellulaires du cortex racinaire (Fig. 2E) puis il colonise les cellules corticales de la racine sans toutefois pénétrer la membrane plasmique et forme différentes structures tel que les pelotons (Fig. 2F) et l'organe d'échange (nutritif) permettant la symbiose : l'arbuscule (Fig. 2G). Le cycle de vie se poursuit par une phase qui se caractérise par le développement du mycélium extra-racinaire dans le sol entraînant une forte augmentation de la biomasse du CMA (Fig. 2H). Certains CMA forment aussi des structures de réserves intra-racinaires, les vésicules (Fig. 2I). Le cycle de vie du CMA se termine par une reproduction clonale qui se traduit par la production de spores (Fig. 2J) et le cycle de vie dure en général entre 4 et 8 mois (Bécard & Fortin 1998 ; Blaszkowski 2012).

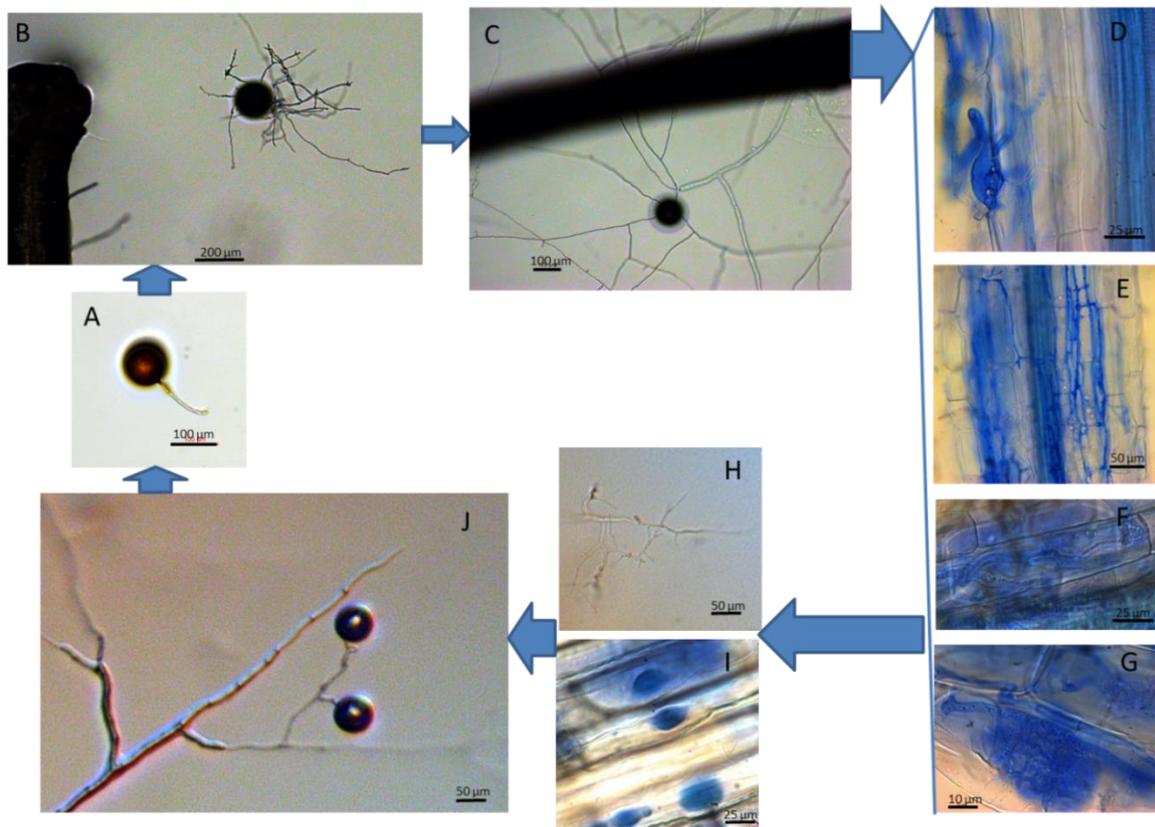


Figure 2. Cycle de vie et structure d'un CMA (*Claroideoglobus etunicatum nc*) isolé d'un sol ultramafique en Nouvelle-Calédonie et cultivé *in vitro* sur un milieu MSR avec des racines de chicorée Ri-T-DNA. A. Germination de la spore. B. Ramification de l'hyphe germinatif en présence d'une racine de chicorée Ri-T-DNA. C. Prolifération des hyphes de prospections (runner hyphae) et contact entre la racine et le CMA. D. Appressorium perforant la racine. E. Développement des hyphes intra-racinaires. F. Peloton dans une cellule de la racine. G. Arbuscule dans une cellule de la racine. H. Hyphes fines ramifiées absorbantes (Branched absorbing structure ; BAS). I. Vésicules intra-racinaires. J. Production de spores. D, E, F, G, I : racines colorées avec du Bleu de Trypan.

2. Structure des CMA

Les CMA sont formés d'hyphes cénocytiques qui ne possèdent pas de septa, ce qui permet aux noyaux de se déplacer librement dans le mycélium ; des cloisons peuvent cependant apparaître quand les hyphes cessent de croître (Bago et al. 1998 ; Fig. 2C, J). Les CMA développent 4 types de structures extra-racinaires différentes. **Les hyphes fines ramifiées absorbantes** (Branched absorbing structure ; Fig. 2H) ces structures sont supposées être les sites majeurs de l'absorption de nutriments issus du sol (Bago 1998). **Les hyphes de**

prospection (runner hyphae ; Fig. 2C) se propagent dans le sol et peuvent atteindre des longueurs importantes allant jusqu'à plusieurs dizaines de mètres par gramme de sol (Leake et al. 2004). L'exploration du sol par ce réseau mycélien permet au champignon d'entrer en contact avec d'autres plantes hôtes et de garantir sa survie. Ce réseau mycélien permet l'absorption des éléments nutritifs du sol nécessaire à la plante et au champignon, il peut être défini comme une extension du système racinaire (Newman & Reddell 1987). **Les spores** (Fig. 2J) sont produites dans les hyphes extra-racinaires des CMA par reproduction asexuée (Gandolfi et al. 2003 ; Normark et al. 2003) ; pour le genre *Rhizophagus*, les spores sont également produites dans les racines. Les spores sont des organes qui servent à identifier morphologiquement les espèces de CMA, et permettent leurs disséminations dans l'environnement. Les spores sont de forme sphérique ou ovale, elles peuvent rester en dormance durant de longues périodes et leur viabilité varie en fonction des conditions de l'environnement. 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 à plusieurs centaines de micromètres. Une quatrième structure extra-racinaire peut être observée chez la famille des Gigasporaceae : les cellules auxiliaires. Les cellules auxiliaires se forment sur les hyphes extra-racinaires ; ces structures, sont riches en noyaux, organelles et lipides (Bonfante et al. 1994) mais leur rôle reste méconnu. **L'appressorium** (Fig. 2D) permet au CMA de pénétrer dans le cortex racinaire par pression mécanique. Les CMA développent 3 types de structures intra-racinaires différentes. **Le mycélium intra-racinaire** (Fig. 2E) permet la colonisation de la racine par le champignon et la formation de différentes structures à l'intérieur des cellules corticales. Toutes les structures intra-racinaires des CMA sont liées au mycélium intra-racinaire qui est lui-même lié au mycélium extra-racinaire. Une fois entré dans le cortex l'hyphe intra-racinaire va se ramifier à plusieurs reprises jusqu'à donner des hyphes de 1µm de diamètre ; l'ensemble de ces ramifications vont alors former l'arbuscule à l'intérieur de la cellule du cortex racinaire interne. **L'arbuscule** (Fig. 2G) est le site d'échange nutritif entre la plante et le CMA (Gianinazzi et al. 1983). Cette structure est intracellulaire (mais pas intracytoplasmique) ; la mise en place de l'arbuscule ne nuit pas à l'intégrité de la cellule. La forme des arbuscules varie en fonction de l'espèce de CMA et de la plante ; le temps de vie d'un arbuscule est estimé à 4-10 jours (Johnson et al. 1997). **Les pelotons** (Fig. 2F) se trouvent généralement dans les cellules corticales périphériques (intracellulaire mais pas intracytoplasmique), l'hyphe s'enroule sur lui-même et forme des pelotons, ces structures semblent être différenciées dans des cellules dégénérantes et ne sont probablement pas fonctionnelles (Smith & Read 2008). Une cinquième structure intra-racinaire peut être

observée : les vésicules cependant ces structures sont absentes chez certaines familles de CMA telles que les Gigasporaceae ou les Paraglomeraceae. Les vésicules (Fig. 2I) sont des structures de réserves, elles possèdent une paroi épaisse et contiennent principalement des lipides, elles peuvent être intracellulaire ou intercellulaire. Comme les spores, les vésicules sont des propagules.

B. Taxonomie et phylogénie des CMA

1. Evolution de la taxonomie et de la phylogénie des CMA

Jusqu'en 2001 les CMA n'étaient pas considérés comme un groupe monophylétique (Morton 2000), mais des analyses phylogénétiques basées sur le gène de l'ARNr de la petite sous unité (SSU) ont permis de démontrer que les CMA formaient un groupe monophylétique bien séparé des autres embranchements de champignons (Schüßler et al. 2001). Les CMA ont donc été placés dans leur propre embranchement fongique : les Glomeromycota (Schüßler et al. 2001) ; à cette époque les Ascomycota et les Basidiomycota (les Dikarya) étaient considérés comme les parents les plus proches de cet embranchement. Ce positionnement, proche de ces deux embranchements, a également été conforté par une analyse phylogénétique de six gènes (James et al. 2006), mais ensuite remis en question par Lee & Young (2009). Le travail de Lee & Young (2009), porte sur l'étude de séquences du génome mitochondrial de *Rhizophagus irregularis*, (anciennement appelé *Glomus intraradices*), et montre que l'ordre des Mortierellales (Zygomycota) seraient les parents les plus proches des CMA. En 2016, Spatofora et al. réalisent une analyse phylogénétique de différents champignons appartenant aux Zygomycota en y incluant les Glomeromycota, cette étude est basée sur l'analyse de plusieurs régions géniques. Spatofora et al. (2016) démontrent que les Zygomycota forment deux clades bien distincts ; ils réactualisent et délimitent l'embranchement des **Mucoromycota** (anciennement les Mucoromycota était synonyme de l'embranchement des Zygomycota) et érigent l'embranchement des **Zoopagomycota** (anciennement synonyme de l'embranchement des Zygomycota). Spatofora et al. (2016) placent les Glomeromycota comme un sous-embranchement des Mucoromycota (Glomeromycotina), mais ce placement semble prématuré. Toutefois, cette étude permet de confirmer que les parents génétiquement les plus proches des CMA sont les **Mucoromycota**.

Récemment plusieurs changements dans la taxonomie des Glomeromycota ont été réalisés. Par exemple, Oehl et al. (2008) publient une révision de la famille des Gigasporaceae

qu'ils divisent en trois nouvelles familles et en cinq genres, mais cette révision taxonomique est rejetée par Morton & Msiska (2010). Dans un premier temps, seul le genre *Racocetra* est accepté, puis les genres *Cetraspora* et *Dentiscutata*, sont finalement acceptés même si, d'un point de vue morphologique, les différences avec le genre *Scutellospora* sont minimales et ne permettent pas de définir de nouveaux genres. Néanmoins les nouvelles données moléculaires phylogénétiques supportent l'existence de ces genres (Schüßler & Walker 2010). Redecker et al. 2013 décident donc de retenir ces deux genres exclusivement parce qu'ils forment un clade divergent des autres Gigasporaceae.

Une révision de l'ordre des Glomérales a également été publiée en 2010 par Schüßler & Walker. Jusqu'à cette publication, il était impossible de placer phylogénétiquement l'espèce type du genre *Glomus* : *Glomus macrocarpum*, car aucune donnée moléculaire n'était disponible pour cette espèce. Schüßler & Walker (2010), réalisent une analyse phylogénétique basée sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous-unité ribosomique (SSU) de l'espèce *Glomus macrocarpum* ; grâce à cette analyse l'ordre des Glomérales est séparé en deux familles (comme proposé par Schwarzott et al. 2001), la famille des Glomeraceae (correspondant phylogénétiquement au groupe *Glomus* A ([GIGr] A)) et la famille des *Claroideoglomeraceae* (correspondant phylogénétiquement au groupe *Glomus* B ([GIGr] B)). L'étude de Schüßler & Walker (2010) décrit quatre genres appartenant à la famille des Glomeraceae : *Glomus*, *Funneliformis*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis* et un seul genre appartenant à la famille des *Claroideoglomeraceae*, le genre *Claroideoglomus*. Oehl et al. (2011a) définissent trois nouveaux genres dans la famille des Glomeraceae, mais cette révision taxonomique est en partie rejetée par Redecker et al. (2013) et seul un nouveau genre sur les trois est accepté : le genre *Septoglomus*. En 2014, Blaszkowski et al. érigent deux nouveaux genres appartenant au Glomeraceae : *Dominikia* et *Kamienskia* ; la création de ces deux nouveaux genres est appuyée par des caractères morphologiques et moléculaires.

En se basant sur des séquences de gènes ribosomiques Sawaki et al. (1998) et Redecker et al. (2000b) reconnaissent l'existence de cinq espèces divergeant des autres CMA ; ces espèces apparaissent comme des lignées basales par rapport aux autres espèces de CMA décrites. Trois de ces cinq espèces, *Acaulospora gerdemannii* N.C Schenck & T.H Nicolson, *A. trapei* R.N Ames & Linderman et *Glomus gerdemannii* S.L Rose, B.A Daniels & Trappe, sont des organismes dimorphiques, ils peuvent former deux types de spores (glomoides et acaulosporoides). Les deux autres espèces sont *Glomus brasilianum* Spain & Miranda et *Glomus occultum* Walker, ces deux espèces forment des spores glomoides (Morton & Redecker 2001, Spain et al. 2006). Les caractères morphologiques de ces 5

espèces ne permettent pas de les situer phylogénétiquement par rapport aux autres espèces de CMA. Morton & Redecker (2001), séquentent le gène codant pour la petite sous unité ribosomique de *G. brasillianum* et *G. occultum* et réalisent que ces espèces sont phylogénétiquement éloignées des autres espèces de CMA et sont les espèces les plus basales. En conséquence ils érigent le genre *Paraglomus* Morton & Redecker et la famille Paraglomeraceae Morton & Redecker appartenant à l'ordre des Paraglomerales Walker & Schüßler. Les trois autres espèces dimorphiques sont placées dans le genre *Archaeospora* Morton & Redecker et dans la famille Archaeosporaceae. Finalement grâce à l'analyse des gènes ribosomiques, la famille des Archeosporaceae est divisée en deux familles, la famille des Ambisporaceae Walker, Vestberg & Schüßler et la famille des Archaeosporaceae. Les espèces dimorphiques sont alors placées dans ces deux familles qui forment l'ordre des Archaeosporales Walker & Schüßler.

Une révision de l'ordre des Paraglomérales est réalisée en 2017 dans le cadre de ma thèse en collaboration avec le Pr. Janusz Blazkowski (Blazkowski et al. 2017), cette révision est liée à la découverte d'une nouvelle espèce de CMA, *Pervetustus simplex* Blazk., Chwat, Kozłowska, Crossay, Symanczik & Al-Yahya'ei dans différents lieux géographiques (Oman, Grèce, Tunisie et Nouvelle-Calédonie). Lors de cette étude, le genre *Innospora* Blazk., Kovacs, Chwat & Kozłowska est érigé et placé dans la famille des Paraglomeraceae ; le genre *Pervetustus* Blazk., Chwat, Kozłowska, Symanczik & Al-Yahya'ei et la famille Pervetustaceae Blazk., Chwat, Kozłowska, Symanczik & Al-Yahya'ei sont créés. Ces changements dans la taxonomie sont principalement basés sur l'analyse de séquences ribosomiques et sont présentés sous forme d'article scientifique dans le second chapitre.

2. Systématique et phylogénie actuelle

Actuellement l'embranchement des Glomeromycota compte quatre ordres : les Paraglomerales, les Archaeosporales (lignées basales), les Glomérales et les Diversisporales (lignée « récente »).

L'ordre des Diversisporales compte cinq familles, les Diversisporaceae avec trois genres bien acceptés (*Diversispora*, *Redeckera*, *Corymbiglomus*) et deux genres incertains (*Otospora*, *Tricispora*). La famille des Gigasporaceae comprend cinq genres bien acceptés (*Scutellospora*, *Gigaspora*, *Dentiscutata*, *Cetraspora*, *Racocetra*) et trois genres incertains (*Intraornatospora*, *Paradentiscutata*, *Bulbospora*). Pour les familles Acaulosporaceae,

Pacisporaceae et Sacculosporaceae, un seul genre représente chacune d'entre elles (*Acaulospora*, *Pacispora* et *Sacculospora*).

L'ordre des Glomérales compte deux familles : les Glomeraceae et les Claroideoglomeraceae. La famille des Glomeraceae comprend sept genres : *Glomus*, *Funneliformis*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Septoglomus*, *Dominikia*, *Kamienskia*. La famille des Claroideoglomeraceae comprend un seul genre : *Claroideoglomus*.

L'ordre des Archaeosporales compte trois familles, les Ambisporaceae avec le genre *Ambispora*, les Geosiphonaceae avec le genre *Geosiphon* et les Archaeosporaceae avec le genre *Archaeospora*.

L'ordre des Paraglomérales compte deux familles les Paraglomeraceae avec deux genres (*Paraglomus* et *Innospora*) et la famille des Pervetustaceae avec un seul genre (*Pervetustus*).

Tous ces changements, dans la taxonomie des Glomeromycètes, indiquent les difficultés rencontrées pour classer et caractériser ces organismes.

Aujourd'hui, il existe 291 espèces de CMA (Glomeromycota) listées sur www.amf-phylogeny.com, mais certaines d'entre elles, découvertes récemment, ne sont pas listées et beaucoup ne sont pas classées dans les bons genres ou sont répétées (ex : *Pacispora boliviana*, *Paraglomus bolivianum*). Il est donc nécessaire de clarifier la situation (Annexe 1).

C. Génétique des CMA

L'organisation génomique nucléaire des CMA est complexe. En effet, ces champignons contiennent plusieurs milliers de noyaux circulant librement dans les hyphes cénocytiques et forment des spores multinucléées (Marleau et al. 2011). Comme aucun stade de leur cycle de vie n'est réduit à un seul noyau (absence de méiose), ils ne sont pas sujets à un goulot d'étranglement génétique. Un grand polymorphisme dans les séquences de gènes codant pour l'ARN ribosomique a été rapporté (Sanders et al. 1995). En effet, les espèces asexuées sont connues pour avoir une grande variabilité au niveau de leur ARN ribosomique (Pawlowska, 2005). Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cette variabilité génétique. D'un côté, il a été proposé que les CMA seraient hétérocaryons, c'est-à-dire qu'une seule et même spore renfermerait des noyaux génétiquement différents (Kuhn et al. 2001 ; Hijri et al. 2004 ; Hijri & Sanders 2005 ; Corradi et al. 2007). D'un autre côté, il a été proposé que les CMA seraient homocaryons (une seule et même spore renfermerait des noyaux haploïdes génétiquement identiques), cependant au sein d'un seul et même noyau il

pourrait y avoir plusieurs variations d'un locus (Pawlowska et Taylor, 2004). D'autres études ont émis l'hypothèse que le maintien de la variabilité génétique des CMA serait assuré par les anses d'anastomose. Les anses d'anastomose fusionnent deux hyphes du mycélium d'isolat appartenant à la même espèce et permettent des échanges de noyaux et de cytoplasmes (Giovannetti et al. 1999 ; Giovannetti et al. 2001 ; Giovannetti et al. 2003 ; de la Providencia et al. 2005 ; Croll et al. 2009). Toutefois, il ne semble pas que ces anastomoses aient lieu chez tous les CMA (Purin et Morton 2011). Il semble qu'il existe un mécanisme de reconnaissance entre les hyphes d'un même isolat (compatibilité végétative), ce qui permettrait la mise en place d'anastomoses comme chez d'autres champignons (Pawlowska et Taylor, 2004).

Le séquençage du génome du champignon modèle *Rhizoglyphus irregularis* (DAOM197198) en 2008 a été un véritable défi (Martin et al. 2008). La première difficulté est liée au fait que les génomes de CMA ont une taille supérieure à la plupart des champignons, allant de 150 Mb à plus de 1 Gb selon les espèces (Hosny et al. 1998). La deuxième difficulté réside dans le fait qu'il faut une biomasse importante du CMA pur ; mais les CMA étant des biotrophes obligatoires, il faut pouvoir le cultiver en co-culture avec une plante hôte pour obtenir de la biomasse pure. Ces difficultés ont pu être surmontées en utilisant *Rhizoglyphus irregularis* DAOM 197198 pour le séquençage du premier génome, car son génome a une taille relativement faible (153 Mb) (Sędziewska et al. 2011) et il peut être propagé efficacement avec des cultures de racines *in vitro*. Comme les spores sont des structures asexuées remplies de plusieurs centaines de noyaux et que chaque noyau contenu dans une seule spore présente des variabilités génétiques, les CMA sont très difficiles à séquencer à partir des spores (Bécard & Pfeffer 1993 ; Kuhn et al. 2001). Cette organisation nucléaire limite les stratégies de séquençage et rend difficile voire impossible d'utiliser les procédures d'assemblages du génome. Grâce au développement des nouvelles générations de technologies de séquençage, deux études indépendantes ont publié les séquences génomiques de *R. irregularis* DAOM 197198 (Tisserant et al. 2013 ; Lin et al. 2014). Le génome a été estimé à 153 Mb avec une fréquence élevée d'éléments transposables (36 % du génome). En séquençant des noyaux individuels, Lin et al. (2014) ont montré que les régions ribosomiques étaient très variables au sein de chaque noyau. De plus, le taux de polymorphisme mononucléotidique (SNP) trouvé chez *R. irregularis* était similaire à celui d'autres génomes de champignons mycorrhiziens homocaryons. L'analyse des séquences génomiques de différentes souches de *R. irregularis* a récemment confirmé le faible taux de SNP (Ropars et al. 2016) comparé aux champignons hétérocaryons. Un résultat similaire a également été trouvé pour les gènes d'une autre espèce de CMA, *Gigaspora rosea* (Tang et al. 2016). Des

analyses génétiques indiquent que les CMA présentent les caractéristiques d'un génome classique, c'est-à-dire un génome haploïde et homocaryon différent pour chaque souche (Tisserant et al. 2013 ; Lin et al. 2014).

Les CMA sont considérés depuis longtemps comme asexués car aucun cycle sexuel n'a été observé au niveau cellulaire et morphologique. Cependant des publications récentes ont révélé que des gènes impliqués dans la méiose et la sexualité sont présents dans plusieurs CMA, suggérant qu'il existe un cycle sexuel cryptique (Riley & Corradi, 2013 ; Riley et al. 2014). De plus, la publication récente sur les données génomiques de 5 souches de *R. irregularis* (Ropars et al. 2016) a révélé que 2 des 5 souches étudiées posséderaient chacune deux noyaux haploïdes différents dans leurs mycéliums et seraient donc des dicaryons. Ces auteurs ont révélé la présence d'un locus du type sexuel (MAT) chez *R. irregularis* ; ce locus semble similaire aux locus trouvés chez les basidiomycètes ayant une reproduction sexuée hétérothalliques bipolaire (deux types de thalles). Ce locus semble être le seul à différer entre les souches de dicaryons. La présence d'allèles liés à ce présumé locus sexuel (MAT) permet d'émettre l'hypothèse que les souches de dicaryons proviendraient d'une plasmogamie entre deux souches homocaryons (Ropars et al. 2016). En effet, la plasmogamie correspond à la fusion des cytoplasmes, elle précède la fusion des noyaux (caryogamie) et conduit à la constitution de couples de noyaux haploïdes ou dicaryons. Ces résultats suggèrent l'existence d'un cycle sexué chez les CMA. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats et pour comprendre la fonction moléculaire de ce présumé locus sexuel (MAT). Pour prouver l'existence d'une reproduction sexuée, des expérimentations doivent être mises en place afin d'évaluer si deux souches de CMA homocaryotiques peuvent être croisées et former une souche dicaryotique qui donnera ensuite une descendance homocaryotique. En attendant des preuves supplémentaires, le débat qui anime les scientifiques pour savoir si les CMA sont homocaryons ou hétérocaryons reste ouvert. Le génome mitochondrial de *R. irregularis* a également été séquencé en 2009 (Lee & Young, 2009). Contrairement aux génomes nucléaires, un certain nombre d'études montre que les génomes mitochondriaux sont homoplasmiques (Raab et al. 2005 ; Beaudet et al. 2013). Le maintien de cette homoplasmie serait dû à une ségrégation active ou seules les mitochondries dont l'ADN est identique seraient transmises à la descendance (Lee & Young, 2009).

III. Quelques techniques utilisées pour l'étude des CMA

A. Techniques d'isolement et de culture des CMA

1. Techniques d'isolement des CMA

La technique la plus utilisée pour isoler une espèce de CMA est le « piégeage » des spores de CMA présentes dans un sol par la culture d'une plante hôte. Cette technique consiste à multiplier des CMA en pot, à partir de spores, de morceaux de racines ou de sols récoltés sur le terrain dans la rhizosphère d'une plante choisie au préalable en fonction du sujet d'étude. Les spores sont isolées du sol par tamisage humide puis récupérées à la suite d'une centrifugation sur un gradient de densité de saccharose, selon la méthode décrite par Gerdemann & Nicolson (1963). Cette méthode permet d'extraire les spores de CMA du sol, d'en évaluer la richesse et d'identifier morphologiquement les différents taxons présents dans l'échantillon. Les spores sont observées dans une suspension d'eau sous un stéréomicroscope et écrasées entre lames et lamelles pour observation des structures pariétales au microscope.

Des pots contenant un substrat autoclavé (exempt de microorganismes) sont ensuite préparés, il est conseillé d'utiliser des pots de faibles contenances (<500 mL) et le même substrat que celui récolté sur le terrain (autoclavé). En effet le confinement de l'*inoculum* et l'utilisation d'un substrat adapté aux CMA permet d'augmenter les chances de réussite de la culture. Le substrat contenant les racines et du sol non autoclavé (10 à 50 g) récolté sur le terrain est déposé à la surface du substrat autoclavé, cet *inoculum* est ensuite recouvert d'une fine couche de substrat autoclavé (0,5 à 1 cm). Une plante hôte est choisie en fonction de son pouvoir mycorhizogène (*Allium porrum*, *Sorghum vulgare*, *Thephrosia* sp., *Plantago lanceolata*...), les graines de cette plante hôte sont désinfectées et placées sur le substrat humide. Plusieurs réplicas doivent être mis en place afin de maximiser le taux de réussite de la culture. Les cultures pièges doivent être maintenues dans une chambre de culture propre. Au bout de 2 mois elles doivent être repotées dans des pots plus volumineux (1 L). Au total 4 à 8 mois sont nécessaires pour la multiplication des CMA. Une fois le cycle de culture terminé, afin d'observer les spores de CMA qui se sont multipliées, une partie du sol de la culture piège est tamisée puis centrifugée sur un gradient de saccharose (Gerdemann & Nicolson 1963). Chaque morphotype peut alors être isolé et observé par microscopie optique, les spores présentant les mêmes caractéristiques morphologiques sont triées et rassemblées avant d'être ré-inoculées et cultivées de différentes manières.

Les spores du terrain peuvent également être triées directement et cultivées *in vitro* ou *in vivo* mais les chances de réussite sont diminuées et l'effort de travail fortement

augmenté. En effet peu de CMA semblent être cultivables en condition contrôlées (*in vivo* ; Ohsowski et al. 2014) et encore moins en culture *in vitro* (Ijdo et al. 2011).

2. Techniques de cultures des CMA

Une fois isolées les spores de chaque espèce de CMA doivent être cultivées en culture monospécifique afin de les identifier de manière sûre et de pouvoir étudier les fonctions de chaque isolat sur les plantes. Principalement deux techniques de cultures sont pratiquées par les laboratoires de recherche : la culture *in vivo* et la culture *in vitro*.

La culture *in vivo*

Pour réaliser une culture monospécifique *in vivo* (après une culture piège), les spores isolées de chaque espèce (50 à 200 spores par pot) doivent être nettoyées (différents rinçages, ultrasons) pour décoller les différentes particules de sol de leurs surfaces (Declerck et al. 1998). Ensuite les spores peuvent être désinfectées (Bécard et al. 1988) ou non. La désinfection peut être réalisée afin de stériliser la surface des spores, pour limiter le développement de microorganismes liés à leurs surfaces. Encore plus que pour la culture piège, il est conseillé d'utiliser des pots de faibles contenances (50 mL) avec un substrat autoclavé similaire au substrat originel des CMA isolés. L'inoculation doit se faire directement par dépôt des spores de CMA sur la racine de la plantule (âgée de 1 à 2 semaines pour le sorgho), afin d'augmenter les chances de réussite de la culture monospécifique. En effet, comme vu précédemment, la symbiose est un dialogue moléculaire entre la plante et le champignon ; pour son établissement, il faut que le champignon perçoive les strigolactones exsudés par les racines de la plante. Plusieurs réplicas doivent être mis en place afin de maximiser le taux de réussite de la culture monospécifique. La culture monospécifique doit être maintenue dans une chambre de culture respectant des mesures strictes d'hygiène. Des précautions doivent être prises afin d'éviter les contaminations croisées, au bout de 1 mois elle doit être repotée dans un pot plus volumineux (1 L). La culture monospécifique peut être maintenue dans des sunbag (Walker & Vestberg 1994). Ces « sacs » possèdent un filtre de 0,2 µm permettant les échanges gazeux ; une fois fermés aucun microorganisme ne peut entrer dans le sunbag. Si toutes les précautions de stérilité sont respectées en manipulant sous une hôte à flux laminaire (désinfection des spores, autoclavage du substrat, du pot, du sunbag, germination en condition aseptique de la plante hôte) ce système peut être qualifié de système axénique (Walker & Vestberg 1994). La plante hôte la plus adaptée à ce système semble être

Plantago lanceolata car elle nécessite peu de lumière (Walker & Vestberg 1994). Les sunbag sont ensuite placés dans une chambre de culture propre ; au bout de 1 mois les cultures doivent être rempotées dans un pot plus volumineux (1 L).

Au total 4 à 8 mois sont nécessaires pour la multiplication du CMA. Ce système est un système de choix pour une production d'*inoculum* axénique. Des cultures mono-sporales peuvent également être réalisées grâce à cette technique.

La culture monospécifique en pot permet de multiplier la plupart des espèces de CMA isolées et multipliées en culture piège. Les spores produites peuvent être repiqués pour obtenir une nouvelle génération de spores en pot ce qui n'est pas toujours le cas en culture *in vitro*. Les cultures *in vivo* de collection telles que l'INVAM ou l'IBG possèdent un grand nombre d'espèces cultivées (50 à 70 espèces).

La culture *in vitro*

La culture *in vitro* peut être réalisée à partir de différents types de propagules de CMA telles que des spores (Bécard & Fortin. 1988), des vésicules ou des fragments de racines mycorhizées comportant des vésicules (Declerck et al. 1998). Tout comme pour la culture axénique *in vivo* les propagules doivent être désinfectées (Declerck et al. 1998) sous hotte à flux laminaire. Deux milieux de culture peuvent être utilisés, le milieu M (Bécard et Fortin 1988), et le milieu MSR (Declerck et al. 1998). La culture de CMA est réalisée en milieu solide (gélifié). Comme les CMA ne peuvent être cultivés sans une plante hôte, la culture *in vitro* est réalisée sur des racines génétiquement modifiées par *Agrobacterium rhizogenes* ou sur des explants racinaires non modifiés. Les propagules de CMA sont désinfectées puis placées sur le milieu de culture pendant 1 à 3 semaines (temps de la germination). La boîte de Pétri est alors scellée avec du parafilm et incubée à 27°C dans le noir en position inversée, pour favoriser la germination, du CO₂ (2%) peut être apporté (Bécard et al. 1992). Les vésicules et les fragments racinaires germent plus rapidement que les spores (Declerck et al. 1998). Une fois que la croissance de l'hyphe du champignon a débuté, la propagule est transférée dans une nouvelle boîte de Pétri contenant du milieu de culture et une racine est placée proche de cette dernière afin d'initier la symbiose. La co-culture entre l'organe racinaire et le CMA peut alors débuter, la boîte de pétri est scellée et incubée à 27°C dans le noir en position inversée. Des cultures mono-sporales peuvent également être réalisées grâce à cette technique.

Une technique utilisant des boîtes de Pétri bi-compartmentées a été développée par St-Arnaud et al. (1996). Elle permet de cultiver les racines et le CMA dans un compartiment

de la boîte de Pétri, contenant du milieu MSR ou M. Le deuxième compartiment de la boîte de Pétri est colonisé uniquement par le CMA, il contient du milieu MSR (ou M) sans saccharose ni vitamines ce qui entraîne une augmentation de la sporulation et permet d'obtenir une biomasse pure du CMA en culture.

La culture *in vitro* présente plusieurs avantages tels que la fiabilité des cultures (pas de contaminants), aucune contamination croisée avec d'autre CMA, pas de perturbation de la coexistence entre la racine et le CMA ce qui facilite les observations morphologiques. Les conditions de culture étant normalisées cela facilite l'étude individuelle de facteurs environnementaux. Cette technique permet également une économie de temps et d'espace (culture en incubateur) et un contrôle qualité facilité, primordial pour une production et une commercialisation à grande échelle. Comme nous l'avons vu précédemment cette technique a permis de fournir le matériel biologique nécessaire au séquençage du premier génome de CMA.

Cette technique présente également plusieurs inconvénients. En effet seulement 18 espèces ont pu être cultivées en culture *in vitro* depuis 40 ans. Les espèces adaptées à ce type de culture sont principalement des espèces du genre *Rhizophagus*. Certaines espèces sporulent peu ou pas et perdent leurs caractéristiques physiologiques après plusieurs repiquages. Cette technique demande beaucoup de qualification et de précaution pour éviter les contaminations.

B. Techniques utilisées pour l'identification taxonomique et l'étude de la diversité des CMA

L'identification morphologique et la description précise d'une espèce de CMA peut être réalisée sans ambiguïté seulement si elle est cultivée en conditions contrôlées. En effet, les spores issues du terrain peuvent être dégradées et conduire à une mauvaise identification morphologique (Redecker et al. 2013). L'identification moléculaire repose sur le séquençage d'une partie de l'ADNr de la spore, les spores issues du terrain ou de cultures pièges peuvent être contaminées par d'autres organismes ou CMA, la fiabilité des séquences obtenues n'est donc pas certaine (Redecker et al. 2013). Pour identifier une nouvelle espèce, il faut préalablement la cultiver en culture monospécifique afin d'obtenir une stabilité de l'isolat qui permet d'obtenir une identification moléculaire et morphologique non ambiguë.

L'étude de la diversité quant à elle consiste à identifier le nombre de taxa (richesse taxonomique) et à quantifier l'abondance de ces taxa au sein de la communauté (Konopka, 2009).

1. Identification morphologique des CMA

L'identification morphologique des CMA est basée sur l'apparence générale de la spore (taille, couleur), sur les structures pariétales de la spore (nombre, épaisseur, nature de chaque paroi), sur la présence de caractéristiques propres à certains taxons (bouclier de germination, cellule sporogène bulbeuse : Gigasporaceae) et sur le mode de formation (ontogénie) de la spore (Abbott 1982 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Morton & Benny 1990 ; Morton & Bentivenga 1994 ; Phillips & Hayman 1970). L'étude de ces caractères morphologiques a permis de dresser les premières classifications (Gerdemann & Trappe 1974 ; Morton & Benny 1990 ; Thaxter 1922), et d'évaluer la diversité des AMF dans différents milieux. Certains caractères, tels que la couleur de la spore et son mode de formation, semblent aléatoires et peu informatifs d'un point de vue taxonomique (Blaszkowski et al. 2015). Par contre, d'autres caractères morphologiques peuvent être retenus pour l'identification des spores de CMA.

Les spores acaulosporoïdes se développent pour la plupart à partir du côté de l'hyphe portant le saccule et sont retrouvées chez les *Acaulospora* spp. ; elles sont constituées de trois parois : une paroi incolore ou colorée qui forme la surface de la spore (appelée paroi 1 de la spore) et deux parois internes incolores (paroi de la spore 2 et 3). Chacune de ces trois parois est composée de 2 ou 3 couches. Les 3 parois ne sont jamais en contact direct (Stürmer & Morton 1999 ; Blaszkowski 2012). La structure de la première couche de la première paroi est souvent mucilagineuse et souple, la deuxième couche est souvent lisse ou laminée et peut être ornementée, la troisième couche est souvent lisse et fine. La deuxième paroi de la spore est toujours lisse et la première couche de la troisième paroi est souvent granuleuse. Chez beaucoup d'*Acaulospora* spp. la deuxième couche ou la troisième couche de la troisième paroi (la plus interne) peuvent se colorer au réactif de Melzer (Blaszkowski et al. 2015). Ces critères morphologiques aujourd'hui doivent être accompagnés d'une caractérisation moléculaire pour permettre une identification non ambiguë (Kaonongbua et al. 2010 ; Oehl et al. 2012).

Les Gigasporacées forment des spores gigasporoïdes (Oehl et al. 2011b). Les spores gigasporoïdes ont la particularité de se développer à l'extrémité de l'hyphe sporogène qui

s'élargit pour former la "cellule sporogène". Si les spores gigasporoïdes ont une seule paroi composée de deux couches et possèdent des excroissances germinatives qui émergent de la surface de la couche interne, ces spores appartiennent à des espèces du genre *Gigaspora*. Si les spores Gigasporoïdes forment des spores qui possèdent des boucliers de germination sur la paroi la plus interne (paroi germinative) et sont formées de 2-4 parois elles appartiennent aux genres *Cetraspora*, *Dentiscutata*, *Racocetra* et *Scutellospora*.

Beaucoup de difficultés sont rencontrées pour l'identification et la classification des CMA qui produisent des spores glomoïdes. Ces spores se développent à l'apex de l'hyphe sporogène comme chez l'espèce *Glomus macrocarpum* Tul. & C. Tul., qui est l'espèce type du genre *Glomus* Tul. & C. Tul. (Schüßler & Walker 2010). La plupart des Gloméromycètes produisent des spores glomoïdes et la plupart des CMA non décrits développent également ce type de spores (Krüger et al. 2009). Les spores glomoïdes ont une structure simple avec une paroi avec 2 à 5 couches, certaines couches sont difficiles à observer et peuvent disparaître en fonction du stade de développement du champignon. Les parois de l'hyphe suspenseur sont une continuité des parois de la spore et sont donc composées des mêmes parois que la spore (Błaszowski 2012). Oehl et al. (2011b) rapportent que certains critères morphologiques tels que la présence d'un septum refermant le pore de l'hyphe suspenseur à la base de la spore ou encore la façon dont la germination de la spore se produit sont des critères étroitement corrélés à la taxonomie obtenue grâce à l'analyse moléculaire. Une étude de Błaszowski et al. (2014) a confirmé que les critères morphologiques cités ci-dessus sont en accord avec les analyses phylogénétiques de plusieurs *Glomus* spp. *sensu lato* mais cette étude indique également que l'identification basée uniquement sur la morphologie dans certains cas peut être difficile voire impossible. Comme, par exemple, pour les CMA produisant des spores de petites tailles et incolores. Dans ce cas une analyse moléculaire de l'ARNr est nécessaire.

2. Les méthodes basées sur la morphologie pour l'étude de la diversité des CMA

Deux méthodes de microscopie sont principalement utilisées pour identifier et déterminer l'abondance des différents taxa dans le sol et dans la plante.

Dans le cas d'une étude sur le terrain ou en condition expérimentale la technique de dénombrement de spores dans une quantité de sol connue permet une estimation de l'abondance en CMA dans le sol. Cette technique consiste simplement à effectuer des prélèvements de sol de quantité connue et extraire les spores du sol (Gerdemann & Nicolson 1963) et les compter sous un stéréomicroscope puis les identifier sous un microscope. Le

volume d'extraction de spore analysée est ensuite rapporté à la quantité de spore par gramme de sol sec. Sur le terrain cette technique est très approximative, l'identification des spores est bien souvent impossible. Plusieurs raisons peuvent expliquer cela ; beaucoup de spores peuvent être parasitées par d'autres organismes (Iffis et al. 2014) ou dégradées (Redecker et al. 2013). Dans ces deux cas leur morphologie ne permet plus de les identifier. Parfois, seulement une spore d'une espèce peut être présente dans une extraction de spores d'un échantillon de sol, une identification morphologique à partir d'une seule spore est impossible. En effet, pour réaliser une identification non ambiguë il faut disposer d'une centaine de spores au minimum (Blaszkowski et al. 2012 ; 2015) c'est pour cela qu'il est nécessaire de réaliser des cultures monospécifiques pour décrire de nouveaux taxons. De plus, les spores sont des formes de résistance qui permettent la survie du CMA dans le sol pendant plusieurs années. Les spores des espèces présentes dans un échantillon de sol ne sont pas forcément physiologiquement actives (dormance des spores) dans la symbiose mycorhizienne (Clapp et al. 1995 ; Renker et al. 2005). Il a également été montré que la sporulation dans le sol peut varier en fonction des saisons (Bever et al. 2003) et que certaines espèces de CMA ne sporulent pas beaucoup alors que d'autres ne sporulent probablement pas du tout.

Cependant, dans le cas d'une étude en conditions contrôlées, cette technique peut être précise et permet facilement de déterminer le nombre d'espèces ayant sporulé. Dans une expérience où des spores de différentes espèces connues de CMA sont inoculées dans un pot, il est très facile de vérifier la présence des spores de chacune de ces espèces après un cycle de culture en conditions contrôlées. En effet les espèces utilisées dans des expériences sont des espèces qui sporulent. L'apparence de ces espèces est bien connue par le manipulateur et l'identité de chaque souche est connue, il est alors facile de dénombrer les spores et de les identifier. Dans ces conditions, cette méthode est qualitative et quantitative mais le nombre de spores présentes dans le sol ne reflète pas le taux de colonisation de la plante par les CMA. Certaines études rapportent une différence des communautés de CMA dans le sol et dans les racines au sein d'un même échantillon (Börstler et al. 2006 ; Hempel et al. 2007) alors que, d'autres études indiquent une similarité des communautés de CMA dans les racines et dans le sol d'un même échantillon (Borriello et al. 2012).

Une autre méthode basée sur la coloration des racines de la plante permet de quantifier le taux de colonisation de la plante par le CMA. En effet cette méthode permet de détecter la présence des structures (hyphes intraracinaires, vésicules, pelotons, arbuscules) intraracinaires du CMA. Cette méthode nécessite de colorer les racines de la plante, les structures intraracinaires des CMA ne sont pas visibles sans coloration. Plusieurs colorants (bleu

Trypan, noir de chlorazole, fuchsine, encre et vinaigre) permettent de révéler les structures des CMA afin d'estimer le taux et la fréquence de mycorhization du système racinaire de la plante (Trouvelot et al. 1986 ; Vierheilig et al. 1998). En revanche cette méthode est purement quantitative car elle ne permet pas de mesurer l'abondance de différents taxa sur un système racinaire. La morphologie des structures intra racinaires d'une espèce de CMA peut varier en fonction des conditions environnementales, des espèces de plantes colonisées et du type de substrat utilisé. Les structures intraracinaires ont donc une valeur taxonomique très limitée (Merryweather & Fitter 1998 ; Van Tuinen et al. 1998).

3. Les méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires sont basées sur l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de fragments d'ADN. La première étude de détection des CMA par PCR a été réalisée par Simon et al. 1992. Cette première étude a permis d'obtenir des séquences d'une partie du gène nucléaire codant pour la petite sous unité ribosomique de l'ADNr (SSU) de plusieurs espèces de CMA, ensuite des amorces spécifiques aux CMA ont pu être développées afin de détecter et d'identifier les CMA dans les racines des plantes. Les échantillons de racines de plantes analysées par Simon et al. 1992 provenaient de plantes fortement mycorhizées en conditions contrôlées. Clapp et al. 1995 utilisent les amorces développées par Simon et al. 1992 sur des racines prélevées sur le terrain mais l'amplification ne fonctionne pas, ils concluent que cet échec est dû à une quantité d'ADN de CMA trop faible dans les racines. Clapp et al. 1995 utilisent alors la technique de PCR nichée, cette technique consiste à réaliser deux PCR successives nécessitant deux paires d'amorces, la seconde étant interne à la première et plus spécifique. Cette technique fonctionne et sera ensuite la technique la plus utilisée jusqu'à aujourd'hui pour la caractérisation des spores de CMA et pour la détection des CMA dans les racines. Différents types d'amorces ciblant différentes régions des gènes ribosomiques sont ensuite développées, les premières amorces ciblaient le gène codant pour la petite sous unité ribosomique (SSU) de l'ADNr (Simon et al. 1992 ; Helgason et al. 1998). Puis des amorces ciblant le gène codant pour la grande sous unité ribosomique de l'ADNr ont été développées (van Tuinen et al. 1998 ; Kjølner & Rosendahl 2000).

En phylogénie les séquences issues de l'amplification de l'ADN ribosomique (ADNr ; SSU-LSU) sont les plus utilisées pour la caractérisation et la reconnaissance des différentes espèces de CMA. Stockinger inclut ensuite les espaceurs internes transcrits (ITS) de l'ADNr

nucléaire, il est ensuite proposé que cette région soit utilisée comme code barre pour l'identification des champignons (Schoch et al. 2012). Cependant, pour les CMA, une plus longue séquence est nécessaire pour différencier des espèces proches (Kruger et al. 2012). Stockinger et al. (2010) et Kruger et al. (2012) ont conclu, que dans la plupart des cas, l'analyse des gènes de l'ADNr codants pour la petite sous unité ribosomique (SSU) seule (500-800pb) ne permettait pas d'arriver au niveau de l'espèce et ont démontré que la meilleure région pour arriver à la définition d'espèce comprenait une partie de la séquence des gènes de l'ADNr nucléaires codants pour la petite sous unité ribosomique (SSU) ainsi que pour la grande sous unité ribosomique (LSU) incluant les ITS (1 et 2) et le 5.8S de l'ADNr nucléaire, cette région est appelé SSU-ITS-LSU. Récemment des amorces ont été développées, chaque amorce est composée d'un mélange de 2 à cinq oligonucléotides et permet d'amplifier la plupart des CMA et d'atteindre une résolution spécifique (Krüger et al. 2009). Ces amorces amplifient par PCR nichée, la séquence SSU-ITS-LSU de l'ADNr, cette séquence fait approximativement 1.500 pb. De nombreuses souches de CMA ont été séquencées avec ces amorces et une base de données importante de séquences SSU-ITS-LSU est maintenant disponible, en conséquence ce marqueur est une référence (étiquette) pour la taxonomie des Glomeromycota (Krüger et al. 2012). La combinaison d'une description basée sur les caractères morphologiques de la spore accompagnée d'une analyse phylogénétique de sa séquence SSU-ITS-LSU permet d'établir l'identité ou la nouveauté d'une espèce de CMA sans ambiguïté (Blaszkowski et al. 2015). Cette région est également utilisée pour des études de la diversité, mais la longueur de la séquence (1.500 pb) ne permet pas d'utiliser la méthode de séquençage à haut débit. Un second code barre pour les champignons avait également été proposé par Schoch et al. 2012. Ce code barre cible un gène codant pour la grande sous unités de l'ARN polymérase II : RPB1. Ce gène présente plusieurs avantages, en général il se trouve en simple copie dans le génome ce qui a pour conséquence de diminuer le nombre de variant et il ne présente pas de polymorphisme chez les CMA, ce qui facilite la différenciation d'espèces proches (Redecker & Raab 2006). Cependant, le nombre de séquences de références reste insuffisant pour ce gène. Récemment Stockinger et al. 2014 ont utilisé des amorces spécifiques aux Glomeromycota et ont utilisé la méthode de séquençage à haut débit (pyroséquencage) pour amplifier une partie de la grande sous unité du gène RPB1 (700pb) de CMA dans les spores et dans les racines, pratiquement toutes les espèces analysées on put être identifiées. Borriello et al. 2014 ont également développé un marqueur sur le gène mitochondrial codant pour la Cytochrome c Oxidase I (*COI*), ce marqueur semble être

efficace pour distinguer des espèces proches de CMA mais le nombre de séquence reste également insuffisant.

Les produits PCR sont généralement séquencés par la méthode de Sanger (Sanger et al. 1977) qui nécessite, le plus souvent, un clonage préalable des produits PCR, car plusieurs espèces et isolats peuvent être présents dans les échantillons analysés. Cette méthode permet l'obtention de séquences double brin fiable d'environ 700 pb. Cependant, cette méthode de séquençage est coûteuse et chronophage surtout s'il s'agit d'analyser les communautés de CMA dans un écosystème. De plus, certaines amorces ne permettent pas d'amplifier toutes les espèces de CMA (Redecker et al. 2003 ; observation personnelle) et peuvent amplifier d'autres groupes de champignons (Douhan et al. 2005 ; observation personnelle).

Des méthodes de séquençage à haut débit sont maintenant disponibles : la méthode de pyroséquençage (Ronaghi et al. 1996 ; Gharizadeh et al. 2004), cette méthode est périmée et abandonnée par la compagnie Roche et a été remplacé principalement par le séquençage Illumina (Schmidt et al. 2012) et d'autres approches concurrentes (Ion Torrent, PacBio). Ces méthodes permettent de ne pas effectuer manuellement le clonage et de passer de nombreux échantillons en même temps par l'ajout de « étiquettes nucléotidiques » permettant de différencier les échantillons lors de l'analyse des résultats (Ronaghi 2001 ; Schmidt et al. 2012). Ces méthodes permettent un gain de temps considérable mais la longueur des séquences obtenues est limitée (250/300 pb).

D'autres techniques ont également été développées pour ne pas séquencer les produits PCR et limiter le cout des analyses. Ces méthodes sont appelées « empreintes moléculaires ». La première de ces méthodes est la méthode d'électrophorèse sur gel avec gradient dénaturant (DGGE) (Marschner et al. 2001). Les produits PCR (séquences ADN) sont de même longueur (donc amplifiés avec les mêmes amorces), mais comportent des séquences différentes. Ces séquences peuvent être séparées sur un gel de polyacrylamide qui contient un gradient de concentration croissante d'un agent dénaturant (urée). Cette séparation dépend de la différence de mobilité des fragments d'ADN provoquée par le fait que les différentes séquences nucléotidiques ont des points de fusion différents (lié à leurs compositions en nucléotide). Les profils de bandes DGGE peuvent fournir une analyse de la diversité microbienne grâce à la séparation des séquences et à leurs dénombrements. Les différentes bandes peuvent également être excisées des gels, réamplifiées par PCR et séquencées afin d'éviter le clonage. La technique de l'électrophorèse sur gel à gradient de température (TGGE) (Cornejo et al. 2004), utilise le même principe que la DGGE mais au lieu d'utiliser un agent dénaturant pour séparer les séquences, les séquences sont séparées par un gradient de

température. La technique de SSCP (polymorphisme de conformation des acides nucléiques simples brins) permet l'analyse, par électrophorèse, des structures des acides nucléiques simple brin. La séparation des ADN est réalisée dans un gel de polyacrylamide grâce aux variations de mobilité dues aux structures secondaires adoptées par les différentes séquences d'ADN. Cette technique permet de séparer les séquences issues d'un produit PCR et permet de différencier différentes espèces de CMA (Sanchez-Castro et al. 2012). La technique du polymorphisme de longueur du fragment de restriction terminal (T-RFLP) repose sur la comparaison des tailles des fragments de restriction obtenus par digestion enzymatique de produits PCR fluorescents. La coupure par enzymes de restriction va libérer des fragments de tailles variables selon les espèces présentes dans le mélange analysée. L'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction terminal est une technique d'empreintes digitales à haut débit utilisée pour étudier les changements dans la structure et la composition des communautés microbiennes. Dans le cadre de l'étude de la diversité des CMA, cette technique est principalement utilisée pour identifier une espèce en comparant son profil T-RFLP à une base de données (Vandenkoornhuysen et al. 2003 ; Johnson et al. 2004 ; Mummey & Rillig 2006 ; Lekberg et al. 2007).

Toutes ces méthodes moléculaires permettent de détecter et de caractériser les CMA dans les racines des plantes hôtes ou dans le sol (Farmer et al. 2007 ; Pellegrino et al. 2012 ; Thonar et al. 2012 ; Werner & Kiers 2015). La méthode de séquençage à haut débit offre potentiellement la technique la plus puissante et la plus sensible pour contrôler la présence d'une espèce de CMA inoculée sur le terrain, tant temporellement que spatialement (Rodriguez & Sanders 2015). Enfin, le séquençage à haut débit permet également de comprendre comment les CMA introduits interagissent et coexistent avec les communautés locales de CMA (Rodriguez & Sanders 2015). Les méthodes moléculaires restent néanmoins très coûteuses et demandent des connaissances et des qualifications importantes. Il y a une réelle nécessité de développer de nouvelles méthodes d'identification des CMA.

Les marqueurs moléculaires décrits précédemment (SSU, LSU, SSU-ITS-LSU ; RPB1 ; *COI*) ne permettent pas systématiquement de différencier certaines espèces de CMA (*Gigaspora* spp.) et ils ne permettent pas non plus une différenciation intraspécifique (Stockinger et al. 2014).

Un des principaux défis auquel la recherche sur les CMA est confrontée est de pouvoir développer des marqueurs moléculaires permettant de différencier différents isolats d'une même espèce. Cependant l'observation d'une grande variation génétique intra isolat complique les recherches. La présence de ce polymorphisme nucléaire combinée à un manque

de données génomiques dans différents groupes phylogénétiques de ces champignons complique le développement de marqueurs moléculaires pour l'identification intra-spécifique des CMA. Une approche prometteuse est le développement de marqueurs moléculaires mitochondriaux pour identifier des isolats d'une même espèce de CMA. Contrairement aux génomes nucléaires, un certain nombre d'études montre que les génomes mitochondriaux sont homoplasmiques (Raab et al. 2005 ; Beaudet et al. 2013). Un très faible niveau de variation génétique intra-isolat a été rapporté pour le gène mitochondrial *rnl* qui code pour la grande sous unité ribosomale mitochondriale (mtLSU) (Raab et al. 2005 ; Börstler et al. 2008 ; Beaudet et al. 2013). Une méthode d'amplification du mtLSU par PCR nichée a été développée grâce à différentes amorces (Börstler et al. 2008). Douze isolats de *R. irregularis* ont pu être différenciés et identifiés sur les 16 testés. Ce marqueur moléculaire présente un polymorphisme de séquences au sein de l'espèce *R. irregularis*, suffisant pour différencier des isolats et pour étudier la structure et la répartition de ces populations sur le terrain (Börstler et al. 2010). Des amorces spécifiques à la souche *R. irregularis* DAOM-197198 ciblant une partie du mtLSU ont également été développées pour identifier la présence de cet isolat sur le terrain et dans des *inocula* commerciaux (Badri et al. 2016). Ces techniques d'identification au niveau intraspécifique nécessitent de développer des amorces spécifiques à chaque isolat et restent très coûteuses et laborieuses. Il y a donc une réelle nécessité de développer un marqueur moléculaire commun permettant de différencier les espèces et les isolats de CMA et/ou développer une technique simple permettant d'obtenir une empreinte unique pour chaque isolat.

Les méthodes moléculaires décrites ci-dessus ont également été décrites comme permettant la quantification des CMA (abondance des différents taxons dans les racines d'une plante ou dans un échantillon de sol). La méthode la plus utilisée est la méthode de PCR quantitative en temps réel. Cette méthode a été validée seulement en condition expérimentale, néanmoins elle ne reflète en aucun cas une biomasse ou l'activité physiologique des CMA dans le sol et dans les racines (Gamper et al. 2008). Les marqueurs mitochondriaux (mtDNA *rnl* gene) ont été utilisés pour la quantification des spores d'*inocula* commerciaux de *R. irregularis* DAOM 197198 (Badri et al. 2016). Les auteurs avancent un nombre de génome mitochondriaux par spore en moyenne de 3172 ± 745 (écart type). Le nombre de mitochondries est donc extrêmement variable entre les spores d'un même isolat. Ayant travaillé sur le sujet avec ces auteurs, mes résultats indiquaient une différence avec ceux publiés en 2016, puisque en 2013 j'évaluais le nombre de mitochondries par spore de *R. irregularis* DAOM197198 en moyenne à 1521 ± 962 (écart type). Les résultats que j'avais obtenus indiquaient également que

le nombre de génomes mitochondriaux par spore est très variable au niveau intra isolats, inter isolat et interspécifique pour des isolats cultivés dans les mêmes conditions environnementales (culture *in vitro*). La variabilité du nombre de mitochondries par spore complique donc la création d'un marqueur spécifique permettant de quantifier les spores de Glomeromycota. En effet la quantification étant basée sur le nombre de génomes mitochondriaux par spore, compte tenu de la variabilité observée à ce niveau, il est difficile de développer un marqueur permettant de quantifier le nombre de spores d'un isolat, dans des biofertilisants et encore plus dans les sols agricoles, étant donné qu'ils ne possèdent pas le même nombre de mitochondries par spore et que le nombre de mitochondries est variable en fonction du stade de développement de la spore et des conditions environnementales. L'utilisation des données quantitatives présente de nombreux biais et les résultats doivent être interprétés en conséquence.

IV. Fonctions des champignons mycorhiziens à arbuscules et leur utilisation comme biostimulant des plantes

Les champignons mycorhiziens à arbuscules en s'associant avec les plantes développent une association à bénéfice réciproque. On retrouve ces symbioses dans les milieux aussi bien tempérés, tropicaux et boréaux. Les symbioses mycorhiziennes permettent d'accroître la productivité de certaines plantes (Jakobsen et al. 1992 ; Cavagnaro et al. 2005) par un apport supplémentaire en eau, en phosphore et en azote (Harrison et al. 2002 ; Helgason et al. 2005 ; Feddermann et al. 2010 ; Subramanian et al. 1999 ; Hawkins et al. 2000 ; Hamel et al. 2004 ; Toussaint et al. 2004 ; Tanaka et al. 2005). Les symbioses mycorhiziennes augmentent également la résistance des plantes à certains agents pathogènes (St-Arnaud et al. 2007) et confèrent une résistance accrue des plantes aux stress abiotiques (Amir et al. 2013). Les champignons mycorhiziens à arbuscules forment des structures symbiotiques intra-racinaires avec la plupart des plantes (Smith et al. 1997). Ils présentent donc un intérêt en tant que biostimulant des plantes dans des contextes agronomiques et environnementaux.

A. Fonctions des CMA

1. Nutrition minérale des plantes

La nutrition minérale des plantes endomycorhizées est au cœur de la recherche et est le sujet le plus étudié dans ce domaine depuis plusieurs années. Les premiers résultats ont permis de montrer que les CMA étaient des contributeurs essentiels à la nutrition minérale des plantes ; la symbiose entre les CMA et la plante pouvait être qualifiée de biotrophie mutualiste (Lewis, 1973).

Les aspects nutritionnels de la symbiose ont été largement étudiés d'un point de vue physiologique et moléculaire (Harrison et al. 2002 ; Paszkowski et al. 2002 ; Nagy et al. 2005 ; Bucher 2007 ; Smith & Smith 2011 ; 2012). Les CMA sont capables d'augmenter significativement la nutrition minérale des plantes, notamment dans un environnement pauvre en nutriments. Il a clairement été démontré que les plantes possèdent une voie de signalisation symbiotique pour l'absorption du phosphore (Harrison et al. 2002 ; Paszkowski et al. 2002 ; Nagy et al. 2005 ; Bucher 2007 ; Smith & Smith 2011) et que les CMA possèdent des transporteurs à forte affinité pour le phosphate (Harrison & Van Buuren 1995). Des expériences avec du phosphore radioactif ont permis de quantifier le phosphore entrant dans le système racinaire de la plante *via* les CMA. Ces expériences ont révélé que les CMA transfèrent du phosphore à la plante même sans un effet significatif sur sa croissance (Pearson & Jakobsen 1993; Smith et al. 2003 ; 2004). La symbiose mycorhizienne à arbuscule est également connue pour induire l'expression de transporteur de phosphore chez la plante (Nagy et al. 2005 ; Xie et al. 2013 ; Walder et al. 2015). Récemment des études menées sur l'expression des transporteurs de phosphore de *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus* (*MtPT4* et *LjPT4*) induite par les CMA, ont montré que ces transporteurs étaient exprimés dans la coiffe racinaire des plantes et permettaient l'assimilation du phosphore (Volpe et al. 2015). Trois gènes codant pour des transporteurs de phosphore (PT) chez la tomate sont connus pour être surexprimés chez les racines des plantes mycorhizées (*LePT3*, *LePT4*, *LePT5*) (Nagy et al. 2005), et la caractérisation fonctionnelle du gène *LePT4* a montré un rôle central dans l'absorption du phosphate inorganique (Pi) à médiation mycorhizienne chez la tomate (Xu et al. 2007). Le rôle de la symbiose MA dans le transfert de plusieurs nutriments chez de nombreuses espèces de végétaux a été démontré par plusieurs études (Casieri et al. 2013 ; Paszkowski et al. 2002 ; Nagy et al. 2005 ; Guether et al. 2009a). Les transporteurs de phosphate Pi sont impliqués dans l'absorption du phosphate au niveau des arbuscules (Harrison et al. 2002 ; Paszkowski et al. 2002 ; Nagy et al. 2005). Des transporteurs d'ammonium induits par les mycorhizes (TAM) ont également été identifiés (Gomez et al.

2009 ; Guether et al. 2009b ; Kobae et al. 2010 ; Koegel et al. 2013). La membrane péri-arbusculaire (membrane dérivée de la plante et enveloppant l'arbuscule) est considérée comme le site principal d'échange et de transfert des minéraux : les transporteurs des plantes sont localisés sur cette membrane et capturent les nutriments minéraux de l'apoplaste péri-arbusculaire et les transfèrent aux cellules corticales de la plante (Javot et al. 2011 ; Bapaume & Reinhardt 2012). En effet les TAMs ont notamment été localisés dans la membrane péri-arbusculaire du soja et de la luzerne, cette découverte suggère qu'il existe un transport de l'ammonium du champignon vers les cellules corticales de la plante (Kobae et al. 2010 ; Breuillin-Sessoms et al. 2015). Des analyses réalisées sur les transporteurs de phosphate et d'ammonium chez des plantes mutantes de *Medicago* ont démontré que ces transporteurs symbiotiques (PT4 et TAM2) ont une influence sur la durée de vie des arbuscules (Javot et al. 2007 ; Breuillin-Sessoms et al. 2015). Les transporteurs symbiotiques de phosphate et d'ammonium ne serviraient pas seulement à transmettre les nutriments aux cellules racinaires, ils permettraient également de déclencher une voie de signalisation pour le maintien et le développement des arbuscules (Breuillin-Sessoms et al. 2015).

Des études ont permis d'identifier et d'analyser l'expression des transporteurs d'ammonium (NH₄) et de phosphate (Pi) dans la cellule arbusculaire grâce à des techniques de microdissection laser et de transcriptomique (Balestrini et al. 2007; Gomez et al. 2009; Guether et al. 2009b ; Tisserant et al. 2012 ; Pérez-Tienda et al. 2011). La symbiose endomycorhizienne permet également un transfert du soufre (S) du champignon vers la plante (Allen & Shachar-Hill 2009; Sieh et al. 2013). Un transporteur de sulfate spécifiquement impliqué dans l'absorption du sulfate provenant des arbuscules a été récemment identifié (Giovannetti et al. 2014). La symbiose augmente le statut nutritionnel de la plante hôte en soufre ce qui modifie l'expression des transporteurs de sulfate de la plante (Giovannetti et al. 2014). Il a été suggéré que les CMA réabsorbent les nutriments relâchés au niveau de l'interface péri-arbusculaire et peuvent contrôler le taux de nutriments alloué à la plante hôte (Balestrini et al. 2007).

Le potassium (K) est un élément essentiel pour le fonctionnement des cellules végétales néanmoins la contribution de la symbiose MA pour la nutrition en K des plantes à très peu été étudiée (Garcia & Zimmermann 2014). Cet élément est très abondant dans la majorité des sols mais sa biodisponibilité est très faible à cause de sa forte adsorption. L'accumulation de K dans les spores, les hyphes et les vésicules des CMA a été rapportée (Olsson et al. 2008). Une étude a montré la surexpression de transporteur de K dans les

racines mycorhizées des plants de *Lotus japonicus* (Guether et al. 2009) et le K⁺ issu de la symbiose MA semble être corrélé à une augmentation de la tolérance de la plante aux stress abiotiques tels que la salinité et la sécheresse (Garcia & Zimmermann 2014).

Une étude a montré que les fruits de différentes plantes mycorhizées contenaient plus de Ca que les plantes non mycorhizées (Michałojć et al. 2015). Balliu et al. 2015 ont également constaté que les feuilles des plants de tomates mycorhizés possédaient des teneurs en Ca plus importantes que les feuilles des plantes non mycorhizées. Une autre étude a montré qu'il n'y avait aucune influence de la mycorhization sur la teneur en calcium des graines de concombre (Tüfenkçi et al. 2012). D'autre part, l'acquisition accrue de Ca, Mg et K a été rapportée pour diverses plantes colonisées avec différents isolats de CMA, par rapport à des plantes non mycorhizées (Saif 1987 ; Siqueira et al. 1990). Par ailleurs Clark & Zeto (2000) ont réalisé des expériences avec différentes espèces de CMA sur différentes plantes ; les résultats de ces expériences montrent que les teneurs en P, N, Zn, Cu, K, Ca et Mg dans les plantes mycorhizées dépendent de l'isolat de CMA et de la plante hôte utilisée. Néanmoins les teneurs en P, N, Zn et Cu sont globalement augmentées pour toutes les espèces de CMA et de plantes hôtes étudiées, que le sol soit acide ou basique. Les teneurs en K, Ca et Mg sont également augmentées lorsque les plantes mycorhizées sont cultivées sur un sol acide.

Récemment, deux études menées sur la contribution de la symbiose MA à la concentration en micronutriments des plantes cultivées en plein champs ont été publiées (Lehmann et al. 2014 ; Lehmann & Rillig 2015). Ces deux études montrent que les CMA peuvent être utilisés pour augmenter les concentrations en micronutriments des plantes sur le terrain. La symbiose MA permettrait d'augmenter la biodisponibilité des minéraux issus des plantes, ce qui représente une valeur ajoutée aux produits dérivés des végétaux (agroalimentaires, textiles, cosmétiques, médicaux.....). En plus d'une augmentation de la productivité des plantes mycorhizées, la symbiose MA a également un impact sur la qualité des cultures grâce à un enrichissement en macro et micronutriments (Antunes et al. 2012 ; Hart & Forsythe 2012 ; Pellegrino & Bedini 2014). Par exemple, pour le Zn, Lehman et al. (2014) ont montré que la symbiose MA permettait d'augmenter les concentrations de cet élément dans les tissus de plusieurs plantes cultivées, et ceci dans différentes conditions environnementales. La texture du sol, le pH et la concentration en nutriment (déficience en Zn, P) ont une influence sur le contenu en Zn alloué par les CMA dans les différents tissus des plantes (Lehmann et al. 2014).

Pour le cuivre (Cu), le fer (Fe), et le manganèse (Mn), une étude réalisée par Lehmann et Rilling (2015) a permis de démontrer l'impact positif de la symbiose MA sur le contenu en

Cu et sur la nutrition en Fe des plantes cultivées. Pour le manganèse un bénéfice nutritionnel lié à la symbiose MA a été constaté pour les herbacées. Pellegrino & Bedini (2014) ont démontré que l'inoculation de CMA sur les cultures de pois chiche permettait d'augmenter la productivité et le contenu nutritionnel des grains en protéine, en Fe et en Zn.

La teneur en éléments nutritifs d'un sol va influencer la colonisation de la plante par les CMA. Ainsi les plantes seraient capables de favoriser ou de limiter la colonisation par les CMA en fonction de leurs besoins (Nouri et al. 2014). Il a déjà été démontré que la disponibilité du phosphore représente un facteur environnemental qui peut perturber l'interaction symbiotique des CMA ; des niveaux élevés de phosphore dans le sol peuvent supprimer l'interaction CMA-plantes (Breuillin et al. 2010 ; Balzergue et al. 2013 ; Bonneau et al. 2013). Des expériences ont été menées afin d'évaluer l'influence de différents nutriments sur la symbiose MA (Nouri et al. 2014). Les résultats de ces expériences ont montré que le phosphate et le nitrate exercent une régulation négative sur la symbiose MA, alors que le sulfate, le magnésium, le fer et le calcium n'ont aucun effet. Les carences en azote peuvent cependant inverser l'effet inhibiteur causé par une quantité importante de phosphore sur la symbiose MA. La carence nutritive en azote déclencherait un signal prédominant chez la plante qui permettrait de favoriser la symbiose MA même en présence de quantité importante de phosphore (Nouri et al. 2014). Cependant ces expériences ont été menées sur une plante (*Petunia hybrida*) en symbiose avec une seule espèce de CMA (*R. irregularis*) ; or des données récentes sur l'échange de nutriments entre la plante et les CMA ont indiqué que les échanges de nutriments sont également liés aux différents partenaires impliqués dans la symbiose (plantes-CMA) et dépendent de plusieurs facteurs tels que les ressources nutritives dans le substrat et la diversité fonctionnelle des CMA (Walder & Van der Heijden 2015).

2. Tolérance des plantes aux stress biotiques

Différents mécanismes faisant intervenir les CMA dans la protection de la plante contre des stress biotiques ont été mis en évidence. Ces mécanismes peuvent passer par une augmentation de la nutrition minérale, une compétition des sites de colonisation, des changements au niveau du système racinaire, des changements au niveau des populations microbiennes de la rhizosphère et/ou une activation des mécanismes de défense de la plante. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en place simultanément et dépendent des conditions

environnementales, du temps de l'interaction et des partenaires impliqués (Azcón Aguilar et al. 1997 ; Whipps 2004).

Le fait que la symbiose endomycorhizienne induise une résistance de la plante face à divers pathogènes est maintenant accepté par la communauté scientifique. L'induction de la résistance par les mycorhizes (MIR ; mycorrhiza-induced resistance) : ce mécanisme permet l'activation systémique de mécanismes de défense cellulaire et biochimique sur les plantes mycorhizées et entraîne une meilleure résistance contre les pathogènes (Pozo & Azcón Aguilar 2007).

Les plantes mycorhizées seraient caractérisées par une expression des gènes de défense liée aux voies de signalisation du méthyle jasmonate et de l'éthylène dans toute la plante, ce qui induirait la surexpression de gènes codants pour des protéines de défense contre les insectes herbivores et contre les champignons pathogènes (Pozo & Azcón Aguilar 2007).

Un autre mécanisme de protection induit par les mycorhizes implique l'amélioration générale de la nutrition de la plante. Les insectes herbivores sont donc sensibles au changement de la qualité de la plante causée par la symbiose endomycorhizienne (Shirvastava et al. 2015). Certaines publications rapportent que la symbiose CMA-plante est associée à l'augmentation de composés carbonés dans les feuilles impliqués dans la défense des plantes ; ces composés sont connus pour réduire les performances des populations d'insectes herbivores. Cependant, certaines publications rapportent qu'il n'y a aucune différence entre une plante témoin et une plante mycorhizée au niveau de la production des défenses chimiques de la plantes. Néanmoins, ces publications indiquent que les populations d'insectes herbivores sont négativement affectées par la mycorhization. Il est donc clairement admis que la colonisation d'une plante par les CMA a un effet sur les insectes herbivores. La variation de cet effet est due à l'isolat de CMA étudié (Pozo & Azcón Aguilar 2007 ; Gange 2006). La symbiose mycorhizienne n'affecte pas seulement les défenses et le métabolisme carboné mais également l'absorption de l'azote de la plante ce qui augmente l'azote disponible pour les composés azotés de défense des plantes (alcaloïdes, glycosides, etc.) (Pozo & Azcón Aguilar 2007). Par ailleurs, un article sur l'interaction entre les insectes herbivores et les CMA aboutit à la conclusion que les insectes généralistes des plantes sont négativement affectés par les CMA alors que les insectes spécialistes comme les aphides répondent positivement (stimulés chez les plantes mycorhizées) à la mycorhization (Hartley & Gange 2009). Dans une autre étude, il a été prouvé que la symbiose endomycorhizienne augmentait fortement le taux d'alcaloïdes dans les plantes (Abu-Zeyad et al. 1999 ; Vannette & Hunter 2009). Une étude récente sur la tomate (Shirvastava et al. 2015) a montré que la quantité de terpénoïdes était

fortement augmentée chez les plants de tomates inoculés avec *Rhizophagus intraradices* et cette surproduction de terpenoïdes conférait une résistance des pieds de tomates à l'insecte herbivore *Spodoptera exigua*.

3. Tolérance des plantes au stress abiotiques ; focus sur les métaux lourds

En plus d'un avantage nutritionnel et d'une résistance accrue aux maladies (Smith & Read 2008 ; Pozo & Azcón Aguilar 2007) les CMA offrent d'autres bénéfices aux plantes comme une meilleure tolérance à la sécheresse, à la salinité et aux métaux lourds (Augé 2001, 2004 ; Porcel et al. 2011 ; Amir et al. 2014a ; Augé et al. 2015). Ces dernières années beaucoup de travaux ont porté sur l'influence de la symbiose MA sur la réponse des plantes à différents stress abiotiques, ainsi que les mécanismes physiologiques impliqués chez la plante (Augé 2001; Ruiz-Lozano 2003; Ruiz-Lozano & Aroca 2010; Bárzana et al. 2012, 2015; Ruiz-Lozano et al. 2012; Calvo-Polanco et al. 2014; Saia et al. 2014; Augé et al. 2015; Sánchez-Romera et al. 2015).

La toxicité des métaux lourds pour les végétaux peut être causée par une absorption excessive des métaux essentiels et non essentiels du sol par les plantes. L'effet des CMA sur le fitness de la plante dans des zones contaminées ou naturellement riches en métaux lourds dépend de l'isolat de CMA, de l'espèce de plante et de la concentration des métaux lourds présents dans le sol. La tolérance des plantes aux métaux lourds conférée par les CMA n'est pas forcément corrélée à une réduction de l'absorption de ces métaux dans la plante. Une accumulation plus importante de métaux lourds chez certaines plantes mycorhizées a été rapportée (Joner & Leyval, 2001 ; Carvalho et al. 2006 ; De Andrade et al. 2008 ; De Souza et al. 2012). Dans la plupart des cas la toxicité des métaux lourds diminue chez les plantes mycorhizées grâce à une augmentation de la nutrition en phosphore et donc de la croissance de la plante par les CMA (Joner & Leyval, 2001 ; Chen et al. 2003). Cependant la stimulation de la croissance de la plante par les CMA dans des milieux contaminés en métaux lourds n'est pas toujours corrélée à une réduction de la concentration des métaux dans les tissus de la plante. Ainsi, Lingua et al. (2008) ont montré que les CMA permettaient d'atténuer la toxicité causée par certains métaux lourds (Cu, Zn) sur le peuplier, alors que les peupliers mycorhizés contenaient des quantités plus importantes de cuivre (Cu) et de zinc (Zn) dans leurs tissus. Bien souvent les CMA augmentent la quantité de métaux lourds accumulés dans les racines et diminuent celle des parties aériennes (Joner & Leyval 1997 ; Chen et al. 2005 ; Sheikh-Assadi & al. 2015 ; Wu et al. 2016). L'accumulation et la stabilisation des métaux dans les racines

mycorhizées et leur localisation dans les structures intra racinaires des CMA plutôt que dans les cellules racinaires ont été confirmées par différentes études (Turnau et al. 1993 ; Turnau, 1998 ; Wu et al. 2016). D'autres études ont montré une réduction de l'absorption des métaux lourds dans les plantes mycorhizées (Heggo et al. 1990 ; Li & Christie 2001 ; Tullio et al. 2003). Par exemple, une diminution de l'absorption et de la concentration de zinc dans les parties aériennes et racinaires des plants de trèfles et de tomates a été rapportée (Li & Christie 2001 ; Watts-Williams et al. 2013). L'immobilisation des métaux lourds dans le mycélium extra racinaire permet de réduire l'absorption de ces métaux par les plantes mycorhizées, ce phénomène peut être attribué au changement de la solubilité des métaux dans le sol contenant les CMA. Comme pour le zinc, la réduction de l'absorption de l'arsenic chez les plantes mycorhizées a été rapportée dans plusieurs études (Gonzalez-Chavez et al. 2002 ; Ultra et al. 2007 ; Christophersen et al. 2012 ; Chen et al. 2013). En effet les CMA permettraient de supprimer l'absorption d'arsenic dans la plante hôte (Gonzalez-Chavez et al. 2002). La fréquence et la diversité des CMA est généralement plus faible dans les sols riches en métaux lourds que dans les sols ne présentant pas de fortes concentrations de ces éléments. Les CMA natifs de ces milieux riches en métaux lourds sont plus tolérants à ces métaux que les CMA issus de milieux présentant de faibles teneurs en métaux lourds (Kaldorf et al. 1999 ; Amir et al. 2008).

Les CMA réduisent les métaux lourds biodisponibles dans le sol pour les plantes par différents mécanismes (i) en réduisant l'entrée des métaux lourds dans les racines en les piégeant sur leurs parois (mycélium, spores) et en les complexant dans le sol, (ii) en chélatant les métaux lourds dans le cytosol de leurs cellules (détoxification du sol), (iii) en compartimentant les métaux lourds dans les vacuoles de leurs cellules et (iv) en réalisant un influx, puis une réduction et un efflux de certains métaux lourds (Ferol et al. 2016).

Les CMA limitent l'entrée des métaux lourds dans les racines en les complexant dans le sol grâce notamment à une protéine spécifique, la glomaline (Wright & Upadhyaya 1996). Beaucoup d'études ont montré que la glomaline, produite par les CMA dans le sol, a la capacité de capturer la plupart des métaux lourds (Cu, Cd, Fe, Pb, Zn, et Cr) et de réduire leur biodisponibilité (González-Chávez et al. 2004 ; Cornejo et al. 2008 ; Gil-Cardesa et al. 2014). Les parois du mycélium et des spores ont également une importance dans la rétention des métaux lourds présents dans le sol (Galli et al. 1994 ; Joner et al. 2000 ; Gonzalez-Chavez et al. 2002). Les composés constituant les parois fongiques ont une forte affinité pour les métaux lourds (chitine, mélanine et chez les CMA glomaline) (González-Guerrero et al.

2008). Cette rétention de métaux lourds varie en fonction des espèces (Gonzalez-Chavez et al. 2002).

Par ailleurs, la chélation intracellulaire des métaux lourds dans le cytosol des cellules de CMA par des ligands à hautes affinités permet de détoxifier le sol et contribue à conférer une tolérance des plantes aux métaux lourds. Les ligands sont principalement des acides aminés et organiques et deux types de peptides, les phytochélatines et les métallothionéines (Hall 2002). Chez les CMA le seul chélateur connu est une métallothionéine, c'est une petite protéine cytosolique riche en cystéine qui est capable de se lier étroitement aux métaux. Les gènes codant cette métallothionéine ont été identifiés chez *Gigaspora margarita* (Lanfranco et al. 2002) et chez *R. irregularis* (González-Guerrero et al. 2007). Ces gènes ont été clonés dans des levures métallothionéines déficientes et l'expression des deux gènes codant pour cette protéine ont permis de restaurer la tolérance au Cu des levures. En présence de Cu ces gènes se sont révélés surexprimés dans les levures et ont conféré une tolérance au Cu. Ces résultats indiquent que ces métallothionéines jouent un rôle important dans la tolérance des CMA aux stress édaphiques. Un gène codant pour une phytochélatine synthase a été découvert dans le génome de *R. irregularis* (Shine et al. 2015). Les phytochélatines sont également capables de conférer une résistance aux métaux lourds chez les CMA. Ces mécanismes de chélation des métaux lourds du sol dans les cellules des CMA vont réduire les métaux lourds biodisponibles dans la rhizosphère et donc conférer aux plantes une tolérance accrue aux stress édaphique.

La compartimentation des métaux lourds du sol dans les vacuoles des cellules des CMA est un autre mécanisme impliqué dans la tolérance des plantes à ces métaux. Une accumulation de Zn, Cu, et Cd a été observée dans les vacuoles du mycélium extra racinaire de plusieurs CMA en culture *in vitro* (González-Guerrero et al. 2008 ; Yao et al. 2014 ; Nayuki et al. 2014). Ces études indiquent que ces métaux sont localisés avec les polyphosphates et suggèrent que ces polyphosphates permettraient de stabiliser les métaux dans les vacuoles des cellules de CMA. González-Guerrero et al. (2005) ont identifié un transporteur de Zn (*GintZnT1*) chez *R. irregularis*. Chez les levures *GintZnT1* permet de diminuer le Zn du cytosol et son expression augmente en présence de Zn et est corrélé avec une accumulation de Zn dans la vacuole (González-Guerrero et al. 2008). Un transporteur ABC (*GintABC1*) de *R. irregularis* semble homologue à un transporteur de Cd de levure impliqué dans le transport du complexe bis-GSH-Cd à travers le tonoplaste (Li et al. 1996) et ce transporteur a également été décrit comme étant impliqué dans l'acheminement du Cd et du Cu dans les vacuoles (González-Guerrero et al. 2010a). En plus de cette accumulation de métaux lourds dans les vacuoles du mycélium, certains CMA peuvent également accumuler

du Cu dans le cytoplasme de leurs spores, ce phénomène entraînant un changement de la couleur des spores (Cornejo et al. 2013). La viabilité des spores ayant accumulé le Cu est cependant fortement réduite.

Une autre alternative pour contrôler le niveau intracellulaire de métaux lourds dans les cellules des CMA est l'efflux des ions métalliques, ce mécanisme permet également de protéger les plantes mycorhizées. Comme la plupart des cations sont essentiels, une exclusion complète n'est pas possible il y a donc un flux sélectif. Le seul exemple connu chez les CMA est l'efflux d'As. Chez *R. irregularis* l'accumulation d'As ce fait grâce aux transporteurs de phosphate GiPT (González-Chávez et al. 2011). En utilisant différentes techniques González-Chávez et al. (2014) montrent que l'arsenic absorbé dans les hyphes est réduit en arsénite. Une induction simultanée de l'expression des transporteurs GiPT et GiArsA est trouvée chez *R. irregularis*. GiArsA est un transporteur à efflux qui permet l'efflux de l'arsénite.

Le dernier mécanisme permettant aux CMA de résister aux métaux lourds passe par la limitation du stress oxydatif ; ce mécanisme n'est pas directement impliqué dans la tolérance des plantes aux métaux lourds. Les métaux lourds causent des dommages cellulaires dus à l'induction de stress oxydatif. En effet le Cu et le Fe, induisent la production de ROS au niveau cellulaire (Halliwell & Gutteridge 1989). Chez les CMA, l'effet de stress oxydatif a été détecté grâce à l'étude de l'altération cellulaire induite par le Cu sur certains composés redox du métabolisme de *R. irregularis*. Le Cu induit une accumulation de ROS qui provoque des dommages oxydatifs sur les membranes fongiques (Benabdellah et al. 2009b ; González-Guerrero et al. 2010b). Pour contrer ces dommages causés par le Cu, le CMA active l'expression de gènes codant pour des composés antioxydants, comme le gène *GintSOD1* qui code pour une super-oxyde dismutase (González-Guerrero et al. 2010b). Ou encore *GintGRX1*, code pour une protéine multifonctionnelle possédant une activité oxydoréductase, peroxydase, et glutathionne S-transférase (Benabdellah et al. 2009b). Le gène *GintPDX1*, quant à lui code pour une enzyme responsable de la biosynthèse de la vitamine B6 (Benabdellah et al. 2009a). Les super-oxydes dismutases sont directement impliquées dans la détoxification des ROS induite par un stress métallique dont *GintSOD1* est probablement impliqué dans le piégeage des ROS résultant de l'activité redox causé par le Cu (González-Guerrero et al. 2010b). *GintGRX1* est également susceptible de jouer un rôle dans la protection du champignon contre les dommages oxydatifs induits par le Cu. En effet, les glutarédoxines agissent comme régulateurs redox des protéines thiols et sont impliquées dans le maintien de l'équilibre redox des cellules. En plus de ces activités enzymatiques, les CMA possèdent de petites molécules, comme le GSH et les vitamines B6, C et E connues pour avoir

un pouvoir antioxydant. La contribution de la GSH dans l'atténuation du déséquilibre redox causé par les métaux toxiques n'a pas été formellement observée. Cependant, comme les métaux lourds toxiques induisent l'expression de gènes codant pour des protéines utilisant la GSH comme cofacteur (glutarédoxines) ou comme substrat (glutathion-S-transférases, Waschke et al. 2006 ; Hildebrandt et al. 2007), la GSH joue un rôle indirect dans la tolérance des CMA aux métaux lourds.

Une analyse transcriptomique des gènes impliqués dans la tolérance aux stress du peuplier sur un sol pollué en métaux lourds a montré que les arbres endomycorhizés étaient caractérisés par : i) une réduction de la transcription des gènes impliqués dans les défenses anti-oxydatives dans les feuilles et les racines ii) une induction d'un gène codant pour une phytochélatine synthase dans les feuilles (Pallara et al. 2013). Les auteurs constatent soit une réduction, soit aucun changement dans l'activité des enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde dismutase, la GSH réductase et la peroxydase. Cette réduction avait également été observée dans les tissus de plantes endomycorhizées cultivées en présence de métaux lourds et a été attribuée au fait que les plantes endomycorhizées présentaient moins de métaux dans leurs tissus (Meier et al. 2011 ; Garg & Kaur 2013 ; Kumar et al. 2015). D'autres études montrent que ces enzymes sont suractivées chez certaines plantes mycorhizées (Garg & Aggarwal 2012). Une donnée qui semble constante dans toutes les études est la surproduction des phytochélatines chez les plantes endomycorhizées pour la tolérance aux métaux lourds (Christophersen et al. 2012 ; Cicatelli et al. 2012 ; Degola et al. 2015 ; Jiang et al. 2016). Toutes ces études ont révélé qu'en condition de stress édaphique les CMA induisent chez les plantes une surexpression des gènes codant pour les phytochélatines synthases, ce qui conduit à une accumulation de phytochélatines dans les tissus de la plante et confère une tolérance plus importante des plantes endomycorhizées aux métaux lourds.

Les CMA permettent donc d'augmenter l'absorption de micronutriments à faible mobilité lorsque les plantes poussent sur des sols déficients en ces éléments et, d'autre part, d'atténuer la toxicité des métaux lourds dans les sols où ces éléments sont en excès, et donc potentiellement toxiques (sols pollués et sols ultramafiques). Les CMA ont ainsi un potentiel biotechnologique énorme pour résoudre des problèmes agronomiques et environnementaux, comme limiter la carence en micronutriments et conférer une tolérance des plantes aux métaux lourds.

4. Complémentarité fonctionnelle des CMA

La diversité biologique influence de nombreuses fonctions de l'écosystème (Zavaleta et al. 2010). Par exemple, certaines études montrent que la productivité végétale augmente avec la richesse en espèces végétales (Hector et al. 1999, Tilman et al. 2001). Cet effet positif de la diversité s'explique souvent par la complémentarité fonctionnelle, cette notion est définie par l'idée que différentes espèces occupent des niches différentes et exercent donc des fonctions différentes. Dans certains cas, la complémentarité fonctionnelle peut permettre une utilisation plus complète des ressources disponibles permettant d'obtenir une biodiversité croissante (Yachi & Loreau 1999, Koide 2000, Hooper et al. 2005, Wagg et al. 2015). Comme vu précédemment, les communautés microbiennes du sol jouent un rôle fondamental dans le cycle des nutriments (Bonkowski & Roy 2005) et sont donc des régulateurs importants de la productivité et de la composition des communautés végétales (Van der Heijden et al. 2008). Les CMA, en tant que microorganismes, jouent un rôle dans l'immobilisation des nutriments et permettent d'augmenter la nutrition minérale des plantes (Van der Heijden et al. 2008). Ils permettent également de conférer aux plantes une tolérance aux stress biotiques et abiotiques.

Les communautés de CMA présentent une grande diversité fonctionnelle entre les différentes espèces ; cette diversité contribue à la productivité des écosystèmes (Jansa et al. 2005). Par exemple, différents isolats de CMA peuvent posséder des traits fonctionnels distincts, certains sont meilleurs pour protéger leurs hôtes contre les pathogènes tandis que d'autres sont meilleurs pour améliorer l'absorption du phosphore. La combinaison de ces isolats de CMA dans une seule communauté peut entraîner une plus grande amélioration de la productivité des plantes (Maherali & Klironomos 2007). De plus, étant donné que des taxons distincts de CMA s'associent à différentes espèces végétales (Vandenkoornhuyse et al. 2003), une grande diversité de CMA peut faciliter le recrutement d'espèces végétales différentes au sein de la communauté (Vandenkoornhuyse et al. 2003). La diversité des CMA peut également réduire l'inégalité concurrentielle entre différentes espèces végétales ce qui maintient un niveau stable de productivité et de biodiversité végétale, même dans des conditions environnementales variables (Wagg et al. 2011b). Il semblerait également que l'inoculation d'une grande diversité d'espèces de CMA augmente la probabilité qu'au moins un taxon soit fonctionnel dans l'écosystème où ils sont réintroduits (Pringle & Bever 2002). Ainsi, la productivité et la stabilité d'un écosystème peuvent être augmentées avec l'augmentation de la richesse en espèces de CMA. Quelques études expérimentales ont été réalisées pour observer l'existence d'une complémentarité fonctionnelle des CMA. Ces expérimentations sont principalement basées sur l'effet de plusieurs espèces de CMA sur la

croissance d'une plante. Par exemple, une étude sur l'effet de 2 espèces de CMA inoculées sur une plante (*Allium porrum*) a montré que les plantes en symbiose avec les 2 espèces (*C. claroideum* et *R. intraradices*) assimilaient plus de phosphore que les plantes inoculées séparément avec l'une ou l'autre espèce (Jansa et al. 2008). Bien que des taxons distincts de CMA puissent clairement être fonctionnellement complémentaires, la relation entre la diversité taxonomique des CMA et la complémentarité fonctionnelle dépend probablement du niveau de résolution taxonomique (Maherali & Klironomos 2007). L'augmentation du nombre d'isolats d'une espèce particulière ou d'espèces d'un genre donné peut avoir un impact sur les effets apportés à la plante. Cependant, une complémentarité fonctionnelle peut se produire en augmentant le nombre de genres ou de familles de CMA (Van der Heijden et al. 2004). En effet, certaines études suggèrent que la variation fonctionnelle la plus significative est observée entre les différentes familles de CMA (Hart & Reader 2002 ; Maherali & Klironomos 2007). Les caractères fonctionnels conservés chez des isolats de CMA de différentes familles pourraient, réduire la compétition, promouvoir la coexistence et améliorer le fonctionnement et la productivité des écosystèmes (Maherali & Klironomos 2007 ; Powell et al. 2009).

Gosling et al. (2016) mettent en avant les phénomènes de compétition entre différents CMA, cette compétition dépendrait des préférences de la plante hôte qui peut favoriser certains isolats de CMA et à l'inverse, les CMA peuvent également avoir une préférence pour certaines espèces végétales. Cette compétition entraîne une réduction de la diversité des CMA. Dans l'étude de Gosling et al. (2016), après un cycle de culture, le nombre d'espèce de CMA a diminué, comparé au nombre d'espèces inoculé au départ. Une autre étude (Thonar et al. 2014) montre que *Medicago truncatula* co-inoculée avec *Claroideoglomus claroideum* et *Rhizophagus irregularis* présente une croissance plus importante comparé aux plants inoculés avec l'un ou l'autre. A l'inverse, une plante co-inoculée avec *Gigaspora margarita* et *Rhizophagus irregularis* présente une croissance plus faible que l'orsque ces deux espèces sont inoculée séparément. De plus, il semblerait que des espèces de CMA appartenant au même genre pourraient provoquer une concurrence intense entraînant une exclusion compétitive (Thonar et al. 2014). Une communauté de CMA comprenant des espèces en compétition intenses pourrait nuire aux fitness de la plante colonisée. De plus certaines espèces de CMA n'apportent pas de bénéfice à la plante colonisée et la plante est capable de discriminer les bons contributeurs et sanctionner les mauvais contributeurs (Kiers et al. 2011 ; Hart et al. 2013).

Certaines études indiquent que les espèces de la famille des Gigasporaceae possèdent de grands réseaux d'hyphes extraracinaires qui leurs permettent d'exploiter un grand volume de sol et donc un transfert plus important des minéraux aux plantes que les Glomeraceae (Hart & Reader 2002 ; Maherali & Klironomos 2007). Cependant d'autres études suggèrent que les nutriments des Gigasporaceae sont principalement concentrés dans le mycélium intraracinaire et que le transfert de ces nutriments à la plante est moins important que chez les Glomeraceae (Smith et al. 2003 ; Gosling et al. 2016). Ces résultats contradictoires peuvent être dus à une durée d'expérimentation trop faible. En effet les Gigasporaceae sont connues pour transférer le phosphore à la plante de manière non linéaire dans le temps, en relation avec un stockage du P dans les cellules auxiliaires avant la production des spores. Les Gigasporaceae sont également connues pour avoir un cycle de développement plus long que les Glomeraceae (Declerk et al. 2004). Il est donc logique que lorsque les Gigasporaceae sont utilisées dans des expériences courtes, ils contribuent moins à la nutrition du P que les Glomeraceae. Les Glomeraceae, grâce à leur colonisation rapide du système racinaire, semblent avoir une meilleure capacité à conférer à la plante une plus forte résistance au stress hydrique en activant des gènes responsables de cette tolérance chez la plante (aquaporines, proline, ABA) (Ruiz-Lozano et al. 2006 ; Aroca et al. 2008). Par ailleurs, les Gigasporaceae auraient une meilleure capacité à améliorer la tolérance aux métaux lourds des plantes, grâce à leurs importants réseaux d'hyphes extraracinaires qui leurs permettent d'exploiter un grand volume de sol, cette caractéristique leur permet de chélater une quantité de métaux importante dans le sol réduisant ainsi l'absorption de ces métaux par les plantes (Yang et al. 2017).

Une étude très récente sur la diversité taxonomique fonctionnelle des CMA, basée sur l'analyse de 900 publications, rapporte différentes informations sur la complémentarité fonctionnelle des CMA (Yang et al. 2017). Tout d'abord, cette étude rapporte que la croissance des plantes est plus fortement augmentée lorsque différentes familles de CMA sont en symbioses avec ces plantes. Cependant, cette étude nous informe également que la diversité spécifique en CMA ne permet pas une augmentation de la croissance des plantes. En d'autres termes, l'inoculation d'une plante avec plusieurs espèces de différentes familles de CMA permettrait une meilleure augmentation de la croissance qu'une inoculation avec différentes espèces d'une même famille de CMA. Cette augmentation de la croissance de la plante, grâce à la colonisation de son système racinaire par des CMA de différentes familles, serait due principalement à une absorption plus importante de P et une meilleure tolérance aux stress biotiques (pathogène fongique) et abiotiques (tolérance aux métaux lourds). Cette étude rapporte également que les Glomeraceae semblent avoir la meilleure capacité à améliorer la

nutrition minérale en P de la plante, ainsi que l'aptitude à lui conférer une résistance aux pathogènes fongiques. A l'inverse, les Gigasporaceae auraient une grande capacité à augmenter la tolérance aux métaux lourds des plantes. Les Claroideoglomeraceae permettent une meilleure croissance des plantes exposées à un stress causé par les nématodes. Cette étude (Yang et al. 2017) conclue que la complémentarité des fonctions de différentes familles de CMA est positivement corrélée à la diversité en CMA et à la productivité des plantes. Ces résultats soutiennent l'hypothèse qu'il existe des niches phylogénétiques fonctionnellement différentes entre les CMA de différentes familles (Maherali & Klironomos 2007 ; Powell & al. 2009).

En condition naturelles, l'effet des espèces de CMA sur la plante est fonction des conditions environnementales. Une multitude de facteurs (caractéristiques physico-chimiques du sol, teneurs en nutriment, pathogènes, climat, plantes et relation entre les microorganismes) peuvent influencer les fonctions des différents CMA (Lekberg & Koide 2014) ; par exemple une espèce de CMA non bénéfique pour la plante en condition expérimentale peut s'avérer bénéfique en conditions naturelles. De plus les études environnementales sont basées sur un temps restreint, souvent moins d'une année ; or il est possible qu'une espèce de CMA ne soit pas rapidement bénéfique pour la plante et que ses effets positifs ne s'expriment qu'après plusieurs années.

Pour finir, il apparaît donc que ce champ de recherche, sur la complémentarité fonctionnelle des CMA et les variations de cette complémentarité en fonction des conditions du milieu, est vaste et encore peu exploré. Beaucoup reste à faire pour élucider les effets et leurs mécanismes et en retirer des applications utiles pour l'agriculture et l'environnement.

B. Utilisation des CMA

1. Utilisation des CMA en agronomie

L'agriculture du 21^{ème} siècle fait face à plusieurs défis afin de répondre à une demande alimentaire sans cesse croissante. Les principaux défis actuels sont de réduire l'usage d'engrais chimiques non-durables, de limiter la consommation d'eau et d'améliorer la résistance des plantes agricoles, tout en augmentant la productivité des systèmes agricoles. La symbiose endomycorhizienne permet de répondre à ces différents objectifs. Les CMA forment des structures symbiotiques intra-racinaires avec la plupart des plantes agricoles

(Smith et al. 1997). L'intérêt d'utiliser et de préserver les CMA, en vue de les utiliser comme biofertilisants pour une agriculture durable, devient de plus en plus évidente, car la gestion appropriée de ces champignons symbiotiques pourrait diminuer l'utilisation d'engrais chimiques qui nuisent à l'environnement et à la santé des organismes vivants (y compris la nôtre). La stratégie principale adoptée pour atteindre ces objectifs est l'inoculation de propagules de CMA (*inoculum*) dans un sol cible. Malheureusement, les CMA sont des symbiontes obligatoires et ne peuvent être cultivés en cultures pures, loin de leurs plantes hôtes. Cette caractéristique contraignante rend la production à grande échelle d'*inoculum* de CMA difficile et complexe. Il existe trois types principaux d'*inoculum* de CMA. Premièrement, le sol provenant de la zone racinaire d'une plante endomycorhizée peut être utilisé comme *inoculum* puisqu'il contient normalement des fragments de racines colonisées, des spores de CMA et des hyphes. Cependant, à moins que des informations précises sur l'abondance, la diversité et le pouvoir infectieux des propagules soient disponibles, les *inocula* de sol peuvent être peu fiables et entraîner le risque possible de transfert de graines de mauvaises herbes et d'agents pathogènes.

Les spores extraites du sol peuvent être utilisées comme amorces pour la production d'*inoculum* brut. L'*inoculum* brut peut être obtenu après culture d'un isolat connu de CMA avec une plante piège hôte (c'est-à-dire une plante qui peut être massivement colonisée par de nombreuses espèces de CMA) dans un milieu inerte optimisé pour la propagation des CMA. Il s'agit du type d'*inoculum* le plus couramment utilisé pour l'inoculation des cultures à grande échelle, car il contient généralement un ensemble plus concentré du même type de propagules que les *inocula* de sol. Enfin, les fragments de racine infectés d'une plante hôte par un CMA peuvent également servir de source d'*inoculum*.

La production d'*inoculum* de CMA à grande échelle reste très difficile même si de nouvelles méthodes de production massive (Ijdo et al. 2011) et de technologie de revêtement des semences (Oliveira et al. 2016) ont été développées ces dernières années (van der Heijden et al. 2015). Le principal obstacle à la production d'un *inoculum* de CMA réside dans le comportement symbiotique obligatoire de ces champignons, c'est-à-dire leur besoin d'avoir une plante hôte pour la croissance et l'achèvement de leur cycle de vie. Cela signifie que l'étape de propagation doit inclure une phase de culture avec la plante hôte qui demande du temps et de l'espace. De plus, l'absence d'une méthode rapide pour identifier et évaluer si et dans quelle mesure la plante hôte est colonisée par les CMA contribue également à rendre difficile leur utilisation pour l'agriculture. En conséquence, des méthodes efficaces et rapides

d'identification et de quantification doivent être développées pour permettre l'utilisation des CMA à grande échelle. La gestion d'une grande quantité d'*inoculum* est également nécessaire pour une application à grande échelle, cette gestion est un processus exigeant. Cependant, l'inoculation par des CMA est plus facile pour des systèmes de production de plantes impliquant un stade de transplantation, étant donné que des quantités plus petites d'*inoculum* sont nécessaires (confinement de l'*inoculum*).

Au premier abord, la mise en œuvre d'un traitement d'inoculation au champ semble techniquement irréalisable et économiquement non viable. Pourtant, récemment, des essais au champ ont été réalisés et ont montré une augmentation significative du rendement pour différentes cultures (Hijri 2016). Une fois que la biodiversité en CMA est restaurée et bien établie, et si les conditions de culture sont adaptées à cet apport (Lehman et al. 2012 ; Säle et al. 2015), la communauté de CMA persistera. Si aucune pratique préjudiciable n'est pratiquée avant et après la culture, les réseaux d'hyphes mycorhiziens resteront infectieux. Comme alternative à l'inoculation à grande échelle, une approche à petite échelle est également possible. S'inspirant de l'idée de créer des îlots de fertilité, l'inoculation des CMA peut se limiter à des petites portions d'un champ, qui progressivement permettront l'établissement d'un réseau mycélien sain sur toute la parcelle. Cette technique permet une réduction des coûts et serait particulièrement indiquée lorsque l'inoculation de CMA vise à favoriser la revégétalisation d'une terre dégradée, puisque les îlots de fertilité inoculés permettent le développement d'espèces de plantes indigènes qui conduit à récupérer les terres appauvries en nutriments plus rapidement (Allen 1987).

Par conséquent, l'utilisation des CMA représente un fort coût initial, cependant sur le long terme cette méthode de fertilisation est économiquement viable et moins coûteuse que les méthodes classiques de fertilisation des sols agricoles et permet même de réaliser des économies pour les producteurs agricoles et pour la restauration de terres dégradées (Barr 2010). Néanmoins il est important que les utilisateurs comparent des parcelles inoculées avec des CMA et des parcelles non inoculées afin d'évaluer la rentabilité et les effets bénéfiques des CMA sur le fitness des plantes cultivées (Dalpé & Monreal, 2004). En effet, la crise économique mondiale oblige maintenant les producteurs à essayer de comprendre le potentiel des systèmes agricoles durables permettant de réduire l'apport de phosphore en utilisant les CMA. Cependant, les méthodes de production en conditions contrôlées et d'inoculation doivent être étudiées en vue de simplifier l'utilisation des CMA et des recherches appliquées visant à définir les meilleures stratégies d'inoculation et de formulation de l'*inoculum* (Verbruggen et al. 2013) doivent être mises en œuvre. Le potentiel des CMA attire l'attention

du secteur commercial, et plusieurs entreprises produisent et vendent aujourd'hui des *inocula* à base de CMA.

La tendance générale de ces entreprises est de formuler des *inocula* composés d'un petit nombre d'espèces de CMA. Certains fabricants choisissent une formulation unique d'autres produisent des produits qui sont censés cibler une gamme de conditions environnementales et certaines plantes hôtes. Les quelques espèces qui sont souvent utilisées peuvent facilement être propagées de façon routinière et sont normalement généralistes, car elles sont associées à une grande variété de plantes hôtes dans différents biomes. Bien que les *inocula* commerciaux soient souvent annoncés comme étant adaptés à un large éventail de plantes et à de larges conditions environnementales, les avantages réels ne sont pas perceptibles dans toutes les conditions (Faye et al. 2013).

Afin de promouvoir le développement et l'amélioration du marché des *inocula* de CMA, les scientifiques doivent renforcer le lien entre la recherche et les entreprises et introduire une série de « meilleures pratiques » qui pourraient être adoptées pour résoudre les problèmes liés au fonctionnement des *inocula* commerciaux (Berruti et al. 2016). Il y a notamment une réelle nécessité de contrôler la composition biologique des *inocula* de CMA, en raison de la présence éventuelle de pathogènes et ou de mauvaises herbes (Douds et al. 2005, Tarbell & Koske 2007). Il faut également mettre en place des contrôles qualité stricts qui permettent de vérifier la pureté en terme de composition de CMA. En effet, la liste d'espèces déclarée dans les *inocula* des entreprises commerciales ne correspond pas toujours exactement à la composition réelle de l'*inoculum* (Berruti et al. 2013 ; observation personnelle). De plus, les *inocula* de CMA sont principalement produits à partir de cultures en pots en conditions non stériles, dans des serres, dans des chambres de cultures ou dans des champs et par conséquent les *inocula* ne peuvent être exempts de microorganismes externes.

En raison de la prise de conscience accrue du risque de contamination des sols par des agents pathogènes, de nombreux fabricants appliquent maintenant des produits agrochimiques durant la production de leurs *inocula* afin d'éviter l'introduction de contaminants (Douds et al. 2005). Afin de réduire les risques de pathologies végétales, on peut préconiser de ne pas inclure de résidus de racine hôte dans l'*inoculum*. Dans cette optique, les fragments de racine peuvent également être stérilisés en surface sans compromettre la viabilité des propagules de CMA (Mohammad & Khan 2002). Au cours des dernières décennies, plusieurs techniques ont été développées et appliquées pour caractériser de façon moléculaire les communautés de CMA dans des matrices complexes, telles que le sol

et les *inocula* de CMA (Berruti et al. 2013 ; Badri et al. 2016) ; mais, comme noté précédemment, ces techniques comportent de nombreux biais.

2. Utilisation des CMA en restauration écologique

Beaucoup d'études rapportent l'importance d'utiliser des *inocula* de CMA pour la restauration écologique des sols dégradés et ou pollués. La présence des CMA semble être primordiale pour la croissance des plantes natives des sites à restaurer puisqu'ils permettent d'augmenter l'acquisition de nutriments et confèrent une résistance aux métaux lourds et au stress hydrique (Hildebrandt et al. 2007 ; Smith & Smith 2011) ; or les populations de ces CMA sont généralement fortement réduites dans les milieux dégradés et même éliminés lorsque le sol a été décapé. Les CMA permettent également une meilleure agrégation et stabilité du sol et une réduction de l'érosion grâce à la production d'hyphes et de glomaline. Ils sont aussi connus pour avoir une influence sur la diversité, la compétition et les processus de succession des communautés végétales (van der Heijden et al. 1998; Middleton & Bever 2012). L'utilisation des CMA comme biostimulant des plantes pour la restauration des sites dégradés nécessite de prendre de nombreuses considérations en compte. Premièrement les conditions du site à restaurer doivent être étudiées afin de déterminer si l'utilisation des CMA est nécessaire ou si un retour passif des différentes communautés du sol est plus approprié. Deuxièmement il faut vérifier si les CMA sont compatibles avec l'environnement où ils sont réintroduits (sols, climat, plantes). Pour finir les résultats dépendent de la méthode d'inoculation utilisée. L'inoculation de CMA peut être particulièrement appropriée pour la réintroduction de plantes natives sur les sites miniers dégradés, ces sites présentent de multiples contraintes qui rendent une réinstallation naturelle des microorganismes du sol tels que les CMA difficile. Pendant l'exploitation minière, les premières couches de sol, les plus fertiles (topsoil), sont retirées et stockées en tas avant d'être replacées ; ce stockage réduit fortement la viabilité des CMA et altère les différentes communautés du sol (Bordez et al. 2015). Parfois les quantités de topsoil disponibles ne suffisent pas et certaines surfaces doivent être restaurées sans topsoil (Amir et al. 2017). Les CMA étant des symbiotes obligatoires, ils ont besoin d'un accès quasi-continu à une plante hôte ; il en résulte que sur un sol dévégétalisé, la viabilité des propagules diminue fortement dans le temps (Jasper et al. 1988). L'exploitation minière laisse derrière elle de grandes surfaces dégradées, ce qui réduit la probabilité d'une dispersion des propagules de CMA et d'un rétablissement de la population dans un délai pertinent pour la restauration. Aujourd'hui, les inocula de CMA

commercialisés sont produits avec des méthodes qui favorisent les taxa les plus généralistes au détriment de la production de taxa adaptés à différents types de sols. En restauration, l'importance d'utiliser des plantes natives adaptées est essentielle (McKay et al. 2005) et il en est généralement de même pour les CMA, notamment en raison des conditions particulières des terrains dégradés. C'est le cas par exemple en Nouvelle-Calédonie où les milieux ultramafiques à restaurer sont défavorables aux isolats non natifs (Amir et al. 2008). Les différentes familles de CMA ont différentes stratégies de colonisation du sol et des racines et ces différences sont liées aux bénéfices apportés aux plantes par les CMA. Par exemple, les CMA de la famille des Gloméracées sont les plus utilisés dans les *inocula* commerciaux, car ils permettent une protection des plantes contre les pathogènes fongiques du sol et une nutrition en phosphore accrue de la plante, comparés aux Gigasporaceae qui produisent plus d'hyphes dans le sol et confèrent une meilleure tolérance aux métaux lourds (Maherali & Klironomos 2007). Les *inocula* commercialisés composés uniquement d'espèces de Glomeraceae ne sont donc pas idéaux pour des objectifs différents, tels que l'adaptation à des substrats très pauvres ou/et toxiques. Il faut notamment s'assurer que l'*inoculum* de CMA soit compatible avec le type de sol et améliore le fitness de la plante hôte (Ji et al. 2010 ; Doubková et al. 2011) dans les conditions de la restauration d'un écosystème particulier. Les recherches ont également montré qu'on ne peut prévoir l'effet de l'introduction d'un microorganisme du sol non natif dans un écosystème, cette introduction pouvant faciliter le développement de plantes non natives (Shah et al. 2009). L'utilisation d'un sol local ou/et de plantes natives pour isoler des CMA afin de développer un *inoculum* serait donc beaucoup moins risqué et plus efficace pour une restauration des sites pollués. En plus du type d'*inoculum*, la méthode d'application peut également influencer le résultat. Les méthodes les plus courantes pour l'utilisation de CMA consistent à inoculer en pépinière les plantes d'intérêts avec les CMA (inoculation avec du sol ou des spores) puis à transplanter, une fois l'*inoculum* bien installé, ces plantes sur le terrain. D'autres méthodes consistent à appliquer l'*inoculum* directement sur le terrain dans des sillons avec les semis ou en utilisant la méthode d'enrobage des semences qui lie directement l'*inoculum* au semis (alginate) (Douds et al. 2005 ; Berruti et al. 2016). Des méthodes dites d'applications « non ciblées » existent également et consistent en l'application d'un *inoculum* mélangé à du sol ou à de l'eau sur le terrain ; ces méthodes peuvent également affecter les plantes mycotrophes non-indigènes et favoriser leur développement. Ces plantes peuvent alors envahir la zone à restaurer et empêcher la réinstallation des plantes natives de l'écosystème à restaurer (Shah et al. 2009 ; Wang & Qiu 2006).

V. Le contexte néo-calédonien

A. Contexte géographique et climatique

La Nouvelle-Calédonie (18°-23°S, 163-168°E) est un archipel mesurant 18 575 km² de superficie, situé dans le pacifique sud à 1200 km à l'est de l'Australie et 1700 km au nord de la Nouvelle Zélande. Il est composé d'une île principale nommée « Grande Terre » qui à elle seule occupe 16 664 km², elle est divisée selon l'axe N-S par une chaîne montagneuse qui culmine au Nord à 1629 m (Mont Panié). Cet axe sépare l'île en deux régions aux paysages différents : la côte Est, présente des pentes abruptes, des vallées profondes et luxuriantes, peuplées majoritairement de forêts humides ; la côte Ouest, caractérisée par la présence de plaines permettant la culture et l'élevage, ces plaines sont surplombées par des massifs riches en nickel. La Nouvelle-Calédonie est composée de la grande terre et des îles Loyautés (Maré, Lifou et Ouvéa). Depuis juillet 2008, l'UNESCO a inscrit les lagons de la Nouvelle-Calédonie au patrimoine mondial. Ils sont malheureusement au cœur des débats et programmes de conservation, car ils sont touchés par les risques de pollution provoqués par les rejets sédimentaires miniers (Ouillon et al. 2010).

Le climat de la Nouvelle-Calédonie est de type océanique tropical. Ce climat est caractérisé par deux saisons. Une saison chaude ou été austral (novembre ; avril), soumise à d'abondantes précipitations de janvier à avril et des températures élevées (en moyenne 26,2°C) créant un climat tropical. Cependant l'influence maritime et l'alizé régulent ces dernières. C'est à cette saison que la Nouvelle-Calédonie subit les cyclones. La fin de la saison chaude laisse place à une période de transition (avril ; mai) ; durant cette période les perturbations tropicales sont rares et la pluviosité diminue, tout comme la température de l'air. La deuxième saison est dite saison fraîche (mai ; septembre). Des perturbations d'origine polaire traversent la mer de Tasman et atteignent la Nouvelle-Calédonie. La température de l'air atteint alors son minimum annuel (en moyenne 19,9°C). Il y a ensuite une période intermédiaire (août ; novembre) caractérisée par un climat plus sec et ensoleillé, et une température qui augmente progressivement. La pluviométrie est alors à son minimum annuel et l'alizé souffle en quasi-permanence. Durant cette période, les feux de brousse se propagent facilement sur une végétation déshydratée, l'évapotranspiration des plantes n'étant plus compensée par les précipitations.

La pluviométrie moyenne est de 1700 mm/an sur la Grande Terre et varie en fonction du relief et de l'exposition au flux quasi permanent des alizés (Est et Sud-Est). Ces vents conditionnent la répartition des précipitations, nettement plus importantes sur la Côte Est, les montagnes et le Sud. Le climat de la côte Ouest subissant l'effet de Foehn (augmentation de la température et diminution de la pluviométrie en aval de l'obstacle rencontré par le vent), peut-être semi-aride dû à une pluviométrie annuelle inférieure à 800 mm. A l'intérieur de la Grande Terre, sur les massifs montagneux (moitié de la superficie de la Grande Terre), la pluviométrie dépasse 1500 mm/an. La moyenne d'insolation en Nouvelle-Calédonie est d'environ 2500 heures/an. Le climat l'isolement et les caractéristiques édaphiques du sol ont permis de contribuer à la présence d'un grand endémisme de la faune et de la flore.

B. Contexte géologique

La Grande Terre et les îles qui l'entourent, sont l'émergence de la partie terminale nord de la ride de Norfolk qui s'étend au sud jusqu'à la Nouvelle Zélande et qui est une relique d'un bloc continental détaché de la marge nord orientale (Australie) du super continent de Gondwana. Ce détachement aurait eu lieu vers la fin du Crétacé, il y a 90 millions d'années. Ce bloc aujourd'hui en grande partie immergé, est dénommé Zealandia les seules parties immergées de ce continent étant la Nouvelle-Calédonie et l'île du sud et du nord de la Nouvelle-Zélande. A l'est, les îles Loyauté font partie d'un arc volcanique (Kroenke 1984 ; Schellart 2006). A l'ouest de la Grande Terre et de la ride de Norfolk, deux bassins océaniques (New Caledonian basin, Fairway basin) sous une tranche d'eau de 1500 et 3000 m de profondeur, résultent de l'étirement crustal de Zealandia. Dans ces bassins la croûte continentale est amincie (10-15 km) et couverte de sédiments du crétacé et paléogènes (8-5 km d'épaisseur). Zealandia fait partie de la Plaque Australienne qui dérive vers l'est nord-est et plonge (subduction) sous la plaque Pacifique à l'ouest de l'arc volcanique du Vanuatu. La subduction est marquée par une fosse sous-marine (fosse des Nouvelles-Hébrides) dont la profondeur est d'environ 7000 m. L'archipel du Vanuatu résulte du volcanisme. Il comporte plusieurs volcans actifs qui font partie de la ceinture de feu du Pacifique.

La Grande Terre de la Nouvelle-Calédonie est constituée en majeure partie de formations sédimentaires et volcaniques datant du Permien (225-280 millions d'années) du Cénozoïque ou du Tertiaire (1,5 - 65 MA). Les formations les plus anciennes allant du Permo-Carbonifère au Jurassique proviendraient d'arcs volcaniques et de sédiments volcano-

sédimentaires collés à la marge orientale du bloc Gondwanien Zealandia lors de sa dérive. L'orogénie qui a constitué la Grande Terre de la Nouvelle-Calédonie actuelle s'est faite au Paléogène (23-65 MA) et plus précisément à la fin de l'Eocène et début de l'Oligocène (environ 30 MA). Elle est marquée par l'obduction (passage d'une plaque sur une autre) de la plaque Pacifique sur la Plaque Australienne avec charriage vers le nord-ouest d'un plancher océanique basaltique, puis un nouveau charriage sur celui-ci d'un feuillet du manteau ultrabasique lequel est normalement sous le plancher océanique. Les formations basaltiques (côte Ouest) sont les restes de l'ancien plancher océanique de la plaque Pacifique obductée sur les sédiments crétacés et éocènes en marge de Zealandia. Les importants massifs de roches ultrabasiques charriées sur les formations basaltiques sont en superficie parmi les plus importants au monde. Les substrats ultramafiques (syn. serpentiniques) dérivent de roches sous-marines déposées sur la croûte continentale lors de phénomènes d'obduction (Chevillotte 2005).

C. Les milieux ultramafiques et les CMA

Les sols ultramafiques représentent 3% des terres émergées de notre planète, et sont présents dans différentes régions du monde (Nouvelle-Calédonie, Californie, Cuba, Afrique du sud, Europe du sud, Sud Est de l'Asie et à l'Ouest de l'Australie) (Coleman & Jove 1992 ; Guillot & Hattori 2013). Les roches ultramafiques sont caractérisées par de très faibles teneurs en silice (moins de 45% en masse – caractère basique), et de fortes teneurs en minéraux riches en magnésium et en fer (plus de 90% de leurs constituants – caractère mafique). Les sols ultramafiques représentent des habitats exceptionnels de par leurs propriétés physico-chimiques, caractérisant le « syndrome serpentinique » (L'Huillier et al. 2010). Ces sols présentent très peu d'éléments minéraux essentiels (N, P, K) et peu de matière organique ce qui engendre une faible capacité d'échange cationique, et une faible disponibilité en eau. Ces sols présentent également un ratio Ca/Mg très faible, ainsi qu'un taux élevé en métaux lourds potentiellement phytotoxiques (majoritairement Cr, Co, et Ni) (Brady et al. 2005 ; Kazakou et al. 2008). Ces contraintes édaphiques inhabituelles ont favorisé une importante spéciation des organismes vivants par radiation adaptative, d'organismes pré-adaptés aux contraintes de ces substrats (Harrison & Rajakaruna 2011). Les écosystèmes ultramafiques sont connus pour leur biodiversité adaptée à la tolérance aux métaux, et leur fort taux d'endémisme, à la fois pour la flore (Whiting et al. 2004), la faune (Chazeau 1993) ainsi pour l'originalité de la microflore (Wettberg & Wright 2011). Les milieux ultramafiques sont depuis des années un modèle d'étude pour la compréhension des mécanismes

d'adaptation, de différenciation éco-typique, de spéciation et de sélection naturelle (Amir et al. 2014b). D'autre part, les milieux ultramafiques représentent des gîtes métallifères d'importance mondiale, indispensables aux besoins de notre société (Harrison & Rajakaruna 2011). En effet, en raison de leur origine géologique et de leur composition chimique unique, les substrats ultramafiques contiennent de nombreux minéraux (jadéite, magnésite, amiante...) et minerais métalliques ayant de fortes valeurs commerciales (Ni, Fe, Al, Cr, Co, Mn). Les milieux ultramafiques connaissent des dégradations importantes liées à l'industrie minière et présentent parfois de forts risques d'extinction des espèces. Les écotypes associés aux milieux ultramafiques font partie des principaux « hotspot » (Whiting et al. 2004). Chaque espèce vivant dans ces milieux a dû développer un mécanisme d'adaptation pour tolérer les contraintes des sols ultramafiques. Un de ces mécanismes est la symbiose des plantes avec les CMA.

Ces sols étant très peu fertiles et riches en métaux lourds, la symbiose mycorhizienne est d'une importance cruciale pour permettre aux plantes de vivre dans ces écosystèmes (Southworth et al. 2014). Les CMA jouent un rôle important dans le soutien de la croissance et du développement des plantes présentes dans les sols ultramafiques grâce à l'amélioration de la nutrition hydrique et minérale et grâce au fait qu'il confère une tolérance aux métaux lourds (Husna et al. 2017). Les CMA des sols ultramafiques sont également impliqués dans l'adaptation, dans la distribution et dans la succession des communautés végétales de ces écosystèmes (Hopkins 1987 ; Castelli & Casper 2003 ; Perrier et al. 2006 ; Husna et al. 2016a). La tolérance aux métaux lourds des plantes est fonction de différents facteurs tels que la composition physicochimique du sol (concentration en métaux), l'espèce de plantes, et les isolats de CMA en interactions (Amir et al. 2013). Sur les sols ultramafiques les CMA ont un rôle majeur pour l'absorption de nutriments non assimilables par les plantes (Southworth et al. 2014).

La symbiose endomycorhizienne sur sol ultramafique a été retrouvée dans des régions tempérées et tropicales (Southworth et al. 2014 ; Husna et al. 2015). Les CMA sont associés à des plantes herbacées et ligneuses sur sol ultramafique en Californie, en Italie, en Pennsylvanie, en Nouvelle-Calédonie, dans le Maryland et dans le sud de l'Indonésie (Hopkins 1987 ; Castelli & Casper 2003 ; Perrier et al. 2006 ; Cumming & Kelly 2007 ; Setiadi & Setiawan 2011 ; Husna et al. 2014 ; 2015 ; 2017). Lagrange et al. (2011) rapportent que les Cyperaceae des milieux ultramafiques de Nouvelle-Calédonie sont endomycorhizées alors qu'habituellement cette famille de plante n'est pas endomycorhizée. Sur sols ultramafiques, les CMA sont également associées avec des plantes hyper-accumulatrices de

Nickel (Turnau & Mesjasz-Przbylowicz 2003 ; Amir et al. 2007). En Nouvelle-Calédonie la plante hyperaccumulatrice de Ni *Phyllanthus favieri*, vivant en forêt humide ultramafique, présente une plus forte teneur en Ni des feuilles lorsque sa colonisation par les CMA est faible (Perrier et al. 2006). Amir et al. (2007) comparent ensuite les taux de mycorhization de plantes non hyperaccumulatrices et hyperaccumulatrices de Ni (*Sebertia acuminata*, *Psychotria douarrei*, *Phyllanthus favieri*) sur sol ultramafique. Les plantes hyperaccumulatrices présentent un plus faible taux de colonisation par les CMA que les non hyperaccumulatrices. Par ailleurs, pour chacune de ces 3 espèces hyperaccumulatrices de Ni, une forte corrélation négative existe entre les teneurs en Ni dans les feuilles et le taux de mycorhization. Les CMA retrouvés comme étant associés aux plantes des milieux ultramafiques appartiennent aux genres *Archaespora*, *Acaulopsora*, *Diversispora*, *Scutellospora*, *Racocetra*, *Cetraspora* *Pacispora*, *Glomus*, *Sclerocystis*, *Funneliformis*, *Rhizophagus*, *Claroideoglomus*, et *Paraglomus* (Gensous 2014 ; Husna et al. 2017).

Une forte concentration de Ni réduit la sporulation et la diversité des CMA (Perrier et al. 2006 ; Cumming & Kelly 2007 ; Amir et al. 2007) ainsi que le taux de colonisation des racines par les CMA (Lagrange et al. 2011 ; Amir et al. 2013). Une étude en République Tchèque réalisée par Doubková et al. (2011) indique que la colonisation par les CMA des racines de *Knautia sparsiflora* est plus faible sur sol ultramafique que sur un sol non ultramafique, et indique qu'il existe une corrélation positive entre le taux de colonisation des racines par les CMA d'une part et certains caractères du sol (pH, Ca, K, Ca/Mg). Schechter et Bruns (2008) montrent qu'il n'y a pas de différence entre un milieu ultramafique et un milieu non ultramafique pour les taux de colonisation des plantes par les CMA et la diversité de ces derniers. Les CMA isolés à partir des racines de plantes hyperaccumulatrices de Ni en milieu ultramafique sont plus tolérants au Ni que les isolats de CMA provenant des racines de plantes non hyper-accumulatrices (Amir et al. 2008). Ces auteurs ont révélé que cinq isolats de *Glomus* spp. provenant de sol ultramafique étaient capables de germer sur un milieu contenant jusqu'à 30 µg/g de Ni, alors que les isolats provenant de milieu non-ultramafique ne germaient plus à partir 15 µg/g de Ni. Une étude menée en Nouvelle-Calédonie sur deux isolats proches de *C. etunicatum* inoculés séparément sur des plantes d'intérêts pour la restauration des milieux ultramafiques, a permis de démontrer le rôle protecteur des CMA vis-à-vis de la toxicité du Ni (Amir et al. 2013). L'application des CMA peut aussi diminuer le contenu en Ni de certaines plantes telles que *Phaseolus vulgaris* (Guo et al. 1996), *Trifolium repens* (Vivas et al. 2006), *Costularia comosa* (Lagrange et al. 2011 ; 2013) *Knautia arvensis* (Doubková et al. 2011), *Alphitonia neocaledonica* et *Cloezia artensis* (Amir et al. 2013). Une

forte accumulation de Ni dans les plantes endomycorhizées serait due à une augmentation de l'activité de la synthèse de glutamine (chélate de nickel) dans les racines (Ker et Christine 2009). Les CMA peuvent être utilisés pour la phytoremédiation, pour la phytoextraction, pour la phytostabilisation et pour « l'agro mine » du Ni (Husna et al. 2017).

L'inoculation de plantes avec des CMA natifs de ces milieux, dans des contextes de restauration écologique après une exploitation minière, permet d'augmenter la croissance des plantes réintroduites, leur biomasse, et leur taux de survie (Gensous 2014 ; Orłowska et al. 2011). En conditions expérimentales, les CMA natifs des milieux ultramafiques augmentent la biomasse des plantes hyperaccumulatrices de Ni (Turnau & Mesjasz-Przybyłowics 2003). Une étude expérimentale sur sol ultramafique a montré que *Gigaspora gigantea* augmentait la biomasse végétale de *Schizachyrium* et d'*Andropogon*, alors que *C. etunicatum* diminuait la biomasse d'*Andropogon* (Gustafson & Casper 2004). En Nouvelle-Calédonie sur les sols ultramafiques l'inoculation d'un isolat proche de *C. etunicatum* sur 2 espèces endémiques *Alphitonia neocaledonica*, et *Cloezia artensis* a permis d'augmenter leurs biomasses et leurs teneurs en P (Amir et al. 2013). Boulet & Lambers (2005) constatent que l'inoculation par des CMA induit une diminution de la croissance des plantes mais augmente la teneur en P et en K dans la partie aérienne des plantes en milieu ultramafique. Il a également été rapporté que les concentrations de P, Ca, Zn et Cu dans les plantes mycorhizées (*Berkheya coddii*) en milieu ultramafique étaient plus élevées que dans les plantes non mycorhizées (Orłowska et al. 2008). L'inoculation de *Costularia comosa* (Nouvelle-Calédonie) par des CMA augmente la biomasse totale de la plante de 185 % (Lagrange et al. 2011). L'inoculation de CMA natifs des milieux ultramafiques augmente l'absorption de P chez *Knautia arvensis* (Doubková et al. 2011). L'inoculation des CMA augmente le contenu en Ni de la plante hyperaccumulatrices *Berkheya coddii* (Turnau & Mesjasz-Przybyłowics 2003 ; Orłowska et al. 2011) et du tournesol (Ker & Charest 2009). La colonisation par *Rhizophagus intraradices* augmente la biomasse sèche du tournesol en présence de Ni (Ker & Charest 2010) comparé aux plantes non endomycorhizées (Ker & Charest 2010). Les CMA augmentent également la croissance des plantes et l'absorption du P de *Knautia arvensis* en condition de stress hydrique (Doubkova et al. 2013). Les CMA associés aux plantes des milieux ultramafiques, ont donc un rôle primordial pour la croissance, la tolérance aux métaux lourds et l'amélioration de la nutrition des plantes vivant dans ces milieux extrêmes. De ce fait, les CMA natifs de ces milieux sont des outils biotechnologiques intéressants pour la restauration des sites miniers dégradés.

D. La restauration écologique des sites miniers dégradés de Nouvelle-Calédonie

En Nouvelle-Calédonie, les objectifs et les contraintes de la gestion des terrains miniers ultramafiques sont uniques en raison de leur biodiversité singulière (2150 espèces végétales pour un taux d'endémisme de 82 %), et de l'importance spatiale des zones ultramafiques (1/3 de la surface de l'île principale) (Jaffré & L'Huillier 2010). La flore des substrats ultramafiques néocalédoniens est plus riche et plus originale que la flore de l'ensemble des autres substrats géologiques du territoire et que l'ensemble des autres écosystèmes ultramafiques (Jaffré et al. 2001). Les sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie comportent des concentrations en métaux lourds généralement supérieures aux autres substrats ultramafiques de la planète. La flore des substrats ultramafiques de Nouvelle-Calédonie représente 35 % de la flore autochtone de l'archipel et 45,5 % de sa flore endémique (Jaffré & L'Huillier 2010). Cette flore métalphyte originale, en danger de par l'activité minière, est la raison principale pour laquelle ces écosystèmes ultramafiques font partie des principaux « hotspot » mondiaux de biodiversité (Whiting et al. 2004). Les substrats ultramafiques néo-calédoniens contiennent, près d'un quart des ressources mondiales en nickel (source INSG, 2014). Ce minerai, exploité depuis 1873, représente aujourd'hui un moteur essentiel du tissu industriel du pays (95 % des exportations, 10 % du PIB, 11,8 % au secteur de l'emploi) (ISEE, 2010). Avec une demande en nickel en constante augmentation (4% par an entre 2000 et 2010) (L'Huillier & Jaffré 2010), la Nouvelle-Calédonie fait face à une augmentation continue des pressions exercées par l'industrie minière sur ces écosystèmes. Les exploitations minières provoquent des perturbations des régimes hydriques qui favorisent les phénomènes d'érosion, d'engravements des cours d'eau, et des cours inférieurs des rivières, générant une pollution du lagon néo-calédonien. Elles engendrent aussi une perte de la biodiversité et un risque de disparition d'espèces (Oostermeijer et al. 2003 ; Honnay & Jacquemyn, 2006). Les risques de perte de biodiversité sont d'autant plus prononcés qu'il s'agit déjà d'écosystèmes en situation critique en raison de leur faible étendue, des phénomènes de micro-endémismes présents sur le territoire (Wulff, 2012), de leur fragmentation et des incendies fréquents. La Nouvelle-Calédonie est donc confrontée à un défi majeur qui est de conserver une ressource minière considérable pour le développement économique, sans impacter la biodiversité reconnue comme une des plus précieuses de la planète (Harrisson & Rajakaruna, 2011). Pour répondre à ce défi, il est impératif de développer des moyens de restauration des terrains miniers dégradés, afin que la

Nouvelle-Calédonie s'inscrit dans un processus de développement durable. En effet, une fois les ressources minières épuisées, les découvertes liées aux « ressources du vivant » contribueront probablement à un développement économique durable pour la Nouvelle-Calédonie (L'Huillier et al. 2010).

En Nouvelle-Calédonie, des recherches sur la revégétalisation des terrains miniers dégradés sur sols ultramafiques sont réalisés depuis une cinquantaine d'années, par les équipes scientifiques du territoire en relation avec les sociétés minières et les Provinces Sud et Nord (L'Huillier et al. 2010). Après quelques essais avec des espèces végétales compétitives et à croissance relativement rapide, mais peu adaptées aux substrats ultramafiques, les travaux ont été focalisés essentiellement sur le choix d'espèces indigènes pionnières des sites miniers et sur la maîtrise de leur culture (Jaffré & Pelletier 1992). Les espèces utilisées sont dites cicatricielles des maquis miniers et sont censées permettre d'amorcer une succession végétale secondaire. À l'heure actuelle, les travaux de revégétalisation utilisant ces espèces sont réalisés par plantation ou ensemencement (L'Huillier et al. 2010). La plantation est la première méthode utilisée à partir des années 1970, et la seule employée pendant plus de 20 ans. Cette méthode est largement utilisée, notamment sur les talus, les décharges ou encore sur les anciens sites d'exploitation. L'ensemencement consiste à déposer les graines directement sur le terrain à restaurer. Cette méthode est mise en œuvre manuellement ou mécaniquement. L'ensemencement, notamment l'ensemencement hydraulique (hydroseeding), a été développé à partir des années 1990 et représente dorénavant la technique la plus utilisée en termes de surfaces traitées (L'Huillier et al. 2010). Celle-ci permet contrairement aux plantations, de traiter rapidement des surfaces importantes y compris les fortes pentes. Ce procédé consiste à projeter sur les surfaces à réhabiliter, à l'aide d'un hydrosemoir (pompe montée sur un camion), un mélange de mulch, colle végétale, nutriments, engrais minéraux et organiques, et semences de diverses espèces.

Néanmoins, un bilan des essais de restauration menés depuis 1971 met en évidence la faiblesse de certains aspects des itinéraires techniques utilisés jusqu'à aujourd'hui (Amir et al. 2014b ; L'Huillier et al. 2014). Les coûts de préparation des terrains à restaurer, amendement et fertilisation, sont élevés. A cela s'ajoutent les coûts et difficultés d'approvisionnement en plants ou en semences (Fogliani, 2011), ces coûts pouvant représenter jusqu'à 40% du coût technique total (Fogliani, 2011). De plus, les résultats observés sont souvent insuffisants en termes de densité et de diversité spécifique. Les itinéraires techniques de restauration néo-calédoniens ne maîtrisent qu'un faible pourcentage des espèces végétales identifiées sur

maquis miniers (Entre 10 et 20 %, VALE-NC, Mac Coy comm.pers. Koniambo Nickel SAS, données internes). Toutefois, le but de la revégétalisation est uniquement d'amorcer un processus dynamique de développement et d'enrichissement progressif visant à recréer des écosystèmes sur le long terme. De nombreux auteurs soulignent également la faiblesse de ces outils dans l'absence de prise en compte des biotes du sol comme un des principaux biais de ces méthodes, pourtant démontré comme essentiel au succès des travaux de restauration (De Deyn et al. 2003 ; Frouz et al. 2006 ; 2008).

Ainsi, si des progrès ont été réalisés, les résultats des travaux de restauration en Nouvelle-Calédonie demeurent encore fluctuants et les recherches sont poursuivies. Depuis quelques années, des avancées significatives ont été obtenues et une revégétalisation dans l'optique d'une restauration écologique, avec une diversité minimale d'espèces natives est désormais pratiquée dans la majorité des opérations de restauration. L'intérêt des recherches se porte aujourd'hui sur une meilleure compréhension du fonctionnement de l'interface sol/plante, et notamment sur l'utilisation des CMA et du sol de surface (topsoil) (Amir et al. 2003 ; Amir et al. 2014b). L'exploitation nécessite de décapé des zones naturelles pour avoir accès au minerai de Ni, ce qui induit l'élimination de tous les organismes vivants sur le site à exploiter. Le sol décapé (topsoil) est ensuite stocké en tas pour être utilisé après exploitation de la zone pour la restauration écologique. Cette couche de sol contient la banque de graines et tous les microorganismes du sol. Le stockage de ce topsoil diminue fortement son potentiel biologique (Bordez 2015), avec notamment un appauvrissement, voire une disparition des CMA. Pour la restauration écologique l'utilisation de CMA natifs de ces milieux est nécessaire ; il est donc primordial d'isoler, d'identifier, de caractériser et de réaliser une production de masse de ces espèces de CMA pour permettre leur réintroduction sur le terrain afin de restaurer les milieux dégradés de façon durable.

Bibliographie

- Abbott LK (1982) Comparative Anatomy of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas Formed on Subterranean Clover. *Aust J Bot* 30:485–499. doi: 10.1071/bt9820485
- Abu-Zeyad R, Khan AG, Khoo C (1999) Occurrence of arbuscular mycorrhiza in *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and production of castanospermine. *Mycorrhiza* 9:111–117. doi: 10.1007/s005720050008
- Allen JW, Shachar-Hill Y (2009) Sulfur Transfer through an Arbuscular Mycorrhiza. *Plant Physiol* 149:549–560 . doi: 10.1104/pp.108.129866
- Allen MF (1991) *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press, Cambridge, p 184.
- Allen MF (1987) “Ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizae in an arid ecosystem: use of natural processes promoting dispersal and establishment,” *Mycorrhizae Decade Practical Applications and Research Priorities 7th NACOM IFAS* (Gainesville, FL), 133–135.
- Amir H, Fogliani B, Gensous S, Durrieu G, L’Huillier L, Saintpierre D, Lagrange A, Reck A. (2017) Analyse et synthèse des expérimentations et actions de restauration écologique réalisées sur sites miniers en Nouvelle-Calédonie depuis 30 ans. Rapport final _ Projet RECOSYNTH, CNRT « Nickel & son environnement », Ed. CNRT.
- Amir H, Jourand P, Cavaloc Y, Ducouso M, (2014a). Role of mycorrhizal fungi on the alleviation of heavy metal toxicity on plant. Pages 241-258. *In: Mycorrhizal fungi: Use in sustainable agriculture and forestry*. Z. Solaiman, L. Abbott, A. Varma Eds, Soil Biology Series, Springer, Heidelberg, Germany. Vol 41, 407 p.
- Amir H, L’Huillier L, Fogliani B, Cavaloc Y, Jourand P et al. (2014b) Caractérisation et fonctionnement du système sol/ plante/ microorganismes dans les maquis miniers. Perspectives d’application à la restauration écologique. Rapport Final - Projet ECOMINE BIOTOP - CNRT « Nickel & son environnement, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Amir H, Lagrange A, Hassaïne N, Cavaloc Y (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza* 23:585–595. doi: 10.1007/s00572-013-0499-6
- Amir H, Jasper DA, Abbott LK (2008) Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils. *Mycorrhiza* 19:1–6. doi: 10.1007/s00572-008-0197-y
- Amir H, Perrier N, Rigault F, Jaffré T (2007) Relationships between Ni-hyperaccumulation and mycorrhizal status of different endemic plant species from New Caledonian ultramafic soils. *Plant Soil* 293:23–35. doi: 10.1007/s11104-007-9238-0
- Amir H, Pineau R (2003) Relationships between extractable Ni, Co and other metals and some microbiological characteristics of different ultramafic soils from New-Caledonia. *Australian Journal of Soil Research*, 41 : 215-228.
- Antunes PM, Lehmann A, Hart MM, et al (2012) Long-term effects of soil nutrient deficiency on arbuscular mycorrhizal communities. *Functional Ecology* 26:532–540. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01953.x
- Aroca R, Alguacil M del M, Vernieri P, Ruiz-Lozano JM (2008) Plant Responses to Drought Stress and Exogenous ABA Application are Modulated Differently by Mycorrhization in

- Tomato and an ABA-deficient Mutant (Sitiens). *Microb Ecol* 56:704. doi: 10.1007/s00248-008-9390-y
- Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3–42. doi: 10.1007/s005720100097
- Augé RM (2004) Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. *Canadian Journal of Soil Science* 84:373–381.
- Augé RM, Toler HD, Saxton AM (2015) Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25:13–24. doi: 10.1007/s00572-014-0585-4
- Azcón-Aguilar C, Barea JM (1997) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6:457–464 . doi: 10.1007/s005720050147
- Baar J (2010) Restoration of plant communities in The Netherlands through the application of arbuscular mycorrhizal fungi. *Symbiosis* 52:87–94. doi: 10.1007/s13199-010-0105-z
- Badri A, Stefani FOP, Lachance G, et al (2016) Molecular diagnostic toolkit for *Rhizophagus irregularis* isolate DAOM-197198 using quantitative PCR assay targeting the mitochondrial genome. *Mycorrhiza* 26:721–733. doi: 10.1007/s00572-016-0708-1
- Bago B, Azcón-Aguilar C, Goulet A, Piché Y (1998) Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *The New Phytologist* 139:375–388.
- 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. doi: 10.1007/BF01415703
- Bahadur I, Maurya BR, Meena VS, et al (2017) Mineral Release Dynamics of Tricalcium Phosphate and Waste Muscovite by Mineral-Solubilizing Rhizobacteria Isolated from Indo-Gangetic Plain of India. *Geomicrobiology Journal* 34:454–466. doi: 10.1080/01490451.2016.1219431
- Baldauf null (1999) A Search for the Origins of Animals and Fungi: Comparing and Combining Molecular Data. *Am Nat* 154:S178–S188. doi: 10.1086/303292
- Baldauf SL, Palmer JD (1993) Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11558–11562
- Balestrini R, Gómez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P (2007) Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1055–1062.
- Balliu A, Sallaku G, Rewald B (2015) AMF Inoculation Enhances Growth and Improves the Nutrient Uptake Rates of Transplanted, Salt-Stressed Tomato Seedlings. *Sustainability* 7:15967–15981. doi: 10.3390/su71215799
- Balergue C, Chabaud M, Barker DG, et al (2013) High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Front Plant Sci* 4:. doi: 10.3389/fpls.2013.00426
- Bapaume L, Reinhardt D (2012) How membranes shape plant symbioses: signaling and transport in nodulation and arbuscular mycorrhiza. *Front Plant Sci* 3:. doi: 10.3389/fpls.2012.00223

- Bardgett RD, van der Putten WH (2014) Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* 515, 505–511.
- Barthlott W, Lauer W, Placke A (1996) Global distribution of species diversity in vascular plants: towards a world map of phytodiversity. *Erdkunde* 50:317-326.
- Bárzana G, Aroca R, Paz JA, et al (2012) Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Ann Bot* 109:1009–1017. doi: 10.1093/aob/mcs007
- Bárzana G, Aroca R, Ruiz-Lozano JM (2015) Localized and non-localized effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on accumulation of osmolytes and aquaporins and on antioxidant systems in maize plants subjected to total or partial root drying: Localized effects of AM symbiosis under drought. *Plant, Cell & Environment* 38:1613–1627. doi: 10.1111/pce.12507
- Beaudet D, Nadimi M, Iffis B, Hijri M (2013) Rapid Mitochondrial Genome Evolution through Invasion of Mobile Elements in Two Closely Related Species of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *PLOS ONE* 8:e60768. doi: 10.1371/journal.pone.0060768
- Bécard G, Douds DD, Pfeffer PE (1992) Extensive In Vitro Hyphal Growth of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Presence of CO₂ and Flavonols. *Appl Environ Microbiol* 58:821–825
- Bécard G, Pfeffer PE (1993) Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma* 174:62–68. doi: 10.1007/BF01404043
- Bécard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108:211–218. doi: 10.1111/j.1469-8137.1988.tb03698.x
- Bell, T. et al. (2005) The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436, 1157–1160.
- Benabdellah K, Azcón-Aguilar C, Valderas A, et al (2009a) GintPDX1 encodes a protein involved in vitamin B6 biosynthesis that is up-regulated by oxidative stress in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 184:682–693. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02978.x
- Benabdellah K, Merlos M-Á, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2009b) GintGRX1, the first characterized glomeromycotan glutaredoxin, is a multifunctional enzyme that responds to oxidative stress. *Fungal Genetics and Biology* 46:94–103. doi: 10.1016/j.fgb.2008.09.013
- Bender SF, Plantenga F, Neftel A, et al (2014) Symbiotic relationships between soil fungi and plants reduce N₂O emissions from soil. *The ISME journal* 8:1336–1345.
- Benjamin R (1961) Addenda to “The Merosporangiferous Mucorales.” *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* 5:11–19. doi: 10.5642/aliso.19610501.05
- Benjamin RK (1966) The Merosporangium. *Mycologia* 58:1–42. doi: 10.2307/3756986
- Berruti A, Borriello R, Beffa MTD, et al (2013) Application of nonspecific commercial AMF inocula results in poor mycorrhization in *Camellia japonica* L. *Symbiosis* 61:63–76. doi: 10.1007/s13199-013-0258-7
- Berruti A, Lumini E, Balestrini R, Bianciotto V (2016) Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let’s Benefit from Past Successes. *Front Microbiol* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01559

- Bever JD, Pringle A, Schultz PA (2003) Dynamics within the Plant — Arbuscular Mycorrhizal Fungal Mutualism: Testing the Nature of Community Feedback. In: Mycorrhizal Ecology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 267–292.
- Bhattacharya D, Yoon HS, Hackett JD (2004) Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *Bioessays* 26:50–60. doi: 10.1002/bies.10376
- Bidartondo MI, Read DJ, Trappe JM, et al (2011) The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biology Letters* 7:574–577. doi: 10.1098/rsbl.2010.1203
- Blackwell M (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* 98:426–438. doi: 10.3732/ajb.1000298
- Blakeslee AF (1904) Sexual Reproduction in the Mucorineae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 40:205–319. doi: 10.2307/20021962
- Błaszowski J, Kozłowska A, Crossay T, et al (2017) A new family, Pervetustaceae with a new genus, Pervetustus, and *P. simplex* sp. nov. (Paraglomerales), and a new genus, Innospora with *I. majewskii* comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina. http://www.ingentaconnect.com/content/schweiz/novh/pre-prints/content-nova_hedwigia_000_0_0_0000_0000_blaszkowski_0419_prepub. Accessed 3 Oct 2017
- Błaszowski J, Chwat G, Góralska A (2015) *Acaulospora ignota* and *Claroideoglomus hanlinii*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) from Brazil and Cuba. *Mycological Progress* 14:. doi: 10.1007/s11557-015-1042-2
- Błaszowski J, Chwat G, Góralska A, et al (2014) Two new genera, *Dominikia* and *Kamienskia*, and *D. disticha* sp. nov. in Glomeromycota. *Nova Hedwigia* 100:225–238. doi: 10.1127/nova_hedwigia/2014/0216
- Błaszowski J (2012) *Glomeromycota*. W. Szafer Institute of Botany. Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Bodelier PLE (2011) Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems. *Front. Microbiol.* 2, 80.
- Bonfante P, Anca I-A (2010) Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Plant Hormones* 1:363–383. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073504
- Bonkowski M, Roy J (2005) Soil microbial diversity and soil functioning affect competition among grasses in experimental microcosms. *Oecologia* 143:232–240. doi: 10.1007/s00442-004-1790-1
- Bonneau L, Huguet S, Wipf D, et al (2013) Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytol* 199:188–202. doi: 10.1111/nph.12234
- Bordez L (2015) *Stratégies de revégétalisation des maquis miniers nickélifères de Nouvelle-Calédonie : étude sur les potentiels biologiques des topsoils et leur gestion en vue de leur utilisation pour la restauration écologique des milieux dégradés*. Thèse de l'Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Borriello R, Bianciotto V, Orgiazzi A, et al (2014) Sequencing and comparison of the mitochondrial COI gene from isolates of Arbuscular Mycorrhizal Fungi belonging to Gigasporaceae and Glomeraceae families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75:1–10. doi: 10.1016/j.ympev.2014.02.012

- Borriello R, Lumini E, Girlanda M, et al (2012) Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biol Fertil Soils* 48:911–922. doi: 10.1007/s00374-012-0683-4
- Börstler B, Raab PA, Thiéry O, et al (2008) Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *New Phytologist* 180:452–465. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02574.x
- Börstler B, Renker C, Kahmen A, Buscot F (2006) Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity. *Biol Fertil Soils* 42:286–298. doi: 10.1007/s00374-005-0026-9
- Börstler B, Thiéry O, Sýkorová Z, et al (2010) Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology* 19:1497–1511. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04590.x
- Boudouresque C-F (2015) Taxonomy and Phylogeny of Unicellular Eukaryotes. In: *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer, Dordrecht, pp 191–257.
- Boulet FM, Lambers H (2005) Characterisation of arbuscular mycorrhizal fungi colonisation in cluster roots of shape *Hakea verrucosa* F. Muell (Proteaceae), and its effect on growth and nutrient acquisition in ultramafic soil. *Plant Soil* 269:357–367. doi: 10.1007/s11104-004-0908-x
- Brady KU, Kruckeberg AR, Jr HDB (2005) Evolutionary Ecology of Plant Adaptation to Serpentine Soils. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36:243–266. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105730
- Breullin F, Schramm J, Hajirezaei M, et al (2010) Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *The Plant Journal* 64:1002–1017. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04385.x
- Breullin-Sessoms F, Floss DS, Gomez SK, et al (2015) Suppression of Arbuscule Degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter4 Mutants Is Dependent on the Ammonium Transporter 2 Family Protein AMT2;3. *Plant Cell* 27:1352–1366. doi: 10.1105/tpc.114.131144
- Brooks RR (1987) *Serpentine and its vegetation: a multidisciplinary approach*. Dioscorides Press, Portland 454 p.
- Brundrett MC, Tedersoo L (2018) Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol* n/a-n/a. doi: [10.1111/nph.14976](https://doi.org/10.1111/nph.14976)
- Bucher M (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173:11–26. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01935.x
- Burki F (2014) The Eukaryotic Tree of Life from a Global Phylogenomic Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016147. doi: 10.1101/cshperspect.a016147
- Calvente R, Cano C, Ferrol N, et al (2004) Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in olive tree (*Olea europaea* L.) plantations and assessment of the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets. *Applied Soil Ecology*, 26(1): 11–19.

- Calvo-Polanco M, Molina S, Zamarreño AM, et al (2014) The Symbiosis with the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Rhizophagus irregularis* Drives Root Water Transport in Flooded Tomato Plants. *Plant Cell Physiol* 55:1017–1029. doi: 10.1093/pcp/pcu035
- Capella-Gutiérrez S, Marcet-Houben M, Gabaldón T (2012) Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol* 10:47. doi: 10.1186/1741-7007-10-47
- Caravaca F, Barea J M, Palenzuela J, et al (2003) Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 22(2): 103–111.
- Cárdenas-Flores A, Draye X, Bivort C, et al (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. doi: 10.1007/s00572-009-0295-5
- Carvalho LM, Caçador I, Martins-Loução MA (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance root cadmium and copper accumulation in the roots of the salt marsh plant *Aster tripolium* L. *Plant Soil* 285:161–169. doi: 10.1007/s11104-006-9001-y
- Casieri L, Lahmidi NA, Doidy J, et al (2013) Biotrophic transportome in mutualistic plant–fungal interactions. *Mycorrhiza* 23:597–625. doi: 10.1007/s00572-013-0496-9
- Castelli JP, Casper BB (2003) Intraspecific AM Fungal Variation Contributes to Plant-Fungal Feedback in a Serpentine Grassland. *Ecology* 84:323–336.
- Cavagnaro TR, Smith FA, Smith SE, Jakobsen I (2005) Functional diversity in arbuscular mycorrhizas: exploitation of soil patches with different phosphate enrichment differs among fungal species. *Plant, Cell & Environment* 28:642–650. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01310.x
- Cavalier-Smith T, Chao EEY (2003) Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* 154:341–358.
- Cavalier-Smith T (1991) Archamoebae: the ancestral eukaryotes? *Biosystems* 25:25–38. doi: 10.1016/0303-2647(91)90010-I
- Cavalier-Smith T (1987) The origin of fungi and pseudofungi. In: Rayner ADM (ed) *Evolutionary biology of fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 339–353.
- Chazeau J (1993) Research on New Caledonian Terrestrial Fauna: Achievements and Prospects. *Biodiversity Letters* 1:123–129. doi: 10.2307/2999756
- Chen BD, Li XL, Tao HQ, et al (2003) The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere* 50:839–846. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00228-X
- Chen X, Wu C, Tang J, Hu S (2005) Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. *Chemosphere* 60:665–671. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.029
- Chen XW, Wu FY, Li H, et al (2013) Phosphate transporters expression in rice (*Oryza sativa* L.) associated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonization under different levels of arsenate stress. *Environmental and Experimental Botany* 87:92–99. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.08.002

- Chevillotte V. (2005) Morphogenèse tropicale en contexte épirogénique modéré. Exemple de la Nouvelle-Calédonie (Pacifique Sud-Ouest). Université de la Nouvelle-Calédonie. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Christophersen HM, Smith FA, Smith SE (2012a) Unraveling the Influence of Arbuscular Mycorrhizal Colonization on Arsenic Tolerance in Medicago: *Glomus mosseae* is More Effective than *G. intraradices*, Associated with Lower Expression of Root Epidermal Pi Transporter Genes. *Front Physiol* 3. doi: 10.3389/fphys.2012.00091
- Christophersen HM, Smith FA, Smith SE (2012b) Unraveling the Influence of Arbuscular Mycorrhizal Colonization on Arsenic Tolerance in Medicago: *Glomus mosseae* is More Effective than *G. intraradices*, Associated with Lower Expression of Root Epidermal Pi Transporter Genes. *Front Physiol* 3. doi: 10.3389/fphys.2012.00091
- Cicatelli A, Lingua G, Todeschini V, et al (2010) Arbuscular mycorrhizal fungi restore normal growth in a white poplar clone grown on heavy metal-contaminated soil, and this is associated with upregulation of foliar metallothionein and polyamine biosynthetic gene expression. *Ann Bot* 106:791–802. doi: 10.1093/aob/mcq170
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* 130:259–265. doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03047.x
- Clark RB, Zeto SK (2000) Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* 23:867–902. doi: 10.1080/01904160009382068
- Coleman R, Jove C (1992) Geological origin of serpentinites. In: Baker AJM, Proctor J, Reeves RD (eds) *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*. Intercept Ltd, Andover, pp 1–18.
- Colin F, Brimhall G, Nahon D, Lewis C, Baronnet A, Danti K (1992) Equatorial rain forest lateritic mantles: A geomembrane filter. *Geology* 20:523–526.
- Cordell D, Drangert J-O, White S (2009) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19:292–305. doi: [10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009](https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009)
- Cornejo P, Azcón-Aguilar C, Miguel Barea J, Ferrol N (2004) Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett* 241:265–270. doi: 10.1016/j.femsle.2004.10.030
- Cornejo P, Meier S, Borie G, et al (2008) Glomalinal-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Science of The Total Environment* 406:154–160. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.07.045
- Cornejo P, Pérez-Tienda J, Meier S, et al (2013) Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biology and Biochemistry* 57:925–928. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.10.031
- Corradi N, Croll D, Colard A, et al (2007) Gene Copy Number Polymorphisms in an Arbuscular Mycorrhizal Fungal Population. *Appl Environ Microbiol* 73:366–369. doi: 10.1128/AEM.01574-06
- Corsaro D, Walochnik J, Venditti D, et al (2014) Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage Rozellomycota. *Parasitology Research* 113:1909–1918. doi: 10.1007/s00436-014-3838-4

- Croll D, Giovannetti M, Koch AM, et al (2009) Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* 181:924–937 . doi: [10.1111/j.1469-8137.2008.02726.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02726.x)
- Cumming JR, Kelly CN (2007b) *Pinus virginiana* Invasion Influences Soils and Arbuscular Mycorrhizae of a Serpentine Grassland. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 134:63–73.
- Cuvelier ML, Ortiz A, Kim E, et al (2008) Widespread distribution of a unique marine protistan lineage. *Environmental Microbiology* 10:1621–1634. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01580.x
- Dalpè Y, Monreal M (2004) Arbuscular Mycorrhiza Inoculum to Support Sustainable Cropping Systems. *Crop Management* 3:0–0. doi: 10.1094/CM-2004-0301-09-RV
- Das I, Pradhan M (2016) Potassium-Solubilizing Microorganisms and Their Role in Enhancing Soil Fertility and Health. In: *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer, New Delhi, pp 281–291.
- de Andrade SAL, da Silveira APD, Jorge RA, de Abreu MF (2008) Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *Int J Phytoremediation* 10:1–13. doi: 10.1080/15226510701827002
- De Boer W, Kowalchuk GA (2001) Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 33:853–866. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00247-9
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernández F, et al (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytol* 165:261–271. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01236.x
- De Deyn GB, Raaijmakers CE, Zoomer HR (2003) Soil invertebrate fauna enhance grassland succession and diversity. *Nature*, 422 : 711–713.
- Declerck S, D’Or D, Bivort C, de Souza FA (2004) Development of extraradical mycelium of *Scutellospora reticulata* under root-organ culture: spore production and function of auxiliary cells. *Mycol Res* 108:84–92.
- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C (1998) Monoxenic Culture of the Intraradical Forms of *Glomus* sp. Isolated from a Tropical Ecosystem: A Proposed Methodology for Germplasm Collection. *Mycologia* 90:579–585. doi: 10.2307/3761216
- Degola F, Fattorini L, Bona E, et al (2015) The symbiosis between *Nicotiana tabacum* and the endomycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* increases the plant glutathione level and decreases leaf cadmium and root arsenic contents. *Plant Physiology and Biochemistry* 92:11–18. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.04.001
- del Campo J, Ruiz-Trillo I (2013) Environmental Survey Meta-analysis Reveals Hidden Diversity among Unicellular Opisthokonts. *Mol Biol Evol* 30:802–805. doi: 10.1093/molbev/mst006
- Delaux P-M, Bécard G, Combier J-P (2013) NSP1 is a component of the Myc signaling pathway. *New Phytol* 199:59–65. doi: 10.1111/nph.12340
- Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, Reich PB, et al (2016) Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications* 7:10541 . doi: [10.1038/ncomms10541](https://doi.org/10.1038/ncomms10541)
- Didier ES, Becnel JJ, Kent ML, et al (2014) 5 Microsporidia. In: *Systematics and Evolution*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 115–140.

- Dobson C (2008) Ecological field studies: through field studies, students learn scientific process and ecological content. *The Science Teacher* 2/01/2008.
- Doubková P, Vlasáková E, Sudová R (2013) Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. *Plant Soil* 370:149–161. doi: 10.1007/s11104-013-1610-7
- Doubková P, Suda J, Sudová R (2012) The symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi contributes to plant tolerance to serpentine edaphic stress. *Soil Biology and Biochemistry* 44:56–64. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.09.011
- Doubková P, Suda J, Sudová R (2011) Arbuscular mycorrhizal symbiosis on serpentine soils: the effect of native fungal communities on different *Knautia arvensis* ecotypes. *Plant Soil* 345:325–338. doi: 10.1007/s11104-011-0785-z
- Douds Jr DD, Nagahashi G, Pfeffer PE, et al (2005) On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum. *Canadian Journal of Plant Science* 85:15–21.
- Douhan GW, Petersen C, Bledsoe CS, Rizzo DM (2005) Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? *Mycorrhiza* 15:365–372. doi: 10.1007/s00572-004-0341-2
- Ehrlich PR et Ehrlich AH (1981) *Extinction: The Causes and Consequences of the Disappearance of Species* Random House.
- Farmer MJ, Li X, Feng G, et al (2007) Molecular monitoring of field-inoculated AMF to evaluate persistence in sweet potato crops in China. *Applied Soil Ecology* 35:599–609. doi: 10.1016/j.apsoil.2006.09.012
- Faye A, Dalpé Y, Ndung'u-Magiroyi K, et al (2013) Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inoculants. *Canadian Journal of Plant Science* 93:1201–1208. doi: 10.4141/cjps2013-326
- 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. doi: 10.1016/j.funeco.2009.07.003
- Ferrol N, Tamayo E, Vargas P (2016) The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany* 67:6253–6265. doi: 10.1093/jxb/erw403
- Field KJ, Rimington WR, Bidartondo MI, et al (2015) First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. *New Phytol* 205:743–756. doi: 10.1111/nph.13024
- Fogliani B, L'Huillier L (2011) Has the soil seed bank the capacity to restore high biodiversity areas? Some case studies from New caledonian ultramafic environment Communication, SER's 4th World Conference on Ecological Restoration (Society for Ecological Restoration International) In: August 21-25, 2011, Merida, Mexico.
- Fortin JA, Plenchette C, Piché Y (2015) L'essor de la nouvelle révolution verte. *Quae.com*. <http://www.quae.com/fr/r4798-les-mycorhizes.html>.
- Frouz J, Prach K, Pizl V, Háněla L, Starýa J et al (2008) Interactions between soil development, vegetation and soil fauna during spontaneous succession in post mining sites. *European Journal of Soil Biology*, 44 : 109–121.

- Frouz J, Elhottova D, Kuraz V, Sourkova M (2006) Effect of soil macrofauna on other soil biota and soil formation in reclaimed and non reclaimed post mining sites: a result of field microcosms experiment. *Applied Soil Ecology*, 33 : 308–320.
- Gadella C, Bass D, Forn I, et al (2011) Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature* 474:200.doi: 10.1038/nature09984
- Galli U, Schüepp H, Brunold C (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 92:364–368.doi: 10.1111/j.1399-3054.1994.tb05349.x
- Gamper HA, Young JPW, Jones DL, Hodge A (2008) Real-time PCR and microscopy: Are the two methods measuring the same unit of arbuscular mycorrhizal fungal abundance? *Fungal Genetics and Biology* 45:581–596.doi: 10.1016/j.fgb.2007.09.007
- Gandolfi A, Sanders IR, Rossi V, Menozzi P (2003) Evidence of recombination in putative ancient asexuals. *Mol Biol Evol* 20:754–761.doi: 10.1093/molbev/msg081
- Gange AC (2006) Insect–mycorrhizal interactions: patterns, processes, and consequences. T. Ohgushi, T.P. Craig, P.W. Price (Eds.), *Indirect Interaction Webs: Nontrophic Linkages Through Induced Plant Traits*, Cambridge University Press (2006), pp. 124-144
- Garcia K, Zimmermann SD (2014) The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Front Plant Sci* 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00337
- Garg N, Aggarwal N (2012) Effect of mycorrhizal inoculations on heavy metal uptake and stress alleviation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. genotypes grown in cadmium and lead contaminated soils. *Plant Growth Regulation* 66:9–26. doi: 10.1007/s10725-011-9624-8
- Garg N, Kaur H (2013) Response of Antioxidant Enzymes, Phytochelatins and Glutathione Production Towards Cd and Zn Stresses in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Genotypes Colonized by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *J Agro Crop Sci* 199:118–133. doi: 10.1111/j.1439-037X.2012.00533.x
- Genre A, Chabaud M, Balzergue C, et al (2013) Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol* 198:190–202. doi: 10.1111/nph.12146
- Gensous S. (2014) Les champignons mycorrhiziens à arbuscules des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. Diversité, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte ultramafique et interaction avec des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes. Thèse de l'Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46:235–244. doi: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0
- Gerdemann JW, Trappe JM (1974) *The Endogonaceae in the Pacific Northwest*. New York Botanical Garden in collaboration with the Mycological Society of America.
- Gharizadeh B, Eriksson J, Nourizad N, et al (2004) Improvements in Pyrosequencing technology by employing Sequenase polymerase. *Analytical Biochemistry* 330:272–280. doi: 10.1016/j.ab.2004.03.018
- Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (1983) The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. In: *Tree Root Systems and Their Mycorrhizas*. Springer, Dordrecht, pp 197–209.

- Gil-Cardesa ML, Ferri A, Cornejo P, Gomez E (2014) Distribution of chromium species in a Cr-polluted soil: Presence of Cr(III) in glomalin related protein fraction. *Science of The Total Environment* 493:828–833. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.080
- Giovannetti M, Tolosano M, Volpe V, et al (2014) Identification and functional characterization of a sulfate transporter induced by both sulfur starvation and mycorrhiza formation in *Lotus japonicus*. *New Phytol* 204:609–619. doi: 10.1111/nph.12949
- Giovannetti M, Sbrana C, Strani P, et al (2003) Genetic Diversity of Isolates of *Glomus mosseae* from Different Geographic Areas Detected by Vegetative Compatibility Testing and Biochemical and Molecular Analysis. *Appl Environ Microbiol* 69:616–624. doi: 10.1128/AEM.69.1.616-624.2003
- Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, et al (2001) The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* 151:717–724. doi: 10.1046/j.0028-646x.2001.00216.x
- Giovannetti M, Azzolini D, Citernesi AS (1999) Anastomosis Formation and Nuclear and Protoplasmic Exchange in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Appl Environ Microbiol* 65:5571–5575.
- Gomez SK, Javot H, Deewatthanawong P, et al (2009) *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology* 9:10. doi: 10.1186/1471-2229-9-10
- Gonzalez-Chavez C, D’Haen J, Vangronsveld J, Dodd JC (2002) Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant and Soil* 240:287–297. doi: 10.1023/A:1015794622592
- González-Chávez M del CA, Miller B, Maldonado-Mendoza IE, et al (2014) Localization and speciation of arsenic in *Glomus intraradices* by synchrotron radiation spectroscopic analysis. *Fungal Biology* 118:444–452. doi: 10.1016/j.funbio.2014.03.002
- González-Chávez M del CA, Ortega-Larrocea M del P, Carrillo-González R, et al (2011) Arsenate induces the expression of fungal genes involved in As transport in arbuscular mycorrhiza. *Fungal Biology* 115:1197–1209. doi: 10.1016/j.funbio.2011.08.005
- González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wright SF, Nichols KA (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution* 130:317–323. doi: 10.1016/j.envpol.2004.01.004
- González-Guerrero M, Benabdellah K, Valderas A, et al (2010a) GintABC1 encodes a putative ABC transporter of the MRP subfamily induced by Cu, Cd, and oxidative stress in *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 20:137–146. doi: 10.1007/s00572-009-0273-y
- González-Guerrero M, Oger E, Benabdellah K, et al (2010b) Characterization of a CuZn superoxide dismutase gene in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Curr Genet* 56:265–274. doi: 10.1007/s00294-010-0298-y
- González-Guerrero M, Melville LH, Ferrol N, et al (2008) Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Can J Microbiol* 54:103–110. doi: 10.1139/w07-119

- González-Guerrero M, Cano C, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2007) GintMT1 encodes a functional metallothionein in *Glomus intraradices* that responds to oxidative stress. *Mycorrhiza* 17:327–335. doi: 10.1007/s00572-007-0108-7
- Gosling P, Jones J, Bending GD (2016) Evidence for functional redundancy in arbuscular mycorrhizal fungi and implications for agroecosystem management. *Mycorrhiza* 26:77–83. doi: 10.1007/s00572-015-0651-6
- Grossart H-P, Wurzbacher C, James TY, Kagami M (2016) Discovery of dark matter fungi in aquatic ecosystems demands a reappraisal of the phylogeny and ecology of zoosporic fungi. *Fungal Ecology* 19:28–38. doi: 10.1016/j.funeco.2015.06.004
- Guether M, Balestrini R, Hannah M, et al (2009a) Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytologist* 182:200–212. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02725.x
- Guether M, Neuhäuser B, Balestrini R, et al (2009b) A Mycorrhizal-Specific Ammonium Transporter from *Lotus japonicus* Acquires Nitrogen Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiol* 150:73–83. doi: 10.1104/pp.109.136390
- Guillot S, Hattori K (2013) Serpentinites: Essential Roles in Geodynamics, Arc Volcanism, Sustainable Development, and the Origin of Life. *Elements* 9:95–98. doi: 10.2113/gselements.9.2.95
- Guo Y, George E, Marschner H (1996) Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of cadmium and nickel in bean and maize plants. *Plant Soil* 184:195–205. doi: 10.1007/BF00010449
- Gustafson DJ, Casper BB (2004) Nutrient addition affects AM fungal performance and expression of plant/fungal feedback in three serpentine grasses. *Plant and Soil* 259:9–17. doi: 10.1023/B:PLSO.0000020936.56786.a4
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:1–11.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- 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.
- Harper JT, Waanders E, Keeling PJ (2005) On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:487–496. doi: 10.1099/ijs.0.63216-0
- Harrison S, Rajakaruna N (2011) *Serpentine: The Evolution and Ecology of a Model System*. Berkeley, CA: University of California Press, Orlando, FL, USA.
- 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. doi: 10.1105/tpc.004861
- Harrison MJ, Buuren ML van (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378:626. doi: 10.1038/378626a0

- Hart MM, Forsythe J, Oshowski B, et al (2013) Hiding in a crowd—does diversity facilitate persistence of a low-quality fungal partner in the mycorrhizal symbiosis? *Symbiosis* 59:47–56. doi: 10.1007/s13199-012-0197-8
- Hart MM, Forsythe JA (2012) Using arbuscular mycorrhizal fungi to improve the nutrient quality of crops; nutritional benefits in addition to phosphorus. *Scientia Horticulturae* 148:206–214. doi: 10.1016/j.scienta.2012.09.018
- Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic Basis for Variation in the Colonization Strategy of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The New Phytologist* 153:335–344
- Hartley SE, Gange AC (2009) Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual review of entomology* 54:323–342
- Hawkins H-J, Johansen A, George E (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226:275–285. doi: 10.1023/A:1026500810385
- Hector A, Schmid B, Beierkuhnlein C, et al (1999) Plant Diversity and Productivity Experiments in European Grasslands. *Science* 286:1123–1127. doi: 10.1126/science.286.5442.1123
- Heggo A, Angle JS, Chaney RL (1990) Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biology and Biochemistry* 22:865–869. doi: 10.1016/0038-0717(90)90169-Z
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, et al (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394:431–431
- Helgason T, Fitter A (2005) The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologist* 19:96–101. doi: 10.1017/S0269-915X(05)00302-2
- Hempel S, Renker C, Buscot F (2007) Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environ Microbiol* 9:1930–1938. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01309.x
- Hernsdorf AW, Probst AJ, Baker BJ, et al (2016) A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* 1:nmicrobiol201648. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.48
- Hibbett DS, Stajich JE, Spatafora JW (2013) Toward genome-enabled mycology. *Mycologia* 105:1339–1349. doi: 10.3852/13-196
- Higashiyama K, Fujikawa S, Park EY, Shimizu S (2002) Production of arachidonic acid by *Mortierella* fungi. *Biotechnol Bioprocess Eng* 7:252–262. doi: 10.1007/BF02932833
- Hijri M (2016) Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. *Mycorrhiza* 26:209–214 . doi: [10.1007/s00572-015-0661-4](https://doi.org/10.1007/s00572-015-0661-4)
- 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 Genet Biol* 41:253–261
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68:139–146. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.023
- Hoff JA, Klopfenstein NB, McDonald GI, et al (2004) Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Forest Pathology* 34(4): 255-271 255–271.

- Hoffmann K, Pawłowska J, Walther G, et al (2013) The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia* 30:57–76. doi: 10.3767/003158513X666259
- Högberg MN, Högberg P (2002) Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist* 154:791–795. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00417.x
- Honnay O, Jacquemyn H (2007) Susceptibility of Common and Rare Plant Species to the Genetic Consequences of Habitat Fragmentation. *Conservation Biology* 21:823–831. doi: 10.1111/j.1523-1739.2006.00646.x
- Hooper DU, Chapin FS, Ewel JJ, et al (2005) Effects of Biodiversity on Ecosystem Functioning: A Consensus of Current Knowledge. *Ecological Monographs* 75:3–35. doi: 10.1890/04-0922
- Hooper DU et al (2000) Interactions between above- and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: patterns, mechanisms, and feedbacks. *BioScience* 50, 1049–1061.
- Hopkins NA (1987) Mycorrhizae in a California serpentine grassland community. *Canadian Journal of Botany* 65:484–487. doi: 10.1139/b87-059
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H (1998) Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. *Genome* 41:422–428. doi: 10.1139/g98-038
- Huang Y-H, Huang C-T, Hseu R-S (2005) Effects of dockerin domains on *Neocallimastix frontalis* xylanases. *FEMS Microbiology Letters* 243:455–460. doi: 10.1016/j.femsle.2005.01.008
- Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, et al (2016) A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* 1:16048 . doi: [10.1038/nmicrobiol.2016.48](https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48)
- L’Huillier L, Fogliani B (2014) Caractérisation du topsoil et de son évolution pendant son stockage en mine. Pages 30-71. In *Caractérisation et fonctionnement du système sol/plante/microorganismes dans les maquis miniers. Perspectives d’application à la restauration écologique. Rapport Final - Projet ECOMINE BIOTOP - CNRT « Nickel & son environnement. Nouméa, Nouvelle-Calédonie.*
- L’Huillier L, Jaffré T, Wulff A (2010) Mines et environnement en Nouvelle-Calédonie : les Milieux sur substrats ultramafiques et Leur Restauration. Editions IAC, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Husna, Tuheteru FD, Arif A (2017) Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Growth on Serpentine Soils. In: *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*. Springer, Singapore, pp 293–303.
- Husna null, Budi SW, Mansur I, Kusmana DC (2015) Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Growth Habitat of Kayu Kuku (*Pericopsis mooniana* Thw.) In Southeast Sulawesi. *Pak J Biol Sci* 18:1–10.
- Husna H, R B, Wilarso S, et al (2014) Fungi Mikoriza Arbuskula Pada Rizosfer *Pericopsis Mooniana* (Thw.) Thw. Di Sulawesi Tenggara [Arbuscular Mycorrhizal Fungi From Rhizosphere of *Pericopsis Mooniana* (Thw.) Thw. in South-east Sulawesi]. *Berita Biologi* 13.
- IJdo M, Cranenbrouck S, Declerck S (2011) Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza* 21:1–16. doi: 10.1007/s00572-010-0337-z

- Jaffré T, L'Huillier L (2010) La végétation des roches ultramafiques ou terrains miniers. Pages 45-103 In: Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie: les Milieux sur Substrats Ultramafiques et Leur Restauration L'Huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds). Editions IAC, Noumea, Nouvelle-Calédonie.
- Jaffré T, Morat P, Veillon J-M, Rigault F, Dagostini G (2001) Composition et caractérisation de la flore indigène de Nouvelle-Calédonie. Institut de Recherche pour le Développement, Nouméa.
- Jaffré T, Pelletier P (1992) Plantes de Nouvelle-Calédonie permettant de revégétaliser des sites miniers. SLN, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD (1992) External hyphae of vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist* 120:509–516. doi: 10.1111/j.1469-8137.1992.tb01800.x
- Jakobsen I, Rosendahl L (1990) Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol* 115: 77–83.
- James TY, Pelin A, Bonen L, et al (2013) Shared Signatures of Parasitism and Phylogenomics Unite Cryptomycota and Microsporidia. *Current Biology* 23:1548–1553. doi: 10.1016/j.cub.2013.06.057
- James TY, Berbee ML (2012) No jacket required – new fungal lineage defies dress code. *Bioessays* 34:94–102. doi: 10.1002/bies.201100110
- James TY, Kauff F, Schoch C, et al (2006) Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* 443:818–822.
- Jansa J, Smith FA, Smith SE (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177:779–789. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x
- Jansa J, Mozafar A, Frossard E (2005) Phosphorus Acquisition Strategies within Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community of a Single Field Site. *Plant Soil* 276:163–176. doi: 10.1007/s11104-005-4274-0
- Jasper DA, Abbott LK, Robson AD (1989) Acacias respond to additions of phosphorus and to inoculation with VA mycorrhizal fungi in soils stockpiled during mineral sand mining. *Plant Soil* 115:99–108. doi: 10.1007/BF02220699
- Javot H, Penmetsa RV, Breuillin F, et al (2011) *Medicago truncatula* mtp4 mutants reveal a role for nitrogen in the regulation of arbuscule degeneration in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal* 68:954–965. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04746.x
- Ji B, Gehring CA, Wilson GWT, Miller RM, et al (2013) Patterns of diversity and adaptation in Glomeromycota from three prairie grasslands. *Mol Ecol* 22: 2573–2587.
- Ji B, Bentivenga SP, Casper BB (2010) Evidence for ecological matching of whole AM fungal communities to the local plant–soil environment. *Ecology* 91:3037–3046. doi: 10.1890/09-1451.1
- Jiang Q-Y, Zhuo F, Long S-H, et al (2016a) Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils? *Sci Rep* 6. doi: 10.1038/srep21805

- Jiang Q-Y, Zhuo F, Long S-H, et al (2016b) Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils? *Sci Rep* 6. doi: 10.1038/srep21805
- Johnson D, Vandenkoornhuyse PJ, Leake JR, et al (2004) Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist* 161:503–515. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00938.x
- Johnson NC, Graham JH, Smith FA (1997) Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *The New Phytologist* 135:575–585.
- Joner E, Leyval C (2001) Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biol Fertil Soils* 33:351–357. doi: 10.1007/s003740000331
- Joner EJ, Briones R, Leyval C (2000) Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil* 226:227–234. doi: 10.1023/A:1026565701391
- Joner EJ, Leyval C (1997) Uptake of ¹⁰⁹Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae*/ *Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytologist* 135:353–360. doi: 10.1046/j.1469-8137.1997.00633.x
- Kaldorf M, Kuhn AJ, Schröder WH, et al (1999) Selective Element Deposits in Maize Colonized by a Heavy Metal Tolerance Conferring Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Journal of Plant Physiology* 154:718–728. doi: 10.1016/S0176-1617(99)80250-8
- Kaonongbua W, Morton JB, Bever JD (2010) Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. *Mycologia* 102:1497–1509. doi: 10.3852/10-011
- Kazakou E, Dimitrakopoulos PG, Baker AJM, et al (2008) Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews* 83:495–508. doi: 10.1111/j.1469-185X.2008.00051.x
- Keeling P (2009) Five Questions about Microsporidia. *PLOS Pathogens* 5:e1000489. doi: 10.1371/journal.ppat.1000489
- Keeling PJ, Fast NM (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol* 56:93–116. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160854
- Ker K, Charest C (2010) Nickel remediation by AM-colonized sunflower. *Mycorrhiza* 20:399–406. doi: 10.1007/s00572-009-0293-7
- Keymer A, Pimprikar P, Wewer V, et al (2017) Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. *eLife Sciences* 6:e29107. doi: [10.7554/eLife.29107](https://doi.org/10.7554/eLife.29107)
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, et al (2011) Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science* 333:880–882. doi: 10.1126/science.1208473
- Kjøller R, Rosendahl S (2000) Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant and Soil* 226:189. doi: 10.1023/A:1026499923717
- Kobae Y, Tamura Y, Takai S, et al (2010) Localized Expression of Arbuscular Mycorrhiza-Inducible Ammonium Transporters in Soybean. *Plant Cell Physiol* 51:1411–1415. doi: 10.1093/pcp/pcq099

- Koegel S, Ait Lahmidi N, Arnould C, et al (2013) The family of ammonium transporters (AMT) in *Sorghum bicolor*: two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 198:853–865. doi: 10.1111/nph.12199
- Koide RT (2000) Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 147:233–235. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00710.x
- Konopka A (2009) What is microbial community ecology? *ISME J* 3:1223–1230. doi: 10.1038/ismej.2009.88
- Krüger M, Krüger C, Walker C, et al (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193:970–984. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüssler A (2009) DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 183:212–223. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x
- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR (2001a) Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414:745–748. doi: 10.1038/414745a
- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR (2001b) Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414:745–748. doi: 10.1038/414745a
- Kumar P, Lucini L, Rouphael Y, et al (2015) Insight into the role of grafting and arbuscular mycorrhiza on cadmium stress tolerance in tomato. *Front Plant Sci* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00477
- Lagrange A, Ducouso M, Jourand P, et al (2011) New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Can J Microbiol* 57:21–28. doi: 10.1139/w10-096
- Lagrange A, L'Huillier L, Amir H (2013) Mycorrhizal status of Cyperaceae from New Caledonian ultramafic soils: effects of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonization of *Costularia comosa* under field conditions. *Mycorrhiza* 23:655–661. doi: 10.1007/s00572-013-0503-1
- Lalitha M, Anil Kumar KS, Dharumarajan S, et al (2017) Role of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae in Mobilization of Soil Phosphorus. In: Meena VS, Mishra PK, Bisht JK, Pattanayak A (eds) *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer Singapore, Singapore, pp 317–331.
- Lanfranco L, Bolchi A, Ros EC, et al (2002) Differential Expression of a Metallothionein Gene during the Presymbiotic versus the Symbiotic Phase of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Plant Physiol* 130:58–67. doi: 10.1104/pp.003525
- Lazarus KL, James TY (2015) Surveying the biodiversity of the Cryptomycota using a targeted PCR approach. *Fungal Ecology* 14:62–70. doi: 10.1016/j.funeco.2014.11.004
- Lazcano C, Barrios-Masias FH, Jackson LE (2014) Arbuscular mycorrhizal effects on plant water relations and soil greenhouse gas emissions under changing moisture regimes. *Soil Biology and Biochemistry* 74:184–192. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.03.010
- Leake J, Johnson D, Donnelly D, et al (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany* 82:1016–1045. doi: 10.1139/b04-060

- Lecointre G, Le Guyader H (2001) *Classification phylogénétique du vivant*. Belin Publishing, Paris.
- 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. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02834.x
- Lefcheck, J. S. et al (2015) Biodiversity enhances ecosystem multifunctionality across trophic levels and habitats. *Nat. Commun.* 6, 6936.
- Lehman RM, Taheri WI, Osborne SL, et al (2012) Fall cover cropping can increase arbuscular mycorrhizae in soils supporting intensive agricultural production. *Applied Soil Ecology* 61:300–304. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.11.008
- Lehmann A, Rillig MC (2015) Arbuscular mycorrhizal contribution to copper, manganese and iron nutrient concentrations in crops – A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 81:147–158. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.11.013
- Lehmann A, Veresoglou SD, Leifheit EF, Rillig MC (2014) Arbuscular mycorrhizal influence on zinc nutrition in crop plants – A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 69:123–131. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.11.001
- Lekberg Y, Koide RT (2014) Integrating physiological, community, and evolutionary perspectives on the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Botany* 92:241–251. doi: 10.1139/cjb-2013-0182
- Lekberg Y, Koide RT, Rohr JR, et al (2007) Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* 95:95–105. doi: 10.1111/j.1365-2745.2006.01193.x
- Letcher PM, Lopez S, Schmieder R, et al (2013) Characterization of *Amoebophilidium protocoecarum*, an algal parasite new to the cryptomycota isolated from an outdoor algal pond used for the production of biofuel. *PLoS ONE* 8:e56232. doi: 10.1371/journal.pone.0056232
- Lewis DH (1973) Concepts in Fungal Nutrition and the Origin of Biotrophy. *Biological Reviews* 48:261–277. doi: 10.1111/j.1469-185X.1973.tb00982.x
- Li X, Christie P (2001) Changes in soil solution Zn and pH and uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal red clover in Zn-contaminated soil. *Chemosphere* 42:201–207. doi: 10.1016/S0045-6535(00)00126-0
- Li ZS, Szczyepka M, Lu YP, et al (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* 271:6509–6517
- Lin K, Limpens E, Zhang Z, et al (2014) Single Nucleus Genome Sequencing Reveals High Similarity among Nuclei of an Endomycorrhizal Fungus. *PLOS Genetics* 10:e1004078. doi: 10.1371/journal.pgen.1004078
- Lingua G, Franchin C, Todeschini V, et al (2008) Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution* 153:137–147. doi: 10.1016/j.envpol.2007.07.012
- López-Gutiérrez J C, Malcolm G M, Koide R T, et al (2008) Ectomycorrhizal fungi from Alaska and Pennsylvania: adaptation of mycelial respiratory response to temperature? *New Phytologist*, 180(4): 741–744.
- Maherali H, Klironomos JN (2007) Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning. *Science* 316:1746–1748. doi: 10.1126/science.1143082

- Marleau J, Dalpé Y, St-Arnaud M, Hijri M (2011) Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. *BMC Evolutionary Biology* 11:51. doi: 10.1186/1471-2148-11-51
- Marschner H, Dell B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159:89–102. doi: 10.1007/BF00000098
- Martin F, Gianinazzi-Pearson V, Hijri M, et al (2008) The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* 180:747–750. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02671.x
- Martin BD, Schwab E (2012) Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *International Journal of Biology* 5:32 . doi: [10.5539/ijb.v5n1p32](https://doi.org/10.5539/ijb.v5n1p32)
- Marulanda A, Porcel R, Barea J M, et al (2007) Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. *Microbial Ecology*, 54(3): 543–552.
- McKay JK, Christian CE, Harrison S, Rice KJ (2005) “How Local Is Local?”—A Review of Practical and Conceptual Issues in the Genetics of Restoration. *Restoration Ecology* 13:432–440. doi: 10.1111/j.1526-100X.2005.00058.x
- Meena SK, Rakshit A, Meena VS (2016) Effect of seed bio-priming and N doses under varied soil type on nitrogen use efficiency (NUE) of wheat (*Triticum aestivum* L.) under greenhouse conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 6:68–75. doi: 10.1016/j.bcab.2016.02.010
- Meier S, Azcón R, Cartes P, et al (2011) Alleviation of Cu toxicity in *Oenothera picensis* by copper-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and treated agrowaste residue. *Applied Soil Ecology* 48:117–124. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.04.005
- Merryweather J, Fitter A (1998) The Arbuscular Mycorrhizal Fungi of *Hyacinthoides non-scripta*. I. Diversity of Fungal Taxa. *The New Phytologist* 138:117–129.
- Michałowicz Z, Jarosz Z, Pitura K, Dzida K (2015) Effect of mycorrhizal colonization and nutrient solutions concentration on the yielding and chemical composition of tomato grown in rockwool and straw medium. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus* 14:15–27.
- Middleton EL, Bever JD (2012) Inoculation with a Native Soil Community Advances Succession in a Grassland Restoration. *Restoration Ecology* 20:218–226. doi: 10.1111/j.1526-100X.2010.00752.x
- Msiska Z, Morton JB (2008) Phylogenetic analysis of the Glomeromycota by partial β -tubulin gene sequences. *Mycorrhiza* 19(4): 247 -254.
- Mohamma A, Khan AG (2002) Monoxenic in vitro production and colonization potential of AM fungus *Glomus intraradices*. *Indian J Exp Biol* 40:1087–1091.
- Mohammadi K, Khalesro S, Sohrabi Y, Heidari G (2011) A Review: Beneficial Effects of the Mycorrhizal Fungi for Plant Growth.
- Møller Andersen N, Cheng L (2004) The marine insect *Halobates* (Heteroptera: Gerridae): Biology, adaptations, distribution, and phylogeny.
- Mora C et al (2014) Alternative hypotheses to explain why biodiversity-ecosystem functioning relationships are concave-up in some natural ecosystems but concave-down in manipulative experiments. *Sci. Rep.* 4, 5427.

- 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. doi: 10.2307/3761615
- Morton JB (2000) Evolution of endophytism in arbuscular mycorrhizal fungi of Glomales. In *Microbial Endophytes* (C. W. Bacon & J. H. White, eds):121±140. Marcel Dekker, New York.
- Morton JB, Bentivenga SP (1994) Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. *Plant Soil* 159:47. doi: 10.1007/BF00000094
- Morton JB, Benny GL (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37:471–491.
- Mummey DL, Rillig MC (2006) The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant Soil* 288:81–90. doi: 10.1007/s11104-006-9091-6
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- Nagy R, Karandashov V, Chague V, et al (2005) The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species. *Plant J* 42:236–250. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02364.x
- Nayuki K, Chen B, Ohtomo R, Kuga Y (2014) Cellular Imaging of Cadmium in Resin Sections of Arbuscular Mycorrhizas Using Synchrotron Micro X-ray Fluorescence. *Microbes Environ* 29:60–66. doi: 10.1264/jsme2.ME13093
- Newsham K-K, Upson R, Read D-J. 2009. Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecol* 2, 10-20.
- Newman EI, Reddell P (1987) The Distribution of Mycorrhizas Among Families of Vascular Plants. *New Phytologist* 106:745–751. doi: 10.1111/j.1469-8137.1987.tb00175.x
- Normark BB, Judson OP, Moran NA (2011) Genomic signatures of ancient asexual lineages. *Biol J Linn Soc* 79:69–84. doi: 10.1046/j.1095-8312.2003.00182.x
- Nouri E, Breuillin-Sessoms F, Feller U, Reinhardt D (2014) Phosphorus and Nitrogen Regulate Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLOS ONE* 9:e90841. doi: 10.1371/journal.pone.0090841
- Oehl F, Palenzuela J, Sánchez-Castro I, et al (2012) *Acaulospora nivalis*, a new fungus in the Glomeromycetes, characteristic for high alpine and nival altitudes of the Swiss Alps. *Nova Hedwigia* 105–122. doi: 10.1127/0029-5035/2012/0038
- Oehl F, Silva GA da, Goto BT, et al (2011a) Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116:75–120. doi: 10.5248/116.75
- Oehl F, Sieverding E, Palenzuela J, et al (2011b) Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2:191–199. doi: 10.5598/imafungus.2011.02.02.10

- Oehl F, de Souza FA, Sieverding E (2008) Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. *Mycotaxon* 106:311–360.
- Ohsowski BM, Zaitsoff PD, Öpik M, Hart MM (2014) Where the wild things are: looking for uncultured Glomeromycota. *New Phytol* 204:171–179. doi: 10.1111/nph.12894
- Oláh B, Brière C, Bécard G, et al (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant Journal* 44:195–207. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02522.x
- Oliveira RS, Rocha I, Ma Y, et al (2016) Seed coating with arbuscular mycorrhizal fungi as an ecotechnological approach for sustainable agricultural production of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 79:329–337 . doi: [10.1080/15287394.2016.1153448](https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1153448)
- Olsson PA, Hammer EC, Pallon J, et al (2011) Elemental composition in vesicles of an arbuscular mycorrhizal fungus, as revealed by PIXE analysis. *Fungal Biology* 115:643–648. doi: 10.1016/j.funbio.2011.03.008
- Oostermeijer JGB, Luijten SH, den Nijs JCM (2003) Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation* 113:389–398. doi: 10.1016/S0006-3207(03)00127-7
- Orchard S, Hilton S, Bending GD, et al (2017) Fine endophytes (*Glomus tenue*) are related to *Mucoromycotina*, not *Glomeromycota*. *New Phytol* 213:481–486. doi: 10.1111/nph.14268
- Orłowska E, Mesjasz-Przybyłowicz J, Przybyłowicz W, Turnau K (2008) Nuclear microprobe studies of elemental distribution in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of Ni-hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *X-Ray Spectrom* 37:129–132. doi: 10.1002/xrs.1034
- Orłowska E, Przybyłowicz W, Orłowski D, et al (2011) The effect of mycorrhiza on the growth and elemental composition of Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* Roessler. *Environmental Pollution* 159:3730–3738. doi: 10.1016/j.envpol.2011.07.008
- Ouillon S, Douillet P, Lefebvre JP, et al (2010) Circulation and suspended sediment transport in a coral reef lagoon: The south-west lagoon of New Caledonia. *Marine Pollution Bulletin* 61:269–296. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.06.023
- Pallara G, Todeschini V, Lingua G, et al (2013) Transcript analysis of stress defence genes in a white poplar clone inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and grown on a polluted soil. *Plant Physiology and Biochemistry* 63:131–139. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.11.016
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP (2002) Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS* 99:13324–13329. doi: 10.1073/pnas.202474599
- Pawlowska TE (2005) Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett* 251:185–192. doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.007
- Pawlowski J, Burki F (2009) Untangling the Phylogeny of Amoeboid Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56:16–25. doi: 10.1111/j.1550-7408.2008.00379.x
- Pearson JN, Jakobsen I (1993) The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labelling with ³²P and ³³P. *New Phytologist* 124:489–494. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03840.x

- Pellegrino E, Bedini S (2014) Enhancing ecosystem services in sustainable agriculture: Biofertilization and biofortification of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 68:429–439. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.09.030
- Pellegrino E, Turrini A, Gamper HA, et al (2012) Establishment, persistence and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants in the field revealed using molecular genetic tracing and measurement of yield components. *New Phytologist* 194:810–822. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04090.x
- Pérez-Tienda J, Testillano PS, Balestrini R, et al (2011) GintAMT2, a new member of the ammonium transporter family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 48:1044–1055. doi: 10.1016/j.fgb.2011.08.003
- Perrier N, Amir H, Colin F (2006) Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16:449–458. doi: 10.1007/s00572-006-0057-6
- Peter, H. et al. (2011) Function-specific response to depletion of microbial diversity. *ISME J.* 5, 351–361.
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-IN18. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Pirozynski KA, Dalpe Y (1989) Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. In: *Symbiosis* Rehovot. <https://geoscience.net/research/002/119/002119202.php>. Accessed 22 Nov 2017
- Porcel R, Aroca R, Ruiz-Lozano JM (2012) Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agron Sustain Dev* 32:181–200. doi: 10.1007/s13593-011-0029-x
- Powell JR, Parrent JL, Hart MM, et al (2009) Phylogenetic trait conservatism and the evolution of functional trade-offs in arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276:4237–4245. doi: 10.1098/rspb.2009.1015
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10:393–398. doi: 10.1016/j.pbi.2007.05.004
- Proctor J (2003) Vegetation and soil and plant chemistry on ultramafic rocks in the tropical Far East. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 6:105-124
- Purin S, Morton JB (2011) In situ analysis of anastomosis in representative genera of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 21:505–514. doi: 10.1007/s00572-010-0356-9
- Raab PA, Brennwald A, Redecker D (2005) Mitochondrial large ribosomal subunit sequences are homogeneous within isolates of *Glomus* (arbuscular mycorrhizal fungi, Glomeromycota). *Mycol Res* 109:1315–1322.
- Rawat J, Sanwal P, Saxena J (2016) Potassium and Its Role in Sustainable Agriculture. In: *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer, New Delhi, pp 235–253.
- Redecker D, Schüßler A (2014) 9 Glomeromycota. In: *Systematics and Evolution*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 251–269.

- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, et al (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23:515–531. doi: 10.1007/s00572-013-0486-y
- Redecker D, Raab P (2006) Phylogeny of the glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98:885–895.
- Redecker D, Hijri I, Wiemken A (2003) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobot* 38:113–124. doi: 10.1007/BF02803144
- 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.
- Reich PB (2012) et al. Impacts of biodiversity loss escalate through time as redundancy fades. *Science* 336, 589–592.
- Renker C, Blanke V, Buscot F (2005) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental Pollution* 135:255–266. doi: 10.1016/j.envpol.2004.11.002
- Riisberg I, Orr RJS, Kluge R, et al (2009) Seven Gene Phylogeny of Heterokonts. *Protist* 160:191–204. doi: 10.1016/j.protis.2008.11.004
- Riley R, Charron P, Idnurm A, et al (2014) Extreme diversification of the mating type–high-mobility group (MATA-HMG) gene family in a plant-associated arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 201:254–268. doi: 10.1111/nph.12462
- Riley R, Corradi N (2013) Searching for clues of sexual reproduction in the genomes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 6:44–49. doi: 10.1016/j.funeco.2012.01.010
- Rodriguez A, Sanders IR (2015) The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *ISME J* 9:1053–1061. doi: 10.1038/ismej.2014.207
- Rodriguez RJ, Redman RS (1997) Fungal Life-Styles and Ecosystem Dynamics: Biological Aspects of Plant Pathogens, Plant Endophytes and Saprophytes. In: Andrews JH, Tommerup IC, Callow JA (eds) *Advances in Botanical Research*. Academic Press, pp 169–193.
- Ronaghi M (2001) Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res* 11:3–11. doi: 10.1101/gr.150601
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, et al (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242:84–89. doi: 10.1006/abio.1996.0432
- Ropars J, Toro KS, Noel J, et al (2016) Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature Microbiology* 1:16033. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.33
- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Azcón C, Aroca R (2012) Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *J Exp Bot* 63:4033–4044. doi: 10.1093/jxb/ers126
- Ruiz-Lozano JM, Aroca R (2010) Modulation of Aquaporin Genes by the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Relation to Osmotic Stress Tolerance. In: *Symbioses and Stress*. Springer, Dordrecht, pp 357–374.

- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Aroca R (2006) Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? *New Phytologist* 171:693–698. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01841.x
- Ruiz-Lozano JM (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13:309–317. doi: 10.1007/s00572-003-0237-6
- Ruiz-Trillo I, Roger AJ, Burger G, et al (2008) A Phylogenomic Investigation into the Origin of Metazoa. *Mol Biol Evol* 25:664–672. doi: 10.1093/molbev/msn006
- Saha M, Maurya BR, Bahadur I, et al (2016) Can Potassium-Solubilising Bacteria Mitigate the Potassium Problems in India? In: *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer, New Delhi, pp 127–136.
- Shah MA, Reshi ZA, Khasa DP (2009) Arbuscular Mycorrhizas: Drivers or Passengers of Alien Plant Invasion. *Bot Rev* 75:397–417 . doi: 10.1007/s12229-009-9039-7
- Saia S, Amato G, Frenda AS, et al (2014) Influence of Arbuscular Mycorrhizae on Biomass Production and Nitrogen Fixation of Berseem Clover Plants Subjected to Water Stress. *PLOS ONE* 9:e90738. doi: 10.1371/journal.pone.0090738
- Saif SR (1987) Growth responses of tropical forage plant species to vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Plant Soil* 97:25–35. doi: 10.1007/BF02149820
- Säle V, Aguilera P, Laczko E, et al (2015) Impact of conservation tillage and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 84:38–52. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.02.005
- Salyards MJ, Knighton WB, Grimsrud EP (2003) Effects of oxygen and water on the resonance electron capture reactions of low electron affinity compounds. *International Journal of Mass Spectrometry* 222:201–212. doi: 10.1016/S1387-3806(02)00991-0
- Sánchez-Castro I, Ferrol N, Cornejo P, Barea J-M (2012) Temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of representative shrub species in a semi-arid Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza* 22:449–460. doi: 10.1007/s00572-011-0421-z
- Sánchez-Romera B, Ruiz-Lozano JM, Zamarreño ÁM, et al (2016) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and methyl jasmonate avoid the inhibition of root hydraulic conductivity caused by drought. *Mycorrhiza* 26:111–122. doi: 10.1007/s00572-015-0650-7
- Sanders IR, Alt M, Groppe K, et al (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. doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb01836.x
- Sanders IR, Hijri M (2005) Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* 433:160. doi: 10.1038/nature03069
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463–5467
- Sawaki H, Sugawara K, Saito M (1998) Phylogenetic position of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora gerdemannii*, and its synanamorph *Glomus leptotichum*, based upon 18S rRNA gene sequence. *Mycoscience* 39:477–480.

- Schechter SP, Bruns TD (2008) Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Molecular Ecology* 17:3198–3210. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03828.x
- Schmidt P-A, Bálint M, Greshake B, et al (2013) Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 65:128–132 . doi: [10.1016/j.soilbio.2013.05.014](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.05.014)
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109:6241–6246. doi: 10.1073/pnas.1117018109
- Schüßler A, Walker C (2010) The Glomeromycota: a species list with new families. Arthur Schüßler & Christopher Walker, Gloucester. Published in December 2010 in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. Printed copy available under ISBN-13: 978-1466388048, ISBN-10: 1466388048. Available at <http://www.amf-phylogeny.com>
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421.
- Schwarzott D, Schüßler A (2001) A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* 10: 203–207.
- Sędziewska KA, Fuchs J, Temsch EM, et al (2011) Estimation of the *Glomus intraradices* nuclear DNA content. *New Phytologist* 192:794–797. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03937.x
- Setiawan A (2011) Study of Arbuscular Mycorrhizal Fungi status at Rehabilitation Post-Nickel Mining Area (Case study at PT INCO Tbk. Sorowako, South Sulawesi).
- Shalchian-Tabrizi K, Minge MA, Espelund M, et al (2008) Multigene Phylogeny of Choanozoa and the Origin of Animals. *PLOS ONE* 3:e2098. doi: 10.1371/journal.pone.0002098
- Sheikh-Assadi M, Khandan-Mirkohi A, Alemardan A, Moreno-Jiménez E (2015) Mycorrhizal limonium sinuatum (L.) mill. Enhances accumulation of lead and cadmium. *Int J Phytoremediation* 17:556–562. doi: 10.1080/15226514.2014.922928
- Shen S K, Wang Y H (2011) Arbuscular mycorrhizal (AM) status and seedling growth response to indigenous AM colonisation of *Euryodendron excelsum* in China: implications for restoring an endemic and critically endangered tree. *Australian Journal of Botany*, 59(5): 460–467.
- Shine AM, Shakya VP, Idnurm A (2015) Phytochelatin synthase is required for tolerating metal toxicity in a basidiomycete yeast and is a conserved factor involved in metal homeostasis in fungi. *Fungal Biol Biotechnol* 2. doi: 10.1186/s40694-015-0013-3
- Shrivastava G, Ownley BH, Augé RM, et al (2015) Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. *Symbiosis* 65:65–74. doi: 10.1007/s13199-015-0319-1
- Sieh D, Watanabe M, Devers EA, et al (2013) The arbuscular mycorrhizal symbiosis influences sulfur starvation responses of *Medicago truncatula*. *New Phytol* 197:606–616. doi: 10.1111/nph.12034
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol* 58:291–295.

- Siqueira JO, Rocha WF, Oliveira E, Colozzi-Filho A (1990) The relationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and lime: Associated effects on the growth and nutrition of brachiaria grass (*Brachiaria decumbens*). *Biol Fertil Soils* 10:65–71. doi: 10.1007/BF00336127
- Smith SE, Smith FA (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annu Rev Plant Biol* 62:227–250. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103846
- Smith SE, Smith FA (2012) Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104:1–13. doi: 10.3852/11-229
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Third Edition. Academic Press.
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997 *Mycorrhizal symbiosis*. San Diego and London: Academic Press, 605, 77–89.
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162:511–524. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01039.x
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003a) Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses. *Plant Physiology* 133:16–20. doi: 10.1104/pp.103.024380
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003b) Mycorrhizal Fungi Can Dominate Phosphate Supply to Plants Irrespective of Growth Responses. *Plant Physiology* 133:16–20. doi: 10.1104/pp.103.024380
- Southworth D, Tackaberry LE, Massicotte HB (2014) Mycorrhizal ecology on serpentine soils. *Plant Ecology & Diversity* 7:445–455. doi: 10.1080/17550874.2013.848950
- Souza LA de, Andrade SAL de, Souza SCR de, Schiavinato MA (2012) Arbuscular mycorrhiza confers Pb tolerance in *Calopogonium mucunoides*. *Acta Physiol Plant* 34:523–531. doi: 10.1007/s11738-011-0849-y
- Spain JL, Sieverding E, Oehl F (2006) *Appendicispora*: A new genus in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes, with a discussion of the genus *Archaeospora*. *Mycotaxon* 97:163–182.
- Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, et al (2017) The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. *Microbiol Spectr* 5. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, et al (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108:1028–1046. doi: 10.3852/16-042
- St-Arnaud, M., Vujanovic, V. 2007 Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. In: C. Hamel C. Plenchette eds. *Mycorrhizae in crop production*. Binghamton, NY: Haworth Food and Agricultural Products Press, 67–122.
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, et al (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. doi: 10.1016/S0953-7562(96)80164-X

- Steenkamp ET, Wright J, Baldauf SL (2006) The Protistan Origins of Animals and Fungi. *Mol Biol Evol* 23:93–106. doi: 10.1093/molbev/msj011
- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Koegel S, et al (2014) The Largest Subunit of RNA Polymerase II as a New Marker Gene to Study Assemblages of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Field. *PLOS ONE* 9:e107783. doi: 10.1371/journal.pone.0107783
- Stockinger H, Krüger M, Schüßler A (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187:461–474. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x
- Stockinger H, Walker C, Schüßler A (2009) '*Glomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 183: 1176–1187.
- Strack D, Fester T (2006) Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytol* 172:22–34. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01837.x
- Stürmer SL, Morton JB (1999) Taxonomic Reinterpretation of Morphological Characters in Acaulosporaceae Based on Developmental Patterns. *Mycologia* 91:849–857. doi: 10.2307/3761538
- 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. doi: 10.1007/s005720050002
- Summerbell RC (2005) Root endophyte and mycorrhizosphere fungi of black spruce, *Picea mariana*, in a boreal forest habitat: influence of site factors on fungal distributions. *Studies in Mycology* 53:121–145. doi: 10.3114/sim.53.1.121
- Tanaka Y, Yano K (2005) Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. *Plant, Cell & Environment* 28:1247–1254. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01360.x
- Tang N, San Clemente H, Roy S, et al (2016) A Survey of the Gene Repertoire of *Gigaspora rosea* Unravels Conserved Features among Glomeromycota for Obligate Biotrophy. *Front Microbiol* 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00233
- Tarbell TJ, Koske RE (2007) Evaluation of commercial arbuscular mycorrhizal inocula in a sand/peat medium. *Mycorrhiza* 18:51–56. doi: 10.1007/s00572-007-0152-3
- Taylor JW, Pawlowska TE (2004) Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 427:733. doi: 10.1038/nature02290
- Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H (1995) Fossil Arbuscular Mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* 87:560–573. doi: 10.2307/3760776
- Thaxter R (1922) A Revision of the Endogoneae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 57:291–350. doi: 10.2307/20025921
- Thonar C, Erb A, Jansa J (2012) Real-time PCR to quantify composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities—marker design, verification, calibration and field validation. *Molecular Ecology Resources* 12:219–232. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03086.x
- Thonar C, Frossard E, Šmilauer P, Jansa J (2014) Competition and facilitation in synthetic communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol Ecol* 23:733–746. doi: 10.1111/mec.12625
- Tilman D, Reich PB, Knops J, et al (2001) Diversity and Productivity in a Long-Term Grassland Experiment. *Science* 294:843–84. doi: 10.1126/science.1060391

- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, et al (2013) Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *PNAS* 110:20117–20122. doi: 10.1073/pnas.1313452110
- Toussaint J-P, 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. doi: 10.1139/w04-009
- Trouvelot, A., Kough, J., & Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorhisation VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In G. S. Gianinazzi-Pearson V (Ed.), *Mycorrhizae: physiology and genetics* (INRA Press., pp. 217-221). Paris.
- Tsai CF, Qiu X, Liu JH (2003) A comparative analysis of two cDNA clones of the cellulase gene family from anaerobic fungus *Piromyces rhizinflata*. *Anaerobe* 9:131–140. doi: 10.1016/S1075-9964(03)00087-8
- TÜFENKİ Ş, Demir S, ŞENSOY S, et al (2012) The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the seedling growth of four hybrid cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 36:317–327
- Tullio M, Pierandrei F, Salerno A, Rea E (2003) Tolerance to cadmium of vesicular arbuscular mycorrhizae spores isolated from a cadmium-polluted and unpolluted soil. *Biol Fertil Soils* 37:211–214. doi: 10.1007/s00374-003-0580-y
- Turnau K (1998) Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* zinc wastes in southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67:105–113. doi: 10.5586/asbp.1998.014
- Turnau K, Kottke I, Oberwinkler F (1993) Element localization in mycorrhizal roots of *Peridium aquilinum* (L.) Kuhn collected from experimental plots treated with cadmium dust. *New Phytologist* 123:313–324. doi: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03741.x
- Turnau K, Mesjasz-Przybyłowicz J (2003) Arbuscular mycorrhiza of *Berkheya coddii* and other Ni-hyperaccumulating members of Asteraceae from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza* 13:185–190. doi: 10.1007/s00572-002-0213-6
- Ultra VU, Tanaka S, Sakurai K, Iwasaki K (2007) Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. *Plant Soil* 290:29–41. doi: 10.1007/s11104-006-9087-2
- Van der Heijden MGA, Bruin S de, Luckerhoff L, et al (2016) A widespread plant-fungal-bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. *The ISME Journal* 10:389 . doi: 10.1038/ismej.2015.120
- Van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol* 205:1406–1423. doi: 10.1111/nph.13288
- Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 11:296–310. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x

- Van Der Heijden MGA, Scheublin TR, Brader A (2004) Taxonomic and functional diversity in arbuscular mycorrhizal fungi – is there any relationship? *New Phytologist* 164:201–204. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01205.x
- Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M et al (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69–72. 10.1038/23932
- Van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, et al (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* 7:879–887. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x
- Vandenkoornhuyse P, Ridgway KP, Watson IJ, et al (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Mol Ecol* 12:3085–3095
- Vannette RL, Hunter MD (2009) Mycorrhizal fungi as mediators of defence against insect pests in agricultural systems. *Agricultural and Forest Entomology* 11:351–358. doi: 10.1111/j.1461-9563.2009.00445.x
- Verbruggen E, van der Heijden MGA, Rillig MC, Kiers ET (2013) Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytol* 197:1104–1109. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04348.x
- Verma S, Varma A, Rexer KH, Hassel A, Kost G, et al. (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia* 90: 896–903.
- Vidrih R, Hribar J (2016) Mead: The Oldest Alcoholic Beverage. In: *Traditional Foods*. Springer, Boston, MA, pp 325–338.
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piché Y (1998) Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Appl Environ Microbiol* 64:5004–5007
- Vivas A, Biró B, Németh T, et al (2006) Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2694–2704. doi: 10.1016/j.soilbio.2006.04.020
- Volpe V, Giovannetti M, Sun X-G, et al (2016) The phosphate transporters LjPT4 and MtPT4 mediate early root responses to phosphate status in non mycorrhizal roots. *Plant, Cell & Environment* 39:660–671. doi: 10.1111/pce.12659
- Vosátka M, Látr A, Gianinazzi S, Albrechtová J (2012) Development of arbuscular mycorrhizal biotechnology and industry: current achievements and bottlenecks. *Symbiosis* 58:29–37. doi: 10.1007/s13199-012-0208-9
- Wagg C, Barendregt C, Jansa J, van der Heijden MGA (2015) Complementarity in both plant and mycorrhizal fungal communities are not necessarily increased by diversity in the other. *J Ecol* 103:1233–1244. doi: 10.1111/1365-2745.12452
- Wagg, C. et al (2014) Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111, 5266–5270.
- Wagg C, Jansa J, Stadler M, et al (2011) Mycorrhizal fungal identity and diversity relaxes plant-plant competition. *Ecology* 92:1303–1313.
- Wall DH et al (2010) Biodiversity in the dark. *Nat. Geosci.* 3, 297–298.

- Walder F, Heijden MGA van der (2015) Regulation of resource exchange in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature Plants* 1:15159. doi: 10.1038/nplants.2015.159
- Walker C, Vestberg M (1994) A simple and inexpensive method for producing and maintaining closed pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi.
- Wardle, D. A. et al. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304, 1629–1633 (2004).
- Wang B, Qiu Y-L (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299–363. doi: 10.1007/s00572-005-0033-6
- Waschke A, Sieh D, Tamasloukht M, et al (2006) Identification of heavy metal-induced genes encoding glutathione S-transferases in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 17:1–10. doi: 10.1007/s00572-006-0075-4
- Watts-Williams SJ, Patti AF, Cavagnaro TR (2013) Arbuscular mycorrhizas are beneficial under both deficient and toxic soil zinc conditions. *Plant Soil* 371:299–312. doi: 10.1007/s11104-013-1670-8
- Werner GDA, Kiers ET (2015) Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytol* 205:1515–1524. doi: 10.1111/nph.13092
- Wettberg E, Wright J (2011) *Genomic Approaches to Understanding Adaptation*.
- Whipps JM (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can J Bot* 82:1198–1227 . doi: 10.1139/b04-082
- Whitbeck JL, Cardon ZG (2007) Introduction. In: *The Rhizosphere*. Academic Press, Burlington, pp xv–xix.
- Whiting SN, Reeves RD, Richards D et al (2004) Research Priorities for Conservation of Metallophyte Biodiversity and their Potential for Restoration and Site Remediation. *Restoration Ecology*, 12: 106–116.
- Wiemken A, Sanders IR, Klironomos JN, et al (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69. doi: 10.1038/23932
- World Bank (2008) *World Development Report, Agriculture for Development* World Bank.
- Wright SF, Upadhyaya A (1996) EXTRACTION OF AN ABUNDANT AND UNUSUAL PROTEIN FROM SOIL AND COMPARISON WITH HYPHAL PROTEIN OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI. *Soil Science* 161:575–586.
- Wu S, Zhang X, Chen B, et al (2016) Chromium immobilization by extraradical mycelium of arbuscular mycorrhiza contributes to plant chromium tolerance. *Environmental and Experimental Botany Complete*:10–18. doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.08.006
- Wulff A (2012) *Le micro-endemisme dans un hotspot de biodiversité : approche globale sur la flore vasculaire de Nouvelle-Calédonie et analyse comparative au sein du genre *Scaevola**. Thèse de l'Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.
- Xie X, Huang W, Liu F, et al (2013) Functional analysis of the novel mycorrhiza-specific phosphate transporter AsPT1 and PHT1 family from *Astragalus sinicus* during the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 198:836–852. doi: 10.1111/nph.12188

- Xu G-H, Chague V, Melamed-Bessudo C, et al (2007) Functional characterization of LePT4: a phosphate transporter in tomato with mycorrhiza-enhanced expression. *J Exp Bot* 58:2491–2501. doi: 10.1093/jxb/erm096
- Yachi S, Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1463–1468
- Yang H, Zhang Q, Koide RT, et al (2017) Taxonomic resolution is a determinant of biodiversity effects in arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J Ecol* 105:219–228 . doi: 10.1111/1365-2745.12655
- Yao Q, Yang R, Long L, Zhu H (2014) Phosphate application enhances the resistance of arbuscular mycorrhizae in clover plants to cadmium via polyphosphate accumulation in fungal hyphae. *Environmental and Experimental Botany* 108:63–70. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.11.007
- Yasin M, Munir I, Faisal M (2016) Can *Bacillus* spp. Enhance K⁺ Uptake in Crop Species. In: *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*. Springer, New Delhi, pp 163–170.
- Yoshida M, Noël M-H, Nakayama T, et al (2006) A Haptophyte Bearing Siliceous Scales: Ultrastructure and Phylogenetic Position of *Hyalolithus neolepis* gen. et sp. nov. (Prymnesiophyceae, Haptophyta). *Protist* 157:213–234. doi: 10.1016/j.protis.2006.02.004
- Youssef NH, Couger MB, Struchtemeyer CG, et al (2013) The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. *Appl Environ Microbiol* 79:4620–4634. doi: 10.1128/AEM.00821-13
- Zavaleta ES, Pasari JR, Hulvey KB, Tilman GD (2010) Sustaining multiple ecosystem functions in grassland communities requires higher biodiversity. *PNAS* 107:1443–1446. doi: 10.1073/pnas.0906829107

Chapitre 2

Isolement et identification de différentes espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie

Introduction au Chapitre 2

L'un des principaux enjeux de l'étude des CMA est de sélectionner des isolats, après une caractérisation judicieuse, afin d'utiliser leurs services écosystémiques pour développer des méthodes durables que ce soit pour l'agriculture ou la restauration de milieux dégradés. L'utilisation des CMA natifs des milieux à restaurer est nécessaire, car ils ont un meilleur potentiel à stimuler la croissance des plantes natives que les CMA issus de milieux différents, notamment lorsqu'il s'agit de milieux très particuliers, comme c'est le cas des milieux ultramafiques.

Le nombre d'espèces de CMA décrites est faible comparé aux autres embranchements de champignons (Ohsowski et al. 2014). Ces dernières années, les connaissances sur la diversité des CMA ont considérablement augmenté, grâce à l'utilisation des techniques de biologie moléculaire et des progrès réalisés pour l'identification morphologique de ces organismes (Da Silva et al. 2006 ; Krüger et al. 2012 ; Błaszowski et al. 2015). Beaucoup de CMA sont connus uniquement grâce aux séquences d'ADN environnementales et le nombre d'unités taxonomiques opérationnelles (moléculaire) différentes ou de taxons virtuels excède le nombre d'espèces de CMA décrites par les méthodes taxonomiques traditionnelles (morphologie) (Öpik et al. 2013 ; 2014). Actuellement 293 espèces sont décrites et nomées (cf. Annexe 1), alors que les études sur la diversité suggèrent l'existence de 348 à 1600 espèces de Glomeromycota. Des études récentes (Opik et al. 2013 ; Ohsowski et al. 2014) suggèrent également que cibler des écosystèmes peu ou pas étudiés permettrait probablement de découvrir de nouvelles espèces de CMA.

La Nouvelle-Calédonie est connue pour être un des plus importants « hots spots » de biodiversité au monde, comprenant une très forte proportion d'espèces de plantes endémiques en danger d'extinction (Myers et al. 2000). En effet, l'exploitation de grandes surfaces de milieux ultramafiques pour l'extraction du Nickel menace ces écosystèmes uniques. Pour développer des techniques de restauration écologiques durables de ces écosystèmes, une bonne compréhension du rôle des CMA en milieu ultramafique est nécessaire (Smith and Read 2008 ; Graham 2009). Les études précédentes sur la restauration des milieux ultramafiques de Nouvelle-Calédonie ont montré que pratiquement toutes les plantes étaient endomycorhizées (Amir et al. 1997 ; Perrier et al. 2006 ; Amir et al. 2007 ; Amir et al. 1997 ; Perrier et al. 2006 ; Amir & Ducouso 2010 ; Lagrange et al. 2011). Les isolats de CMA des milieux ultramafiques ont été décrits comme étant tolérant au Nickel et comme étant plus

performant que des CMA provenant de milieux différents ; ces CMA sont donc des cibles intéressantes pour être utilisés comme biostimulant des plantes pour la restauration des milieux ultramafiques dégradés en Nouvelle-Calédonie (Amir et al. 2008). La diversité des CMA en milieux ultramafiques a été étudiée (Fitzsimons et al. 2010 ; Schechter & Bruns 2008 ; 2012 ; Gensous et al. 2014 ; Kohout et al. 2015) ; ces études suggèrent l'existence de nouvelles espèces de CMA. Cependant, les CMA de ces milieux n'ont généralement pas été caractérisés et identifiés clairement.

Cette étude présente la description de 5 nouvelles espèces de CMA et d'un isolat et a fait l'objet de deux articles actuellement sous presse. Le premier article présente la description d'une espèce découverte dans différents milieux situés dans plusieurs lieux géographiques et a été rédigé en collaboration avec le Pr. Janusz Blazkowski. Cet article a permis d'ériger une nouvelle famille et un nouveau genre et de décrire une nouvelle espèce présente notamment sur les milieux ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. Le deuxième article présente la description de 4 nouvelles espèces de CMA isolées uniquement sur un milieu ultramafique de Nouvelle-Calédonie. La dernière partie de ce chapitre présente la description d'un isolat provenant d'un milieu ultramafique de Nouvelle-Calédonie et affilié à l'espèce *Claroideoglossum etunicatum*. Les descriptions sont basées sur la morphologie des spores et les séquences de l'ADNr.



A new family, Pervetustaceae with a new genus, *Pervetustus*, and *P. simplex* sp. nov. (Paraglomerales), and a new genus, *Innospora* with *I. majewskii* comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina

Janusz Błaszowski^{1*}, Anna Kozłowska¹, Thomas Crossay², Sarah Symanczik³ and Mohamed N. Al-Yahya'ei⁴

¹ Department of Ecology, Protection and Shaping of Environment, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Słowackiego 17, PL-71434 Szczecin, Poland

² Laboratoire du Vivant et de l'Environnement (LIVE) University of New Caledonia BP R4, Ave James Cook, Noumea 98851, Nouvelle-Calédonie

³ Department of Soil Sciences, Research Institute of Organic Agriculture, Ackerstrasse 113, CH-5070 Frick, Switzerland

⁴ Department of Aridland Agriculture, College of Food and Agriculture, United Arab Emirates University (UAEU), PO Box 15551, Al Ain, UAE

With 11 figures

Abstract: A new arbuscular mycorrhizal, *Paraglomus*-like, fungal species (Glomeromycotina) was found and propagated in single-species cultures established from spores coming from Oman, Greece, Tunisia, and New Caledonia. The hyaline spores of the fungus are small, 17–67 μm diam. when globose. Their spore wall consists of an evanescent, 1.0–2.3 μm thick, short-lived outer layer and a laminate, smooth, 3.8–7.3 μm thick inner layer, of which none shows amyloid or dextrinoid reaction in Melzer's reagent. Mycorrhizal structures (arbuscules and hyphae without vesicles) of the fungus stained slightly in Trypan blue, thus like those of the formerly described *Paraglomus* spp., in which the histochemical feature has been recognized. However, in the phylogenies gained from analyses of nrDNA sequences, the fungus formed a distinct lineage in a basal position relative to and highly diverged from that with *P. majewskii* and that with the other *Paraglomus* spp. of known molecular phylogeny. Comparisons of similarity of sequences and the spore wall structure of the new fungus with those of *P. majewskii* and the other *Paraglomus* spp. and the positions of clades of the three taxa relative to those of the other taxa of the Glomeromycotina suggested transferring *P. majewskii* to a new genus in the Paraglomeraceae and describing the new fungus as a new species of a new genus in a new family of the order Paraglomerales.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi, molecular phylogeny, mycorrhiza, new taxa.

*Corresponding author: janusz.blaszowski@zut.edu.pl

© 2017 J. Cramer in Gebr. Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, Germany. DOI: 10.1127/nova_hedwigia/2017/0419

www.borntraeger-cramer.de
0029-5035/2017/0419 \$ 3.50

Introduction

Based on rRNA gene sequence data, Redecker et al. (2000) and Sawaki et al. (1998) recognized the ancient origin of five species of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that have been classified in the phylum Zygomycota. Three of them, *Acaulospora gerdemannii* N.C.Schenck & T.H.Nicolson, *A. trappei* R.N.Ames & Linderman and *Glomus gerdemannii* S.L.Rose, B.A.Daniels & Trappe, were dimorphic organisms (Morton & Redecker 2001, Spain 2003, Spain et al. 2006). Spores of one of the morphs arose laterally from the neck of a sporiferous saccule like in *Acaulospora laevis* Gerd. & Trappe, the type species of the genus *Acaulospora* Gerd. & Trappe (Gerdemann & Trappe 1974), but differed in subcellular structure and the phenotypic and histochemical characters of components of their spore walls. In addition, the spores usually developed from a short branch of the sporiferous saccule neck rather than directly from it as sessile acaulosporoid spores of *Acaulospora* spp. The second morph produced spores blastically at the tip of a sporogenous hypha (called glomoid spores) like *G. microcarpum* Tul. & C. Tul., which at that time was considered the type species of the genus (Gerdemann & Trappe 1974); now it is *G. macrocarpum* Tul. & C.Tul. (Schüßler & Walker 2010). *Glomus brasilianum* Spain & J. Miranda and *G. occultum* C. Walker formed only glomoid spores (Błaszowski 2012, Morton and Redecker 2001). In addition, the fungi were distinguished by the following (i) their mycorrhizal structures usually lacked vesicles and the other structures (arbuscules, intraradical and extraradical hyphae) stained much lighter than those of other AMF or did not stain at all in mycological stains and (ii) *G. leptotichum* Schenck & Smith (the synanamorph of *A. gerdemannii*) and *G. occultum* contained a unique fatty acid, C16:1 ω 7 *cis* (Redecker et al. 2000, Spain et al. 2006). However, all of the morphological, histochemical and biochemical characters did not contain enough information to determine the position of the species among other AMF in a phylogenetic tree. Therefore, Morton & Redecker (2001), based on sequences of the 18S ribosomal RNA gene, transferred *G. brasilianum* and *G. occultum* to a newly erected genus, *Paraglomus* J.B.Morton & D.Redecker, in a new family, Paraglomeraceae J.B.Morton & D.Redecker. The other three species were accommodated in the genus *Archaeospora* J.B.Morton & D.Redecker of the family Archaeosporaceae J.B.Morton & D.Redecker.

Currently AMF are grouped in the subphylum Glomeromycotina (C.Walker & A.Schüßler) Spatafora & Stajich of the phylum Mucoromycota Doweld (Spatafora et al. 2016) and the species mentioned above are in three families: Ambisporaceae C.Walker, Vestberg & A.Schüßler, Archaeosporaceae representing the order Archaeosporales C.Walker & A.Schüßler, and Paraglomeraceae belonging to Paraglomerales Walker & A.Schüßler (Bills & Morton 2015, Oehl et al. 2011a, b, Redecker et al. 2013, Schüßler & Walker 2010), of which the last family is the focus of this study.

Apart from the two *Paraglomus* spp. mentioned above, currently the genus *Paraglomus* still comprises four other species with known molecular phylogenies, i.e. *P. bolivianum* (Sieverd. & Oehl) Oehl & G.A.Silva, *P. laccatum* (Błaszcz.) Renker, Błaszcz. & Buscot, *P. majewskii* Błaszcz. & Kovács, and *P. pernambucanum* Oehl et al. (Błaszowski 2012, Mello et al. 2013). In addition, Oehl et al. (2011a) proposed two new combinations

in the *Paraglomus*, i.e. *P. albidum* (C.Walker & L.H.Rhodes) Oehl et al. (formerly *G. albidum* C.Walker & L.H.Rhodes) and *P. lacteum* (S.L.Rose & Trappe) Oehl et al. (formerly *G. lacteum* S.L.Rose & Trappe) only based on morphological similarity of their spores to those of most *Paraglomus* spp. mentioned above. However, given that *Paraglomus* spp. represent the most ancient lineage in the Glomeromycotina, the number of named species of the genus compared to that of the other clades of the subphylum is low and probably concerns a small part of species existing in the world, as Krüger et al. (2012) suggested.

Except for *P. bolivianum* and *P. pernambucanum* found to have 2-walled spores (Mello et al. 2013), the other *Paraglomus* spp. were originally described as forming spores with one spore wall, as all species of the Glomeromycotina with glomoid spores. However, Mello et al. (2013) suggested that only *P. majewskii* produces one-walled spores and this corresponds with its clearly diverged and basal molecular phylogenetic position relative to the other *Paraglomus* spp. of recognized natural phylogeny (Błaszowski et al. 2012). In addition, the currently named *Paraglomus* spp. are either uncharacterized or heterogeneous in respect of histochemical features and pigmentation of their spores. Spores of six *Paraglomus* spp. lack amyloid or dextrinoid reaction in Melzer's reagent, young *P. albidum* spores turn pink to orange in this reagent, and this property has not been recognized at all in *P. lacteum* (Błaszowski 2012, Mello et al. 2013, Rose & Trappe 1980, Walker & Rhodes 1981). Except for *P. bolivianum* producing yellow brown to brown spores (Mello et al. 2013), spores of the other *Paraglomus* spp. are hyaline to light-coloured at most (Błaszowski 2012, Mello et al. 2013, Morton & Redecker 2001).

We found and grew in single-species cultures a *Paraglomus*-like fungus with small, hyaline spores with a simple, 2-layered spore wall, whose mycorrhizal structures stain slightly in Trypan blue, thus like those of, for example, *P. occultum*, the type species of the genus *Paraglomus* (Morton & Redecker 2001). However, phylogenetic analyses of nrDNA sequences of this *Paraglomus*-like fungus placed it in its own clade located basally relative to but highly diverged from the clade of *P. majewskii* and that of the other *Paraglomus* spp. of known molecular phylogeny. Comparisons of similarity of sequences and the spore wall structure of the new fungus with those of *P. majewskii* and the other *Paraglomus* spp. and the positions of clades of the three taxa relative to those containing the other taxa of the Glomeromycotina strengthened our confidence that *P. majewskii* represents a separate genus in the Paraglomeraceae, and the new fungus forming the basal lineage is an undescribed species of a new family in the order Paraglomerales. Therefore, below we transferred *P. majewskii* to a new genus in the Paraglomeraceae and erected a new family with a new genus and a new species in the Paraglomerales.

Materials and methods

ORIGIN OF THE STUDY MATERIAL, ESTABLISHMENT AND GROWTH OF TRAP AND SINGLE-SPECIES CULTURES, EXTRACTION OF SPORES, AND STAINING OF MYCORRHIZAL STRUCTURES: The study material used in morphological and molecular analyses of the new species described below came from Oman, Greece, and Tunisia (North Africa). The presence of the fungus in New Caledonia was confirmed on the

basis of sequences and microscopic pictures provided by T. Crossay. Spores were first extracted from trap cultures that were established from field-collected rhizosphere soils and roots of sampled plants mixed with autoclaved coarse grained sand and then grown in conditions described previously (Błaszowski et al. 2012, Al-Yahya'ei et al. 2011). The sampled plants were *Salvadora persica* Wall. and *Tetraena qatarensis* Beier & Thulin. growing at AlKamel, the area located between Al-Sharqiya Sands and Oman Mountains in southern Arabia in the Sultanate of Oman (Al-Yahya'ei et al. 2011), and *Ammophila arenaria* (L.) Link colonizing sand dunes of the Mediterranean Sea located near Thessalonica, Greece, and Tunis, Tunisia.

Single-species cultures of the fungus coming from Oman were initiated by positioning a single spore close to a leek (*Allium porrum* L.) seed and growing in conditions described by Symanczik et al. (2014), and those with the Greek and Tunisian isolates by inoculating roots of *Plantago lanceolata* L. with 10–20 spores per pot and growing according to Błaszowski et al. (2012). Spores for morphological and molecular analyses and roots for studies of mycorrhizal structures were collected from four- to five-month-old cultures. Spores were extracted from trap and single-species cultures by wet sieving and sucrose density gradient centrifugation (Daniels & Skipper 1982) and by the method described by Błaszowski et al. (2015). Roots were stained as described in Błaszowski (2012).

MICROSCOPY AND NOMENCLATURE: Morphological features of spores and the phenotypic and histochemical characters of spore wall layers were determined after examination of at least 100 spores mounted in water, lactic acid, polyvinyl alcohol/lactic acid/glycerol (PVLG, Omar et al. 1979) and a mixture of PVLG and Melzer's reagent (1:1, v/v). The preparation of spores for studies, determination of colour, and photographing of spores and mycorrhizal structures were as those described previously (Błaszowski 2012, Błaszowski et al. 2012). Types of spore wall layers are those defined by Błaszowski (2012), Stürmer & Morton (1997), and Walker (1983). Colour names are from Kornerup & Wanscher (1983). Nomenclature of fungi and the authors of fungal names are from the Index Fungorum website <http://www.indexfungorum.org/AuthorsOfFungalNames.htm>. Voucher specimens were mounted in PVLG and a mixture of PVLG and Melzer's reagent (1:1, v/v) on slides and deposited at the common mycological herbarium of the ETH and University of Zurich, Switzerland (Z+ZT, holotype), the Department of Ecology, Protection and Shaping of Environment (DEPSE), West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Poland and in the herbarium at Oregon State University (OSC) in Corvallis, Oregon, USA (isotypes).

MOLECULAR PHYLOGENY, DNA EXTRACTION, POLYMERASE CHAIN REACTION, CLONING, AND DNA SEQUENCING: Molecular analyses of spores from Oman were performed at Zurich Basel Plant Science Center, Institute of Botany, University of Basel, Switzerland. The Greek and Tunisian isolates were studied at J. Błaszowski's lab. Crude DNA was extracted from eight single spores. The treatment of the spores prior to polymerase chain reactions (PCRs), the conditions and primers used in the PCRs to obtain sequences of the small subunit (SSU) rRNA gene, the internal transcribed spacer 1 (ITS1), the 5.8S rRNA gene, ITS2 rDNA (hereinafter named ITS), and the large subunit (LSU) rRNA gene (together named SSU–ITS–LSU nrDNA), as well as cloning and sequencing were as those described in Błaszowski et al. (2013) and Symanczik et al. (2014). The sequences were deposited in GenBank (KY630227–KY630251).

SEQUENCE ALIGNMENT AND PHYLOGENETIC ANALYSES: Aligning SSU–ITS–LSU nrDNA sequences of AMF belonging to distant clades may be impossible or may led to erroneous conclusions due to the highly variable ITS1 and ITS2 regions (Krüger et al. 2012, pers. observ.). Therefore, to know the position of the AMF discussed here among other taxa of the Glomeromycotina, we performed pilot phylogenetic analyses separately with SSU-only and LSU-only sequences of the fungus and species representing all named genera of AMF with glomoid spores. The analyses placed the fungus basally relative to the other AMF and indicated that it is most closely related to *Paraglomus* spp. (data not shown). Consequently, we assembled a set with sequences covering the SSU–ITS–LSU region or part thereof. Apart from 17 sequences of our fungus, the set contained 60 other sequences that characterized seven species originally described in the genus *Paraglomus* and one to three species each of the families Ambisporaceae, Archaeosporaceae and Geosiphonaceae. The outgroup was represented by sequences of species of the families Endogonaceae Paol. and Mortierellaceae A. Fisch.

The pilot and final sequence sets were aligned with MAFFT v. 7 using the auto option (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). In the SSU–ITS–LSU set, indels were coded by means of the simple indel

coding algorithm (Simmons et al. 2001) as implemented in GapCoder (Young & Healy 2003) and this binary character set was added to the nucleotide alignment, as described and justified in Błaszowski et al. (2014). Bayesian (BI) analysis was conducted with MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) using SSU–ITS–LSU sequences plus indel analysis divided into four partitions. GTR+G and two-parameter Markov (Mk2 Lewis) models were applied for the nucleotide partitions and indel matrices, respectively. The GTR+G nucleotide substitution model was selected in jModelTest (Posada 2008) considering the Akaike criterion. Four Markov chains were run for 5 000 000 generations, sampling every 100 steps, with a burn-in at 7500 sampled trees. Maximum likelihood (ML) analysis was carried out with the raxmlGUI (Silvestro & Michalak 2012) implementation of RAxML (Stamatakis 2014) with the GTRGAMMA algorithm. Rapid bootstrap analysis with 1000 replicates was used to test the support for the branches. The generated phylogenetic trees were visualized and edited in MEGA6 (Tamura et al. 2013).

Taxonomy

PHYLOGENY: The phylogenies of the fungi studied here were determined based on a set of SSU–ITS–LSU nrDNA sequences. The set was 2377 characters in length, had 2167 (91.17%) informative sites and comprised 77 sequences, of which 28 characterized six *Paraglomus* spp. (including the fungus originally described as *P. majewskii*), and 17 sequences represented our new AMF. Bayesian and ML phylogenetic analyses of the sequence set proved that *P. majewskii* represents a new basal genus in the family Paraglomeraceae and our undescribed species belongs to a new genus in a new basal family of the order Paraglomerales (Fig. 1). The clade with *P. majewskii* sequences and the node connecting it with the clade with sequences of the other *Paraglomus* spp. obtained full BI (1.0) and ML (100%) support values. The clade with the new taxon was also fully supported, and the BI and ML support values of the node connecting it with the clade representing the family Paraglomeraceae were 1.0 and 99%, respectively. The eight *P. majewskii* and the four *P. laccatum* sequences used in the analyses showed 83.6% similarity. The similarity between *P. majewskii* sequences and those of our new species was 77.8%. The intraspecific variability of sequences of *P. majewskii* and the new species were 0.9% and 1.3%, respectively. No environmental sequences were found matching closer than 85% with the sequences of the new species. The taxa are erected and defined below.

Erection of a new genus in the Paraglomeraceae

***Innospora* Błasz., Kovács, Chwat & Kozłowska, gen. nov.**

MycoBank MB 820124.

Spores single, glomoid, hyaline with one spore wall and a subtending hypha with an open pore. Mycorrhiza with arbuscules and vesicles staining variable in Trypan blue. nrDNA sequences highly divergent from those of *Paraglomus* spp., from which and other genera of the Glomeromycotina and other fungi differing in the SSU nrDNA sequences GATAGAGGCCTACCATGGTAGTAACGGGTAACGGG GAATTAGGGTGATTCCGGAGAGGG,GTCTTGTTATTGGAATGAGTAC GATTAAATCTCCTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG

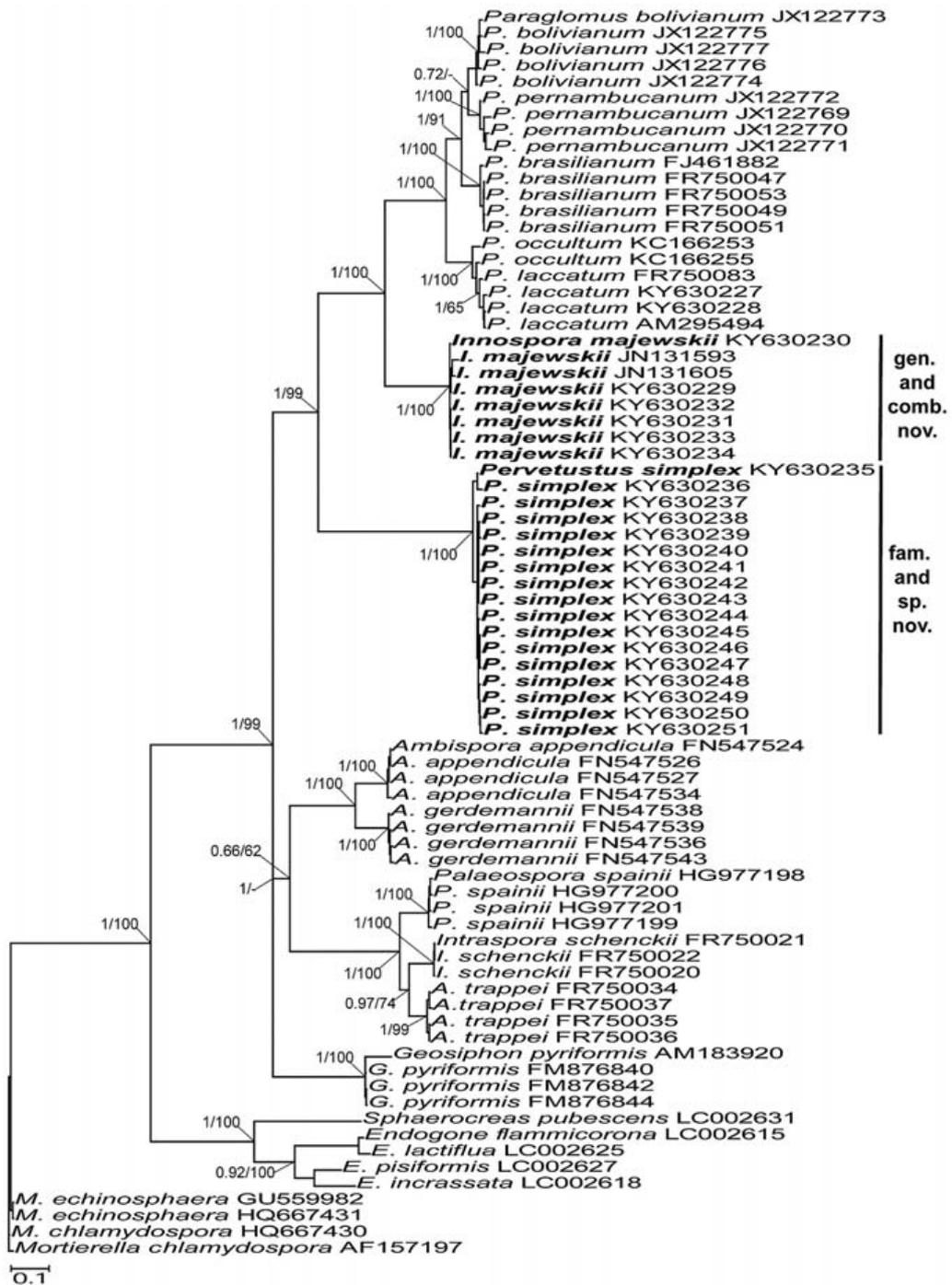


Fig. 1. A 50% majority rule consensus phylogram inferred from a Bayesian analysis of SSU-ITS-LSU nrDNA sequences of *Innospora majewskii* comb. nov. and *Pervetustus simplex* gen. and sp. nov., five known *Paraglomus* spp. and six species of the families Ambisporaceae, Archaeosporaceae and Geosiphonaceae of the Glomeromycotina with seven species of the families Endogonaceae and Mortierellaceae as outgroup. The two new taxa are in boldface and their names are followed by GenBank accession numbers. The Bayesian posterior probabilities \square 0.50 and ML bootstrap values \square 50% are shown near the branches, respectively. Bar indicates 0.1 expected change per site per branch.

CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGT
TAAAAGCTCGTAGTTGAACTTCAGGCCTGTCCAGATGGTCCGCCT
TAA,GCTCGAATACATTAGCATGGAATAATGGAATAGGACGATGGTTCTAT
TTTGTGGTTCTAGGACCGTTGTAATGATTAATAGGGATAGT and GGGGGC
ATTAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATTGAAGACTAAC
TACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGT
TAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTAT
GCCGACTAGGAATCGGGCGATGTTGACAAAATGACTCGCTCGGCACCT
CATGGGAAACCAAAGTGTGGT, the ITS2–LSU nrDNA signature sequence
TTTATATTCCTTTATTATGAGACCTCAAATCAGACAAGAATACCC
GCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAA
CAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGACAGCT
CAAATTTTAAATCGGTTTGCACAATGCAGCCCGAGTTGTAGTTT
GAAGAAGTCTGTGCGCAG and the LSU nrDNA sequences TTGTGAAATTTTC
GCATGGCAGGTCAGCATCAGTTTC and GCTCCCCGTGCTAACAGCATGC
TGAGTGGGTGTGGGGACGCTTTGAACACCAGGTTGCGGAAGCCAGC.

ETYMOLOGY: Latin, *Innospora*, *inno* = float, *spora* = spore, referring to spores of this fungus floating in water.

TYPE SPECIES: *Innospora majewskii* (Błaszcz. & Kovács) Błaszcz., Kovács, Chwat & Kozłowska, comb. nov. MycoBank No. MB 820125.

BASIONYM: *Paraglomus majewskii* Błaszcz. & Kovács. Mycologia 104: 149, 2012.

NOTES: Other data on the morphology, phylogeny, and distribution of the species are in Błaszczowski (2012) and Błaszczowski et al. (2012).

Innospora majewskii does not contain any particular morphological trait conclusively distinguishing the species from those of other genera of the Glomeromycotina with glomoid spores. The formation of one-walled spores clearly separates *I. majewskii* from *Paraglomus* spp. having two-walled spores, as Mello et al. (2013) concluded. However, one-walled glomoid spores are also produced in all members of the orders Archaeosporales and Glomerales and many species of the order Diversisporales (Redecker et al. 2013, Bills & Morton 2015), as well as a fungus representing a new family described below. Thus, only a large phylogenetic distance, unique molecular properties included in the signature sequences mentioned above, and the position of the clade with the sequences relative to other clades in the Glomeromycotina unambiguously indicate that the species should represent a new genus (Fig. 1).

Erection of a new family and a new genus in the Paraglomerales

Pervetustaceae Błaszcz., Chwat, Kozłowska, Symanczik & Al-Yahya’ei, **fam. nov.**

MycoBank MB 820126.

Spores single, glomoid, hyaline. Mycorrhiza with arbuscules staining variably in Trypan blue. nrDNA sequences highly divergent from those of *Innospora* and *Paraglomus* spp., from which and other genera of the Glomeromycotina and other fungi differing in the SSU

nrDNA signature sequences CTTGGTGTCCGCGGGAACCAGGACCTTTACCTT
GAAAAAATTAGAGTGCTCAAAGCGGGCTCGTACGCTTGAATACATTAG
CATGGAATAATGAAATAGGACGACGGTTCTATTTTGTGGTTTCCGGG and
GCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGATC
GAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACTATGC
CGACTGGGAATCGGGCGATGTTA, the ITS2–LSU nrDNA sequence ATTCCT
GGCCTCAGATCAAGCAAGACCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
AGC and the LSU nrDNA sequences GTCCACGGCCGGCGCACCGGATGCG
TACGATACGACCTC, AGTTCGTTTCGCCGTGCACTATTCCGCATGGCAGGC
CAGCGTCGGTTTCGGACGTCGTAAAACGGCCGGGGAAAGGTGGCCCCC
GCGGGGGTGTTTACAGACCCTGGTCAATGCGGGCGTGCGGAACCGAG
GAATGCGGGCGGCGACCCTTCTGGGCTTGGACCTTTCCTTTGTGTGGC
GGC, TCGTTCCGAGCTTGCTCGGGCGTGGGTGACCGTTCGCTCAA and C
ACCGCCAAGGACGCTGGCGTAATGGCTTCAAACGACCCGTCTTGAAA
CACGGACCAAGGAGTC.

ETYMOLOGY: Latin, from *pervetusta* = very old, referring to the molecular phylogeny of the type species of the family, suggesting its very old origin.

TYPE GENUS: *Pervetustus* Błaszcz., Chwat, Kozłowska, Symanczik & Al-Yahya'ei.

***Pervetustus* Błaszcz., Chwat, Kozłowska, Symanczik & Al-Yahya'ei, gen. nov.**

Mycobank MB 820127.

Diagnostic characters as for Pervetustaceae.

TYPE SPECIES: *Pervetustus simplex* Błaszcz., Chwat, Kozłowska, Crossay, Symanczik & Al-Yahya'ei, sp. nov.

ETYMOLOGY: Latin, *Pervetustus*, as for Pervetustaceae.

NOTES: The formation of single, colourless, very small spores with one spore wall (Figs 2–7) by the new fungus characterized below suggested that it is most closely related to *I. majewskii*. However, the unique nrDNA sequences of the fungus, which differ from those of *I. majewskii* by an average of 22.2%, and the basal position of the clade with the sequences relative to the clades with sequences of the other species of the Glomeromycotina (Fig. 1) proved that the fungus is a new species of a previously unrecognized new genus and a new family.

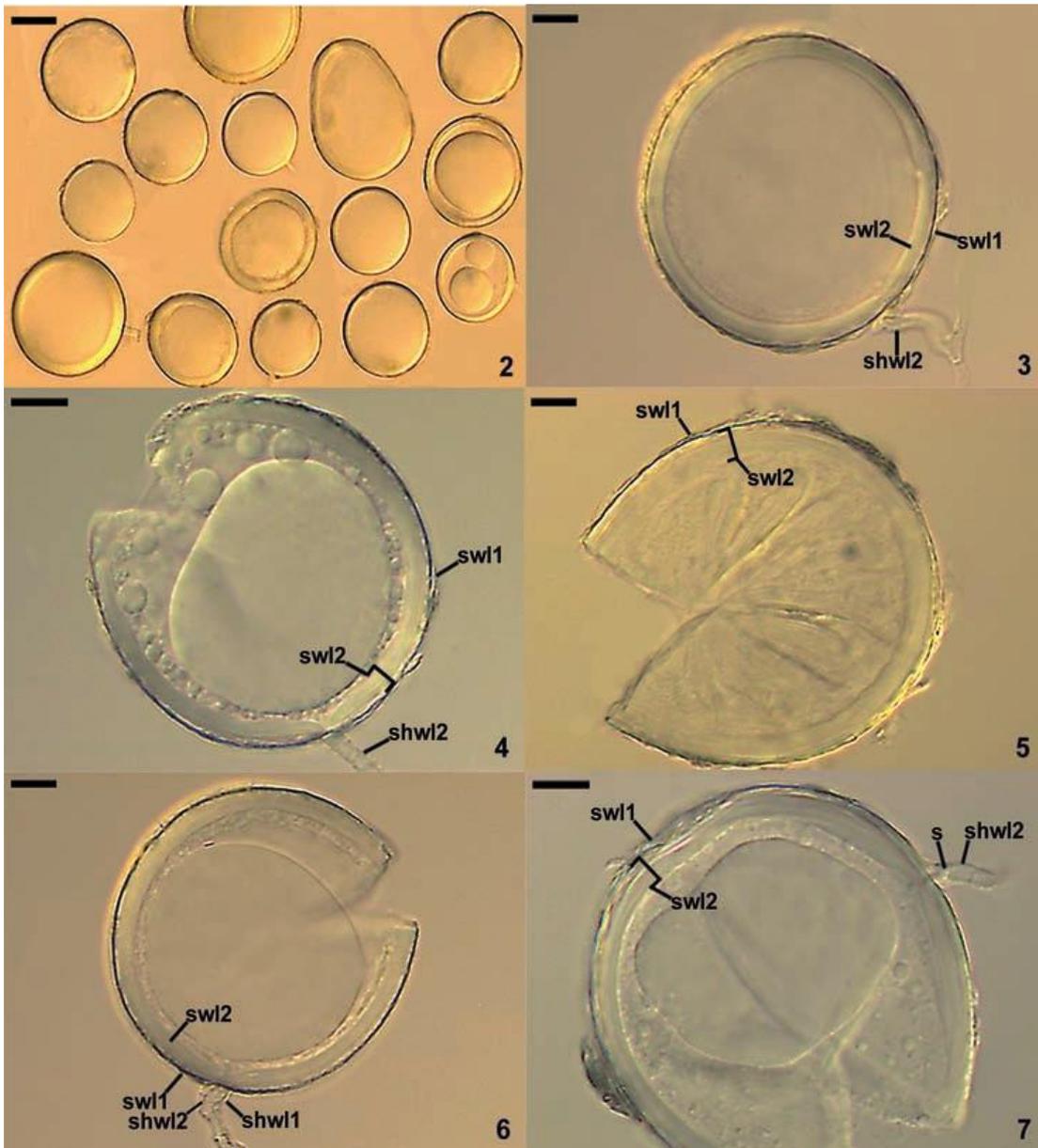
According to Oehl et al. (2011a), likely all *Paraglomus* spp. germinate through the spore wall instead of through the subtending hypha as in species of most other genera with glomoid spores. Unfortunately, the mode of spore germination in *I. majewskii* and *Pe. simplex* has not been recognized to date.

***Pervetustus simplex* Błaszcz., Chwat, Kozłowska, Crossay, Symanczik & Al-Yahya'ei, sp. nov.**

Figs 2–11

Mycobank MB 820128.

COLLECTIONS EXAMINED: HOLOTYPE: ZT Myc 57795 (Z+ZT), isotypes: 3258–3274, 3276–3280 (DEPSE), and OSC 156399, OSC 156400 (OSC).



Figs 2–7. *Pervetustus simplex*. 2. Intact spores. 3, 4. Spore wall layers (swl) 1 and 2 and subtending hyphal wall layer (shwl) 2; shwl1 is completely sloughed. 5. Spore wall layers (swl) 1 and 2. 6. Spore wall layers (swl) 1 and 2 and subtending hyphal wall layers (shwl) 1 and 2. 7. Spore wall layers (swl) 1 and 2 and subtending hyphal wall layer (shwl) 2; shwl1 is completely sloughed; note the septum (s) in the lumen of the subtending hypha. Figs 3, 4, 6, 7. Spores in PVLG. Figs 2, 5. Spores in PVLG+Melzer's reagent. Figs 2–7. Differential interference microscopy. Bars: Fig. 2 = 20 μ m, Figs 3–7 = 10 μ m.

ETYMOLOGY: Latin, *simplex*, referring to the morphological simplicity of the fungus.

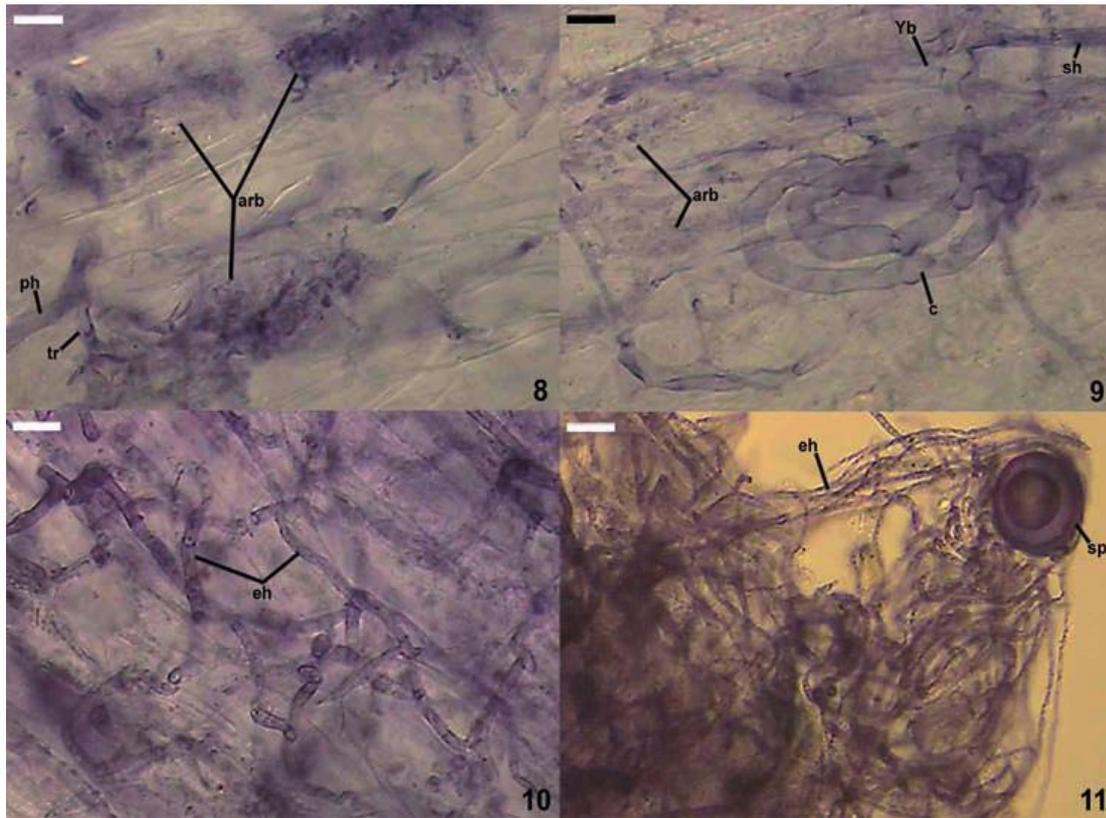
SPOROCARPS unknown. Spores formed singly in soil (Figs 2–7) and blastically at the tip of sporogenous hyphae developed from mycorrhizal extraradical hyphae. SPORES hyaline; globose to subglobose; (17–)51(–67) μm diam.; very rarely ovoid; 52–58 \times 58–63 μm ; with one subtending hypha (Figs 2–7). SPORE WALL consists of two hyaline layers (Figs 3–7). Layer 1, forming the spore surface, evanescent, (1.0–)1.5(–2.3) μm thick, short-lived, usually highly deteriorated or completely sloughed in most spores (Figs 3–7). Layer 2 laminate, smooth, (3.8–)5.1(–7.3) μm thick, consisting of very thin, <0.5 μm thick, laminae, tightly adherent to each other (Figs 3–7). Layers 1 and 2 do not show amyloid or dextrinoid reaction in Melzer's reagent (Figs 2, 5). SUBTENDING HYPHA hyaline; straight or recurved, cylindrical to slightly funnel-shaped, sometimes slightly constricted at the spore base; (3.0–)4.2(–5.8) μm wide at the spore base (Figs 3, 4, 6, 7). WALL OF SUBTENDING HYPHA hyaline; (1.0–)1.3(–1.8) μm thick at the spore base; continuous with spore wall layers 1 and 2; layer 1 usually highly deteriorated and present only near the spore base or completely sloughed in most spores (Figs 3, 4, 6, 7). PORE (0.8–)1.8(–2.8) μm diam, open (Figs 3, 4, 6) or occluded by a straight or curved septum connecting the inner surfaces of subtending hyphal wall layer 2 (Fig. 7). GERMINATION unknown.

MYCORRHIZAL ASSOCIATIONS: In the field, *Pe. simplex* was likely associated with roots of *S. persica* and *T. qatarensis* (growing in undisturbed natural field at Al-Kamel in Al-Sharqiyia region of Oman), *Am. arenaria* (colonizing sand dunes of the Mediterranean Sea near Thessalonica, Greece and Tunis, Tunisia) and *Alphitonia neocaledonica* (Schltr.) Guillaumin (an endemic plant of New Caledonia that grew in soil of a nickel mine). However, the presence of the fungus inside roots of the plant species was not examined using molecular methods.

In single-species cultures with *A. porrum* and *P. lanceolata* as host plants, *Pe. simplex* formed mycorrhiza with arbuscules and intraradical and extraradical hyphae (Figs 8–11). No vesicles were found. Arbuscules were generally widely dispersed along the root fragments examined (Figs 8, 9). Intraradical hyphae grew along the root axis, were (2.0–)3.8(–8.8) μm wide, straight or slightly recurved, and occasionally formed Y-shaped branches and coils (Fig. 9). The coils were ellipsoidal; 22.8–28.8 \times 36.8–62.5 μm ; when seen in a plan view. Extraradical hyphae were (1.8–)3.1(–4.5) μm wide and occurred infrequently or abundantly, depending on the root fragment examined (Figs 10, 11). In 0.1% Trypan blue, arbuscules stained pale violet (17A3) to greyish violet (17B3), intraradical hyphae violet white (17A2) to light violet (17A5), coils pale violet (17A3) to light violet (17A5), and extraradical hyphae pastel violet (17A4) to greyish violet (17C6, Figs 8–11).

PHYLOGENETIC POSITION: As that of *Pervetustaceae* fam. nov. (see above and Fig. 1).

DISTRIBUTION AND HABITAT: As mentioned in "*Mycorrhizal associations*", *Pe. simplex* has so far been found only in an undisturbed natural field located in Oman, in two maritime sand dune sites belonging to Greece and Tunisia, and in soil of a nickel mine of New Caledonia. The Oman field is situated in a sandy plain area (22°14'11"N, 59°10'30"E) characterized by its hyperaridity based on the aridity index defined by



Figs 8–11. Mycorrhizal structures of *Pervetustus simplex* in roots of *Plantago lanceolata* stained in 0.1% Trypan blue. 8. Arbuscules (a) and arbuscular trunk (t) developed from parent hypha (ph). 9. Arbuscules (a), Y-shaped branch (Yb), straight hypha (sh), and coil (c). 10. Extraradical hyphae (eh) on the root surface. 11. Extraradical hyphae (eh) and spore (sp). Figs 8–11. In PVLG. Figs 8–11. Differential interference microscopy. Bars: Figs 8–10 = 10 μm , Fig. 11 = 20 μm .

the United Nations Environmental Program (UNEP 2006). Annual rainfall does not exceed 100 mm and summer temperatures exceed 48 °C (Symanczik et al. 2014). The Greek (40°33'59"E, 22°57'26"E) and Tunisian (36°48'19"N, 10°12'04"E) sites were located ca. 50 m and 20 m, respectively, from the bank of the Mediterranean Sea. The New Caledonian nickel mine is situated in the great south ultramafic massif of the archipelago, near Plum (22°16'35"S, 166°36'55"E). The annual rainfall on the study site ranges from 900 to 2000 mm with variations between and within years (Enright et al. 2001). Sampling in Oman and Tunisia took place in August 2006, in Greece in September 2008, and in New Caledonia in September 2014. Chemical and physical properties of the habitat soil from Oman are presented in Al-Yahya'ei et al. (2011). The soil from New Caledonia is a colluvial lateritic soil with the following characteristics: coarse sand, 39.4%; fine sand, 22.1%; silt-clay, 37.2%; pH H₂O, 5.9; pH KCl, 5.6; total C, 42.1 g kg⁻¹; total N, 2.2 g kg⁻¹; total P, 147 mg kg⁻¹; available P (Mehlich), 3 mg kg⁻¹; and total Ni, 4.78 g kg⁻¹.

BLAST queries did not show any sequence from environmental samples with at least 97% similarity to those of *Pe. simplex*. The fungus has not also been found in ca. 3000 field-collected soil samples and ca. 2900 trap cultures that represented different cultivated and uncultivated sites located in Africa, Asia, Brazil, Europe, and USA (Błaszowski, pers. observ.). Thus, *Pe. simplex* is likely to be rare in the world.

NOTES: Morphologically *Pe. simplex* is conspicuous because of its very small and colourless spores that are produced singly in soil and have a simple spore wall structure consisting of an evanescent, short-lived, thin outer layer and a much thicker, permanent, smooth, laminate inner layer. None of these layers shows amyloid or dextrinoid reaction in Melzer's reagent (Figs 2–7).

Spores of *Pe. simplex* and *I. majewskii* are similar in colour (are hyaline), size, width of their subtending hypha, thickness of its wall and in diameter of the subtending hyphal pore at the spore base (Błaszowski et al. 2012). However, in *I. majewskii* the spore wall is 1.4–1.6-fold thicker and consists of three layers (vs. two layers in *Pe. simplex*, Figs 3–7), and its subtending hyphal pore is open (vs. open or occluded by a septum, Figs 3, 4, 6, 7). Finally, the subtending hypha of *I. majewskii* spores is more regular in shape (cylindrical to flared vs. cylindrical to slightly funnel-shaped in *Pe. simplex*).

Most importantly, *Pe. simplex* is unique due to its molecular properties expressed among others in the signature sequences given above.

Acknowledgements

We thank Dr. Roland Kirschner for managing the review process of the paper. This study was supported in part by the Polish National Centre of Science, grants no. 2012/05/B/NZ8/00498 and 2012/07/N/NZ8/02363, Oman's Ministry of Agriculture and Fisheries, the Universities of Basel and of UAE which are gratefully acknowledged.

References

- AL-YAHYA'EI, M.N., F. OEHL F, M. VALLINO, E. LUMINI, D. REDECKER et al. 2011: Unique arbuscular mycorrhizal fungal communities uncovered in date palm plantations and surrounding desert habitats of southern Arabia. – *Mycorrhiza* **21**: 195–209, doi:10.1007/s00572-010-0323-5.
- BILLS, R.B. & J.B MORTON 2015: A combination of morphology and 28S rRNA gene sequences provide grouping and ranking criteria to merge eight into three *Ambispora* species (Ambisporaceae, Glomeromycota). – *Mycorrhiza* **25**: 485–498, doi: 10.1007/s00572-015-0626-7.
- BŁASZKOWSKI, J. 2012: Glomeromycota. – W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- BŁASZKOWSKI, J., G. CHWAT, A. GÓRALSKA, P. RYSZKA & M. ORFANOUDAKIS 2014: *Septoglomus jasnowskae* and *Septoglomus turnauae*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). – *Mycol. Prog.* **13**: 999–1009, doi: 10.1007/s11557-014-0985-z).
- BŁASZKOWSKI, J., G. CHWAT, G.M. KOVÁCS, B.K. GÁSPÁR, P. RYSZKA et al. 2013: *Septoglomus fuscum* and *S. furcatum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). – *Mycologia* **105**: 670–680, doi: 10.3852/12–127.

- BŁASZKOWSKI, J., G. CHWAT, S. SYMANCZIK & A. GÓRALSKA 2015: *Dominikia duoreactiva* and *D. difficilevidera*, two new species in the Glomeromycota. – *Botany* **93**: 389–396, doi:10.1139/cjb-2015-0016.
- BŁASZKOWSKI, J., G.M. KOVÁCS, B.K. GÁSPÁR, T.K. BALÁZS, F. BUSCOT et al. 2012: The arbuscular mycorrhizal *Paraglomus majewskii* sp. nov. represents a new distinct basal lineage in Paraglomeraceae (Glomeromycota). – *Mycologia* **104**: 148–156, doi: 10.3852/10-430.
- DANIELS, B.A. & H.D. SKIPPER 1982: Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. – In: SCHENCK, N.C. (ed.): *Methods and principles of mycorrhizal research*. St Paul, Minnesota: Am. Phytopathol. Soc. p. 29–35.
- ENRIGHT, N.J., L. RIGG & T. JAFFRÉ 2001: Environmental controls on species composition along a (maquis) shrubland to forest gradient on ultramafics at Mont Do, New Caledonia. – *S. Afr. J. Sci.* **97**: 573–58.
- GERDEMANN, J.W. & J.M. TRAPPE 1974: The Endogonaceae in the Pacific Northwest. – *Myc. Memoir* **5**: 1–76.
- HUELSENBECK, J.P. & F. RONQUIST 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. – *Bioinformatics* **17**: 754–755, doi: 10.1093/bioinformatics/17.8.754
- KORNERUP, A. & J.H. WANSCHER 1983: *Methuen handbook of colour*. – 3rd ed., Methuen, London.
- KRÜGER, M., C. KRÜGER, C. WALKER, H. STOCKINGER & A. SCHÜSSLER 2012: Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. – *New Phytol.* **193**: 970–984, doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x
- MELLO DE, C.M.A., G.A. DA SILVA, D.M.A. DE ASSIS, J.S. DE PONTES, A.C.A. FERREIRA et al. 2013: *Paraglomus pernambucanum* sp. nov. and *Paraglomus bolivianum* comb. nov., and biogeographic distribution of *Paraglomus* and *Pacispora*. – *J. Appl. Bot. Food Qual.* **86**: 113–125, doi: 10.5073/JABFQ.2013.086.016
- MORTON, J.B. & D. REDECKER 2001: Two families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus* based on concordant molecular and morphological characters. – *Mycologia* **93**: 181–195, doi: 10.2307/3761615
- OEHL, F., G.A. DA SILVA, B.T. GOTO & E. SIEVERDING 2011a: Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. – *Mycotaxon* **116**: 75–120, doi: 10.5248/116.75
- OEHL, F., G.A. DA SILVA, B.T. GOTO, L.C. MAIA & E. SIEVERDING 2011b: Glomeromycota: two new classes and a new order. – *Mycotaxon* **116**: 365–379, doi: 10.5248/116.365
- OMAR, M.B., L. BOLLAN & W.A. HEATHER 1979: A permanent mounting medium for fungi. – *Bull. Brit. Mycol. Soc.* **13**: 31–32, doi: 10.1016/S0007-1528(79)80038-3
- POSADA, D. 2008: jModelTest: phylogenetic model averaging. – *Mol. Biol. Evol.* **25**: 1253–1256, doi: 10.1093/molbev/msn083
- REDECKER, D., J.B. MORTON & T.D. BRUNS 2000: Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). – *Mol. Phylogenet. Evol.* **14**: 297–301, doi: 10.1006/mpev.1999.0713
- REDECKER, D., A. SCHÜSSLER, H. STOCKINGER, S.L. STÜRMER, J.B. MORTON et al. 2013: An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). – *Mycorrhiza* **23**: 515–531, doi: 10.1007/s00572-013-0486-y
- ROSE, S.L. & J.M. TRAPPE 1980: Three new endomycorrhizal *Glomus* spp. associated with actinorrhizal shrubs. – *Mycotaxon* **10**: 413–420.
- SAWAKI, H., K. SUGAWARA & M. SAITO 1998: Phylogenetic position of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora gerdemanni*, and its synanamorph *Glomus leptotichum*, based upon 18 rRNA gene sequence. – *Mycoscience* **39**: 477–480, doi: 10.1007/BF02460910

- SCHÜSSLER, A. & C. WALKER 2010: The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. – Royal Botanic Garden Edinburgh, Gloucester.
- SILVESTRO, D. & I. MICHALAK 2012: raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. – *Org. Divers. Evol.* **12**: 335–337, doi: 10.1007/s13127-011-0056-0
- SIMMONS, M.P., H. OCHOTERENA & T.G. CARR 2001: Incorporation, relative homoplasy, and effect of gap characters in sequence-based phylogenetic analyses. – *Syst. Biol.* **50**: 454–462, doi: 10.1080/106351501300318049
- SPAIN, J.L. 2003: Emendation of *Archaeospora* and its type species, *Archaeospora trappei*. – *Mycotaxon* **87**: 109–112.
- SPAIN, J.L., E. SIEVERDING & F. OEHL 2006: *Appendicispora*: a new genus in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes, with a discussion of the genus *Archaeospora*. – *Mycotaxon* **97**: 163–182.
- SPATAFORA, J.W., Y. CHANG, G.L. BENNY, K. LAZARUS, M.E. SMITH et al. 2016: A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. – *Mycologia* **108**: 1028–1046, doi: 10.3852/16-042
- STAMATAKIS, A. 2014: RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. – *Bioinformatics* **30**: 1312–1313, doi: 10.1093/bioinformatics/btu033
- STÜRMER, S.L. & J.B. MORTON 1997: Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. – *Mycologia* **89**: 72–81, doi: 10.2307/3761174
- SYMANCZIK, S., J. BŁASZKOWSKI, G. CHWAT, T. BOLLER, A. WIEMKEN et al. 2014: Three new species of arbuscular mycorrhizal fungi discovered at one location in a desert of Oman: *Diversispora omaniana*, *Septoglomus nakheelum* and *Rhizophagus arabicus*. – *Mycologia* **106**: 243–259, doi: 10.3852/106.2.243
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI & S. KUMAR 2013: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. – *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725–2729, doi:10.1093/molbev/mst197
- UNEP 2006: Global deserts outlook. – United Nations environmental program; 148 p.
- WALKER, C. 1983: Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. – *Mycotaxon* **18**: 443–455.
- WALKER C. & L.H. RHODES 1981: *Glomus albidus*: a new species in the Endogonaceae. – *Mycotaxon* **12**: 509–514.
- YOUNG, N.D. & J. HEALY 2003: GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. – *BMC Bioinformatics* **4**: 6, doi: 10.1186/1471-2105-4-6

Manuscript submitted November 10, 2016: accepted March 31, 2017.

Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia

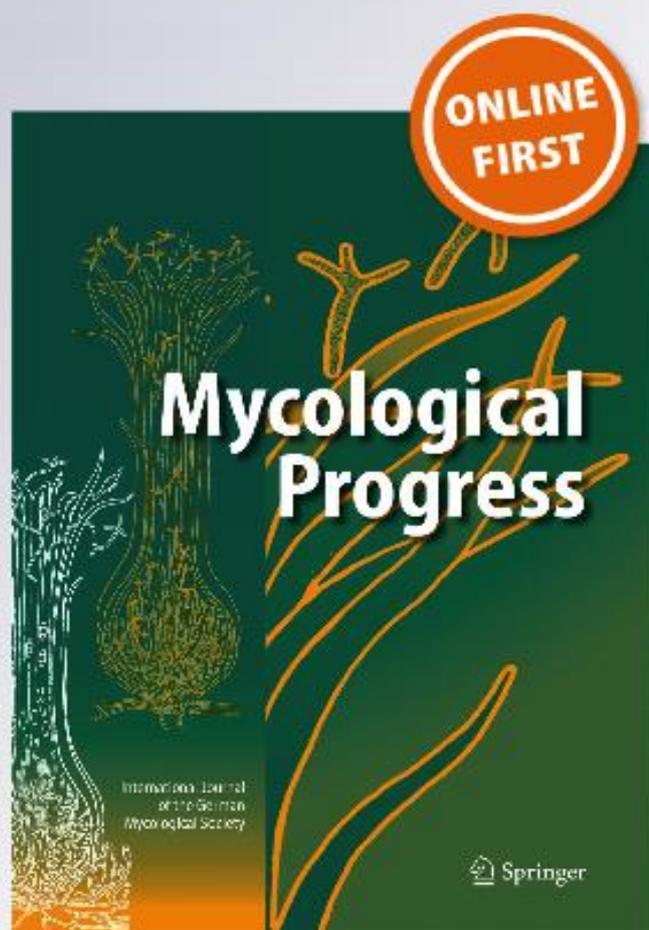
Thomas Crossay, Alexis Cilia, Yvon Cavaloc, Hamid Amir & Dirk Redecker

Mycological Progress

ISSN 1617-416X

Mycol Progress

DOI 10.1007/s11557-018-1386-5



 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by German Mycological Society and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia

Thomas Crossay¹ & Alexis Glia¹ & Yvon Cavaloc¹ & Hamid Amir¹ & Dirk Redecker²

Received: 13 September 2017 / Revised: 2 February 2018 / Accepted: 8 February 2018
 # German Mycological Society and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Four new species of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi (Glomeromycota) were isolated from the rhizosphere of endemic metallophytic plants in ultramafic soils in New Caledonia (South Pacific) and propagated on *Sorghum vulgare*. *Acaulospora saccata* and *A. fragilissima* are placed in the Acaulosporaceae, *Scutellospora ovalis* in the Gigasporaceae, and *Rhizophagus neocaledonicus* in the Glomeraceae. The novelty of these species is supported by morphological characters of spores and phylogenetic analyses of sequences of the rDNA region, comprising partial small subunit rRNA gene, the internal transcribed spacers, 5.8S rRNA gene, and the partial large subunit rRNA gene. New Caledonia is known for its high degree of endemism in plants, which is due to its geographic position and geological history. This is the first taxonomic study exploring local Glomeromycota of this island, which may help to address the question of possible AMF endemism in future studies.

Keywords Arbuscular mycorrhiza · New Caledonia · Ultramafic soils · Glomeromycota · Species description

Introduction

Fungi of the phylum Glomeromycota are ubiquitous microorganisms living in symbiosis with 70–90% of the world's vascular land plants (Smith and Read 2008; Brundrett 2009). Despite their common occurrence and evidence of their association with land plants since their appearance 460 million years ago (Firozynski and Malloch 1975; Redecker et al.

2000), the number of described arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) species is very low compared with other phyla of fungi (Ohsowski et al. 2014). During the recent decades, the knowledge of diversity of AMF has considerably increased due to the use of DNA-based identification tools and continuing progress in morphological identification of AMF taxa (da Silva et al. 2006; Krüger et al. 2012; Blaszowski et al. 2015). Many AM fungi are known only from environmental DNA sequences and the number of molecular operational taxonomical units or virtual taxa exceeds the number of AMF species described by traditional morphological analyses of soil-borne spores (Öpik et al. 2013, 2014). In 2017, A. Schüßler (<http://www.amf-phylogeny.com/>) listed 291 species of Glomeromycota. Molecular diversity studies have suggested the existence of 348 to 1600 Glomeromycota species (Ohsowski et al. 2014). Recent studies (Opik et al. 2013; Ohsowski et al. 2014) suggested that targeting previously unstudied or little-studied environments would result in revealing many novel AMF taxa. Furthermore, every year about a dozen of new AMF species have been described through AMF single-species culturing and concomitant morphological and molecular phylogenetic analyses, often, but not only from, thus far unexplored habitats (Palenzuela et al. 2013; Symanczik et al. 2014; Blaszowski et al. 2015).

Section Editor: Marco Thines

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11557-018-1386-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Hamid Amir
hamid.amir@univ-nc.nc

* Dirk Redecker
dirk.redecker@u-bourgogne.fr

¹ Institut des Sciences Exactes et Appliquées (EA 7484), Université de Nouvelle-Calédonie, BP R4, 98851 Nouméa Cedex, Nouvelle-Calédonie

² Agroécologie, INRA, AgroSup Dijon, CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France

New Caledonia, a tropical archipelago in the South Pacific, is known as one of the world's most important biodiversity hot spots, displaying a very high proportion of endemic and endangered plant species (Myers et al. 2000). In New Caledonia, serpentine ecosystems which have developed over ultramafic rocks (peridotites, serpentinites) cover one third of the surface area of the main island called Grande Terre. The originality of these ecosystems, where plant endemism levels reach 82%, is not only due to their geographic isolation, but also to the adaptation of communities to strong edaphic constraints (Jaffré 1993). New Caledonian ultramafic soils have very low levels of major elements (N, P, K, and Ca), with low Ca/Mg ratios and high concentrations of Ni, Co, Cr, and Mn (Brooks 1987; Jaffré and L'Huillier 2010). The stripping of large areas, for the purpose of nickel mining, endangers this unique ecological heritage. Ecological restoration of degraded mine sites is therefore a major concern in New Caledonia. Improvement of currently used techniques for revegetation (Luçon et al. 1997) requires a good understanding of the role of mycorrhizal associations involved in ultramafic soils (Smith and Read 2008; Graham 2009). Previous studies of New Caledonian ultramafic maquis (a biome characterized by shrubby and bushy plants with a low growth rate and xeromorphic foliage, equivalent to Italian macchia) have highlighted that nearly all plant species are arbuscular mycorrhizal (Amir et al. 1997; Perrier et al. 2006), including Ni-hyperaccumulating plants (Amir et al. 2007) and species of Cyperaceae and Proteaceae, two families generally considered as non-mycorrhizal (Amir et al. 1997; Perrier et al. 2006; Amir and Ducouso 2010; Lagrange et al. 2011). AMF isolates from ultramafic soils have been found to be highly tolerant to Ni (Amir et al. 2008), so AM fungi from New Caledonian ultramafic soils are a good target to be used as plant growth promoters. Ultramafic habitats are among those that have received only little attention in AMF diversity, (Fitzsimons and Miller 2010; Schechter and Bruns 2008, 2012; Gensous 2014; Kohout et al. 2015); these studies suggested the presence of several new species of AMF in ultramafic soil. AM fungi from ultramafic soil have never been clearly described and identified.

Our morphological and molecular investigation of fungal communities associated with plants of ultramafic soil of New Caledonia revealed the presence of four undescribed AMF species in pot trap cultures comprising mixtures of rhizosphere soils and roots of plant colonizing the ultramafic soil in New Caledonia. We subsequently grew the fungi in single-species cultures. Two species formed typical acaulosporoid spores, one formed typical gigasporoid spores, and the last species formed glomoid spores. The aim of the present study was to isolate, describe, and identify these new species, based on both morphological and molecular analyses.

Material and methods

Study site

The archipelago of New Caledonia is situated in the South Pacific, approximately 1500 km east of Australia and 1800 km north of New Zealand. The climate is subtropical to tropical, with a rainy season from December to May and a dry season from June to November that can vary in duration and severity. Mean monthly temperature in the capital, Noumea, is highest in February with 26.2 °C and lowest in August with 19.9 °C (Enright et al. 2001). The study site is covered by ultramafic maquis vegetation under annual rainfall varying from 900 to 4000 mm (Proctor 2003; Read et al. 2006). The study site is situated in the great south ultramafic massif and was in the area at Plum (22° 16' S, 166° 38' E). The altitude varies from 34 to 206 m. The topography is rugged with slopes often above 30%. In our study site, the vegetation is a mosaic of maquis and relict forests (paraforest formations). The paraforest formations are restricted to humid or topographically protected sites and form small patches surrounded by maquis. New Caledonian maquis has more than 2150 species with an endemism level of 82% (Jaffré et al. 2010) and occurs generally in old forest zones which have declined, during the last centuries, following successive fires (McCoy et al. 1999). There are several unifying features: maquis is evergreen, 1–7 m tall, more or less bushy or with a dense sedge layer, most species are sclerophyllous and it includes some transitional forest forms. Most of the maquis species have a well-developed superficial root system (Jaffré and L'Huillier 2010).

Soil geochemistry

The soil of the study site is a colluvial lateritic soil with following characteristics: coarse sand, 39.4%; fine sand, 22.1%; silt-clay, 37.2%; pH H₂O, 5.9; pH KCl, 5.6; total C, 42.1 g kg⁻¹; total N, 2.2 g kg⁻¹; total P, 147 mg kg⁻¹; available P (Mehlich), 3 mg kg⁻¹; total Ca, 1.06 g kg⁻¹; total Mg, 5.08 g kg⁻¹; Ca/Mg, 0.207; total Ni, 4.78 g kg⁻¹; DTPA extractable Ni, 91.4 mg kg⁻¹; DTPA extractable Co, 71.0 mg kg⁻¹; DTPA extractable Cr, 0.5 mg kg⁻¹; DTPA extractable Mn, 864.8 mg kg⁻¹.

Sampling, establishment, and growth of trap and single-species cultures

Soil samples were collected from the rhizosphere of four endemic plants: *Codia discolor* (Brongn. & Gris) Guillaumin, *Alphitonia neocaledonica* (Schltr.) Guillaumin, *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. and *Sannantha leratii* (Schltr.) Peter G. Wilson. All these plants species are arbuscular mycorrhizal (Amir et al. 1997; Perrier et al. 2006) and are used for

ecological restoration of New Caledonian degraded mine sites. An area of 200 m² was delimited; rhizosphere soil (100 g of soil and roots) of ten plants of each species was sampled. The rhizosphere soil was sampled by first digging a pit of 30-cm diameter and 30-cm depth, close to the plant stems to have access to the roots. Soil was then collected from the border of the pits in order to obtain a sample representing a vertical cross section across the root zones of these plants and then the soil was pooled per plants species. For the four samples of soil (one sample by plant species), 20 pot trap cultures (1 L) were established. Pots were filled with 0.85 kg of an autoclaved substrate consisting of ultramafic soil from the study site. As plant growth in this pure ultramafic soil was very slow, a mixture of 80% ultramafic soil and 20% commercial compost (v/v) was used. The soil was first autoclaved three times at 120 °C for 1 h, with an interval of 24 h, to eliminate microorganisms. The mycorrhizal inocula (50-g mixture of rhizosphere soils and roots each) were spread as a layer on the surface of the substrate in the pots and covered with a thin layer of the substrate. *Sorghum vulgare* was used as trap plant. Seeds of *S. vulgare* were surface-disinfected in a 1.25% solution of sodium hypochlorite (12° chlorometric) for 15 min, and then rinsed with distilled water in sterilized Petri dishes. The seeds were subsequently sown in sterilized vermiculite (autoclaved for 60 min; at 120 °C) before transfer to experimental pots. Two 2-week-old AMF-free plantlets of *S. vulgare* were removed from the vermiculite and planted in every experimental pot. The trap cultures were kept in a greenhouse (temperature, 21–24 °C; relative humidity, 70%) for 7 months and irrigated manually every 2 days. After 7 months, spores were extracted by wet sieving and sucrose density gradient centrifugation, using a modified method of Daniels and Skipper (1982). For each trap culture, 10 g of soil were wet-sieved, and then 10 mL of the sieved material enriched in spores was well suspended in 20 mL of water in a 50-mL Falcon tube. A 25 mL sucrose solution (70% v/w) was injected to the bottom of the tube, forming a stepped density gradient that was centrifuged at 900g for 3 min. Spores of AMF were collected from the interface of sucrose solution, washed with tap water on a 36- μ m sieve for 2 min, and transferred to Petri dishes. Spores were then picked individually under a stereomicroscope and examined morphologically. Then, several spores of each morphotype were surface-sterilized using the procedure of Bécard and Fortin (1988). These steps were carried out aseptically in a laminar flow cabinet. Spores were washed in a 0.05% (v/v) Tween 20 solution, soaked in a vacutainer tube with 2% (w/v) chloramine T solution for 10 min, and rinsed three times by centrifugations for 30 s in sterile distilled water. A second treatment with chloramine T followed by rinsing in water was performed in the same manner. Then, spores were washed 10 min in a sterile solution of 200 mg L⁻¹ streptomycin and 100 mg L⁻¹ gentamycin and rinsed three times by centrifugations for 30 s in sterile distilled

water. Spores were used immediately for establishment of single-species cultures, using the Bone-tainer technique[^] (Koske and Gemma 1997; <https://invam.wvu.edu/methods/cultures/single-species-cultures>). For this technique, the same substrate used for trap cultures was placed in a 50 mL Bone tainer[^] (Cooperative Centrale Agricole, Nouméa). As previously described two, 2-week-old, AMF-free plantlets of *S. vulgare* were placed in every Bone-tainer.[^] A total of 100 surface-sterilized spores of each morphotype in 200 μ l water were pipetted along the length of the intertwined roots, so they theoretically were in good contact with roots. After two months, the Bone tainers[^] were transplanted into 450-mL pots filled with the same substrate. Overall, 25 single-species cultures were set up per morphotype and kept in a greenhouse (temperature, 21–24 °C; relative humidity, 70%) for 6 months. They were irrigated manually every 2 days. After 6 months, spores were extracted by wet sieving and sucrose density gradient centrifugation as described previously. Spores from successful, pure single-species cultures were re-inoculated on *S. vulgare* as described previously. After 6 months, spores were extracted and used for morphological and molecular analyses and for root organ culture. The presence of mycorrhizal structures on roots of *S. vulgare* was determined using a clearing and staining protocol for roots (Phillips and Hayman 1970) as modified by Błazzkowski et al. (2006): tissue acidification was performed using 20% hydrochloric acid instead of 1% and trypan blue concentration was 0.1% instead of 0.05%.

Root organ culture

Transformed chicory (*Cichorium intybus* L.) roots were provided by BCCM (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms). Routine maintenance of the roots was performed on the modified Strullu-Romand (MSR) medium (Diop et al. 1994) in an inverted position at 28 °C in the dark. The MSR medium contained in milligrams per liter distilled water: MgSO₄·7H₂O, 739; KNO₃, 76; KH₂PO₄, 4.1; Ca(NO₃)₂·4H₂O, 359; NaFeEDTA, 8; KCl, 65; MnSO₄·4H₂O, 2.45; ZnSO₄·7H₂O, 0.29; H₃BO₃, 1.86; CuSO₄·5H₂O, 0.24; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.035; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.0024; thiamine, 1; pyridoxine, 0.9; nicotinic acid, 1; calcium pantothenate, 0.9; cyanocobalamin, 0.4; biotine 0.9 × 10⁻³; sucrose, 6000 and phytigel (SIGMA) 4500. The pH was adjusted to 5.5 before sterilization at 121 °C for 15 min. Fungal inoculum: 500 spores of single-species cultures of each species were extracted and surface-sterilized as previously described. Then, 30–60 spores per Petri plate were spread out on MSR medium. Ten Petri plates were established for each species. Primary mycorrhizal colonization was achieved after 1 week by placing root explants (3 cm) in each Petri plate. Root organ cultures were kept in an inverted position for 6 months at 28 °C in the dark. Every

week in situ observation of different structures: germination, ramification, runner hyphae, branch absorbing structure, and spores of each fungus were performed under a compound microscope (Olympus BX 50). Photographs were taken using a digital camera (Leica DFC 295) on a compound microscope (Olympus BX 50) using Leica Application Suite Version V 4.1 software.

Morphological analyses

Spores from single-species cultures of each new fungus were extracted as previously described. Morphological features of spores and phenotypic and histochemical characters of spore wall layers were determined after examination of at least 100 spores mounted in water, lactic acid, PVLG (Omar et al. 1979), and a mixture of PVLG and Melzer's reagent (1:1, v/v). For the Rhizophagus species, some spores were cleared in a solution of 25% sodium hypochlorite (12° chlorometric) for 5 min, and then rinsed with distilled water in sterilized Petri dishes. The terminology for spore subcellular structures follows Błaszczkowski (2012). Spore color was examined under a dissecting microscope on fresh specimens immersed in water. Colors were determined using the INVAM color chart. Photographs were taken using a digital camera (Leica DFC 295) on a compound microscope (Olympus BX 50) equipped with Nomarski differential interference contrast optics and Leica Application Suite Version V 4.1 software. Specimens mounted in PVLG and a (1:1) mixture of PVLG and Melzer's reagent were deposited at the Mycological Herbarium of the National Museum (France, Paris) in MNHN-PC-PC0728837, MNHN-PC-PC0728838, MNHN-PC-PC0728839, MNHN-PC-PC0728840.

Morphological comparisons of *Acaulospora* spp. and *Scutellospora* spp. were performed using species descriptions from the INVAM website (<http://fungi.invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions.html>). Exceptions were *A. papillosa*, for which the study of Pereira et al. (2016) was used and *S. spinosissima*, *S. pernambucana*, and *S. alterata* for which the original descriptions by Walker et al. (1998), da Silva et al. (2008), and Pontes et al. (2013) were used, respectively.

Molecular analyses

One to three spores of each species from the single-species cultures on *S. vulgare* were crushed using a pipette tip in a 1.5 Eppendorf tube containing 10 µl of ultrapure water, 2 µl was used for polymerase chain reaction (PCR). A DNA fragment of around 1545 bp, covering partial SSU, the whole ITS and the variable D1 and D2 regions of the LSU, was amplified by nested PCR using the AMF-specific primers developed by Krüger et al. (2009). In the first round of PCR, the primers

SSUmAf and LSUmAr were used. In the second, nested round of PCR, the primer SSUmCf and LSUmBr were used with 1 µl of the first PCR round product as a template. The PCR mix included 0.4 U of AmpliTaq® 360 DNA polymerase (Applied Biosystems), 1X AmpliTaq® 360 PCR buffer (Applied Biosystems), 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer and 1 µl of the template in a final volume of 25 µl. The cycling parameters for the first PCR were 3 min at 98 °C followed by 35 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 60 °C, and 1 min at 72 °C. The program was concluded by a final extension phase of 10 min at 72 °C. The cycling parameters for the second PCR were the same as in the first PCR except for the number of cycles (35) and annealing temperature (63 °C). The PCRs were conducted in triplicates. PCR products were checked on 1% agarose gels. The positive PCR products were cloned into pGEM-T using a pGEM-T easy vector system (Promega) following the manufacturer's instructions. Ligated plasmids were transformed into CaCl₂ competent *Escherichia coli* DH5α cells using a heat-shock approach. The transformed bacteria were plated into LB (Luria-Bertani) medium containing ampicillin (50 µg/mL) and grown overnight at 37 °C. A PCR using the universal M13F and M13R primers was performed directly on bacterial colonies to screen for positive clones. Clones that exhibited fragments with the expected size were sequenced on an Applied Biosystems 3730xl capillary sequencer (IRD, Noumea) with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The forward and reverse strands were assembled in ChromasPro (Technelysium Pty Ltd., Australia). The glomeromycotan origin of the sequences was tested by BLAST (Altschul et al. 1997). The new sequence were deposited in the EMBL database under the accession numbers: KY362428, KY362429, KY362430; KY362431, KY362432, KY362433; KY362434, KY362435; KY362436, KY362437, KY362438.

Phylogenetic analyses

A sequence alignment of our data and published glomeromycotan species was obtained using MAFFT 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>; Katoh and Standley 2013) using the slow iterative refinement option FF-NS-I (gap opening penalty 1.0, offset value 0.1). Maximum likelihood (ML) analyses of the whole region (SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU) or of the 28S part were performed using PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010) and MEGA 7 software (Kumar et al. 2016) with bootstrap support obtained using 1000 replicates. Phylogenetic trees were viewed and edited using MEGA 7. Bayesian analyses were performed using MrBayes 3.2 (Ronquist and

Huelsenbeck 2003), using the General Time Reversible Model for 10^7 generations and a burnin value of 25%.

Results

Taxonomic analyses

Acaulospora saccata D. Redecker, Crossay & Clia, sp. nov.
Fig. 1a–j Mycobank MB820531

Holotype Isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Nouméa, April 2016, T. Crossay. Holotype deposited at Mycological Herbarium of the National Museum (France, Paris) MNHN-PC-PC0728838 (slide). This single-species culture was originally inoculated with 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of a single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Nouméa, October 2015, T. Crossay. The previous single-species culture generation originally was set up using 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot trap cultures propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Noumea, April 2015, T. Crossay. Pot trap cultures had originally been inoculated with rhizospheric soil of *Alphitonia neocaledonica* sampled in an ultramafic maquis in New Caledonia, September 2014, T. Crossay. This ultramafic maquis is located in south of Grand Terre island of New Caledonia at Plum, (22° 16' S, 166° 38' E).

Description Sporocarps unknown. Spores sessile, globose to subglobose, occasionally ovoid, hyaline when young, later to white to pale ochraceous (0/10/50/10), (69–)75(–85) μm in diameter, formed laterally on the sporogenous hypha (Fig. 1a). No sporiferous saccule observed in single-species culture (in vivo). Spore wall with two layers. Layer 1 hyaline, mucilaginous, disappearing during spore maturation, (1.0–)1.2(–1.5) μm thick (Fig. 1f). Layer 2 laminate, pale yellow (0/0/50/10) (4–)5.5(–6.5) μm thick (Fig. 1d–f). Inner wall 1 with one thin, hyaline, semi-flexible layer (1–)1.2(–1.5) μm thick (Fig. 1e–f). Inner wall 2 with two layers, layer 1 hyaline with granular excrescences (or Ebeads[^]) (0.8–1.6 μm thick), seem to associate with inner face of inner wall 1 (Fig. 1e). Layer 2 in PVLG at least (1.5–)1.8(–3.5) μm thick (Fig. 1e–f), plastic, turning deep beetroot purple (20/80/20/0 to 40/80/20/0) in Melzer's reagent (Fig. 1f), appearing sack-like and thus very difficult to break up by pressure. Germination through spore wall (Fig. 1h), no germination orb was observed.

Eymology From Latin *saccatus*, sac-shaped, referring to the innermost wall of the spore which resembles an elastic bag with folds that is difficult to break.

Habitat Rhizospheric soil in tropical ultramafic maquis.

Distribution Known only from the type locality.

Material examined Spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Nouméa, April 2016, T. Crossay, MNHN-PC-PC0728838.

In vitro morphology Spores formed laterally on the sporogenous hypha and no sporiferous saccules observed (Fig. 1b). Runner hyphae (3.5–)4(–4.5) μm diameter (Fig. 1c–g), often with swellings (Fig. 1c).

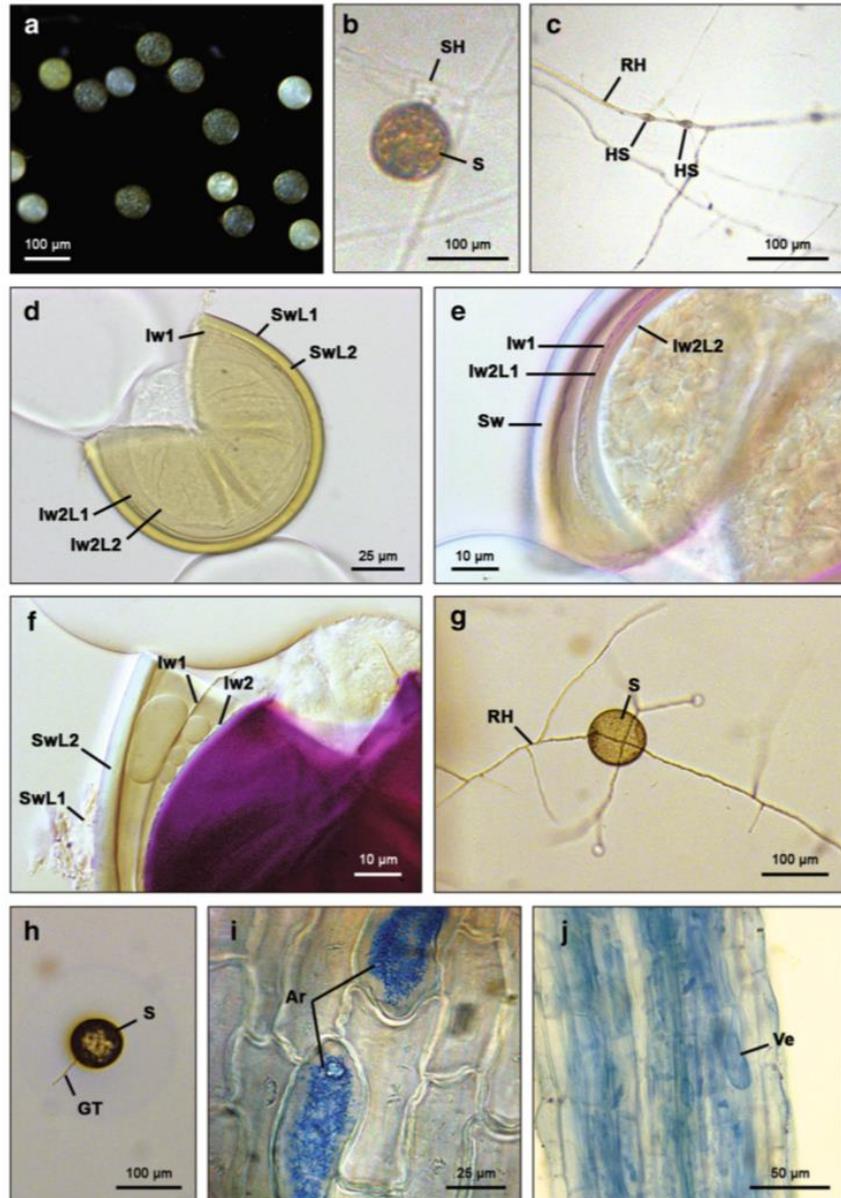
Molecular and phylogenetic analysis Phylogenetic analyses of the 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S region firmly places this species in a branch of the genus *Acaulospora*, containing *A. rugosa*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. delicata*, *A. dilatata*, *A. morrowiae*, and *A. papillosa* (Fig. 3). Analyses of the whole region (Fig. 3) or of the 28S part (see Supplementary information Fig. S1) using maximum likelihood analyses in MEGA and PhyML clearly separate this species from their closest relatives and from each other.

Notes Of the *Acaulospora* spp. that clustered in the major clade with the basal subclade represented by *A. saccata* (Fig. 3), the new species is morphologically most closely related to *A. delicata*. Only in these two species, the spore wall and inner wall 1 are two- and one-layered, respectively. In the other species, the spore wall comprises three layers, and inner wall 1 consists of two layers. Other features clearly separate *A. saccata* from *A. delicata*. Spores of *A. saccata* are approximately 1.2-fold smaller when globose, and their spore wall is 2-fold thicker. Moreover, layer 2 of inner wall 2 of *A. saccata* is plastic and stains purple in Melzer's reagent, whereas that of *A. delicata* is flexible, does not swell in PVLG (is not plastic), and stains faintly or does not stain at all in this reagent. For more details on the comparison with other species, see Supplementary Text File.

Acaulospora fragilissima D. Redecker, Crossay & Clia, sp. nov. Fig. 2a–i Mycobank MB820533

Holotype Isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Noumea, April 2016, T. Crossay. Holotype deposited at Mycological Herbarium of the National Museum

Fig. 1 a–j *Acaulospora saccata* spores. **a** Intact spores. **b** Intact spore (S) with sporogenous hyphae (SH) in root organ culture. **c** Runner hyphae (RH) with hyphal swelling (HS) in root organ culture. **d** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2) and inner walls 1 and 2 (Iw1, Iw2). **e** Inner wall 1 layer 1 (Iw1L1), inner wall 2 layers 1 and 2 (Iw2L1, Iw2L2). **f** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2), inner wall 1 layer 1 (Iw1L1), and inner wall 2 (Iw2). **g** Spore (S) and runner hyphae (RH) on root organ culture. **h** Germinal tube (GT) of spore (S). **i, j** Mycorrhizal structures of *A. saccata* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1% Trypan blue: arbuscules (Ar) and vesicles (Ve). **d, e** In PVLG. **f** In PVLG + Melzer's reagent

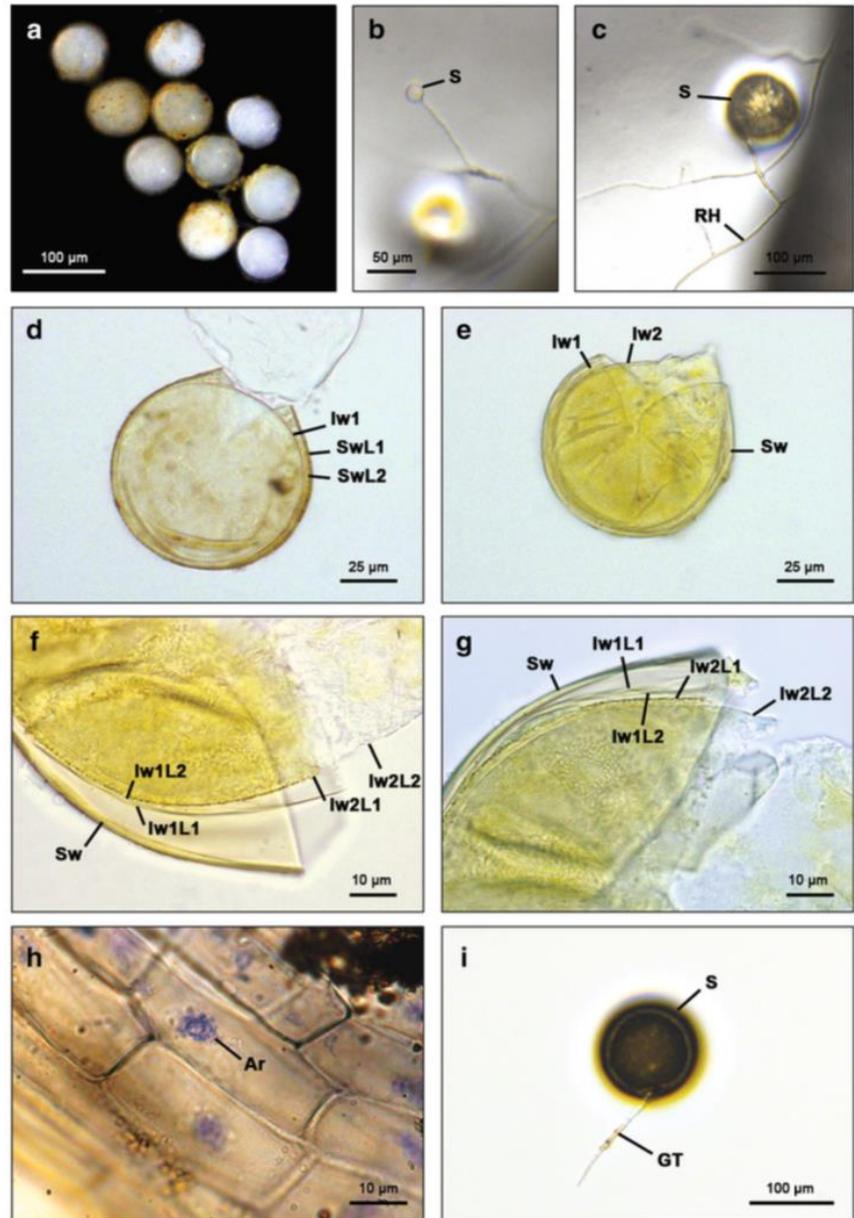


(France, Paris) in MNHN-PC-PC0728839 (slide). This single-species culture was originally inoculated with 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Noumea, October 2015, T. Crossay. The previous generation of single-species culture originally was inoculated with 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot trap cultures propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Noumea, April 2015, T. Crossay.

Pot trap cultures originally had been inoculated with rhizospheric soil of *Alphitonia neocaledonica* sampled in an ultramafic *maquis* in New Caledonia, September 2014, T. Crossay.

Description Sporocarps unknown. Spores sessile, globose to subglobose, occasionally ovoid, creamy white to pale ochraceous (0/10/40/0 to 0/10/70/10), (60–)67(–83) μm in diameter (Fig. 2a). No sporiferous saccule observed in

Fig. 2 a-i *Acaulospora fragilissima* spores. **a** Intact spores. **b** Intact spore (S) with sporogenous hyphae on root organ culture. **c** Runner hyphae (RH) on root organ culture. **d** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2) and inner wall 1 (Iw1). **e** Inner walls 1 and 2 (Iw1, Iw2). **f**, **g** Inner wall 1 layers 1 and 2 (Iw1L1, Iw1L2); Inner wall 2 layers 1 and 2 (Iw2L1, Iw2L2). **h** Mycorrhizal structures of *A. fragilissima* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1% Trypan blue: arbuscules (Ar). **i** Germinal tube (GT) of spore (S). **d**, **g** In PVLG. **e**, **f** In PVLG + Melzer's reagent



single-species culture (in vivo). Spore wall with two layers. Layer 1 hyaline, evanescent, disappearing during spore maturation, (1.0–)1.2(–1.5) μm thick (Fig. 2a–d), often with adhering debris (Fig. 2a). Layer 2 laminate, pale yellow (0/10/40/0) (1.9–)2.8(–3) μm thick (Fig. 2e–f–g). Inner wall 1 very thin, rigid, with two hyaline layers, rarely separating, together (1–)1.2(–1.5) μm thick (Fig. 2f–g). Inner wall 2 composed of two layers (Fig. 2e–g), not staining in

Melzer's reagent (Fig. 2f) except for layer 1 which has a light greenish yellow-ochre (10/0/80/0) tint after Melzer's staining. Layer 1 flexible, (0.9–)1(–1.2) μm thick, covered with granular excrescences in PVLG (Fig. 2f–g). Layer 2 thin, hyaline, flexible (0.8–)1(–1.2) μm thick, forming numerous folds, breaking easily by pressure on the cover slip (Fig. 2f–g). Germination through spore wall (Fig. 2i). No germination orb was observed.

Eymology From Latin *fragilissima*, highly fragile, is referring to the spores which break easily and are quickly degraded when stored.

Mycorrhizal structure Forming hyphal coils and arbuscules, staining with Trypan Blue (Fig. 2h).

Habitat Rhizospheric soil in tropical ultramafic maquis.

Distribution Known only from the type locality.

Material examined Spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Nouméa, April 2016, T. Crossay, MNHN-PC-PC0728839.

In vitro morphology Spores formed terminally on the sporogenous hyphae, no sporiferous saccule observed (Fig. 2b). Runner hyphae (2.5–)3(–3.2) diameter (Fig. 2c).

Molecular and phylogenetic analysis Phylogenetic analyses of the 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S region firmly place this species in a branch of the genus *Acaulospora*, containing *A. rugosa*, *A. longula*, *A. mella*, *A. delicata*, *A. dilatata*, *A. morrowiae*, and *A. papillosa* (Fig. 3). Analyses of the whole region (Fig. 3) or of the 28S part (see Supplementary information Fig. S1) using maximum likelihood analyses in MEGA and PhyML clearly separate this species from their closest relatives and from each other. *A. fragilissima* sp. nov. is well-differentiated by its DNA sequence from other species in the same major clade in the rDNA phylogeny (*A. mellea*, *A. delicata*, *A. dilatata*, *A. morrowiae*, *A. rugosa*, *A. longula*, *A. papillosa*).

Notes *Acaulospora fragilissima* differs from other *Acaulospora* spp. mainly in its molecular phylogeny (Fig. 3). In morphology, the species is most similar to *A. delicata*. These species are differentiated by the following characters: spores of *A. delicata* are clearly larger, differ somewhat in color, being pale yellow with a pale greenish tint, and their inner wall 1 consists of one layer instead of two as in *A. fragilissima*. For more details on the comparison with other species, see Supplementary Text File.

The two closest BLAST hits of *A. saccata* and *A. fragilissima* for its partial LSU sequences comprise only environmental sequences from maize roots in China (KF849639, KF849513), none of these closely related in phylogenetic trees (see Supplementary information Fig. S2). Bayesian analyses confirmed the phylogenetic placement of the two species by maximum likelihood (Suppl. Fig. 3).

Scutellospora ovalis D. Redecker, Crossay & Ollia, sp. nov. Fig. 4a–i Mycobank MB820535

Holotype Isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of a single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Noumea, April 2016, T. Crossay. Holotype deposited at Mycological Herbarium of the National Museum (France, Paris) in MNHN-PC-PC0728837 (slide). This single-species culture was originally inoculated with 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Nouméa, October 2015, T. Crossay. The previous generation of single-species culture originally was inoculated with 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot trap cultures propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Noumea, April 2015, T. Crossay. Pot trap cultures were originally inoculated with rhizospheric soil of *Sannantha leratii* sampled in an ultramafic maquis in New Caledonia, September 2014, T. Crossay.

Description Sporocarps unknown. Spores ellipsoid, hyaline when young, yellow ochraceous (0/10/80/0) at maturity, 90–110 × 175–260 µm in diameter, formed on a hyaline bulbous sporogenous cell, 15–20 × 25–30 µm. Subtending hypha hyaline, cylindrical (7–)8(–8.5) µm diameter (Fig. 4a–c). Spore wall with two layers. Layer 1 hyaline, often disappearing as spore ages, (1.2–)1.5(–2) µm thick (Fig. 4g). Layer 2 laminate, pale yellow (0/10/60/0) at maturity, (3.5–)4(–4.5) µm thick (Fig. 4f–h). Inner wall 1 very thin with two layers, layer 1 hyaline, (1–)1.2(–1.5) µm thick, layer 2 hyaline, (1–)1.1(–1.2) µm thick, these two layers are usually adherent and are positioned very close to the spore wall, therefore very difficult to detect (Fig. 4e–f). Inner wall 2 very thick and coriaceous, with two layers, layer 1 semi-flexible, (5–)6(–6.6) µm thick, staining lightly purple in Melzer's reagent (0/20/20/10) (Fig. 4e–f). Layer 2 (1–)1.25(–1.5) µm thick, plastic, forming numerous folds, staining deep beetroot purple in Melzer's (20/80/30/10 to 60/80/30/10) (Fig. 4e–f). Germination shield hyaline, bilobate, 20–25 × 40–45 µm with two germ tubes (Fig. 4d, g). No auxiliary cells observed.

Eymology From Latin *ovalis*, referring to the shape of the spore.

Mycorrhizal structure Forming hyphal coils and arbuscules, staining lightly with Trypan Blue (Fig. 4i).

Habitat Rhizospheric soil in tropical ultramafic maquis.

Distribution Known only from the type locality.

Fig. 3 ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequences of *Acaulospora saccata* and *Acaulospora fragilissima* and 31 known species of AMF, including *Claroideoglossum claroideum* as outgroup. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree based on small subunit-internal transcribed spacer-large subunit (SSU-ITS-LSU) rDNA sequences. Sequences labeled with an asterisk (*) represent the LSU gene only. Bootstrap values are given for each branch. The scale bar indicates the number of substitutions per site. Phylogenetic trees were viewed and edited using MEGA 7

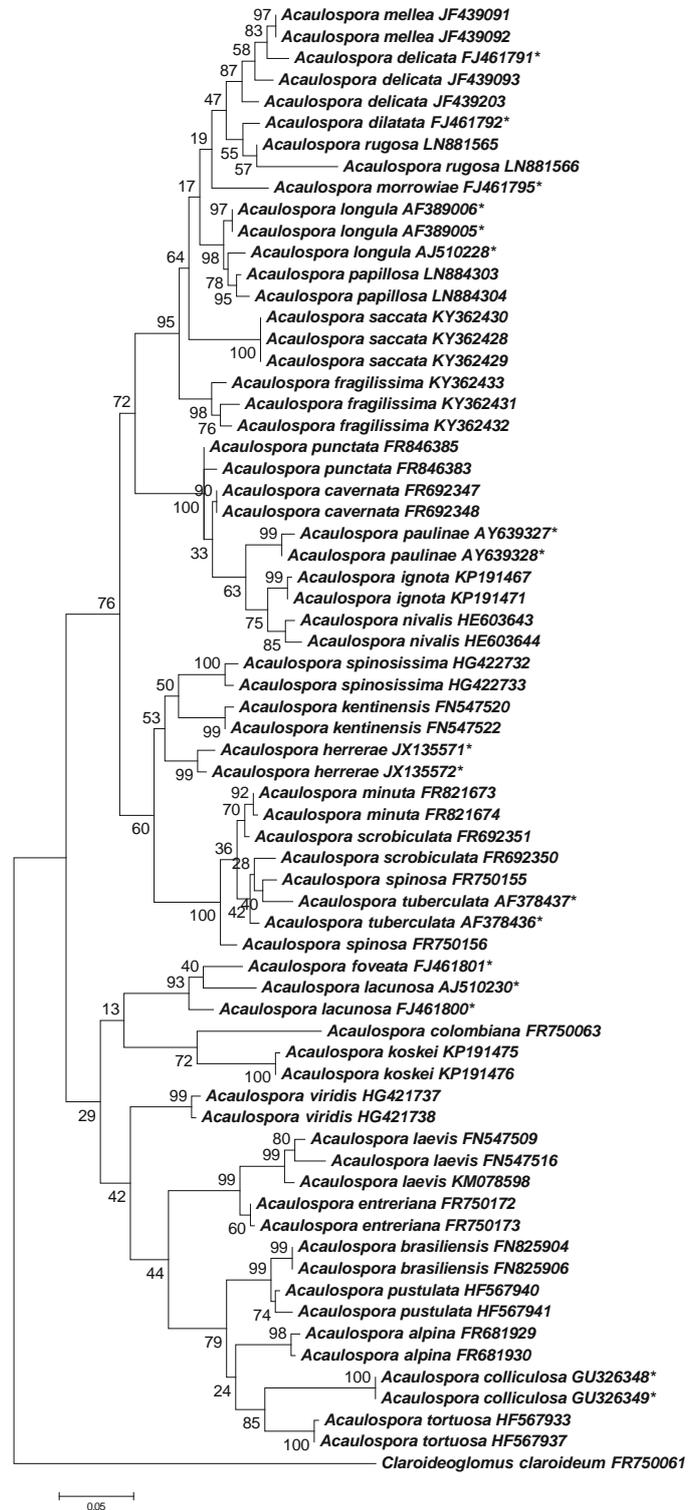
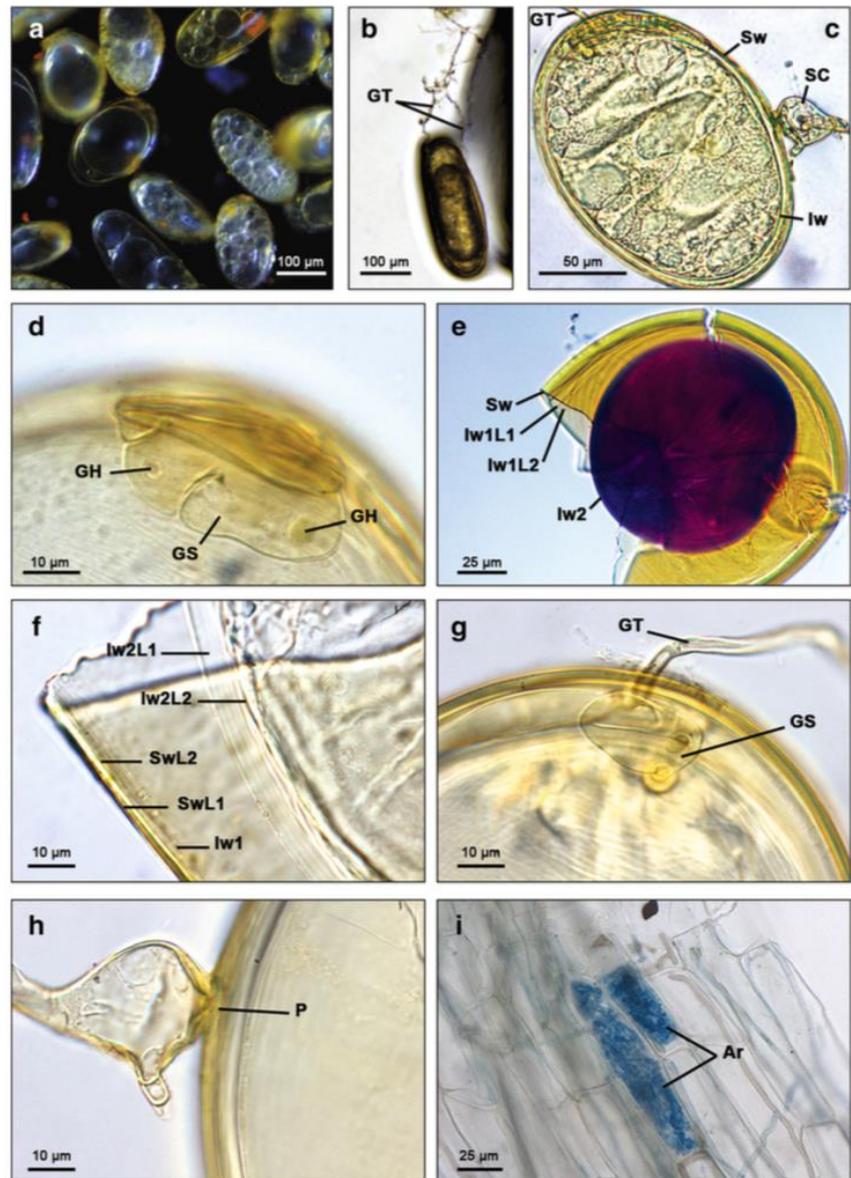


Fig. 4 a-i *Scutellospora ovalis* spores. **a** Intact spores. **b** Germinal tube (GT) of spore and ramification of hyphae on root organ culture. **c** Spore wall (Sw), sporogenous cell (sc), germinal tube (GT) and inner wall (Iw). **d** Germination shield (GS) with two germination holes (GH). **e** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2) and inner wall 1 (Iw1). **f** Spore wall layers 1 and 2 (SwL1, SwL2) and inner wall 1 layers 1 and 2 (Iw1L1, Iw1L2). **g** Germinal tube (GT) through spore germination shield (GS). **h** Sporogenous cell closed by a plug. **i** Mycorrhizal structures of *Scutellospora ovalis* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1% Trypan blue; arbuscules (Ar). **c, d, f, g, h** In PVLG. **e** In PVLG + Melzer's reagent



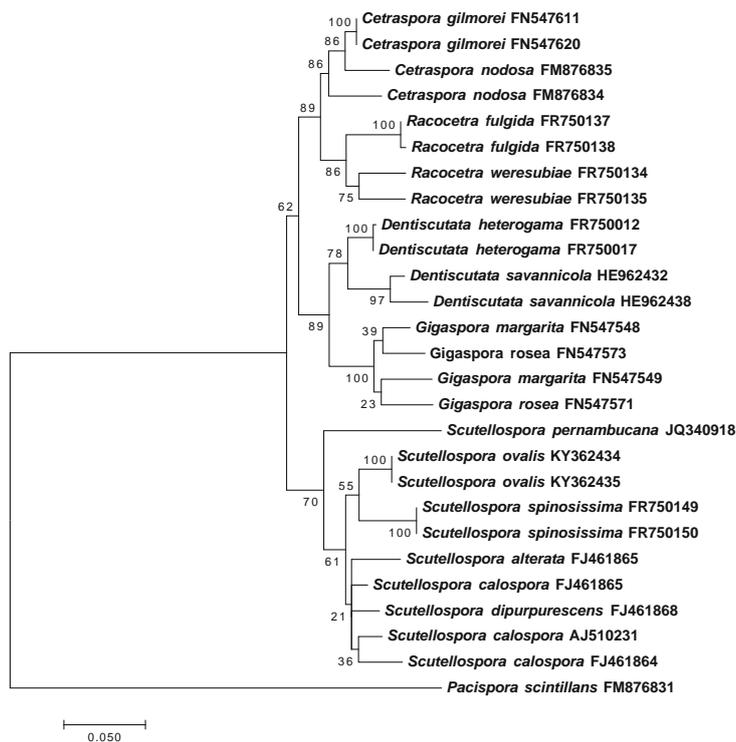
Material examined Spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Nouméa, April 2016, T. Crossay, MNHN-PC-PC0728837.

In vitro morphology Only germination and ramification (pre-symbiotic stage) (Fig. 4b) were observed, no sporulation occurred. Germination always with two germ tubes at the same

time, through spore germination shield (Fig. 4b). Germinal hyphae (4.5–)5.5(–6) μm diameter (Fig. 4b).

Molecular and phylogenetic analysis Phylogenetic analyses of the 28S rDNA region firmly place this species in a branch of the genus *Scutellospora* (Fig. 5) in the Gigasporaceae, and clearly separate this species from their closest relative, *S. spinosissima* and the remaining species of the genus.

Fig. 5 Maximum likelihood analysis of LSU rDNA sequences of *Scutellospora ovalis* including 12 known species of AMF, including *Pacispora scintillans* as outgroup. Bootstrap values are given for each branch. The scale bar indicates the number of substitutions per site. Phylogenetic trees were viewed and edited with MEGA 7



Notes In the rDNA-based phylogeny, *Scutellospora ovalis* sp. nov. forms a weakly-supported monophyletic group with *S. spinosissima*, a species described from Venezuela (Walker et al. 1998).

Scutellospora dipurpurescens, *S. calospora* and *S. alterata* are grouped in a neighboring loose clade or grade. Interestingly, *S. dipurpurescens*, *S. alterata*, and *S. calospora* share a 21 base pair insertion in the LSU rDNA, which has not been found in other Gigasporaceae. This insertion may constitute a synapomorphy characterizing the clade comprising these three taxa, but a gain in the clade of *Scutellospora* except *S. pernambucana*, followed by a loss in *S. ovalis* and *S. spinosissima* seems also possible.

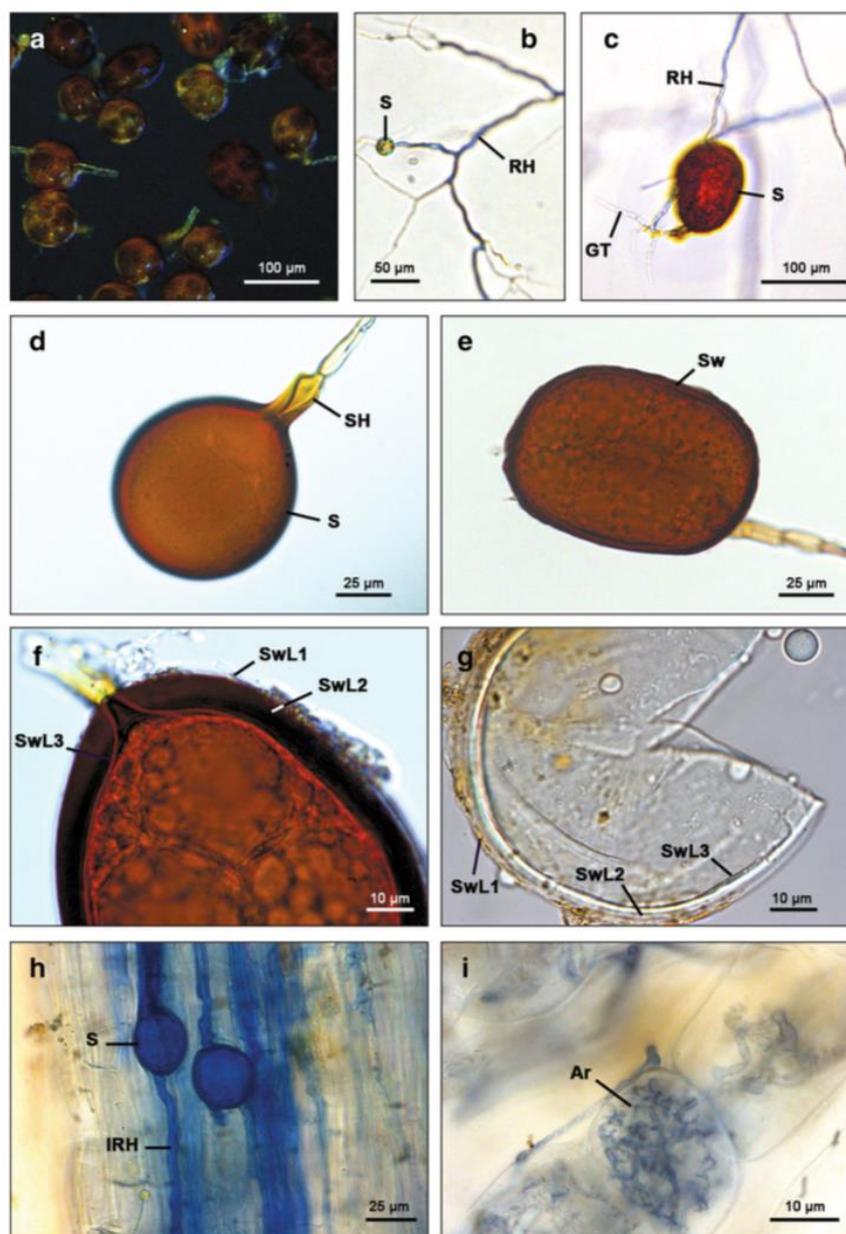
Scutellospora ovalis differs from other *Scutellospora* spp. by its (i) thicker spore wall layer 2 (mean 4 µm) and (ii) plastic inner wall 2 which is easily extruded from the spore wall. The latter has also been observed in *S. spinosissima* (differing from *S. ovalis* by the presence of spines on its spore wall layer 2) but is not possible in *S. calospora* and *S. dipurpurescens*. This feature has not been reported for *S. pernambucana* and *S. alterata*. Overall, spore wall structure of *S. ovalis* is more similar to *S. spinosissima*, with the difference that inner wall 2 of *S. spinosissima* is composed of three layers (vs. two in *S. ovalis*). *Scutellospora alterata* differs from all other *Scutellospora* species by an evanescent, papillate surface roughening[^] (Pontes et al. 2013).

The spores of *S. calospora* and *S. dipurpurescens* also exhibit a greenish tint which was not found in *S. ovalis* (see Supplementary information Fig. S4) and was not reported for *S. spinosissima*, *S. pernambucana* and *S. alterata*. For more details on the comparison with other species, see Supplementary Text File.

Rhizophagus neocaledonicus D. Redecker, Crossay & Glia, sp. nov. Fig. 6a-i Mycobank MB820537

Holotype Isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Nouméa, April 2016, T. Crossay. Holotype deposited at Mycological Herbarium of the National Museum (France, Paris) in MNHN-PC-PC0728840 (slide). This single-species culture was originally inoculated with 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Nouméa, September 2015, T. Crossay. The previous generation of single-species culture originally was inoculated with 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot trap cultures propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Noumea, March 2015, T. Crossay. Pot trap cultures were originally inoculated with rhizospheric soil of *Alphitonia neocaledonica* sampled in an

Fig. 6 a–i *Rhizophagus neocaledonicus* spores. **a** Intact spores. **b** Intact spore (S) in root organ culture and runner hyphae (RH) on root organ culture. **c** Spore (s), germinal tube (GT), and runner hyphae (RH) on root organ culture. **d** Spore (s) with subtending hyphae (SH). **e** Spore wall (Sw). **f, g** Spore wall layers 1, 2, and 3 (SwL1, SwL2, and SwL3). **h, i** Mycorrhizal structures of *R. neocaledonicus* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1% Trypan blue: arbuscules (Ar), spore (S), and intraradical hyphae (IRH). **d, f, g** In PVLG. **e** In PVLG + Melzer's reagent. **G.** Spore bleached in a 25% solution of sodium hypochlorite (12° chlorometric)

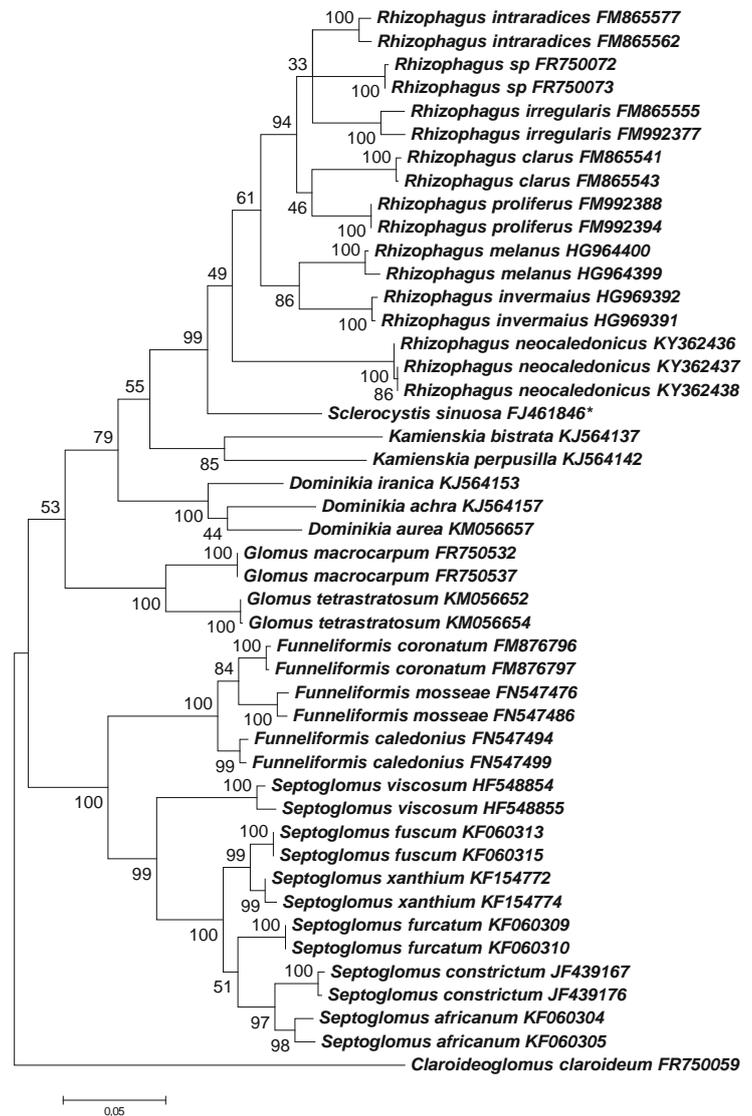


ultramafic *maquis* in New Caledonia, September 2014, T. Crossay.

Description Sporocarps unknown. Spores mostly globose to subglobose, (61–)75(–83) μm in diameter, sometimes oblong to irregular, 70–82 \times 95–113 μm , dark chestnut to coffee brown (40/60/100/0 to 60/80/100/10) (Fig. 6a–e). Spores found singly or in clusters of 2–3. Spore wall with three layers. Layer 1

hyaline, mucilaginous, in mature spores with attached debris, (1.5–)2(–2.5) μm thick, disappearing upon washing the spores during disinfection (Fig. 6f). Layer 2 laminate, dark brown (60/80/100/10), (5.4–)6(–6.5) μm thick (Fig. 6f). Layer 3 fine and tightly attached to layer 2, appearing bright brown (20/60/50/10), (0.8–)1(–1.2) μm thick (Fig. 6f–g). Hyphal attachment cylindrical to constricted (Fig. 6d). Spore occlusion by ingrowth of

Fig. 7 ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequence of *Rhizophagus neocaledonicus* and 24 known species of AMF, including *Claroideoglossum claroideum* as outgroup. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree based on small subunit-internal transcribed spacer-large subunit (SSU-ITS-LSU) rDNA sequence. Sequences labeled with an asterisk (*) represent the LSU gene only. Bootstrap values are given for each branch. The scale bar indicates the number of substitutions per site. Phylogenetic trees were viewed and edited using MEGA 7



spore wall. Spore germination through hyphal attachment (Fig. 6c). Subtending hypha at further distance from spore hyaline, cylindrical (5.5)–6(–6.5) μm diameter (Fig. 6d).

Eymology Indicating the location, New Caledonia, where it was first isolated.

Mycorrhizal structure Forming spores in the roots, vesicles and arbuscules, staining lightly with Trypan Blue (Fig. 4i).

Habitat Rhizospheric soil in tropical ultramafic maquis.

Distribution Known only from the type locality.

Material examined Spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single-species culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Nouméa, April 2016, T. Crossay, MNHN-PC-PC0728840.

In vitro morphology Spores formed intercalarily or terminally (Fig. 6c). In root organ culture, runner hyphae of a diameter of (4)–4.2–(4.5) μm (Fig. 6b, c).

Molecular and phylogenetic analysis Phylogenetic analyses accommodated sequences of *R. neocaledonicus* in a separate clade located basally relative to the clades with sequences of

the other *Rhizophagus* spp. considered (Fig. 7). The closest relatives of the new species were *R. invermaius* and *R. melanus*, which clustered in two sister subclades.

Notes *Rhizophagus neocaledonicus* sp. nov., is clearly distinct by its rDNA sequences. This species is phylogenetically quite distant from well-known *Rhizophagus* species such as *R. irregularis* or *R. clarus*, grouping at the periphery of the genus. Pending additional information on related basal lineages and *Sclerocystis* species (for which few sequences are available) it might later even be incorporated into a new genus. The three closest BLAST hits are environmental sequences from roots of *Panicum virgatum* in a prairie in Kansas (USA, JX276903), *Panicum repens* in a wetland in the Guangdong province of China (KT378084), and a sequence from roots of mycoheterotrophic *Voyria aphylla* from Guadeloupe (HQ857173). None of these sequences is grouping close enough to be considered as conspecific (see Supplementary information Fig. S5).

The only other known species of *Rhizophagus* known to produce dark brown spores are *R. melanus* (Sudová et al. 2015) and *R. invermaius* (Hall 1977). The spore wall of *R. invermaius* is 1.4–1.9-fold thicker and consists of two permanent layers, whereas that of our new species comprises three layers, of which the outermost layer 1 is impermanent. Spores of *R. melanus* are larger and also have a thicker wall. *R. invermaius*, interestingly described in New Zealand (Hall 1977), but also reported from Europe (Oehl et al. 2005) and from South America (Senés-Guerrero & Shulfer 2016).

General discussion

The geographic isolation of the archipelago of New Caledonia and the unusual composition of its soils let it appear possible that AMF show a similarly high degree of endemism as plants. Indeed, several of the AMF we isolated from ultramafic soils were clearly distinct from known species and four of them are described here. Further studies will show whether these fungi are indeed endemic to New Caledonia or whether they are also found in geographically distant locations, as in the case of *Pervetustus simplex*, a fungus we found in the same field site, but which was at the same time found in soils coming from Oman, Greece and Tunisia (Błaszowski et al. 2017).

In vitro culture of these organisms allowed observations on the pre-symbiotic stage of the four species described in this article, the formation of spores were also observed for *A. saccata*, *A. fragilissima*, and *R. neocaledonicus*. No sporiferous saccules could be observed in the two *Acaulospora* species, instead spores of *A. fragilissima* were formed terminally on the sporogenous hyphae. Due to the notorious fragility of the sporiferous saccules it is difficult to say whether they were produced in pot culture, in any case

they were not observed there. Therefore, this glomoid sporulation may be due to an artifact caused by the in vitro culture conditions or may also mean that spore formation in *Acaulospora* is not necessarily linked to the presence of a sporiferous saccule, thereby putting into question one of the paradigms of AMF taxonomy. *Rhizophagus neocaledonicus*, for instance, forms smaller spores in root organ culture than in pot culture. Spores of these species produced in vitro have not been reintroduced into an in vivo condition on a plant, accordingly the viability of these spores is not yet known and further work is needed to interpret our observations.

These fungi sporulated readily in cultures on *S. vulgare* both in ultramafic soils and in commercial compost, indicating that neither ultramafic soil nor particular metallophyte plants are required for the completion of their life cycle and the production of fungal inoculum.

In summary, our molecular and morphological analyses allow us to conclude that the four AMF species described in this study are new species, which are the first AM fungi newly described from New Caledonia. They have so far been detected only in soils from a single ultramafic area in New Caledonia and further field research is needed to confirm whether they are restricted to this specific environment, and whether the proportion of endemic AM fungi is as high as in plants.

Funding information This work was partly supported by the CNRT BNickel and its environment, ^ Nouméa, New Caledonia (CSF No. 1PS2013)

References

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Amir H, Ducouso M (2010) Les bactéries et les champignons du sol sur roches ultramafiques. In: L'huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds) *Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie: les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration*. IAC, Nouméa, New Caledonia, pp 129–146
- Amir H, Jasper DA, Abbott LK (2008) Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils. *Mycorrhiza* 19:1–6. <https://doi.org/10.1007/s00572-008-0197-y>
- Amir H, Perrier N, Rigault F, Jaffré T (2007) Relationships between Ni-hyperaccumulation and mycorrhizal status of different endemic plant species from New Caledonian ultramafic soils. *Plant Soil* 293:23–35. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9238-0>
- Amir H, Pineau R, Violette Z (1997) Premiers résultats sur les endomycorhizes des plantes de maquis miniers de Nouvelle-Calédonie. In: Jaffré T, Reeves RD, Bequer T (eds) *The ecology of ultramafic and metalliferous areas*. ORSTOM, Nouméa, New Caledonia, pp 79–85
- Bécard G, Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211–218. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb03698.x>

- Błaszowski J, Kozłowska A, Crossay T, et al (2017) A new family, Pervetustaceae with a new genus, Pervetustus, and *P. simplex* sp. nov. (Paraglomerales), and a new genus, Innospora with *I. majewskii* comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina. *Nova Hedwigia*. doi: https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2017/0419
- Błaszowski J, Chwat G, Górska A (2015) *Acaulospora ignota* and *Claroideoglossum hanlinii*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) from Brazil and Cuba. *Mycol Prog*. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1042-2>
- Błaszowski J (2012) *Glomeromycota*. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków
- Błaszowski J, Renker C, Buscot F (2006) *Glomus drummondii* and *G. walkeri*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycol Res* 110:555–566. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.02.006>
- Brooks RR (1987) The serpentine factor. In: Brooks RR (ed) *Serpentine and its vegetation*. A multidisciplinary approach. Dioscorides Press, Portland, Oregon, pp 32–59
- Brundrett MC (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320:37–77. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9877-9>
- da Silva DKA, da Silva DKA, de Oliveira Freitas N et al (2008) *Scutellospora pernambucana*, a new fungal species in the Glomeromycetes with a diagnostic germination orb. *Mycotaxon* 106:361–370
- da Silva GA, Lumini E, Maia LC et al (2006) Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* 16: 183–189. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0030-9>
- Daniels BA, Skipper HD (1982) Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: *Methods and Principles of Mycorrhizal Research* (ed. Schenck, N.C.). The American Phytopath Society, St Paul, Minnesota, U.S.A., pp. 29–35
- Diop TA, Plenchette C, Strullu DG (1994) Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza* 5:17–22. <https://doi.org/10.1007/BF00204015>
- Enright NJ, Rigg L, Jaffré T (2001) Environmental controls on species composition along a (maquis) shrubland to forest gradient on ultramafics at Mont Do, New Caledonia. *SAfr J Sci* 97:573–580
- Fitzsimons MS, Miller RM (2010) Serpentine soil has little influence on the root-associated microbial community composition of the serpentine tolerant grass species *Avena sulcata*. *Plant Soil* 330:393–405. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0213-9>
- Gensous S (2014) Les champignons mycorrhiziens à arbuscules des maquis miniers de la Nouvelle Calédonie : Diversité, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte ultramafique et interaction avec des rhizobactéries promotrices de la croissance. *Res Gate*. <https://doi.org/10.6098/2014NCAL0062>
- Graham RC (2009) Serpentine Geocology of Western North America: Geology, Soils, and Vegetation. *Soil Sci* 174:193. <https://doi.org/10.1097/SS.0b013e318199f342>
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V et al (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Hall IR (1977) Species and mycorrhizal infections of New Zealand endogonaceae. *Trans Br Mycol Soc* 68:341–356. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(77\)80186-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(77)80186-1)
- Jaffré T, L'Huillier L (2010) Conditions de milieu des terrains miniers. In: *Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie*. Les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. Ed. by L'Huillier L, Jaffré T, Wulff A. IAC Editions. pp, pp 33–44
- Jaffré T, Munzinger J, Lowry PP (2010) Threats to the conifer species found on New Caledonia's ultramafic massifs and proposals for urgently needed measures to improve their protection. *Biodivers Conserv* 19:1485–1502. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9780-6>
- Jaffré T (1993) The relationship between ecological diversity and floristic diversity in New Caledonia. *Biodivers Lett* 1:82. <https://doi.org/10.2307/2999751>
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30:772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kohout P, Doubková P, Bahram M et al (2015) Niche partitioning in arbuscular mycorrhizal communities in temperate grasslands: a lesson from adjacent serpentine and nonserpentine habitats. *Mol Ecol* 24:1831–1843. <https://doi.org/10.1111/mec.13147>
- Koske RE, Gemma JN (1997) Mycorrhizae and succession in plantings of beachgrass in sand dunes. *Am J Bot* 84:118–130. <https://doi.org/10.2307/2445889>
- Krüger M, Krüger C, Walker C et al (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol* 193:970–984. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x>
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A (2009) DNA-based species level detection of Glomeromycota : one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 183:212–223. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lagrange A, Ducouso M, Jourand P et al (2011) New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Can J Microbiol* 57:21–28. <https://doi.org/10.1139/W10-096>
- Luçon S, Marion F, Niel JF, Pelletier B (1997) Rehabilitation des sites miniers sur roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie. Dans: Jaffré T, Reeves RD and Becquer T (eds) *Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères*, ORSTOM, Noumea pp 297–303
- McCoy S, Jaffré T, Rigault F, Ash JE (1999) Fire and succession in the ultramafic maquis of New Caledonia. *J Biogeogr* 26:579–594. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1999.00309.x>
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG et al (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K et al (2005) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytol* 165:273–283. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01235.x>
- Ohsowski BM, Zaitsoff PD, Opik M, Hart MM (2014) Where the wild things are: looking for uncultured Glomeromycota. *New Phytol* 204: 171–179. <https://doi.org/10.1111/nph.12894>
- Omar MB, Bolland L, Heather WA (1979) A permanent mounting medium for fungi. *Bull Br Mycol Soc* 13:31–32. [https://doi.org/10.1016/S0007-1528\(79\)80038-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1528(79)80038-3)
- Öpik M, Davison J, Moora M, Zobel M (2014) DNA-based detection and identification of Glomeromycota: the virtual taxonomy of environmental sequences¹. *Botany* 92:135–147. <https://doi.org/10.1139/gjb-2013-0110>
- Öpik M, Zobel M, Cantero JJ et al (2013) Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23:411–430. <https://doi.org/10.1007/s00572-013-0482-2>
- Palenzuela J, Azcon-Aguilar C, Jim B et al (2013) *Acaulospora pustulata* and *Acaulospora tortuosa*, two new species in the Glomeromycota from Sierra Nevada National Park (southern Spain). *Res Gate* 97: 305–319. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2013/0129>

- Pereira CMR, Maia LC, Sánchez-Castro I et al (2016) *Acaulospora papillosa*, a new mycorrhizal fungus from NE Brazil, and *Acaulospora rugosa* from Norway. *Phytotaxa* 260:14–24. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.260.1.2>
- Perrier N, Amir H, Colin F (2006) Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16:449–458. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0057-6>
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158–168. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3)
- Prozynski KA, Malloch DW (1975) The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6:153–164. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(75\)90023-4](https://doi.org/10.1016/0303-2647(75)90023-4)
- de Pontes JS, Sánchez-Castro I, Palenzuela J et al (2013) *Scutellospora alterata*, a new gigasporalean species from the semi-arid Caatinga biome in northeastern Brazil. *Mycotaxon* 125:169–181. <https://doi.org/10.5248/125.169>
- Proctor J (2003) Vegetation and soil and plant chemistry on ultramafic rocks in the tropical Far East. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* 6:105–124. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00045>
- Read J, Jaffre T, Ferris JM et al (2006) Does soil determine the boundaries of monodominant rain forest with adjacent mixed rain forest and maquis on ultramafic soils in New Caledonia? *J Biogeogr* 33:1055–1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01470.x>
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920–1921
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574
- Schechter SP, Bruns TD (2012) Edaphic sorting drives arbuscular mycorrhizal fungal community assembly in a serpentine/non-serpentine mosaic landscape. *Ecosphere* 3:art42. <https://doi.org/10.1890/ES12-00059.1>
- Schechter SP, Bruns TD (2008) Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Mol Ecol* 17:3198–3210. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03828.x>
- Senés-Guerrero C, Schüßler A (2016) A conserved arbuscular mycorrhizal fungal core-species community colonizes potato roots in the Andes. *Fungal Divers* 77:317–333. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0328-7>
- Smith SE, Read D (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, Third edn. Academic Press, London
- Sudová R, Šýkorová Z, Rydlová J et al (2015) *Rhizoglyphus melanum*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species associated with submerged plants in freshwater lake Avsjøen in Norway. *Mycol Progress* 14:9. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1031-5>
- Symanczik S, Blaszkowski J, Chwat G et al (2014) Three new species of arbuscular mycorrhizal fungi discovered at one location in a desert of Oman: *Diversispora omaniensis*, *Septoglomus nakheelum* and *Rhizophagus arabicus*. *Mycologia* 106:243–259. <https://doi.org/10.3852/106.2.243>
- Walker C, Cuenca G, Sánchez F (1998) *Scutellospora spinosissima* sp. nov., a newly described glomalean fungus from acidic, low nutrient plant communities in Venezuela. *Ann Bot* 82:721–725

Supplementary data

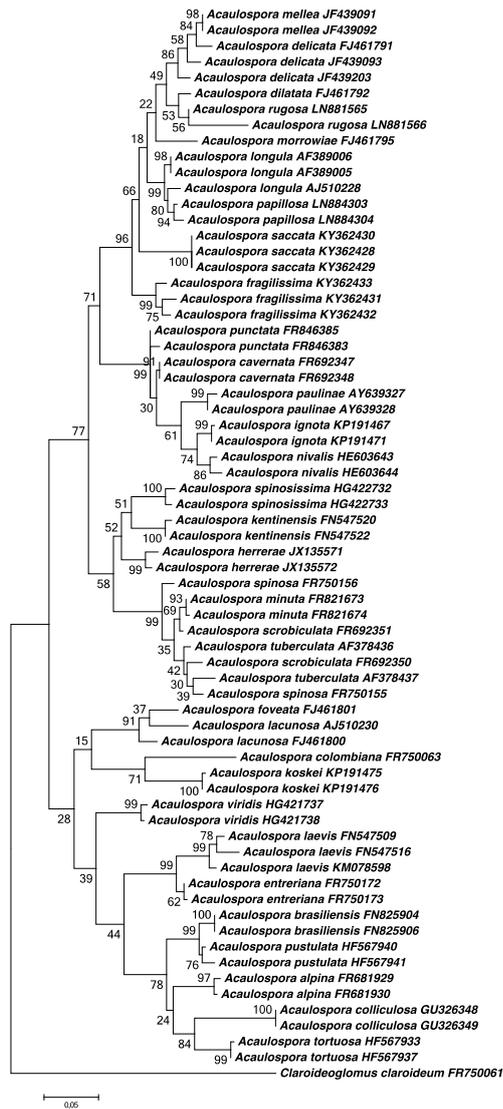


Fig. S1 ML analysis of LSU rDNA sequence of *Acaulospora saccata* and *Acaulospora fragilissima* and 31 known species of AMF, including *Claroideoglomus claroideum* as outgroup. Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees based on large subunit (LSU) rDNA sequence. Bootstrap values are given for each branch. The scale bar indicates the number of substitutions per site. Phylogenetic trees were viewed and edited with MEGA 7.

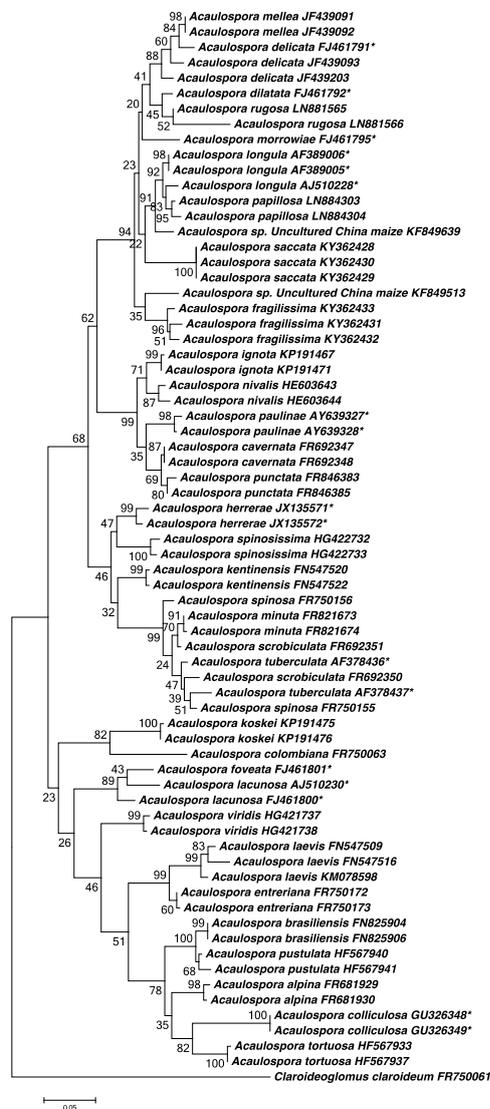


Fig. S2 ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequences of *Acaulospora saccata* and *Acaulospora fragilissima* and 31 known species of AMF, including two nearest environmental sequences and *Claroideoglomus claroideum* as outgroup. Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees based on individual small subunit–internal transcribed spacer–large subunit (SSU-ITS-LSU) rDNA sequence. Sequences labeled with an asterisk (*) represent the LSU gene only. Bootstrap values are given for each branch. The scale bar indicates the number of substitutions per site. Phylogenetic trees were viewed and edited with MEGA 7.

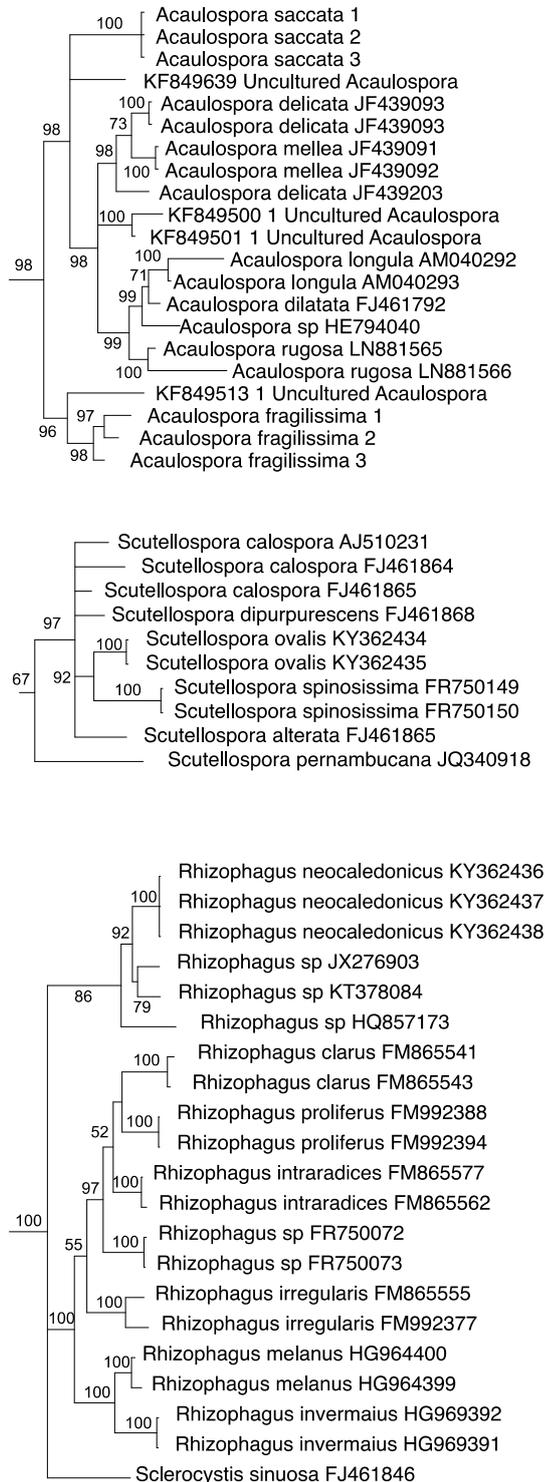
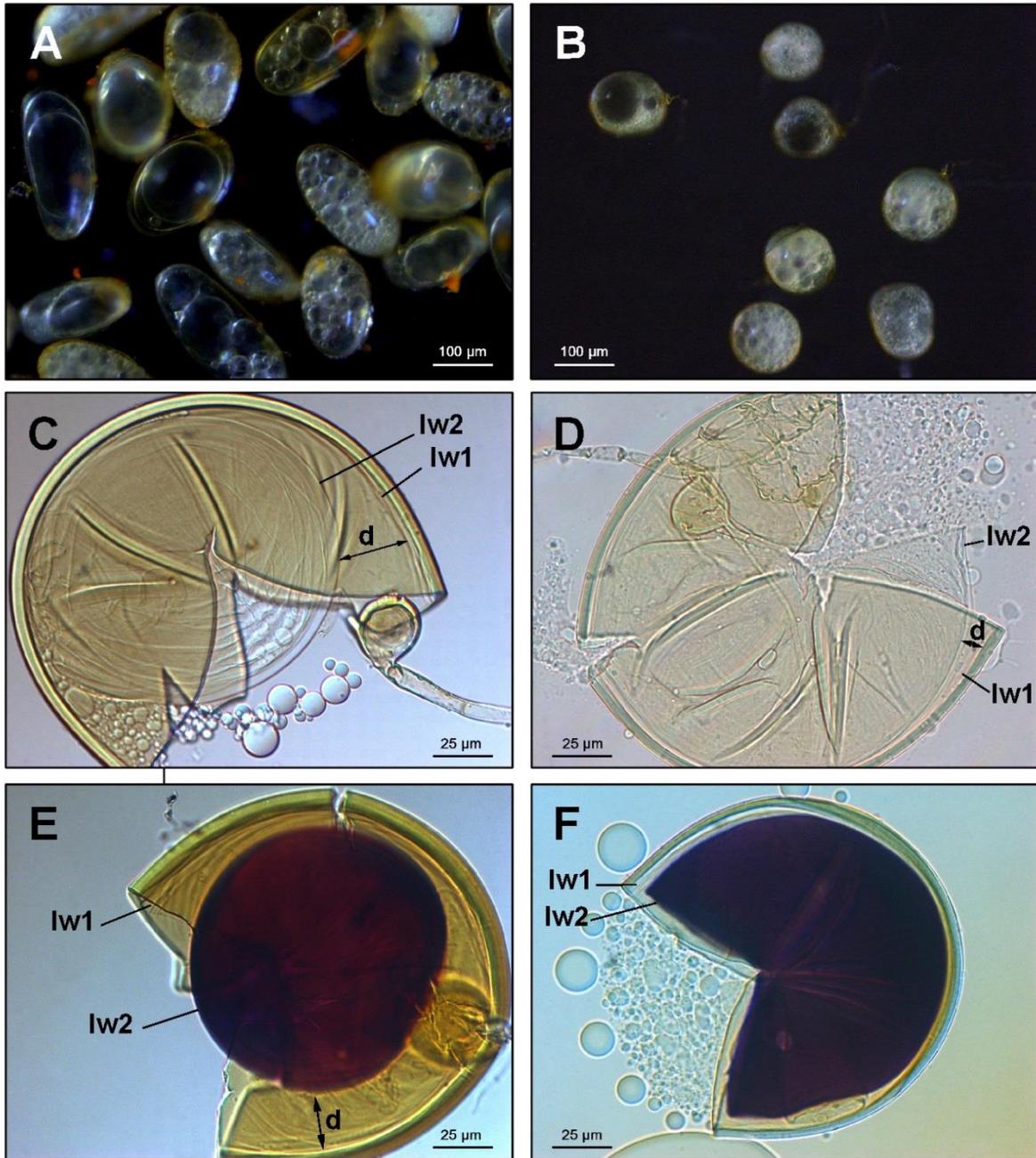


Fig. S3 Partial phylogenetic trees of LSU rDNA obtained by Bayesian analysis over 10^7 generations using the General Time Reversible Model in MrBayes 3.2 (ref.). Analyses were run. Majority rule consensus trees were cropped to only retain regions of interest. Numbers at branches indicate posterior probabilities.



Figs. S4 A. C. E. *Scutellospora ovalis* spores. B. D. F. *Scutellospora calospora* BEG32 spores. A. B. Intact spores. C. D. E. F. Spore wall (Sw), inner wall 1 (Iw1) and inner wall 2 (Iw2). C. D. In PVLG. E. F. In PVLG + Melzer's reagent.

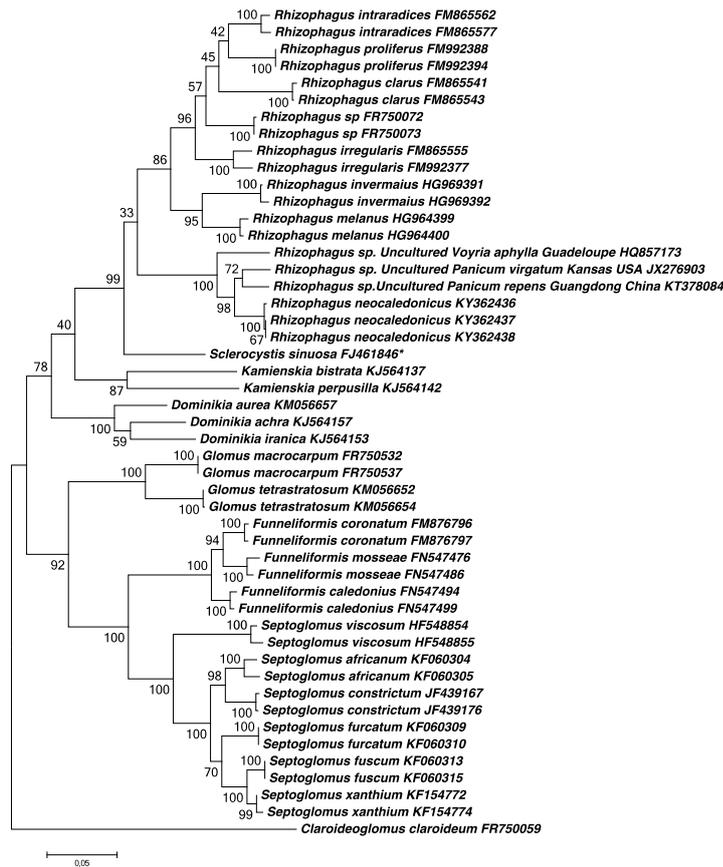


Fig. S5 ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequence of *Rhizophagus neocaledonicus* and 24 known species of AMF, including three nearest environmental sequences and *Claroideoglomus claroideum* as outgroup. Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees based on individual small subunit–internal transcribed spacer–large subunit (SSU-ITS-LSU) rDNA sequences. Sequences labeled with an asterisk (*) represent the LSU gene only. Bootstrap values are given for each branch. The scale bar indicates the number of substitutions per site. Phylogenetic trees were viewed and edited with MEGA 7.

Supplementary Text file: Detailed discussion of morphological characters

Acaulospora saccata sp nov. and *Acaulospora fragilissima* sp nov.

Spores of *A. saccata* and *A. fragilissima* are much smaller (mean diameter: 75 μm and 67 μm , respectively) than *A. mellea* (mean diameter 120 μm), *A. dilatata* (mean diameter 113 μm), *A. delicata* (mean diameter 99 μm) and *A. papillosa* (mean diameter 100 x 93 μm).

A. saccata differs from *A. morrowiae*, *A. longula*, *A. rugosa*, *A. delicata* and *A. fragilissima* by the thickness of its spore wall layer 2 (mean 5.5 μm thick) that is two times thicker than the respective layer in *A. morrowiae* (2-2.4 μm), *A. longula* (2-2.4 μm), *A. rugosa* (2.0-3.2 μm), *A. delicata*, (0.8-3.2 μm), *A. fragilissima* (1.9-3 μm). Conversely, layer 2 of the spore wall of *A. fragilissima* is thin ((1.9-) 2.8 (-) 3 μm) and therefore differs from the other species in the clade with a thicker spore wall layer 2 (*A. mellea* 3.6-5.1 μm thick, *A. dilatata* 2.8-5.5 μm thick, *A. saccata* 4-6.5 μm thick). *A. papillosa* differs from *A. saccata* and *A. fragilissima* and from other members of the

clade by the presence of “small papilla” on its spore wall layer 1. The spore wall of *A. saccata* and *A. fragilissima* differs from the spore wall of *A. morrowiae*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. dilatata*, *A. rugosa*, *A. papillosa* by the presence of only two layers, the aforementioned species possess a spore wall with three layers. The absence of layer 3 in *A. saccata* and *A. fragilissima* spores is shared with *A. delicata*.

The inner wall 1 of *A. saccata* and *A. delicata* spores is constituted by only one layer, unlike *A. fragilissima* and all other species of the clade, *A. morrowiae*, *A. longula*, *A. mellea*, *A. dilatata*, *A. rugosa* and *A. papillosa* whose inner wall 1 has two layers.

The inner wall 2 of *A. saccata* and *A. fragilissima* spores consists of two layers as all other species present in the clade, except *A. papillosa*. In fact, the inner wall 2 of this latter species is composed of three layers. Inner wall 2 layer 1 of *A. saccata* is granular and hyaline, a character shared by all species of the clade except *A. fragilissima*. Indeed, in this species, layer 1 has strongly granular structure but differs from others by its light greenish yellow-ochre (10/0/80/0) color in reaction with Melzer's. The thickness of layer 1 of the inner wall 2 of *A. saccata* (0.8-1.6 μm thick) and *A. fragilissima* (0.9-1.2 μm thick) is similar to all species in the clade except *A. morrowiae* (0.5-0.8 μm thick), *A. longula* (0.5-0.8 μm thick), and *A. delicata* (0.6-0.8 μm thick). Layer 2 of inner wall 2 is hyaline in all species of the clade. This layer has an amorphous character and is staining dark purple in Melzer's reagent (40/80/20/10) in all species of the clade except for *A. delicata* and *A. fragilissima*, where a pale pink color is observed for the former and no reaction is observed for the latter. The thickness of this layer varies as a function of the pressure applied on the cover slip (except for *A. fragilissima* and *A. delicata*).

***Scutellospora ovalis* sp nov.**

The spore wall of *S. ovalis* differs from *S. calospora*, *S. dipurpurescens* and *S. spinossisima* by the presence of a thick spore wall layer 2 (4 μm mean thick), that is much thicker than spore wall layer 2 in *S. calospora*, *S. dipurpurescens* (mean 2.6 μm thick) and *S. spinossisima* (mean 2 μm thick). Spore wall layer 2 of *S. spinossisima* differs from *S. calospora*, *S. dipurpurescens* and *S. ovalis* in that it possesses ornamentations on the layer 2 of its spore wall. It is ornamented with dense blunt spines, 2 μm 4 μm long. Spore walls of *S. pernambucana* and *S. alterata* are composed of three layers whereas all other species have two spore wall layers.

Inner wall 1 of *S. ovalis*, *S. calospora*, *S. pernambucana* and *S. alterata* spores consists of two layers while the inner wall 1 of *S. dipurpurescens* and *S. spinossisima* spores consists of only one layer.

Inner wall 2 of *S. ovalis* spores differs from *S. calospora*, *S. dipurpurescens*, *S. pernambucana* and *S. alterata* inner wall 2. *S. ovalis* inner wall 2 layer 1 measures (5-)6(-6.6) μm and is coriaceous whereas inner wall 2 layer 1 of *S. calospora* and *S. dipurpurescens* are 1.2-3.2 μm thick and fragile.

Inner wall 2 layer 2 of *S. ovalis* is thin and forms many folds, stains dark purple in Melzer's reagent and measures 1-1.5µm (mean 1.25 µm thick) whereas that of *S. calospora* and *S. dipurpurescens* is amorphous and 2.5-8.0 µm thick. Inner wall 2 of *S. pernambucana*, *S. spinosissima* and *S. alterata* is composed of three layers whereas inner wall 2 of all other species has only 2 layers. *S. ovalis* and *S. spinosissima* differs from all species by the coriaceous character of their inner wall 2. Due to this character, inner wall 2 can be easily extruded from the spore wall when applying pressure on the cover slip. This last character is already known from *S. spinosissima* but this species differs from *S. ovalis* by the presence of spines on its spore wall layer 2.

Taxonomic description of *Claroideoglopus etunicatum* *nc*

Claroideoglopus etunicatum *nc* Figs. 1A-G.

Holotype: Isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single species-culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Nouméa, April 2016, T. Crossay. This single species-culture was originally inoculated with 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single species-culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Nouméa, September 2015, T. Crossay. The previous generation of single species-culture originally was inoculated with 100 spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot trap cultures propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE in New Caledonia, Noumea, March 2015, T. Crossay. Pot trap cultures were originally inoculated with rhizospheric soil of *Alphitonia neocaledonica* sampled in an ultramafic *maquis* in New Caledonia, September 2014, T. Crossay.

Description: Sporocarps unknown. Spores mostly globose to subglobose, ovoid (81-)92,5(-110) μm in diameter, brown (0/60/100/0) (Figs. 1A-B). Spores found singly. Spore wall with four layers. Layer 1 hyaline, mucilaginous, in mature spores with attached debris, (1-)1,3(-1,5) μm thick, disappearing on mature spores (Fig. 1D). Layer 2 laminate, red-brown (0/40/100/10), (4-)5(-6) μm thick (Fig. 1C-D). Layer 3 fine and tightly attached to layer 2, appearing orange-brown (0/20/60/0), (1-)1,2(-1,4) μm thick (Fig. 1D). Layer 4 fine hyaline, (0,8-)1(-1,2) μm tick, sometimes impossible to detect (Fig. 1D). Subtending hypha hyaline, with septum (5-)7(-8) μm diameter (Fig. 1C). Spore germination through hyphal attachment (Fig. 1B).

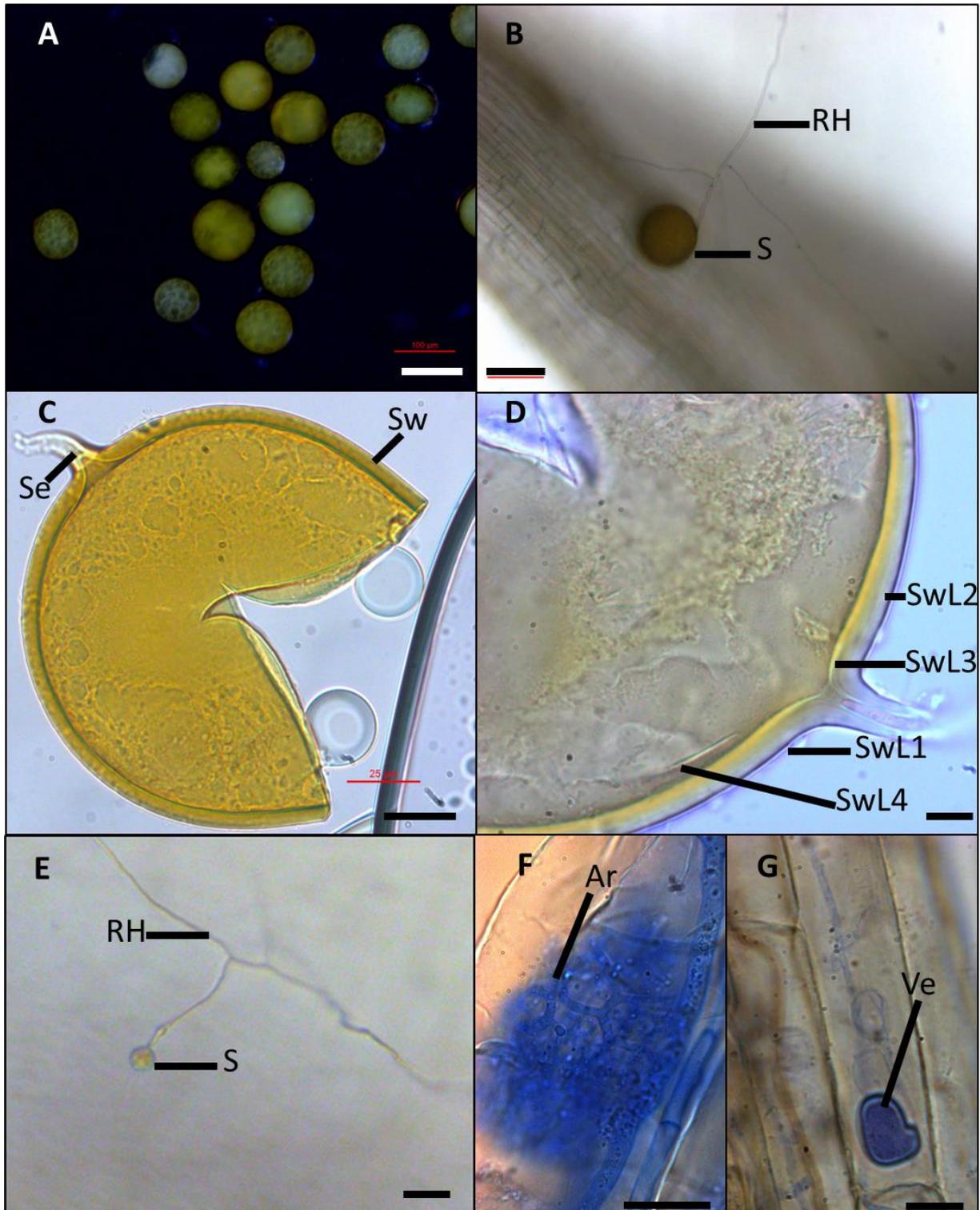
Etymology: *nc* indicating the location New Caledonia, where it was isolated.

Mycorrhizal structure: Forming spores vesicles and arbuscules, staining lightly with Trypan Blue (Figs. 1F-G).

Habitat: Rhizospheric soil in tropical ultramafic *maquis*.

Material examined: Spores isolated from rhizospheric soil of a greenhouse pot of single species-culture propagated on *Sorghum vulgare* at LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) in New Caledonia, Nouméa, April 2016, T. Crossay.

In vitro morphology: Spores formed terminally (Fig. 1E). In root organ culture, runner hyphae of a diameter of (5-)6,5-(7,5) μm (Figs. 1B, E).



Figs. 1 A-G *Claroideoglomus etunicatum nc* spores. A. Intact spores. B. Intact spore (S) on root organ culture and runner hyphae (RH) on root organ culture. C. Spore wall (Sw) and septum (Se) inside subtending hyphae. D. Spore wall layers 1, 2, 3 and 4 (SwL1, SwL2, SwL3 and SwL4). E. Juvenile spore (S) and runner hyphae (RH) on root organ culture. D.

Spore (s) with subtending hyphae (SH). F. G. Mycorrhizal structures of *C. etunicatum nc* in roots of *Sorghum vulgare* stained in 0.1 % trypan blue: arbuscules (Ar), and vesicle (Ve). D. In PVLG. C. In PVLG + Melzer's reagent. Scale barre: A. B. E. 100 μ m. C. 25 μ m. D. F. G. 10 μ m.

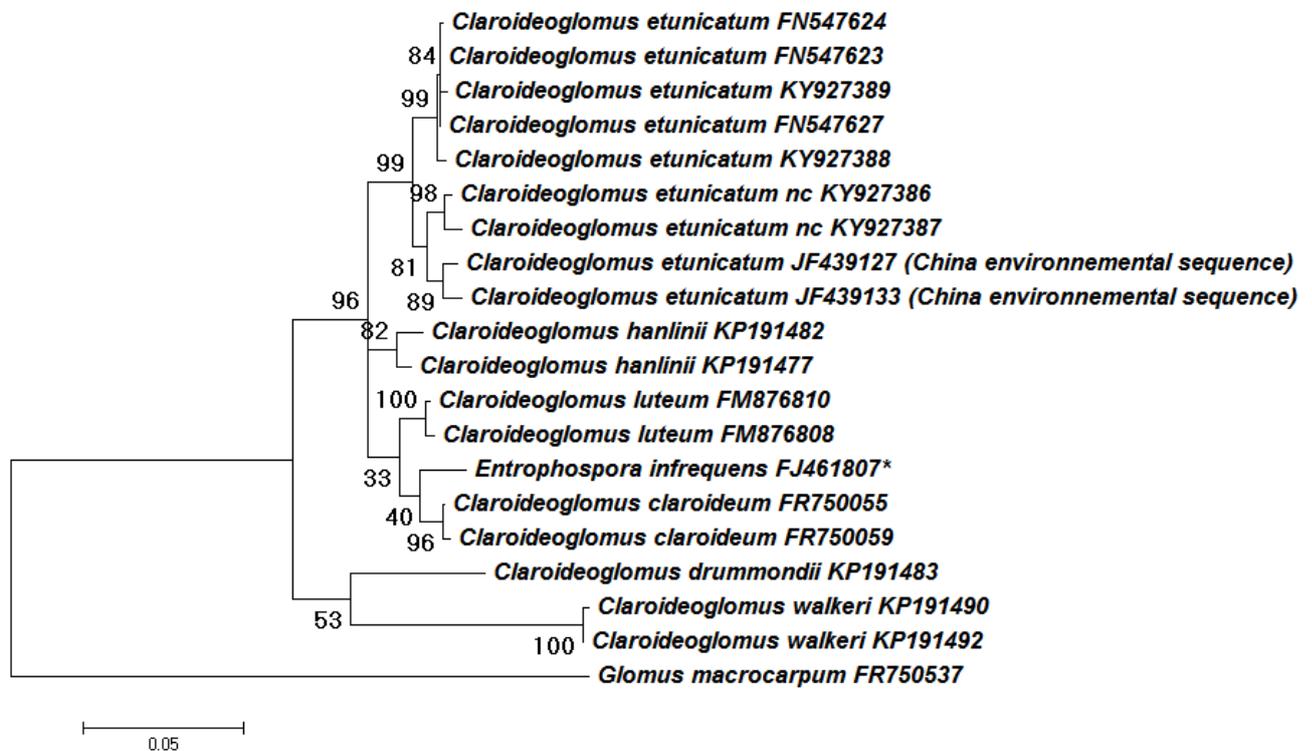


Fig. 2 ML analysis of SSU-ITS-LSU rDNA sequence of *Claroideoglossum etunicatum nc* and 7 known species of AMF, including *Glomus macrocarpum* as outgroup. Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees based on individual small subunit–internal transcribed spacer–large subunit (SSU-ITS-LSU) rDNA sequence. Sequences labeled with an asterisk (*) represent the LSU gene only. Bootstrap values are given for each branch. The scale bar indicates the number of substitutions per site. Phylogenetic trees were viewed and edited with MEGA 7.

Molecular and phylogenetic analysis: Phylogenetic analyses accommodated sequences of *C. etunicatum nc* in a clade relative to the clades with sequences of the other *Claroideoglossum etunicatumum* considered (Fig. 2).

Notes: As showed molecular phylogenetic analyses, *C. etunicatum nc* is related to *C. etunicatum* (Fig. 2). Despite this, *C. etunicatum nc* differ in some morphological characters from the INVAM isolate of *C. etunicatum*. The spore wall of *C. etunicatum nc* consists of four layers, whereas that of INVAM isolate of *C. etunicatum* comprises only two layers. These morphological differences are not sufficient to consider *C. etunicatum nc* as a new species. Proteomic approach (cf chapter 3) confirm the fact that *C. etunicatum nc* is an isolate that belong to the species *Claroideoglossum etunicatum*.

Chapitre 3

Développement d'une méthode d'identification des champignons mycorhiziens à arbuscules à partir des spores, par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS)

Introduction au Chapitre 3

Les Glomeromycota forment différents types de spores dont les caractéristiques morphologiques et structurales sont utilisées pour identifier les espèces^{12, 13}. Néanmoins, la morphologie des spores reste bien souvent insuffisante pour identifier ces organismes. La caractérisation moléculaire a été possible, grâce aux développements de marqueurs moléculaires permettant d'amplifier des fragments de gènes. La caractérisation moléculaire a été introduite dans les années 1990¹⁴ pour identifier et quantifier les CMA dans les racines des plantes. Un des défis majeurs de la recherche sur les CMA est de développer un marqueur moléculaire commun permettant de différencier les espèces et les isolats de CMA et/ou développer une technique simple permettant d'obtenir une empreinte unique pour chaque isolat.

La présence d'une grande variation intra isolat des gènes ribosomiques^{15, 16} complique l'attribution d'un marqueur moléculaire unique à un isolat et donc l'évaluation de la diversité intraspécifique des CMA dans les études de diversité sur le terrain. La recherche d'un nouveau marqueur a également été compliquée par la grande difficulté rencontrée pour l'assemblage du génome de *Rhizophagus irregularis*¹⁷. Un marqueur a récemment été développé pour l'identification et la différenciation d'espèce proches ; ce fragment comprend une partie du gène SSU de l'ADNr et, les espaceurs internes de l'ADNr (ITS) comprenant le gène 5.8S de l'ARNr et une partie de la grande sous-unité ribosomique (LSU)¹⁸. Cependant, ce marqueur ainsi que tous les marqueurs moléculaires connus, ne permettent pas de différencier toutes les espèces et ne permettent pas non plus de différencier des isolats de la même espèce⁴³. Les méthodes moléculaires restent laborieuses, chronophages et présentent des coûts élevés, alors que l'identification morphologique nécessite beaucoup de temps et d'expertise et ne permet pas forcément une identification au niveau de l'espèce.

Développer une technique fiable pour identifier les CMA aux niveaux inter et intraspécifique faciliterait leur utilisation à grande échelle. En effet, un prérequis pour l'application des CMA comme biostimulants des plantes pour l'agriculture et la restauration écologique est de pouvoir effectuer un contrôle qualité strict des *inocula*. Un contrôle qualité strict consiste à identifier et quantifier les isolats présents dans les *inocula* et déterminer l'absence de pathogène. Une méthode d'identification taxonomique rapide des isolats de CMA est nécessaire pour les cultures de collections (IBG, INVAM, SAF, CICG, et GINCO), la recherche et la certification des *inocula* commerciaux.

Il existe une méthode alternative à l'identification par biologie moléculaire, qui n'a jamais été testée pour identifier les CMA : le biotypage protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette technique est déjà largement utilisée pour le diagnostic médical et permet une identification rapide et fiable des microorganismes. L'identification de microorganismes par spectrométrie de masse date de 1975²⁰. La méthode a ensuite été optimisée pour être utilisée dans des contextes médicaux et environnementaux. Le biotypage par MALDI-TOF-MS a été utilisé avec succès pour identifier des bactéries, des levures, des champignons et des eucaryotes supérieurs tel que les insectes, les mollusques et les poissons^{21,23}. Le biotypage des champignons par MALDI-TOF-MS s'est révélé plus efficace que l'identification basée sur leur morphologie²⁴. De plus cette technique est moins coûteuse et plus rapide que les méthodes d'identification par biologie moléculaire²⁵.

Dans l'étude qui suit, nous avons rigoureusement évalué la possibilité d'identifier différents isolats de CMA par MALDI-TOF-MS, à partir des spores. L'article est également disponible en version HTML: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-14487-6>.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS

Thomas Crossay¹, Cyril Antheaume^{1,2}, Dirk Redecker³, Lucie Bon¹, Nicolas Chedri⁴, Clément Richert⁵, Linda Guentas¹, Yvon Cavaloc¹ & Hamid Amir¹

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF, Glomeromycota) are mutualistic symbionts associated with majority of land plants. These fungi play an important role in plant growth, but their taxonomic identification remains a challenge for academic research, culture collections and inoculum producers who need to certify their products. Identification of these fungi was traditionally performed based on their spore morphology. DNA sequence data have successfully been used to study the evolutionary relationships of AMF, develop molecular identification tools and assess their diversity in the environment. However, these methods require considerable expertise and are not well-adapted for “routine” quality control of culture collections and inoculum production. Here, we show that Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry proteomic-based biotyping is a highly efficient approach for AMF identification. Nineteen isolates belonging to fourteen species, seven genera and five families were clearly differentiated by MALDI biotyping at the species level, and intraspecific differentiation was achieved for the majority. AMF identification by MALDI biotyping could be highly useful, not only for research but also in agricultural and environmental applications. Fast, accurate and inexpensive molecular mass determination and the possibility of automation make MALDI-TOF-MS a real alternative to conventional morphological and molecular methods for AMF identification.

Agriculture will face significant challenges in the 21st century, largely due to the need to increase global food supply under the declining availability of soil, land and water resources, the environmental impacts of chemical inputs and the declining resources of mineral phosphate fertilizers. The main challenge is to develop and promote food and livelihood systems that have greater environmental, economic and social resilience to risk. Developing a sustainable crop production will require a shift from industrial crops, which generally rely on mono-cropping, the intensive application of commercial fertilizers, and the heavy use of pesticides and other inputs that are damaging to the environment, communities, and farm workers¹. As a means towards developing sustainable agriculture, soil organisms that are considered plant bio-fertilizer have been used for biotechnological applications to agronomy and the environment. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are among these organisms and have been successfully used in both fields². Fungi of the phylum Glomeromycota are ubiquitous hypogeous microorganisms that live in symbiosis with 80% of the world’s vascular land plants^{3,4}. Despite their common occurrence and evidence of their association with land plants since their appearance 460 million years ago^{5,6}, our knowledge of the genetics and diversity of AMF remains limited. Plant AMF symbiosis can be critically important in the development of sustainable agriculture, remediation of polluted lands and ecological restoration of degraded sites, such as mines⁷. As obligate biotrophs, AMF depend on host-derived carbon to complete their life cycle, and hosts have been estimated to transfer up to 20% to their photosynthetically fixed carbon to fungi⁸. In return for this substantial

¹Institut des Sciences Exactes et Appliquées (EA 7484), Université de Nouvelle-Calédonie, BP R4, 98851, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, France. ²Plate-forme d’Analyse Chimique Strasbourg-Illkirch. Université de Strasbourg, F-67400, Illkirch, France. ³Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000, Dijon, France. ⁴Institut Pasteur, Bacteriology Research Unit, 98800, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, France. ⁵Braker Corporation, Nouvelle-Calédonie, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.A. (email: cyril.antheaume@gmail.com) or H.A. (email: hamid.amir@univ-nc.nc)

Received: 8 May 2017

Accepted: 11 October 2017

Published online: 30 October 2017

carbon cost, host plants obtain multiple benefits from their fungal partners: on average, 90% of the phosphorus and 60% of the nitrogen present in plants are sustained by these fungi³. The mycelial network of AMF extends into the soil volume and greatly increases the surface area for the uptake of immobile nutrients. AM symbioses also improve plant tolerance to drought and enhance their resistance to plant pathogens and their tolerance to heavy metals in polluted and metalliferous soils⁷. As a result, AMF are important determinants of plant nutrition and ecosystem productivity⁹.

The number of described AMF species is very low compared to other fungal phyla¹⁰. Currently, the Glomeromycota comprise approximately 270 known species¹¹. Molecular diversity studies, however, have suggested the existence of 348 to 1,600 Glomeromycota species¹⁰. There are three possible reasons why unknown taxa have not been described to date. First, they may represent isolates that are difficult to grow¹⁰. Second, they may not have been discovered due to a lack of AMF sampling in many earth terrestrial regions. Third, only a small number of experts currently address morphological and molecular characterization of this group of fungi. Although various Glomeromycota species form different types of spores^{12,13}, the type, mode of formation, subcellular structure, and characteristics of the spore components are frequently insufficient to identify fungi. Molecular characterization using DNA sequences was introduced in the 1990s¹⁴ to detect, identify and quantify AMF in the roots of plants. The main challenges in AMF research are the power of molecular markers used for quantification and identification of AMF at intra and inter-specific levels. Large intra-isolate variation of nuclear ribosomal genes^{15,16} complicates assignment of a single marker gene sequence to a fungal strain and assessment of the diversity of AMF in molecular field studies. The search for new marker genes has additionally been hampered by the great difficulty encountered in assembling the nuclear genome of *Rhizophagus irregularis*¹⁷. An often-used fragment for resolving closely related species comprises the SSU rRNA gene, the whole internal transcribed spacer (ITS) rDNA region, including the 5.8 S rRNA gene, and the partial large subunit (LSU) rRNA gene, herein referred to as SSU-ITS-LSU¹⁸. As explained in Krüger *et al.*¹⁹, ITS1 and ITS2 regions are highly variable and must be excluded when different families are included in the same phylogenetic analysis; this is because alignment is impossible among higher taxa.

Morphological identification of AMF is time-consuming and requires considerable expertise, while DNA-based methods are still time-consuming and expensive.

A reliable and simple technique to discriminate AMF could help removing a roadblock on the way to large-scale AMF usage. A prerequisite for the application of AMF as biological fertilizer for agricultural and environmental uses is the ability to perform strict quality control of the inoculum. Quality control consists of identifying and quantifying which species of AMF are present in the inoculum and in determining the absence of pathogens. A quick, accurate taxonomic identification of AMF isolates is necessary for culture collections (IBG, INVAM, SAF, CICG, and GINCO) and research and for industrial certification.

An alternative approach to DNA-based isolate characterization, which to our knowledge has never been applied to AMF, is proteomic-based chemotaxonomic biotyping using MALDI-TOF mass spectrometry. This technique is already used in the fields of forensic and medical diagnosis. It allows rapid and accurate identification of microorganisms. The use of mass spectrometry to characterize microorganisms dates back to 1975²⁰. Subsequently, methods were quickly optimized and used in clinical and environmental contexts. MALDI-TOF-MS biotyping has successfully been used to identify bacteria, yeast, fungi, and higher eukaryotes including insects, molluscs and fish^{21–23}. In fact, MALDI-TOF-MS based identification of fungi provided more accurate results than morphology-based analyses²⁴. Furthermore, this technology is less expensive, easier and faster than current DNA based-identification²⁵. MALDI-TOF-MS and gene sequencing methods resulted in highly similar groupings of entomopathogenic fungus species of the genus *Metarhizium*²⁶, and similar results were observed for soil fungal species of the genus *Trichoderma*²⁷ and plant pathogenic fungi of the genus *Alternaria*²⁸. All these authors highlight the fact that identification by MALDI-TOF-MS is useful for culture collections because once the protein profiles of fungus isolates are obtained and included in a MALDI-TOF-MS library, matching is easily accomplished by simple comparison between stored profiles and a newly obtained profile. The limitation of the technology is that identification of new isolates is possible only if the spectral database contains protein mass fingerprints for the type strains of specific genera, species or subspecies²⁹. However, the potential for this approach to be applied to green biotechnology has not been explored. In this study we rigorously evaluated the possibility to identifying AMF spores of nineteen isolates belonging to fourteen species, seven genera and five families by MALDI-TOF-MS biotyping.

Results

Phylogenetic analysis. The partial 18S-5.8S-partial 28S region of nuclear rRNA or the partial 28S region of all isolates also analysed by MALDI was used for maximum likelihood phylogenetic analyses in MEGA and PhyML (Fig. 1). ITS1 and ITS2 regions were excluded from the alignment because they are highly variable. Phylogenetic analysis (Fig. 1) confirmed morphological identification, with the exception of two sequences of *G. margarita* species that were not recovered as a monophyletic clade.

Analysis of intra- and inter-isolate spectrum variation of MALDI-TOF MS using the main spectrum (MSP) database. We assessed the detection limit of MALDI-TOF-MS, by successively using 10, 5, 4, 2 and 1 spores of *Scutellospora ovalis*. A good signal to noise ratio was obtained with two spores of this species. For this isolate, we also verified spectral reproducibility for any number of spores (Fig. 2). Based on this result, we decided to normalize the amount of spore material per sample to a minimum volume equivalent to two spores of *Scutellospora ovalis* (estimated as 2270700 μm^3) for all studied isolates. A single spore was used for species with a spore volume > 2270700 μm^3 . Origin, spore diameter, estimated volume of one spore and spore number used per sample of all isolates studied are presented in Supplementary Table 1.

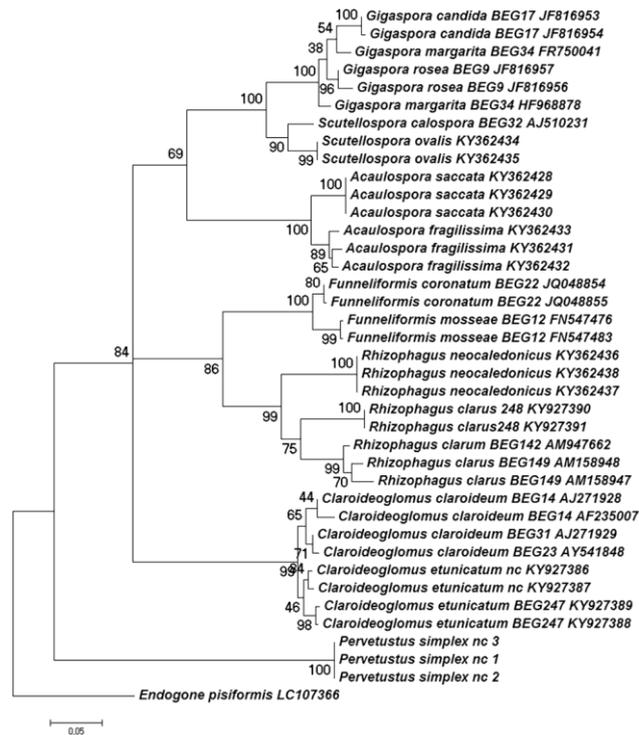


Figure 1. Phylogenetic tree of partial 18S-5.8S-partial 28S rDNA sequences of 19 Glomeromycota isolates. Maximum likelihood (ML) analysis including *Endogone pisiformis* as outgroup. ML phylogenetic tree was based on individual partial small subunit–5.8S-partial large subunit (partial 18S-5.8S-partial 28S) rDNA sequence. When partial 18S-5.8S-partial 28S were not available, partial LSU sequences were used. Bootstrap values are given for each branch. Scale bar indicates the number of substitutions per site.

For some species, spectra were compared between young and mature spores. Spores of *F. mosseae* BEG12 usually double in size from young to mature and are thus categorized based on spore diameter (Supplementary Fig. 1). They showed differences only in the intensity of four major peaks, rather than in their m/z ratio (ratio mass/charge number of ions) (m/z : 4054 ± 1 , 5228 ± 1 , 8109 ± 2 , 10466 ± 9), and in the presence of one minor peak at m/z 2700 ± 1 , which was not found in the juvenile stage. Despite this slight variation between mature, juvenile and mixed sample spectra, the software gave a sufficient score to match all of these to the same isolate (Fig. 3).

Representative mass spectra of five species of Gigasporaceae are illustrated in Fig. 4. A single spore per analysis was used, except for *Scutellospora* species: for *S. ovalis*, two spores were used and for *S. calospora* BEG32, three spores were used per analysis (Supplementary Table 1). The Gigasporaceae species yielded clearly different spectra (Fig. 4) and can be easily differentiated, as all other studied species (Supplementary Fig. 2).

The analyses yielded spectra of sufficient quality to generate MSPs (Main Spectrum Patterns; see Material and Methods, section data processing for MSP creation and MALDI-TOF-MS data export for graphical MSP creation in R software³⁰). MSPs of microbial isolates are commonly used as reference spectra for identification by comparison to unknown samples. A graphical MSP representation of the Gigasporaceae species is shown in Fig. 5. All other spectra are provided as supplementary material (Supplementary Fig. 3). MSPs of different AMF species markedly differ, demonstrating that biotyping by MALDI-TOF-MS can easily distinguish the AMF species in question. For each fungal species, a single peak could be identified as a marker of the respective species. No single peak was common to all species tested.

For each family but the Pervetustaceae (only one species), a Principal Component Analysis (PCA) was performed to investigate the intra- and inter-species variation of the spectra. With a few exceptions, technical and biological replicates corresponding to one studied isolate formed well-separated clusters (Fig. 6). The exceptions were *R. clarus* BEG248/149, which were not separated from each other, and *C. claroideum* BEG23/14. In all families, species were clearly differentiated, and in several cases, the isolates of the same species were differentiated.

A dendrogram created with the reference spectra allows easy comparison of the isolates (Fig. 7). All studied species were well identified at a distance level of more than 500 units³¹ (see Materials and Methods), but isolates of the same species were not always differentiated. *Claroideoglomus claroideum* BEG23 and *Claroideoglomus claroideum* BEG14 could not be discriminated by distance values calculated between MSP references of these two isolates, nor were *Rhizophagus clarus* BEG149 and *Rhizophagus clarus* BEG248 differentiated. Other isolates of the same species were differentiated in the dendrogram: *R. clarus* BEG248/149 versus *R. clarus* BEG142; *C. etunicatum* BEG247 versus *C. etunicatum* nc and *C. claroideum* BEG23/14 versus *C. claroideum* BEG31.

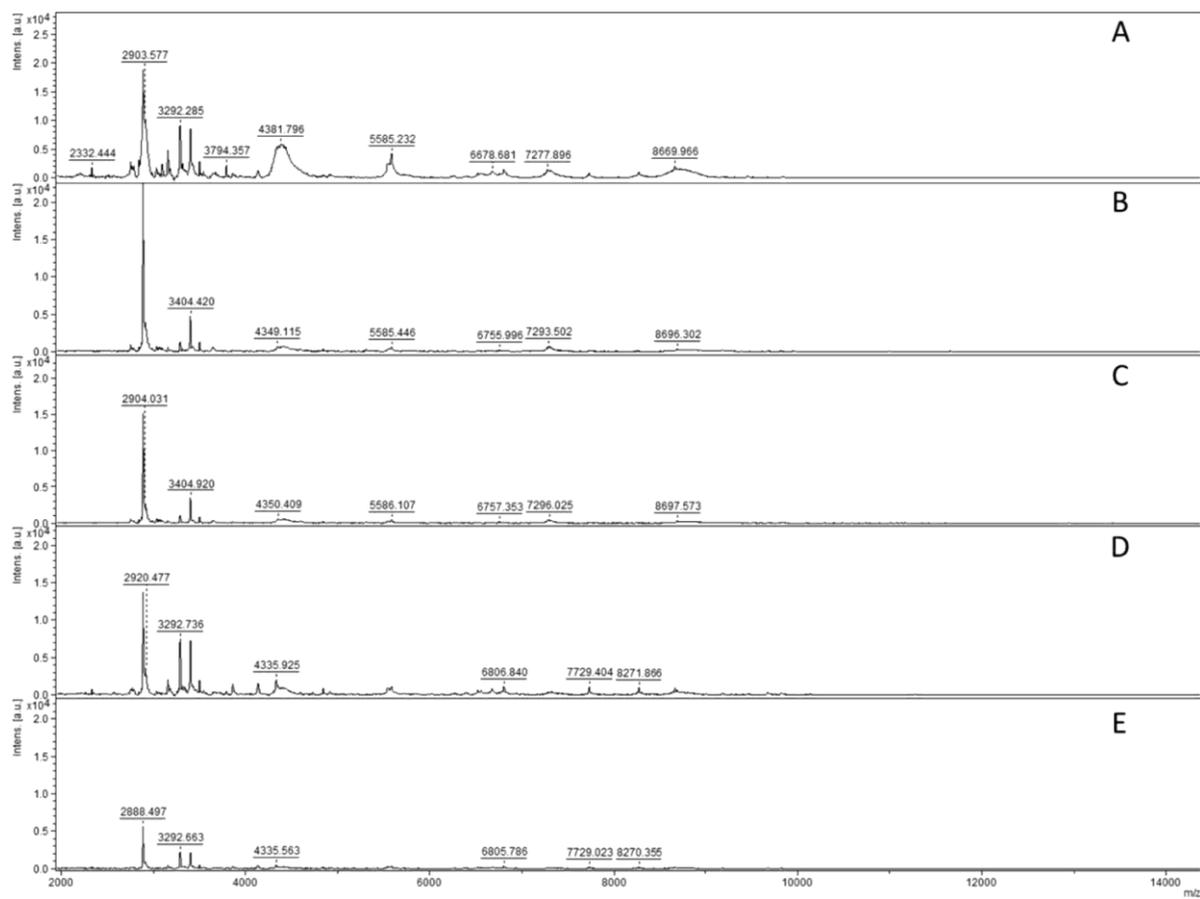


Figure 2. Limit of MALDI-TOF mass spectra detection using (A) 10, (B) 5, (C) 4, (D) 2 and (E) 1 crushed spores to extract *Scutellospora ovalis*.

MALDI-TOF-MS database matching real-time blind test. Using our homemade database, we also used the Bruker “real time identification” software, which is ordinarily used for clinical diagnosis, to evaluate the robustness of AMF identification from the perspective of strain certification. The identification rate of Gigasporaceae species was 100%, with Main Pattern scores (MP scores, see Material and methods) higher than 1.920 (Table 1). The identification rate of species in the Acaulosporaceae was also 100%, with MP scores ranging from 1.500 to 2.590. The species identification rate of Glomeraceae was 100%, with MP scores ranging from 1.590 to 2.550. *R. clarus* BEG248 and *R. clarus* BEG149 have very similar spectra, as explained above; therefore, the method identified them with virtually equivalent scores and provided them as identical candidates or species. *R. clarus* isolate BEG142 was clearly identified, with no matching second candidate. The identification rate of species in the Claroideoglomeraceae was 100%, with MP scores ranging from 1.720 to 2.260. *C. claroideum* BEG23 and *C. claroideum* BEG14 have very similar spectra, as explained above. For *C. claroideum* BEG23, one of the three samples was identified as *C. claroideum* BEG14, with an MP score of 2.10, but *C. claroideum* BEG14 was presented as the second candidate, with an MP score of 1.920. *C. claroideum* isolate BEG31 was distinguished from the others, with no second candidate given by the software. The two isolates of *C. etunicatum* BEG247 and *C. etunicatum* *nc* were also identified correctly. In the Pervetustaceae, a single isolate has been studied: *Pervetustus simplex* *nc*. Two of the three samples allowed identification of this isolate, with MP scores of 1.760 and 1.370, whereas the third sample did not produce a signal.

In summary, AMF species were reliably identified using this method: no misidentification was observed at the species level. Various isolates of the same species were correctly assigned in 22 out of 24 cases, even for *R. clarus* BEG248/BEG149 and *C. claroideum* BEG14/BEG23 who have very similar spectra. Identification at isolate level could be correctly assigned for these last four isolates in 10 out of 12 cases. Even when scores < 1.7 were obtained, species identification matched the reference methods. One sample of *Pervetustus simplex* *nc* gave no signal and another from the same isolate gave a score under 1.5 (1.370).

MALDI-TOF-MS data export and identification by graphical analyses. The spectra of a mixed sample *Gigaspora rosea* BEG9/*Gigaspora margarita* BEG34, using one spore of each species, were compared to all MSP peak lists. Comparison of the MSP spectrum of each of the two species with the spectrum of their mixture is presented in Fig. 8. A comparison of the spectrum of the mixed sample with all MSPs is available in supplementary Fig. 4. Among the m/z of the six most intense peaks of the mixed sample, three peaks belong to the species G.

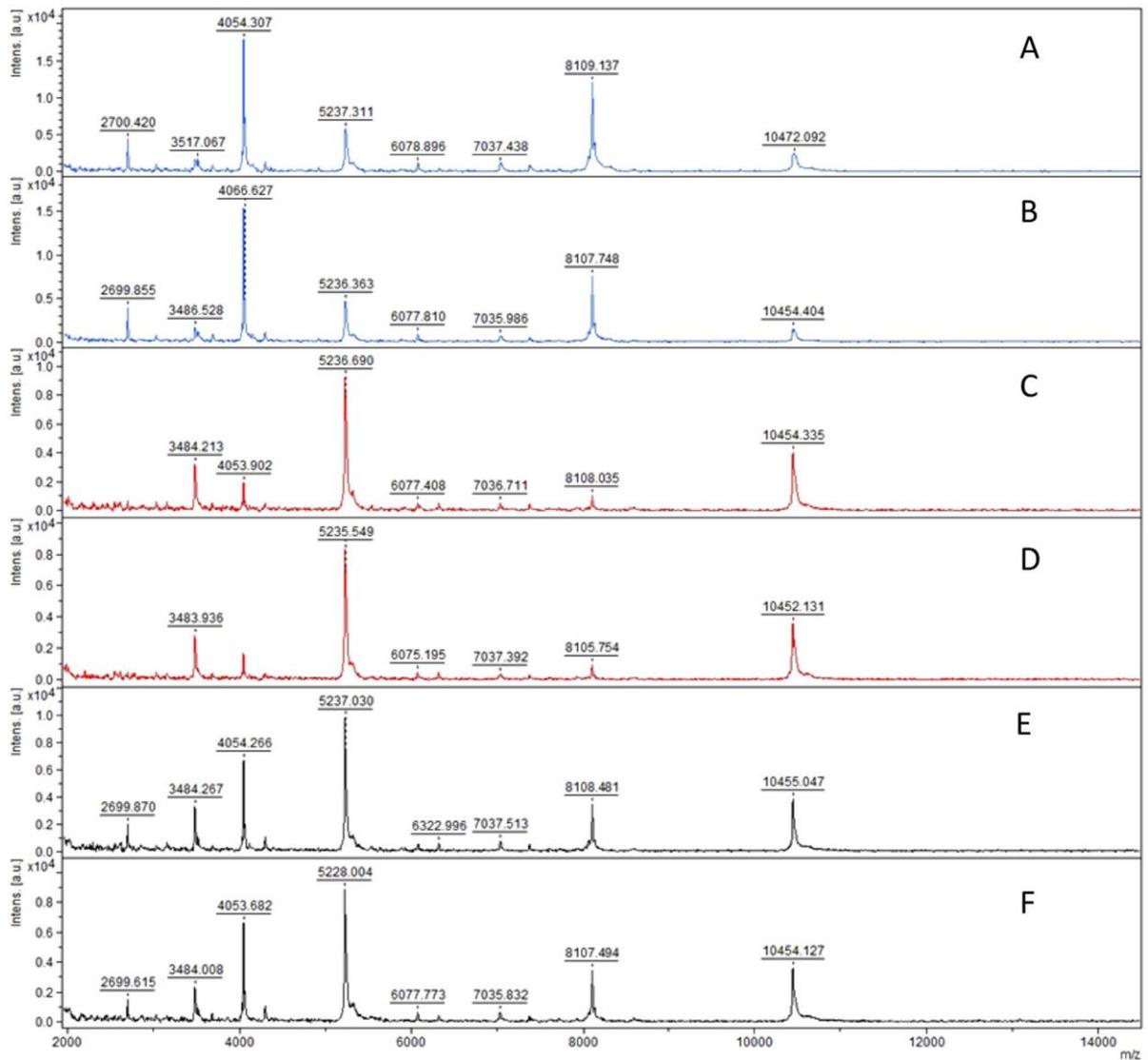


Figure 3. Comparison of mass spectra of two replicates each of mature and juvenile spores of *F. mosseae* BEG12. (A,B) Mature spores of *F. mosseae* BEG12; (C,D) juvenile spores of *F. mosseae* BEG12; (E,F) mix of juvenile and mature spores of *F. mosseae* BEG12.

margarita (2284 ± 3 , 3282 ± 2 , 3393 ± 2) and three belong to the species *G. rosea* (3319 ± 2 , 3430 ± 2 , 3812 ± 3). This graphical comparison showed that cross-contamination with other Glomeromycota can be easily detected using our approach.

Influences of culture substrate, storage, and subculture on spore MALDI-TOF-MS spectra. Using Bruker “real time identification” software, we studied the robustness of the method by evaluating different aspects of AMF culture and its potential constraints. Two subcultures of *C. etunicatum* BEG247 that differed in age by three years (from 2011 and 2014) demonstrated strictly the same spectral pattern (Fig. 9). The BEG247 MSP was obtained using the 2014 subculture, and the other samples scored up to 2 with the MSP reference. Therefore, the spectral patterns obtained using the MALDI-TOF-MS biotyping approach are independent of culture age.

Storage and substrate were found to have a slight impact on the spectrum profile for *Claroideoglossum etunicatum* *nc*, but the observed variation of the spectra did not affect the accuracy of identification by MALDI-TOF-MS, with log scores between 1.86 for compost and 2.12 for wet ultramafic soil in comparison with MSP ultramafic dry reference soil (Fig. 10). All of these profiles (Fig. 10A,B) and (Fig. 10C,D) compared to real MSP references in our internal database allowed identification at the isolate level with *Claroideoglossum etunicatum* *nc*. These experiments revealed that neither culture substrate (ultramafic soil or commercial compost), spore storage in dry or wet soils, nor subculture affected the accuracy of MALDI-TOF-MS identifications.

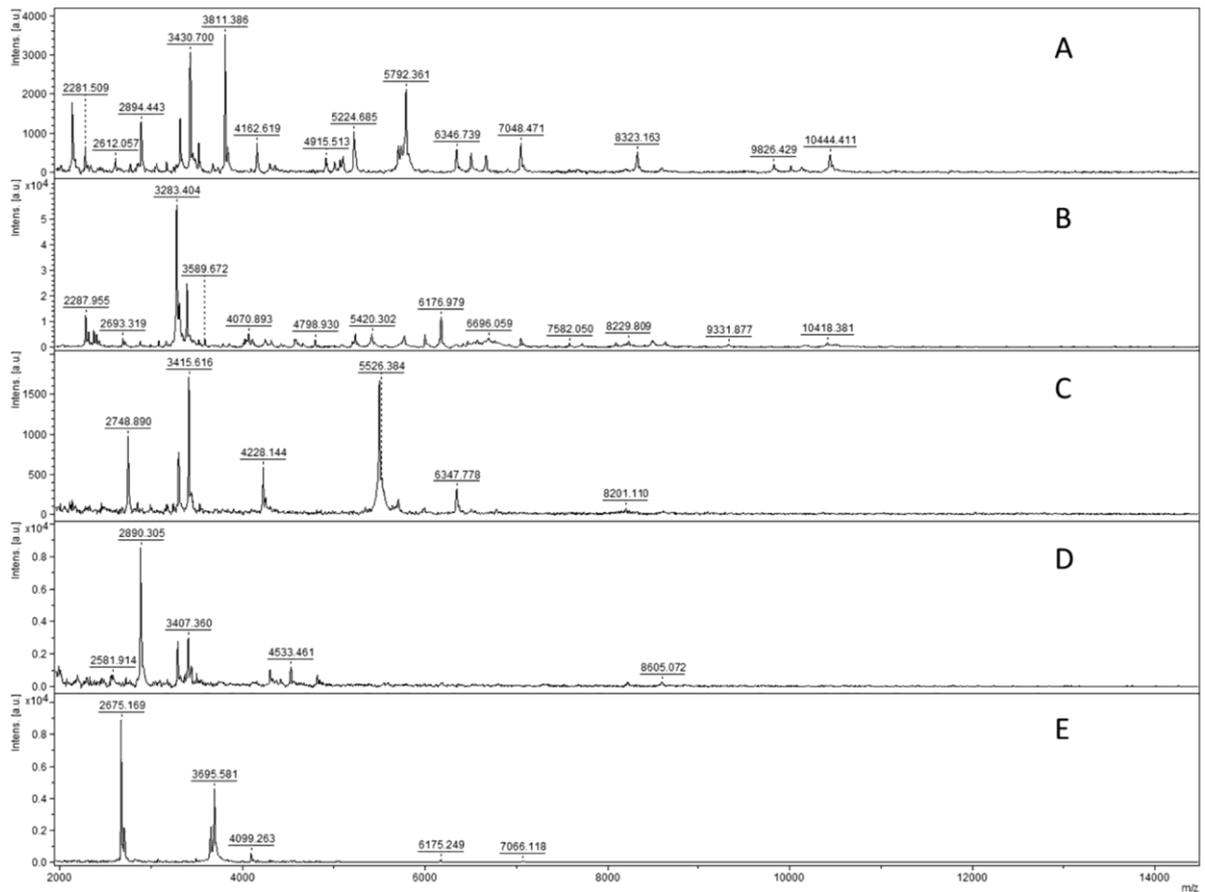


Figure 4. Comparison of MALDI-TOF mass spectra of: (A) *Gigaspora rosea* BEG9; (B) *Gigaspora margarita* BEG34; (C) *Gigaspora candida* BEG17; (D) *Scutellospora ovalis*; and (E) *Scutellospora calospora* BEG32.

Discussion

In this study, we use MALDI-TOF-MS biotyping as a novel technique for AMF isolate characterization. This approach has been used for a variety of organisms^{23,32–35}, among them human pathogenic fungi^{36–39}, but is still an “underutilized technique, especially from a biotechnology perspective”³². We developed novel bioinformatics tools to facilitate database matching, which is essential for future usability.

The strength of our method clearly lies in resolving closely related taxa. As evident from the dendrogram (Fig. 7), large-scale phylogenetic relationships (i.e., among genera and beyond) were not reliably recovered, as shown in the rDNA phylogeny (Fig. 1) and as can be expected from a protein profile. We showed that the obtained proteome profiles are highly reproducible; we also clearly distinguished closely related species such as *C. claroideum/etunicatum* or *F. mosseae/coronatum*, or even *Gigaspora* species, some of which are genetically quite close and notoriously difficult to separate using nuclear ribosomal genes^{40,41}, mitochondrially-encoded COI gene⁴², or the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1) gene⁴³.

Furthermore, MALDI-TOF biotyping proved far superior to currently used DNA based analysis in distinguishing isolates of the species *C. etunicatum* and two out of three isolates in *R. clarus* and *C. claroideum*. The possibility of identifying intra-species isolates by MALDI-TOF-MS has been demonstrated for several clinically relevant bacteria, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains⁴⁴, *Haemophilus influenzae* Type b isolates⁴⁵ or *Clostridium difficile*⁴⁶. While this appears to be well established for bacteria, sub-species typing of fungi by MALDI-TOF-MS must still be properly assessed³⁶.

In Fig. 1, we present two sequences per isolate, which all grouped together with the exception of *G. margarita*. The failure to recover the two sequences, which are separated by weakly supported nodes, as a monophyletic group is consistent with previous studies which indicated the difficulty to assess *Gigaspora* diversity due to low inter-species variation in some regions of the rRNA operon and high variation even within spores in others^{47,48}. The clear separation of these taxa by MALDI spectra reinforces that the new method will be highly useful to distinguish closely-related fungi.

However, not all isolates of the same species could be distinguished, suggesting that they were genetically too similar. Interestingly, ribosomal sequences and biotyping provided discordant results in terms of the similarity among the three isolates studied here: BEG142 and BEG149 were very close in the rRNA sequencing approach whereas BEG149 and BEG248 were closely related in proteomic analysis. Indeed, BEG248 (formerly known as LPA64) grouped at a certain distance from the other two isolates in the rDNA phylogenetic tree, which we

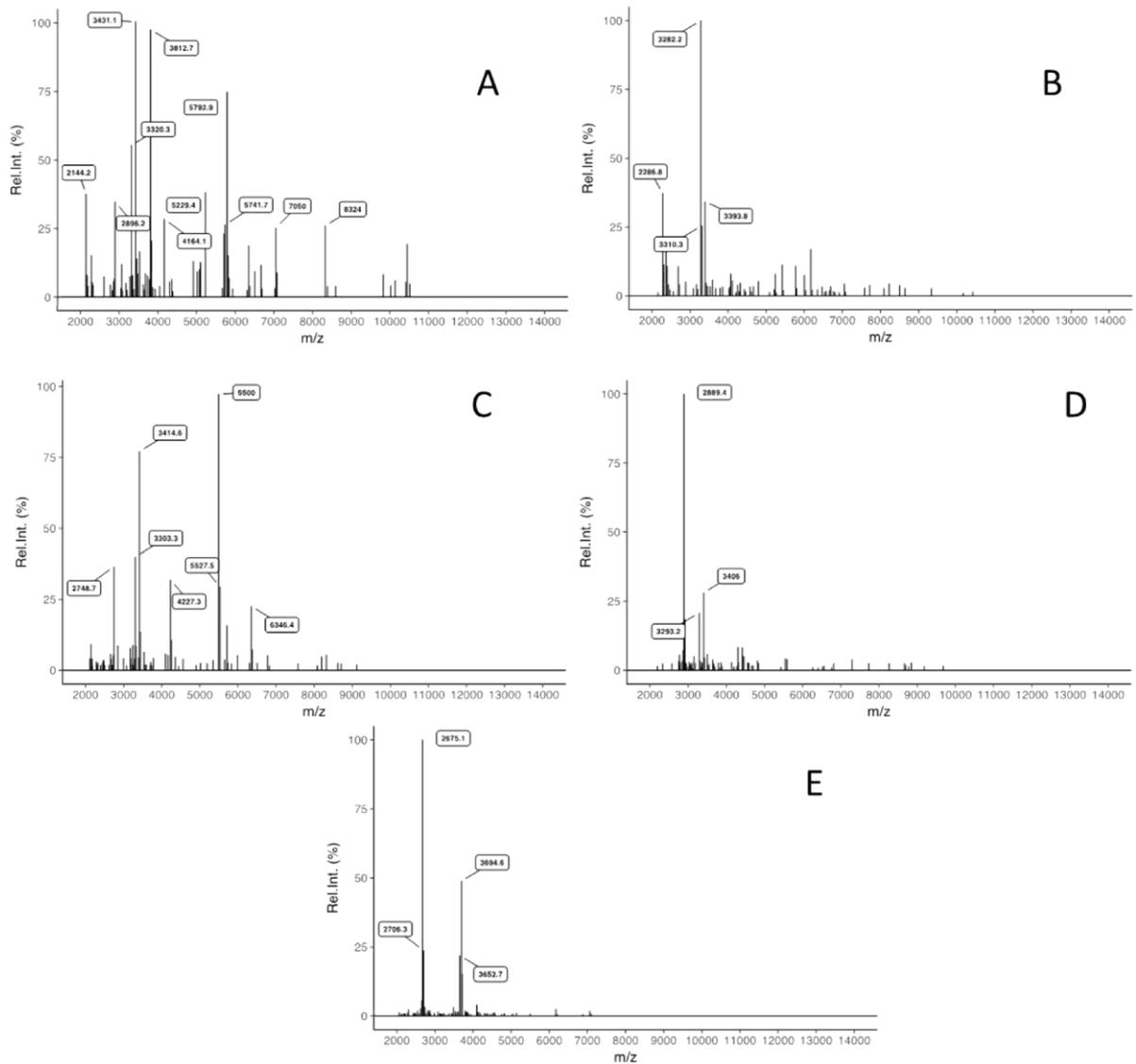


Figure 5. Main Spectrum Patterns of: (A) *Gigaspora rosea* BEG9; (B) *Gigaspora margarita* BEG34; (C) *Gigaspora candida* BEG17; (D) *Scutellospora ovalis*; and (E) *Scutellospora calospora* BEG32. Peaks were labelled if they had a minimum of 20% relative intensity.

confirmed by resequencing its LSU after an initial analysis in 2002 (accession number AJ510243). These findings will be the starting point for further analyses of the species *R. clarus* to clarify its morphological and molecular diversity.

Several studies have found no significant influence of culture media and culture age on bacterial and fungal protein mass spectral patterns. Apparently, dominant peaks result from ribosomal and house-keeping proteins, which generally remain mainly unchanged under different growth conditions and throughout different growth stages^{35–39}. Using *Funneliformis mosseae* BEG12, we explored whether culture age altered AMF mass spectra. The spectral pattern did not change between juvenile and mature spores, except for one minor peak at m/z 2700 ± 1 not found at a juvenile stage and some peak intensities. The latter likely results from changes in the ratio of the quantity of proteins between the two stages. This result is in accordance with the study of Emami *et al.*³² on microalgae. In addition, we confirmed that the duration of storage and subculture did not affect the accuracy of MALDI-TOF-MS. As AMF are normally cultivated with their host plants under non-sterile conditions and their spores are known to contain numerous other microorganisms^{49,50}, the stability of the patterns (regardless of the culture environment) is of particular concern for AMF strain typing.

These results indicate that this technique is clearly suitable for AMF identification and could be a reliable alternative to DNA sequencing. The real value of the approach lies in its ability to differentiate between closely related isolates and its better cost efficiency and lower turnover time compared to current DNA sequencing approaches. Preparation of a biological sample for a single identification of one isolate requires less than one hour of work. The identification of this sample by MALDI-TOF-MS biotyping requires at most a few minutes. In addition,

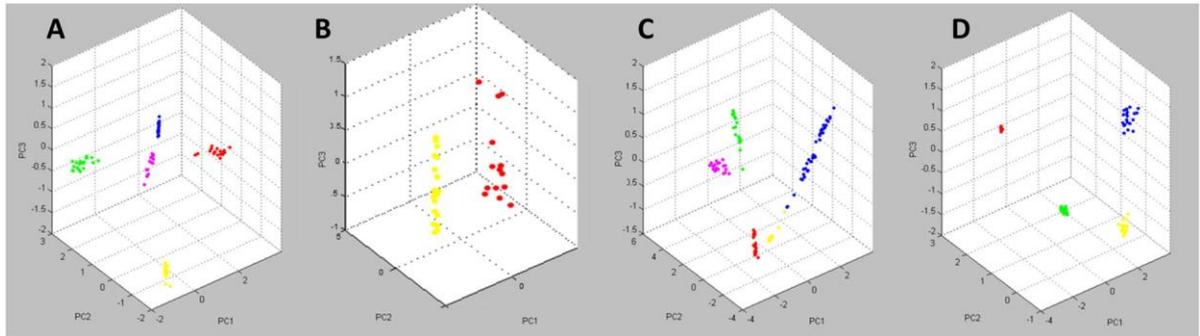


Figure 6. Three-dimensional principal component analysis (PCA) plot of 20 available spectra (replicates) of different species isolates of: (A) Gigasporaceae: *G. rosea* BEG9 in red; *G. margarita* BEG34 in yellow; *G. candida* BEG17 in green; *S. ovalis* in pink; and *S. calospora* BEG32 in blue. (B) Acaulosporaceae: *A. saccata* in yellow and *A. fragilissima* in red. (C) Glomeraceae: *R. neocaledonicus* in pink; *R. clarus* BEG248 and *R. clarus* BEG149 in blue; *R. clarus* BEG142 in yellow; *F. coronatum* BEG22 in red; *F. mosseae* in green. (D) Claroideoglomeraceae: *C. etunicatum* BEG247 in yellow; *C. etunicatum nc* in blue; *C. claroideum* BEG31 in red; *C. claroideum* BEG23 and *C. claroideum* BEG14 in green.

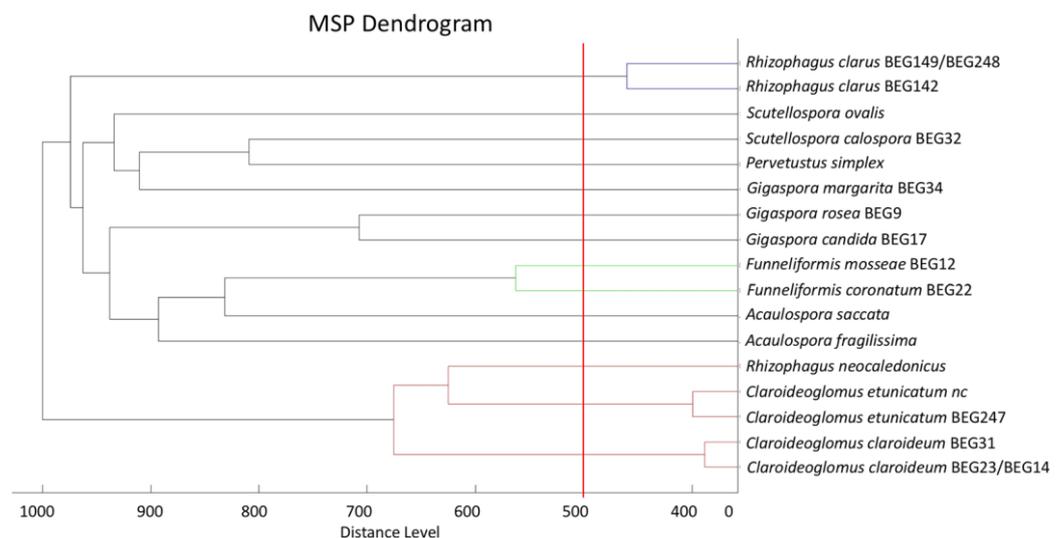


Figure 7. Cluster analysis of MALDI-TOF-MS of selected MSP references. Distance is displayed in relative units. Distance levels below 500 (represented by the red line) were considered reliably classified to the same species³¹.

MALDI-TOF-MS is much more affordable than conventional DNA sequencing, despite the cost of instrument and regardless of the microorganism^{25,51–53} (Table 2).

The MALDI-TOF-MS approach could fulfil the current need for simple but efficient inoculum quality control and the isolate certification required by inoculum producers and research laboratories. Most AMF inocula are produced on host plants in open pot cultures, which are very prone to contamination and require rigorous quality control of the inoculum. Markers from the mitochondrial DNA have been used for quality checks for mass production of the AMF model organism *R. irregularis*⁵⁴. However, the transposition of this approach to track another isolate can be time consuming, at least for the design of specific qPCR primers and experimental procedures. The proteomic approach, developed in this study may be a useful alternative which can be easily used for identifying and detecting cross-contamination of AMF cultures in a broad range of AMF.

Whatever the micro-organism group, a well-populated database is essential for MALDI-TOF-MS real time identification. Reference isolates from the IBG culture collection were crucial for building this first version of the database. It must now be supplemented using additional isolates by various institutions who work with AMF, particularly AMF culture collections, to make this identification tool usable and effective for research and industry in a broad range of working environments. One remaining limitation is that AMF spores are required and that non-sporulating AMF thus could not be detected. In all “human pathogenic fungi” biotyping studies³⁶, the mycelia of fungi were targeted for identification by MALDI-TOF-MS and therefore it is also important to further test this method with *in vitro* AMF extraradical mycelium. This limitation may be less of a concern in culture collections and inoculum production, as the fungi targeted there are usually good sporulators and the culture

| Family | Genus | Species/Isolates | Nb spores | MP scores value | Organism (Best match/second best match > 1.500) |
|----------------------|------------------|----------------------|-----------|--------------------|---|
| Gigasporaceae | Gigaspora | G. rosea BEG9 | 1 | 2.370 | G. rosea BEG9 |
| | | | 1 | 2.290 | G. rosea BEG9 |
| | | | 1 | 2.470 | G. rosea BEG9 |
| | | G. margarita BEG34 | 1 | 2.250 | G. margarita BEG34 |
| | | | 1 | 2.140 | G. margarita BEG34 |
| | | | 1 | 2.120 | G. margarita BEG34 |
| | G. candida BEG17 | 1 | 2.300 | G. candida BEG17 | |
| | | 1 | 2.420 | G. candida BEG17 | |
| | | 1 | 2.250 | G. candida BEG17 | |
| | Scutellospora | S. ovalis | 2 | 1.920 | S. ovalis |
| | | | 2 | 2.130 | S. ovalis |
| | | | 2 | 2.600 | S. ovalis |
| S. calospora BEG32 | | 3 | 2.270 | S. calospora BEG32 | |
| | | 3 | 2.310 | S. calospora BEG32 | |
| | | 3 | 2.220 | S. calospora BEG32 | |
| Acaulosporaceae | Acaulospora | A. fragilissima | 14 | 2.590 | A. fragilissima |
| | | | 14 | 2.190 | A. fragilissima |
| | | | 14 | 2.170 | A. fragilissima |
| | | A. saccata | 10 | 1.870 | A. saccata |
| | | | 10 | 1.830 | A. saccata |
| | | | 10 | 1.500 | A. saccata |
| Glomeraceae | Rhizopogon | R. neocaledonicus | 10 | 1.780 | R. neocaledonicus |
| | | | 10 | 1.660 | R. neocaledonicus |
| | | | 10 | 1.670 | R. neocaledonicus |
| | | R. clarus BEG248 | 1 | 2.530/2.300 | R. clarus BEG248/BEG149 |
| | | | 1 | 2.490/2.260 | R. clarus BEG248/BEG149 |
| | | | 1 | 2.550/2.370 | R. clarus BEG248/BEG149 |
| | | R. clarus BEG149 | 1 | 2.440/2.350 | R. clarus BEG149/BEG248 |
| | | | 1 | 2.330/2.270 | R. clarus BEG248/BEG149 |
| | | | 1 | 2.410/2.340 | R. clarus BEG149/BEG248 |
| | | R. clarus BEG142 | 1 | 1.590 | R. clarus BEG142 |
| | | | 1 | 1.820 | R. clarus BEG142 |
| | | | 1 | 1.900 | R. clarus BEG142 |
| | Funneliformis | F. coronatum BEG 22 | 1 | 1.940 | F. coronatum BEG22 |
| | | | 1 | 2.130 | F. coronatum BEG22 |
| | | | 1 | 1.840 | F. coronatum BEG22 |
| F. mosseae BEG12 | | 4 | 2.050 | F. mosseae BEG12 | |
| | | 4 | 1.900 | F. mosseae BEG12 | |
| | | 4 | 2.080 | F. mosseae BEG12 | |
| Claroideoglomeraceae | Claroideoglonus | C. etunicatum BEG247 | 7 | 2.130 | C. etunicatum BEG247 |
| | | | 7 | 1.720 | C. etunicatum BEG247 |
| | | | 7 | 2.000 | C. etunicatum BEG247 |
| | | C. etunicatum nc | 6 | 2.140 | C. etunicatum nc |
| | | | 6 | 2.220 | C. etunicatum nc |
| | | | 6 | 2.010 | C. etunicatum nc |
| | | C. claroideum BEG31 | 4 | 2.070 | C. claroideum BEG31 |
| | | | 4 | 2.040 | C. claroideum BEG31 |
| | | | 4 | 2.090 | C. claroideum BEG31 |
| | | C. claroideum BEG14 | 4 | 2.140/1.760 | C. claroideum BEG14/BEG23 |
| | | | 4 | 2.220/1.350 | C. claroideum BEG14/BEG23 |
| | | | 4 | 2.260/1.820 | C. claroideum BEG14/BEG23 |
| | | C. claroideum BEG23 | 4 | 2.10/1.920 | C. claroideum BEG14/BEG23 |
| | | | 4 | 2.170/2.040 | C. claroideum BEG23/BEG14 |
| | | | 4 | 1.870/1.690 | C. claroideum BEG23/BEG14 |
| Pervetustaceae | Pervetustus | P. simplex nc | 29 | 1.760 | P. simplex nc |
| | | | 29 | 1.370 | P. simplex nc |
| | | | 29 | 0 | — |

Table 1. Spore identification of 19 isolates of AMF by MALDI-TOF-MS biotyper: Bruker real-time analysis of log MP scores. Bold scores indicate that the method identifies a second candidate; the second candidate is presented (in bold) only for MP scores greater than 1.500.

conditions are optimized to assure this. However, our approach will also be useful for identifying spores in the environment. This may allow to determine the presence or absence of spores of known isolates in the field for instance after inoculation. In the long term, it will nevertheless be interesting to identify m/z peaks characteristic for target AMF that can be detected even against the background of plant protein in root extracts⁵⁵.

In conclusion, identification of AMF by MALDI-TOF-MS biotyping could have considerable value, not only for research but also in agricultural and environmental applications. Fast and accurate molecular mass determination and the possibility of automation makes MALDI-TOF-MS a real alternative to conventional morphological and molecular methods for identification of AMF.

Material and Methods

Arbuscular mycorrhizal fungi isolates and culture conditions. Nineteen AMF isolates (Supplementary Fig. 1; Table 1) were studied: 13 were obtained from the culture collection of International Bank for the Glomeromyco (IBG, Dijon, France) and six were obtained by the *Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement* (LIVE, New-Caledonia). Four of them are currently described as new species and are therefore marked here as *nomina inedita*: *Acaulospora saccata* D. Redecker, Crossay & Cilia. *nom. ined.*, *Acaulospora fragilissima* D. Redecker, Crossay & Cilia. *nom. ined.*, *Scutellospora ovalis* D. Redecker, Crossay & Cilia. *nom. ined.* and *Rhizophagus neocaledonicus* D. Redecker, Crossay & Cilia. *nom. ined.* *P. simplex nc* was described as a new species⁵⁶. All of the latter isolates and *C. etunicatum nc* were isolated in New Caledonia. For the six New Caledonian isolates, the culture was initiated as follows: The cone-tainer technique⁵⁷ was applied for producing single species cultures, and 100 surface-sterilized spores of each isolate were used. Pots were filled with 40 g of an autoclaved substrate consisting of ultramafic soil from the area where each fungus was isolated. As plant growth in this pure ultramafic soil was very slow, a mixture of 80% ultramafic soil and 20% commercial compost (v/v) was used. For *Claroideoglossum etunicatum nc* an additional experiment was conducted: 100 spores were inoculated as described previously in 100% commercial compost to evaluate the possible influence of the culture substrate on MALDI spectra. The soil was autoclaved three times at 120 °C for 1 h, with an interval of 24 h. The substrate was placed in 50 mL cone-tainers. Two-week-old AMF-free plantlets of *Sorghum vulgare* were inoculated with AMF and placed in each cone-tainer. Spores in 200 µL water were deposited in the vicinity of the intertwined roots, to contact roots across a maximum range of root physiological states. After two months, cone-tainers were transplanted into 450 mL pots filled with the same substrate. Single-species cultures were maintained in a greenhouse (temperature, 21–24 °C; relative humidity, 70%) for 6 months and irrigated manually every two days. To prevent cross-contamination, pots of isolates were grown separately for each isolate on aluminium benches. Benches were separated by two metres of space. Isolates obtained from IBG had been cultivated in custom-built growth chambers at 20–26 °C under a 16:8 h day-night rhythm using various host plants and substrates as detailed in the following: BEG9, BEG34 (leek/onion; 75% Epoisses soil pH 7.5, 25% perlite), BEG12, BEG14, BEG17, BEG22, BEG23 (leek/onion; Epoisses soil pH 7.5), BEG31, BEG32 (clover; 75% Marlins soil pH 5, 25% gravel); and BEG142, BEG149, BEG247, BEG248 (*Tephrosia* sp.; 75% Marlins soil pH 5, 25% perlite). Further details about these cultures are available at <http://i-beg.eu>.

Arbuscular mycorrhizal fungi spore extraction. After six months of culture, spores were stored in dry soil at room temperature for three months and extracted by wet sieving and sucrose density gradient centrifugation, using the method of Daniels and Skipper⁵⁸. For each culture, approximately 10 mL of harvested were well suspended in 20 mL of water in a 50-mL Falcon tube. A 25 mL sucrose solution (70% v/w) was injected into the bottom of the tube, forming a stepped density gradient that was centrifuged at 900 × g for 3 minutes. Spores of AMF were collected from the interface of the sucrose solution, washed with tap water on a 36 µm sieve for 2 minutes, and transferred to Petri dishes. Spores were picked individually under a stereomicroscope and transferred to Petri dishes with ultrapure water. Spores were sonicated for 15 seconds at 40 kHz of output frequency to remove debris from the spore surface and washed two times with ultrapure water. This extraction step was common for microscopy, molecular and MALDI proteomic analysis.

Microscopic analysis. Before being used for proteomics and molecular analyses, spores of each specimen were checked for quality and homogeneity control and photographed using a digital camera (Leica DFC 295) on a compound microscope (Olympus BX 50) equipped with Normarski differential interference contrast optics using Leica Application Suite Version V 4.1 software (Supplementary Fig. 1).

Molecular analysis. For the six New Caledonian isolates and those from the IBG for which no sequence of the SSU-ITS-LSU was available (BEG247, BEG248), one to three spores of each species from the single species cultures on *S. vulgare* were ground with a pipette tip in a 1.5-mL Eppendorf tube containing 10 µL of ultrapure water; 2 µL was used for polymerase chain reaction (PCR). A DNA fragment of 1,545 base pairs covering partial SSU, the whole ITS and the variable D1 and D2 regions of the LSU were amplified by nested PCR using AMF-specific primers developed by Krüger *et al.*¹⁸. In the first round of PCR, the primers SSUmAf and LSUmAr were used. In the second, nested round of PCR, the primers SSUmCf and LSUmBr were used with 1 µL of the first PCR round product as a template. The PCR mix included 0.4 U of AmpliTaq[®] 360 DNA polymerase (Applied Biosystems), 1X AmpliTaq[®] 360 PCR buffer (Applied Biosystems), 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer and 1 µL of the template in a final volume of 25 µL. The cycling parameters for the first PCR were: 3 minutes at 98 °C followed by 30 cycles of 10 seconds at 98 °C, 30 seconds at 60 °C, and 1 minute at 72 °C. The program was concluded by a final extension phase of 10 minutes at 72 °C. The cycling parameters for the second PCR were the same as in the first PCR, except for the number of cycles (35) and the annealing temperature (63 °C). The PCRs were conducted in triplicate. PCR products were checked on 1% agarose gels and stained with ethidium bromide.

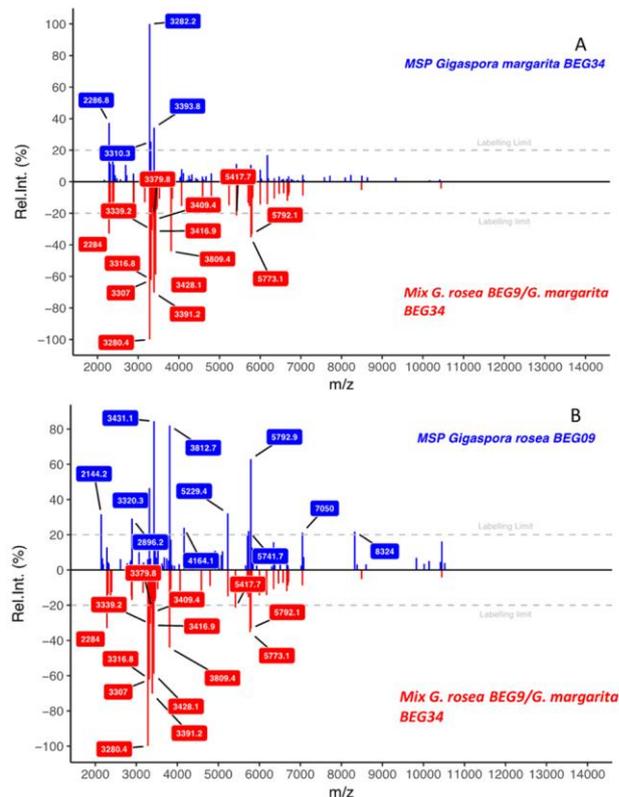


Figure 8. Example using R (version 3.3.2³⁰) MSP importation data based on a mixed-species sample. The unknown sample (red) is matched to MSP reference spectra (blue). (A) *G. margarita* MSP in blue versus mixed-species sample (*G. rosea* BEG9/*G. margarita* BEG34). (B) *G. rosea* BEG9 MSP in blue versus mixed-species sample (*G. rosea* BEG9/*G. margarita* BEG34).

The positive PCR products (70 ng) were cloned into pGEM-T using a pGEM-T easy vector system (Promega) following the manufacturer's instructions. Ligated plasmids were transformed into *CaCl*₂-competent *E. coli* DH5 α cells using a heat-shock approach. The transformed bacteria were plated into LB (Luria Bertani) medium containing ampicillin (50 μ g/mL) and grown overnight at 37 °C. For each AMF isolate, three independent recombinant clones were sequenced using an Applied Biosystems 3730xl capillary sequencer (IRD, Noumea) with the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The forward and reverse strands were assembled in ChromasPro (Technelysium Pty Ltd, Australia). The glomeromycotan origin of the sequences was tested by BLAST⁵⁹. The new sequences were deposited in the EMBL database under the accession numbers KY362428, KY362429, KY362430, KY362431, KY362432, KY362433, KY362434, KY362435, KY362436, KY362437, KY362438, KY927386, KY927387, KY934450, KY934451, KY934452, KY927391, KY927390, KY927388, and KY927389.

Phylogenetic analysis. DNA sequences were aligned using MAFFT 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>; Katoh and Standley⁶⁰) with the slow iterative refinement option FF-NS-I (gap opening penalty 1.0, offset value 0.1). Maximum likelihood (ML) analyses of the partial region (partial SSU-5,8S-LSU partial) or the partial 28S part were performed using PhyML 3.0⁶¹ and MEGA 7 software⁶² with bootstrap support obtained using 1000 replicates. ITS1 and ITS2 were trimmed as explained in Krüger *et al.*¹⁹. Phylogenetic trees were viewed and edited using MEGA 7 software⁶³.

MALDI-TOF-MS sample preparation. First, we tested the detection limit of MALDI-TOF using *Scutellospora ovalis* with 1, 2, 4, 5 and 10 spores for the analyses to determine the optimal signal-to-noise ratio. The number of spores per sample for the other isolates was calculated using the estimated spore volume of each isolate (Supplementary Table S1). The final protocol was designed considering the protocols developed for pathogenic yeasts⁶⁴ and cyanobacteria³². Spore proteins were extracted using formic acid (FA) as follows: fungal spore samples were transferred to a sterile 1.5-mL tube with 20 μ L of ultrapure water. After centrifugation for 3 minutes at 13,000 \times g, the supernatant was discarded and the spore pellet was incubated for 5 minutes in 10 μ L of (70:30 [vol/vol]) formic acid/acetonitrile (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Spores were crushed using a pestle for 30 seconds and incubated for 5 minutes at room temperature before use. Each sample was checked under a stereomicroscope to ensure that spores were completely crushed. Successive aliquots of 1.5 μ L of the supernatant were transferred to a polished steel MSP 96 target (Bruker) until the sample was consumed and was allowed to dry at room temperature before being overlaid with 1 μ L of a

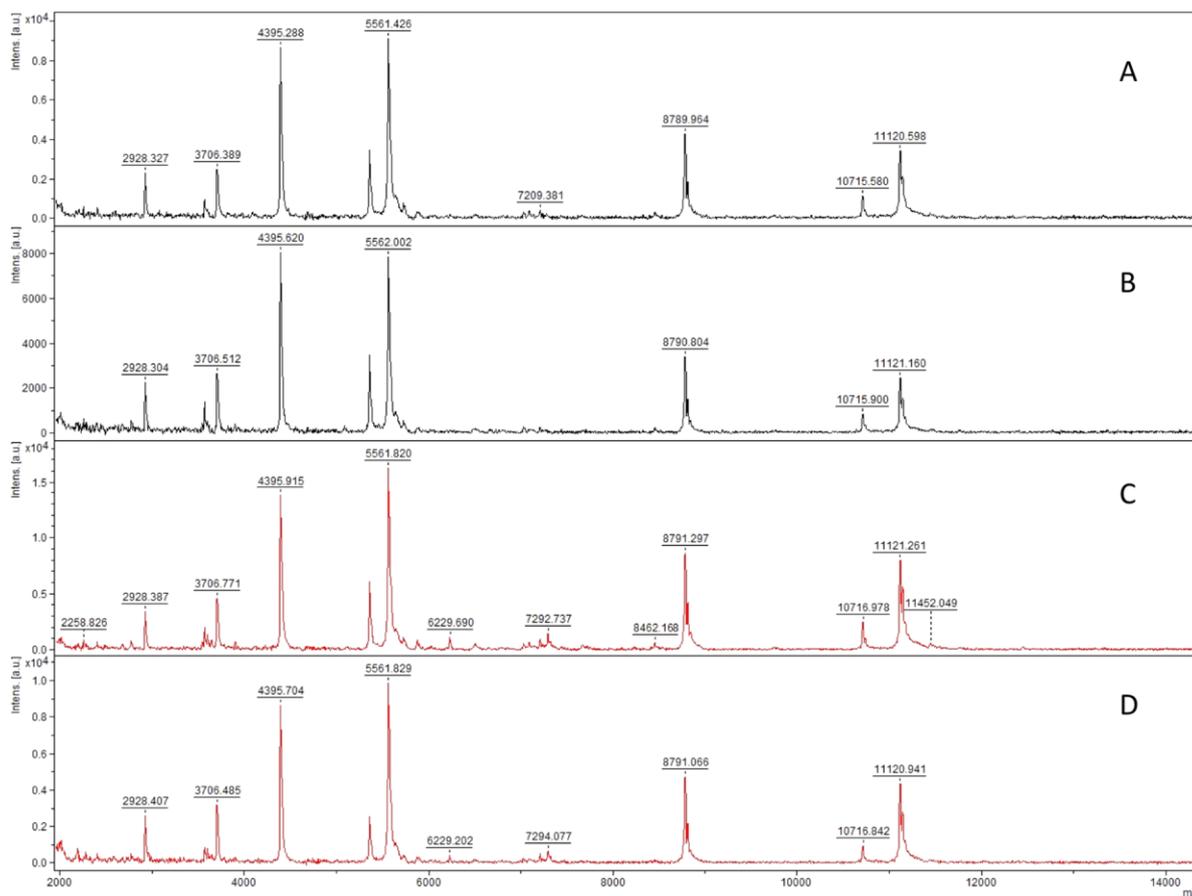


Figure 9. Replicate ($n = 2$) MALDI -TOF mass spectra of six spores of *C. etunicatum* BEG247 of (A,B) a culture from 2011 and (C,D) a culture from 2014. Subculture did not affect the score.

saturated *a*-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix solution in 50% acetonitrile-2.5% trifluoroacetic acid (Bruker).

Data acquisition. Measurements were performed on a Biotyper CA System that includes a Bruker bench-top microflex™ MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) software. A Bruker Bacterial Test Standard (BTS0000218558; Bruker) was used for instrument calibration and performance verification. Spectra were recorded in the positive linear mode (laser frequency, 20 Hz; ion source 1 voltage, 20 kV; ion source 2 V, 16.7 kV; lens voltage, 8.5 kV; mass range, 2000–20000 Da).

Data processing. Spores of the investigated AMF isolates were recorded as MSP references using the automated functionality of the MALDI Biotyper package (Bruker MBT 3.1 software). For each database entry, eight biological replicates were individually measured three times. A selection of 20 mass spectra were imported into the software, which performs normalization, smoothing, baseline correction and peak picking, generating a list of the most significant peaks and calculating a main spectrum containing the average peak mass (m/z : m stands for mass and z stands for charge number of ions), the average peak intensity and frequency information. In a first step to assess the uniqueness of our spectra, we checked for overlaps of our database with the Bruker database included with the MALDI Biotyper 3.1 software which contains 6903 reference spectra of 2461 microbial species, including human pathogen fungi by merging the two.

Principal component analyses (PCA) for each AMF family and hierarchical cluster analyses were conducted using the integrated tools of the MALDI Biotyper 3.1 software package, using default settings. A graphical analysis of the spectra of the different isolates was carried out and a dendrogram was created using the reference spectra to assess the similarity of their spectra. Isolates with distance levels under 500 (arbitrary units) have been described as reliably conspecific, whereas isolates with a distance level under 100 are considered clones³¹.

MALDI-TOF MS real-time blind test, data interpretation. For each isolate, three biological replicates of spores were prepared as explained above. The MALDI Biotyper CA System Sample Workflow (the internal software), compares each sample mass spectrum to the reference mass spectra in the MSP database and calculates a unit score value (Main Pattern score or MP score) between 0 and 3, reflecting the similarity between sample

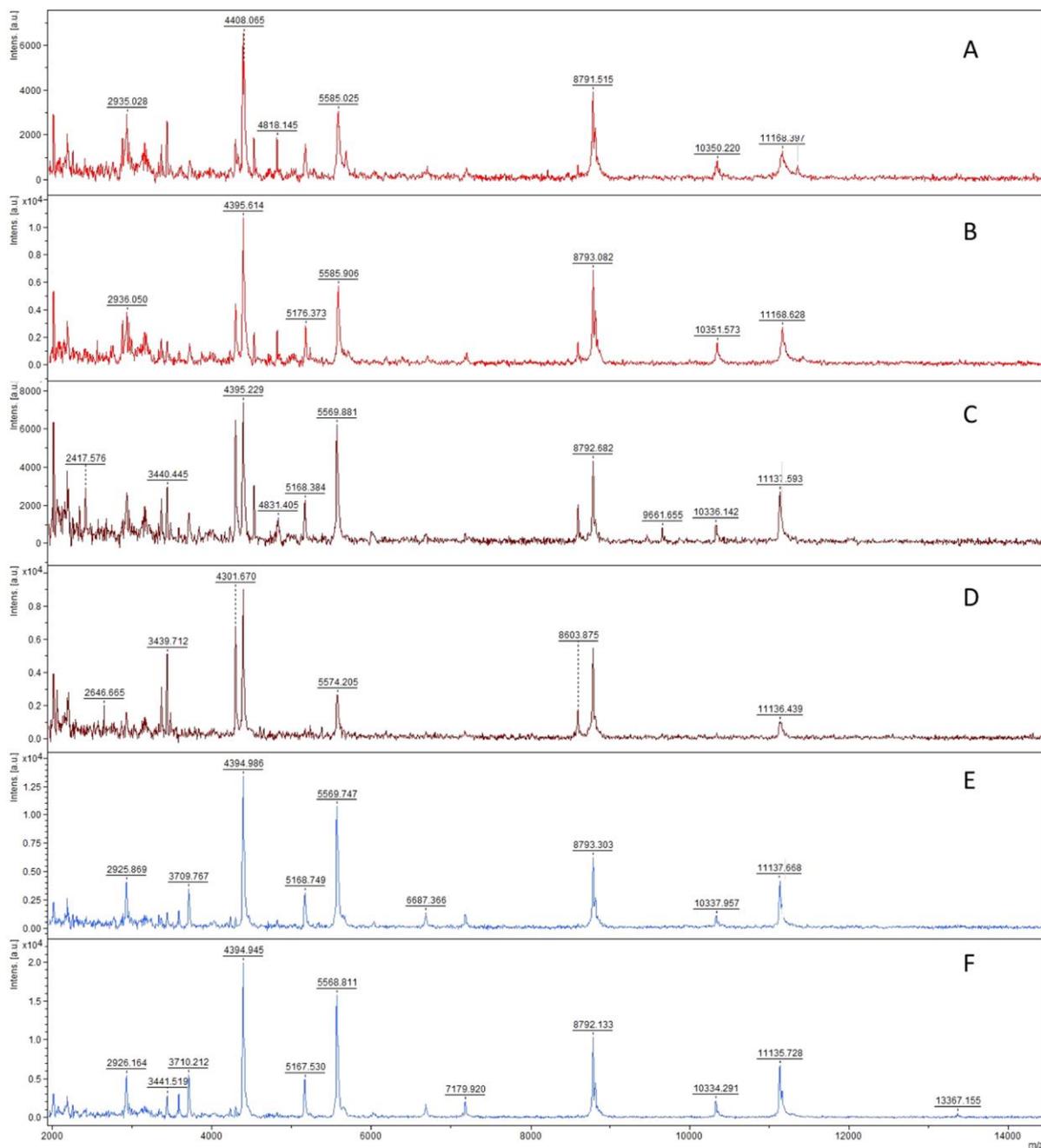


Figure 10. Replicate ($n = 2$) MALDI-TOF mass spectra of six spores of *Claroideoglossum etunicatum nc* (A,B) grown on ultramafic soil and (C,D) commercial compost, all collected on humid soil of pure and fresh “living culture” with (E,F) two spectra used for MSP reference obtained after three-month storage of dry ultramafic soil.

and reference spectrum. The top 10 matching database records are displayed. As specified by the manufacturer (Bruker) for bacteria identification, scores ≥ 2.0 are generally accepted for a reliable identification at the species level, and scores ≥ 1.7 and < 2.0 were used for identification at the genus level. Similar to Nonnemann *et al.*⁶⁵, we tried to investigate whether it was possible to lower the log score. This previous work suggested that the log score can be lowered to 1.5 when identifying pure cultures.

MALDI-TOF-MS data export and identification by graphical analyses on R software. All MSPs data were exported in m/z XML format to the software R, version 3.3.2³⁰ using the “tcltk, XML, reshape2, ggplot2, ggrepel” packages. MSP in Bruker software consists of a peak list of a selection of the 100 “best” peaks and are used for calculation and scoring in real time analysis. The export of these data makes it possible to obtain a graphical representation of the MSPs and perform a graphical comparison between reference spectra and unknown

| DNA sequencing (Sanger) | | MALDI-TOF-MS | |
|-----------------------------|----------------|--------------------|----------------|
| Hands-on time | Hands-off time | Hands-on time | Hands-off time |
| Process/work time | | | |
| DNA extraction | | Protein extraction | |
| 20 min | 0 min | | |
| Nested PCR steps | | 1 min | 5 min |
| 40 min | 5 hr | | |
| Cloning steps | | MALDI sampling | |
| 3–4 hr | 1–2 days | | |
| Sequencing reaction | | 10 min | 5 min |
| 25 min | 4 hr | | |
| Sequencing clean up | | Data acquisition | |
| 30 min | 0 hr | | |
| Sanger Sequencing | | 5 min | 1 min |
| 5 min | 1 hr | | |
| Total time | | | |
| Total time/sample | | Total time/sample | |
| 5–6 hr | 34–58 hr | 16 min | 11 min |
| Approximate cost | | | |
| (Chemistry and consumables) | | | |
| Total Price/sample | | Total Price/sample | |
| 17 US \$ with cloning | | 3 US \$ | |
| 9.5 US \$ without | | | |
| Approximate cost | | | |
| (Instruments) | | | |
| 95000 US \$ | | 155000 US \$ | |

Table 2. Time and estimated cost analysis for rDNA sequencing from one isolate using conventional Sanger sequencing versus MALDI-TOF-MS biotyping.

sample spectra. For further investigation, a mixed sample of two isolates (one spore of *G. rosea* BEG9; one spore of *G. margarita* BEG34) was prepared and analysed as explained above, followed by a graphical comparison of the obtained spectra to MSP of each study's isolates.

Possible influence of culture conditions, age or storage. We assessed the possible influence of the culturing substrate on spectra by analysing spores of *Claroideoglossum etunicatum* nc from commercial compost and ultramafic soils. Possible storage effects were addressed by comparing spectra from spores of this species after three months of storage in dry soil and spores from a living culture (humid soil). To address the effect of culture age we compared spores of *C. etunicatum* BEG247 from cultures set up in 2011 and 2014. Finally, *Funneliformis mosseae* BEG12 was chosen to investigate the influence of spore maturity because, in this species, it is very easy to differentiate juvenile and mature spores; juvenile spores are clearly smaller than mature spores (Supplementary Fig. 1). We used four mature spores to compare to eight juvenile spores. All spore samples were prepared as explained above in three replicates. Graphical analysis of spectra resulting from spores from different culture substrates, subculture age, storage conditions and different maturity stages were performed as described above.

References

1. Abumhadi, N. *et al.* Agricultural research in 21st century: Challenges facing the food security under the impacts of climate change. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* **18**, 801–818 (2012).
2. Berruti, A., Lumini, E., Balestrini, R. & Bianciotto, V. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let's Benefit from Past Successes. *Frontiers in Microbiology* **6** (2016).
3. Smith, S. E. & Read, D. 5 - Mineral nutrition, toxic element accumulation and water relations of arbuscular mycorrhizal plants. in *Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition)* 145–VI (Academic Press, <https://doi.org/10.1016/B978-012370526-6.50007-6>) (2008).
4. Brundrett, M. C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* **320**, 37–77 (2009).
5. Pirozynski, K. A. & Malloch, D. W. The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems* **6**, 153–164 (1975).
6. Redecker, D., Kodner, R. & Graham, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**, 1920–1921 (2000).
7. Amir, H., Jourand, P., Cavaloc, Y. & Ducouso, M. In *Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Land Restoration* (eds. Solaiman, Z. M., Abbott, L. K. & Varma, A.) **41**, 241–258 (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
8. Jakobsen, I. & Rosendahl, L. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* **115**, 77–83 (1990).
9. van der Heijden, M. G. A. *et al.* Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**, 69–72 (1998).
10. Ohsowski, B. M., Zaitsoff, P. D., Öpik, M. & Hart, M. M. Where the wild things are: looking for uncultured Glomeromycota. *New Phytol* **204**, 171–179 (2014).

21. Błaszowski, J., Chwat, G. & Górska, A. *Acaulospora ignota* and *Claroideoglomus hanlinii*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) from Brazil and Cuba. *Mycological Progress* **14** (2015).
22. Schüßler, A. & Walker, C. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. *The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University* (2010).
23. Redecker, D. *et al.* An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* **23**, 515–531 (2013).
24. Simon, L., Lalonde, M. & Bruns, T. D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 291–295 (1992).
25. Hijiri, M. & Sanders, I. R. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* **433**, 160–163 (2005).
26. Croll, D. *et al.* Nonspecific vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **181**, 924–937 (2009).
27. Martin, F. *et al.* The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* **180**, 747–750 (2008).
28. Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C. & Schüssler, A. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **183**, 212–223 (2009).
29. Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H. & Schüßler, A. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* **193**, 970–984 (2012).
30. Anhalt, J. P. & Fenselau, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **47**, 219–225 (1975).
31. Kaufmann, C. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting midges. *Medical and Veterinary Entomology* **25**, 32–38 (2011).
32. Stephan, R. *et al.* Rapid and reliable species identification of scallops by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Control* **46**, 6–9 (2014).
33. Volta, P., Riccardi, N., Lauceri, R. & Tonolla, M. Discrimination of freshwater fish species by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS): a pilot study. *Journal of Limnology* **71**, 17 (2012).
34. Gautier, M. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect* **20**, 1366–1371 (2014).
35. Tran, A., Alby, K., Kerr, A., Jones, M. & Gilligan, P. H. Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 2473–2479 (2015).
36. Lopes, R. B. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry applied to identifying species of insect-pathogenic fungi from the *Metarhizium anisopliae* complex. *Mycologia* **106**, 865–878 (2014).
37. Respinis, S. D. *et al.* MALDI-TOF MS of *Trichoderma*: a model system for the identification of microfungi. *Mycol Progress* **9**, 79–100 (2010).
38. Brun, S. *et al.* Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. *Fungal Biology* **117**, 32–40 (2013).
39. Normand, A.-C. *et al.* Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiology* **17**, 25 (2017).
40. R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2016).
41. Sauer, S. *et al.* Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. *PLOS ONE* **3**, e2843 (2008).
42. Emami, K. *et al.* Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: An example using *Dunaliella*. *Sci Rep* **5**(5), 10036–10036 (2015).
43. Wirth, H. *et al.* MALDI-typing of infectious algae of the genus *Prototheca* using SOM portraits. *J. Microbiol. Methods* **88**, 83–97 (2012).
44. Murugaiyan, J., Ahrholdt, J., Kowbel, V. & Roesler, U. Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. *Clinical Microbiology and Infection* **18**, 461–467 (2012).
45. Pennanec, X., Dufour, A., Haras, D. & Rachel, K. A quick and easy method to identify bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**, 384–392 (2010).
46. Rizzato, C., Lombardi, L., Zoppo, M., Lupetti, A. & Tavanti, A. Pushing the Limits of MALDI-TOF Mass Spectrometry: Beyond Fungal Species Identification. *Journal of Fungi* **1**, 367–383 (2015).
47. Reich, M. Species Identification of Bacteria and Fungi from Solid and Liquid Culture Media by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Bacteriology & Parasitology* **01** (2013).
48. De Respinis, S. *et al.* Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using the Vitek MS System for Rapid and Accurate Identification of Dermatophytes on Solid Cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **52**, 4286–4292 (2014).
49. Pineda, F. J. *et al.* Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Anal. Chem.* **75**, 3817–3822 (2003).
50. VanKuren, N. W., den Bakker, H. C., Morton, J. B. & Pawlowska, T. E. Ribosomal RNA Gene Diversity, Effective Population Size, and Evolutionary Longevity in Asexual Glomeromycota. *Evolution* **67**, 207–224 (2013).
51. de Souza, F. A., de Kowalchuk, G. A., Leeflang, P., Veen, J. A. & Smit, E. PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiling of Inter- and Intraspecific 18S rRNA Gene Sequence Heterogeneity Is an Accurate and Sensitive Method To Assess Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi of the Genus *Gigaspora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1413–1424 (2004).
52. Borriello, R., Bianciotto, V., Orgiazzi, A., Lumini, E. & Bergero, R. Sequencing and comparison of the mitochondrial COI gene from isolates of Arbuscular Mycorrhizal Fungi belonging to Gigasporaceae and Glomeraceae families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **75**, 1–10 (2014).
53. Stockinger, H., Peyret-Guzzon, M., Koegel, S., Bouffaud, M.-L. & Redecker, D. The Largest Subunit of RNA Polymerase II as a New Marker Gene to Study Assemblages of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Field. *PLOS ONE* **9**, e107783 (2014).
54. Ueda, O. *et al.* Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *Journal of Hospital Infection* **90**, 147–155 (2015).
55. Mansson, V., Resman, F., Kostrzewa, M., Nilson, B. & Riesbeck, K. Identification of Haemophilus influenzae Type b Isolates by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **53**, 2215–2224 (2015).
56. Rizzardi, K. & Åkerlund, T. High Molecular Weight Typing with MALDI-TOF MS - A Novel Method for Rapid Typing of *Clostridium difficile*. *PLOS ONE* **10**, e0122457 (2015).
57. Lanfranco, L., Delpero, M. & Bonfante, P. Intraspecific variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology* **8**, 37–45 (1999).
58. Thiéry, O. *et al.* Sequence variation in nuclear ribosomal small subunit, internal transcribed spacer and large subunit regions of *Rhizophagus irregularis* and *Gigaspora margarita* is high and isolate-dependent. *Mol Ecol* **25**, 2816–2832 (2016).

49. Iffis, B., St-Arnaud, M. & Hijri, M. Bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungi within roots of plants growing in a soil highly contaminated with aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons. *FEMS Microbiol Lett* **358**, 44–54 (2014).
50. Hijri, M. *et al.* Identification and Isolation of Two Ascomycete Fungi from Spores of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Scutellospora castanea*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4567–4573 (2002).
51. Shokralla, S. *et al.* Massively parallel multiplex DNA sequencing for specimen identification using an Illumina MiSeq platform. *Sci Rep* **5** (2015).
52. Neville, S. A. *et al.* The Utility of Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) following introduction for routine laboratory bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* JCM. 00431-11 <https://doi.org/10.1128/JCM.00431-11> (2011).
53. Liu, L. *et al.* Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *BioMed Research International* <https://doi.org/10.1155/2012/251364> (2012).
54. Badri, A. *et al.* Molecular diagnostic toolkit for *Rhizophagus irregularis* isolate DAOM-197198 using quantitative PCR assay targeting the mitochondrial genome. *Mycorrhiza* **26**, 721–733 (2016).
55. Weidner, S., Schultze, R. D. & Enthaler, B. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry of pollen grains and their mixtures. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27**, 896–903 (2013).
56. Błaszowski, J., Kozłowska, A., Crossay, T., Symanczik, S. & Al-Yahya'ei, M. N. A new family, Pervetustaceae with a new genus, *Pervetustus*, and *P. simplex* sp. nov. (Paraglomerales), and a new genus, *Innospora* with *I. majewskii* comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2017/0419 (2017).
57. Koske, R. E. & Gemma, J. N. Mycorrhizae and Succession in Plantings of Beachgrass in Sand Dunes. *American Journal of Botany* **84**, 118 (1997).
58. Daniels, B. A. & Skipper, H. D. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. Ed., N. C. Schenck. Amer. Phytopath. Soc. St. Paul, Minnesota. In: *Methods and Principles of Mycorrhizal Research* 29–35 (1982).
59. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
60. Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 772–780 (2013).
61. Guindon, S. *et al.* New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**, 307–321 (2010).
62. Tamura, K. & Nei, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512–526 (1993).
63. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* msw054, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054> (2016).
64. Ghosh, A. K. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 372–378 (2015).
65. Nonnemann, B., Tvede, M. & Bjarnsholt, T. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *APMIS* **121**, 871–877 (2013).

Acknowledgements

We are thankful to Dr Julien Colot, CHT (*Centre Hospitalier Territorial de Nouvelle-Calédonie, Medical Microbiology Laboratory, Nouméa, New Caledonia*), who provided access to his analytical facilities and his technician Benjamin De Georges. We would also like to thank Joël Michel and Nathalie Koszela at the International Bank for the Glomeromycota for their work providing the IBG isolates. The authors gratefully acknowledge CNRT “Nickel et son Environnement” for providing financial support for this study.

Author Contributions

T.C. designed the research, provided AMF cultures, prepared biological samples, conducted molecular and phylogenetic analysis, microscopy photographing and mass spectrometry, analysed data and wrote the manuscript; C.A. designed and supervised the research, conducted the mass spectrometry, analysed data and wrote the manuscript; D.R. contributed to the research supervision, provided AMF cultures, (SSU-ITS)-LSU sequences and wrote the manuscript; L.B. prepared biological samples and contributed to data analysis; N.C. contributed to mass spectrometry data collection; C.R. conducted the data analysis using R software and contributed to writing the manuscript; L.G. contributed to the research supervision in MALDI-TOF-MS; Y.C. contributed to the research supervision; H.A. supervised the research, provided the funding and wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14487-6>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Chapitre 4

Complémentarité des fonctions de différentes espèces de champignons mycorhiziens à arbuscules des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie, dans la croissance et l'adaptation des plantes

Introduction au Chapitre 4

Le travail réalisé dans ce chapitre correspond à l'objectif final de la thèse : tester l'hypothèse d'une complémentarité des fonctions des différents CMA au sein de la symbiose mycorhizienne. Dans cette optique, une expérimentation en serre a été mise en place : elle consiste à tester les effets individuels et combinés des différentes espèces isolées et identifiées dans le chapitre 2, en pot, sur un sol ultramafique. Deux expériences indépendantes ont été réalisées : une première sur *Sorghum vulgare*, utilisée comme plante modèle (cette espèce a une croissance relativement rapide et est une des plantes de culture courante, parmi les plus adaptées au sol ultramafique), une deuxième sur une plante endémique des sols ultramafiques de Nouvelle-Calédonie et utilisée en restauration écologique : *Metrosideros laurifolia*. L'objectif est d'analyser les effets combinés de différentes espèces de CMA appartenant à plusieurs familles, afin de vérifier s'il existe une complémentarité de leurs influences dans l'amélioration de la croissance, de la nutrition, de la tolérance aux métaux et du rapport Ca/Mg chez chacune des deux plantes testées, sur sol ultramafique. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article. Cependant l'article n'est pas encore soumis et nécessite encore un travail de finalisation.

The combination of several native arbuscular mycorrhizal isolates belonging to different taxa, in the same *inoculum*, improve the efficiency of mycorrhizal symbiosis of two plant species growing on a New Caledonian ultramafic soil

Abstract

Recently, 5 new species and one isolate of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from a New Caledonian ultramafic soil were described: *Acaulospora saccata*, *A. fragilissima*, *Scutellospora ovalis*, *Rhizophagus neocaledonicus*, *Pervetustus simplex* and a *Claroideoglossum etunicatum* isolate (*C. etunicatum nc*). AMF communities were established in pots using the native isolates of the cited taxa, and two host plant species, *M. laurifolia* and *S. vulgare* in ultramafic soil. In this study we investigated if AMF taxa diversity is correlated with an improvement of plant fitness in ultramafic soil. Our results suggest that, when plant faced multiple stress factors, the use of AMF mix with different families for plant inoculation is more performant than mono-inoculation to improve biomass, mineral nutrition, Ca/Mg ratio and tolerance to heavy metal of plants in ultramafic soil. The combination of different AMF taxa seemed to induce a complementation in their effects, each isolate having abilities which differs somewhat from others.

Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are obligate symbionts having a huge potential as biological fertilizer for plants (Berruti *et al.*, 2016). AMF improve plant growth by different mechanisms, including increased mineral nutrition (Subramanian *et al.*, 1999 ; Hawkins *et al.*, 2000 ; Harrison *et al.*, 2002 ; Hamel *et al.*, 2004 ; Toussaint *et al.*, 2004 ; Helgason *et al.*, 2005 ; Tanaka *et al.*, 2005 ; Feddermann *et al.*, 2010), enhanced tolerance to pathogen (Abu-Zeyad *et al.*, 1999 ; St-Arnaud *et al.*, 2007; Pozo & Azcon-Aguilar 2007 ; Hartley & Gange 2009; Vannette & Hunter 2009; Shrivastava *et al.*, 2015) or increased abiotic stress tolerance (Augé, 2001; Ruiz-Lozano, 2003 ; Ruiz-Lozano & Aroca 2010 ; Barzana *et al.*, 2012, 2015; Ruiz-Lozano *et al.*, 2012 ; Amir *et al.*, 2013 ; Calvo-Polanco *et al.*, 2014, 2015; Augé *et al.*, 2015, 2016 ; Ferol *et al.*, 2016). However, the effects of AMF on plant growth are highly variable within fungal genera and even among isolates within species, as well as among plant taxa (Koch *et al.*, 2017) and it is still unclear how variation in plant responsiveness to mycorrhizal colonization is regulated (Van der Heijden *et al.*, 2015). One of

the main challenges in AMF research is to know how the taxonomic diversity of AMF is related to their efficiency to promote plant growth and adaptation. The answer to this question is essential for the conception and production of effective *inoculum* for the large-scale use of AMF in the fields in agronomic and environmental context.

A recent review showed that the effect of biodiversity of AMF taxa depended on taxonomic resolution (Yang *et al.*, 2017). Some studies reported that plant performance was positively promoted by AMF family richness. No effect was found for fungal species richness and a negative effect was found for AMF phylogenetic diversity (Maherali & Klironomos 2007; Powell *et al.*, 2009). This pattern can be explained by competition and functional conservatism within AMF families and functional differentiation among AMF families (Thonar *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017). Finally, Yang *et al.* (2017) concluded that conservation of AMF communities is essential to maintain a full complement of ecosystem functions and required the presence of diverse families and not simply diverse species within a family. This finding may be of key importance for the function of ecosystems under various environmental perturbations to which AMF families may respond differently. Another study (Gosling *et al.*, 2015) showed that there are no beneficial effects in inoculating different AMF species with different traits when the host plant is exposed to a single stress, because only some of these species of AMF are able to lift stress. Gosling *et al.* (2015) concluded that the failure to show a benefit from high AM fungal diversity in their study and other studies may be the result of experimental conditions, with the benefits of AMF diversity only becoming apparent when the host plant faced with multiple stress factors. These studies also highlight the fact that in extreme environments, with several stress factors for the plant, inoculation of several species among different family of AMF is probably essential, but the different AMF species need to be compatible with each other and therefore native from the same ecosystem (Gosling *et al.*, 2015; Berruti *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2017).

In New Caledonia, serpentine ecosystems which have developed over ultramafic rocks (peridotites, serpentinites) cover one third of the surface area of the main island called Grande Terre. The originality of these ecosystems, where plant endemism levels reach 82 %, is not only due to their geographic isolation, but also to the adaptation of communities to strong edaphic constraints (Jaffré & L'Huillier 2010). The stripping of large areas, for the purpose of nickel mining, endangers New Caledonian ultramafic ecosystems. Ecological restoration of degraded mine sites is therefore a major concern in New Caledonia. Improvement of currently used techniques for revegetation (Luçon *et al.*, 1997) requires a good understanding of the

role of mycorrhizal associations involved in ultramafic soils (Smith & Read 2008; Graham, 2009). Previous studies on New Caledonian ultramafic *maquis* have highlighted that nearly all plant species are arbuscular mycorrhizal (Amir *et al.*, 1997; Perrier *et al.*, 2006), including Ni-hyperaccumulating plants (Amir *et al.*, 2007) and species of Cyperaceae and Proteaceae, two families generally considered as non-mycorrhizal (Amir *et al.*, 1997; Perrier *et al.*, 2006; Amir & Ducouso 2010; Lagrange *et al.*, 2011). AMF isolates from ultramafic soils have been found to be highly tolerant to Ni (Amir *et al.*, 2008). The ultramafic soils present three main constraints to plant growth (Brook, 1987; Kazakou *et al.*, 2008). The first concerns is the very low (<1) Ca/Mg ratio, which can lead to Ca deficiency in plants. A second major constraint is the limitation of nutrients in these soils, due to a low level of organic matter, but also to parental material often deficient in K and P. Limiting nutrients can vary, with gaps in N, K or P, but in any case, lead to very low growth rate of plants and often a low response to the addition of nutrients. The last important constraint concerns high concentrations of heavy metals Ni, Co, Cr, and Mn (Brooks, 1987; Jaffré & L’Huillier 2010). These heavy metals are generally phytotoxic to plants. In ultramafic ecosystem AMF can have a great importance for improved acquisition of nutrients in plants, reduced heavy metal content in plants tissues and enhanced Ca/Mg ratio by improved assimilation of Ca and reduced Mg assimilation in plants tissues (Gensous, 2014 ; Orłowska *et al.*, 2011; Doubkova *et al.*, 2013). Therefore, AMF can improve plant adaptation to the three major constraints present in ultramafic soils and native AMF are potentially a good target to be used as plant growth promoters for ecological restoration of mine degraded areas.

Recently 5 new species and one isolate of AMF from ultramafic soil of New Caledonia were described: *Acaulospora saccata*, *A. fragilissima*, *Scutellospora ovalis*, *Rhizophagus neocaledonicus*, *Pervetustus simplex* (Błaszowski *et al.*, 2017; Crossay *et al.*, 2018) and a *Claroideoglossum etunicatum* isolate (*C. etunicatum nc*) were found in the same site (Crossay *et al.*, 2017). In this study we tested different combined inoculations of 6 isolates of these native AMF species belonging to five different families on growth and adaptation of two different plants species: *Metrosideros laurifolia* an endemic myrtaceae used in restoration programs; *Sorghum vulgare*, as plant model. We aimed to investigate the following questions: i) are combinations of different taxa isolates more efficient than individual ones to improve plant adaptation to the three physico-chemical stress factors (low P, N and K, low Ca/Mg ratio and high levels of heavy metals)? ii) what level of taxa combination induce the better level of adaptation? iii) what complementation of parameters

can explain the observed positive effects of AMF inoculation on plant growth and adaptation to ultramafic soils ?

Material and methods

To test for variation of plant growth and adaptation to ultramafic soils induced by different combinations of AM fungal taxa, we set up two experiments in a glasshouse using 6 AM fungal species and two host species. The experiments were conducted between January and September 2017.

AM fungi

To compare interspecific functional variability of AM fungi isolated from New Caledonian ultramafic soils, we used 6 isolates belonging to 6 different species affiliated to three orders (Diversisporales, Glomerales and Paraglomerales), five families (Acaulosporaceae, Gigasporaceae, Glomeraceae, Claroideoglomeraceae and Pervertustaceae) and five genera (*Acaulospora*, *Scutellospora*, *Rhizophagus*, *Claroideoglobus* and *Pervetustus*). Two species belong to the genus *Acaulospora* (*A. saccata*, *A. fragilissima*); one belongs to the genus *Scutellospora* (*S. ovalis*), another to the genus *Rhizophagus* (*R. neocaledonicus*). The other species belong to the genera *Claroideoglobus* (*C. etunicatum nc*) and *Pervetustus* (*Pervetustus simplex nc*). The origin and taxonomic description and affiliation of each isolate are fully described (Blaszkowski *et al.*, 2017; Crossay *et al.*, 2018); all these AMF were isolated from rhizospheric soil in tropical ultramafic *maquis* in New-Caledonia (Plum area: 22°16'S, 166°38'E). *Inoculum* of each isolate was obtained from LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement), and were grown using the “cone-tainer technique” (Koske and Gemma 1997; <https://invam.wvu.edu/methods/cultures/single-species-cultures>) as explained in Crossay *et al.*, 2018. *Inocula* consisted of ultramafic soil of single species culture (soil, roots, and spores). The substrate of each pure culture was verified for the presence of viable AM fungal spores of the correct morphotype and stored at 4°C until use.

Host plants

We choose two host plant species which differed in growth form in order to test for variation in plant responsiveness to mycorrhizas: an herbaceous monocotyledon used as plant model,

poorly adapted to ultramafic soil, but able to grow in it: *Sorghum vulgare*; and a woody myrtaceae endemic to the New-Caledonian ultramafic areas: *Metrosideros laurifolia*. The seeds of *Metrosideros laurifolia* were provided by SIRAS Pacifique, Noumea and seeds of *Sorghum vulgare* were provided by Cooperative Centrale Agricole, Noumea.

Substrate

The soil used in greenhouse experiments is a colluvial lateritic soil with following characteristics: coarse sand, 39.4 %; fine sand, 22.1 %; silt-clay, 37.2 %; pH H₂O, 5.9; pH KCl, 5.6; total C, 42.1 g kg⁻¹; total N, 2.2 g kg⁻¹; total P, 147 mg kg⁻¹; available P (Mehlich), 3 mg kg⁻¹; total Ca, 1.06 g kg⁻¹; total Mg, 5.08 g kg⁻¹; Ca/Mg, 0.207; total Ni, 4.78 g kg⁻¹; DTPA extractable Ni, 91.4 mg kg⁻¹; DTPA extractable Co, 71.0 mg kg⁻¹; DTPA extractable Cr, 0.5 mg kg⁻¹; DTPA extractable Mn, 864.8 mg kg⁻¹. This soil was sampled in New Caledonian ultramafic *maquis* in Plum area (22°16'S, 166°38'E). As plant growth in this pure ultramafic soil was very slow, a mixture of 80 % ultramafic soil and 20 % commercial compost (v/v) was used. The soil was first autoclaved three times at 120 °C for 1 h, with an interval of 24 h, to eliminate microorganisms.

Inoculum and treatments

Plants were inoculated separately with *inocula* of each species consisting of 20 g of mixture of rhizosphere soils containing homogenized spores, mycelium and colonized root fragments of each single species culture (6 treatments one for each AMF species). All fungal mixtures were prepared by using equal weight of the pure soil *inocula*, so that each mixture *inoculum* consisting of 20 g of *inoculum*. Uninoculated control treatments were equally prepared. Each pot also received 1 ml of a microbial filtrate. This was obtained from a mixture of 20 g of all different AM fungal *inocula* used in the experiment, suspended in 2 l of sterile water and passed through a 20 µm mesh. The six mixtures treatments were set up as follow: *R. neocaledonicus*, *C. etunicatum nc* (Mix 1); *R. neocaledonicus*, *S. ovalis* (Mix 2); *R. neocaledonicus*, *S. ovalis*, *P. simplex nc* (Mix 3) ; *R. neocaledonicus*, *C. etunicatum nc*, *A. fragilissima*, *P. simplex* (Mix 4) ; *R. neocaledonicus*; *C. etunicatum nc*, *A. saccata*, *S. ovalis*, *P. simplex* (Mix 5); *R. neocaledonicus*, *C. etunicatum nc*, *A. fragilissima*, *A. saccata*, *S. ovalis*, *P. simplex* (Mix 6). Mixture treatments Mix 2 and Mix 5 were not done for greenhouse experiments with *Sorghum vulgare*. Ten replicate pots for each AM fungal species (6 species)

and for each combination (6 for *M. laurifolia* and 4 for *S. vulgare*) and 10 non-mycorrhizal controls (NMCs) were set up. These treatments were set up for each host plant species for a total of 240 pots.

Inoculation procedures and growth conditions

The mycorrhizal *inocula* (20 g) were spread as a layer on the surface of the substrate in the pots and covered with a thin layer of the substrate. For each treatment and each species of plant, ten pots cultures (1L) were established. Pots were filled with 0.85 kg of an autoclaved substrate. Seeds of *S. vulgare* and *M. laurifolia* were surface-disinfected in a 1.25 % solution of sodium hypochlorite (12° chlorometric) for 15 min, and then rinsed with distilled water in sterilized Petri dishes. The seeds were subsequently sown in sterilized vermiculite (autoclaved for 60 min; at 120 °C) before transfer to experimental pots. One-week-old AMF-free plantlets of *S. vulgare* was removed from the vermiculite and planted in every experimental pot. Three-month-old AMF-free plantlets of *M. laurifolia* were equally removed from the vermiculite and planted in every experimental pot. The cultures were kept in a greenhouse (temperature, 21-24°C; relative humidity, 70%) for 5 months for *S. vulgare* and for 8 months for *M. laurifolia* and irrigated manually every two days.

Harvesting procedures

Plant height and number of flowers (only for *S. vulgare*) were measured all along experiments. Height of the main stem was measured in centimeters from the soil level to the tip of the stem. After 5 months for sorghum and after 8 months for *M. laurifolia*, the plants were harvested, roots were removed from the soil by washing, and shoots and roots separated. Approximately 300 mg for each plant of fresh roots was retained for quantification of colonization and approximately 50 mg of fresh roots of each plant were pooled per treatments and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for molecular analyses. The rest of plants were weighed, dried at 60 °C for 74 h and re-weighed.

Quantification of AMF colonization in roots

The sub-sample of fresh roots was stained with blue trypan according to Phillips and Hayman (1970) and Błaszczowski (2006): tissue acidification was performed using 20 % hydrochloric acid instead of 1 % and blue trypan concentration was 0.1 % instead of 0.05%. AM fungal

colonization of 30 roots fragments per pot was quantified using the method of estimation of mycorrhizal colonization according to Trouvelot *et al.* (1986).

AMF spore extraction and quantification

A subsample of substrate from each pot was air-dried to quantify spore abundance of each species. Spores were extracted by wet sieving and sucrose density gradient centrifugation, using a modified method from Daniels and Skipper (1982). For each pot culture, 10 g of dried soil were wet sieved, then around 10 mL of harvested soil were well suspended in 20 mL of water in a 50 mL Falcon tube. A 25-mL sucrose solution (70% v/w) was injected to the bottom of the tube; forming a stepped density gradient that was centrifuged at 900g for 3 min. Spores of AMF were collected from the interface of sucrose solution, washed with tap water on a 36 µm sieve for 2 min, and transferred to a 50 mL Falcon tube with 10 mL of water. Finally, Falcon tube was vortexed and 10 successive aliquots of 100 µL were immediately transferred into a Petri dish to counted and identified spores under a stereomicroscope. Spores were estimated per gram of soil for each pot.

Identification of AMF with molecular markers

The partial 18S-5.8S-partial 28 S region of nuclear rRNA or the partial 28 S region of each species were obtained from Genbank (Crossay *et al.*, 2017a, 2018). Using the sequence information, we designed the primer pairs to specifically amplify each species of AMF.

DNA extracts from spores of each species were used to cross check that the specific primers only amplified the targeted species. One to three spores of each species from the single species cultures on *S. vulgare* were crushed using a pipette tip in a 1.5 Eppendorf tube containing 10 µl of ultrapure water, 2 µl was used for polymerase chain reaction (PCR). DNA fragment of around 1,545 bp, covering partial SSU, the whole ITS and the variable D1 and D2 regions of the LSU, was amplified by the AMF-specific primers developed by Krüger *et al.* (2009). In the first round of PCR, the primers SSUmAf and LSUmAr were used. In the second, nested round of PCR, the specific primers (Table 1) were used with 1 µl of the first PCR round product as a template. The PCR mix included 0.4 U of AmpliTaq® 360 DNA polymerase (Applied Biosystems), 1X AmpliTaq® 360 PCR buffer (Applied Biosystems), 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer and 1µl of the template in a final volume of 25 µl. The cycling parameters for the first PCR were: 3 min at 98°C followed by 35 cycles of 10 s at 185

98°C, 30 s at 60°C, and 1min at 72°C. The program was concluded by a final extension phase of 10 min at 72°C. The cycling parameters for the second PCR were: 3 min at 98°C followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, and 40 s at 72 °C. The program was concluded by a final extension phase of 7 min at 72°C. The amplified DNA fragments were visualized on a 1% (w/v) agarose gel in TBE buffer to ensure that the specific primers amplify only the target species.

DNA extracts of one sample of roots (100 mg) for each treatment was performed with the FastDNA[®] Spin Kit for plant (MP Biomedicals, Solon, OH) according to manufacturer's instructions. The primers were used (separately for each species) in a nested PCR for polymerase chain reaction (PCR). The first PCR were performed as explain above with primers SSUmAf and LSUmAr and the second PCR were performed as explain above with species specific primers (Table 1). The amplified DNA fragments were visualized on a 1% (w/v) agarose gel in TBE buffer.

When a weak amplification or no amplification is obtained we performed a third nested PCR (Jansa *et al.*, 2003). In this case the primers SSUmAf and LSUmAr and SSUmCf and LSUmBr were used for the first and the second PCR respectively. For the second, nested round of PCR, the primer SSUmCf and LSUmBr were used with 1 µl of the first PCR round product as a template. The PCR mix included 0.4 U of AmpliTaq[®] 360 DNA polymerase (Applied Biosystems), 1X AmpliTaq[®] 360 PCR buffer (Applied Biosystems), 0.2 mM of each dNTP, 0.4 µM of each primer and 1µl of the template in a final volume of 25 µl. The cycling parameters for the second PCR were the same as in the first PCR (see above) except for annealing temperature (63°C). The second PCR product (1µL) was used as template for the third reaction with specific primers (Table 1). PCR conditions are similar to that described above.

Table 1. Specificity and length of the expected fragment with primers developed for identification of AM fungi in plant roots.

| Primer name | DNA sequence in 5' -end to 3' -end orientation | T _m °C | Targeted specificity | Product length base pair |
|------------------|--|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Glom_LSU_990F | AACAAGTACCGTGAGGGAAAG | 59 | <i>A. saccata</i> | 334 pb |
| AcS-LSU_1300R | GCTTGCTAACGTCGATGGGA | 60 | | |
| Glom_LSU_990F | AACAAGTACCGTGAGGGAAAG | 59 | <i>A. fragilissima</i> | 336 pb |
| AcF-LSU_1300R | TAGCAAGCTATCGAAGACGGGG | 64 | | |
| RhN-SSU_100F | GATCGGTGAGTAGCAATATTCG | 60 | <i>R. neocaledonicus</i> | 242 pb |
| Glom_LSU_58S280R | AACAAGTACCGTGAGGGAAAG | 58 | | |
| CIS-SSU_70F | GATCGGTGAGTAGCAATATTCG | 60 | <i>C.etunicatum nc</i> | 258 pb |
| Glom_LSU_58S280R | AACAAGTACCGTGAGGGAAAG | 58 | | |
| PaM-SSU_70F | CTGATTGAGCGAACGGTCAC | 65 | <i>P. simplex nc</i> | 288 pb |
| Glom_LSU_58S280R | AACAAGTACCGTGAGGGAAAG | 58 | | |
| ScC_Ssu_100F | TCGCGGAAGCCTTAACCGGC | 65 | <i>S. ovalis</i> | 212 pb |
| Glom_LSU_58S280R | AACAAGTACCGTGAGGGAAAG | 58 | | |

Mineral analyses of plants

Aliquots of dried plant tissues (shoot or root) were collected for mineral analyses, which were performed by ICP-OES as reported in Perrier et al. (2006 a, b) and by CHN, mass spectrometry using an Integra2 spectrometer (Sercon Instruments, www.sercongroup.com) linked to a Sercon elemental analyzer. All elements analyses (Ca, Mg, K, P, Na, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, N, C) were performed by L. Jamet and all the staff of the Laboratoire des Moyens Analytiques (LAMA) from Centre IRD de Nouméa, New Caledonia.

Statistical analysis

Normality and equality of variance were analyzed using Shapiro and Levene tests, respectively. Following results, either a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test was applied to identify differences ($p \leq 0.05$), between treatments. This method was applied independently for each plant species and each variable. All statistical analysis was performed using R software version 3.3.1 (R Development Core Team, 2008) with the 'agricolae' package. Mean of biomass, mycorrhizal intensity and sporulation are necessary to perform Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Classification on Principal Component (HCPC) with root and shoot element concentrations. PCA and HCPC were performed with 34 variables using R software with the

'FactoMineR' package. HCPC used euclidian distances for calculating dissimilarities between observations and average method to define cluster.

Results

Summarized plant growth data are presented in Fig. 1. Full data are accessible in Supplementary Table S1 and S2 and Fig. S1 and S2. For both species, general AMF effect was significant at 60 and 120 days after inoculation respectively for *S. vulgare* (H=28.1; $p<0.05$) and *M. laurifolia* (H=55.5; $p<0.05$).

In *M. laurifolia*, all AMF treatments are significantly higher than controls from 186 days to the end of experiment (Table S1). Whereas on *S. vulgare*, only *R. neocaledonicus* and mix inoculations 3, 4 and 6 induced significant growth enhancements, from 78 days to the end of experiment (excepted mix 6, significantly only at the end).

During experiment some plants of *S. vulgare* produced flowers. Flowers were produced only with AMF treatments: *C. etunicatum* (1 plant), *R. neocaledonicus* (7 plants), Mix 3 (7 plants), Mix 4 (3 plants) and Mix 6 (3 plants). During these experiments some plants died. In *M. laurifolia* only one control plant and in *S. vulgare* one control plant, 4 plants for *A. fragilissima* treatment, 5 plants for *A. saccata* treatment and one plant for Mix 2 treatment.

In *M. laurifolia* the biomass was significantly enhanced with an increase of shoot dry weight (H=90,70; $p<0.05$) by 4.9× (*A. saccata*) to 21.6× (Mix 5) (except for treatments *A. fragilissima* and *S. ovalis*) and an increase of root dry weight (H=73,7; $p<0.05$) by 1.5× (*S. ovalis*) to 11.9× (Mix 5) (except for plants inoculated with *A. fragilissima*); in *S. vulgare* the plant shoot dry weight was significantly enhanced by 1.2× (Mix 6) to 3× (Mix 3) and the root dry weight by 1.9× (Mix 6) to 3.4× (Mix 3) (except for plants inoculated with *A. fragilissima*, *A. saccata*, *C. etunicatum*, *P. simplex* and *S. ovalis*), all when compared with controls.

Frequency, intensity of mycorrhization and percentage of arbuscules were analyzed in roots of plants. Results are summarized in Fig. 2. Full data are accessible in Supplementary Table 3. All plants excepted controls were colonized by AMF, a weak colonization was recovered for *Acaulospora* species and *S. ovalis* on the root of the two plants species. For *S. vulgare*, mycorrhizal colonization of *P. simplex* was equally weak. For *M. laurifolia* mycorrhizal colonization was > 80% for all Mix inoculum and for mono-inoculation with *R.*

neocaledonicus; a similar pattern was observed for *S. vulgare*: mycorrhizal colonization was > 40% for all *Mix inoculum* and for mono-inoculation with *R. neocaledonicus*.

Spores of all species inoculated alone or combined were recovered after plants growth in soils of pot culture (Table. 2). *Rizophagus neocaledonicus* produced more spores than other species with an average of 23.5 ± 4 and 92.4 ± 8.1 spores per g^{-1} of dry soil for *M. laurifolia* and *S. vulgare* respectively. The maximum averages of spores were recovered for the AMF treatment Mix 2 with 79.2 ± 19 spores per g^{-1} of dry soil (74.5 ± 18.1 spores of *R. neocaledonicus* and 4.7 ± 0.7 spores of *S. ovalis*) and the AMF treatment Mix 3 with 200 ± 31 spores per g^{-1} of dry soil (29.2 ± 4.6 spores of *P. simplex*, 3.2 ± 0.4 spores of *S. ovalis* and 167.6 spores of *R. neocaledonicus*) for *M. laurifolia* and *S. vulgare* respectively.

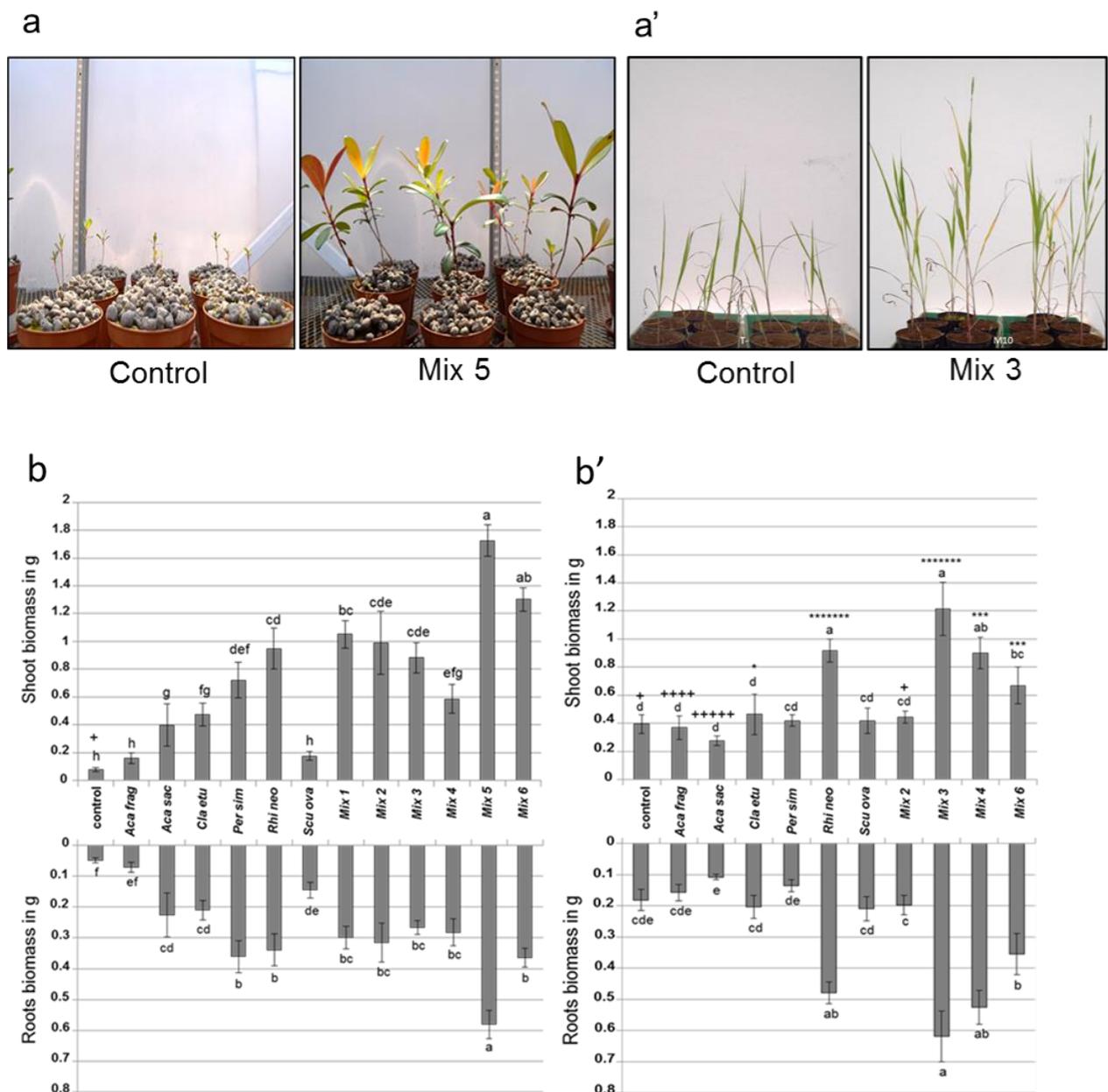


Fig. 1. *Metrosideros laurifolia* (a) and *Sorghum vulgare* (a') (control versus treatment mix 5 and mix 3 respectively for *M. laurifolia* and *S. vulgare*) after 7 months of growth on ultramafic substrate and 4 months respectively for *M. laurifolia* and *S. vulgare*. The biomass of their respective shoot and root (b: *M. laurifolia* and b': *S. vulgare*) were measured as dry weight tissue expressed in g. Each dead plant was represented with “+” and each flowering plant was represented with “*”. Bars represent means, and error bars represent standard error of means (n= 10 excepted for treatment with dead plants). The different letters above columns indicate significant differences as determined by a Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test ($p \leq 0.05$).

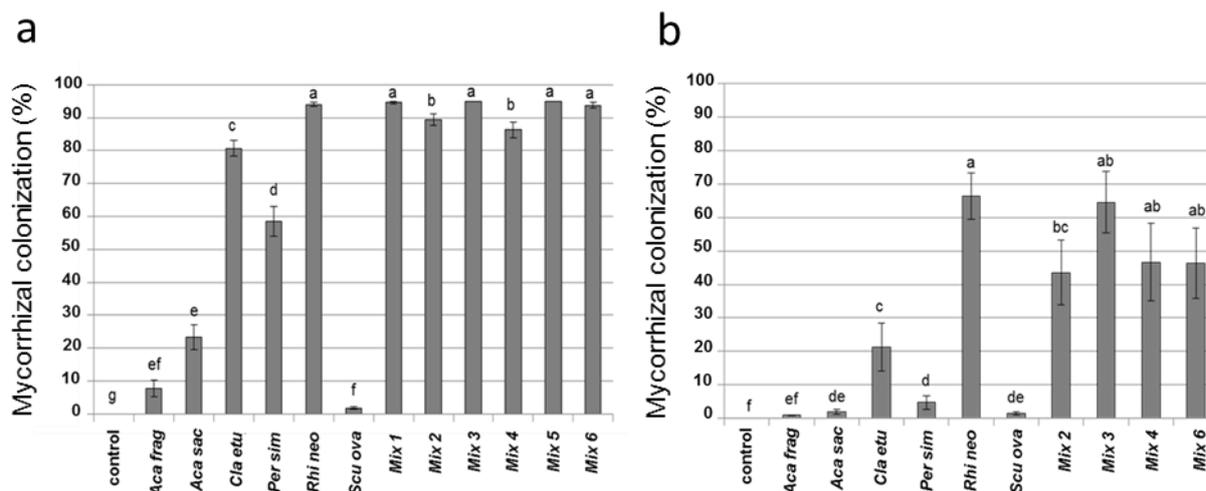


Fig. 2. *Metrosideros laurifolia* (a) and *Sorghum vulgare* (b) mycorrhizal colonization for each fungal treatment after 8 months of growth on ultramafic substrate for *M. laurifolia* and 5 months for *S. vulgare*. Bars represent means, and error bars represent standard error of means (n= 10 excepted for treatment with dead plants). The different letters above columns indicate significant differences as determined by a Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test ($p \leq 0.05$).

Primers developed for molecular approach were validated on pure spores DNA extract of all species excepted for *S. ovalis* (Table 3). In mono-inoculation all species were detected by PCR on roots of *M. laurifolia* and *S. vulgare* excepted for plants inoculated with *S. ovalis*. Curiously in fungal treatments Mix 3 and 6, *S. ovalis* was detected in roots of *M. laurifolia* with primers who failed to amplify DNA from spores. In Mix 1 the two species *C. etunicatum* and *R. neocaledonicus* were detected by PCR in roots of *M. laurifolia*. In Mix 2 only *R. neocaledonicus* was detected in roots of *M. laurifolia* and *S. vulgare*. In Mix 3 all species were detected in roots of *M. laurifolia*, whereas only *P. simplex* was detected in roots of *S. vulgare*. In Mix 4 only *C. etunicatum* was detected in roots of *M. laurifolia* whereas *C. etunicatum* and *P. simplex* were detected in roots of *S. vulgare*. In Mix 5 *R. neocaledonicus* and *S. ovalis* were not detected in roots. In Mix 6 all species were detected in roots of *M. laurifolia* whereas only *A. fragilissima*, *C. etunicatum* and *P. simplex* were detected in roots of *S. vulgare*.

Plant mineral nutrition analyses

The major elements needed for plant nutrition (*i.e.* N, P, K, Ca and Mg contents) were analyzed in shoots and roots of inoculated and control plants exposed to the ultramafic substrate. Results are summarized in Fig. 3 while full data are reported in Supplementary Table 4. The presence of AMF in roots of the two plants significantly affected major element contents in shoot and roots tissues when compared with controls.

Table 2. AMF spore production in soil (spore number in 1 g of soil) for each fungal treatment on *M. laurifolia* and *S. vulgare*. Means, and error of means were presented (n= 10 excepted for treatment with dead plants). The different letters indicate significant differences differences as determined by a Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test ($p \leq 0.05$).

| Plant | Treatments | Spores per gramm of dry soil | | | | | |
|--------------------------------|-----------------|------------------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|------------------|
| | | <i>A. fragilissima</i> | <i>A. saccata</i> | <i>C. etunicatum nc</i> | <i>P. simplex nc</i> | <i>R. neocaledonicus</i> | <i>S. ovalis</i> |
| <i>Metrosideros laurifolia</i> | Control | 0 b | 0 d | 0 e | 0 d | 0 d | 0 e |
| | <i>Aca fra</i> | 8.1±2.9 a | 0 d | 0 e | 0 d | 0 d | 0 e |
| | <i>Aca sac</i> | 0 b | 11±0.9 a | 0 e | 0 d | 0 d | 0 e |
| | <i>Cl a etu</i> | 0 b | 0 d | 14.2±3.3 b | 0 d | 0 d | 0 e |
| | <i>Per sim</i> | 0 b | 0 d | 0 e | 6±0.6 ab | 0 d | 0 e |
| | <i>Rhi neo</i> | 0 b | 0 d | 0 e | 0 d | 23.5±4 b | 0 e |
| | <i>Scu ova</i> | 0 b | 0 d | 0 e | 0 d | 0 d | 3.5±0.4 b |
| | <i>Mix 1</i> | 0 b | 0 d | 28.3±2.8 a | 0 d | 25.5±2.5 b | 0 e |
| | <i>Mix 2</i> | 0 b | 0 d | 0 e | 0 d | 74.5±18.1 a | 4.7±0.7 a |
| | <i>Mix 3</i> | 0 b | 0 d | 0 e | 6.4±1.3 b | 37±6.7 ab | 3.6±0.3 ab |
| | <i>Mix 4</i> | 4.7±0.5 a | 0 d | 4.7±0.6 d | 2.8±0.2 c | 12.1±0.6 c | 0 e |
| | <i>Mix 5</i> | 0 b | 2.3±0.2 c | 8.6±0.7 c | 8.4±1 a | 29.2±5.3 b | 2±0.1 d |
| | <i>Mix 6</i> | 3.9±0.3 a | 4.4±0.4 b | 17.5±3.02 b | 5.2±0.5 b | 24.5±3.1 b | 2.5±0.2 c |
| <i>Sorghum vulgare</i> | Control | 0 c | 0 c | 0 b | 0 d | 0 d | 0 c |
| | <i>Aca fra</i> | 10.3±3.3 a | 0 c | 0 b | 0 d | 0 d | 0 c |
| | <i>Aca sac</i> | 0 bc | 2.2±1 a | 0 b | 0 d | 0 d | 0 c |
| | <i>Cl a etu</i> | 0 c | 0 c | 14.9±2.7 a | 0 d | 0 d | 0 c |
| | <i>Per sim</i> | 0 c | 0 c | 0 b | 15.6±6.2 b | 0 d | 0 c |
| | <i>Rhi neo</i> | 0 c | 0 c | 0 b | 0 d | 92.4±14.8 a | 0 c |
| | <i>Scu ova</i> | 0 c | 0 c | 0 b | 0 d | 0 d | 3±0.5 ab |
| | <i>Mix 2</i> | 0 c | 0 c | 0 b | 0 d | 24.4±8.5 b | 2.5±0.4 ab |
| | <i>Mix 3</i> | 0 c | 0 c | 0 b | 29.2±4.6 a | 167.6±28.3 a | 3.2±0.4 a |
| | <i>Mix 4</i> | 2.1±0.4 a | 0 c | 12.3±1.1 a | 3.9±0.5 c | 7.7±1 c | 0 c |
| | <i>Mix 6</i> | 1.3±0.9 b | 3.3±1.9 b | 34.3±9.7 a | 14.2±4.3 b | 32.7±9.5 b | 2.4±0.5 b |

Table 3. Detection of AMF by PCR on pure spores and on roots of *M. laurifolia* and *S. vulgare*. Positives detections were labelled with “+”, negatives detections were labelled with “-”, grey squares indicate when species were detected in soil (spores) by morphological analysis and were not recovered by PCR in roots.

| | | Targeted species forward and reverse primers | | | | | |
|--------------------------------|----------------|--|-------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|------------------|
| | | <i>A. fragilissima</i> | <i>A. saccata</i> | <i>C. etunicatum nc</i> | <i>P. simplex nc</i> | <i>R. neocaledonicus</i> | <i>S. ovalis</i> |
| | | Glom_LSU_990F | Glom_LSU_990F | CIS-SSU_70F | Glom_LSU_585280R | RhN-SSU_100F | ScC_SSU_100F |
| | | AcS-LSU_1300R | AcS-LSU_1300R | Glom_LSU_585280R | PaM-SSU_70F | Glom_LSU_585280R | Glom_LSU_585280R |
| Spores | <i>Aca fra</i> | + | - | - | - | - | - |
| | <i>Aca sac</i> | - | + | - | - | - | - |
| | <i>Cla etu</i> | - | - | + | - | - | - |
| | <i>Per sim</i> | - | - | - | + | - | - |
| | <i>Rhi neo</i> | - | - | - | - | + | - |
| | <i>Scu ova</i> | - | - | - | - | - | - |
| Roots Plants | Treatments | | | | | | |
| <i>Metrosideros laurifolia</i> | Control | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Aca fra</i> | + | - | - | - | - | - |
| | <i>Aca sac</i> | - | + | - | - | - | - |
| | <i>Cla etu</i> | - | - | + | - | - | - |
| | <i>Per sim</i> | - | - | - | + | - | - |
| | <i>Rhi neo</i> | - | - | - | - | + | - |
| | <i>Scu ova</i> | - | - | - | - | - | - |
| | Mix 1 | - | - | + | - | + | - |
| | Mix 2 | - | - | - | - | + | - |
| | Mix 3 | - | - | - | + | + | + |
| | Mix 4 | - | - | + | - | - | - |
| | Mix 5 | - | + | + | + | - | - |
| Mix 6 | + | + | + | + | + | + | |
| <i>Sorghum vulgare</i> | Control | - | - | - | - | - | - |
| | <i>Aca fra</i> | + | - | - | - | - | - |
| | <i>Aca sac</i> | - | + | - | - | - | - |
| | <i>Cla etu</i> | - | - | + | - | - | - |
| | <i>Per sim</i> | - | - | - | + | - | - |
| | <i>Rhi neo</i> | - | - | - | - | + | - |
| | <i>Scu ova</i> | - | - | - | - | - | - |
| | Mix 2 | - | - | - | - | + | - |
| | Mix 3 | - | - | - | + | - | - |
| | Mix 4 | - | - | + | + | - | - |
| Mix 6 | + | - | + | + | - | - | |

In shoot tissues of *M. laurifolia*, significant reduction of N content from 16% (Mix 2) to 40% (Mix 5) was observed. Only mono-inoculation with *R. neocaledonicus* and Mix 2, 3, 4, 5, 6 decreased N content in shoot tissues of *M. laurifolia* whereas significant diminution of N content in root tissues from 19% (Mix 1) to 34% (Mix 4) was observed. Only mono-inoculation with *A. saccata* and Mix 1, 2, 3, 4, 5, 6 reduced N content in tissues of roots of *M. laurifolia*; in other treatments N content of *M. laurifolia* was not significantly different when compared with controls. In shoot tissues of *S. vulgare*, significant diminution of N content from 62% (Mix 3) to 75 % (*R. neocaledonicus*) was observed. Only mono-inoculation with *R. neocaledonicus* and Mix 3, 4 decreased N content in shoot tissues of *M. laurifolia*, whereas significant diminution of N content in root tissues from 23% (*P. simplex*) to 28% (Mix 4) was observed. Only mono-inoculation with *P. simplex* and Mix 3, 4 decreased N content of roots of *S. vulgare* ; in other treatments N content of *S. vulgare* was not significantly different when compared with controls.

In shoot tissues of *M. laurifolia* P assimilation was significantly enhanced from 23% (Mix 5) to 37% (Mix 2). Only mix-inoculation (Mix 1, 2, 3, 5, 6) enhanced P content in shoot tissues of *M. laurifolia* whereas significant reduction of P content in root tissues, from 49% (*A. fragilissima*) to 58% (*A. saccata*), was observed. Mono-inoculation with *A. fragilissima*, *A. saccata*, *C. etunicatum* and Mix 4 significantly reduced P content of roots of *M. laurifolia*; in other treatments P content of inoculated *M. laurifolia* was not significantly different when compared with controls. In shoots of *S. vulgare*, for all treatments, P assimilation was not

significantly different when compared with controls. P content was significantly enhanced in root tissues of *S. vulgare* with *R. neocaledonicus* (18%).

In shoots tissues of *M. laurifolia* K assimilation was significantly enhanced from 20% (*A. saccata*) to 27% (Mix 2). Mix-inoculation (Mix 1, 2, 3, 4, 5, 6) and mono-inoculation with *A. saccata* and *R. neocaledonicus* significantly enhanced K content in shoot tissues of *M. laurifolia* whereas significant enhancement of K content in root tissues from 18% (Mix 3) to 32% (Mix 2) was observed. All mix-inoculations excepted Mix 4 significantly enhanced K content in root tissues of *M. laurifolia*; in other treatments K content in root tissues of *M. laurifolia* was not significantly different when compared with controls. In shoots of *S. vulgare*, for all treatments K assimilation was not significantly different when compared with controls, excepted with *P. simplex* for which a diminution of K content (14%) was observed. K content was significantly enhanced on roots of *S. vulgare* only with *A. fragilissima* (13%) and *R. neocaledonicus* (29%).

In shoots and roots of *M. laurifolia* Ca content was not significantly different when compared with controls, excepted for shoots of plants inoculated with *R. neocaledonicus* for which a significant diminution of Ca was observed (33%). In shoots of *S. vulgare*, significant diminution of Ca content was observed. Mono-inoculation with *C. etunicatum* and *R. neocaledonicus* and Mix 2, 3, 4 reduced Ca content in shoot tissues of *S. vulgare* whereas significant enhancement of Ca assimilation in root tissues, from 32% (*S. ovalis*) to 41% (Mix 6), was observed when compared with controls.

In shoot tissues of *M. laurifolia* Mg assimilation was significantly reduced, from 20% (Mix 2) to 35% (*R. neocaledonicus*). Mix-inoculation (Mix 1, 2, 3, 4, 5, 6) and mono-inoculation with *C. etunicatum* and *R. neocaledonicus* significantly reduced Mg content in shoot tissues of *M. laurifolia* whereas significant reduction of Mg content in root tissues, from 26% (*P. simplex*) to 33% (Mix 2), was observed. Mix-inoculation (Mix 2, 3, 4) and mono-inoculation with *A. saccata*, *C. etunicatum* and *P. simplex* reduced significantly Mg content in root tissues of *M. laurifolia* when compared with controls. In shoot tissues of *S. vulgare* Mg assimilation was significantly reduced, from 35% (Mix 4) to 45% (Mix 3). Mix-inoculation (Mix 3, 4) and mono-inoculation with *R. neocaledonicus* significantly reduced Mg content in shoot tissues of *S. vulgare* whereas significant enhancement of Mg content in roots of plants inoculated with Mix 6 (51%) was observed. In other treatments Mg content in root tissues of *S. vulgare* were not significantly different when compared with controls.

Metals, present at high concentrations in the ultramafic substrate (Co, Cr, Fe, Mn and Ni), were analyzed in shoots and roots of plants. Results are summarized in Fig. 4 while full data are reported in Supplementary Table 5.

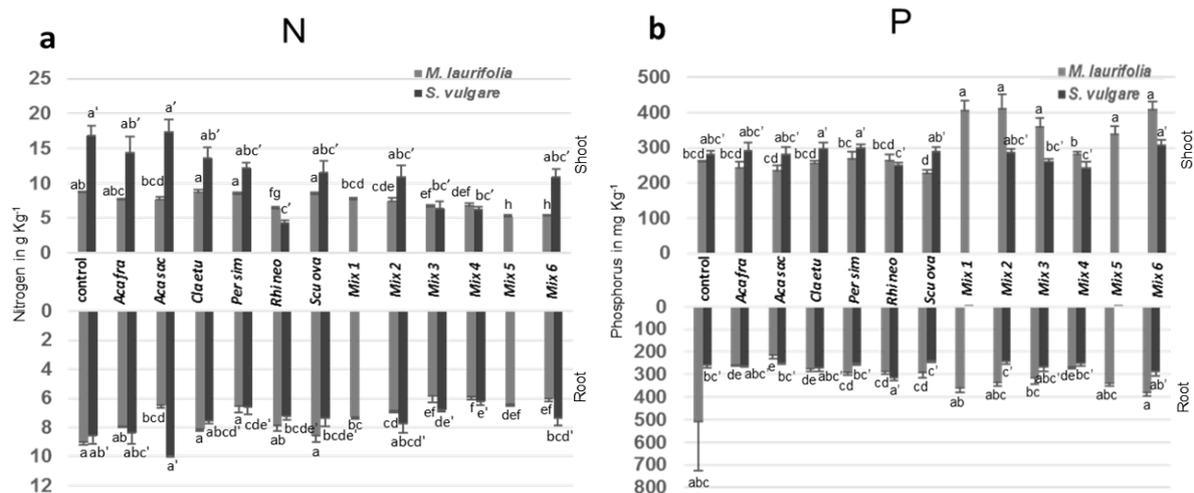
In shoot tissues of *M. laurifolia* Fe content was significantly reduced, from 66% (Mix 3) to 76% (*R. neocaledonicus*). Mix-inoculation (Mix 1, 2, 3, 5) and mono-inoculation with *R. neocaledonicus* significantly reduced Fe content in shoot tissues of *M. laurifolia* whereas significant reduction of Fe content in root tissues, from 33% (*C. etunicatum*) to 50% (*S. ovalis*), was observed. Only mono-inoculation with *A. saccata*, *C. etunicatum* and *S. ovalis* reduced significantly Fe content in root tissues of *M. laurifolia* when compared with controls. In shoot tissues of *S. vulgare* Fe content was significantly reduced, from 34% (*C. etunicatum*) to 90% (Mix 4). Mix-inoculation (Mix 2, 3, 4, 6) and mono-inoculation with *A. saccata*, *C. etunicatum* and *R. neocaledonicus* significantly reduced Fe content in shoot tissues of *S. vulgare* whereas significant reduction of Fe content in root tissues was observed only with *A. saccata* (55%) when compared with controls.

In shoot tissues of *M. laurifolia* Cr content was significantly reduced by 75% (*R. neocaledonicus*) and 76% (Mix 1). Curiously plants inoculated with Mix 4 have significantly more Cr than controls (50%), whereas significant reduction of Cr content in root tissues, from 28% (Mix 2) to 55% (*S. ovalis*) was observed. Mono-inoculation with *A. saccata*, *C. etunicatum* and *S. ovalis* and Mix 2 reduced significantly Cr content in roots of *M. laurifolia* when compared with controls. In shoots of *S. vulgare* Cr content was significantly reduced, from 52% (*C. etunicatum*) to 77% (Mix 4). Mix-inoculation (Mix 3, 4, 6) and mono-inoculation with *C. etunicatum* significantly reduced Cr content in shoot tissues of *S. vulgare* whereas significant reduction of Cr content in roots tissues was observed for *A. fragilissima* (45%) and *A. saccata* (69%) when compared with controls.

In shoot tissues of *M. laurifolia* Co content was significantly reduced, from 56% (*P. simplex*) to 80% (Mix 1). Mix-inoculation (Mix 1, 2, 3, 5, 6) and mono-inoculation with *C. etunicatum*, *P. simplex* and *R. neocaledonicus* significantly reduced Co content in shoot tissues of *M. laurifolia* whereas significant reduction of Co content in roots was observed only with *S. ovalis* (36%) when compared with controls. In shoot tissues of *S. vulgare* Co content was significantly reduced, from 47% (Mix 6) to 71% (Mix 4). Mix-inoculation (Mix 4, 6) and mono-inoculation with *R. neocaledonicus* significantly reduced Co content in shoot tissues of *S. vulgare* whereas no significant differences in roots tissues were observed when compared with controls.

Mn contents in shoots of *M. laurifolia* was significantly enhanced, from 38% (*A. saccata*) to 52% (Mix 4). Mix 4 and mono-inoculation with *A. fragilissima*, *A. saccata* and *S. ovalis* significantly enhanced Mn content in shoot tissues of *M. laurifolia* whereas Mn content in roots tissues was significantly reduced only for Mix 1 (34%) when compared with controls. In shoots of *S. vulgare* Mn content was significantly reduced, from 52% (Mix 4) to 61% (*R. neocaledonicus*). Mix-inoculation (Mix 3, 4) and mono-inoculation with *R. neocaledonicus* significantly reduced Mn content in shoot tissues of *S. vulgare*. Plants inoculated with *A. saccata*, *C. etunicatum* and *P. simplex* presented a significant enhancement of Mn content, from 51% (*A. saccata*) to 61% (*P. simplex*), whereas Mn content was significantly enhanced with *C. etunicatum* (45%) in roots tissues of *S. vulgare* when compared with controls.

In shoot tissues of *M. laurifolia* Ni contents was significantly reduced, from 56% (Mix 5) to 73% (Mix 1). Mix-inoculation (Mix 1, 5) and mono-inoculation with *R. neocaledonicus* significantly reduced Ni content in shoot tissues of *M. laurifolia* whereas significant reduction of Ni content in roots tissues was observed with *C. etunicatum* (32%), *S. ovalis* (36%) and *A. saccata* (40%) when compared with controls. In shoots of *S. vulgare* Ni content was significantly reduced, from 62% (Mix 3) to 85% (Mix 4), mix-inoculation (Mix 3, 4, 6) and mono-inoculation with *C. etunicatum* significantly reduced Ni content in shoot tissues of *S. vulgare* whereas Ni content in root was reduced with *A. fragilissima* (40%), *A. saccata* (60%) and Mix 2 (37%) when compared with controls.



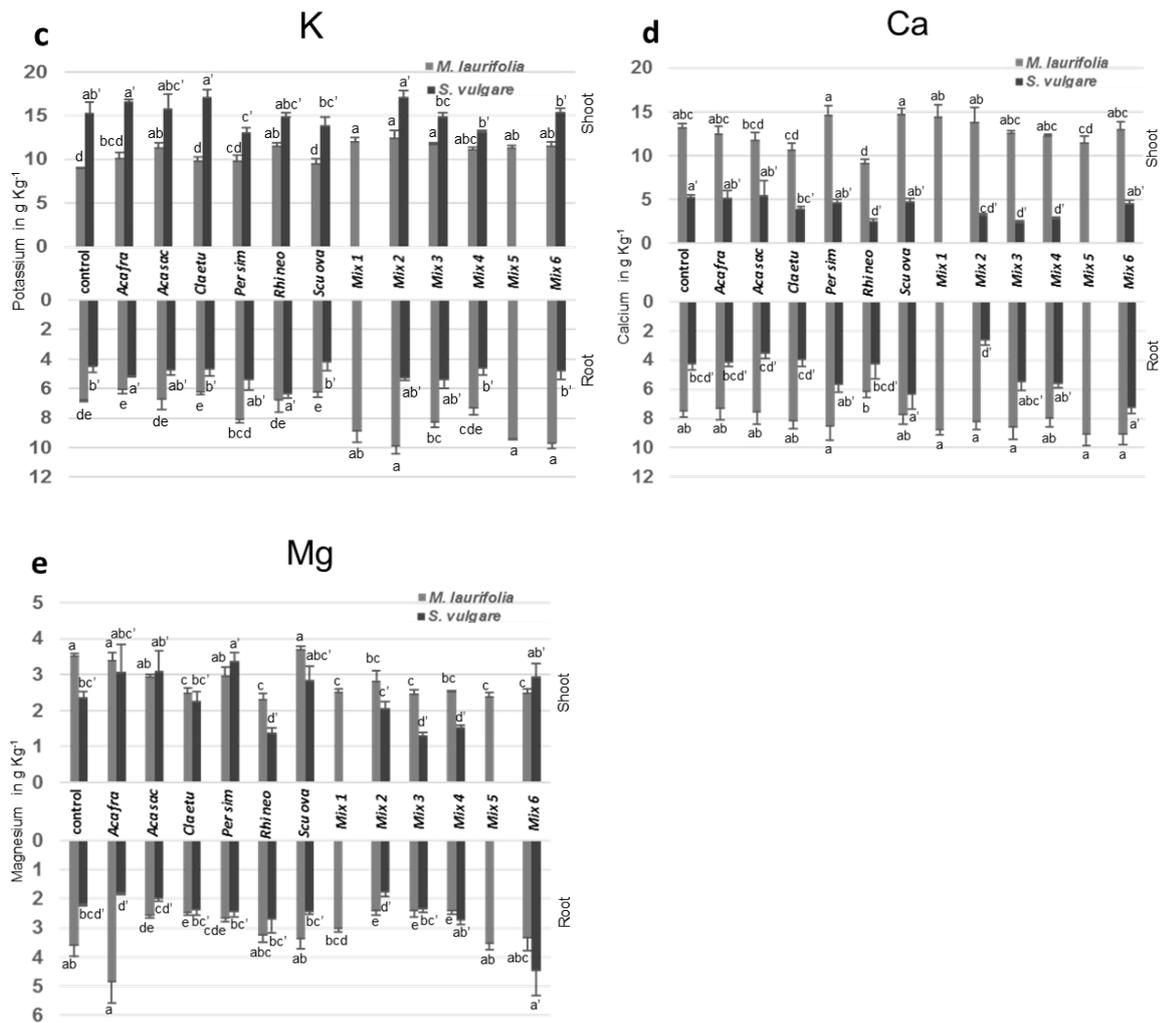
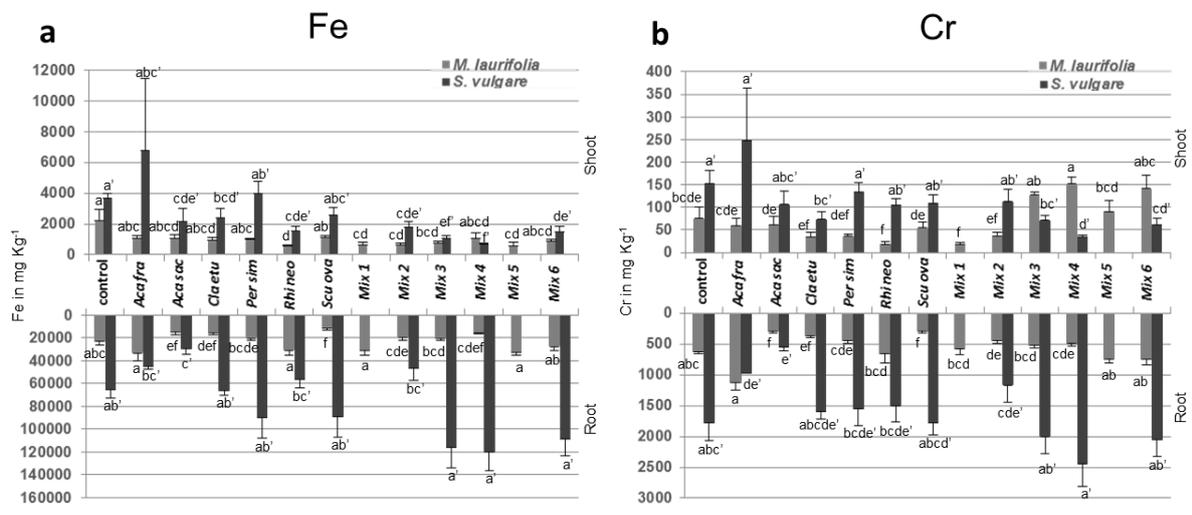


Fig. 3. Major element content in plant shoots and roots of *M. laurifolia* and *S. vulgare* expressed as mg kg⁻¹, or g kg⁻¹ of dry weight tissue. (a) Nitrogen (N); (b), Phosphorus (P); (c): Potassium (K); (d), Calcium (Ca) and (e), Magnesium (Mg). Bars represent means and error bars represent standard error of means (n=5). Different letters above columns indicate significant differences as determined by a Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test (p ≤ 0.05).



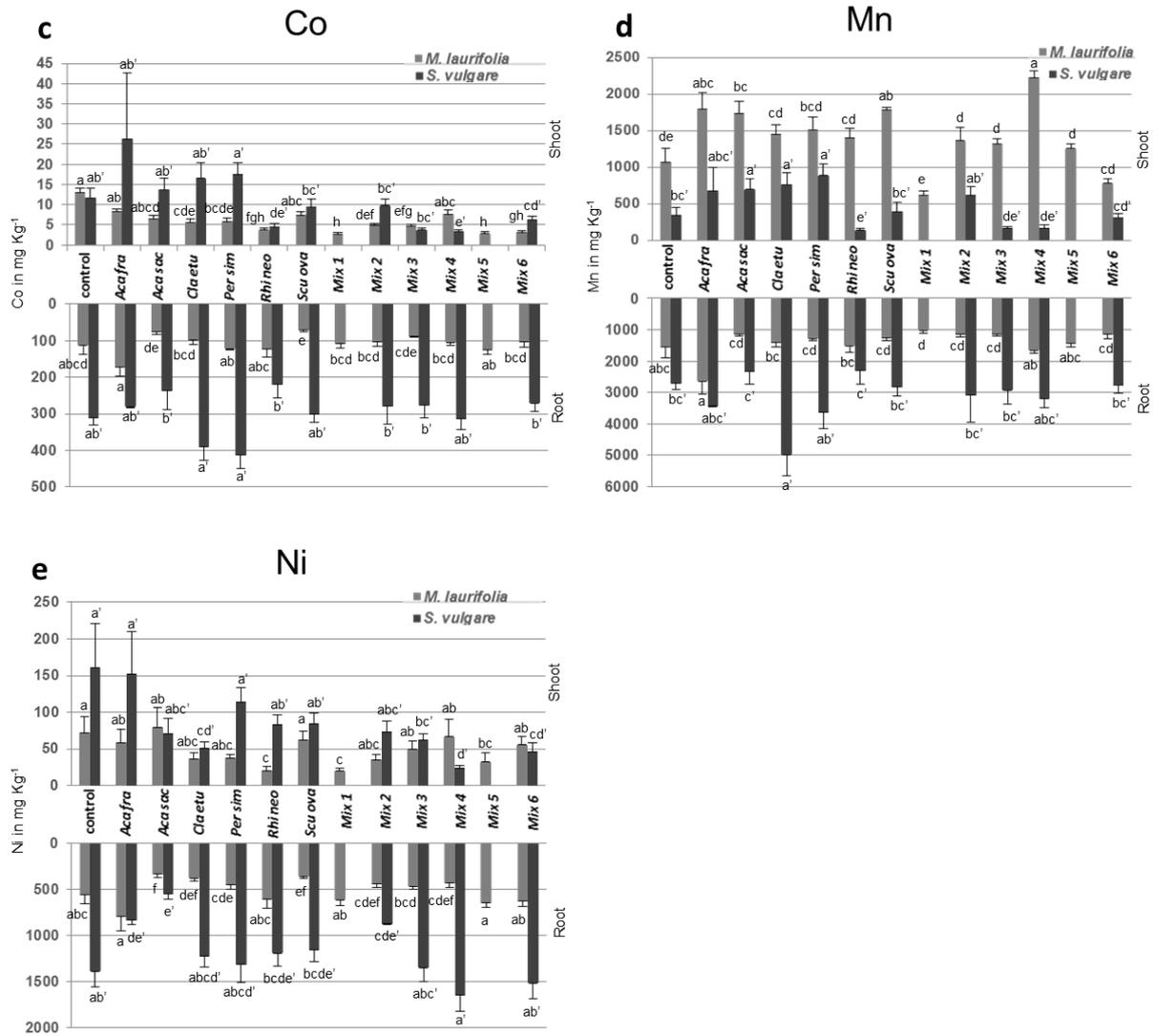


Fig. 4. Metal contents in plant shoot and roots of *M. laurifolia* and *S. vulgare* expressed as mg kg⁻¹ of dry weight tissue. (a) Iron (Fe); (b), Chromium (Cr); (c), Cobalt (Co); (d), Manganese (Mn) and (e), Nickel (Ni). Bars represent means and error bars represent standard error of means (n = 5). Different letters above columns indicate significant differences as determined by a Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test (p ≤ 0.05).

Global analysis

The two plants species were clearly differentiated by the Hierarchical Classification applied on PCA: *M. laurifolia* belonged to the cluster 3 and 4, whereas *S. vulgare* belonged to the cluster 1 and 2 (Fig. 5).

These two-species differed for some variables. *Metrosideros laurifolia* was characterized by a higher intensity of mycorrhization, higher arbuscules abundance in root system, a higher biomass of roots and shoots, a higher Ca/Mg ratio of roots and shoots, a higher content of Ca, Na, C, P, Mg in roots and shoot tissues, and a higher content of Mn in shoots. *S. vulgare* was

characterized by a higher metal content (Co, Ni, Cr, Fe) in shoot and root tissues, a higher Mn content in root tissues and a higher content of N and K in shoot tissues.

Two clusters were delimited by PCA for each plant species. Cluster 1 belonging to *S. vulgare* was represented by control, *S. ovalis*, *P. simplex*, *A. saccata*, *A. fragilissima* and Mix 2 treatments. This cluster was characterized by a low biomass, a high N content in roots and shoots, a high Mg content in shoot tissues and a high metal content (Ni, Co, Cr, and Fe) in shoots tissues, when compared with all other clusters.

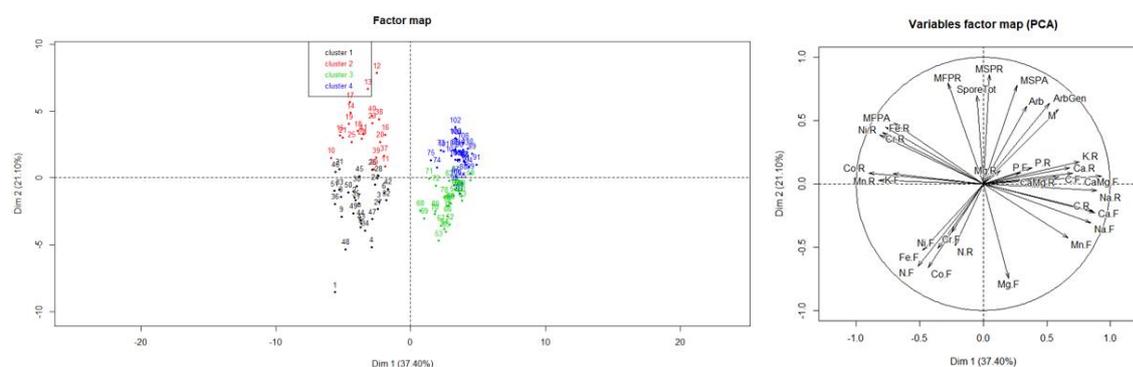


Fig. 5. Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Classification on Principal Component (HCPC). PCA and HCPC were performed with 34 variables (Biomass (dry weight tissue of shoot (MSPA) and roots (MSPR), fresh weight tissue of shoot (MFPA) and roots (MFPR)), intensity of mycorrhization (M), arbuscule abundance in mycorrhizal parts of root fragments (Arb), arbuscule abundance in roots system (Arb Gen), total sporulation (Spore Tot), major element content in shoot (ie. N, F) and roots (ie. N, R) (N, P, K, Ca, Mg, Ca/Mg, C, Na) and metal content in shoot (ie. Co, F) and roots (ie. Co, R) (Co, Cr, Fe, Mn, Ni) using R software with the ‘FactoMineR’ package. HCPC used euclidean distances for calculating dissimilarities between observations and average method to define cluster.

Cluster 2 belonging to *S. vulgare* was represented by *R. neocaledonicus*, Mix 3 and Mix 4 treatments. This cluster was characterized by a high biomass, high Fe, Ni, Co and Mn contents in roots, a high K content in shoots and greater arbuscule abundance in mycorrhizal parts of root fragments, when compared with all other cluster. Treatments *C. etunicatum* and Mix 6 for *S. vulgare* were recovered between cluster 1 and 2 in PCA analyses.

Cluster 3 belonging to *M. laurifolia* was composed by control, *C. etunicatum*, *S. ovalis*, *P. simplex*, *A. saccata* and *A. fragilissima* treatments. This cluster was characterized by a lower biomass, higher C, Ca, and Na contents in roots and shoots, a higher N content in roots and a higher Mn content in shoot tissues, when compared with all other cluster. Cluster 4 belonging

to *M. laurifolia* was represented by Mix 1, Mix 2, Mix 3, Mix 5 and Mix 6 treatments. This cluster was characterized by a higher biomass and intensity of mycorrhization, higher arbuscule abundance in root system, a higher Ca/Mg ratio in roots and shoots, higher P, Ca, Na, and C contents in roots and shoots and a higher Mn content in shoot tissues. Treatments *R. neocaledonicus* and Mix 4 for *M. laurifolia* were recovered between cluster 3 and 4 in PCA analyses.

Discussion

This study is the first to report data about complementary effects of native AMF species on plants growing on ultramafic substrate, and showing that combined inoculation of different species belonging to different families i) improved plant growth more than mono inoculation, ii) improved P acquisition of endemic ultramafic plants and iii) limited metal transfer to plants.

AMF diversity improved plant development on ultramafic soil

The promotion of plant growth by AMF symbiosis has been widely reviewed: AMF associations are known to enhance plant growth, improve plant mineral nutrition and then plant fitness (Smith & Reads 2008). In ultramafic soils, essential mineral nutrient contents, such as P, N and K are low or deficient (Brooks, 1987). In addition, the Ca/Mg ratio is strongly unbalanced in favor of Mg. It is not surprising that, in our study, most of the AMF species improved plant growth and plant biomass production.

The highest increase of biomass obtained here with *M. laurifolia* for Mix 5, is spectacular (total biomass 18 Times higher than control). In comparison, Gensous (2014) working with the same plant species and the same soil, reported biomass over three times higher than control when plants were inoculated with a mix of three AMF isolates. Amir *et al.* (2014), tested the same AMF *inoculum* with the same plant species in field experiment and reported biomass 7 times higher than control plants.

All AMF species improved biomass of *M. laurifolia* except the two species of *Acaulospora* spp., whereas in *S. vulgare* only *R. neocaledonicus* and combined *inocula* improved biomass of this plant, suggesting that functions on plant fitness of different species depended of the host plants species (Lekberg & Koide 2014). The most biomass improvement of *M. laurifolia* was obtained when plants were inoculated with all AMF families (Mix 5). When an additional species of *Acaulospora* spp. was added (Mix 6) the biomass value was

reduced, but not significantly. A functional redundancy or competition between two species (here *Acaulospora* spp.) has already been reported (Thonar *et al.*, 2014 ; Gosling *et al.*, 2016). In *S. vulgare* the most improvement of biomass was obtained with 3 AMF species belonging to three families (Perretaceae, Glomeraceae and Gigasporaceae) but the biomass was not significantly different when compared with plants inoculated with *R. neocaledonicus* or with Mix 4.

Intensity of mycorrhization appeared to be dependent of AMF species and plant species engaged in symbiosis (Smith & Reads 2008). For the two plants species, the higher values of root colonization were recovered when they are inoculated with *R. neocaledonicus* and Mix species *inocula*. The two species of *Acaulospora* spp. and *S. ovalis* were characterized by a weak power of colonization. *M. laurifolia* seemed to be more receptive to the 3 other AMF species (*R. neocaledonicus*, *P. simplex nc*, *C. etunicatum nc*) in terms of root colonization and growth stimulation. Overall *M. laurifolia* showed a higher mycorrhizal colonization than *S. vulgare* and appeared then more receptive to the studied AMF isolates. It is known that an AMF species can be a good contributor of a given host plant and the same species can be a bad contributor to another plant (Berruti *et al.*, 2016; Gosling *et al.* 2016). In our case, native AMF isolates can be more adapted and give more profit to an endemic plant from their ecosystem compared to *S. vulgare*. In consequence some of our AMF isolates could be bad contributors in *S. vulgare*. *Sorghum vulgare* could have sanctioned these bad contributors (Kiers *et al.*, 2011 ; Hart *et al.*, 2013) ; which can explain why all mono-inoculation (excepted *R. neocaledonicus*) presented a weak colonization in *S. vulgare*. All these results support hypotheses formulated by Yang *et al.* (2017) that complementarity of function in different AMF families contributes most to the positive relationship between AMF diversity and plant productivity but only when a native plant and AMF were used.

In each fungal treatment spores of inoculated species were recovered, and showed that all inoculated AMF species had grown and achieved their life cycle. Our molecular approach allowed the detection of each species of AMF in mono inoculation excepted for *S. ovalis*. In Mix inoculation all inoculated species were not always recovered in roots. Different hypothesis can explain these results. First the fact that we failed to detect *S. ovalis* in pure DNA from spores can be due to the DNA conformation in spore or because the rDNA region targeted by the primer can be highly variable. The fact that we failed to recover all the species inoculated in mix *inocula* can be due to the presence of inhibitors from soil and roots or because the sampling was too small (only one DNA extraction of 100 mg of roots per treatment).

Treatments with the most important biomass (Mix 5, 6 for *M. laurifolia* and Mix 3 and *R. neocaledonicus* in *S. vulgare*) have the most significant reduction of N content in shoot and roots tissues when compared with controls. Wu *et al.* (2017) observed the same affect and concluded that inoculation of plants with AMF improved photosynthesis and that AMF effect was mostly determined by the relative allocation of nitrogen to photosynthesis and not by the leaf nitrogen concentration. However, we can also explain these results by the greater dilution of N in a larger volume of tissues due to the high increase of biomass. Regarding P assimilation improvement, our results showed that only mix-inoculation on *M. laurifolia* improved the P content of shoot tissues; these results are in agreement with common Harrison *et al.* (2002). This increase of P content here needed a combined *inoculum* and a plant adapted to the ultramafic soil. The ability of AMF to preferentially allocate P to some host plants has been demonstrated previously (Kiers *et al.*, 2011; Fellbaum *et al.*, 2012). Jansa *et al.* (2008) and Thonar *et al.* (2014) found equally that only combined *inoculum* improved P content in tissues of *Allium porrum* and *Medicago truncatula* respectively. Potassium assimilation was improved only for mix inoculation on *M. laurifolia*. Our results show that Ca/Mg ratio was improved principally on mix inoculation for the two plants species, particularly by a reduction of Mg assimilation. A variation in fungal control can also help to explain the variation of mineral contribution by different AMF species on different plants species (Hart *et al.*, 2013). All these results clearly demonstrate that a mix of different AMF isolates, particularly when belonging to different families, clearly stimulate the mineral nutrition of a native plant on ultramafic soil.

In this study, we demonstrated that ultramafic AMF isolates could improve plant metal tolerance on ultramafic substrate when metals were present at high concentration in the soil. The mechanisms that are involved in metal homeostasis and detoxification of essential and non-essential metals in AMF are fully described in Ferrol *et al.* (2016). Heavy metal tolerance can be due to several processes: (i) binding mechanisms on external mycelium and spores (ii) chelating heavy metal in cytosol (iii) sequestration in the fungal vacuole and (iv) reduction of metal accumulation by activation of specific transport (Ferrol *et al.*, 2016). All these mechanisms reduce the toxicity of metal in the mycorrhizosphere. Our results argue in favour of the hypothesis that AMF regulates and detoxifies metals in the rhizosphere and stop the metal translocation to the shoot: all metal (excepted Mn for *M. laurifolia*) were drastically reduced in plants shoots and generally increased on roots. Mn was found to be accumulated in shoot tissues of *M. laurifolia*; this result was in accordance with Gensous (2014) and was

probably due to the physiology of this plant. In most cases, mix inoculation and *R. neocaledonicus* treatments were the most performant to reduced metal content of shoot tissue.

Conclusion

All, these results suggest that when plant faced multiple stress factors, the use of AMF mix inoculation with different families are more performant than mono-inoculation to improve biomass, mineral nutrition, Ca/Mg ratio and tolerance to heavy metal of plants in ultramafic soil. Our results support the hypothesis that they are a positive correlation between AMF family diversity and enhancement of plants growth (Hart & Reader 2002; Maherali & Klironomos 2007; Yang *et al.*, 2017). This hypothesis was verified only with a plant species adapted to the edaphic constraints. This study highlighted that AMF can have an spectacular effect on plant growth and adaptation when combined natives AMF families were inoculated on their original substrate with a native plant species and open a new perspective for the use of AMF for ecological restauration of ultramafic soils.

References

- Abu-Zeyad R, Khan AG, Khoo C (1999) Occurrence of arbuscular mycorrhiza in *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and production of castanospermine. *Mycorrhiza* 9:111–117. doi: 10.1007/s005720050008
- Amir H, Lagrange A, Hassaine N, Cavaloc Y (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza* 23:585–595. doi: 10.1007/s00572-013-0499-6
- Amir H, Ducouso M (2010) Les bactéries et les champignons du sol sur roches ultramafiques. In : L’huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds) Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration. IAC, Nouméa, New Caledonia, pp. 129-146.
- Amir H, Jasper DA, Abbott LK (2008) Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils. *Mycorrhiza* 19:1–6. doi: 10.1007/s00572-008-0197-y
- Amir H, Perrier N, Rigault F, Jaffré T (2007) Relationships between Ni-hyperaccumulation and mycorrhizal status of different endemic plant species from New Caledonian ultramafic soils. *Plant and Soil* 293:23–35. doi: 10.1007/s11104-007-9238-0
- Amir H, Pineau R, Violette Z (1997) Premiers résultats sur les endomycorhizes des plantes de maquis miniers de Nouvelle-Calédonie. In: Jaffré T, Reeves RD, Becquer T (eds) The ecology of ultramafic and metalliferous areas. ORSTOM, Nouméa, New Caledonia, pp 79-85.
- Augé RM, Toler HD, Saxton AM (2015) Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 25:13–24. doi: 10.1007/s00572-014-0585-4
- Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3–42. doi: 10.1007/s005720100097
- Bárzana G, Aroca R, Ruiz-Lozano JM (2015) Localized and non-localized effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on accumulation of osmolytes and aquaporins and on antioxidant systems in maize plants subjected to total or partial root drying: Localized effects of AM symbiosis under drought. *Plant, Cell & Environment* 38:1613–1627. doi: 10.1111/pce.12507
- Bárzana G, Aroca R, Paz JA, et al (2012) Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Ann Bot* 109:1009–1017. doi: 10.1093/aob/mcs007
- Berruti A, Lumini E, Balestrini R, Bianciotto V (2016) Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Natural Biofertilizers: Let’s Benefit from Past Successes. *Front Microbiol* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01559
- Błaszowski J, Kozłowska A, Crossay T, et al (2017) A new family, Pervetustaceae with a new genus, *Pervetustus*, and *P. simplex* sp. nov. (Paraglomerales), and a new genus, *Innospora* with *I. majewskii* comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina. *Nova Hedwigia*. doi:info:doi/10.1127/nova_hedwigia/2017/0419
- Błaszowski J, Renker C, Buscot F (2006) *Glomus drummondii* and *G. walkeri*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycological Research* 110:555–566. doi: 10.1016/j.mycres.2006.02.006

- Brooks RR (1987) The serpentine factor. In *Serpentine and its Vegetation. A Multidisciplinary Approach*, ed RR Brooks. Dioscorides Press, Portland, Oregon, pp. 32-59.
- Calvo-Polanco M, Molina S, Zamarreño AM, et al (2014) The Symbiosis with the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Rhizophagus irregularis* Drives Root Water Transport in Flooded Tomato Plants. *Plant Cell Physiol* 55:1017–1029. doi: 10.1093/pcp/pcu035
- Crossay T, Cilia A, Cavaloc Y, Amir H, Redecker D. 2018. Four new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) associated with endemic plants from ultramafic soils of New Caledonia. *Mycological Progress*: 1–16.
- Crossay T, Antheaume C, Redecker D, et al (2017) New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS. *Sci Rep* 7: . doi: 10.1038/s41598-017-14487-6
- Daniels BA, Skipper HD (1982) Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In, "Methods and Principles of Mycorrhizal Research" (ed. Schenck, N.C.). The American Phytopath Society, St Paul, Minnesota, U.S.A., pp. 29–35.
- Doubková P, Vlasáková E, Sudová R (2013) Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. *Plant Soil* 370:149–161. doi: 10.1007/s11104-013-1610-7
- 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. doi: 10.1016/j.funeco.2009.07.003
- Fellbaum CR, Mensah JA, Pfeffer PE, et al (2012) The role of carbon in fungal nutrient uptake and transport. *Plant Signaling & Behavior* 7:1509–1512 . doi: [10.4161/psb.22015](https://doi.org/10.4161/psb.22015)
- Ferrol N, Tamayo E, Vargas P (2016) The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany* 67:6253–6265. doi: 10.1093/jxb/erw403
- Gensous S (2014) Les champignons mycorrhiziens à arbuscules des maquis miniers de la Nouvelle Calédonie : Diversité, rôle dans l’adaptation des plantes à la contrainte ultramafique et interaction avec des rhizobactéries promotrices de la croissance. ResearchGate. doi: 10.6098/2014NCAL0062
- Gosling P, Jones J, Bending GD (2016) Evidence for functional redundancy in arbuscular mycorrhizal fungi and implications for agroecosystem management. *Mycorrhiza* 26:77–83. doi: 10.1007/s00572-015-0651-6
- Graham RC (2009) Serpentine Geocology of Western North America: Geology, Soils, and Vegetation. *Soil Science* 174:193. doi: 10.1097/SS.0b013e318199f342
- 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, 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. doi: 10.1105/tpc.004861
- Hart MM, Forsythe J, Oshowski B, et al (2013) Hiding in a crowd—does diversity facilitate persistence of a low-quality fungal partner in the mycorrhizal symbiosis? *Symbiosis* 59:47–56. doi: 10.1007/s13199-012-0197-8

- Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic Basis for Variation in the Colonization Strategy of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The New Phytologist* 153:335–344
- Hartley SE, Gange AC (2009) Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual review of entomology* 54:323–342
- Hawkins H-J, Johansen A, George E (2000) Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226:275–285. doi: 10.1023/A:1026500810385
- Helgason T, Fitter A (2005) The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologist* 19:96–101. doi: 10.1017/S0269-915X(05)00302-2
- Jaffré T (1993) The Relationship between Ecological Diversity and Floristic Diversity in New Caledonia. *Biodiversity Letters* 1:82. doi: 10.2307/2999751
- Jansa J, Smith FA, Smith SE (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177:779–789 . doi: [10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x)
- Jansa J, Mozafar A, Kuhn G, et al (2003) Soil Tillage Affects the Community Structure of Mycorrhizal Fungi in Maize Roots. *Ecological Applications* 13:1164–1176 . doi: 10.1890/1051-0761(2003)13[1164:STATCS]2.0.CO;2
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, et al (2011) Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science* 333:880–882. doi: 10.1126/science.1208473
- Koch AM, Antunes PM, Maherali H, et al (2017) Evolutionary asymmetry in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: conservatism in fungal morphology does not predict host plant growth. *New Phytol* 214:1330–1337 . doi: 10.1111/nph.14465
- Kazakou E, Dimitrakopoulos PG, Baker AJM, et al (2008) Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews* 83:495–508 . doi: [10.1111/j.1469-185X.2008.00051.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00051.x)
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A (2009) DNA-based species level detection of *Glomeromycota* : one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183:212–223. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x
- Lagrange A, Ducouso M, Jourand P, et al (2011) New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Canadian Journal of Microbiology* 57:21–28. doi: 10.1139/W10-096
- Lekberg Y, Koide RT (2014) Integrating physiological, community, and evolutionary perspectives on the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Botany* 92:241–251. doi: 10.1139/cjb-2013-0182
- Luçon S, Marion F, Niel JF, Pelletier B (1997) Rehabilitation des sites miniers sur roches ultramafiques en Nouvelle-Calédonie. Dans : Jaffré T, Reeves RD and Becquer T (eds) *Écologie des milieux sur roches ultramafiques et sur sols métallifères*, ORSTOM, Noumea pp 297-303.
- Maherali H, Klironomos JN (2007) Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning. *Science* 316:1746–1748. doi: 10.1126/science.1143082

- Orłowska E, Przybyłowicz W, Orłowski D, et al (2011) The effect of mycorrhiza on the growth and elemental composition of Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* Roessler. *Environmental Pollution* 159:3730–3738. doi: 10.1016/j.envpol.2011.07.008
- Perrier N, Amir H, Colin F (2006a) Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza* 16:449–458. doi: 10.1007/s00572-006-0057-6
- Perrier N, Ambrosi JP, Colin F, Gilkes RJ (2006b) Biogeochemistry of a regolith: The New Caledonian Koniambo ultramafic massif. *Journal of Geochemical Exploration* 88:54–58 . doi: [10.1016/j.gexplo.2005.08.015](https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2005.08.015)
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158–IN18. doi: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Powell JR, Parrent JL, Hart MM, et al (2009) Phylogenetic trait conservatism and the evolution of functional trade-offs in arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276:4237–4245. doi: 10.1098/rspb.2009.1015
- Pozo MJ, Azcón-Aguilar C (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10:393–398. doi: 10.1016/j.pbi.2007.05.004
- Ruiz-Lozano JM, Porcel R, Azcón C, Aroca R (2012) Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *J Exp Bot* 63:4033–4044. doi: 10.1093/jxb/ers126
- Ruiz-Lozano JM, Aroca R (2010) Modulation of Aquaporin Genes by the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Relation to Osmotic Stress Tolerance. In: *Symbioses and Stress*. Springer, Dordrecht, pp 357–374.
- Ruiz-Lozano JM (2003) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* 13:309–317. doi: 10.1007/s00572-003-0237-6
- Saia S, Rappa V, Ruisi P, et al (2015) Soil inoculation with symbiotic microorganisms promotes plant growth and nutrient transporter genes expression in durum wheat. *Front Plant Sci* 6: . doi: 10.3389/fpls.2015.00815
- Sánchez-Romera B, Ruiz-Lozano JM, Zamarreño ÁM, et al (2016) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and methyl jasmonate avoid the inhibition of root hydraulic conductivity caused by drought. *Mycorrhiza* 26:111–122. doi: 10.1007/s00572-015-0650-7
- Shrivastava G, Ownley BH, Augé RM, et al (2015) Colonization by arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi enhanced terpene production in tomato plants and their defense against a herbivorous insect. *Symbiosis* 65:65–74. doi: 10.1007/s13199-015-0319-1
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Third Edition. Academic Press.
- St-Arnaud, M., Vujanovic, V. 2007 Effect of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. In: C. Hamel C.Plenchette eds. *Mycorrhizae in crop production*. Binghamton, NY: Haworth Food and Agricultural Products Press, 67–122.
- 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. doi: 10.1007/s005720050002

- Tanaka Y, Yano K (2005) Nitrogen delivery to maize via mycorrhizal hyphae depends on the form of N supplied. *Plant, Cell & Environment* 28:1247–1254. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01360.x
- Thonar C, Frossard E, Šmilauer P, Jansa J (2014) Competition and facilitation in synthetic communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol Ecol* 23:733–746. doi: 10.1111/mec.12625
- Toussaint J-P, 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. doi: 10.1139/w04-009
- Trouvelot, A., Kough, J., & Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorhisation VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In G. S. Gianinazzi-Pearson V (Ed.), *Mycorrhizae: physiology and genetics* (INRA Press., pp. 217-221). Paris.
- Van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR (2015) Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol* 205:1406–1423. doi: 10.1111/nph.13288
- Vannette RL, Hunter MD (2009) Mycorrhizal fungi as mediators of defence against insect pests in agricultural systems. *Agricultural and Forest Entomology* 11:351–358. doi: 10.1111/j.1461-9563.2009.00445.x
- Wu F, Zhang H, Fang F, et al (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi alter nitrogen allocation in the leaves of *Populus × canadensis* ‘Neva.’ *Plant Soil* 421:477–491 . doi: 10.1007/s11104-017-3461-0
- Yang H, Zhang Q, Koide RT, et al (2017) Taxonomic resolution is a determinant of biodiversity effects in arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J Ecol* 105:219–228 . doi: 10.1111/1365-2745.12655

Supplementary data

Table S1: Plant height data values along experiments expressed in cm. Data are means \pm standard error of means ($n = 10$). Data followed by the same letters are not significantly different (Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test, $P \leq 0.05$)

| | Treatments | Days (inoculation at 60 days) | | | | | |
|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | | 60 | 120 | 158 | 186 | 240 | 290 |
| <i>Metrosideros laurifolia</i> | <i>Control</i> | 2.9 \pm 0.1 a | 5.4 \pm 0.3 f | 6.5 \pm 0.3 f | 6.5 \pm 0.2 f | 6.7 \pm 0.7 g | 7.3 \pm 0.8 h |
| | <i>Aca fra</i> | 2.7 \pm 0.1 a | 6.8 \pm 0.6 cde | 7.4 \pm 0.5 def | 8.3 \pm 0.6 e | 9.2 \pm 0.7 f | 9.6 \pm 0.7 g |
| | <i>Aca sac</i> | 2.7 \pm 0.1 a | 7.3 \pm 0.5 cd | 8.1 \pm 0.4 d | 9.3 \pm 0.5 de | 10.4 \pm 0.5 ef | 10.9 \pm 0.5 fg |
| | <i>Cla etu</i> | 2.7 \pm 0.1 a | 6.7 \pm 0.4 cde | 7.9 \pm 0.3 de | 9.3 \pm 0.3 de | 10.6 \pm 0.5 ef | 11.3 \pm 0.4 efg |
| | <i>Per sim</i> | 2.9 \pm 0.1 a | 6.7 \pm 0.5 cde | 8.5 \pm 0.7 cd | 10.8 \pm 0.6 bc | 12.3 \pm 0.7 cd | 13.1 \pm 0.7 cd |
| | <i>Rhi neo</i> | 2.9 \pm 0.1 a | 7.8 \pm 0.4 bc | 9.6 \pm 0.5 bc | 10.4 \pm 0.5 bcd | 12.8 \pm 0.6 bc | 13.5 \pm 0.6 bc |
| | <i>Scu ova</i> | 2.9 \pm 0.1 a | 7.4 \pm 0.5 cd | 8.1 \pm 0.5 d | 8.7 \pm 0.6 e | 9.3 \pm 0.7 f | 9.9 \pm 0.7 g |
| | <i>Mix 1</i> | 2.8 \pm 0.1 a | 7.5 \pm 0.3 cd | 8.6 \pm 0.4 cd | 9.4 \pm 0.3 cde | 11.9 \pm 0.5 cde | 12.75 \pm 0.5 cde |
| | <i>Mix 2</i> | 2.8 \pm 0.1 a | 6.5 \pm 0.5 def | 8.3 \pm 0.6 d | 9.2 \pm 0.6 de | 11.7 \pm 0.8 cde | 12.6 \pm 0.8 cde |
| | <i>Mix 3</i> | 2.7 \pm 0.1 a | 6.7 \pm 0.3 cde | 8.4 \pm 0.3 cd | 9.6 \pm 0.4 cde | 11.7 \pm 0.5 cde | 12.5 \pm 0.5 cde |
| | <i>Mix 4</i> | 2.9 \pm 0.1 a | 5.9 \pm 0.3 ef | 6.8 \pm 0.3 ef | 9.4 \pm 0.3 cde | 10.9 \pm 0.4 def | 11.6 \pm 0.4 def |
| | <i>Mix 5</i> | 2.9 \pm 0.1 a | 10.8 \pm 0.4 a | 11.7 \pm 0.3 a | 12.9 \pm 0.4 a | 15.6 \pm 0.4 a | 16.3 \pm 0.4 a |
| <i>Mix 6</i> | 2.8 \pm 0.1 a | 8.9 \pm 0.2 ab | 10.3 \pm 0.3 ab | 11.3 \pm 0.3 ab | 14.1 \pm 0.3 ab | 14.9 \pm 0.4 ab | |

| | Treatments | Days (inoculation at seedling day 0) | | | | | | |
|------------------------|----------------|--------------------------------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | | 13 | 29 | 44 | 62 | 78 | 95 | 125 |
| <i>Sorghum vulgare</i> | <i>Control</i> | 9 \pm 0.3 a | 10.2 \pm 0.3 a | 10.5 \pm 1 a | 10.6 \pm 0.4 cd | 10.9 \pm 0.4 bc | 12.1 \pm 0.7 bcd | 13.7 \pm 1.1 de |
| | <i>Aca fra</i> | 9.2 \pm 0.3 a | 9.7 \pm 0.3 a | 9.7 \pm 0.3 a | 9.7 \pm 0.3 d | 10.4 \pm 0.4 bc | 10.9 \pm 0.9 cd | 10.9 \pm 3.3 e |
| | <i>Aca sac</i> | 8.5 \pm 0.4 a | 9 \pm 0.3 a | 9.4 \pm 0.4 a | 9.7 \pm 0.5 d | 10.8 \pm 0.6 bc | 11.6 \pm 0.8 bcd | 12 \pm 1.1 e |
| | <i>Cla etu</i> | 9.4 \pm 0.2 a | 10 \pm 0.2 a | 10.2 \pm 0.2 a | 10.4 \pm 0.3 d | 11 \pm 0.7 bc | 14 \pm 1.8 bcd | 20.9 \pm 4.6 de |
| | <i>Per sim</i> | 8.6 \pm 0.4 a | 9.8 \pm 0.3 a | 9.9 \pm 0.3 a | 9.9 \pm 0.3 d | 10.3 \pm 0.4 c | 11.3 \pm 0.9 d | 13.1 \pm 1 de |
| | <i>Rhi neo</i> | 8.6 \pm 0.2 a | 9.9 \pm 0.2 a | 10.4 \pm 0.3 a | 14.1 \pm 1.4 a | 19.3 \pm 2.5 a | 29.4 \pm 3.9 a | 46 \pm 4.5 a |
| | <i>Scu ova</i> | 8.9 \pm 0.3 a | 9.6 \pm 0.3 a | 9.6 \pm 0.3 a | 10.1 \pm 0.3 d | 10.8 \pm 0.5 bc | 12.5 \pm 1.3 bcd | 14.7 \pm 2.3 e |
| | <i>Mix 2</i> | 8.8 \pm 0.3 a | 10.2 \pm 0.4 a | 10.3 \pm 0.4 a | 10.4 \pm 0.4 bcd | 12 \pm 0.6 b | 14.3 \pm 1 bc | 20.9 \pm 2.5 cd |
| | <i>Mix 3</i> | 8.7 \pm 0.3 a | 9.6 \pm 0.2 a | 10 \pm 0.2 a | 12.8 \pm 1 abc | 18.8 \pm 2.9 a | 31.9 \pm 5.9 a | 52.6 \pm 4.8 a |
| | <i>Mix 4</i> | 8.2 \pm 0.3 a | 9.4 \pm 0.3 a | 9.8 \pm 0.3 a | 11.9 \pm 0.4 ab | 15.9 \pm 1.4 a | 24 \pm 2.8 a | 37.3 \pm 4.7 ab |
| | <i>Mix 6</i> | 8.7 \pm 0.3 a | 10 \pm 0.2 a | 10.1 \pm 0.3 a | 10.2 \pm 0.2 d | 11.5 \pm 0.5 bc | 16.3 \pm 1.8 b | 33.3 \pm 6.6 bc |

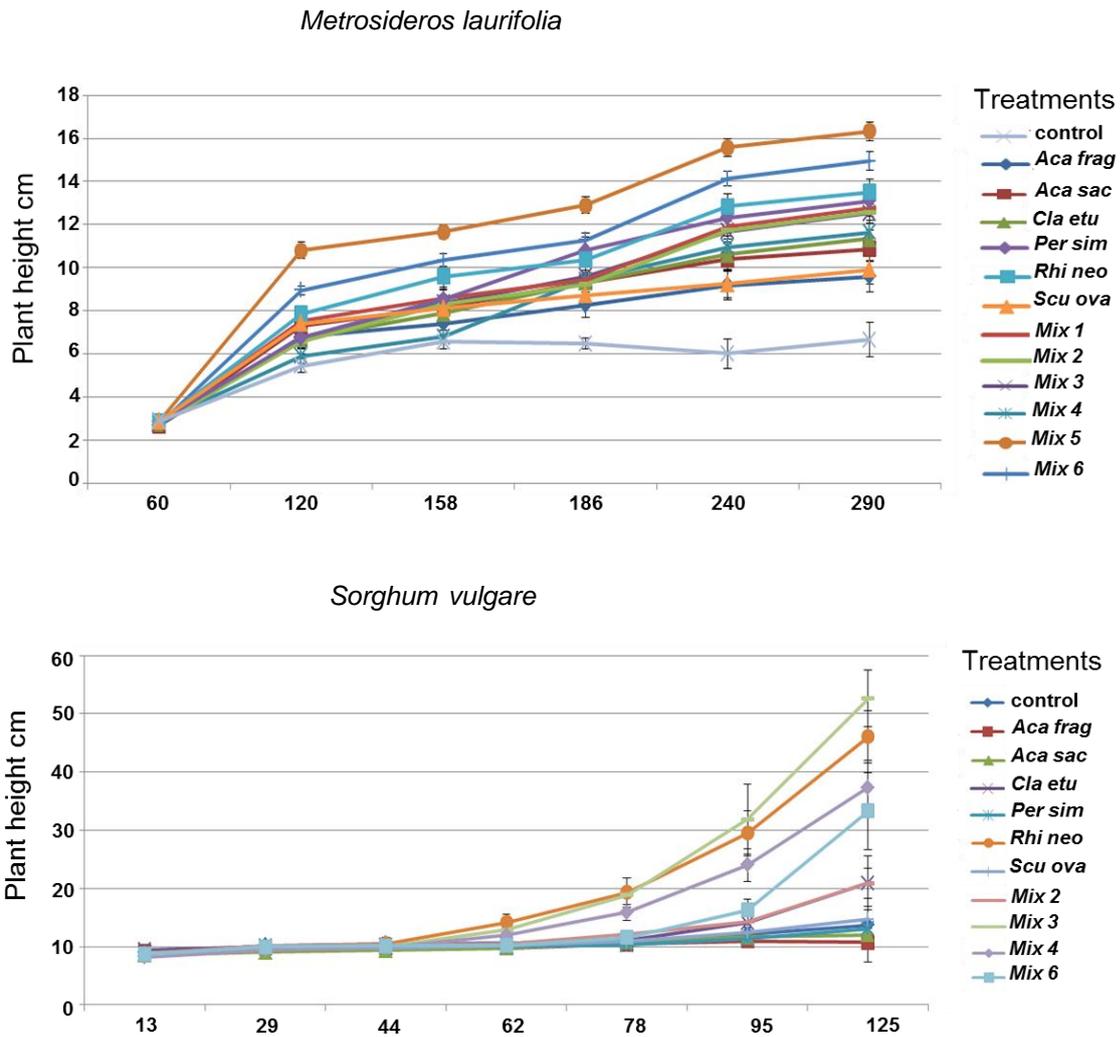
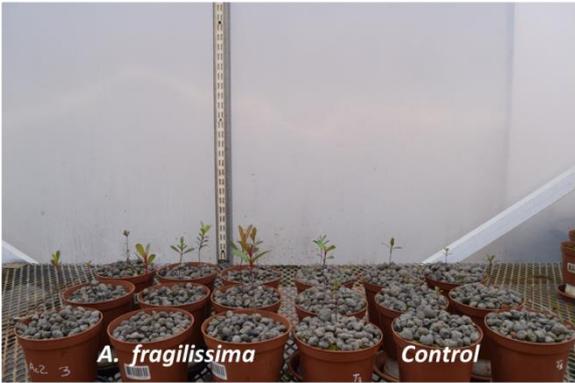
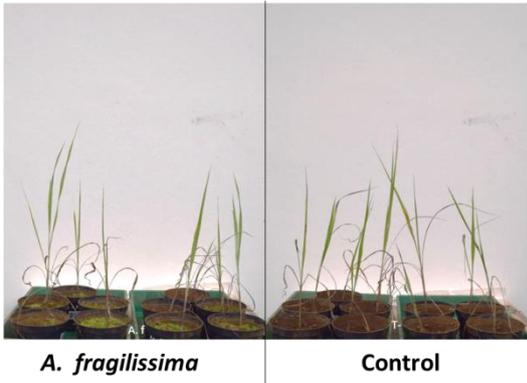
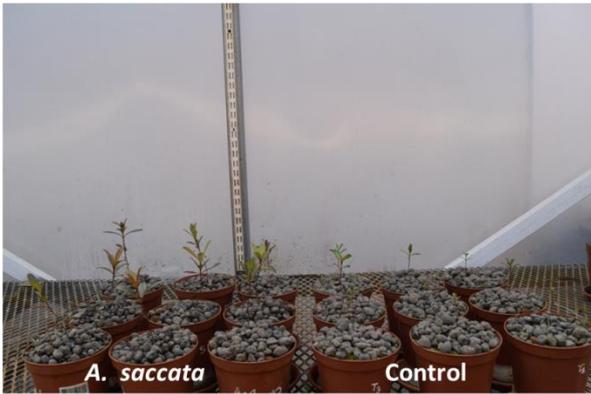


Fig. S1. Plant height (cm) along experiments (days). Data are means \pm standard error of means ($n = 10$).

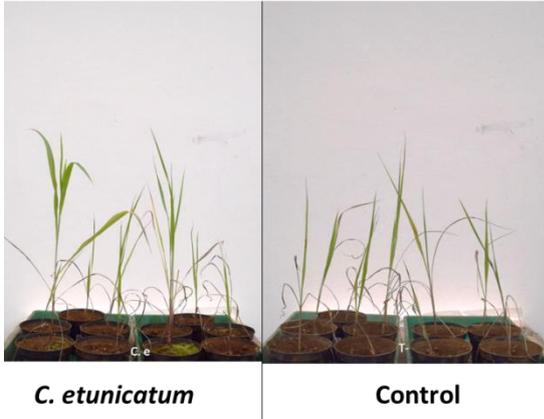
***Acaulospora fragilissima* vs Control**



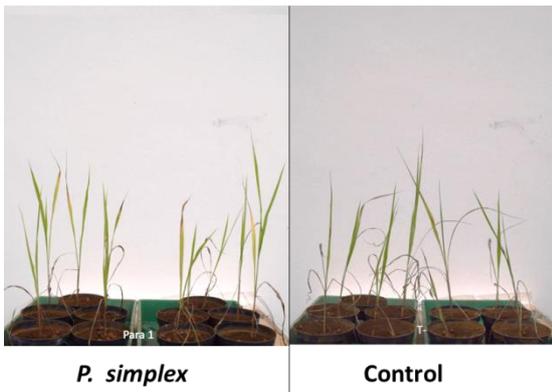
***Acaulospora saccata* vs Control**



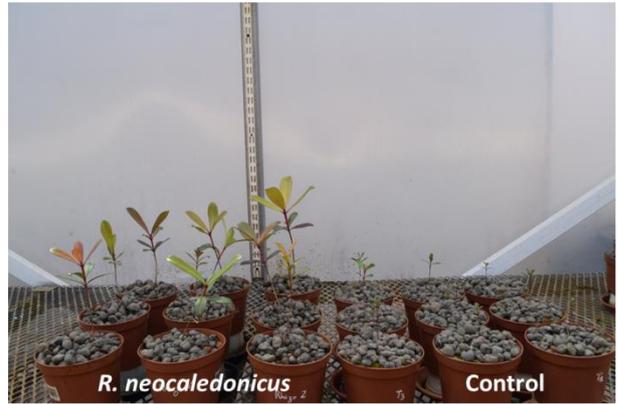
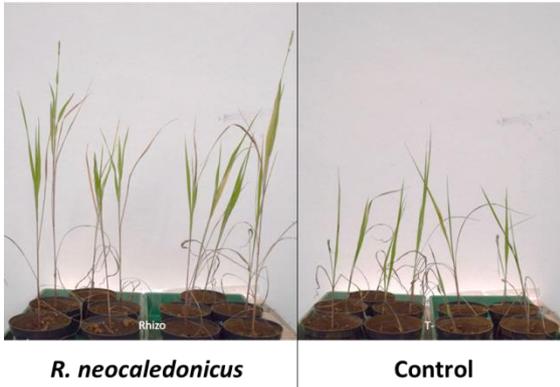
***C. etunicatum* nc vs Control**



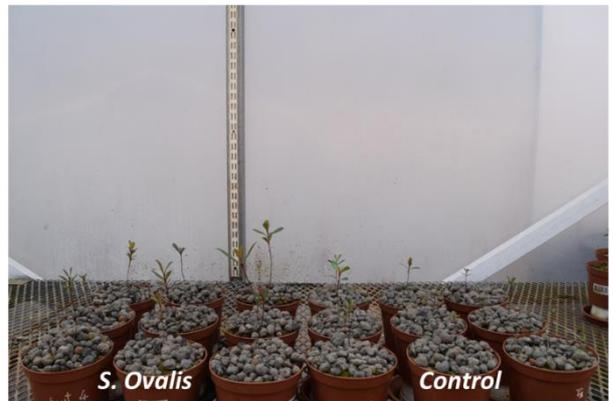
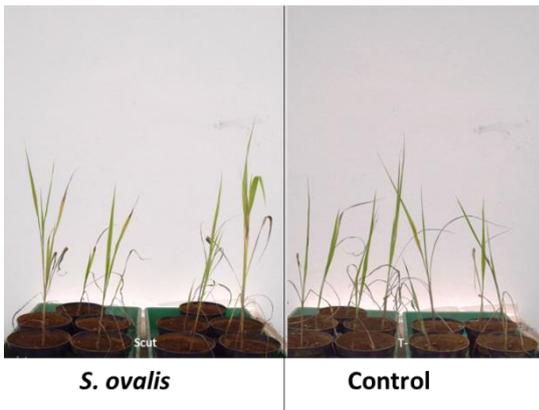
***Pervetustus simplex* nc vs Control**



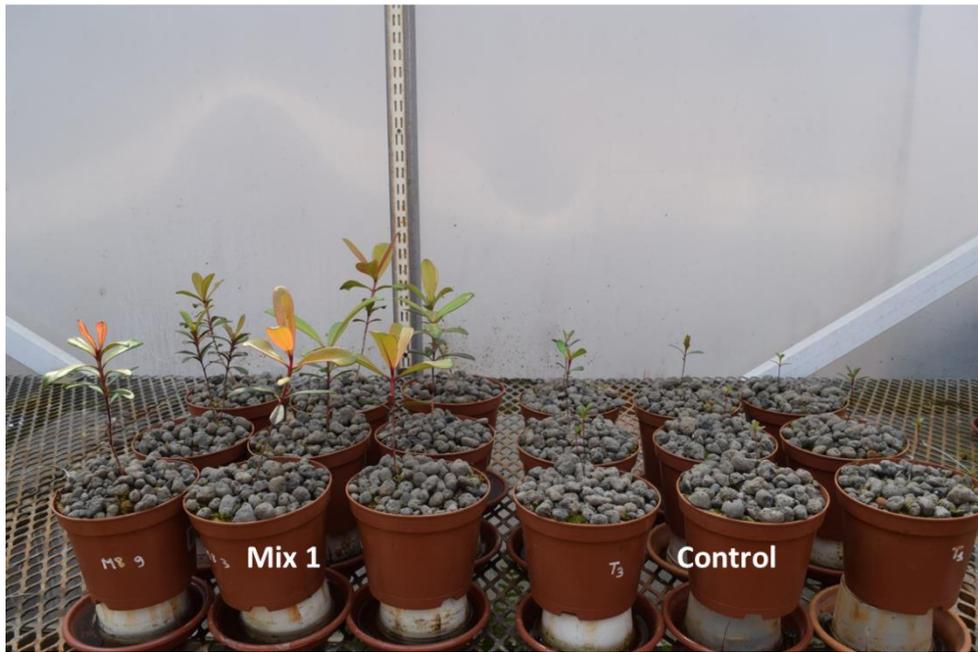
***R. neocaledonicus* vs Control**



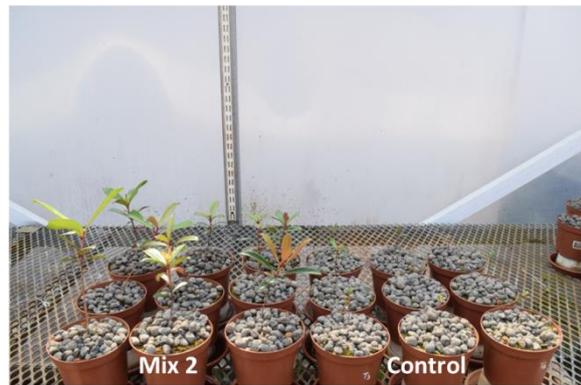
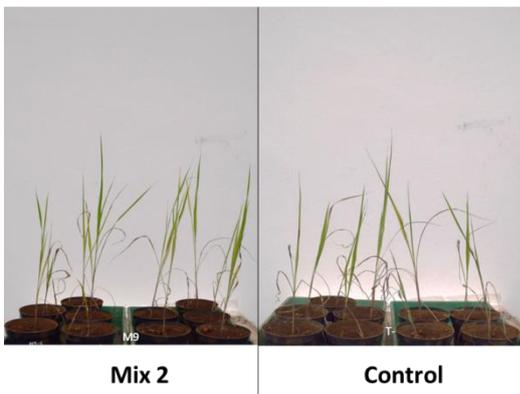
***Scutellospora ovalis* vs Control**



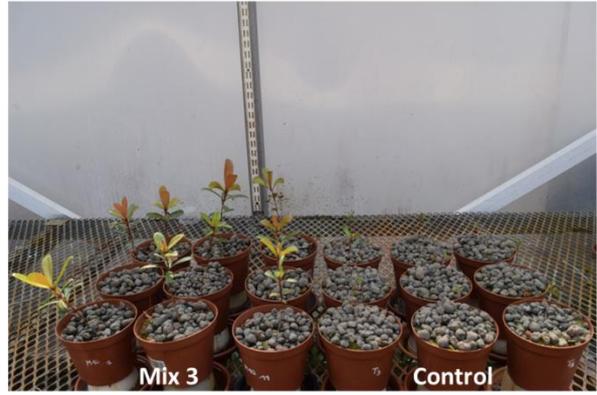
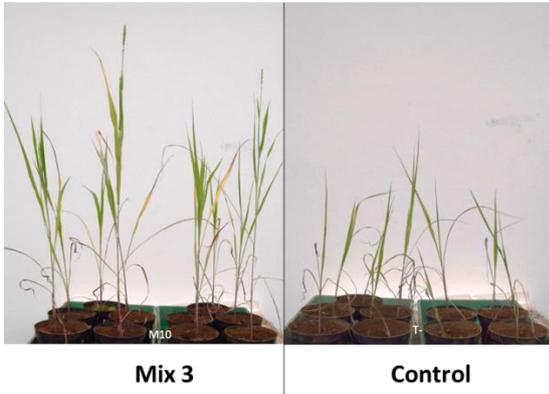
Mix 1 vs Control



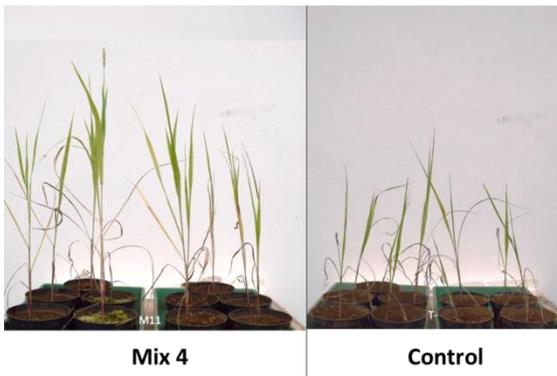
Mix 2 vs Control



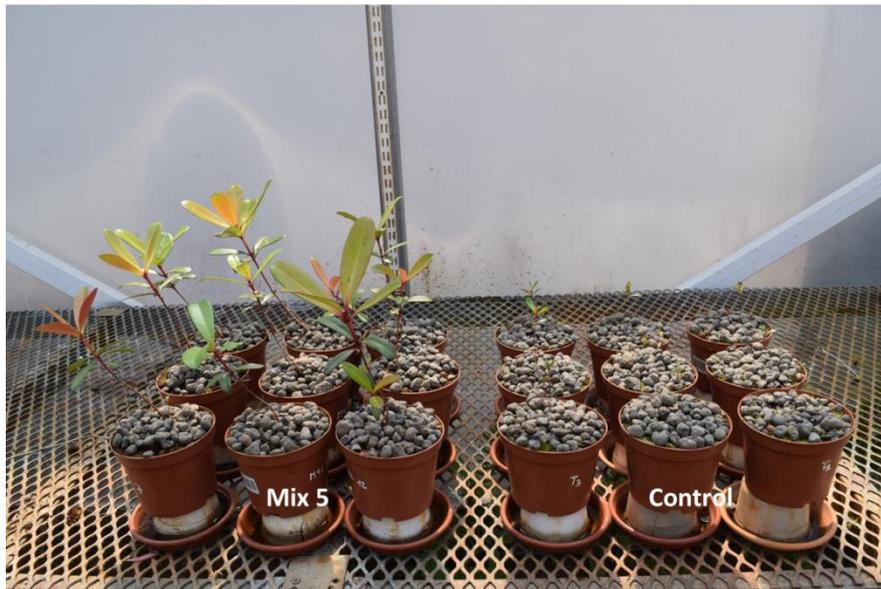
Mix 3 vs Control



Mix 4 vs Control



Mix 5 vs Control



Mix 6 vs Control

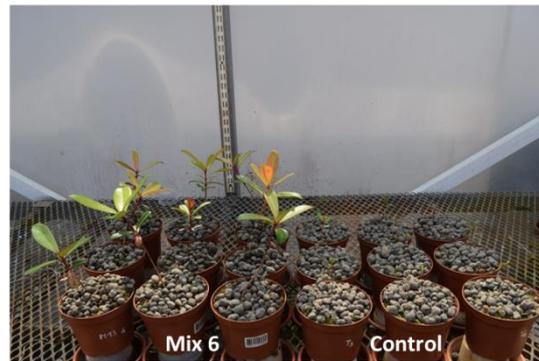
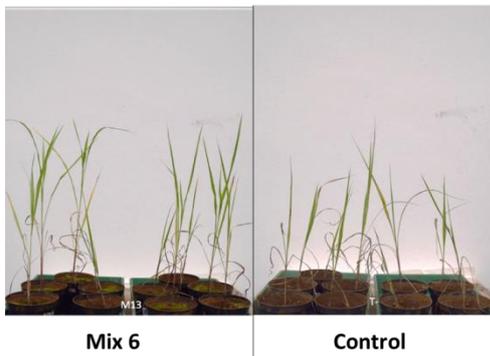


Fig. S2. Photographs of *Metrosideros laurifolia* and *Sorghum vulgare* (for each AMF treatments) after 7 months of growth on ultramafic substrate for *M. laurifolia* and 4 months for *S. vulgare*.

Table S2: Plant growth data values: shoot and root biomasses expressed in g dry weight. Data are means \pm standard error of means ($n = 10$). Data followed by the same letters are not significantly different (Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test, $P \leq 0.05$).

| Plants | Treatments | Shoot biomass (g) | Roots biomass (g) |
|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>M. laurifolia</i> | <i>Control</i> | 0.078 \pm 0.0126 h | 0.049 \pm 0.008 f |
| | <i>Aca fra</i> | 0.16 \pm 0.028 h | 0.071 \pm 0.012 ef |
| | <i>Aca sac</i> | 0.396 \pm 0.107 g | 0.225 \pm 0.05 cd |
| | <i>Cla etu</i> | 0.472 \pm 0.08 fg | 0.21 \pm 0.032 cd |
| | <i>Per sim</i> | 0.72 \pm 0.121 def | 0.361 \pm 0.049 b |
| | <i>Rhi neo</i> | 0.948 \pm 0.148 cd | 0.339 \pm 0.051 b |
| | <i>Scu ova</i> | 0.174 \pm 0.029 h | 0.145 \pm 0.024 de |
| | <i>Mix 1</i> | 1.051 \pm 0.099 bc | 0.299 \pm 0.036 bc |
| | <i>Mix 2</i> | 0.989 \pm 0.217 cde | 0.316 \pm 0.06 bc |
| | <i>Mix 3</i> | 0.882 \pm 0.107 cde | 0.267 \pm 0.022 bc |
| | <i>Mix 4</i> | 0.586 \pm 0.105 efg | 0.282 \pm 0.043 bc |
| | <i>Mix 5</i> | 1.725 \pm 0.112 a | 0.581 \pm 0.045 a |
| <i>Mix 6</i> | 1.301 \pm 0.084 ab | 0.364 \pm 0.029 b | |
| <i>S. vulgare</i> | <i>Control</i> | 0.39 \pm 0.066 d | 0.181 \pm 0.034 cde |
| | <i>Aca fra</i> | 0.37 \pm 0.084 d | 0.157 \pm 0.026 cde |
| | <i>Aca sac</i> | 0.27 \pm 0.034 d | 0.107 \pm 0.008 e |
| | <i>Cla etu</i> | 0.46 \pm 0.145 d | 0.203 \pm 0.037 cd |
| | <i>Per sim</i> | 0.42 \pm 0.039 cd | 0.135 \pm 0.017 de |
| | <i>Rhi neo</i> | 0.92 \pm 0.082 a | 0.479 \pm 0.035 ab |
| | <i>Scu ova</i> | 0.42 \pm 0.084 cd | 0.209 \pm 0.037 cd |
| | <i>Mix 2</i> | 0.44 \pm 0.041 cd | 0.198 \pm 0.029 c |
| | <i>Mix 3</i> | 1.22 \pm 0.188 a | 0.62 \pm 0.081 a |
| | <i>Mix 4</i> | 0.9 \pm 0.111 ab | 0.525 \pm 0.055 ab |
| <i>Mix 6</i> | 0.67 \pm 0.132 bc | 0.355 \pm 0.066 b | |

Table S3. Frequency, intensity of mycorrhization and percentage of arbuscules within infected areas of roots. Data are means \pm standard error of means ($n = 10$). Data followed by the same letters are not significantly different (Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test, $P \leq 0.05$).

| Plant | Treatments | Mycorrhizal frequency | Intensity of mycorrhization | Percentage of arbuscules within infected areas |
|--------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|--|
| <i>Metrosideros laurifolia</i> | Control | 0 c | 0 g | 0 h |
| | <i>Aca fra</i> | 82 \pm 7.1 b | 7.7 \pm 2.5 ef | 51.2 \pm 5.9 fg |
| | <i>Aca sac</i> | 100 a | 23.3 \pm 3.8 e | 75.6 \pm 7.1 bc |
| | <i>Cla etu</i> | 100 a | 80.7 \pm 2.3 c | 59.3 \pm 5.2 ef |
| | <i>Per sim</i> | 100 a | 58.4 \pm 4.5 d | 68.4 \pm 2.6 def |
| | <i>Rhi neo</i> | 100 a | 94 \pm 0.6 a | 72.4 \pm 3.3 cde |
| | <i>Scu ova</i> | 80 \pm 7.7 b | 1.8 \pm 0.3 f | 21.1 \pm 5.2 gh |
| | Mix 1 | 100 a | 94.5 \pm 0.4 a | 88.6 \pm 1.7 a |
| | Mix 2 | 100 a | 89.4 \pm 1.7 b | 72.9 \pm 5.7 bcd |
| | Mix 3 | 100 a | 95 a | 77.4 \pm 4.3 bcd |
| | Mix 4 | 100 a | 86.3 \pm 2.4 b | 78.4 \pm 4.2 bcd |
| | Mix 5 | 100 a | 95 a | 70.5 \pm 6.9 bcd |
| | Mix 6 | 100 a | 93.7 \pm 0.8 a | 83.7 \pm 3.3 ab |
| <i>Sorghum vulgare</i> | Control | 0 d | 0 f | 0 e |
| | <i>Aca fra</i> | 85.7 \pm 4.13 c | 0.9 \pm 0.04 ef | 13.6 \pm 2.9 cd |
| | <i>Aca sac</i> | 100 a | 1.8 \pm 0.7 de | 26.9 \pm 6.9 cd |
| | <i>Cla etu</i> | 100 a | 21.2 \pm 7.1 c | 73 \pm 4.9 b |
| | <i>Per sim</i> | 96 \pm 2.69 b | 4.7 \pm 2 d | 34.3 \pm 7.8 c |
| | <i>Rhi neo</i> | 100 a | 66.3 \pm 6.8 a | 77.3 \pm 5.5 ab |
| | <i>Scu ova</i> | 100 a | 1.4 \pm 0.4 de | 10.6 \pm 3.6 de |
| | Mix 2 | 100 a | 43.6 \pm 9.6 bc | 73 \pm 6.3 ab |
| | Mix 3 | 100 a | 64.6 \pm 9.1 ab | 87.2 \pm 4.01 ab |
| | Mix 4 | 100 a | 46.7 \pm 11.5 bc | 68.7 \pm 9.1 b |
| | Mix 5 | 100 a | 46.4 \pm 10.4 ab | 88 \pm 5.3 a |

Table S4. Plants shoot and roots tissue mineral analysis: essential element for plant mineral nutrition: N, P, K, Ca and Mg. (a) *Metrosideros laurifolia*, (b) *Sorghum vulgare*. Data are means \pm standard error of means ($n = 5$). Data followed by the same letters are not significantly different (Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test, $P \leq 0.05$).

a

| Treatments | Elements | | | | | | |
|------------|---------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | Nitrogen g Kg-1 | Potassium g Kg-1 | Phosphorus mg Kg-1 | Carbon g Kg-1 | Calcium g Kg-1 | Magnesium g Kg-1 | Ca/Mg |
| Control | 8.67 \pm 0.11 ab | 9.05 \pm 0.03 d | 259 \pm 4 bcd | 469.16 \pm 19.63 a | 13.14 \pm 0.53 abc | 3.51 \pm 0.08 a | 3.75 \pm 0.23 d |
| Aca fra | 7.65 \pm 0.14 abc | 10.05 \pm 0.72 bcd | 242.33 \pm 17.03 bcd | 435.44 \pm 9.66 bcde | 12.48 \pm 0.89 abc | 3.38 \pm 0.22 a | 3.73 \pm 0.41 d |
| Aca sac | 7.61 \pm 0.37 bcd | 11.33 \pm 0.61 ab | 235.6 \pm 13.8 cd | 443.76 \pm 3.56 abcd | 11.7 \pm 0.97 bcd | 2.92 \pm 0.09 ab | 4.01 \pm 0.24 d |
| Clu etu | 8.69 \pm 0.36 a | 9.81 \pm 0.49 d | 255.6 \pm 6.49 bcd | 446.31 \pm 6.92 abc | 10.55 \pm 0.85 cd | 2.47 \pm 0.15 c | 4.3 \pm 0.34 cd |
| Per sim | 8.43 \pm 0.28 a | 9.72 \pm 0.71 cd | 269 \pm 19.4 bc | 448.32 \pm 5.86 abcd | 14.52 \pm 1.18 a | 2.96 \pm 0.25 ab | 4.9 \pm 0.27 ab |
| Rhi neo | 6.33 \pm 0.26 fg | 11.52 \pm 0.41 ab | 263.2 \pm 18.8 bcd | 439.56 \pm 3.11 bcde | 9.05 \pm 0.48 d | 2.29 \pm 0.18 c | 3.99 \pm 0.19 d |
| Scu ova | 8.45 \pm 0.22 a | 9.47 \pm 0.57 d | 227.25 \pm 10.35 d | 442.21 \pm 1.96 abcde | 14.66 \pm 0.75 a | 3.69 \pm 0.1 a | 3.98 \pm 0.25 d |
| Mix 1 | 7.62 \pm 0.32 bcd | 11.97 \pm 0.52 a | 405.6 \pm 28.7 a | 432.53 \pm 1.89 e | 14.41 \pm 1.36 ab | 2.49 \pm 0.12 c | 5.75 \pm 0.3 a |
| Mix 2 | 7.32 \pm 0.53 cde | 12.36 \pm 0.93 a | 409.4 \pm 41.8 a | 434.04 \pm 6.62 de | 13.73 \pm 1.71 abc | 2.8 \pm 0.31 bc | 4.88 \pm 0.18 bc |
| Mix 3 | 6.6 \pm 0.31 ef | 11.66 \pm 0.24 a | 359.2 \pm 26.22 a | 433.18 \pm 2.69 e | 12.57 \pm 0.26 abc | 2.46 \pm 0.11 c | 5.15 \pm 0.2 ab |
| Mix 4 | 6.75 \pm 0.31 def | 11.04 \pm 0.31 abc | 280.2 \pm 7.21 b | 434.71 \pm 6.16 cde | 12.21 \pm 0.24 abc | 2.52 \pm 0.02 bc | 4.85 \pm 0.12 bc |
| Mix 5 | 5.18 \pm 0.23 h | 11.32 \pm 0.26 ab | 336.6 \pm 23.43 a | 446 \pm 1.89 ab | 11.39 \pm 0.79 cd | 2.38 \pm 0.12 c | 4.77 \pm 0.14 bc |
| Mix 6 | 5.32 \pm 0.1 gh | 11.52 \pm 0.47 ab | 407.6 \pm 23.8 a | 431.23 \pm 3.56 e | 12.93 \pm 0.91 abc | 2.47 \pm 0.14 c | 5.23 \pm 0.12 ab |
| Control | 8.99 \pm 0.22 a | 6.79 \pm 0.09 de | 508.5 \pm 217.5 abc | 446.83 \pm 33.6 a | 7.47 \pm 0.41 ab | 3.58 \pm 0.4 ab | 2.1 \pm 0.12 cd |
| Aca fra | 7.91 \pm 0.08 ab | 6.02 \pm 0.32 e | 260.67 \pm 3.71 de | 370.8 \pm 7.87 bcde | 7.31 \pm 0.8 ab | 4.83 \pm 0.74 a | 1.56 \pm 0.19 d |
| Aca sac | 6.47 \pm 0.18 def | 6.68 \pm 0.75 de | 216 \pm 15.87 e | 435.16 \pm 2.95 abcd | 7.55 \pm 0.87 ab | 2.55 \pm 0.12 de | 2.97 \pm 0.35 abc |
| Clu etu | 8.12 \pm 0.14 a | 6.2 \pm 0.2 e | 276 \pm 11.93 de | 423.09 \pm 6.21 abc | 8.14 \pm 0.57 ab | 2.48 \pm 0.1 e | 3.27 \pm 0.13 ab |
| Per sim | 6.51 \pm 0.44 de | 8.07 \pm 0.27 bcd | 290 \pm 12.1 cd | 410.66 \pm 5.47 abcd | 8.5 \pm 1 a | 2.66 \pm 0.14 cde | 3.23 \pm 0.38 ab |
| Rhi neo | 7.89 \pm 0.36 ab | 6.75 \pm 0.86 de | 288.75 \pm 12.06 cd | 388.57 \pm 6.59 bcde | 6.17 \pm 0.4 b | 3.25 \pm 0.25 abc | 1.93 \pm 0.17 d |
| Scu ova | 8.6 \pm 0.41 a | 6.24 \pm 0.33 e | 291.5 \pm 23.62 cd | 431.87 \pm 3 abcde | 7.72 \pm 0.67 ab | 3.37 \pm 0.34 ab | 2.3 \pm 0.03 cd |
| Mix 1 | 7.27 \pm 0.18 bc | 8.89 \pm 0.76 ab | 360 \pm 18.35 ab | 411.78 \pm 7.15 e | 8.77 \pm 0.35 a | 3 \pm 0.15 bcd | 2.95 \pm 0.18 abc |
| Mix 2 | 6.87 \pm 0.1 cd | 9.89 \pm 0.52 a | 335 \pm 15.67 abc | 400.9 \pm 10.3 de | 8.22 \pm 0.51 a | 2.39 \pm 0.18 e | 3.47 \pm 0.21 a |
| Mix 3 | 5.86 \pm 0.42 ef | 8.28 \pm 0.37 bc | 317.8 \pm 24.1 bc | 418.11 \pm 6 e | 8.55 \pm 0.89 a | 2.39 \pm 0.23 e | 3.72 \pm 0.54 a |
| Mix 4 | 5.93 \pm 0.17 f | 7.32 \pm 0.45 cde | 267.8 \pm 7.75 de | 434.34 \pm 3.96 cde | 7.96 \pm 0.63 ab | 2.4 \pm 0.12 e | 3.35 \pm 0.32 ab |
| Mix 5 | 6.42 \pm 0.12 def | 9.38 \pm 0.09 a | 340.8 \pm 9.17 abc | 405.75 \pm 2.51 ab | 9.07 \pm 0.76 a | 3.53 \pm 0.22 ab | 2.6 \pm 0.23 bcd |
| Mix 6 | 6.01 \pm 0.21 ef | 9.72 \pm 0.36 a | 380.6 \pm 13.43 a | 423.87 \pm 11 e | 9.07 \pm 0.7 a | 3.35 \pm 0.42 abc | 2.85 \pm 0.33 abc |

b

| Treatments | Elements | | | | | | |
|------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Nitrogen g Kg-1 | Potassium g Kg-1 | Phosphorus mg Kg-1 | Carbon g Kg-1 | Calcium g Kg-1 | Magnesium g Kg-1 | Ca/Mg |
| Control | 16.79 \pm 1.46 a | 15.19 \pm 1.33 ab | 282 \pm 9.59 abc | 409.71 \pm 9.29 bc | 5.18 \pm 0.35 a | 2.34 \pm 0.18 bc | 2.24 \pm 0.12 a |
| Aca fra | 14.3 \pm 2.43 ab | 16.51 \pm 0.34 a | 291 \pm 23.8 abc | 402.18 \pm 7.55 bc | 5.09 \pm 0.97 ab | 3.05 \pm 0.79 abc | 1.73 \pm 0.11 bc |
| Aca sac | 17.33 \pm 1.81 a | 15.7 \pm 1.8 abc | 280.33 \pm 19.91 abc | 410.12 \pm 10.54 bc | 5.38 \pm 1.74 ab | 3.09 \pm 0.57 ab | 1.67 \pm 0.24 bcd |
| Clu etu | 13.56 \pm 1.64 ab | 17.03 \pm 0.89 a | 297.6 \pm 17.99 a | 396.38 \pm 6.04 c | 3.88 \pm 0.32 bc | 2.24 \pm 0.29 bc | 1.79 \pm 0.1 abc |
| Per sim | 12.11 \pm 0.78 abc | 13.05 \pm 0.53 c | 298 \pm 12.07 a | 413.33 \pm 0.72 abc | 4.57 \pm 0.42 ab | 3.36 \pm 0.25 a | 1.35 \pm 0.03 d |
| Rhi neo | 4.27 \pm 0.46 c | 14.80 \pm 0.54 abc | 248.8 \pm 9.75 c | 414.56 \pm 1.88 ab | 2.47 \pm 0.26 d | 1.37 \pm 0.14 d | 1.81 \pm 0.05 ab |
| Scu ova | 11.51 \pm 1.68 abc | 13.82 \pm 0.97 bc | 289.4 \pm 12.18 ab | 400.14 \pm 15.94 abc | 4.68 \pm 0.4 ab | 2.84 \pm 0.4 abc | 1.69 \pm 0.09 bc |
| Mix 2 | 10.82 \pm 1.70 abc | 17.01 \pm 0.88 a | 285.8 \pm 11.79 abc | 407.61 \pm 5.12 abc | 3.13 \pm 0.28 cd | 2.05 \pm 0.19 c | 1.53 \pm 0.07 cd |
| Mix 3 | 6.38 \pm 0.94 bc | 14.84 \pm 0.47 bc | 259 \pm 9.44 bc | 428.81 \pm 10.32 a | 2.36 \pm 0.18 d | 1.29 \pm 0.1 d | 1.87 \pm 0.19 bc |
| Mix 4 | 6.24 \pm 0.34 bc | 13.14 \pm 0.21 c | 240.8 \pm 19.59 c | 413.28 \pm 5.66 bc | 2.77 \pm 0.19 d | 1.52 \pm 0.06 d | 1.84 \pm 0.15 abc |
| Mix 6 | 10.84 \pm 1.20 abc | 15.34 \pm 0.48 ab | 307.8 \pm 13.79 a | 416.68 \pm 3.37 ab | 4.47 \pm 0.39 ab | 2.93 \pm 0.37 ab | 1.56 \pm 0.1 bcd |
| Control | 8.57 \pm 0.60 ab | 4.49 \pm 0.43 b | 257.75 \pm 12.7 bc | 295.07 \pm 26.22 ab | 4.28 \pm 0.42 bcd | 2.18 \pm 0.05 bcd | 1.95 \pm 0.15 abc |
| Aca fra | 8.37 \pm 0.78 abc | 5.15 \pm 0.03 ab | 262.5 \pm 1.5 abc | 336.13 \pm 16.85 a | 4.17 \pm 0.3 bcd | 1.79 \pm 0.07 d | 2.32 \pm 0.07 a |
| Aca sac | 9.95 \pm 0.11 a | 4.76 \pm 0.36 ab | 253 \pm 1 bc | 351.4 \pm 25.83 a | 3.55 \pm 0.37 cd | 1.99 \pm 0.1 cd | 1.77 \pm 0.09 abc |
| Clu etu | 7.55 \pm 0.21 abcd | 4.67 \pm 0.47 b | 269.75 \pm 18.77 abc | 276.07 \pm 20.34 ab | 3.97 \pm 0.45 cd | 2.38 \pm 0.18 bc | 1.67 \pm 0.13 bc |
| Per sim | 6.6 \pm 0.50 cde | 5.41 \pm 0.7 ab | 251.25 \pm 7.9 bc | 264.22 \pm 22.29 b | 5.66 \pm 0.55 ab | 2.45 \pm 0.18 bc | 2.3 \pm 0.08 a |
| Rhi neo | 7.22 \pm 0.29 bcde | 6.34 \pm 0.3 a | 314.8 \pm 13.21 a | 330.28 \pm 10.08 a | 4.28 \pm 1.04 bcd | 2.69 \pm 0.48 bc | 1.56 \pm 0.19 bc |
| Scu ova | 7.39 \pm 0.54 bcde | 4.22 \pm 0.55 b | 239.75 \pm 7.04 c | 294.69 \pm 20.44 ab | 6.31 \pm 1.04 a | 2.45 \pm 0.09 bc | 2.55 \pm 0.34 a |
| Mix 2 | 7.72 \pm 0.69 abcd | 5.28 \pm 0.17 ab | 241.75 \pm 11.49 c | 281.92 \pm 40.76 ab | 2.63 \pm 0.37 d | 1.75 \pm 0.16 d | 1.51 \pm 0.16 c |
| Mix 3 | 6.81 \pm 0.11 de | 5.4 \pm 0.61 ab | 269.6 \pm 15.34 abc | 296.4 \pm 14.09 ab | 5.46 \pm 0.65 abc | 2.33 \pm 0.15 bc | 2.32 \pm 0.2 a |
| Mix 4 | 6.2 \pm 0.30 e | 4.60 \pm 0.47 b | 251.4 \pm 11.35 bc | 265.28 \pm 20.59 b | 5.61 \pm 0.31 ab | 2.72 \pm 0.18 ab | 2.09 \pm 0.12 ab |
| Mix 6 | 7.37 \pm 0.53 bcd | 4.78 \pm 0.64 b | 289.4 \pm 18.4 ab | 266.88 \pm 30.17 ab | 7.22 \pm 0.43 a | 4.47 \pm 0.84 a | 1.79 \pm 0.28 abc |

Table S5. Plants shoot and roots tissue mineral analysis: metal content: Fe, Co, Cr, Mn, Ni and translocation factor (TF). (a) *Metrosideros laurifolia*, (b) *Sorghum vulgare*. Data are

means \pm standard error of means ($n = 5$). Data followed by the same letters are not significantly different (Scheffe post-hoc test or a Kruskal-Wallis test, $P \leq 0.05$).

a

| Treatments | Nickel (mg/kg) | | Manganese (mg/kg) | | Fer (mg/kg) | | Chromium (mg/kg) | | Cobalt (mg/kg) | | | |
|------------|----------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| | Shoot | Root | Shoot | Root | Shoot | Root | Shoot | Root | Shoot | Root | | |
| Control | 72.26 \pm 21.52 a | 558.11 \pm 95.34 abc | 0.14 \pm 0.06 abc | 1563.51 \pm 346.5 abc | 23270.51 \pm 2823.5 abc | 0.14 \pm 0.04 a | 74.98 \pm 26.26 bcde | 628.64 \pm 30.06 abc | 0.12 \pm 0.05 bcd | 13.06 \pm 1.09 a | 111.97 \pm 25.58 abcd | 0.13 \pm 0.04 a |
| Aca fra | 58.27 \pm 18.87 ab | 790.56 \pm 155.68 a | 0.09 \pm 0.05 cdef | 2642 \pm 420.08 a | 33571.33 \pm 68883.52 a | 0.04 \pm 0.01 bcd | 59.85 \pm 16.54 cde | 1124.32 \pm 115.68 a | 0.06 \pm 0.02 cde | 8.12 \pm 0.83 ab | 171.7 \pm 25.03 a | 0.05 \pm 0.01 cd |
| Aca sac | 79.41 \pm 26.82 ab | 333.34 \pm 33.21 f | 0.22 \pm 0.06 ab | 1156.65 \pm 97.75 cd | 15169 \pm 1820.96 ef | 0.06 \pm 0.01 abc | 60.72 \pm 18.81 de | 295.93 \pm 33.62 f | 0.19 \pm 0.05 abc | 6.5 \pm 0.86 abcd | 76.83 \pm 6.09 de | 0.06 \pm 0.01 ab |
| Cla etu | 36.39 \pm 8.37 abc | 377.46 \pm 36.02 def | 0.09 \pm 0.02 abc | 1415.61 \pm 262.62 bc | 15509.41 \pm 1763.42 def | 0.06 \pm 0.01 abc | 34.64 \pm 9.3 ef | 361.99 \pm 47.64 ef | 0.09 \pm 0.02 bcde | 5.56 \pm 0.77 cde | 98.41 \pm 11.52 bcd | 0.06 \pm 0.01 bc |
| Per sim | 37.77 \pm 4.69 abc | 449.84 \pm 43.15 cde | 0.09 \pm 0.02 bcd | 1282.64 \pm 65.17 cd | 20414.61 \pm 1914.79 bcde | 0.05 \pm 0.01 abc | 35.65 \pm 2.4 def | 444.99 \pm 48.78 cde | 0.03 \pm 0.02 cde | 5.81 \pm 0.8 bcde | 121.81 \pm 3.66 ab | 0.05 \pm 0.01 cd |
| Rhi neo | 20.42 \pm 5.79 c | 601.51 \pm 97.81 abc | 0.04 \pm 0.01 ef | 1510 \pm 206.34 bc | 30797.75 \pm 4609.23 a | 0.02 \pm 0.004 d | 18.62 \pm 6 f | 657.83 \pm 152.6 bcd | 0.03 \pm 0.01 de | 3.69 \pm 0.43 fgh | 122.88 \pm 21.53 abc | 0.03 \pm 0.01 de |
| Sci ova | 62.17 \pm 12.14 a | 355.03 \pm 28.89 ef | 0.17 \pm 0.02 a | 1257.25 \pm 49.71 cd | 11708.25 \pm 1352.16 f | 0.09 \pm 0.01 a | 54.15 \pm 12.36 de | 284.51 \pm 31.77 f | 0.19 \pm 0.05 ab | 7.44 \pm 0.9 abc | 71.54 \pm 4.92 e | 0.11 \pm 0.01 a |
| Mix 1 | 19.81 \pm 4.34 c | 614.23 \pm 61.38 ab | 0.03 \pm 0.01 f | 1027.24 \pm 84.49 d | 31462.84 \pm 4051.1 a | 0.02 \pm 0.01 d | 18.04 \pm 3.91 f | 585.26 \pm 87.88 bcd | 0.04 \pm 0.01 e | 2.60 \pm 0.52 h | 108.72 \pm 11.49 bcd | 0.03 \pm 0.01 e |
| Mix 2 | 34.87 \pm 4.4 abc | 439.81 \pm 33.12 cdef | 0.08 \pm 0.02 cde | 1155.24 \pm 66.33 cd | 19410.61 \pm 2440.97 cde | 0.04 \pm 0.01 bcd | 35.55 \pm 9.3 ef | 450.91 \pm 44.19 de | 0.08 \pm 0.02 cde | 4.81 \pm 0.41 def | 103.65 \pm 10.64 bcd | 0.05 \pm 0.01 cd |
| Mix 3 | 49.21 \pm 11.18 ab | 464.86 \pm 32.61 bcd | 0.10 \pm 0.02 abc | 1150.64 \pm 56.82 cd | 20744.61 \pm 1063.63 bcd | 0.04 \pm 0.01 bcd | 127.13 \pm 7.39 ab | 520.55 \pm 49.44 bcd | 0.26 \pm 0.03 a | 4.68 \pm 0.33 efg | 88.41 \pm 3.36 cde | 0.05 \pm 0.003 c |
| Mix 4 | 66.25 \pm 24.7 ab | 431.31 \pm 50.44 cdef | 0.18 \pm 0.09 abc | 1661.21 \pm 104.86 ab | 15965.21 \pm 862.29 cdef | 0.07 \pm 0.02 abc | 151.59 \pm 15.45 a | 483.99 \pm 49.44 cde | 0.34 \pm 0.07 a | 7.59 \pm 1.77 abc | 104.24 \pm 7.38 bcd | 0.07 \pm 0.01 abc |
| Mix 5 | 32.09 \pm 12.13 bc | 649.13 \pm 49.98 a | 0.04 \pm 0.01 def | 1428.21 \pm 131.43 abc | 32882.84 \pm 2597.56 a | 0.02 \pm 0.01 d | 90.95 \pm 24.58 bcd | 749.61 \pm 61.7 ab | 0.13 \pm 0.04 bc | 2.77 \pm 0.6 h | 125.61 \pm 10.81 ab | 0.02 \pm 0.004 e |
| Mix 6 | 55.71 \pm 10.88 ab | 627.16 \pm 54.71 ab | 0.09 \pm 0.01 cd | 1150.64 \pm 141.78 cd | 27573.61 \pm 3552.75 ab | 0.03 \pm 0.003 cd | 141.33 \pm 29.09 abc | 743.82 \pm 86.59 ab | 0.18 \pm 0.03 ab | 3.16 \pm 0.37 gh | 103.71 \pm 14.61 bcd | 0.03 \pm 0.003 de |

b

| Treatments | Nickel (mg/kg) | | Manganese (mg/kg) | | Fer (mg/kg) | | Chromium (mg/kg) | | Cobalt (mg/kg) | | | |
|------------|----------------------|---------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| | Shoot | Root | Shoot | Root | Shoot | Root | Shoot | Root | Shoot | Root | | |
| Control | 160.11 \pm 61.38 a | 1392 \pm 171.71 ab | 0.12 \pm 0.02 abc | 2719.51 \pm 194.75 bc | 65743.75 \pm 7323.9 ab | 0.06 \pm 0.01 abc | 152 \pm 29.3 a | 1781.25 \pm 281.12 abc | 0.09 \pm 0.02 abc | 11.66 \pm 2.47 ab | 310.75 \pm 19.19 ab | 0.04 \pm 0.004 ab |
| Aca fra | 151.86 \pm 58.06 a | 835.54 \pm 55.5 de | 0.11 \pm 0.01 a | 3443 \pm 5 abc | 45130 \pm 24252 bc | 0.15 \pm 0.01 abc | 2484 \pm 114.6 a | 976 \pm 2 de | 0.25 \pm 0.01 b | 26.23 \pm 16.4 ab | 280.5 \pm 3.5 ab | 0.09 \pm 0.004 a |
| Aca sac | 71.11 \pm 20.2 abc | 543.51 \pm 58.5 e | 0.15 \pm 0.08 a | 2344 \pm 396 c | 29798.51 \pm 4938.5 c | 0.07 \pm 0.062 a | 106.33 \pm 23.17 abc | 550 \pm 54 e | 0.19 \pm 0.11 a | 13.72 \pm 8.9 ab | 237 \pm 51 b | 0.06 \pm 0.035 a |
| Cla etu | 50.76 \pm 8.81 cd | 1221.75 \pm 122.9 abcd | 0.04 \pm 0.01 bc | 4989.75 \pm 661.43 a | 66443.25 \pm 4021.8 ab | 0.04 \pm 0.01 abc | 73.21 \pm 16.94 bc | 1597 \pm 127.49 abcde | 0.05 \pm 0.02 bc | 16.53 \pm 7.8 ab | 390 \pm 38.2 a | 0.04 \pm 0.012 a |
| Per sim | 114.18 \pm 19.38 a | 1317.54 \pm 188.5 abcd | 0.09 \pm 0.01 abc | 3643 \pm 513.78 ab | 90081.75 \pm 18143.21 ab | 0.04 \pm 0.008 abc | 133.82 \pm 20.81 a | 1555 \pm 271.99 bcde | 0.09 \pm 0.01 abc | 17.46 \pm 2.86 a | 413.25 \pm 35.47 a | 0.04 \pm 0.006 a |
| Rhi neo | 82.44 \pm 13.37 ab | 1193.44 \pm 137.52 bcde | 0.07 \pm 0.02 abc | 2307.24 \pm 30.96 c | 56675.84 \pm 6764.9 bc | 0.03 \pm 0.009 cd | 105.21 \pm 13.56 ab | 1510.2 \pm 258.88 bcde | 0.07 \pm 0.02 abc | 4.42 \pm 0.91 de | 219.61 \pm 37.3 b | 0.02 \pm 0.008 cde |
| Sci ova | 83.46 \pm 15.79 ab | 1158.51 \pm 123.3 bcde | 0.07 \pm 0.02 abc | 2833 \pm 271.11 bc | 89286 \pm 17934.22 ab | 0.03 \pm 0.013 abc | 108.18 \pm 8.88 ab | 1784 \pm 195.64 abcd | 0.06 \pm 0.02 abc | 9.41 \pm 1.88 bc | 301.75 \pm 21.06 ab | 0.03 \pm 0.006 abc |
| Mix 2 | 73.11 \pm 4.78 abc | 875.25 \pm 59.59 cde | 0.08 \pm 0.01 abc | 3096.25 \pm 867.63 bc | 46886 \pm 10013.68 bc | 0.04 \pm 0.005 bc | 112.82 \pm 6.47 ab | 1170.25 \pm 267.56 cde | 0.14 \pm 0.02 abc | 9.74 \pm 1.7 bc | 279.54 \pm 49.75 b | 0.03 \pm 0.003 abc |
| Mix 3 | 61.72 \pm 9.26 bc | 1350 \pm 150.86 abc | 0.04 \pm 0.01 bc | 2934.84 \pm 32.96 bc | 116277.81 \pm 17407.44 a | 0.01 \pm 0.002 e | 70.85 \pm 10.69 bc | 2004.44 \pm 273.97 ab | 0.04 \pm 0.01 cd | 3.71 \pm 0.41 de | 277.23 \pm 33.39 b | 0.01 \pm 0.001 de |
| Mix 4 | 24 \pm 2.91 d | 1645.81 \pm 75.74 a | 0.01 \pm 0.004 d | 165.44 \pm 0.99 de | 3190.44 \pm 298.66 abc | 0.05 \pm 0.01 d | 35.21 \pm 3.96 d | 2445.44 \pm 372.97 a | 0.01 \pm 0.01 d | 3.36 \pm 0.42 e | 314 \pm 27.85 ab | 0.01 \pm 0.002 e |
| Mix 6 | 46.26 \pm 11.51 cd | 1516 \pm 171.16 abc | 0.03 \pm 0.006 cd | 2778.44 \pm 251.46 bc | 108963.21 \pm 14268.12 a | 0.01 \pm 0.003 de | 62.21 \pm 13.5 d | 2053.44 \pm 273.63 abc | 0.03 \pm 0.01 cd | 6.14 \pm 0.86 cd | 271.24 \pm 22.37 b | 0.02 \pm 0.003 bcd |

Conclusion générale de la thèse

Les milieux ultramafiques de Nouvelle-Calédonie présentent de fortes concentrations en métaux lourds toxiques, mais aussi de faibles concentrations en nutriments essentiels et un fort déséquilibre du rapport Ca/Mg. Pour se protéger de ces différentes contraintes, les plantes, vivants sur ces milieux extrêmes ont développé des mécanismes adaptatifs spécifiques. Les champignons mycorhiziens à arbuscules jouent un rôle majeur dans l'adaptation des espèces végétales endémiques à ces milieux extrêmes (Perrier *et al.* 2006; Amir *et al.* 2007, 2013; Lagrange *et al.* 2011, 2013). Ainsi, isoler, identifier et caractériser les CMA de ces milieux est cruciale, car l'originalité de la flore de ces sols suggère une originalité de leurs symbiotes. Par ailleurs, il est également nécessaire d'étudier les rôles de ces symbiotes dans l'adaptation des plantes aux contraintes édaphiques, afin de pouvoir, à long terme, utiliser leurs services écosystémiques pour la restauration écologique. Les études réalisées dans le cadre de cette thèse se sont d'abord focalisées sur l'isolement et l'identification de différents taxons de CMA, avant d'analyser leurs rôles dans la symbiose, notamment les effets additifs de plusieurs isolats.

L'étude sur la caractérisation de différentes espèces de CMA est la première du genre en Nouvelle-Calédonie. Les études précédentes sur la restauration des milieux ultramafiques de Nouvelle-Calédonie ont montré que pratiquement toutes les plantes étaient endomycorhizées et ont souligné leur importance pour la restauration écologique (Amir *et al.* 1997 ; Amir *et al.* 2007 ; Amir *et al.* 1997 ; Perrier *et al.* 2006 ; Amir & Ducouso 2010 ; Lagrange *et al.* 2011). La diversité des CMA en milieux ultramafiques a été étudiée (Fitzsimons *et al.* 2010 ; Schechter & Bruns 2008, 2012 ; Gensous *et al.* 2014 ; Kohout *et al.* 2015) suggérant l'existence de nouvelles espèces de CMA. Cependant, les CMA de ces milieux n'ont généralement pas été caractérisés et identifiés clairement. Cette étude présente la description de 5 nouvelles espèces de CMA et d'un isolat et a fait l'objet de deux articles actuellement sous presse. Le premier article présente la description d'une espèce (*Pervetustus simplex*) découverte dans différents milieux situés dans plusieurs lieux géographiques et a été rédigé en collaboration avec le Pr. Janusz Blaszowski. Cet article a permis d'ériger une nouvelle famille (Pervetustaceae) et un nouveau genre (Pervetustus). Le deuxième article présente la description de 4 nouvelles espèces (*A. saccata*, *A. fragilissima*, *R. neocaledonicus* et *S. ovalis*) de CMA isolées d'un sol ultramafiques de Nouvelle-Calédonie. Un isolat (*C. etunicatum nc*) provenant du même milieu a également été découvert et affilié à l'espèce

Claroideoglossum etunicatum. Ces résultats confortent l'hypothèse que les symbiotes des milieux ultramafiques de Nouvelle-Calédonie présentent une grande originalité.

Ce travail a également permis la mise au point d'une nouvelle méthode d'identification des CMA à partir des spores. L'identification taxonomique des CMA reste délicate, ce qui est préjudiciable pour la recherche académique, les cultures de collections et les producteurs d'*inoculum*, qui doivent certifier leurs produits. L'identification de ces champignons est traditionnellement effectuée sur la base de la morphologie des spores (McNeill *et al.* 2006). Les données moléculaires (séquences d'ADN) ont été utilisées avec succès pour développer des outils d'identification moléculaire et évaluer leur diversité dans l'environnement (Simons *et al.* 1992 ; Jansa *et al.* 2008). Cependant, ces méthodes nécessitent une expertise considérable et ne sont pas adaptées pour des contrôles qualités "de routine" nécessaire pour les cultures de collections et les producteurs d'*inoculum* et ne permettent pas toujours une identification jusqu'à l'espèce, encore moins au niveau intraspécifique (Stockinger *et al.* 2014). L'étude réalisée ici a permis de découvrir que le biotypage protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF est une approche très efficace pour l'identification des CMA. Dix-neuf isolats appartenant à quatorze espèces, sept genres et cinq familles ont été clairement différenciés par biotypage MALDI au niveau de l'espèce, et la différenciation intraspécifique a été réalisée pour la majorité d'entre eux. L'identification des CMA par MALDI-TOF-MS pourrait être très utile, non seulement pour la recherche, mais aussi dans des contextes agricoles et environnementaux. L'identification rapide et précise par MALDI-TOF-MS des CMA à partir de leurs spores, offre une véritable alternative aux méthodes morphologiques et moléculaires conventionnelles. Cette étude devrait permettre d'aider à développer l'utilisation des CMA à grande échelle.

Les différents isolats identifiés et cultivés en laboratoire ont été testés en conditions expérimentales afin d'évaluer leurs fonctions individuelles et collectives dans la symbiose mycorhizienne, sur sol ultramafique. Cela a permis de prouver qu'il existe une synergie de ces différents isolats dans leurs effets sur le développement et l'adaptation des plantes. Les résultats obtenus suggèrent que quand une plante est face à plusieurs facteurs de stress (sol ultramafique), l'utilisation de plusieurs espèces de CMA appartenant à plusieurs familles différentes est plus appropriée pour augmenter la biomasse, la nutrition minérale, le rapport Ca/Mg et la tolérance aux métaux lourds, en comparaison avec une inoculation monospécifique. Nos résultats supportent l'hypothèse avancée par certains auteurs, selon laquelle l'augmentation de la diversité taxonomique des CMA (au niveau de la famille) est

positivement corrélée à l'amélioration du fitness de la plante (Hart & Reader 2002; Maherali & Klironomos 2007; Yang *et al.* 2017) ; cependant cette hypothèse semble se vérifier uniquement lorsque les CMA utilisés sont adaptés à la plante et que les deux partenaires sont également adaptés au substrat de culture.

Ces nouvelles espèces de CMA ayant un potentiel important en termes d'amélioration de la croissance des plantes et de leur adaptation aux milieux contraints, ouvrent une nouvelle perspective pour l'utilisation des CMA dans le cadre de la restauration des sols ultramafiques dégradés. Ainsi, dans un avenir proche, cette étude permettra d'optimiser les services écosystémiques de ces CMA pour une bonne restauration écologique des terrains dégradés par l'activité minière sur sols ultramafiques.

La rédaction d'une synthèse complète sur la taxonomie des Glomeromycota a également été entreprise et a permis de faire le point sur l'historique de la taxonomie des CMA, sur leur diversité taxonomique, sur les caractères morphologiques utilisés pour l'identification des CMA, sur l'affiliation phylogénétique de chacune des espèces de CMA décrites et sur le nombre d'espèces décrites jusqu'à aujourd'hui (Annexe 1).

Bibliographie

- Amir, H, Jourand, P., Cavaloc, Y., & Ducouso, M. (2013). Role of mycorrhizal fungi on the alleviation of heavy metal toxicity on plant. In Solaiman (Ed.), *Mycorrhizal fungi : Use in sustainable agriculture and forestry* (Springer.). Soil Biology Series.
- Amir H, Ducouso M (2010) Les bactéries et les champignons du sol sur roches ultramafiques. In : L'huillier L, Jaffré T, Wulff A (eds) *Mines et Environnement en Nouvelle-Calédonie : les milieux sur substrats ultramafiques et leur restauration*. IAC, Nouméa, New Caledonia, pp. 129-146.
- Amir H, Jasper DA, Abbott LK (2008) Tolerance and induction of tolerance to Ni of arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils. *Mycorrhiza* 19:1–6. doi: 10.1007/s00572-008-0197-y
- Amir, H, Perrier, N., & Jaffré, F. R. T. (2007). Relationships between Ni-hyperaccumulation and mycorrhizal status of different endemic plant species from New Caledonian ultramafic soils. *Plant and Soil*, 293(1-2), 23-35.
- Amir H, Pineau R, Violette Z (1997) Premiers résultats sur les endomycorhizes des plantes de maquis miniers de Nouvelle-Calédonie. In: Jaffré T, Reeves RD, Becquer T (eds) *The ecology of ultramafic and metalliferous areas*. ORSTOM, Nouméa, New Caledonia, pp 79-85.
- Fitzsimons MS, Miller RM (2010) Serpentine soil has little influence on the root-associated microbial community composition of the serpentine tolerant grass species *Avenula sulcata*. *Plant and Soil* 330:393–405. doi: 10.1007/s11104-009-0213-9
- Gensous S (2014) Les champignons mycorrhiziens à arbuscules des maquis miniers de la Nouvelle Calédonie : Diversité, rôle dans l'adaptation des plantes à la contrainte ultramafique et interaction avec des rhizobactéries promotrices de la croissance. ResearchGate. doi: 10.6098/2014NCAL0062
- Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic Basis for Variation in the Colonization Strategy of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The New Phytologist* 153:335–344
- Jansa J, Smith FA, Smith SE (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177:779–789 . doi: [10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x)
- Kohout P, Doubková P, Bahram M, et al (2015) Niche partitioning in arbuscular mycorrhizal communities in temperate grasslands: a lesson from adjacent serpentine and nonserpentine habitats. *Molecular Ecology* 24:1831–1843. doi: 10.1111/mec.13147
- Lagrange, A., L'huillier, L., & Amir, H. (2013). Mycorrhizal status of Cyperaceae from New Caledonian ultramafic soils: effects of phosphorus availability on arbuscular mycorrhizal colonization of *Costularia comosa* under field conditions. *Mycorrhiza*, 23(8), 655-61. doi:10.1007/s00572-013-0503-1
- Lagrange, A., Ducouso, M., Jourand, P., Majorel, C., & Amir, H. (2011). New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Canadian journal of microbiology*, 57(1), 21-28. doi:10.1139/W10-096
- Maherali H, Klironomos JN (2007) Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning. *Science* 316:1746–1748. doi: 10.1126/science.1143082

- McNeill J, Barrie FR, Burdet HM, et al (2006) International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005. Regnum Vegetabile 146 Ruggell: A.R.G. Ganter Verlag.
- Perrier, N., Amir, H., & Colin, F. (2006). Occurrence of mycorrhizal symbioses in the metal-rich lateritic soils of the Koniambo Massif, New Caledonia. *Mycorrhiza*, 16(7), 449-58. doi:10.1007/s00572-006-0057-6
- Schechter SP, Bruns TD (2012) Edaphic sorting drives arbuscular mycorrhizal fungal community assembly in a serpentine/non-serpentine mosaic landscape. *Ecosphere* 3:art42. doi: 10.1890/ES12-00059.1
- Schechter SP, Bruns TD (2008) Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Molecular Ecology* 17:3198–3210. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03828.x
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:291–295.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Third Edition. Academic Press.
- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Koegel S, Bouffaud M-L, Redecker D (2014) The Largest Subunit of RNA Polymerase II as a New Marker Gene to Study Assemblages of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Field. *PLOS ONE.*;9:e107783. doi: 10.1371/journal.pone.0107783.
- Yang H, Zhang Q, Koide RT, et al (2017) Taxonomic resolution is a determinant of biodiversity effects in arbuscular mycorrhizal fungal communities. *J Ecol* 105:219–228 . doi: 10.1111/1365-2745.12655

Annexe 1

Caractéristiques morphologiques et taxonomie des champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA)

Introduction

Les descriptions de nouvelles espèces de CMA doivent être basées sur la morphologie des spores conformément au code international de nomenclature (ICBN) (McNeill et al. 2006) et à la révision récente du code international de nomenclature pour les algues, les champignons et les plantes (ICN) (Miller et al. 2011; McNeill et al. 2012), la caractérisation moléculaire n'est pas une obligation pour la description de nouvelles espèces. La caractérisation morphologique s'appuie principalement sur la description des spores (couleur, taille) et sur leurs structures pariétales (nombre de paroi, épaisseur, nature, couleur). Il existe actuellement quatre types de spores. Les spores glomoiïdes formées d'une ou deux parois elles ne possèdent pas de bouclier de germination ni de cellule bulbeuse à leur base. Les spores gigasporoiïdes cloisonnées par une cellule bulbeuse sporogène fermée par un bouchon (plug) ou plus rarement par un septum. Les spores entrophosporoiïdes sont des spores qui se développent à partir du milieu de l'hyphe portant le saccule. Et les spores acaulosporoiïdes, qui elles, se développent à partir du côté de l'hyphe portant le saccule. L'identification morphologique peut être réalisée seulement par des experts dans le domaine car elle demande un travail important, de nombreuses connaissances et peut être rendue difficile car certaines espèces ont la particularité de former des spores dimorphiques (deux types de spores). De plus, certaines espèces forment des spores avec une structure relativement simple, le manque de critère morphologique discriminant ne permet donc pas d'affilier ces espèces à un genre parmi les Glomeromycota, une identification par biologie moléculaire est alors indispensable. Certains caractères utilisés pour la description morphologique peuvent être ambigus (mode de formation de la spore, couleur de la spore) et viennent compliquer l'identification.

Par exemple, concernant la couleur des spores, Morton & Msiska (2010) ont montré qu'une culture de *Dentiscutata heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) a produit des spores mutantes albinos, ce caractère a une grande stabilité dans le temps, en effet il est conservé depuis 15 ans et sur 19 générations de culture en pots. Si ce mutant avait été trouvé sur le terrain, il aurait certainement été décrit comme une nouvelle espèce en se basant uniquement sur sa morphologie alors que ce n'est pas le cas.

Un autre exemple concernant le mode de formation de la spore, *Entrophospora colombiana* (Schenck & Spain) initialement décrite dans le genre *Entrophospora* (Ames & Schneider), uniquement parce qu'elle forme des spores qui se développent à partir du milieu de l'hyphe portant le saccule (spore entrophosporoiïde), comme chez l'espèce type du genre *E. infrequens* (Ames et Schneider 1979). Cependant la structure subcellulaire et les propriétés

phénotypiques d'*E. colombiana* diffèrent des spores d'*E. infrequence* alors qu'elles sont identiques à celles de la plupart des espèces types du genre *Acaulospora* spp. (*A. mellea* Spain & Schenck et *A. laevis* Gerd. & Trappe), qui produisent des spores se développant à partir du côté de l'hyphe portant le saccule (Gerdemann et Trappe, 1974). Kaonongbua et al. (2010) ont reconstruit la phylogénie moléculaire de *E. colombiana* et *E. kentinensis* (Wu & Liu) à partir du séquençage d'une partie de la grande sous unité ribosomique nucléaire (nrLSU). Les résultats obtenus démontrent que le mode de formation des spores (entrophosporoïde) n'est pas un critère synapomorphique et ne définit donc pas un groupe monophylétique. En conséquence ces deux espèces ont été transférées dans le genre *Acaulospora*. Le mode de développement des spores ne semble pas être un bon critère pour une identification morphologique des CMA.

Dans ces deux cas, la caractérisation moléculaire a permis d'éviter ou de rectifier une erreur, cela souligne l'importance de lier la caractérisation morphologique à la caractérisation moléculaire pour décrire de nouvelles espèces de manière sûre et non ambiguë.

Il existe 291 espèces de CMA (Glomeromycota) listées sur www.amf-phylogeny.com, mais sur ces 291 espèces beaucoup sont classées dans de mauvais genres ou sont répétées.

Ce chapitre décrit l'histoire de la taxonomie des Glomeromycota et permet de faire le point sur les caractères morphologique de chaque genre et sur le nombre d'espèces décrites jusqu'à aujourd'hui. La position phylogénétique de chaque genre et de chaque espèce (séquence disponible) a également été vérifiée dans ce chapitre. Les résultats obtenus et décrits dans le chapitre 2 sont également incorporés dans ce bilan taxonomique.

Matériel et Méthodes

Analyse bibliographique

Toutes les espèces recensées sont citées avec la référence bibliographique de leur première description, quand les espèces ont été transférées dans un autre groupe (ordre, famille, genre) la bibliographie liée à ces transferts est également citée. Les descriptions des différents taxons sont directement inspirées de leur première publication (création) quand il y a eu des corrections elles sont prises en compte. Ces travaux sont en grande partie issus de l'étude bibliographique de tous les articles taxonomiques publiés dans des revues internationales jusqu'à aujourd'hui et des descriptions de l'INVAM (International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal).

Isolats de Champignons mycorhiziens à arbuscules utilisés pour les photographies

Des photographies de la morphologie des spores d'une espèce de chaque genre ont été réalisées pour cette étude et sont présentées (souches de l'IBG fournies par Dirk Redecker), quand aucune souche du genre n'était disponible au laboratoire, les photographies ont été fournies par le Pr. Janusz Blaszkowski, le Pr. Dirk Redecker et le Dr. Matt Kason conservateur de l'INVAM.

Les isolats *Scutellospora calospora* BEG32, *Gigaspora rosea* BEG9, *Rhizophagus clarus* BEG149, *Funneliformis mosseae* BEG12, *Claroideoglossum claroideum* BEG23, *Sclerocystis coremioides* BEG250 ont été fournis gracieusement par Dirk Redecker conservateur de l'IBG (Banque International des Glomeromycota). Ces isolats sont cultivés en chambres de culture spécialement aménagées pour la culture des CMA. La température de culture est de 20-26°C pour une photopériode 16:8 h jour-nuit. Les isolats BEG12 et BEG23 sont cultivés en association avec du poireau ou de l'oignon sur un sol Epoisse pH 7.5. L'isolat BEG32 est cultivé en association avec du persil sur un sol Marlins pH 5 (75%) avec du gravier (25%). L'isolat BEG9 est cultivé en association avec du poireau ou de l'oignon sur un sol Epoisses (75%) pH 7.5 avec de la perlite (25%). Les isolats BEG149 et BEG250 sont cultivés en association avec *Tephrosia* sp. sur un sol Marlins pH 5 (75%) avec de la perlite (25%). Les détails sont disponibles sur le site : <http://i-beg.eu>. L'isolat *Pervetustus simplex* ne a été isolé en Nouvelle-Calédonie sur un sol ultramafique, cet isolat est cultivé en laboratoire au LIVE (Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement) sur un sol ultramafique en association avec du sorgho. Pour chaque isolat, les spores présentes dans le sol sont isolées par tamisage humide. Deux tamis : (350µm et 36µm) sont superposés et le sol est entraîné à travers les tamis par un jet d'eau. Vingt millilitres de substrat contenant les spores sont récupérés dans le tamis 36µm et placés dans un tube de 50 mL. Puis 20 mL de saccharose (2,92 Mol/L) sont ajoutés dans le tube sous le substrat contenant les spores. Les tubes sont ensuite centrifugés à 900 rpm pendant 3 min. Les spores sont ainsi récupérées à l'interface au dessus du saccharose alors que les débris minéraux sédimentent au fond du tube durant la centrifugation. Les spores dans le surnageant sont récupérées dans un tamis 36µm et rincées avec de l'eau distillée. Après re-suspension dans 25 mL d'eau stérile, les spores sont séparées des débris sous la loupe binoculaire (MOTIC SMZ140-FBLED) pour l'analyse morphologique. Les spores sont ensuite photographiées puis montées entre lame et lamelle dans du PVLG (Omar et al. 1979) et dans un mélange PVLG réactif de Melzer (1:1, v/v). La terminologie utilisée pour légènder les photographies est celle utilisée par Blaszkowski 2012.

Les photographies ont été prises avec une caméra digitale (Leica DFC 295) montée sur un microscope (Olympus BX 50) équipé du logiciel Leica Application Suite Version V 4.1 software.

Analyse phylogénétique

Plusieurs analyses phylogénétiques ont été réalisées, la première analyse (Figure. 1) est basée sur les séquences partielles de la petite sous unité, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (partiel SSU)-5.8S-(LSU partiel) de l'ADNr. Quand les séquences SSU-5.8S-LSU n'étaient pas disponibles les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (LSU) ont été utilisées. Pour cette analyse les ITS ont été tronqués car comme expliqué par Kruger et al. 2012 ils ne sont pas alignables quand des taxons de différentes familles sont analysés. Une séquence par espèce est représentée dans l'arbre phylogénétique au total 158 espèces de CMA sont représentées dans cette analyse. Des analyses phylogénétiques pour chaque famille ont également été réalisées, ces analyses sont basées sur les séquences partielles de la petite sous unité, les espaceurs internes transcrits, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (partiel SSU)-ITS1-5.8S-ITS2-(LSU partiel) de l'ADNr, quand les séquences SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU n'étaient pas disponibles les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (LSU) ont été utilisées. Une séquence par espèce est représentée. Toutes les séquences utilisées dans les analyses phylogénétiques sont des séquences provenant de culture de collection. L'alignement des séquences a été obtenu en utilisant MAFFT 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server>; Katoh and Standley 2013) avec l'option : slow iterative refinement FF-NS-I (gap opening penalty 1.0, offset value 0.1). L'analyse du Maximum de vraisemblance (ML) a été réalisé avec les programmes PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010) et MEGA 7 (Tamura et al. 1993) avec 1000 ré-échantillonnages (bootstrap). Les arbres phylogénétiques ont été édités avec le logiciel MEGA 7 (Kumar et al. 2016).

Résultats et Discussion

Analyses phylogénétiques des Glomeromycota

Les séquences partielles de la petite sous unité, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (partiel 18S)-5.8S-(28S partiel) ou du 28S (partiel) de 158 espèces de CMA ont été utilisées pour cette analyse phylogénétique (maximum de

vraisemblance) avec MEGA 7 et PhyML (Fig. 1). L'analyse phylogénétique confirme l'existence de pratiquement tous les genres acceptés. Pour certains genres ou pour certaines espèces on note cependant des discordances entre la classification taxonomique et l'affiliation phylogénétique obtenue dans cette analyse.

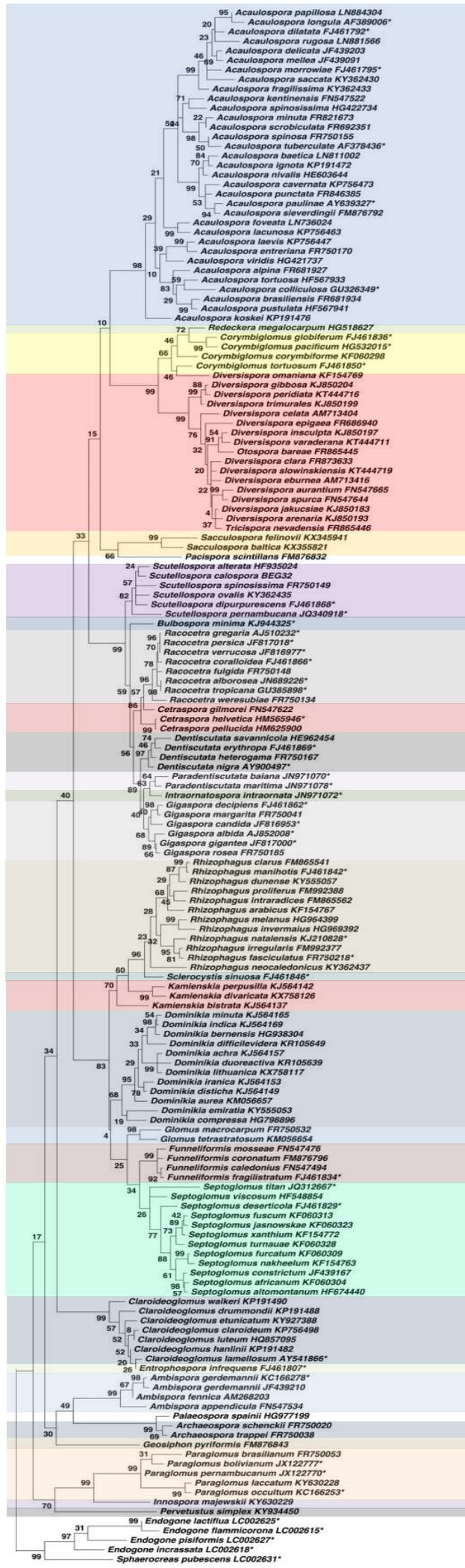
Dans la famille des Diversisporaceae deux groupes monophylétiques sont formés : le groupe du genre *Diversispora* et le groupe du genre *Corymbiglomus/Redeckera*, les espèces des genres *Corymbiglomus* et *Redeckera* forment un groupe monophylétique. L'espèce *Diversispora omaniana* n'est pas retrouvée dans le groupe du genre *Diversispora* mais dans le groupe du genre *Corymbiglomus/Redeckera* (Fig. 1). La situation doit être clarifiée avec le séquençage d'autres espèces de *Redeckera* spp. Une analyse morphologique et moléculaire des spores de *Diversispora omaniana* doit être réalisée afin de conforter ou non cette position. Les espèces des genres considérés comme incertains (*Tricispora* et *Otospora*) par Redecker et al. 2013 groupent parfaitement avec le genre *Diversispora* cela confirme l'absence de preuve phylogénétique pour la création de ces deux genres et confirme leur illégitimité.

Dans la famille des Gigasporaceae les cinq genres (*Scutellospora*, *Racocetra*, *Cetraspora*, *Dentiscutata* et *Gigaspora*) sont bien retrouvés comme formant des groupes monophylétiques par l'analyse phylogénétique. Les genres considérés comme incertains (*Bulbospora*, *Intraornatospora*, *Paradentiscutata*) sont également retrouvés dans des groupes séparés des autres genres (Fig. 1). L'espèce *Bulbospora minima* forme un groupe de niveau générique ; les espèces *Intraornatospora*, *Paradentiscutata* forment également un groupe de niveau générique, ces deux derniers genres doivent donc être rassemblés en un genre unique d'après la phylogénie obtenue.

Curieusement la séquence de l'unique espèce du genre *Entrophospora* groupe parfaitement avec les séquences des espèces du genre *Claroideoglomus*.

Dans la famille des Archaesporaceae le genre *Paleospora* ne forme pas un groupe de niveau générique et apparaît comme appartenant au genre *Archaeospora* (Fig. 1). D'après la phylogénie obtenue ce genre devrait être fusionné avec le genre *Archaeospora*.

Toutes les séquences des autres espèces de chaque genre analysé sont bien affiliées à leurs genres respectifs et forment des groupes monophylétiques (Fig. 1).



Acaulospora Acaulosporaceae

Redeckera
Corymbiglomus

Diversispora Diversisporaceae

Sacculospora Sacculosporaceae
Pacispora Pacisporaceae

Scutellospora
Bulbospora

Racocetra Gigasporaceae

Cetraspora Gigasporaceae
Dentiscutata
Paradentiscutata
Intraornatospora

Gigaspora
Rhizophagus

Sclerocystis
Kamienskia

Dominikia Glomeraceae

Glomus
Funneliformis

Septoglomerus

Claroideoglomerus Claroideoglomeraceae

Entrophospora

Ambispora Ambisporaceae
Paleoaspora Archaeosporaceae
Geosiphon Geosiphonaceae

Paraglomerus Paraglomeraceae
Innospora
Pervetustus Pervetustaceae

Endogone
Sphaeroceas

Diversisporales

Glomeromycota

Glomerales

Archaeosporales

Paraglomerales

Figure 1. Analyse phylogénétique des Glomeromycota. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-5.8S-LSU de l'ADNr de 158 espèces de Glomeromycota. L'arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) est basé sur les séquences partielles de la petite sous unité, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (partiel SSU)-5.8S-(LSU partiel) de l'ADNr, quand les séquences SSU-5.8S-LSU n'étaient pas disponibles les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (LSU) ont été utilisées et labellisées avec un astérisque (*). Les valeurs de Bootstrap sont données pour chaque branche. La barre d'échelle indique le nombre de substitution par site.

Diversisporales Walker & Schüßler. (Walker et al. 2004a; Walker & Schüßler 2004b; Schüßler & Walker 2010).

L'ordre des Diversisporales compte cinq familles ayant une position phylogénétique claire et des traits morphologiques bien définis : les Diversisporaceae, les Gigasporaceae, les Acaulosporaceae, les Pacisporaceae et les Sacculosporaceae, cette dernière famille a été retenue par le consensus de 2013 (Redecker et al. 2013) et sa position phylogénétique a été confirmée par Willis et al. 2016. Les champignons de cet ordre ont la particularité de former des mycorhizes arbusculaires, avec ou sans vésicules et des hyphes extra-racinaires avec ou sans cellules auxiliaires. Cet ordre regroupe différentes familles formant des spores complexes qui peuvent être produites à partir d'une cellule bulbeuse à la base de la spore (spores gigasporoïdes) ou à partir d'un saccule sporifère (spores acaulosporoïdes, entrophosporoïdes) ou encore des spores glomoïdes. Cet ordre diffère également des autres ordres appartenant à l'embranchement des Glomeromycètes par une signature moléculaire du gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique (SSU), par exemple, les séquences GGGTTTH et TYACCGGRAGGTRT sont spécifiques à cet ordre et correspondent respectivement aux positions homologues 234 et 1495 de la séquence SSU de *S. cerevisiae* (J01353).

Diversisporaceae Walker & Schuessler. (Walker et al. 2004a; Walker & Schüßler 2004b; Schüßler & Walker 2010).

La famille des Diversisporaceae comprend trois genres bien définis, le genre *Redeckera*, le genre *Diversispora* et le genre *Corymbiglomus* et deux genres incertains, *Tricispora* et *Otospora* rejetés par le consensus de Redecker et al. 2013 à cause d'un manque de données moléculaires et d'un faible nombre d'espèces découvertes appartenant à chacun de ces genres. La famille des Diversisporaceae diffère des autres familles appartenant à l'ordre

des Diversisporales, par le fait que toutes les espèces appartenant au Diversisporaceae possèdent des spores gloïdes sans bouclier de germination (excepté pour les deux genres en suspens *Otospora* et *Tricispora* qui possèdent respectivement des spores acaulosporoïdes et entrosphosporoïdes). Les Diversisporaceae possèdent une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique (SSU), par exemple les séquences : GGCTCATTYGRRTYTS, ACYCATTRYCAGGCTTAAT et TTGGCATTTAGYCA sont spécifiques de cette famille et correspondent respectivement aux positions homologues 487, 648 et 1379 de la séquence SSU de *S. cerevisiae* (J01353).

Analyse phylogénétique : Comme observé dans l'analyse phylogénétique présentée dans la Figure 1, deux groupes monophylétiques sont formés : le groupe du genre *Diversispora* et le groupe du genre *Corymbiglomus/Redeckera* et l'espèce *Diversispora omaniana* n'est pas retrouvée dans le groupe du genre *Diversispora* mais dans un groupe proche du genre *Corymbiglomus/Redeckera* (Fig. 1 ; Fig. 2). *D. omaniana* fait probablement partie d'un genre qui reste à décrire. Les espèces des genres considérés comme incertains (*Tricispora* et *Otospora*) par Redecker et al. 2013 groupent parfaitement avec le genre *Diversispora* cela confirme l'absence de preuve phylogénétique pour la création de ces deux genres et confirme leurs illégitimités. Toutes les espèces sont bien différenciées entre elles par l'analyse phylogénétique (Fig. 2). Les analyses phylogénétiques des séquences SSU-(ITS1)-5.8S-(ITS2)-LSU de l'ADNr des espèces de cette famille confirment, la position phylogénétique de cette famille (Fig. 1) et confirment les résultats obtenus par Kruger et al. 2012.

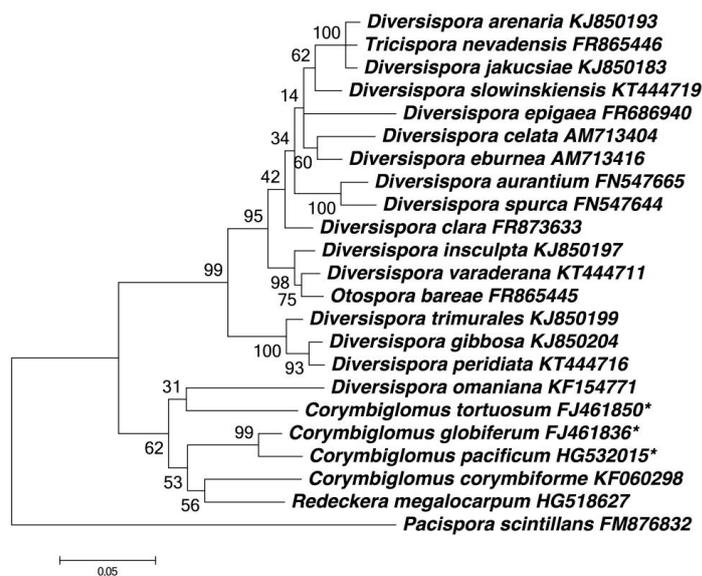


Figure 2. Analyse phylogénétique des Diversisporaceae. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences (SSU-ITS1-5.8S-ITS2)-LSU de l'ADNr de 15 espèces du genre *Diversispora*, une espèce

du genre *Tricispora*, une espèce du genre *Otospora*, quatre espèces du genre *Corymbioglomus* et une séquence du genre *Redeckera*. *Pacispora scintillans* est utilisé comme groupe externe. L'arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) est basé sur les séquences partielles de la petite sous unité, les espaceurs internes transcrits, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (partiel SSU)-ITS1-5.8S-ITS2-(LSU partiel) de l'ADNr, quand les séquences SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU n'étaient pas disponibles les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (LSU) ont été utilisées et labellisées avec un astérisque (*). Les valeurs de Bootstrap sont données pour chaque branche. La barre d'échelle indique le nombre de substitution par site.

Diversispora Walker & Schüßler. (Walker et al. 2004a; Walker & Schüßler 2004b; Schüßler & Walker 2010).

L'espèce type du genre *Diversispora* est *Diversispora spurca* (Pfeiff., Walker & Bloss) Walker & Schuessler (Fig. 3). La création du genre *Diversispora* (Walker & Schüßler 2004b) est basée sur des critères morphologiques et moléculaires. Les critères morphologiques retenus pour la création de ce genre sont : des spores globoïdes, avec deux parois, cette paroi est composée de deux couches, une couche fine externe et une deuxième couche laminée (Fig. 3). Les spores des *Diversispora* spp. ont une paroi qui ne réagit pas au réactif de Melzer. Certains genres de l'ordre des Diversisporales ont des spores qui présentent des structures particulières comme des boucliers de germinations, une cellule bulbeuse à la base de la spore ou encore la présence d'un saccule sporifère ; toutes ces structures typiques sont absentes chez les *Diversispora* spp. Du point de vue de la biologie moléculaire plusieurs courtes séquences de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique ont été définies comme spécifiques à ce genre : CYCATTRGYCAGGCTTAATTGTC, TATTGGCATTTAGYCA et CTTTGGATTRGGGTTTAGGGRTC, ces séquences correspondent par homologie aux positions 649, 1387 et 1673 respectivement de la séquence J01353 de l'ADNr de la petite sous unité ribosomique de *S. cerevisiae*. Les analyses phylogénétiques des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr des espèces de ce genre confirment, la position phylogénétique de ce genre (Fig. 1 ; Fig. 2) et confirme les résultats obtenus par Kruger et al. 2012.

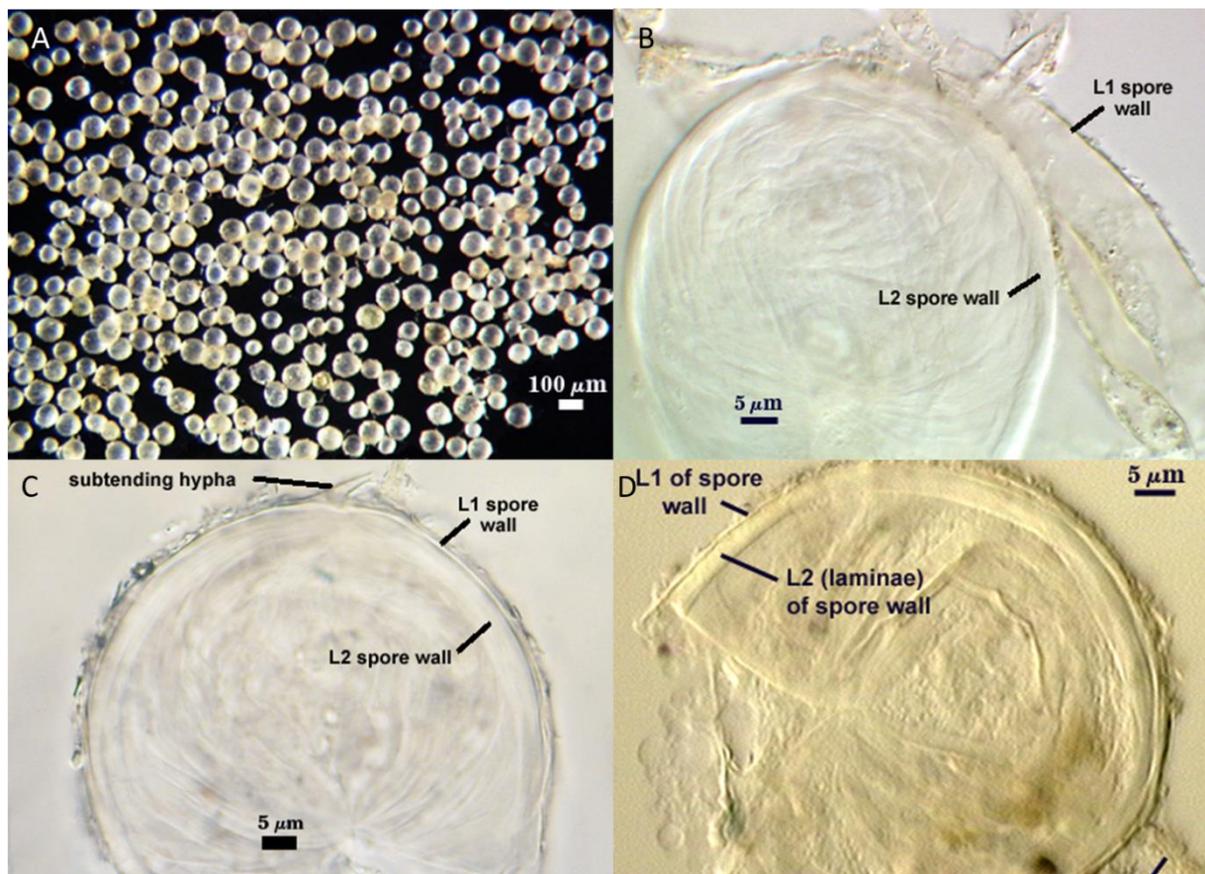


Figure 3. Photographies des spores de *Diversispora spurca* (reference accession HA567). A. Spores intactes. B. Paroi de la spore couche 1 (L1 spore wall), paroi de la spore couche 2 (L2 spore wall). C. D. Paroi de la spore couche 1 (L1 spore wall), paroi de la spore couche 2 (L2 spore wall), hyphe suspenseur (subventing hypha). B. C. Spore dans du PVLG. D Spore dans du PVLG + Melzer. (Photographie INVAM ; Morton 2017).

Ce genre comprend actuellement 15 espèces ayant des positions phylogénétiques claires, (6 sont listées dans Schüßler & Walker 2010) : *Diversispora aurantium* (Blaszkowski et al. 2004a ; Schüßler & Walker 2010), *Diversispora celata* (Gamper et al. 2009), une nouvelle espèce a été isolée par Estrada et al. 2012 *Diversispora clara*. *Diversispora eburnea* (Kennedy et al. 1999 ; Schüßler & Walker 2010), *Diversispora epigaea* (Daniels & Trappe 1979 ; Schüßler & Walker 2010) ; Trois espèces initialement décrites dans le genre *Glomus lato sensu* par Blaszkowski et al. 1997a, 2001, 2004b, sont replacées dans les *Diversispora* par Oehl et al. 2011a : *Diversispora arenaria*, *Diversispora gibbosa*, *Diversispora insculpta*. Une nouvelle espèce a été isolée par Balázs et al. 2015, *Diversispora jakucsiae*, une nouvelle espèce isolée par Symanczik et al. 2014 : *Diversispora omaniana* (rev. *Desertispora omaniana* Symanczik et al. 2018), *Diversispora trimurales* (Koske & Halvorson 1989a ; Schüßler & Walker 2010), trois nouvelles espèces isolées par Blaszkowski et al. 2015, *Diversispora varaderana* ; *Diversispora slowinskiensis* ; *Diversispora peridiata* et

Diversispora spurca (Pfeiffer et al. 1996 ; Walker & Schüßler 2004b ; Fig. 3). Et enfin *Diversispora sabulosa* (Symanczik et al. 2018).

Ce genre comprend actuellement 3 espèces n'ayant pas de position phylogénétique claire. Oehl et al. 2011a, replacent trois espèces initialement décrites comme *Glomus lato sensu*, mais aucunes données moléculaires ne sont disponibles pour ces trois espèces : *Diversispora przelewicensis* (Blaszkowski et al. 1988a ; Oehl et al. 2011a) ; *Diversispora tenera* (Tandy 1975 ; Oehl et al. 2011a) ; *Diversispora pustulata* (Koske et al. 1986a ; Oehl et al. 2011a).

Tricispora Oehl, Sieverd., Silva & Palenz. (Oehl et al. 2011b). Genre incertain (Redecker et al. 2013).

La phylogénie place ce genre très proche, voire faisant partie des *Diversispora* spp. d'après l'étude phylogénétique de Oehl et al. 2011b basée sur des séquences de l'ADNr codant pour la grande sous unité ribosomique (LSU). L'analyse phylogénétique basée sur des séquences de l'ADNr (SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU) présentée dans cette étude place l'espèce type de ce genre dans le genre *Diversispora* (Fig. 2). Ce genre est actuellement accepté car il a été publié, mais le matériel biologique de l'unique espèce type du genre *Tricispora nevadensis* déposé à l'herbier de Zurich présente des spores dégradées. Le consensus (Redecker et al. 2013) remet en cause la fiabilité des séquences car les caractères morphologiques ne sont pas en accord avec la phylogénie obtenue. En effet les spores de l'espèce type ne sont pas glomoides comme toutes les espèces de *Diversispora* spp. mais entrophosporoïdes (présence d'un saccule) ; de nouvelles preuves phylogénétiques et morphologiques formelles concernant ce genre doivent être apportées. Le consensus (Redecker et al. 2013) propose de vérifier la fiabilité des séquences et si les séquences nouvellement obtenues concordent avec celles d'Oehl et al. 2011b, Redecker et al. 2013, il proposera de placer *Tricispora nevadensis* (Palenzula et al. 2010 ; Oehl et al. 2011b) dans le genre *Diversispora* et donc de corriger la définition des caractères morphologiques définissant la famille des Diversisporaceae et le genre *Diversispora*.

Otospora Oehl, Palenzuela & Ferrol. (Oehl et al. 2011b). Genre incertain (Redecker et al. 2013).

Ce genre n'a pas une affiliation phylogénétique claire, il est placé très proche, voire faisant partie des *Diversispora* spp. (Oehl et al. 2011b) de par l'analyse phylogénétique des séquences courtes de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique (SSU) ou pour la

grande sous unité ribosomique (LSU). L'analyse phylogénétique, basée sur des séquences de l'ADNr (SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU), présentée dans cette étude place l'espèce type de ce genre dans le genre *Diversispora* (Fig. 2). Les séquences proviennent de spores de *Otospora bareae* issues de culture trap et non de culture pure, elles peuvent donc être dues à des contaminations. Le consensus (Redecker et al. 2013) remet en cause la fiabilité des séquences car les caractères morphologiques ne sont pas en accord avec la phylogénie obtenue. En effet les spores de l'espèce type ne sont pas glomoides comme toutes les espèces de *Diversispora* spp. mais acaulosporoïdes (possèdent un saccule), de nouvelles preuves phylogénétiques et morphologiques formelles concernant ce genre doivent être apportées. Ce genre est actuellement accepté car il a été publié, mais l'unique espèce type du genre *Otospora bareae* (Palenzula et al. 2008 ; Oehl et al. 2011b) déposée à l'herbier de Zurich présente des spores parasitées et dégradées, et il n'existe pas encore de preuves phylogénétiques et morphologiques formelles concernant ce genre (Redecker et al. 2013).

Corymbiglomus Blaszk. & Chwat. (Blaszkowski 2012 ; Blaszkowski et al. 2013a).

Blaszkowski 2012 a utilisé la phylogénie (ADNr LSU) pour ériger ce nouveau genre, en effet en analysant les séquences LSU de *Glomus corymbiforme* (Blaszkowski 1995b), la phylogénie place cette espèce dans la famille des Diversisporaceae. En 2013a Blaszkowski et al. ont confirmé l'existence de ce genre grâce à l'analyse des séquences SSU de l'ADNr et placent cette espèce entre le genre *Diversispora* et *Redeckera*. Blaszkowski et al. 2013a réalisent également une analyse des séquences LSU de l'ADNr mais curieusement l'arbre phylogénétique présenté dans l'article ne présente aucune séquence de *Redeckera* spp. alors que des séquences LSU de *Redeckera megalocarpum* sont disponibles (cette remarque avait déjà été faite par Redecker et al. 2013). L'analyse phylogénétique basée sur des séquences de l'ADNr (SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU) présentée dans cette étude place ces deux genres *Redeckera* et *Corymbiglomus* dans un même groupe (Fig. 2). D'après Blaszkowski et al. 2013a, d'un point de vue morphologique les spores des *Corymbiglomus* spp. forment des spores semblables aux *Glomus* spp., il n'y pas de formation de sporocarpes et les spores sont recouvertes d'un manteau mycélien (Fig. 4). L'hyphe peut être ramifiée avec ou sans renflement vésiculaire terminal. Les spores peuvent être retrouvées seules ou en cluster dans le sol. Les clusters sont composés de deux ou trois spores et peuvent être regroupés par des hyphes entrelacées, en groupe de deux à 20 spores (Fig. 4). Les hyphes portant les spores sont issues d'une hyphe parental qui se divise de façon dichotomique pour former des spores à l'extrémité de chaque hyphe sporogène extra-racinaire. Les spores sont pigmentées, avec une

paroi composée de 1 à 3 couches. L'hyphe suspenseur de la spore est droit ou recourbé, cylindrique ou en entonnoir ou encore resserré. La paroi de l'hyphe suspenseur de la spore est en continuité avec la paroi de la spore et présente une couleur similaire. Le pore est ouvert ou obstrué par un septum qui est partie intégrante de la paroi laminée de la spore qui s'épaissit et dans certains cas forme une troisième couche (Fig. 4). Ces caractères sont basés sur l'analyse morphologique des trois espèces affiliées à ce genre grâce à l'analyse des séquences SSU et LSU de l'ADNr réalisé par Blaszkowski et al. 2013a : *Corymbiglomus corymbiforme* (Blaszkowski 1995b ; 2012 ; 2013a ; Fig. 4) ; *Corymbiglomus globiferum* (Koske & Walker 1986c ; Blaszkowski et al. 2013a) ; *Corymbiglomus tortuosum* (Schenck & Smith 1982 ; Blaszkowski et al. 2013a). Ces caractères morphologiques sont remis en question par Medina et al. 2014 qui décrivent une quatrième espèce *Corymbiglomus pacificum* (Medina et al. 2014), affiliée à ce genre grâce à l'analyse des séquences LSU de l'ADNr. Encore une fois dans l'arbre présenté par Medina et al. 2014 aucune séquence de *Redeckera* spp. n'y est représentée. Les caractères morphologiques de l'espèce décrite par Medina et al. 2014 diffèrent des caractères énoncés précédemment qui décrivent le genre *Corymbiglomus*. En effet les spores de cette espèce ne sont pas recouvertes d'un manteau mycélien et possèdent deux parois bien distinctes et non une comme chez les trois autres espèces qui représentent ce genre. Les caractères morphologiques qui définissent ce genre doivent impérativement être corrigés. La situation doit être clarifiée avec le séquençage d'autres espèces de *Redeckera* spp. afin de vérifier si les genres *Corymbiglomus* et *Redeckera* doivent être fusionnés ou non (Fig. 1 ; Fig. 2).

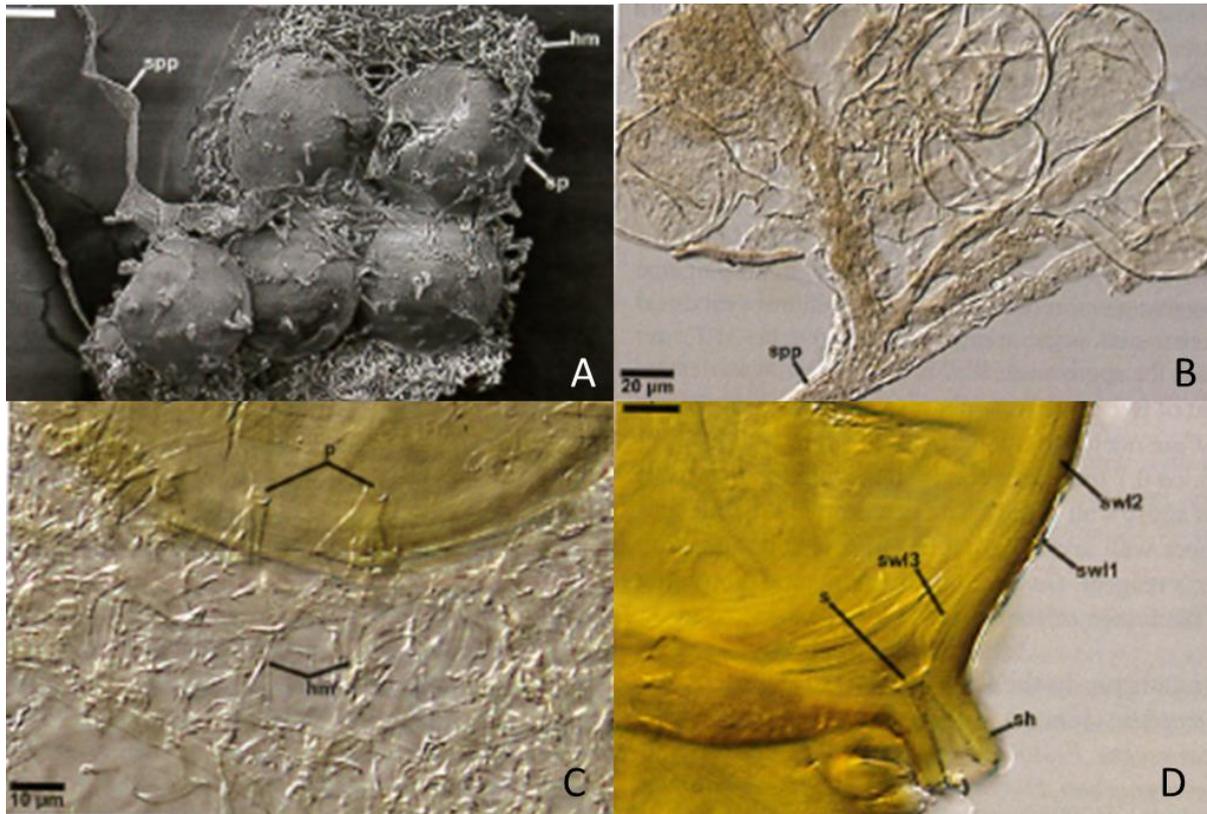


Figure 4. Photographie de *Corymbiglomus corymbiforme*. A. Manteau mycelien (hm), spore (s), sporophore (spp). B. Sporophore (spp). C. Manteau mycelien (hm), pore (p). D. Spore (s), hyphe suspenseur (sh), couche 1 de la paroi de la spore (sw1), couche 2 de la paroi de la spore (sw2), couche 3 de la paroi de la spore (sw3). B. C. D. Spore dans du PVLG. A. D. barre=10µm. (Photographies fourni par Janusz Błaszowski).

Redeckera Walker & Schüßler. (Schüßler & Walker 2010).

L'espèce type du genre *Redeckera* est *Redeckera megalocarpum* cette espèce a été décrite par Redecker et al. 2007 comme *Glomus megalocarpum* puis transférée dans le genre *Redeckera* par Schüßler & Walker 2010. La création de ce nouveau genre est appuyée par des critères morphologiques et moléculaires. Les critères morphologiques retenus pour la création de ce genre sont : la formation de larges sporocarpes avec un peridium renfermant les spores (Fig. 5). Du point de vu de la biologie moléculaire une courte séquence de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique a été définie comme spécifique à ce genre (ARKTYTGGKMGCGGYAACGTRA). Les analyses phylogénétiques (Fig. 1 ; Fig. 2) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr des espèces de ce genre, confirment la position phylogénétique de ce genre (Fig. 2) et confirment les résultats obtenus par Kruger et al. 2012. Néanmoins la situation doit être clarifiée avec le séquençage d'autres espèces de *Redeckera*

spp. afin de vérifier si les genres *Corymbiglomus* et *Redeckera* doivent être fusionnés ou non (Fig. 1 ; Fig. 2).

Ce genre comprend actuellement trois espèces clairement décrites et ayant une position phylogénétique claire *Redeckera fulvum* (Berkeley & Broome 1873 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Schüßler & Walker 2010); *Redeckera megalocarpum* (Redecker et al. 2007 ; Schüßler & Walker 2010) et *Redeckera pulvinatum* (Hennings 1897 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Schüßler & Walker 2010).

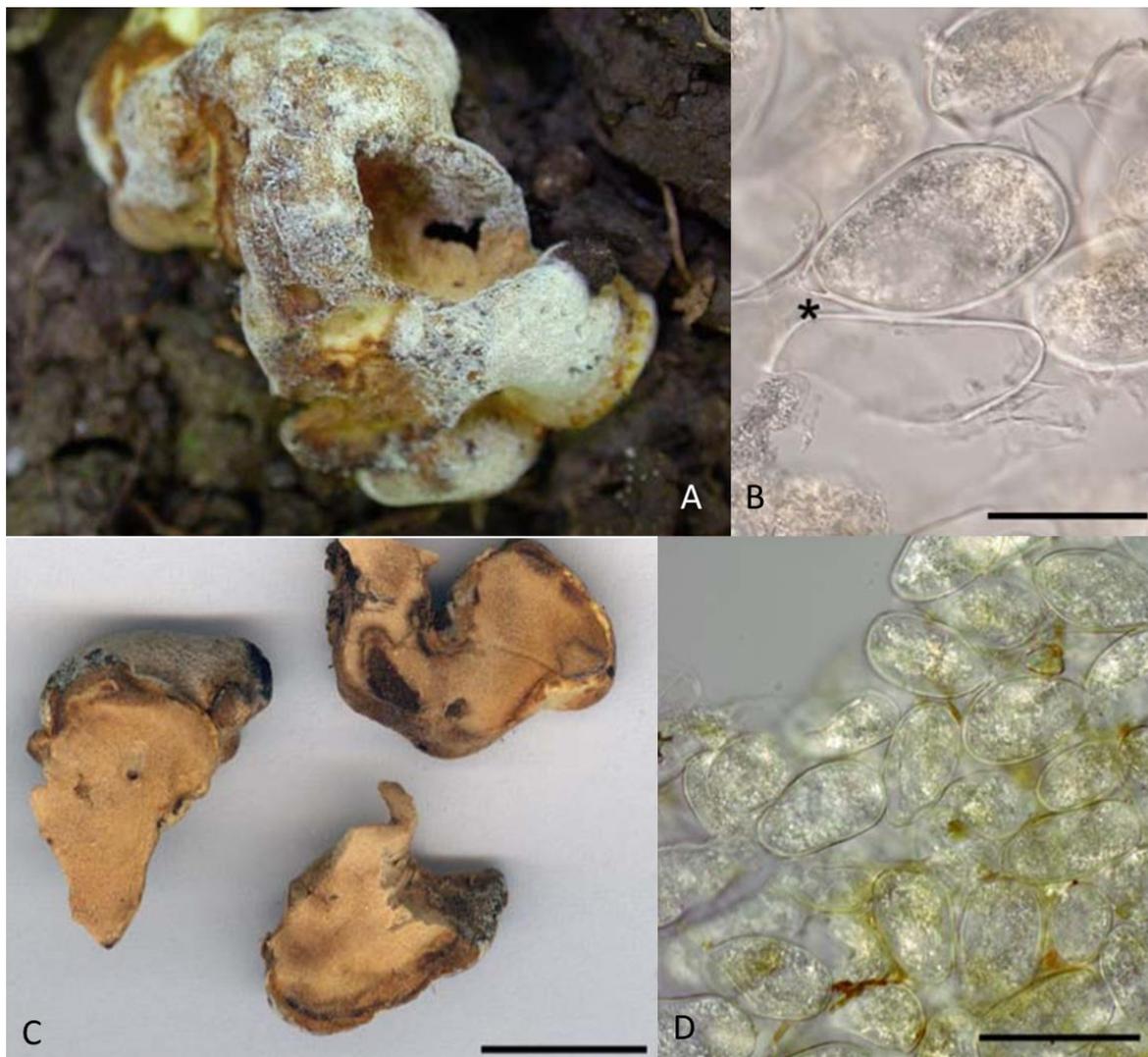


Figure 5. Photographies de sporocarpes et de spores de *Redeckera megalocarpum*. A. Sporocarpe. B. Spores, cavité triangulaire fermée par un septum (*). C. Coupes séchées de sporocarpes. D. spores. B. barre=50µm. C. barre=1cm. D. barre=100µm. (Photographies fournies par Dirk Redecker).

Oehl et al. 2011a, listent trois autres espèces, ces espèces sont citées par Schüßler & Walker 2010 comme appartenant au groupe *Glomus sensu lato*. Oehl et al. 2011a les

transfèrent dans le genre *Redeckera* en se basant sur la morphologie, cependant aucunes données moléculaires ne sont disponibles pour ces espèces : *Redeckera avelingiae* (Sinclair et al. 2000 ; Oehl et al. 2011a) ; *Redeckera canadensis* (Thaxter 1922 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Oehl et al. 2011a) ; *Redeckera fragilis* (Berkeley & Broome 1873 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Oehl et al. 2011a).

Acaulosporaceae (Gerdemann & Trappe) Morton & Benny. (Gerdemann & Trappe 1974 ; Morton & Benny 1990).

La famille des Acaulosporaceae comprend un seul genre bien défini, le genre *Acaulospora*. Tous les membres de la famille des Acaulosporaceae forment des spores se développant à partir du milieu (entrophosporoïdes) ou du côté (acaulosporoïdes) de l'hyphe portant le saccule. La paroi des spores est composée de deux ou trois couches et de deux parois internes. La paroi interne 1 est composée d'une ou deux couches fines et la paroi interne 2 est composée de deux ou trois couches. Sur la deuxième paroi interne la formation d'un orbe de germination précède la germination.

Analyse phylogénétique : Les espèces du genre *Acaulospora* forment un clade séparé de tous les autres genres (Fig. 1). Les familles Pacisporaceae, Sacculosporaceae et Acaulosporaceae sont bien séparées les unes des autres. Toutes les espèces sont bien différenciées entre elles par l'analyse phylogénétique (Fig. 2). Les analyses phylogénétiques des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr des espèces de ce genre, confirment la position phylogénétique de ce genre (Fig. 1 ; Fig. 6) et confirment les résultats obtenus par Kruger et al. 2012.

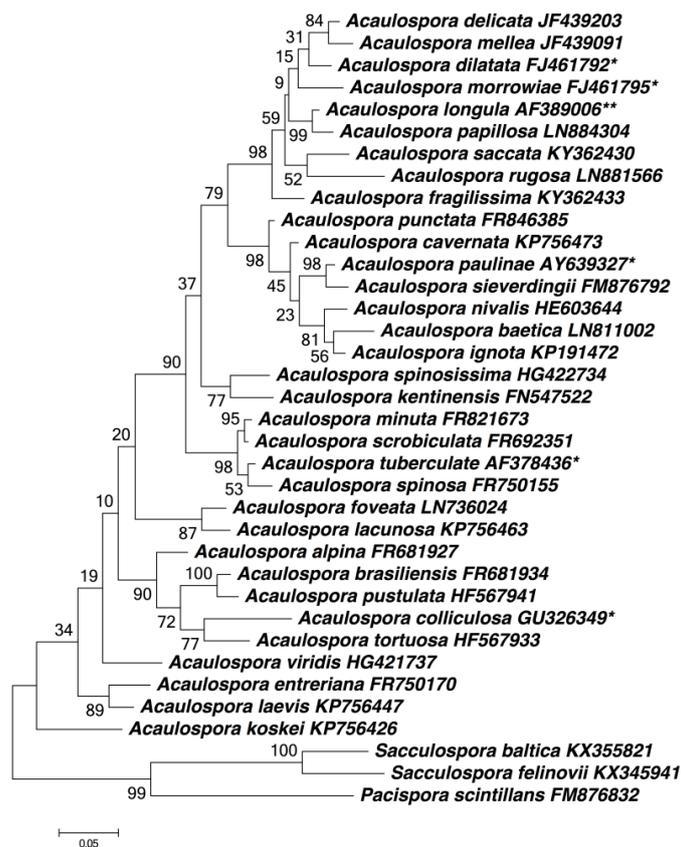


Figure 6. Analyse phylogénétique des Acaulosporaceae, Sacculosporaceae et Pacisporaceae. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ANDr de 33 espèces du genre *Acaulospora*, deux espèces du genre *Sacculospora* et une espèce du genre *Pacispora*. L'arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) est basé sur les séquences partielles de la petite sous unité, les espaceurs internes transcrits, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (SSU-ITS-LSU) de l'ADNr ; Quand les séquences SSU-ITS-LSU n'étaient pas disponibles, les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (LSU) ont été utilisées et labellisées avec un astérisque (*). Les valeurs de Bootstrap sont données pour chaque branche. La barre d'échelle indique le nombre de substitution par site.

Acaulospora Gerd. & Trappe emend. Berch. (Gerdemann & Trappe 1974 ; Berch 1985a).

Tous les membres des *Acaulospora* spp. forment des spores se développant à partir du milieu (entrophosporoïdes) ou du côté de l'hyphe portant le saccule (acaulosporoïdes). Les spores des *Acaulospora* spp. ont une paroi de la spore composée de deux ou trois couches et deux parois internes. La paroi interne 1 est composée d'une ou deux couches fines et la paroi interne 2 est composée de deux ou trois couches. Sur la paroi interne deux la formation d'un orbe de germination précède la germination (Fig. 7).

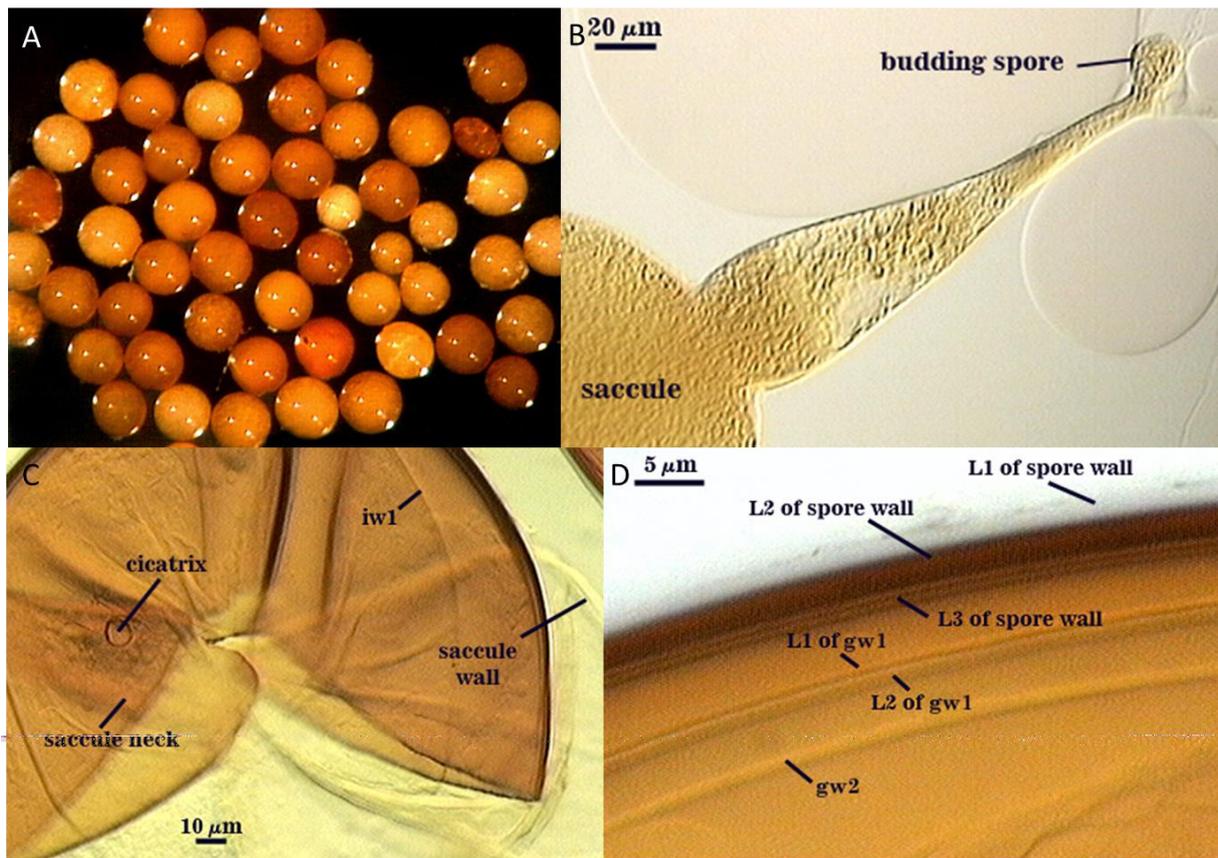


Figure 7. Photographies des spores d'*Acaulospora laevis* (reference accession AU211). A. Spores intactes. B. Saccule, bourgeonnement de la spore. C. Paroi du saccule (saccule wall), cicatrice de l'hyphe suspenseur (cicatrix), paroi interne 1 de la spore (iw1), cou du saccule (saccule neck). D. Paroi de la spore couche 1 (L1 of spore wall), paroi de la spore couche 2 (L2 of spore wall), paroi de la spore couche 3 (L3 of spore wall), paroi interne 1 de la spore couche 1 (L1 of gw1), paroi interne 1 de la spore couche 2 (L2 of gw1), paroi interne 2 de la spore (gw2). B. C. Spore dans du PVLG. D Spore dans du PVLG + Melzer. (Photographie INVAM ; Morton 2017).

Ce genre compte actuellement 37 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Acaulospora alpina* (Oehl et al. 2006 ; Kruger et al. 2011) ; *Acaulospora baetica* (Palenzuela et al. 2015) ; *Acaulospora brasiliensis* (Goto et al. 2008 ; Kruger et al. 2011) ; *Acaulospora cavernata* (Blaszkowski 1989) ; *Acaulospora colliculosa* (Kaonongbua et al. 2010) ; *Acaulospora colossica* (Schultz et al. 1999) cette espèce présente beaucoup de caractères communs avec *A. laevis* ; *Acaulospora delicata* (Walker et al. 1986b) ; *Acaulospora denticulata* (Sieverding & Toro 1987a) ; *Acaulospora dilatata* (Morton 1986) ; *Acaulospora entreriana* (Velazquez et al. 2008) ; *Acaulospora excavata* (Ingleby et al. 1994) ; *Acaulospora foveata* (Janos & Trappe 1982) ; *Acaulospora ignota* (Blaszkowski et al. 2015b) ; *Acaulospora kentinensis* (Wu et al. 1995 ; Sieverding & Oehl 2006 ; Kaonongbua et al. 2010) ; *Acaulospora koskei* (Blaszkowski 1995a) ; *Acaulospora lacunosa* (Morton 1986) ;

Acaulospora laevis (Gerdemann & Trappe 1974) cette espèce est identique à *A. capsicula* (à l'exception qu'elle ne réagit pas au réactif de Melzer) ; *Acaulospora longula* (Schenck et al. 1984) ; *Acaulospora mellea* (Schenck et al. 1984) ; *Acaulospora minuta* (Oehl et al. 2011e) ; *Acaulospora morrowiae* (Schenk et al. 1984) ; *Acaulospora nivalis* (Oehl et al. 2012) ; *Acaulospora papillosa* (Pereira et al. 2016) ; *Acaulospora paulinae* (Blaszkowki 1988a) ; *Acaulospora punctata* (Oehl et al. 2011f) ; *Acaulospora pustulata* (Palenzuela et al. 2013a) ; *Acaulospora rugosa* (Morton 1986) ; *Acaulospora saccata*, *Acaulospora fragilissima* (Crossay et al. 2017) ; *Acaulospora scrobiculata* (Trappe 1977) ; *Acaulospora sieverdingii* (Oehl et al. 2011g) ; *Acaulospora spinosa* (Walker & Trappe 1981a) ; *Acaulospora spinosissima* (Oehl et al. 2014a) ; *Acaulospora spinulifera* (Souza de Pontes et al. 2017) ; *Acaulospora tortuosa* (Palenzuela et al. 2013a) ; *Acaulospora tuberculata* (Janos & Trappe 1982) ; *Acaulospora viridis* (Palenzuela et al. 2014).

Ce genre compte également 12 espèces n'ayant pas de données moléculaires permettant de confirmer leurs positions: *Acaulospora bireticulata* (Rothwell & Trappe 1979) cette espèce est morphologiquement identique à *A. elegans*, la différence réside dans le fait que *A. bireticulata* possède des ornements sur la couche 2 (laminée) de la paroi de ses spores ; *Acaulospora capsicula* (Blaszkowski 1990) cette espèce est identique à *A. laevis* à l'exception qu'elle réagit au réactif de Melzer, cette espèce est également considérée comme synonyme d'*Acaulospora colossica* par l'INVAM (Morton 2017) ; *Acaulospora elegans* (Gerdemann & Trappe 1974) cette espèce est probablement synonyme de *A. bireticulata*, la différence réside dans le fait que *A. elegans* ne possède pas d'ornementation sur la couche 2 (laminée) de la paroi de ses spores; *Acaulospora endographis* (Goto et al. 2013a) ; *Acaulospora gedanensis* (Blaszkowski 1988b) ; *Acaulospora polonica* (Blaszkowski 1988b) ; *Acaulospora rehmi* (Sieverding & Toro 1987a) ; *Acaulospora splendida* (Sieverding et al. 1988a) cette espèce ne semble pas avoir les mêmes caractères que les autres espèces du genre, aucune séquence n'est disponible, cette espèce reste donc affiliée au genre *Acaulospora* pour le moment ; *Acaulospora sporocarpia* (Berch 1985a) ; *Acaulospora taiwania* (Hu 1988) cette espèce n'est peut-être pas une *Acaulospora spp.* car elle produit des sporocarpes, la description et les illustrations morphologiques ne sont pas de bonne qualité, les spores ne ressemblent pas à des spores acaulosporoïdes, le matériel type a été perdu, sans preuve supplémentaire cette espèce reste dans le genre *Acaulospora* pour le moment ; *Acaulospora thomii* (Blaszkowski 1988b) cette espèce possède des caractères morphologiques fondamentalement différents des autres espèces d'*Acaulospora spp.* elle appartient peut être au genre *Archaeospora* mais aucune preuve ne permet de le prouver formellement, sans

preuve supplémentaire cette espèce reste dans le genre *Acaulospora* pour le moment et *Acaulospora walker* (Kramadibrata & Hedger 1990).

Deux espèces *Acaulospora myriocarpa* (Schenck et al. 1986) et *Acaulospora undulata* (Sieverding 1988b) ont été transférées dans le genre *Archaeospora* et renommées : *Archaeospora myriocarpa* (Oehl et al. 2011c) et *Archaeospora undulata* (Oehl et al. 2011c). Une autre espèce *Acaulospora nicolsonii* (Walker et al. 1984) a quant à elle, été transférée dans le genre *Ambispora* et renommée *Ambispora nicolsonii* (Oehl et al. 2011c). Ces transferts ont été réalisés par Oehl et al. 2011c sans aucunes données moléculaires.

Sacculosporaceae Oehl, Sieverd., Silva, Goto, Sánchez & Palenz. (Oehl et al. 2011b).

Sacculospora Oehl, Sieverd., Silva, Goto, Sánchez & Palenz. (Oehl et al. 2011b).

La famille Sacculosporaceae et le genre *Sacculospora* ont été érigés par Oehl et al. 2011b, et contenaient une seule espèce, *Sacculospora baltica* (Błaszowski et al. 1998 ; Oehl et al 2011b) (ancien synonyme *Entrophospora baltica*). Depuis, Willis et al. 2016 ont isolé, décrit et séquencé une deuxième espèce appartenant à cette famille *Sacculospora felinovii* (Willis et al. 2016). Ces deux espèces sont éloignées des autres espèces de Glomeromycota, les analyses d'Oehl et al. 2011b n'ont pas permis de savoir quel taxon est phylogénétiquement le plus proche de cette famille. En 2016, Willis et al. en identifiant *Sacculospora felinovii* et réalisant une analyse phylogénétique à partir de l'ADNr (SSU-ITS-LSU), ont permis de placer la famille des Sacculosporaceae entre la famille des Pacisporaceae et des Acaulosporaceae , ces résultats sont confirmés par l'analyse phylogénétique effectuée dans cette étude (Fig. 1).

Morphologiquement les spores des Sacculosporaceae sont dites entrophosporoïdes, elles se forment à partir du milieu de l'hyphe portant le saccule et sont étroitement liées à ce dernier. Ces spores sont composées de deux parois : une paroi de la spore composées de 4 couches, et d'une paroi internes composés de 3 couches (Fig. 8).

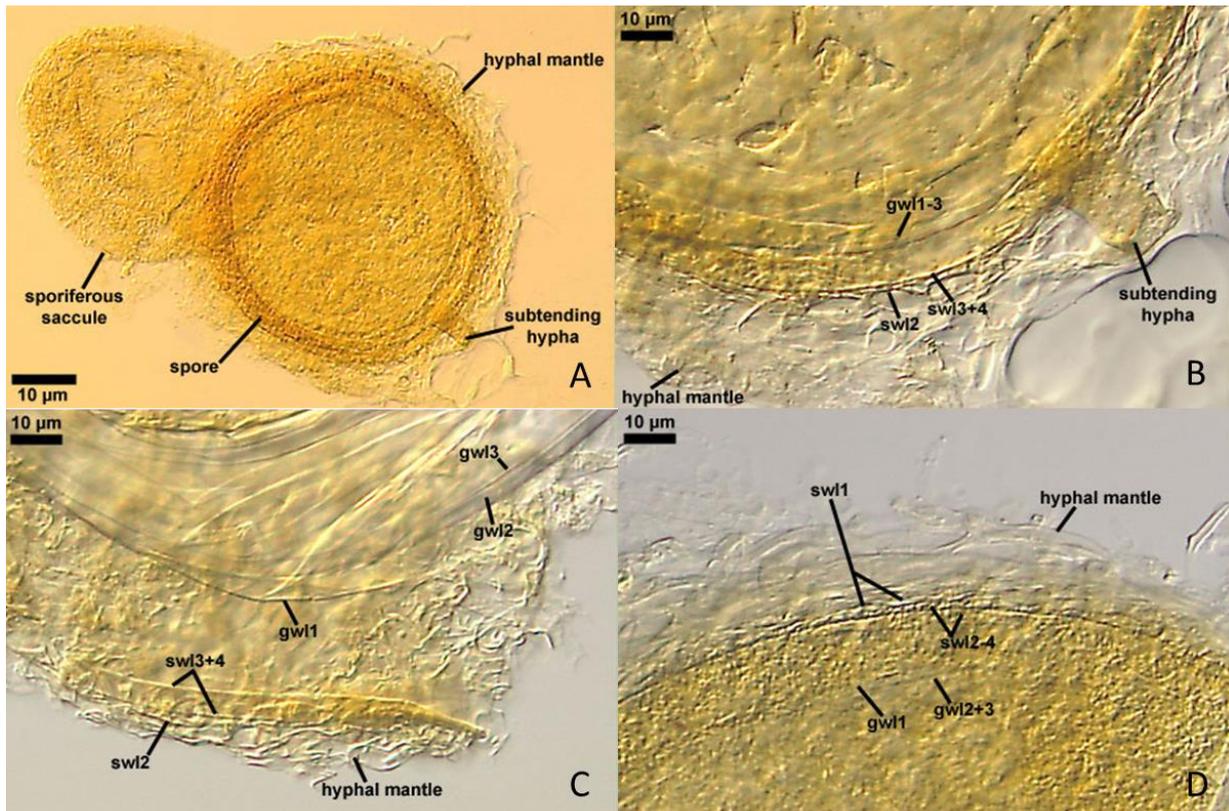


Figure 8. Photographies des spores de *Sacculospora baltica*. A. Spore, saccule (sporiferous saccule), hyphe suspenseur (hypha subtending), manteau mycelien (hyphal mantle). B. Manteau mycelien (hyphal mantle), hyphe suspenseur (subtending hypha), couche 2 de la paroi de la spore (sw12), couches 3 et 4 de la paroi de la spore (sw13+4), couches 1 à 3 de la paroi interne de la spore (gw11-3). C. Manteau mycelien (hyphal mantle), couche 2 de la paroi de la spore (sw12), couches 3 et 4 de la paroi de la spore (sw13+4), couche 1 de la paroi interne de la spore (gw11), couche 2 de la paroi interne de la spore (gw12), couche 3 de la paroi interne de la spore (gw13). D. Manteau mycelien (hyphal mantle), couche 1 de la paroi de la spore (sw11), couches 2 à 4 de la paroi de la spore (sw12-4), couche 1 de la paroi interne de la spore (gw11), couches 2 et 3 de la paroi interne de la spore (gw12+3). A. B. C. D. Spore dans du PVLG. (Photographies fourni par Janusz Błaszowski).

Pacisporaceae Walker, Blaszk., Schuessler & Schwarzott. (Walker et al. 2004a; Walker & Schüßler 2004b).

Diffère des autres familles de Glomeromycètes par la combinaison de ces caractères : des spores gloïdes avec une paroi interne amyloïde (réaction au réactif de Melzer) et par la formation d'un bouclier de germination précédant la germination. Cette famille comprend qu'un seul genre et les espèces forment des mycorhizes à arbuscules et des vésicules. Ces espèces ont deux signatures moléculaires sur l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique (SSU) : TTATCGGTTRAATC et ACTGAGTTMATYT. Ces séquences correspondent par homologie aux positions 650 et 1481 respectivement de la séquence J01353

de l'ADNr de la petite sous unité ribosomique de *S. cerevisiae*. Les analyses phylogénétiques des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr des espèces de cette famille, confirment la position phylogénétique de cette famille (Fig. 1 ; Fig. 6) et confirment les résultats obtenus par Kruger et al. 2012.

Pacispora Oehl & Sieverd. (Oehl & Sieverding 2004).

Les spores des *Pacispora* spp. sont globoïdes, non pigmentées, avec deux parois : une paroi de la spore, une paroi interne flexible réagissant au réactif de Melzer et un bouclier de germination (Fig. 9). Chaque paroi comprend 3 couches. Certains auteurs décrivent que les espèces de ce genre sont capables de former des mycorhizes à arbuscules, cependant il s'est révélé impossible de cultiver les espèces de ce genre en culture pure en conditions contrôlées en pot. Leurs descriptions sont donc basées sur des échantillons de spores collectées sur le terrain ou en culture trap.

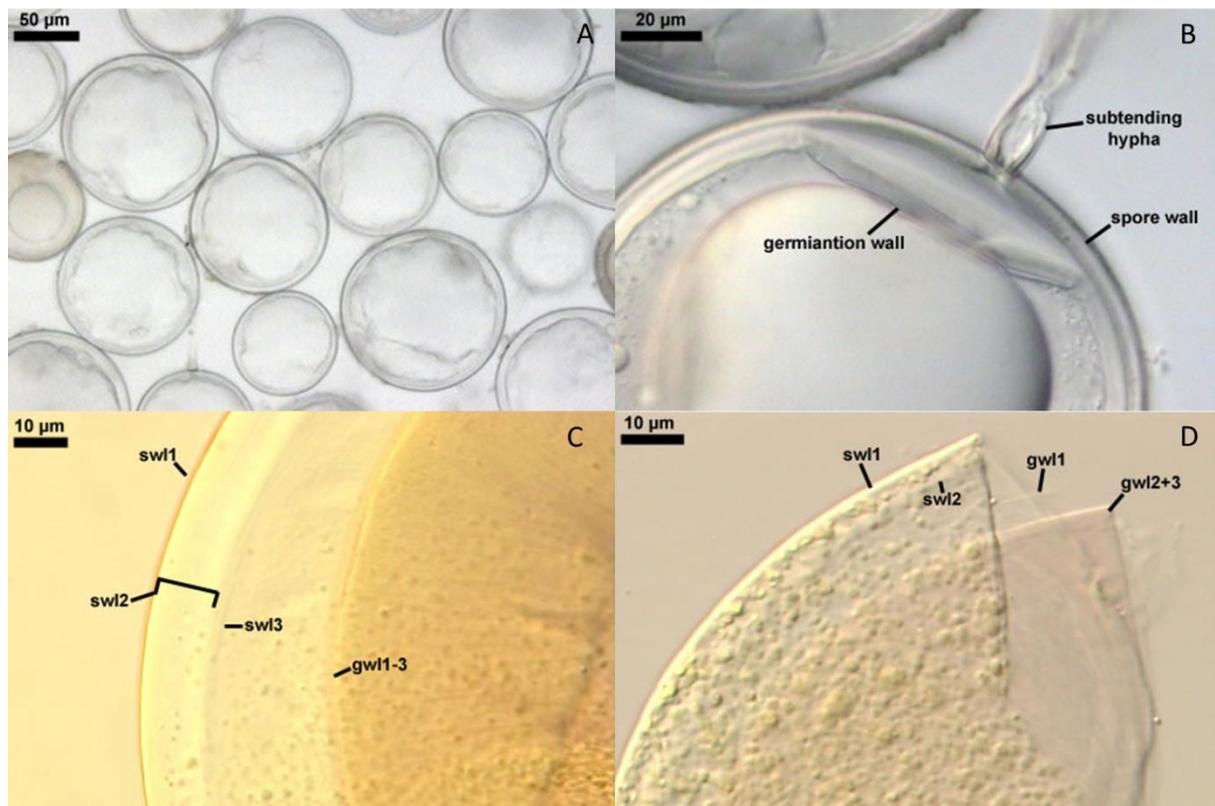


Figure 9. Photographies des spores de *Pacispora scintillans*. A. Spores intactes. B. Hyphe suspenseur (subtending hypha), paroi de la spore (spore wall), paroi germinative (germination wall). C. Couche 1 de la paroi de la spore (sw1), couche 2 de la paroi de la spore (sw2), couche 3 de la paroi de la spore (sw3), couche 1, 2 et 3 de la paroi interne de la spore (gw1-3). D. Couche 1 de la paroi de la spore (sw1), couche 2 de la paroi de la spore (sw2), couche 1 de la paroi interne de la spore (gw1), couche

2 et 3 de la paroi interne de la spore (gw12+3). B. C. Spore dans du PVLG. D Spore dans du PVLG + Melzer. (Photographies fourni par Janusz Błaszowski).

Ce genre compte actuellement 2 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Pacispora scintillans* (Rose & Trappe 1980 ; Walker et al. 2004a ; Oehl & Sieverding 2004 ; Walker et al. 2007a) ; *Pacispora franciscana* (Oehl & Sieverding 2004).

Ce genre compte également 4 espèces n'ayant pas de données moléculaires : *Pacispora patagonica* (Novas et al. 2005 ; Walker et al. 2007a) ; *Pacispora chimonobambusae* (Wu et al. 1995 ; Oehl & Sieverding 2004 ; Walker et al. 2004a ; Walker et al. 2007a) ; *Pacispora coralloidae* (Oehl & Sieverding 2004) ; *Pacispora robigina* (Oehl & Sieverding 2004) ;

Une espèce *Pacispora boliviana* (Oehl & Sieverding 2004) ; est replacée dans le genre *Paraglomus* par Mello et al. 2013, grâce à l'analyse des séquences d'ADNr qui codent pour la grande sous unité ribosomique et a donc été renommée *Paraglomus bolivianum* (Mello et al. 2013). Cette anecdote souligne l'importance et l'utilité de la biologie moléculaire pour la taxonomie de ces champignons. Les analyses phylogénétiques des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr des espèces de ce genre, confirme la position phylogénétique de ce genre (Fig. 1 ; Fig. 6) et confirme les résultats obtenus par Kruger et al. 2012.

Gigasporaceae Morton & Benny. (Morton & Benny 1990).

La famille des Gigasporaceae comprend cinq genres bien définis, le genre *Scutellospora*, *Gigaspora*, *Dentiscutata*, *Cetraspora*, *Racocetra* et trois genres (*Intraornatospora*, *Paradentiscutata*, *Bulbospora*) qui restent incertains par manque de données moléculaires et du faible nombre d'espèces découvertes appartenant à chacun de ces genres (Fig. 10). D'un point de vue morphologique, cette famille se distingue des autres, par la taille importante de ses spores (>200 um diamètre). La paroi des spores est composée d'une couche externe enveloppant la couche laminée. Chacune des espèces de cette famille possède des spores avec des parois qui diffèrent par plusieurs caractères (couleur, épaisseur, réaction au réactif de Melzer, etc.). Le contenu des spores des espèces de cette famille est cloisonné par une cellule bulbeuse sporogène fermée par un bouchon (plug) ou plus rarement par un septum (Morton 2017).

Analyse phylogénétique : Les genres considérés comme incertains (*Bulbospora*, *Intraornatospora*, *Paradentiscutata*) sont également retrouvés dans des groupes séparés des autres genres (Fig. 1 ; Fig. 10). L'espèce *Bulbospora minima* forme un groupe de niveau générique avec une faible valeur de bootstrap (Fig. 10), les espèces *Intraornatospora*, *Paradentiscutata* forment également un groupe de niveau générique ; ces deux derniers genres doivent donc être rassemblés en un genre unique d'après la phylogénie obtenue (Fig. 1 ; Fig. 10). Toutes les espèces sont bien différenciées entre elles par l'analyse phylogénétique (Fig. 10).

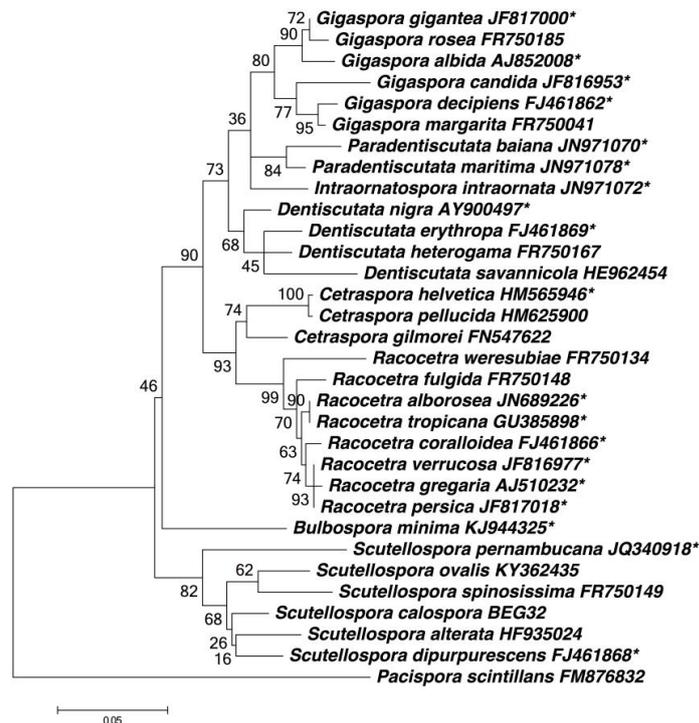


Figure 10. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ANDr de 6 espèces du genre *Gigaspora*, deux espèces du genre *Paradentiscutata*, une espèce du genre *Intraornata*, 4 espèces du genre *Dentiscutata*, trois espèces du genre *Cetraspora*, 8 espèces du genre *Racocetra*, une espèce du genre *Bulbospora* et 7 espèces du genre *Scutellospora*. L'arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) est basé sur les séquences partielles de la petite sous unité, les espaceurs internes transcrits, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (SSU-ITS-LSU) de l'ADNr, quand les séquences SSU-ITS-LSU n'étaient pas disponibles les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (LSU) ont été utilisées et labellisées avec un astérisque (*). Les valeurs de Bootstrap sont données pour chaque branche. La barre d'échelle indique le nombre de substitution par site.

Scutellospora Walker & Sanders. (Walker & Sanders 1986a).

Les spores des *Scutellospora* spp. peuvent être pourvues ou dépourvues d'ornementations. Les spores possèdent deux parois internes composées chacune de deux couches. Les tubes germinatifs émergent d'un bouclier de germination, cette structure est permanente et est toujours associée avec la paroi la plus interne de la spore, les boucliers de germination ont un ou deux lobes et sont transparents (Fig. 11). On note également la présence de cellules auxiliaires ayant une surface boutonneuse produit sur l'hyphes extraracinaire dans le sol (Oehl et al. 2008 ; Redecker et al. 2013). L'analyse phylogénétique des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr (Kruger et al. 2012 ; 2014 ; Fig. 1 ; Fig. 10) des espèces de ce genre a confirmé sa position phylogénétique. La reconstruction moléculaire réalisée par Oehl et al. 2008 remet en cause l'hypothèse avancé par Morton 1990, en effet Morton pensait que le genre *Scutellospora* dérivait du genre *Gigaspora*, finalement il semble que cela soit l'inverse, les *Gigaspora* spp. dériveraient des *Scutellospora* spp. (Fig. 10).

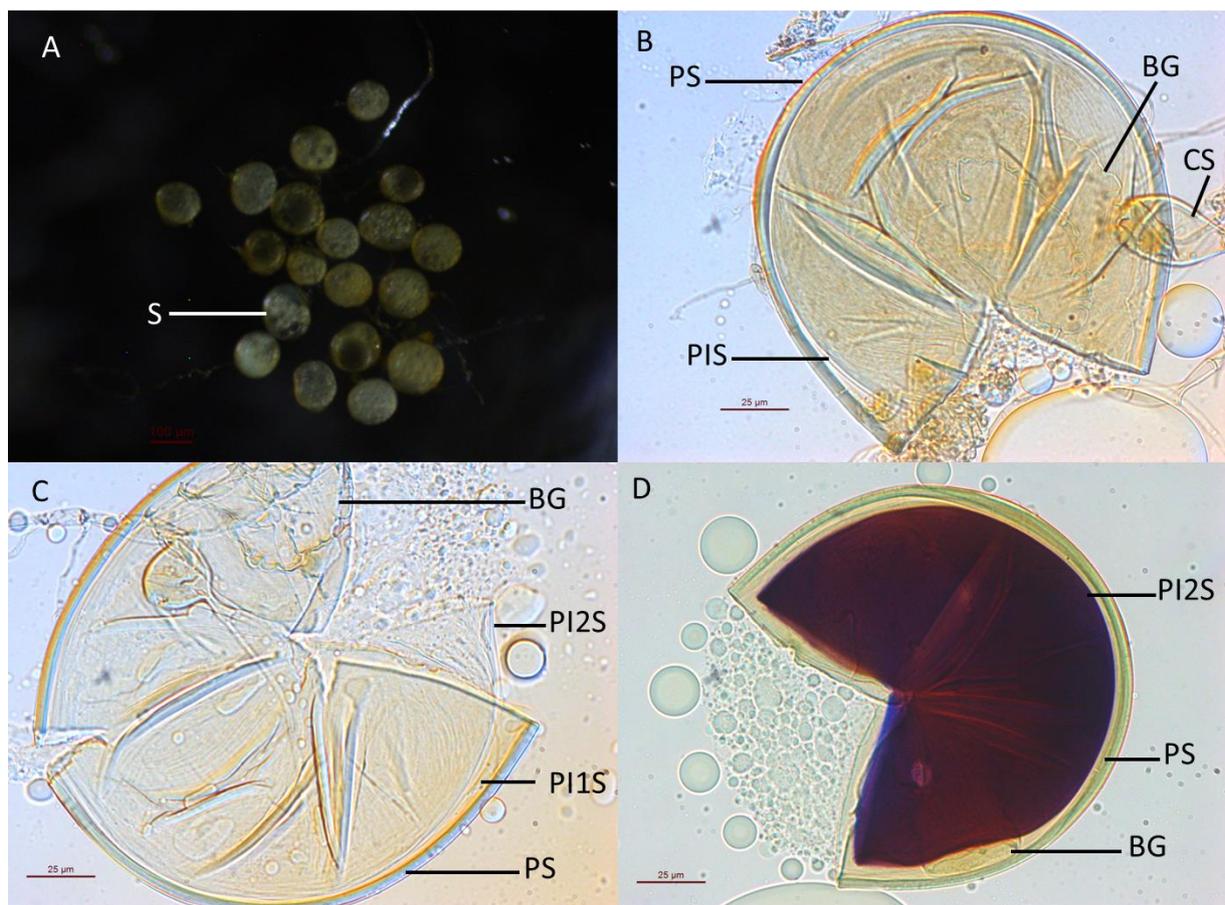


Figure 11. Photographies des spores de *Scutellospora calospora* BEG32. A. Spores intactes (S). B. Paroi de la spore (PS), paroi interne de la spore (PIS), cellule sporogène (CS), bouclier de germination (BG). C. Paroi de la spore (PS), paroi interne 1 de la spore (PI1S), paroi interne 2 de la spore (PI2S),

bouclier de germination (BG). D. Paroi de la spore (PS), paroi interne de la spore (PIS). B. C. Spore dans du PVLG. D. spore dans du PVLG+Melzer.

Ce genre compte actuellement 11 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Scutellospora alterata* (Pontes et al. 2013) ; *Scutellospora aurigloba* (Hall 1977 ; Walker & Sanders 1986a) ; *Scutellospora calospora* (Nicolson 1968 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Walker & Sanders 1986a) ; *Scutellospora crenulata* (Herrera-Peraza et al. 2001) ; *Scutellospora dipapillosa* (Koske & Walker 1985a ; Walker & Sanders 1986a) ; *Scutellospora dipurpurescens* (Morton & Koske 1988) ; *Scutellospora ovalis* (Crossay et al. 2017). *Scutellospora pernambucana* (da Silva et al. 2008 ; Redecker et al. 2013) ; *Scutellospora projecturata* (Kramadibrata et al. 2000 ; Redecker et al. 2013) ; *Scutellospora spinosissima* (Walker et al. 1998) ; *Scutellospora striata* (Cuenca & Herrera 2006).

Ce genre compte également 6 espèces n'ayant pas de données moléculaires : *Scutellospora arenicola* (Koske & Halvorson 1989a) ; *Scutellospora armeniaca* (Blaszkowski 1992) ; *Scutellospora hawaiiensis* (Koske & Gemma 1995) ; *Scutellospora scutata* (Walker & Diederichs 1989) ; *Scutellospora tepuiensis* (De Andrade et al. 2017) ; *Scutellospora tricalypta* (Ferrer & Herrera 1980 ; Walker & Sanders 1986).

Gigaspora Gerd. & Trappe. (Gerdemann & Trappe 1974).

Toutes les espèces connues de ce genre produisent des spores sans ornements. La paroi des spores consiste en une seule paroi composée de deux couches, le tube germinatif émerge d'une fine structure verruqueuse « papillate (warty) » située sur la surface interne de la couche laminée (Fig. 12). On note également la présence de cellules auxiliaires ayant une surface épineuse sur l'hyphe extra-racinaire dans le sol, ce caractère est typique de ce genre (Bentivenga & Morton 1995). L'analyse phylogénétique des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr (Kruger et al. 2012 ; 2014 ; Fig. 1 ; Fig. 10) des espèces de ce genre a confirmé la position phylogénétique de ce genre.

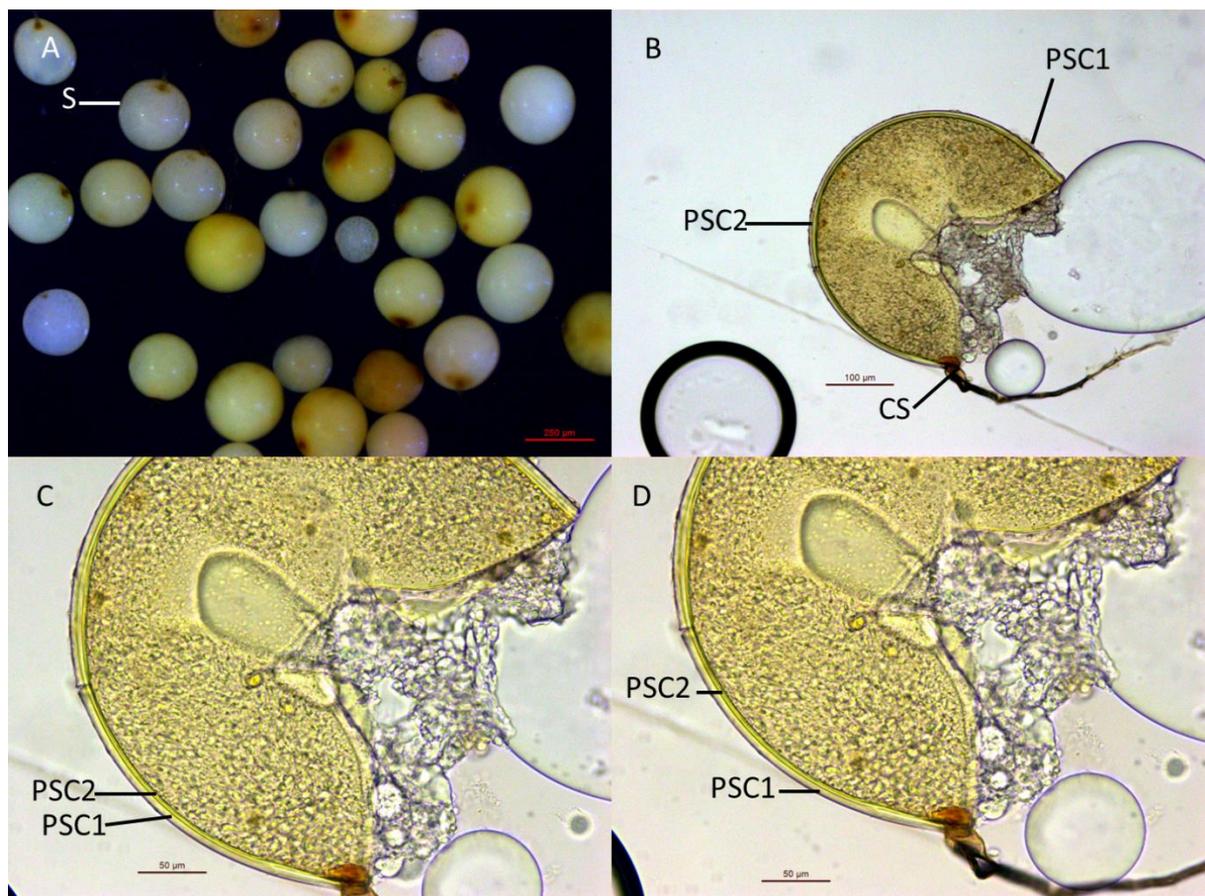


Figure 12. Photographies des spores de *Gigaspora rosea* BEG9. A. Spores intactes (S). B. Paroi de la spore couche 1 (PSC1), paroi de la spore couche 2 (PSC2), cellule sporogène (CS). C. D Paroi de la spore couche 1 (PSC1), paroi de la spore couche 2 (PSC2). B. C. D. Spore dans du PVLG.

Ce genre compte actuellement 7 espèces : *Gigaspora albida* (Schenck & Smith 1982) ; *Gigaspora candida* (Bhattacharjee et al. 1982) ; *Gigaspora decipiens* (Hall & Abbott 1984) ; *Gigaspora gigantea* (Nicolson & Gerdemann 1968; Gerdemann & Trappe 1974) ; *Gigaspora margarita* (Becker & Hall 1976) ; *Gigaspora ramisporophora* (Spain et al. 1989a) ; *Gigaspora rosea* (Nicolson & Schenck 1979).

Une espèce *Gigaspora lazzarii* (Montecchi et al. 1996) est également listée par Schüßler & Walker 2010, cependant cette espèce présente des caractères morphologiques différents des autres Glomeromycota connues et aucune donnée moléculaire n'est disponible pour cette espèce.

Dentiscutata F.A. Souza & Oehl. (Oehl et al 2008 ; Redecker et al. 2013).

Les spores des espèces de ce genre se développent de la même façon que les spores des *Scutellospora* spp. Ce genre a été séparé des *Scutellospora* spp. uniquement par des critères morphologiques se rapportant au bouclier de germination des spores, ces caractères

morphologiques avancés par Oehl et al. 2008 sont jugés douteux par Msiska & Morton 2010, Schüßler & Walker 2010, Redecker et al. 2013 et par Morton 2017. Néanmoins les nouvelles données moléculaires phylogénétiques supportent l'existence de ce genre (Schüßler & Walker 2010). L'analyse phylogénétique des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr (Kruger et al. 2012 ; 2014 ; Fig. 1 ; Fig. 10) des espèces de ce genre a confirmé l'existence et la position phylogénétique de ce genre. Redecker et al. 2013 décident donc de retenir ce genre exclusivement parce qu'il forme un clade divergent des autres Gigasporaceae.

Les spores des *Dentiscutata* spp. peuvent être pourvues ou dépourvues d'ornementations. La paroi des spores est composée de deux couches et les spores possèdent deux parois internes composées chacune de deux couches, les tubes germinatifs émergent d'un bouclier de germination, cette structure est permanente et est toujours associée avec la paroi la plus interne de la spore, les boucliers de germination sont de couleur jaune-marron à marron et sont bilobés ou comportent des compartiments multiples (Fig. 13). On note également la présence de cellules auxiliaires ayant une surface boutonneuse produit sur l'hyphe extra-racinaire dans le sol (Morton 2017, Oehl et al. 2008 ; Redecker et al. 2013).

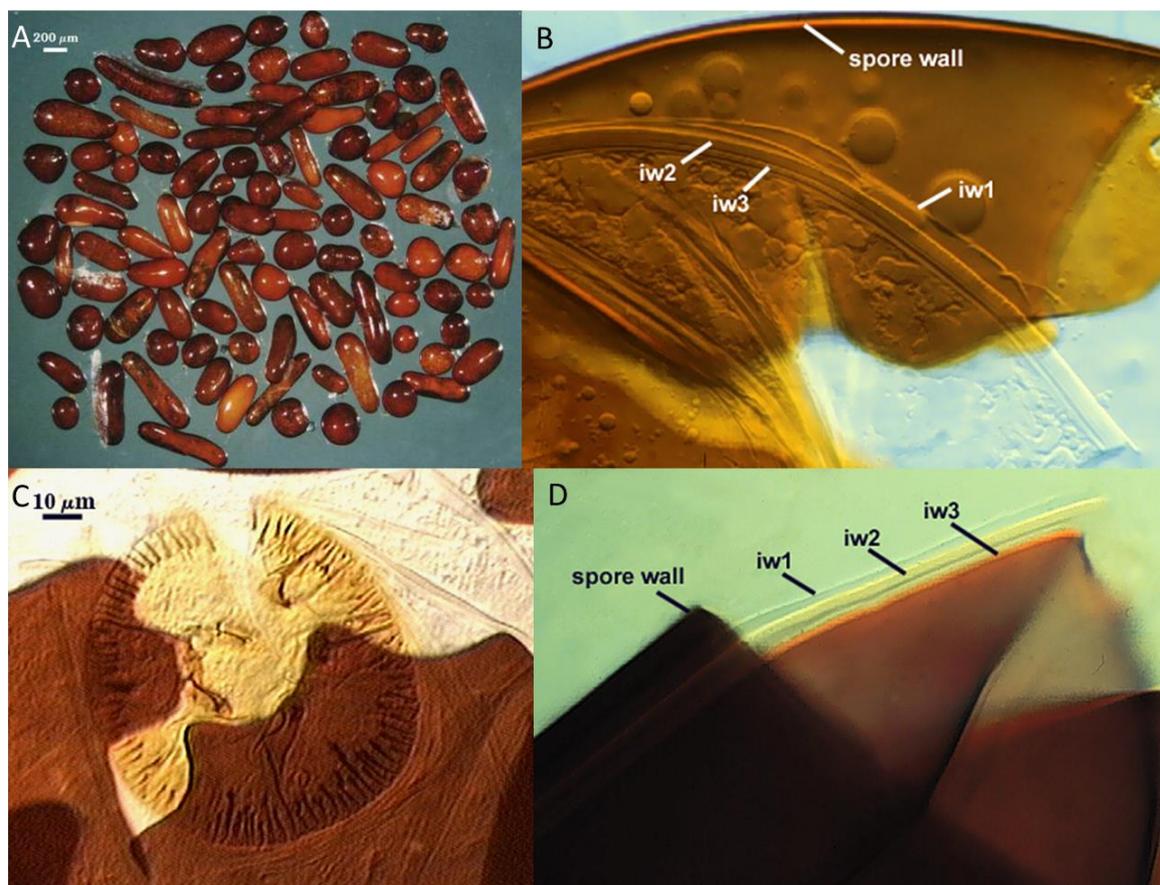


Figure 13. Photographies des spores de *Dentiscutata erythropha* (reference accession MA453B). A. Spores intactes. B. Paroi de la spore (spore wall), paroi interne 1 de la spore (iw1), paroi interne 2 de 253

la spore (iw2), paroi interne 3 de la spore (iw3). C. Bouclier de germination de la spore. D. Paroi de la spore (spore wall), paroi interne 1 de la spore (iw1), paroi interne 2 de la spore (iw2), paroi interne 3 de la spore (iw3). B. C. Spore dans du PVLG. D Spore dans du PVLG + Melzer. (Photographie INVAM; Morton 2017).

Ce genre compte actuellement 7 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Dentiscutata cerradensis* (Spain & Claessen de Miranda 1996a ; Oehl et al. 2008) ; *Dentiscutata colliculosa* (Goto et al. 2010) ; *Dentiscutata erythropha* (Koske & Walker 1984 ; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al. 2008 ; Redecker et al. 2013) ; *Dentiscutata heterogama* (Nicolson & Gerdemann 1968 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al. 2008) ; *Dentiscutata nigra* (Walker & Sander 1986a ; Oehl et al. 2008). *Dentiscutata reticulata* (Koske et al. 1983 ; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al. 2008) ; *Dentiscutata savannicola* (Ferrer & Herrera 1980 ; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al. 2008 ; Kruger et al. 2014).

Ce genre compte également 3 espèces décrites sans données moléculaires : *Dentiscutata biornata* (Spain et al. 1989b ; Oehl et al. 2008) ; *Dentiscutata nigerita* (Khade 2010) ; *Dentiscutata rubra* (Stürmer & Morton 1999 ; Morton 2017).

Intraornatospora Goto, Oehl & Silva., *Paradentiscutata* Goto, Oehl & Silva. (Goto et al. 2012a) et *Bulbospora* Oehl & G. A. Silva. (Marinho et al. 2014). Genres incertains (Redecker et al. 2013).

Les données moléculaires et morphologiques utilisées par Goto et al. 2012a pour ériger la famille *Intraornatosporaceae* et les genres *Intraornatospora* et *Paradentiscutata* sont jugés clairement insuffisantes par Redecker et al. 2013. Les genres *Intraornatospora* et *Bulbospora* sont les seuls genres dans l'embranchement des Glomeromycètes à avoir été définis seulement par des séquences de l'ADNr provenant de spores d'un champignon non cultivé et récolté sur le terrain, en conséquence les séquences de ces champignons peuvent être erronées. D'un point de vue morphologique les spores de l'unique espèce type du genre *Intraornatospora intraornata* (Goto et al. 2009 ; 2012a) ressemblent beaucoup aux spores des *Racocetra* spp. et les spores des deux espèces de *Paradentiscutata* ressemblent beaucoup aux spores des *Dentiscutata* spp. La phylogénie construite par Goto et al. 2012a montre des faiblesses dans la valeur des bootstrap et en conséquence il est très peu probable que ces deux genres existent. Des données supplémentaires doivent être apportées pour confirmer ou infirmer l'existence de ces deux genres. Le genre *Bulbospora* a été érigé en 2014 par Marinho et al., d'un point de vue morphologique les spores de l'unique espèce type du genre,

Bulbospora minima (Marinho et al. 2014) ressemblent beaucoup aux spores des *Scutellospora* spp., elles diffèrent des autres Gigasporaceae par la petite taille de sa cellule bulbeuse sporogène et par la petite taille de ses spores. L'analyse phylogénétique réalisée dans cette étude place les genres *Intraornatospora* et *Paradentiscutata* dans un seul et même genre séparé des autres genres de la famille des Gigasporaceae. Le genre *Bulbospora* semble proche du genre *Scutellospora* mais apparaît également séparé des autres genres de la famille des Gigasporaceae (Fig. 1 ; Fig. 10).

Une espèce est décrite dans le genre *Intraornatospora* : ***Intraornatospora intraornata*** (Goto et al. 2009a ; 2012a). Deux espèces sont décrites par Goto et al. 2012a comme appartenant au genre *Paradentiscutata* : ***Paradentiscutata bahiana*** et ***Paradentiscutata maritima*** (Goto et al. 2012a). Une espèce est décrite dans le genre *Bulbospora* : ***Bulbospora minima*** (Marinho et al. 2014).

Cetraspora Oehl, FA Souza & Sieverd. (Oehl et al 2008 ; Redecker et al. 2013).

Les spores des espèces de ce genre se développent de la même façon que les spores des *Scutellospora* spp. Ce genre a été séparé des *Scutellospora* spp. uniquement par des critères morphologiques se rapportant au bouclier de germination des spores, ces caractères morphologiques avancés par Oehl et al. 2008 sont jugés douteux par Msiska & Morton 2010, Schüßler & Walker 2010, Redecker et al. 2013 et par Morton 2017. Néanmoins les nouvelles données moléculaires phylogénétiques supportent l'existence de ce genre (Schüßler & Walker 2010). Redecker et al. 2013 décident donc de retenir ce genre exclusivement parce qu'il forme un clade divergent des autres Gigasporaceae. Les spores des *Cetraspora* spp. peuvent être pourvues ou dépourvues d'ornementations. La paroi des spores est composée de deux couches et les spores possèdent deux parois internes composées chacune de deux couches (Fig. 14). Les tubes germinatifs émergent d'un bouclier de germination, cette structure est permanente et est toujours associée avec la paroi la plus interne de la spore, les boucliers de germination sont transparents et multilobés. On note également la présence de cellules auxiliaires ayant une surface boutonneuse sur l'hyphe extra-racinaire dans le sol (Oehl et al. 2008 ; Redecker et al. 2013). L'analyse phylogénétique des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr (Kruger et al. 2012 ; 2014 ; Fig. 1 ; Fig. 10) des espèces de ce genre a confirmé la position phylogénétique de ce genre.

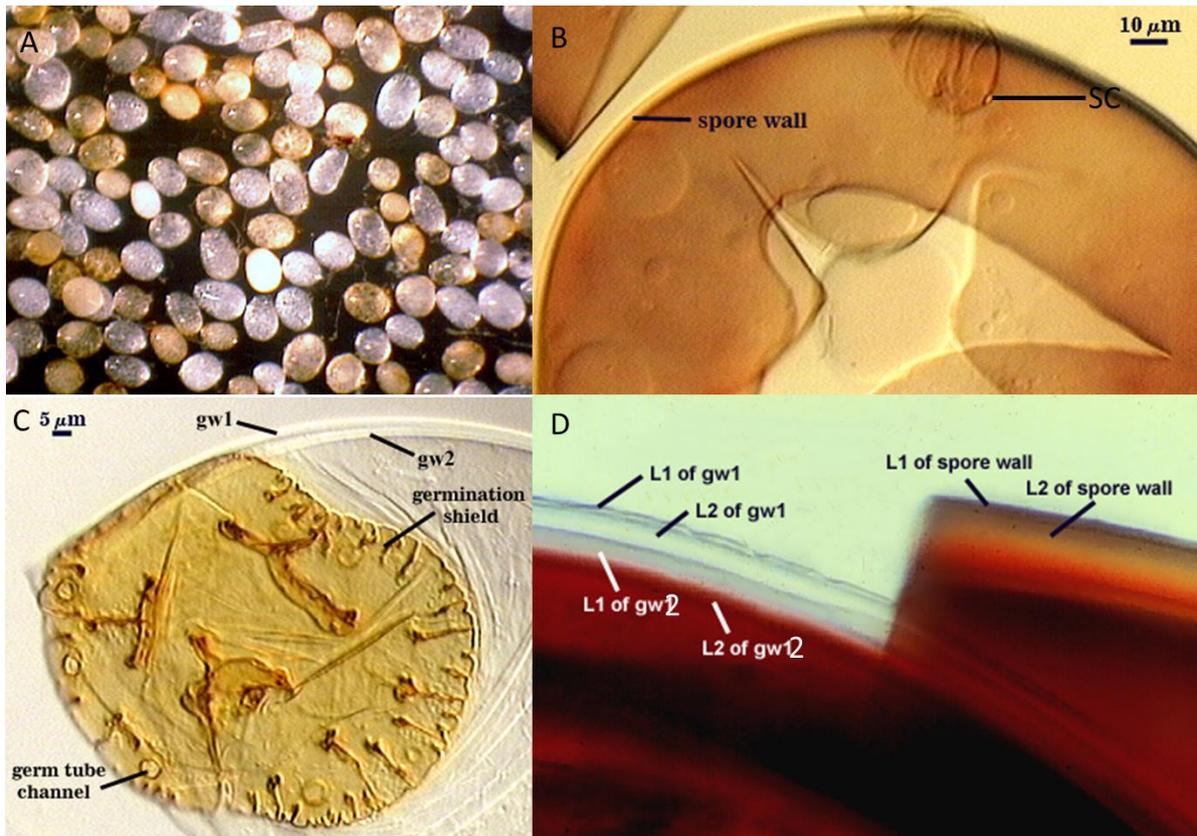


Figure 14. Photographies des spores de *Cetraspora pellucida* (reference accession FL966). A. Spores intactes. B. Paroi de la spore (spore wall), cellule sporogène (SC). C. Bouclier de germination de la spore (germination shield), paroi interne 1 de la spore (gw1), paroi interne 2 de la spore (gw2), emplacement du tube germinatif (germ tube channel). D. Couche 1 de la paroi de la spore (L1 of spore wall), couche 2 de la paroi de la spore (L2 of spore wall), couche 1 de la paroi interne 1 de la spore (L1 of gw1), couche 2 de la paroi interne 1 de la spore (L2 of gw1), couche 1 de la paroi interne 2 de la spore (L1 of gw2), couche 2 de la paroi interne 2 de la spore (L2 of gw2). B. C. Spore dans du PVLG. D Spore dans du PVLG + Melzer. (Photographie INVAM ; Morton 2017).

Ce genre compte actuellement 4 espèces : *Cetraspora gilmorei* (Gerdemann & Trappe 1974 ; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al. 2008) ; *Cetraspora helvetica* (Oehl et al. 2011d). *Cetraspora nodosa* (Blaszkowski 1991 ; Oehl et al. 2011c) et *Cetraspora pellucida* (Nicolson & Schenck 1979 ; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al 2008).

Racocetra Oehl, F.A. Souza & Sieverd. (Oehl et al. 2008 ; Redecker et al. 2013).

Les spores des *Racocetra* spp. peuvent être pourvues ou dépourvues d'ornementations. La paroi des spores est composée de deux couches et les spores possèdent seulement une paroi interne composée de deux couches. Les tubes germinatifs émergent d'un bouclier de germination, cette structure est permanente et est toujours associée avec la paroi la plus

interne de la spore, les boucliers de germination sont transparents et multilobés (Fig. 15). On note également la présence de cellules auxiliaires ayant une surface boutonneuse produites sur l'hyphe extra-racinaire dans le sol (Oehl et al. 2008 ; Redecker et al. 2013). L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Kruger et al. 2012, 2014 ; Fig. 1 : Fig. 10) des espèces de ce genre a confirmé la position phylogénétique de ce genre.

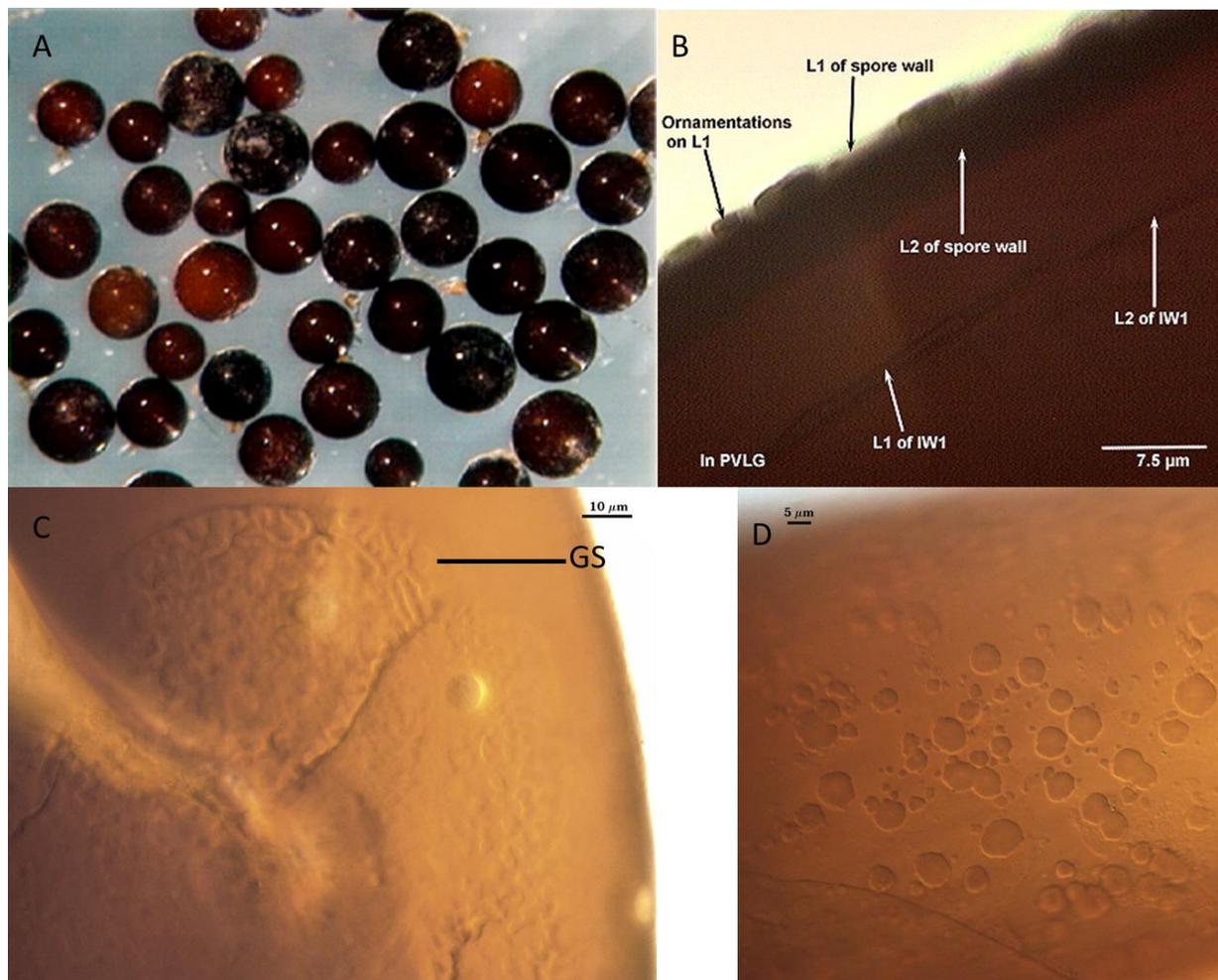


Figure 15. Photographies des spores de *Racocetra coralloidea* (reference accession CA260). A. Spores intactes. B. Ornementation de la couche 1 de la paroi de la spore, couche 1 de la paroi de la spore (L1 of spore wall), couche 2 de la paroi de la spore (L2 of spore wall), couche 1 de la paroi interne 1 de la spore (L1 of iw1), couche 2 de la paroi interne de la spore couche 2 (L2 of iw1). C. Bouclier de germination de la spore (GS). D. Ornementation de la couche 1 de la paroi de la spore. B. C. D. Spore dans du PVLG. (Photographie INVAM ; Morton 2017).

Ce genre compte actuellement 9 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Racocetra alborosea* (Ferrer & Herrera 1980 ; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al. 2008) ; *Racocetra castanea* (Walker et al. 1993 ; Oehl et al. 2008) ; *Racocetra fulgida* (Koske & Walker 1986b ; Oehl et al. 2008) ; *Racocetra coralloidea* (Gerdemann & Trappe 1974 ; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al. 2008) ; *Racocetra gregaria* (Nicolson & Schenck 1979 ;

Walker & Sanders 1986a; Oehl et al. 2008) ; *Racocetra persica* (Koske & Walker 1985a ; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al. 2008) ; *Racocetra tropicana* (Goto et al. 2011). *Racocetra verrucosa* (Koske & Walker 1985a; Walker & Sanders 1986a ; Oehl et al 2008) et *Racocetra weresubiae* (Koske & Walker 1986b; Oehl et al. 2008).

Ce genre compte également 3 espèces pour lesquelles aucunes données moléculaires ne sont disponibles : *Racocetra beninensis* (Tchabi et al. 2009) ; *Racocetra minuta* (Ferrer & Herrera 1980 ; Oehl et al. 2008) et *Racocetra undulata* (Lin & Yen 2011).

Glomerales Morton & Benny. (Morton & Benny 1990).

L'ordre des Glomérales compte deux familles les Glomeraceae et les Claroideoglomeraceae. Les espèces de cet ordre sont principalement hypogées et parfois épigées, elles forment des endomycorhizes à arbuscules avec les plantes terrestres. La reproduction sexuée n'est pas connue chez ces champignons, ils se reproduisent par reproduction asexuée grâce à la production de spores qui s'apparentent à des azygospores et ou des clamydospores. Les spores des Glomérales sont glomoïdes, produites proche de la surface du sol, il peut y avoir formation de sporocarpe avec ou sans peridium, elles peuvent aussi être produites seules ou en cluster dans le sol (Morton & Benny 1990 ; Schüßler & Walker 2010 ; Oehl et al. 2011a ; Redecker et al 2013 ; Blaszkowski et al. 2014a).

Glomeraceae Piroz. & Dalpé emend C. Walker & A. Schüßler. (Pirozynski & Dalpé 1989; Schüßler & Walker 2010; Blaszkowski et al. 2014a).

Cette famille compte sept genres : *Glomus* (*sensu stricto*), *Funneliformis*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis*, *Septoglomus*, *Dominikia*, *Kamienskia*. Les espèces de ces familles sont considérées comme des endophytes symbiotiques des racines des plantes, les hyphes de ces champignons sont coenocytiques et forment des vésicules entre les cellules des plantes et des arbuscules à l'intérieur des cellules des plantes, ces deux structures se colorent généralement en bleu foncé avec le bleu Trypan. La reproduction sexuée n'a jamais été observée. Les spores sont produites individuellement ou en petit cluster ou encore en sporocarpe. Les spores peuvent être intra ou extra-racinaires. Elles peuvent être hyalines ou pigmentées et possèdent une paroi épaisse qui peut être ornementée. Elles sont rattachées à un ou plusieurs hyphes suspenseurs. Cette famille possède une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr : TGTYADGGCAYYRCACYGG. (Pirozynski & Dalpé 1989 ; Schüßler &

Walker 2010 ; Oehl et al. 2011a ; Redecker et al 2013 ; Blaszkowski et al. 2014a). Elle inclue également toutes les espèces décrites comme *Glomus sensu lato*, ce sont des espèces qui possèdent des spores gloïdes et qui ont été décrites sans données moléculaires.

Analyse phylogénétique : Toutes les séquences (SSU-(ITS)-LSU) des espèces de chaque genre analysé sont bien affiliées à leurs genres respectifs et forment des groupes monophylétiques (Fig. 1 ; Fig. 16). Toutes les espèces sont bien différenciées entre elles par l'analyse phylogénétique (Fig. 16).

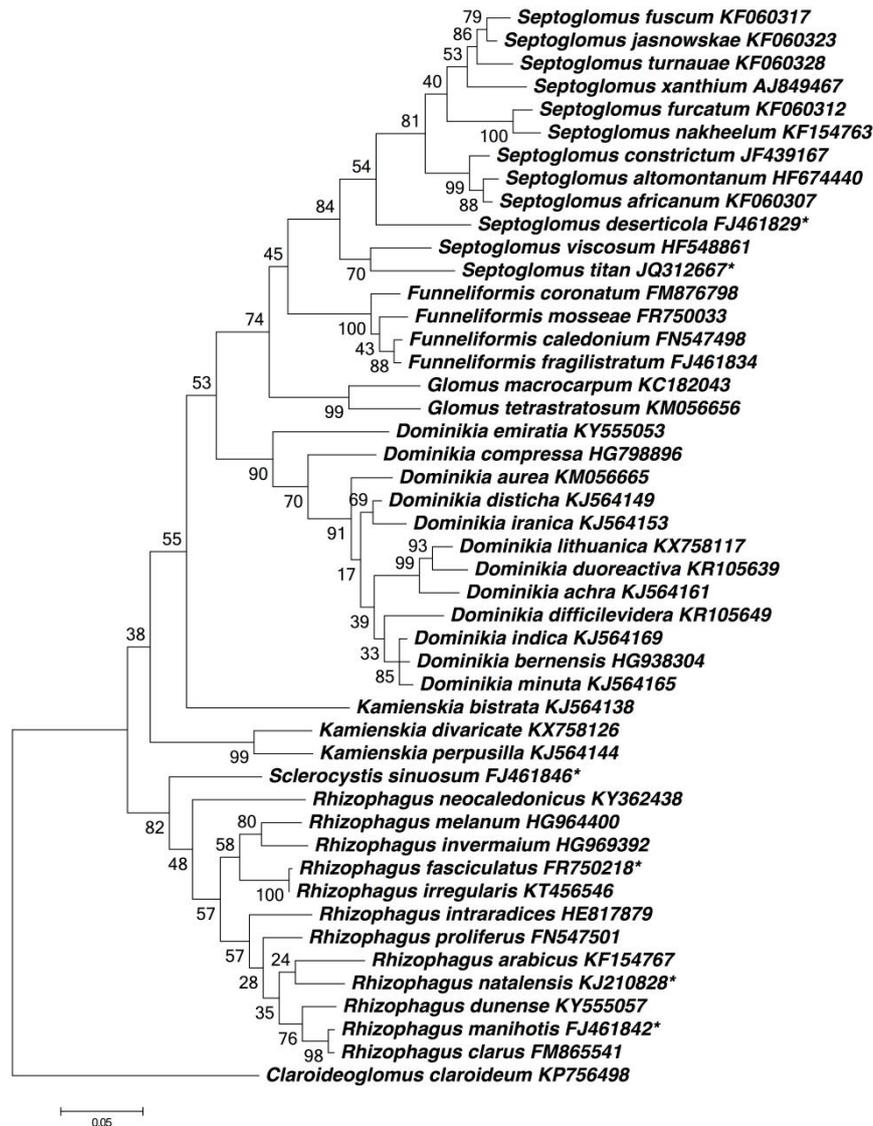


Figure 16. Analyse phylogénétique des Glomeraceae. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ANDr de 12 espèces du genre *Septoglomus*, 4 espèces du genre *Funneliformis*, deux espèces du genre *Glomus*, 12 espèces du genre *Dominikia*, 3 espèces du genre *Kamienskia*, une espèce du genre *Sclerocystis* et 12 espèces du genre *Rhizophagus*. Une espèce du

genre *Claroideoglomus* a été utilisé comme groupe externe. L'arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) est basé sur les séquences partielles de la petite sous unité, les espaceurs internes transcrits, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (SSU-ITS-LSU) de l'ADNr. Quand les séquences SSU-ITS-LSU n'étaient pas disponibles les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (LSU) ont été utilisées et labellisées avec un astérisque (*). Les valeurs de Bootstrap sont données pour chaque branche. La barre d'échelle indique le nombre de substitution par site.

Glomus (*sensu stricto*) Piroz. & Dalpé emend C. Walker & Schüßler. (Pirozynski & Dalpé 1989 ; Schüßler & Walker 2010).

Ce genre est basé sur l'espèce type *Glomus macrocarpum* Tul. & C. Tul. (1845) Berch & Fortin (1983). Depuis plusieurs années cette espèce était connue mais elle n'avait jamais été cultivée en conditions contrôlées en pots, les descriptions de cette espèce étaient donc basées uniquement sur la morphologie des spores retrouvées sur le terrain. Schüßler & Walker 2010 ont réussi à établir une culture pure de cette espèce en pots, ils ont pu séquencer des parties de gènes de cette espèce, et ont ensuite pu définir un épitype puis réaliser une analyse phylogénétique. Les spores des *Glomus (sensu stricto)* sont gloïdes, produites près de la surface du sol, il peut y avoir formation de sporocarpe, souvent avec un peridium partiel ou complet ou alors les spores peuvent être produites seules ou en cluster dans le sol. Les spores se développent par expansion blastique de l'extrémité de l'hyphe. La formation de spore peut également se produire de façon non terminale mais ce phénomène est plus rare. Les spores possèdent une seule paroi. La couche la plus extérieure de la paroi de la spore se forme en premier chez les spores juvéniles et peut être détériorée chez les spores âgées. Le plus souvent, la couche la plus externe de la paroi de la spore est mucilagineuse, et réagit au réactif de Melzer en se colorant en rouge (dextrinoïde) (Fig. 17). L'hyphe suspenseur de la spore se différencie au même rythme et synthétise les mêmes couches que celles de la paroi de la spore. Chez certaines espèces, à maturité l'hyphe suspenseur de la spore est si mince qu'il est difficile de le voir, l'hyphe peut être également séparée de la spore. Ce genre possède une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique : GGTACGYACTGGTATCATTGG et TCGGCTGTAAAAGGCYYTTG (Morton 2017 ; Schüßler & Walker 2010). L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 16) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

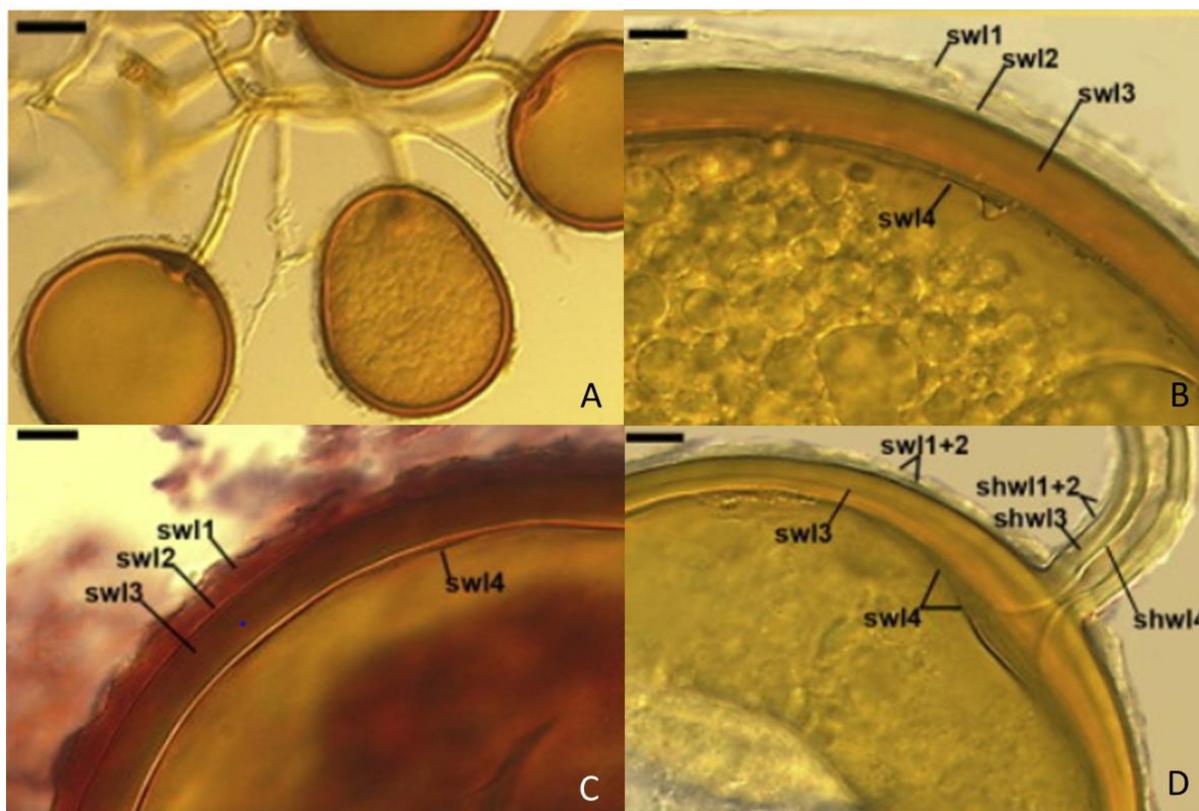


Figure 17. Photographies de *Glomus tetrastratosum* (Błaszowski et al. 2015c). A. Spores intactes. B. C. Couche 1 de la paroi de la spore (swl1), couche 2 de la paroi de la spore (swl2), couche 3 de la paroi de la spore (swl3), couche 4 de la paroi de la spore (swl4). D. Couche 1 de la paroi de l'hyphe suspenseur (shwl1), couche 2 de la paroi de l'hyphe suspenseur (shwl2), couche 3 de la paroi de l'hyphe suspenseur (shwl3), couche 4 de la paroi de l'hyphe suspenseur (shwl4). A. B. D. Spores dans du PVLG. C. Spore dans du PVLG + Melzer. A ; barre=50µm. B. C. D ; barre=10µm. (Photographies fournies par Janusz Błaszowski).

Ce genre compte actuellement 2 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Glomus macrocarpum* (Tulasne & Tulasne 1844 ; Berch & Fortin 1983 ; Schüßler & Walker & 2010) et *Glomus tetrastratosum* (Błaszowski et al. 2015c).

Glomus (*sensu lato*) (Schüßler & Walker 2010).

Toutes les espèces décrites dans la littérature comme ayant des spores gloïdes sans affiliation phylogénétique claire sont classées dans ce groupe : *Glomus albidus* (Walker & Rhodes 1981b), cette espèce semble identique à *Diversispora eburneum* ; *Glomus ambisporum* (Smith & Schenck 1985) ; *Glomus antarcticum* (Cabello et al. 1994) morphologiquement similaire aux *Rhizophagus spp.* ; *Glomus arboreense* (McGee 1986) ;

Glomus atrouva (McGee & Trappe 2002) ; *Glomus australe* (Berch & Fortin 1983) morphologiquement similaire à *Glomus macrocarpum*, mais aucune données moléculaires ne sont disponibles ; *Glomus bagyarajii* (Mehrotra 1997) ; *Glomus boreale* (Gerdemann & Trappe 1974) ; *Glomus botryoides* (Rothwell & Victor 1984) ; *Glomus brohultii* (Herrera-Peraza et al 2003) ; *Glomus canum* (McGee & Trappe 2002) ; *Glomus cerebriforme* (McGee 1986), selon les données de séquence d'ADNr actuellement publiées (2012), cette espèce semble être à l'intérieur du genre *Rhizophagus*, mais la culture utilisée pour générer les séquences peut ne pas correspondre à la bonne espèce et nécessite une vérification, donc cette espèce reste classée comme ayant une position incertaine., d'un point de vue morphologique elle semble similaire à *Glomus pallidum* (Schüßler & Walker 2010) ; *Glomus citricola* (Tang & Zang 1984), le matériel type est difficile à interpréter, peut être un mélange de plusieurs espèces (Schüßler & Walker 2010) ; *Glomus convolutum* (Gerdemann & Trappe 1974) ; *Glomus crenatum* (Furrazola et al. 2011) ; *Glomus cubens* (Rodriguez et al. 2011) ; *Glomus cuneatum* (McGee & Trappe 2002) ; *Glomus delhiense* (Mukerji et al. 1983) ; *Glomus dolichosporum* (Mei-Qing et al. 1997) ; *Glomus flavisporum* (Lange & Lund 1954 ; Gerdemann & Trappe 1974) ; *Glomus formosanum* (Wu & Chen 1986) ; *Glomus fuegianum* (Gerdemann & Trappe 1974) ; *Glomus glomerulatum* (Sieverding 1987b) ; *Glomus goaensis* (Khade 2009) ; *Glomus heterosporum* (Smith & Schenck 1985) ; *Glomus hoi* (Berch & Trappe 1985b), cette espèce est synonyme de *Simiglomus hoi* (Oehl et al. 2011a), le genre *Simiglomus* est rejeté par Redecker et al. 2013, de plus les séquences annotées *G. hoi* proviennent d'une autre espèce, la position de cette espèce reste incertaine (Schüßler & Walker 2010) ; *Glomus hyderabadensis* (Swarupa Rani et al. 2004) ; *Glomus lacteum* (Rose & Trappe 1980) cette espèce n'appartient probablement pas au genre *Glomus* (Schüßler & Walker 2010) ; *Glomus magnicaule* (Hall 1977) ; *Glomus melanosporum* (Gerdemann & Trappe 1974) ; *Glomus microaggregatum* (Koske & Gemma 1986d ; Sieverding et al. 2014), cette espèce est synonyme de *Rhizoglomus microaggregatum* (Sieverding et al. 2014) ; *Glomus mortonii* (Bentivenga & Hetrick 1991), cette espèce a été isolée en culture trap et a produit des spores, mais une culture mono spécifique n'a pas pu être établie, en conséquence, un séquençage fiable de l'ADN des spores n'a pas pu être réalisé, sa position phylogénétique reste inconnue ; *Glomus multicaule* (Gerdemann & Bakshi 1976) ; *Glomus multisubstensum* (Mukerji et al. 1983), cette espèce est synonyme de *Claroideoglomus claroideum* (anciennement *Glomus claroideum*) mais aucune vérification moléculaire n'a été réalisée, cette espèce reste donc à une position incertaine ; *Glomus nanolumen* (Koske & Gemma 1989b) ; *Glomus pallidum* (Hall 1977) ; *Glomus pansihalos* (Berch & Koske 1986) ; *Glomus*

pellucidum (McGee & Trappe 2002) ; *Glomus radiatum* (Thaxter 1922 ; Gerdemann & Trappe 1974) ; *Glomus reticulatum* (Bhattacharjee & Mukerji 1980), la description de cette espèce est vague et mal illustrée, le matériel type n'existe plus, c'est donc un nom d'espèce qui n'est pas utilisable ; *Glomus segmentatum* (Trappe 1979), cette espèce forme des sporocarpes et est connue uniquement à partir d'échantillons de terrain, il n'existe pas de séquence d'ADN pouvant être utilisée pour établir sa véritable phylogénie ; *Glomus spinosum* (Hu 2002), la description de cette espèce est vague et aucun matériel type ne semble exister ; *Glomus spinuliferum* (Oehl et al. 2003a) ; *Glomus sterilum* (Mehrotra et al. 1992) cette espèce a été publiée sans description ou diagnostic en latin (une exigence du Code botanique pour les descriptions formelles après le 1er janvier 1935), donc son nom est invalide ; *Glomus tenebrosum* (Thaxter 1922 ; Berch & Fortin 1983) ; *Glomus trufemii* (Goto et al. 2012b) ; *Glomus warcupii* (McGee 1986) ; *Glomus zaozhuangianus* (Fayuan & Runjin 2002).

Funneliformis Walker & Schüßler. (Schüßler & Walker 2010, Oehl et al. 2011a).

Les spores des espèces appartenant au genre *Funneliformis* diffèrent des spores des autres genres qui produisent des spores glomoides, par la production de spores colorées dans le sol ou dans le substrat. Les spores sont produites dans des sporocarpes qui peuvent être composés de 1 à 20 spores et qui sont recouverts entièrement ou partiellement par un manteau mycélien, les spores peuvent également être ectocarpiques, elles sont alors produites seules ou en petit groupe dans le substrat. L'hyphe suspenseur est de la même couleur que la paroi de la spore (ou un peu plus clair), il est spécifique à chaque espèce et est généralement en forme d'entonnoir ou cylindrique. La paroi de la spore est en continuité avec l'hyphe suspenseur qui est pigmenté sur une distance de 50 à 250 µm à partir de la base de la spore, ensuite le mycélium devient hyalin. Les spores ont une seule paroi qui est normalement composée de deux ou trois couches. La couche incolore la plus extérieure de la spore disparaît chez les spores matures. Les spores sont fermées par un septum à leur base au niveau de l'hyphe suspenseur (Fig. 18). Ce genre de champignon forme des mycorhizes à arbuscules et à vésicules dans les racines des plantes, ces structures se colorent de bleu à bleu foncé avec le bleu de trypan. Ce genre possède une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique : CGGTCATGCCGTTGGTATGY. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 16) des espèces de ce genre confirme sa position phylogénétique.

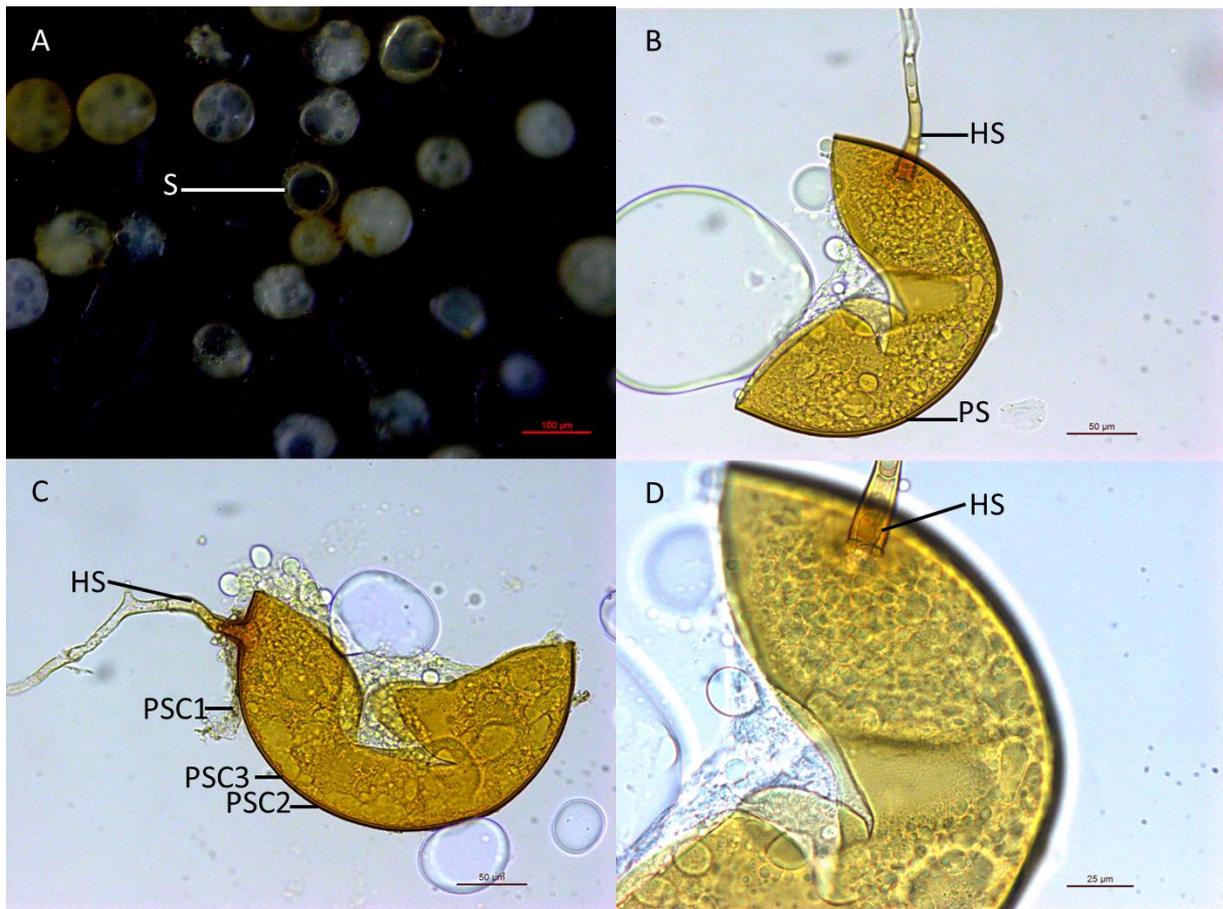


Figure 18. Photographies des spores de *Funneliformis mosseae* BEG12. A. Spores intactes (S). B. Paroi de la spore (PS), hyphe suspenseur (HS). C. Paroi de la spore couche 1 (PSC1), paroi de la spore couche 2 (PSC2), paroi de la spore couche 3 (PSC3), hyphe suspenseur (HS). D. Hyphe suspenseur (HS). B. C. D. Spore dans du PVLG.

Ce genre compte actuellement 7 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Funneliformis badium* (Oehl et al. 2005 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Funneliformis caledonium* (Nicolson & Gerdemann 1968 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Funneliformis coronatum* (Giovannetti et al. 1991 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Funneliformis mosseae* (Nicolson & Gerdemann 1968 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Funneliformis fragilistratum* (Skou & Jakobsen 1989 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Funneliformis geosporum* (Nicolson & Gerdemann 1968 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Walker 1982 ; Schüßler & Walker 2010) et *Funneliformis verruculosum* (Błaszczowski & Tadych 1997b ; Schüßler & Walker 2010).

Oehl et al. 2011a transfèrent 6 espèces classées dans le groupe *Glomus sensu lato* par Schüßler & Walker 2010, dans le genre *Funneliformis*, ces transferts ont été réalisés sans aucune données moléculaires et sont basées sur des critères morphologiques peu clairs et

rejetés par le consensus de Redecker et al. 2013. *Funneliformis caesaris* (Oehl et al. 2002 ; Oehl et al. 2011a) ; *Funneliformis dimorphicus* (Boyetchko & Tewari 1986 ; Oehl et al. 2011a), nom confus en raison d'une erreur, le matériel type déposé comprend quatre espèces déjà décrites, Oehl et al. 2011a replacent cette espèce dans le genre *Funneliformis* sans preuves moléculaires ; *Funneliformis halonatum* (Goto et al. 2009b ; Oehl et al. 2011a) ; *Funneliformis kerguelensis* (Dalpé et al. 2002 ; Oehl et al. 2011a) ; *Funneliformis monosporum* (Gerdemann & Trappe 1974 ; Oehl et al. 2011a), une culture en pot de cette espèce avait été établie, mais la culture de cette espèce a été perdue avant qu'elle puisse être séquencée et *Funneliformis multiformis* (Blaszkowski & Tadych 1997b ; Oehl et al. 2011a).

Septoglomus Sieverd., Silva & Oehl. (Oehl et al. 2011a).

Les spores sont formées seules ou en petit groupe, elles ont une paroi qui peut être composée d'une ou plusieurs couches. L'hyphe suspenseur est de la même couleur que la paroi de la spore (ou un peu plus clair), il peut être cylindrique resserré ou en forme d'entonnoir à la base de la spore. Le pore à la base de la spore ou proche de la base de la spore est fermé par un septum (Fig. 19). Les *Septoglomus* spp. forment des mycorhizes vesiculo-arbusculaires dans les racines des plantes, les structures mycorhiziennes se colorent en bleu à bleu foncé avec le bleu Trypan. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 16) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

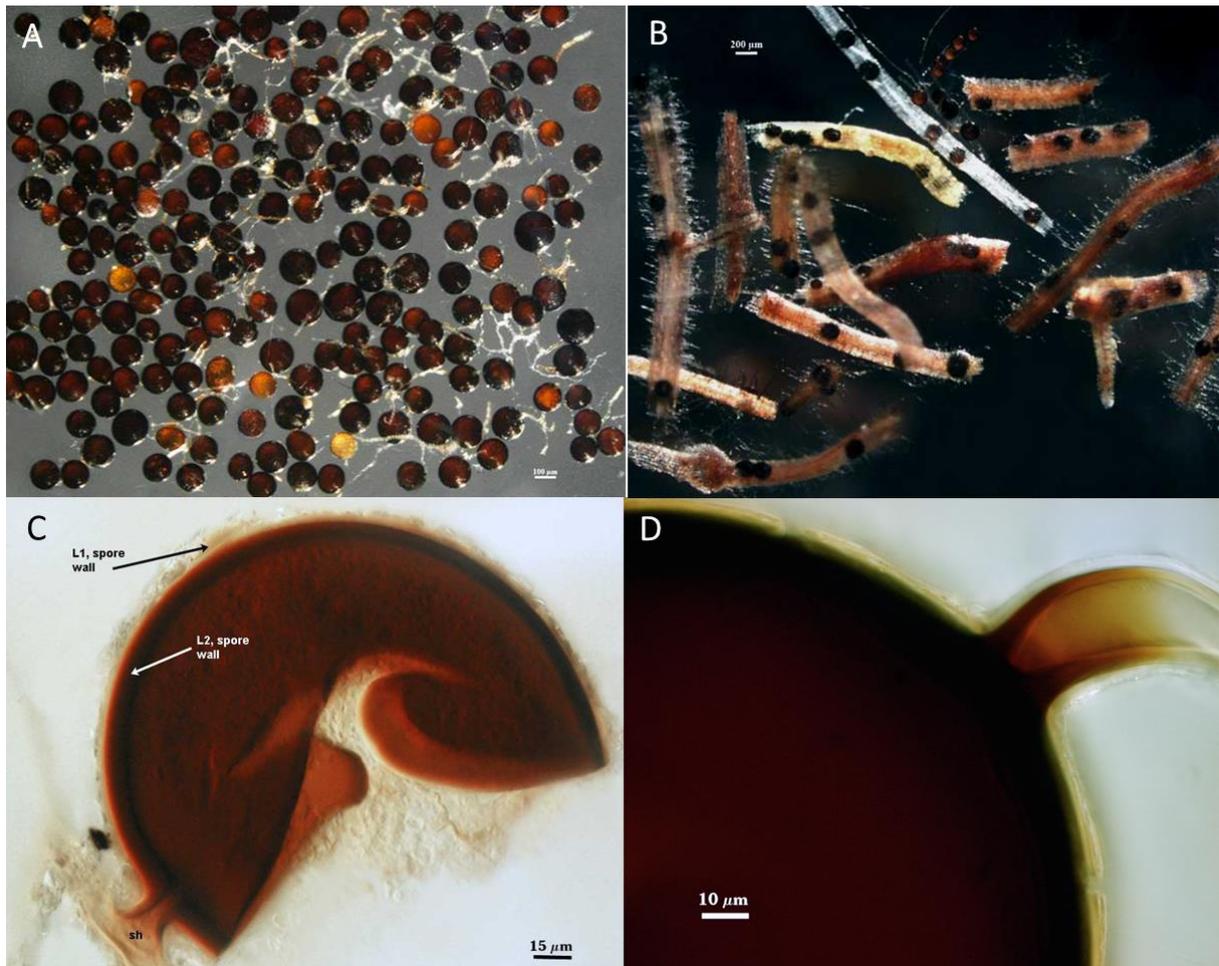


Figure 19. Photographies des spores de *Septoglomerus constrictum* (reference accession KS890). A. Spores intactes. B. Spores intactes dans les racines. C. Couche 1 de la paroi de la spore (PSC1), couche 2 de la paroi de la spore (PSC2), hyphe suspenseur de la spore (sh). D. Hyphe suspenseur. C. Spore dans du PVLG. D. Spore dans du PVLG + Melzer (Photographie INVAM ; Morton 2017).

Ce genre compte actuellement 12 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Septoglomerus altomontanum* (Palazuela et al. 2013b) ; *Septoglomerus africanum* (Błaszowski et al. 2010a ; Schüßler & Walker 2010 ; Oehl et al. 2011a), cette espèce est initialement décrite comme *Glomus (sensu lato)* par Błaszowski et al. 2010a, puis suite à des analyses phylogénétiques elle est replacée dans le genre *Funneliformis* nouvellement érigé par Schüßler & Walker 2010, en 2011a Oehl et al. séparent le genre *Funneliformis* en deux genres : *Funneliformis* et *Septoglomerus* et transfèrent cette espèce dans le genre *Septoglomerus*. ; *Septoglomerus constrictum* (Trappe 1977 ; Schüßler & Walker 2010 ; Oehl et al. 2011a) ; *Septoglomerus deserticola* (Trappe et al. 1984 ; Schüßler & Walker 2010 ; Oehl et al. 2011a ; Błaszowski et al. 2013a) l'article où la première preuve moléculaire de cette espèce a été publiée (Chellappan et al. 2005) montre une illustration d'un champignon qui ne permet pas

de confirmer qu'il s'agit bien de *S. deserticola*, la culture de l'ex-type de cette espèce étant disponible, Blazkowski et al. 2013a séquencent une partie des gènes de l'ADNr codant pour la petite et la grande sous unité ribosomiques et prouvent que cette espèce appartient bien au genre *Septoglomus* ; *Septoglomus furcatum* (Blazkowski et al. 2013b) ; *Septoglomus fuscum* (Blazkowski et al. 2013b) ; *Septoglomus jasnowskae* (Blazkowski et al. 2014b) ; *Septoglomus nakheelum* (Symanczik et al. 2014) ; *Septoglomus titan* (Goto et al. 2013b) ; *Septoglomus turnauae* (Blazkowski et al. 2014b) ; *Septoglomus viscosum* (Walker et al. 1995 ; Oehl et al. 2011a ; Redecker et al. 2013) et *Septoglomus xanthium* (Blazkowski et al. 2004a ; Schüßler & Walker 2010, Oehl et al. 2011a).

Rhizophagus (Dangeard) Walker & Schüßler. (Dangeard 1896, 1900; Schüßler & Walker 2010; Sieverding et al. 2014; Walker et al. 2017).

Dangeard (1896) est le premier à décrire un champignon mycorhizien à arbuscule formant des spores dans les racines d'un arbre, cependant Dangeard 1896 décrit cette espèce comme étant un champignon pathogène du peuplier et la nomme *Rhizophagus populinus* (Dangeard 1896, 1900). Plusieurs années plus tard Petri (1919) explique que Dangeard (1896) a fait fausse route en pensant que la maladie du peuplier était liée à *R. populinus* et reconnaît que *R. populinus* est un champignon endomycorrhizien. Gerdemann & Trappe (1974) considèrent que les genres *Rhizophagus* et *Glomus* sont synonymes. Schüßler & Walker 2010 après avoir examiné l'étude de Dangeard (1896) concluent que l'espèce décrite dans cette étude *R. populinus* est une espèce de champignon mycorhizien à arbuscules qui produit des spores de façon très abondante dans les racines du peuplier. Cette caractéristique est typique du groupe *Glomus* Ab (GIGrAb) (Schwarzott et al. 2001 ; Stockinger et al. 2009) et ce groupe forme un clade de niveau générique au sein de la famille des Glomeraceae. Par conséquent, Schüßler & Walker 2010 ressuscitent le genre *Rhizophagus* et placent les espèces de Gloméromycètes appartenant à ce groupe (*Glomus* Ab) qui forment des spores de manière abondante dans les racines des plantes vasculaires dans ce genre. En 2014 Sieverding et al. rejettent le genre *Rhizophagus* en argumentant que l'espèce *R. populinus*, ne peut être affiliée d'après la description de Dangeard (1896) à aucun genre de Glomeromycota (la description de la spore étant très sommaire), de plus ils revendiquent qu'aucun matériel type n'existe pour cette espèce. Ils proposent de renommer le genre *Rhizophagus* : *Rhizoglomus*. En 2017, Walker et al. revendiquent l'existence et la légitimité du genre *Rhizophagus* et proposent de rejeter le genre *Rhizoglomus*. Walker et al. 2017 argumentent en expliquant que la première

description de Dangeard (1896) décrivait bien une espèce de Gloméromycètes appartenant au genre *Rhizophagus* et non une espèce pathogène. Le code international de la nomenclature pour les algues, les champignons et les plantes (ICN) (McNeill et al. 2006) stipule que les noms taxonomiques de genre sont déterminés par la nomenclature du nom de l'espèce type. Aucun type n'a encore été créé pour *R. populinus*, il est donc nécessaire de typifier une espèce pour que le genre *Rhizophagus* soit légitime. Les planches réalisées par Dangeard (1900) sont des illustrations fondées pour décrire un néotype (les illustrations sont acceptables pour décrire un type, pour les noms publiés avant 2007 (Art. 40.4). Le problème réside dans le fait que *R. populinus* a été décrit uniquement sur de simples illustrations alors que du matériel biologique aurait dû être déposé dans une collection officielle pour légitimer l'existence de cette espèce et pour qu'elle puisse servir d'espèce type pour le genre *Rhizophagus*. Ce matériel type est nécessaire pour permettre des observations morphologiques a posteriori par la communauté scientifique. Walker et al. 2017 proposent alors de garder le nom de genre *Rhizophagus* mais d'utiliser une nouvelle espèce type qui est clairement identifiée et décrite et dont le matériel type est disponible en culture de collection. L'espèce choisie par Walker et al. 2017 est *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Smith 1982 ; Schüßler & Walker 2010). Le débat est encore d'actualité d'un côté les illustrations de Dangeard (1900) ne permettent pas de certifier que l'espèce décrite appartienne au genre *Rhizophagus* (syn. *Rhizoglomus*), genre basée principalement sur la phylogénie. En effet le fait que les spores sporulent abondamment dans les racines est un caractère très informatif pour considérer que *R. populinus* appartenait à ce groupe (phylogénétique) mais pas suffisant d'un point de vue taxonomique, en effet plusieurs genres produisent des spores dans les racines des plantes (*Septoglomus*, *Archaeospora*, *Claroideoglomus*), ce caractère n'est donc pas synapomorphique, néanmoins la sporulation dans les racines de ces genres n'est pas très abondante mais plutôt sporadique. A ma connaissance les seules espèces à sporuler très abondamment dans les racines comme décrit par Dangeard 1900 appartiennent au groupe phylogénétique *Rhizophagus* (syn. *Rhizoglomus*) mais certaines espèces appartenant à ce groupe ne sporulent pas plus abondamment dans les racines que certaines espèces de *Septoglomus*.

Les spores des espèces appartenant au genre *Rhizophagus* peuvent être formées soit dans des sporocarpes, soit en groupe, soit seules dans le sol ou dans les racines. La paroi de l'hyphe suspenseur est en continuité avec la paroi de la spore, et présente la même couleur (ou un peu plus clair) sur une petite portion de l'hyphe (à la base de la spore). L'hyphe suspenseur de la spore est cylindrique avec un pore ouvert et, plus rarement, il peut être légèrement en forme d'entonnoir à la base de la spore. La paroi de la spore présente souvent deux ou trois

couches distinctes, la ou les couches les plus externes, celle(s) qui précèdent la couche laminée se sépare facilement de la spore lorsqu'une pression est appliquée entre lame et lamelle (Fig. 20). Les *Rhizophagus* spp. forment des mycorhizes vesiculo-arbusculaires dans les racines des plantes (de manière abondante ou sporadique selon les espèces), les structures mycorhiziennes se colorent en bleu à bleu foncé avec le bleu Trypan. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 16) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

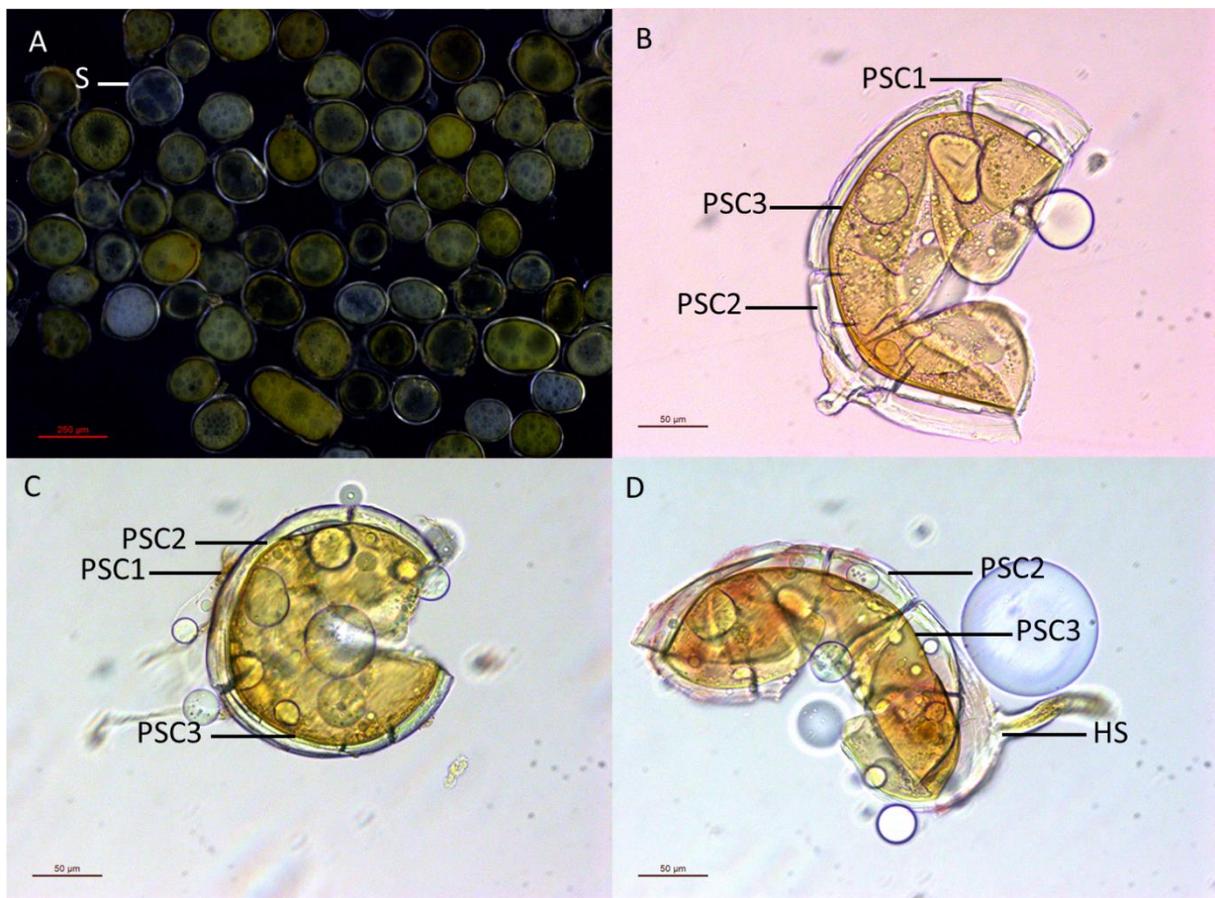


Figure 20. Photographies des spores de *Rhizophagus clarus* BEG149. A. Spores intactes (S). B. C. Paroi de la spore couche 1 (PSC1), paroi de la spore couche 2 (PSC2), paroi de la spore couche 3 (PSC3). D. Hyphe suspenseur (HS). B. C. D. Spore dans du PVLG.

Ce genre compte actuellement 15 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Rhizophagus arabicus* (Symanczik et al. 2014) ; *Rhizophagus clarus* (Nicolson & Schenk 1979 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Rhizophagus diaphanus* (Morton & Walker 1984 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Rhizophagus dunensis* (Al-Yahya'ei et al. 2017) ; *Rhizophagus custos* (Cano et al. 2009 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Rhizophagus fasciculatus* (Thaxter

1922 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Walker & Koske 1987 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Rhizophagus intraradices* (Schenck & Smith 1982 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Rhizophagus invermaius* (Hall 1977 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Rhizophagus irregularis* (Błaszkowski et al. 2008 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Rhizophagus manihotis* (Schenck et al. 1984 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Rhizophagus melanus* (Sudová et al. 2015) ; *Rhizophagus natalensis* (Błaszkowski et al. 2014c) ; *Rhizophagus neocaledonicus* (Crossay et al. 2017) ; *Rhizophagus proliferus* (Declerck et al 2000 ; Schüßler & Walker 2010) et *Rhizophagus vesiculiferus* (Thaxter 1922 ; Gerdemann & Trappe 1974 ; Schüßler & Walker 2010 ; Redecker et al. 2013).

Et une espèce incertaine : *Rhizophagus aggregatus* (Schenck & Smith 1982 ; Koske 1985b ; Sieverding et al. 2014), l'analyse de la séquence ADN de la β -tubuline place cette espèce parmi les *Claroideoglosum* spp, ces résultats ne concordent pas avec l'analyse morphologique qui place cette espèce parmi les *Rhizophagus* spp. la séquence utilisée est peut être due à une contamination, la position de cette espèce reste incertaine (Schüßler & Walker 2010).

Sclerocystis Berk. & Broome, emend. Almeida & Schenck. (Berkeley & Broome 1873; Almeida & Schenk 1990; Redecker et al. 2000a; Schüßler & Walker 2010).

Le genre *Sclerocystis* a été décrit pour la première fois en 1875 (Berkeley & Broome 1873), il a ensuite été regroupé avec le genre *Glomus* (Almeida & Schenck 1990). Schüßler & Walker 2010 après analyse des données moléculaires disponibles (Redecker et al. 2000a), établissent que ce genre forme un groupe basal par rapport au genre *Rhizophagus* et décident de conserver ce genre, cependant ils précisent que d'autres analyses doivent être réalisées pour confirmer la légitimité de ce genre. Les *Sclerocystis* spp. forment des spores gloïdes avec une paroi et un ptéridium (Fig. 21). Les spores sont disposées (excepté à la base du sporocarpe) côte à côte de façon radiale autour d'un plexus stérile central de mycelium, sur une seule couche hémisphérique, allongée. Les sporocarpes sont principalement épigés et parfois hypogés, ils peuvent fusionner les uns avec les autres, cette prolifération peut être distale ou latérale et conduit à la formation de rangées de sporocarpes qui peuvent se ramifier. Le sporocarpe typique de ce genre est renflé à subglobuleux, avec un court hyphe suspenseur à la base. Les *Sclerocystis* spp. forment des mycorhizes vesiculo-arbusculaires. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 16) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

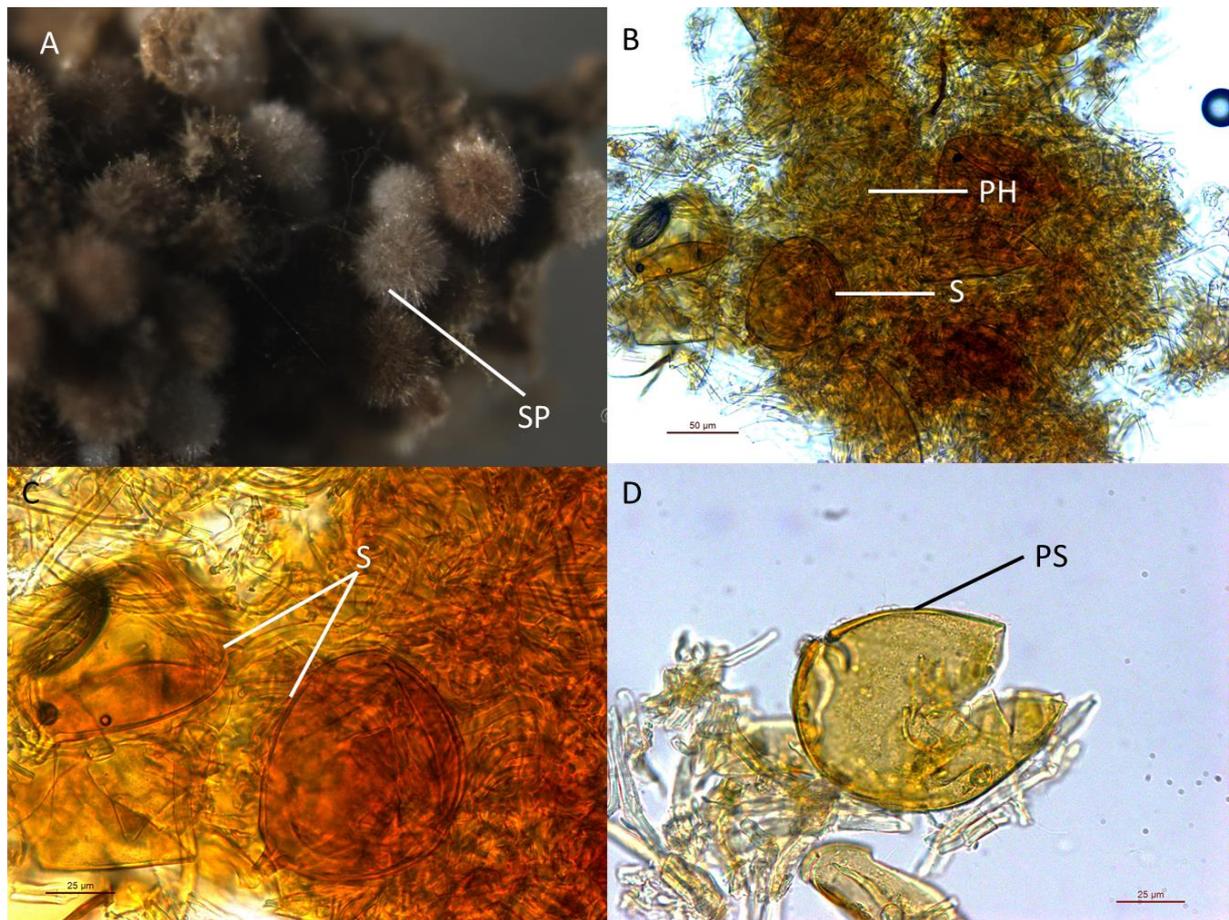


Figure 21. Photographies des spores de *Sclerocystis coremioides* BEG250. A. Sporocarpe (SP). B. Spore (S), plexus formé d'hyphe (PH). C. Spores (S). D. Paroi de la spore (PS). B. C. D. Spore dans du PVLG.

Ce genre compte actuellement 2 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Sclerocystis coremioides* (Berkeley & Broome 1874 ; Redecker et al. 2000a) et *Sclerocystis sinuosa* (Gerdemann & Bakshi 1976 ; Almeida & Schenck 1990 ; Redecker et al. 2000a).

Ce genre compte également 8 espèces pour lesquelles aucune données moléculaires ne sont disponibles : *Sclerocystis alba* (Petch 1925 ; Gerdemann & Trappe 1974) ; *Sclerocystis dussi* (Patouillard 1902 ; Höhnelt 1910) ; *Sclerocystis clavispora* (Trappe 1977 ; Almeida & Schenck 1990) ; *Sclerocystis coccogenum* (Patouillard 1902 ; Höhnelt 1910 ; Iqbal & Perveen 1980) ; *Sclerocystis liquidambaris* (Almedia & Schenck 1990 ; Yao et al. 1995 ; Wu & Chen 1987 ; Hu 1988) ; *Sclerocystis rubiformis* (Gerdemann & Trappe 1974 ; Bhattacharjee & Mukerji 1980 ; Wu & Chen 1986 ; Almeida & Schenck 1990) ; *Sclerocystis pubescens* (Saccardo 1882 ; Saccardo 1886 ; Höhnelt 1910 ; Zycha 1935 ; Gerdemann &

Trappe 1974) et *Sclerocystis taiwanensis* (Wu & Chen 1987 ; Almedia & Schenk 1990 ; Yao et al. 1995).

Dominikia Błaszcz., Chwat & Kovács. (Błaszczowski 2015d).

Les spores sont principalement hypogées et parfois produites dans les racines, elles sont formées en groupes et très rarement peuvent être produites seules dans le sol. Les spores sont de couleur jaune pastel, et de petites tailles 60-70 µm de diamètre. La paroi des spores possède deux ou trois couches la couche 1 est la plus externe, elle se trouve donc à la surface de la spore (recouvre la couche laminée) et est mucilagineuse, elle se dégrade rapidement chez les spores matures et se colore au réactif de Melzer. Chez certaines espèces de ce genre cette couche n'est pas différenciée de la couche laminée de la spore et dans ce cas elle ne réagit pas au réactif de Melzer. La couche laminée peut être la couche 2 ou 3. La paroi de la spore peut être pourvue ou dépourvue d'une couche 3 semiflexible, cette couche peut se colorer ou non-au réactif de Melzer (Fig. 22). L'hyphe suspenseur de la spore peut être de forme cylindrique ou en entonnoir avec un pore ouvert ou fermé par une cloison (septum) qui est en continuité avec la couche 3 de la paroi de la spore ou avec une lame de la couche 2 laminée. Cette cloison peut être droite ou incurvée et se développe à partir de la surface interne (couche 2) de l'hyphe suspenseur de la spore. Les espèces de ce genre forment des structures vesiculo-arbusculaires ou seulement des arbuscules, ces structures se colorent en bleu foncé en présence de bleu de Trypan. Ce genre possède une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la grande sous unité ribosomique : TGATTCCCTTAGTAACGGCGAGTGAA. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 16) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

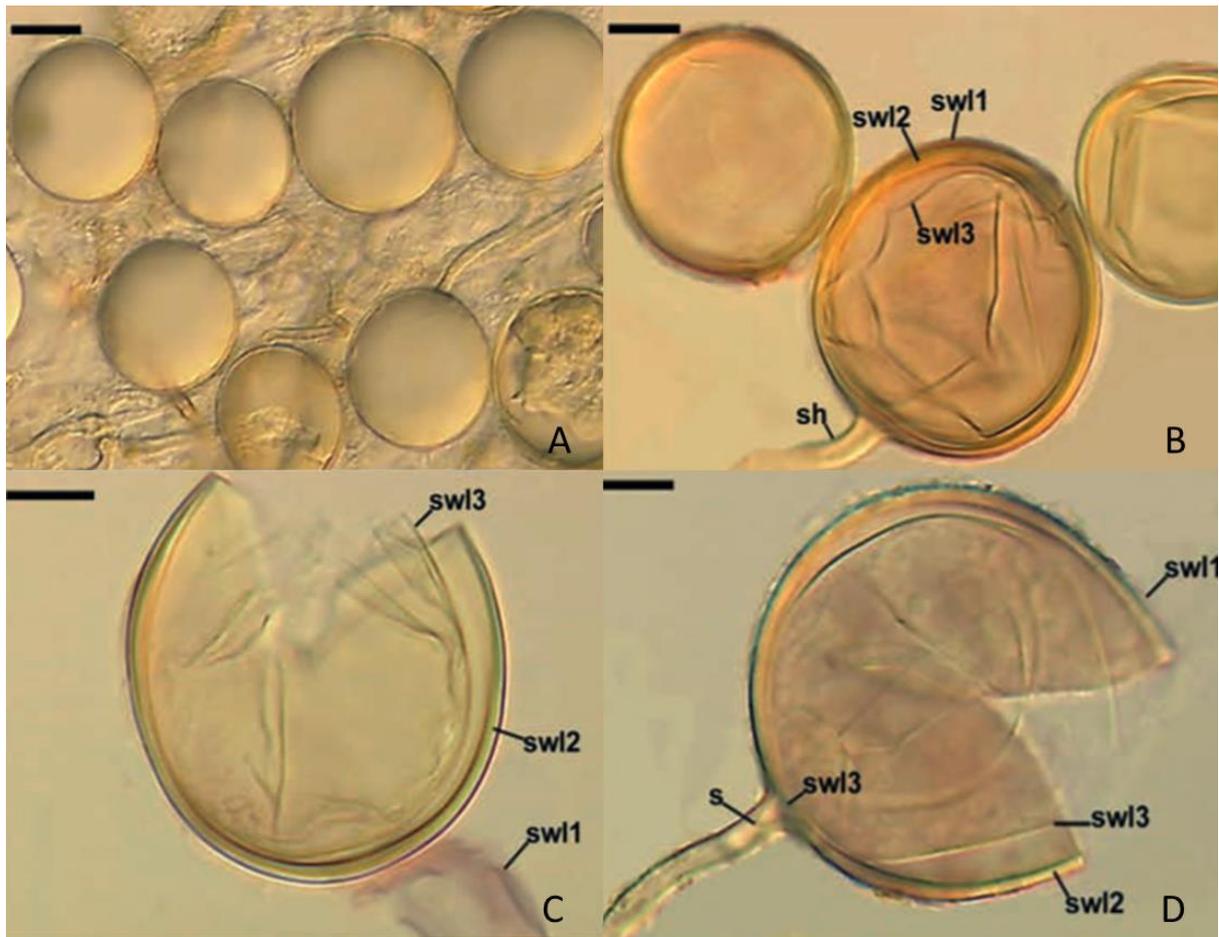


Figure 22. Photographies des spores de *Dominikia disticha*. A. Spores intactes. B. C. Couche 1 de la paroi de la spore (swl1), couche 2 de la paroi de la spore (swl2), couche 3 de la paroi de la spore (swl3). D. Couche 1 de la paroi de la spore (swl1), couche 2 de la paroi de la spore (swl2), couche 3 de la paroi de la spore (swl3), hyphe suspenseur (s). A. Spores dans du PVLG. B. C. D. Spore dans du PVLG + Melzer. A ; barre=20 μ m. B. C. D ; barre=10 μ m. (Photographies fournies par Janusz Błaszowski).

Ce genre compte actuellement 12 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Dominikia achra* (Błaszowski et al. 2009a, 2014a) ; *Dominikia aurea* (Oehl et al. 2003b ; Oehl et al. 2015a) ; *Dominikia bernensis* (Oehl et al. 2015a) ; *Dominikia compressa* (Oehl et al. 2014b ; Oehl et al. 2015a) ; *Dominikia difficilevidera* (Błaszowski et al. 2015e) ; *Dominikia disticha* (Błaszowski et al. 2014) ; *Dominikia emiratia* (Al-Yahya'ei et al. 2017) ; *Dominikia duoreactiva* (Błaszowski et al. 2015e) ; *Dominikia indica* (Błaszowski et al. 2014b, 2015e) ; *Dominikia iranica* (Błaszowski et al. 2010a, 2014) ; *Dominikia lithuanica* (Błaszowski et al. 2016) et *Dominikia minuta* (Błaszowski et al. 2000 ; 2014).

Kamienskia Błasz., Chwat & Kovács. (Błaszowski 2015d).

Les spores sont principalement hypogées et parfois produites dans les racines, elles sont formées en groupes. Les spores sont hyalines, de très petite taille (supérieure à 50 μm de diamètre). La paroi de la spore est composée de deux couches permanentes dont une peut se colorer au réactif de Melzer. La paroi structurelle de la spore peut être la couche une ou deux. L'hyphe suspenseur de la spore est cylindrique ou en forme d'entonnoir avec un pore ouvert à la base de la spore (Fig. 23). Il forme des structures vesiculo-arbusculaires qui se colorent en bleu foncé au bleu de Trypan. Ce genre possède une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la grande sous unité ribosomique : GAGAGTATGCCTGTTTGAGGGTCGGT. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 16) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

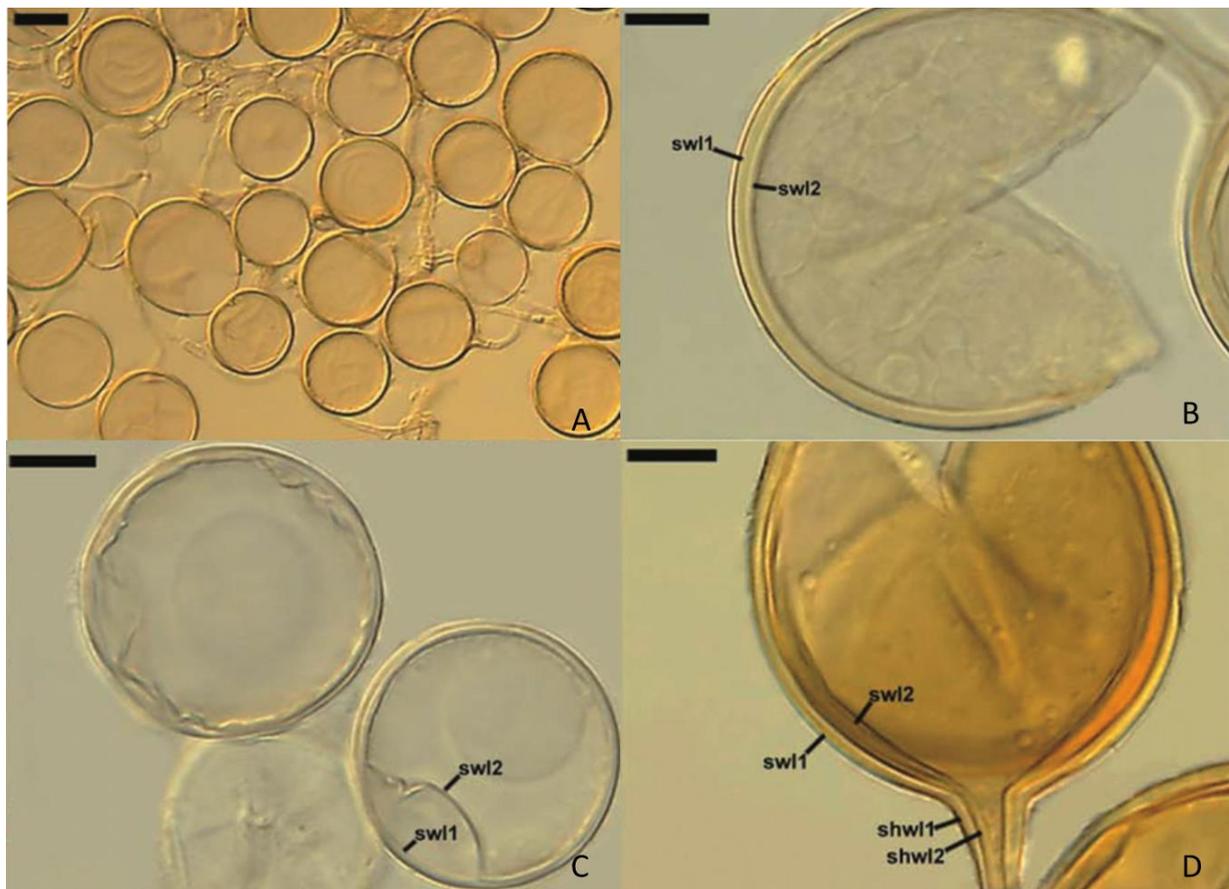


Figure 23. Photographies des spores de *Kamienskia bistrata*. A. Spores intactes. B. C. Couche 1 de la paroi de la spore (sw1), couche 2 de la paroi de la spore (sw2). D. Couche 1 de la paroi de la spore (sw1), couche 2 de la paroi de la spore (sw2), couche 1 de la paroi de l'hyphe suspenseur (shw1), couche 2 de la paroi de l'hyphe suspenseur (shw2). B. C. Spores dans du PVLG. A. D. Spores dans

du PVLG + Melzer. A ; barre=20 µm. B. C. D ; barre=10 µm. (Photographies fournies par Janusz Błaszowski).

Ce genre compte actuellement 3 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Kamienskia bistrata* (Błaszowski et al. 2009a, 2014) ; *Kamienskia divaricata* (Błaszowski et al. 2016) et *Kamienskia perpusilla* (Błaszowski et al. 2009b, 2014).

Claroideoglomeraceae Walker & Schüßler. (Schüßler & Walker 2010).

Cette famille a été décrite comme le groupe Glomus B (GlGrB; Schüßler et al. 2001), sur la base d'une analyse phylogénétique. Schwarzott et al. 2001 ont réalisé une analyse phylogénétique qui a permis de séparer ce groupe des Glomeraceae, et de conclure que ce groupe forme une famille distincte. Le genre *Claroideoglomus* est le seul genre certain de la famille des Claroideoglomeraceae. Le genre *Entrophospora* semble être affilié à la famille des Claroideoglomeraceae mais la position phylogénétique des *Entrophospora* reste en suspens à cause d'un manque de séquences disponibles et pour l'instant les *Entrophospora* ne sont donc pas considérés comme appartenant aux Claroideoglomeraceae. Les spores des espèces de cette famille sont glomoïdes et se forment dans le substrat et plus rarement dans les racines dégradées. Elles sont constituées d'une paroi composée de trois couches : une couche externe évanescence qui peut se colorer au réactif de Melzer (dextrinoïde), une couche intermédiaire interne semiflexible et une couche fine qui forme un pont au niveau de la lumière de son hyphe suspenseur qui forme ainsi un septum. A maturité la couche interne semiflexible semble former une « endospore ». Les espèces de cette famille sont différenciées par la taille des spores et la couleur de la couche intermédiaire. Elles forment des mycorhizes à arbuscules et la formation de vésicules dépend de l'environnement. Cette famille possède une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique : CAGYYGGGRAACCRCTAAA ; ATTKRC- ACATCGGTCGTGC ; CYTAAGGGGYATGAACYRGTGTAGTSA ; TAAAAYRGGACG GCATGATTCT.

Analyse phylogénétique : Toutes les séquences (SSU-(ITS)-LSU) des espèces de la famille des Claroideoglomeraceae sont bien affiliées à leur famille et forment un groupe monophylétique (Fig. 1 ; Fig. 24). Toutes les espèces sont bien différenciées entre elles par l'analyse phylogénétique (Fig. 24). Le genre *Entrophospora* semble faire partie intégrante du genre *Claroideoglomus* (Fig. 24), toutefois des différences morphologiques importantes existent entre *Entrophospora infrequens* et les espèces appartenant au genre *Claroideoglomus*, la situation doit être clarifiée en re-séquençant *Entrophospora infrequens*.

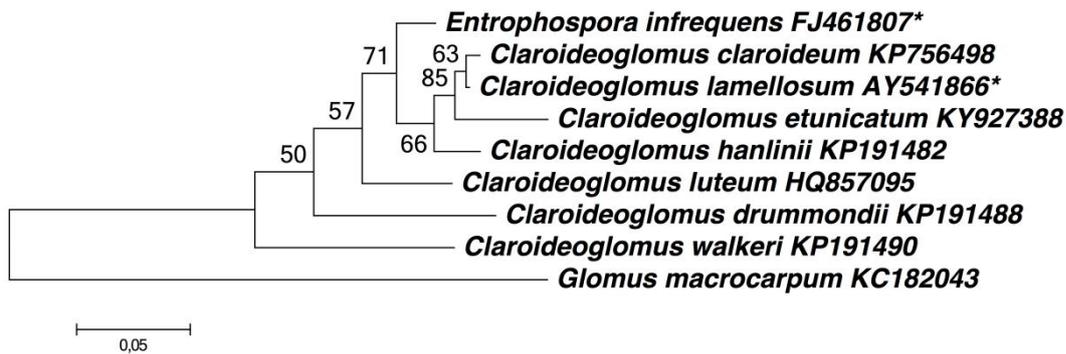


Figure 24. Analyse phylogénétique des Claroideoglomeraceae. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ADNr de 7 espèces du genre *Claroideoglomeraceae* et une espèce du genre *Entrophospora*. Une espèce du genre *Glomus* a été utilisée comme groupe externe. L'arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) est basé sur les séquences partielles de la petite sous unité, les espaceurs internes transcrits, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (SSU-ITS-LSU) de l'ADNr. Quand les séquences SSU-ITS-LSU n'étaient pas disponibles les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (LSU) ont été utilisées et labellisées avec un astérisque (*). Les valeurs de Bootstrap sont données pour chaque branche. La barre d'échelle indique le nombre de substitution par site.

Claroideoglomeraceae Walker & Schüßler. (Schüßler & Walker 2010).

Toutes les spores de ce genre ont une paroi interne qui se développe séparément de la paroi externe. Ils diffèrent des autres Glomeromycota de par la formation de spores de type globoides formées dans le substrat ou rarement dans les racines âgées des plantes. Les spores possèdent une paroi externe évanescence et une paroi interne semiflexible qui à maturité ressemble à la formation d'une 'endospore' dans la spore elle même (Fig. 25). Ce genre possède une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique : CAGYTGGGRAACCRCTAAA ; ATTKRCACATCGGTCGTGCC. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 24) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

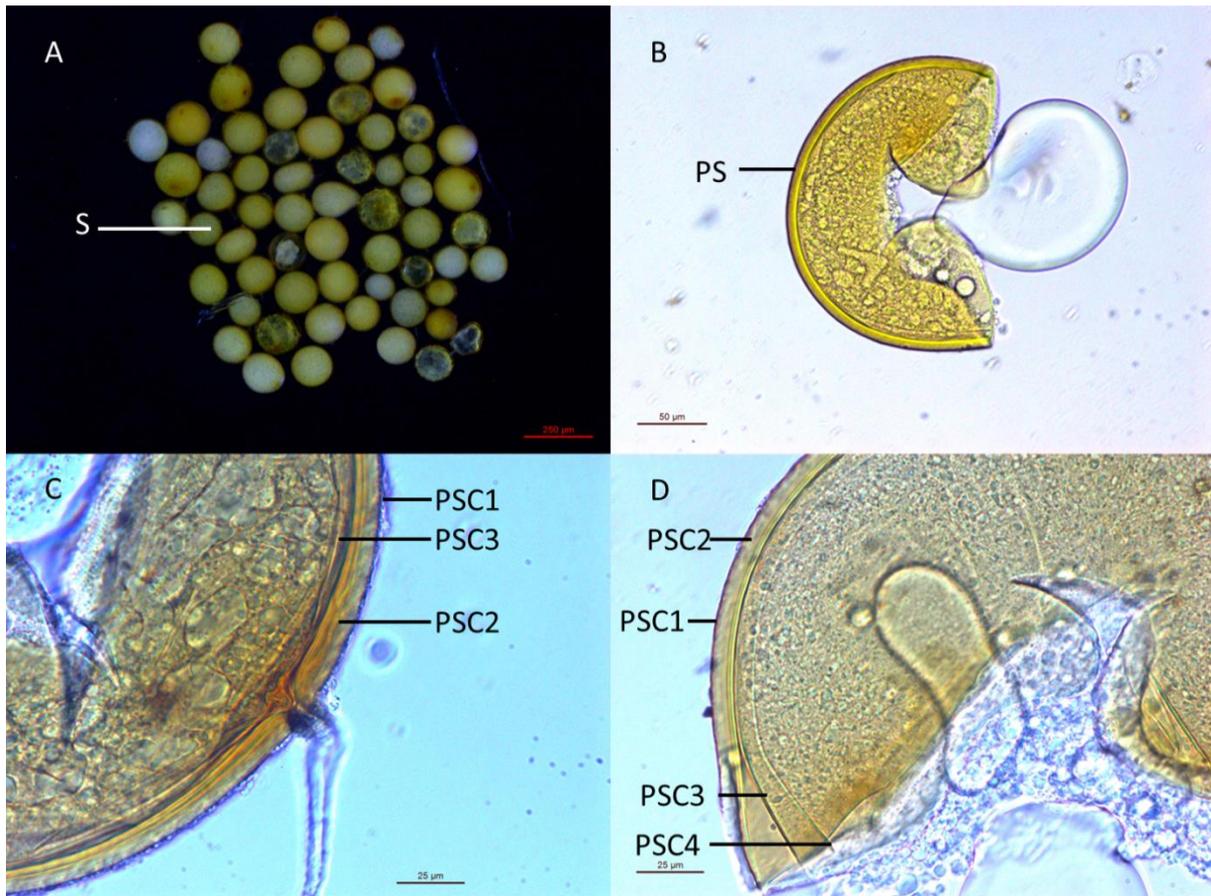


Figure 25. Photographies des spores de *Claroideoglomus claroideum* BEG23. A. Spores intactes (S). B. Paroi de la spore (PS). C. Paroi de la spore couche 1 (PSC1), paroi de la spore couche 2 (PSC2), paroi de la spore couche 3 (PSC3). D. Paroi de la spore couche 1 (PSC1), paroi de la spore couche 2 (PSC2), paroi de la spore couche 3 (PSC3), paroi de la spore couche 4 (PSC4). B. C. D. Spore dans du PVLG.

Ce genre compte actuellement 8 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Claroideoglomus candidum* (Furrazola et al. 2010 ; Ohel et al. 2011a) ; *Claroideoglomus claroideum* (Schenck & Smith 1982 ; Walker & Vesteborg 1998 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Claroideoglomus drummondii* (Błaszkowski et al. 2006 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Claroideoglomus etunicatum* (Becker & Gerdemann 1977 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Claroideoglomus hanlinii* (Błaszkowski et al. 2015b) ; *Claroideoglomus lamellosum* (Dalpé et al. 1992 ; Schüßler & Walker 2010) ; *Claroideoglomus luteum* (Kennedy et al. 1999 ; Schüßler & Walker 2010) et *Claroideoglomus walkeri* (Błaszkowski et al. 2006 ; Schüßler & Walker 2010).

Entrophospora Ames & Schneid. (Ames & Schneider 1979).

Au départ ce genre a été créé pour séparer les membres des Acaulosporaceae en deux groupes : les espèces formant des spores se développent à partir du milieu de l'hyphe portant le saccule (entrophosporoïdes) étaient placées dans le genre *Entrophospora* et les espèces formant des spores se développant à partir du côté de l'hyphe portant le saccule (acaulosporoïdes) étaient placées dans le genre *Acaulospora*. Kaonongbua et al. (2010) ont reconstruit la phylogénie moléculaire de *E. colombiana* et *E. kentinensis* (C.G Wu & Y.S. Liu) à partir du séquençage d'une partie de la grande sous unité ribosomique nucléaire (nrLSU). Les résultats obtenus démontrent que le mode de formation des spores (entrophosporoïde) n'est pas un critère synapomorphique et ne définit donc pas un groupe monophylétique. En conséquence ces deux espèces ont été transférées dans le genre *Acaulospora*. Actuellement une seule espèce est représentée dans le genre : ***Entrophospora infrequens*** (Hall 1977 ; Ames & Schneider 1979). Elle possède des caractères morphologiques similaires aux *Acaulospora* spp (Fig. 26) mais la phylogénie basée sur les séquences de l'ADNr codant pour la grande sous unité ribosomique place cette espèce parmi les Claroideoglomeraceae (Fig. 1 ; Fig. 24). La position phylogénétique des *Entrophospora* reste en suspens à cause d'un manque de séquences disponibles, de nouvelles données moléculaires doivent être apportées pour clarifier la situation de ce genre.

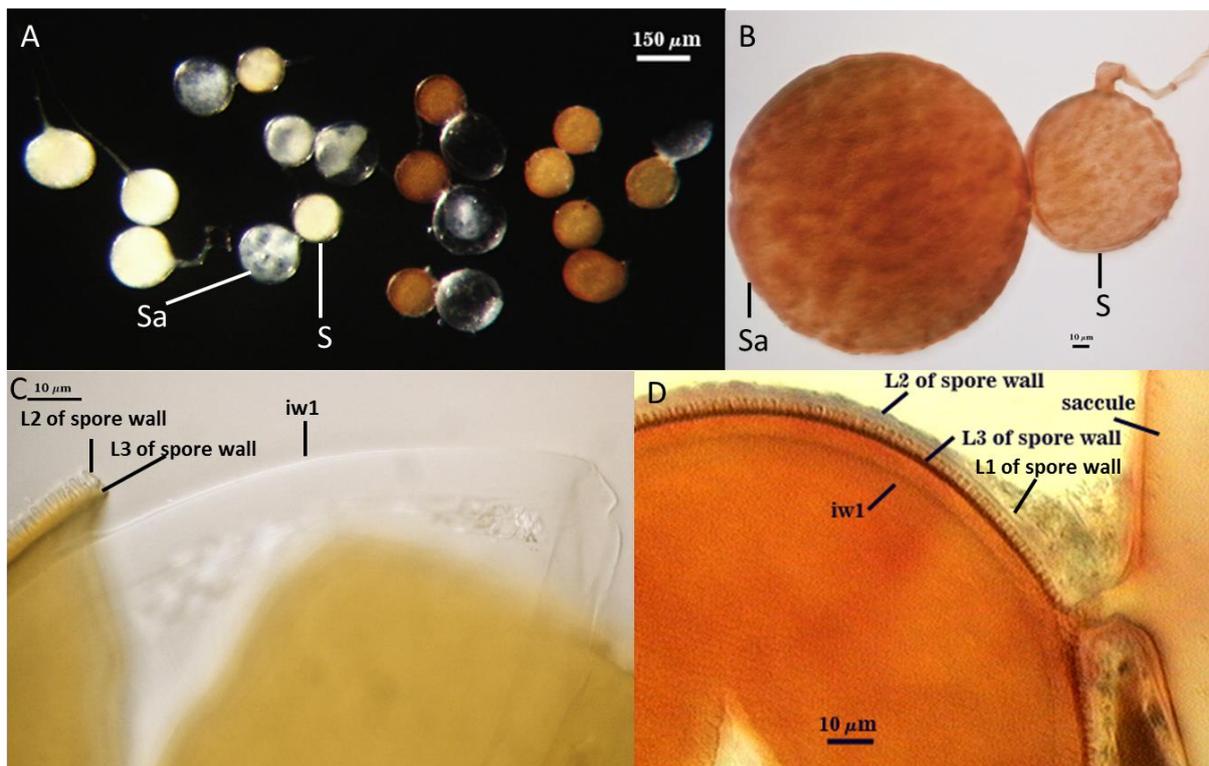


Figure 26. Photographies des spores d'*Entrophospora infrequens* (reference accession AZ237). A. B. Spores intacts (S) et saccule (Sa). C. Couche 2 de la paroi de la spore (L2 of spore wall), couche 3 de la paroi de la spore (L3 of spore wall), paroi interne de la spore (iw1). D. Paroi de la spore couche 1

(L1 of spore wall), paroi de la spore couche 2 (L2 of spore wall), paroi de la spore couche 3 (L3 of spore wall), paroi interne de la spore (iw1). B. C. D. Spore dans du PVLG. (Photographie INVAM; Morton 2017).

Archaeosporales Walker & Schüßler. (Schüßler et al. 2001).

Champignons hypogés, qui forment des endocytosymbioses avec certains procaryotes photoautotrophiques, ou produisent des mycorhizes à arbuscules avec ou sans vésicules dans les racines des plantes. Les spores de ces champignons sont incolores et ne réagissent pas au réactif de Melzer. Les spores sont glomoides ou acaulosporoides et peuvent être formées seules ou en petit groupe dans le sol (uniquement pour le type glomoides). Cet ordre comprend trois familles les Archaeosporaceae, les Ambisporaceae et les Geosiphonaceae, ces trois familles possèdent une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique : YCTATCYKYCTGGTGAKRCG (Schüßler et al. 2001 ; Schüßler & Walker 2010).

Analyse phylogénétique : Les Archaeosporales sont divisées en trois groupes : les *Archeospora/Paleospora* (Archaeosporaceae), les *Geosiphon* (Geosiphonaceae) et les *Ambispora* (Ambisporaceae) (Fig. 1 ; Fig. 27). Phylogénétiquement le genre *Paleospora* semble être trop proche du genre *Archeospora* pour être considéré comme un genre différent (Fig.27). Les Paraglomérales sont divisés en trois groupes : les *Paraglomus*, les *Innospora* et les *Pervetustus*. Le groupe *Innospora* est bien différencié des *Paraglomus* à un niveau générique et la famille Pervetustucaceae est bien différenciée de la famille des Paraglomeraceae (Fig. 27).

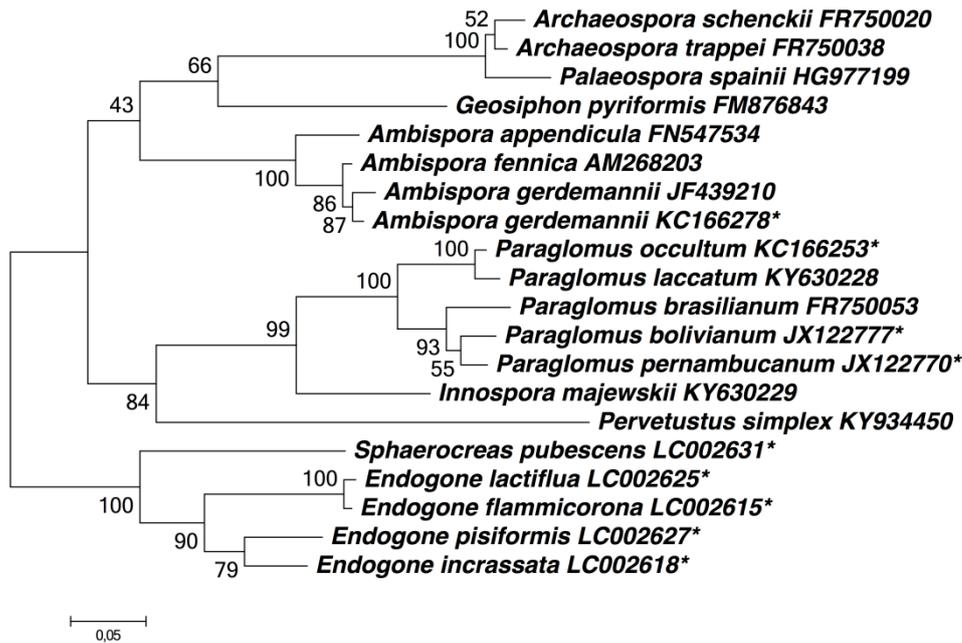


Figure 27. Analyse phylogénétique des Archaeosporales et des Paraglomérales. Analyse (Maximum de vraisemblance) des séquences SSU-ITS-LSU de l'ANDr de 6 espèces du genre *Archaeospora*, une espèce du genre *Paleospora*, une espèce du genre *Geosiphon*, 4 espèces du genre *Ambispora*, 5 espèces du genre *Paraglomus*, une espèce du genre *Innospora* et une espèce du genre *Pervetustus*. Une espèce du genre *Sphaerocreas*, et 4 espèces du genre *Endogone* ont été utilisées comme groupe externe. L'arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) est basé sur les séquences partielles de la petite sous unité, les espaceurs internes transcrits, le 5.8S et les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (SSU-ITS-LSU) de l'ADNr, quand les séquences SSU-ITS-LSU n'étaient pas disponibles les séquences partielles de la grande sous unité ribosomique (LSU) ont été utilisées et labellisées avec un astérisque (*). Les valeurs de Bootstrap sont données pour chaque branche. La barre d'échelle indique le nombre de substitution par site.

Archaeosporaceae Morton & Redecker. (Morton & Redecker 2001).

Deux études portant sur l'identification de certains caractères biochimiques, telles que les spécificités d'anticorps monoclonaux (Wright et al. 1986) et les profils d'acides gras (Graham et al. 1995) ont fourni la première preuve que cette famille, ainsi que les espèces classées dans les Ambisporaceae et Paraglomeraceae, étaient phylogénétiquement éloignées des espèces d'*Acaulospora* et de *Glomus*, mais ces données étaient insuffisantes pour déterminer la position phylogénétique des espèces appartenant à ces familles. Les caractères morphologiques étaient atypiques pour les spores de type Acaulosporoïdes ou Entrophosporoïdes (Morton et Benny, 1990). Des séquences SSU ont finalement permis de

positionner cette famille comme un clade ancestral par rapport aux Acaulosporaceae et Glomeraceae (Redecker et al. 2000b ; Sawaki et al. 1997). La phylogénie et la morphologie du gène rDNA sont congruentes et permettent de conclure que cette famille est une lignée ancestrale séparée des Paraglomeraceae et des Ambisporaceae. Les espèces appartenant aux Archaeosporaceae produisent des spores petites, hyalines, par reproduction asexuée, elles sont formées latéralement ou centralement à partir d'une hyphe portant un saccule sporifère et ne se colorent pas au réactif de Melzer. Deux genres sont représentés dans cette famille les genres *Archaeospora* et *Palaeospora*. Les espèces de ces deux genres forment des structures mycorhiziennes qui se colorent très peu et ne produisent pas de vésicules. Les Archaeosporaceae possèdent une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique : TGCTAAATAGCCAGGCT.

Archaeospora Morton & Redecker. (Morton & Redecker 2001).

Les espèces de ce genre forment des spores latéralement ou de façon centrale sur l'hyphe suspenseur qui comporte un saccule sporifère. Le mode de formation des spores est donc similaire à celui des *Acaulospora/Entrophospora* mais elles présentent d'importantes différences comme l'absence de parois germinatives internes, de pigmentation et de réaction au réactif de Melzer (Fig. 28). Deux espèces (*Acaulospora trappei* et *Entrophospora schenckii*), ont été classées comme appartenant au genre *Acaulospora* et *Entrophospora* en se basant sur le mode de formation de leurs spores mais comme expliqué ci-dessus la structure subcellulaire (absence de paroi interne) de ces spores diffèrent des autres espèces appartenant aux Acaulosporaceae et aux Entrophosporaceae. Grace aux données moléculaires (SSU) *Acaulospora trappei* est alors classée dans un clade qualifié de plus primitif : les Archaeosporales et renommée : *Archaeospora trappei* (Redecker et al. 2000b). Sieverding et Oehl (2006) placent alors *E. schenckii* dans un nouveau genre : le genre *Intraspora*, en se basant exclusivement sur le mode de formation de la spore. Ils ont fait erreur car le mode de formation de la spore est un trait convergent, et donc phylogénétiquement non informatif dans la définition de clades monophylétiques. Schüßler & Walker (2010) corrigent cette erreur, et renomment *E. schenckii* : *Archaeospora schenckii* et la replacent dans le genre *Archaeospora* en se basant sur des données moléculaires. Les *Archaeospora* possèdent une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique : TCTCKKYTTYGGKSGA. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 27) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce

genre.

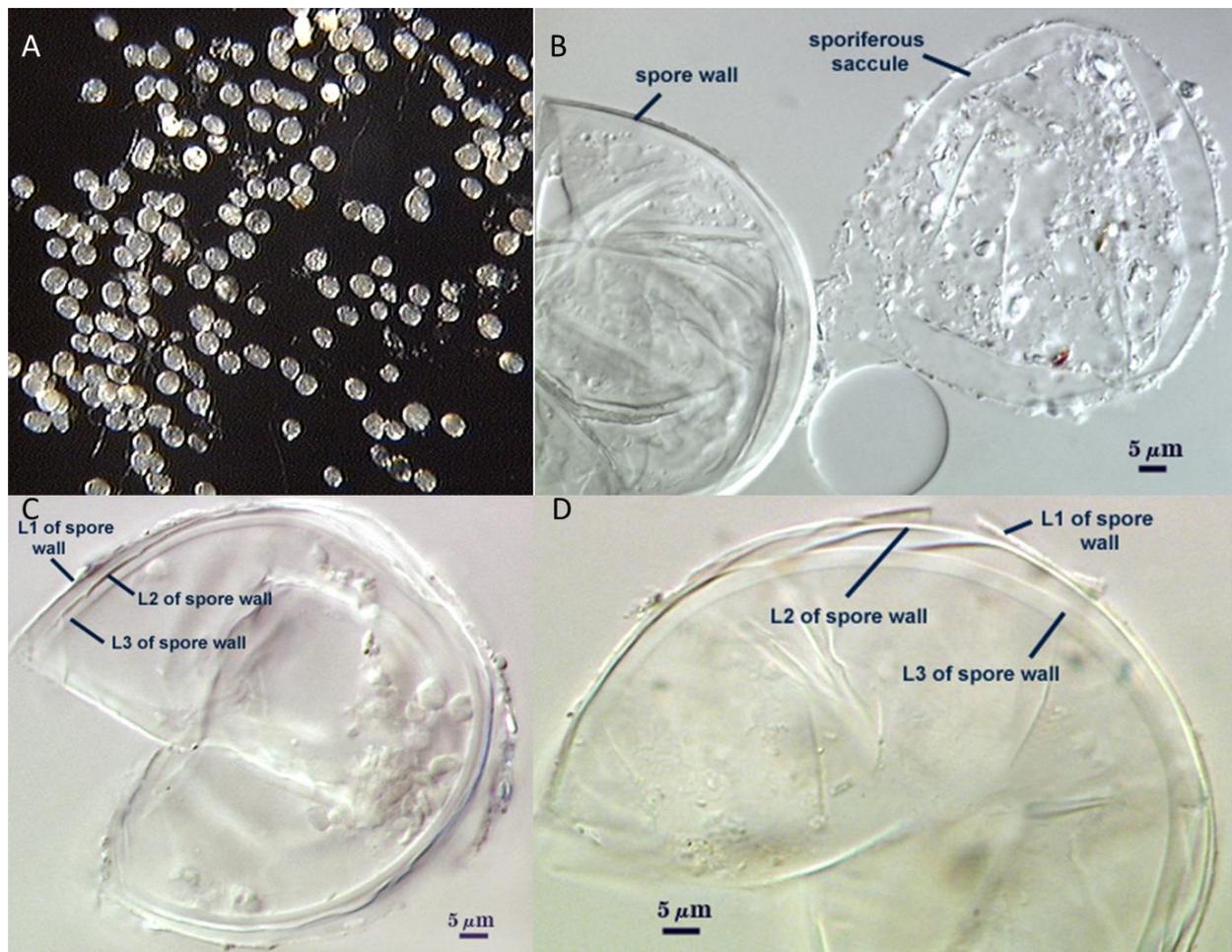


Figure 28. Photographies des spores *Archaeospora trappei* (reference accession AU219). A. B. Spores intactes (S) et saccule (Sa). C. D. Couche 1 de la paroi de la spore (L1 of spore wall), couche 2 de la paroi de la spore (L2 of spore wall), couche 3 de la paroi de la spore (L3 of spore wall). B. C. Spore dans du PVLG. D. Spore dans du PVLG + Melzer. (Photographie INVAM ; Morton 2017).

Ce genre compte actuellement 2 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Archaeospora schenckii* (Sieverding & Toro 1987c ; Sieverding & Oehl 2006 ; Schübler & Walker 2010) et *Archaeospora trappei* (Ames & Linderman 1976 ; Morton & Redecker 2001).

Ce genre compte actuellement 2 espèces pour lesquelles aucune données moléculaires ne sont disponibles : *Archaeospora myriocarpa* (Oehl et al. 2011c) et *Archaeospora undulata* (Oehl et al. 2011c).

Palaeospora Oehl, Palenz., Sánchez-Castro & G.A. Silva. (Oehl et al. 2015b).

Ces spores diffèrent des spores d'*Archaeospora* par la présence de trois parois, des spores des *Acaulospora* par l'absence de granule « beads » sur la paroi interne et des spores d'*Ambispora* par l'absence d'un pédicelle à deux parois.

La formation des spores est initiée par une expansion de l'hyphe portant le saccule (spore acaulosporoïde) ; ou bien de manière glomoïde à l'extrémité ou intercalaire sur l'hyphe. Les spores ont trois parois sans formation de pédicelle. Le pore à la base de la spore est fermé par la couche interne de la paroi externe de la spore. Une seule espèce est décrite dans ce genre : *Palaeospora spainii* (Oehl et al. 2015b). Phylogénétiquement le genre *Paleospora* semble être trop proche du genre *Archaeospora* pour être considéré comme un genre différent (Fig.27).

Ambisporaceae Walker, Vestberg & Schüßler. (Walker et al. 2007b).

Les champignons mycorhiziens à arbuscule de cette famille peuvent former des spores glomoïdes ou acaulosporoïdes et certaines espèces sont dites dimorphiques car elles peuvent former des spores glomoïdes et acaulosporoïdes. Les spores glomoïdes ne sont pas pigmentées et ont une nature souple entraînant une résistance à la fracturation lorsqu'elles sont écrasées. Les spores de type acaulosporoïdes sont formées près d'un saccule sporifère blanchâtre sur l'hyphe sporogène, elles ne sont pas forcément étroitement accolées à l'hyphe sporogène, parfois un pédicelle les rattachent à cette hyphe. Une fois détachées de l'hyphe, les spores arborent donc une apparence glomoïde. Cette famille est séparée des autres familles de l'ordre des Archaeosporales par l'analyse des séquences de l'ADNr (Walker et al. 2007b ; Fig. 27).

Ambispora Walker, Vestberg & Schüßler. (Walker et al. 2007b).

Les spores sont formées dans le sol, de façon uniquement glomoïde ou de façon glomoïdes et acaulosporoïdes. Les spores glomoïdes sont formées seules ou en petits groupes dans le sol, elles diffèrent des spores des Glomeraceae par leurs caractères résistants et par la présence d'une paroi interne. Les spores possèdent un pore ouvert ou fermé par un septum appartenant à la paroi interne. Le saccule sporifère semble initialement similaire à une spore glomoïde de par sa nature souple et résistante, il se forme à l'extrémité de l'hyphe et est fermé par un septum. Les spores acaulosporoïdes se développent sur le côté de l'hyphe portant le

saccule, la structure pariétale de la spore est complexe avec deux ou trois groupes de paroi. La paroi externe forme le premier groupe elle est en continuité avec la paroi du saccule, cette paroi renferme les deux autres groupes de paroi, le groupe deux et trois sont formés de plus d'une couche flexible chacun (Fig. 29). Les espèces de ce genre forment des mycorhizes à arbuscules dans les racines des plantes. Ce genre est séparé des autres genres appartenant aux Archaeosporales par une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la petite sous unité ribosomique : CAAAACCAATCTCGTCTTCGGGC (Walker et al. 2007b). L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 27) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

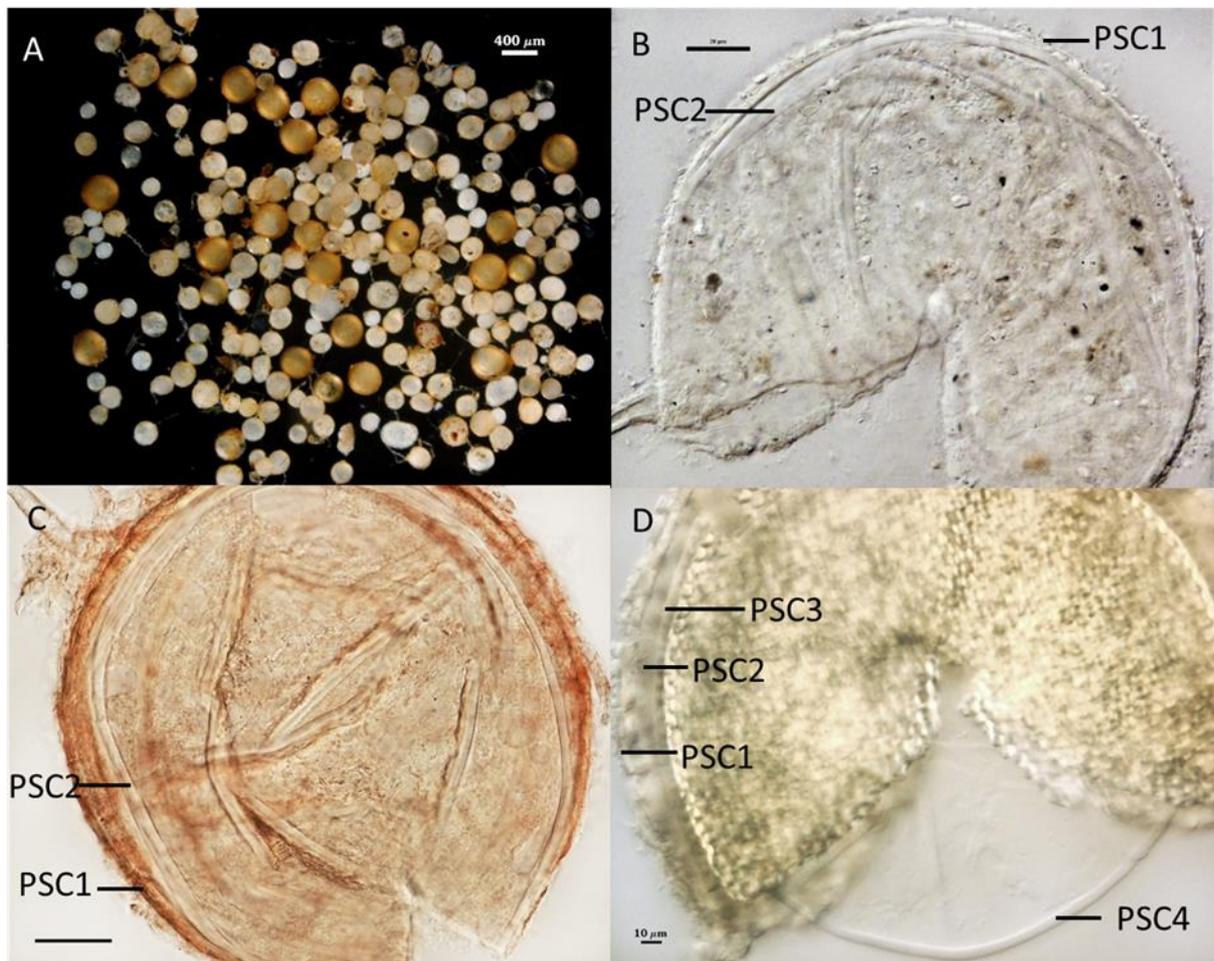


Figure 29. Photographies des spores d'*Ambispora leptoticha* (reference accession FL130A). A. Spores intactes. B. C. Morphotype gloméroïde, couche 1 de la paroi de la spore (PSC1), couche 2 de la paroi de la spore (PSC2). D. Morphotype acaulosporoïde, couche 1 de la paroi de la spore (PSC1), couche 2 de la paroi de la spore (PSC2), couche 3 de la paroi de la spore (PSC3), couche 4 de la paroi de la spore (PSC4). B. D. Spore dans du PVLG. C. Spore dans du PVLG + Melzer. (Photographie INVAM ; Morton 2017).

Ce genre compte actuellement 6 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Ambispora appendicula* (Schenck et al. 1984 ; Spain et al. 2006 ; Walker 2008) ; *Ambispora callosa* (Sieverding 1988b ; Walker et al. 2007b) ; *Ambispora fennica* (Walker et al. 2007b) ; *Ambispora gerdemannii* (Rose 1979 ; Walker et al. 2007b) ; *Ambispora granatensis* (Palenzuela et al. 2011) et *Ambispora leptoticha* (Schenck & Smith 1982 ; Walker 2008).

Ce genre compte actuellement 4 espèces pour lesquelles aucune données moléculaires ne sont disponibles : *Ambispora fecundispora* (Schenck & Smith 1982 ; Walker et al. 2007b) ; *Ambispora jimgerdemannii* (Nicolson & Schenck 1979 ; Spain et al. 2006 ; Walker 2008) ; *Ambispora reticulata* (Oehl et al. 2013) et *Ambispora nicolsonii* (Oehl et al. 2011c).

Geosiphonaceae Engler & Gilg. (Engler & Gilg 1924).

Champignon avec mycelium coenocytique, présentant des cloisons (septa) quand le mycelium devient senescent ou mort ; vit principalement de manière hypogée. Forme des spores asexuées avec des parois rigides composées de chitine. Les spores se développent de façon blastiques à l'extrémité ou non de l'hyphe. Elles peuvent être glomoïdes, produites seules ou en groupes dans le sol. Les Geosiphonaceae sont connus pour être biotrophiques, ils forment des symbioses étroites avec des organismes photo-autotrophiques. Pour le moment une seule espèce est connue, elle produit des endocytosymbioses avec les cyanobactéries. Cette famille est phylogénétiquement placée dans l'ordre des Archaeosporales.

Geosiphon Wettstein. (Wettstein 1915 ; Schüßler 2002).

Cette espèce forme des spores asexuées avec des parois rigides composées de chitine. Les spores se développent de façon blastique à l'extrémité ou non de l'hyphe. La paroi de la spore est une succession de 3 parois, une interne fine et flexible, une laminée épaisse et une externe évanescence recouvrant l'hyphe suspenseur de la spore sur quelques micromètres. Pour le moment une seule espèce est connue *Geosiphon pyriformis* (Wettstein 1915 ; Schüßler 2002). L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 27) de l'espèce de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

Paraglomerales Walker & Schüßler. (Schüßler et al. 2001).

Cet ordre est entièrement basé sur les données moléculaires. Cet ordre regroupe deux familles : Paraglomeraceae et Pervetustaceae.

Paraglomeraceae Morton et Redecker. (Morton & Redecker 2001).

Deux études portant sur l'identification de certains caractères biochimiques, telles que les spécificités d'anticorps monoclonaux (Wright et al. 1986) et les profils d'acides gras (Graham et al. 1995), ont fourni la première preuve que cette famille, ainsi que les espèces classées dans les Archaeosporales étaient phylogénétiquement éloignées des Acaulosporaceae et des Glomeraceae. Des séquences SSU ont finalement permis de positionner cette famille comme un clade ancestral par rapport aux Acaulosporaceae et Glomeraceae (Redecker et al. 2000b ; Sawaki et al. 1997). La phylogénie et la morphologie du gène rDNA sont congruentes et permettent de conclure que cette famille est une lignée ancestrale séparée des Archaeosporaceae et des Ambisporaceae. Les spores sont produites seules ou en petit groupe de 2-3 spores, la structure subcellulaire de la spore est similaire à celle des espèces de *Glomus*, avec une paroi de la spore en continuité avec la paroi de l'hyphe suspenseur. Les spores se développent de manière terminale sur un hyphe suspenseur cylindrique ou légèrement évasé. Cette famille est composée de deux genres : le genre *Paraglomus* et le genre *Innospora* (Błaszowski et al. 2017).

Cette famille est séparée des autres familles appartenant aux Glomeromycota par une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour le 5.8S : GGCATGTCTGTTTGAGGGCACCA.

Paraglomus Morton et Redecker. (Morton & Redecker 2001).

Toutes les espèces de ce genre possèdent les caractéristiques de la famille des Paraglomeraceae. Le développement des spores est identique à celui de la famille des Glomeraceae. La paroi la plus externe de la spore est dégradée chez les spores âgées (dans le sol). Les spores de ce genre sont composées de deux parois (Mello et al. 2013 ; Fig. 30). La spore est fermée par l'épaississement de la couche de la paroi la plus interne. Cette paroi est la première à se former lors du développement de la spore, des débris peuvent s'accumuler à la surface de cette paroi aucune réaction au réactif de Melzer a été rapportée. Les structures mychoriziennes des espèces de ce genre se colorent très faiblement, aucune vésicule n'a été

détectée pour les espèces décrites. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 27) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

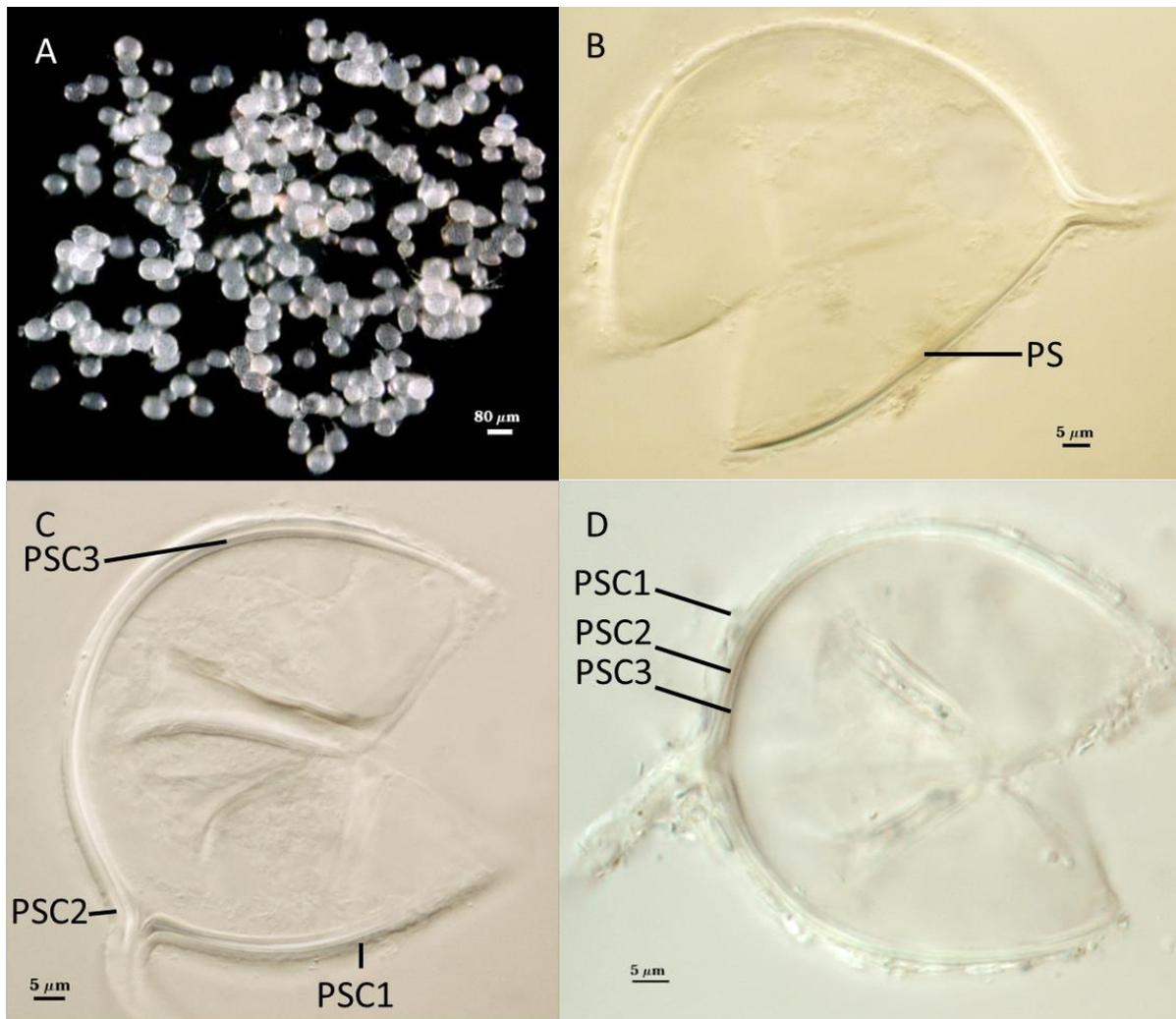


Figure 30. Photographies des spores de *Paraglomus occultum* (reference accession CL700). A. Spores intactes. B. Paroi de la spore (PS). C. D. Couche 1 de la paroi de la spore (PSC1), couche 2 de la paroi de la spore (PSC2), couche 3 de la paroi de la spore (PSC3). C. Spore dans du PVLG. B. D. Spore dans du PVLG + Melzer. (Photographie INVAM ; Morton 2017).

Ce genre compte actuellement 5 espèces ayant une position phylogénétique claire : *Paraglomus bolivianum* (Mello et al. 2013 ; Błaszowski et al. 2017) ; *Paraglomus brasilianum* (Morton & Redecker 2001 ; Spain & Claessen de Miranda 1996b) ; *Paraglomus laccatum* (Błaszowski 1988a ; Renker et al. 2007) ; *Paraglomus occultum* (Walker 1982 ; Morton & Redecker 2001) et *Paraglomus pernambucanum* (Mello et al. 2013 ; Błaszowski et al. 2017).

Ce genre compte actuellement 2 espèces pour lesquelles aucune données moléculaires ne sont disponibles : *Paraglomus albidum* (Walker 2001b ; Oehl et al. 2011a) ; et *Paraglomus lacteum* (Rose & Trappe 1980 ; Oehl et al. 2011a).

Innospora Blaszk., Kovacs, Chwat & Kozłowska. (Błaszowski et al. 2017).

Les spores sont produites seules, sont glomoiïdes et hyalines. La spore possède une seule paroi et un hyphe suspenseur avec un pore ouvert (Fig. 31). Les structures mycorhiziennes se colorent de manière variable avec le bleu de Trypan. Les séquences de l'ADNr diffèrent des séquences de l'ADNr des *Paraglomus* spp. Ce genre possède une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la grande sous unité ribosomique : TTGTGAAATTTTTTCGCATGGCAGGTCAGCATCAGTTTC. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 27) des espèces de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

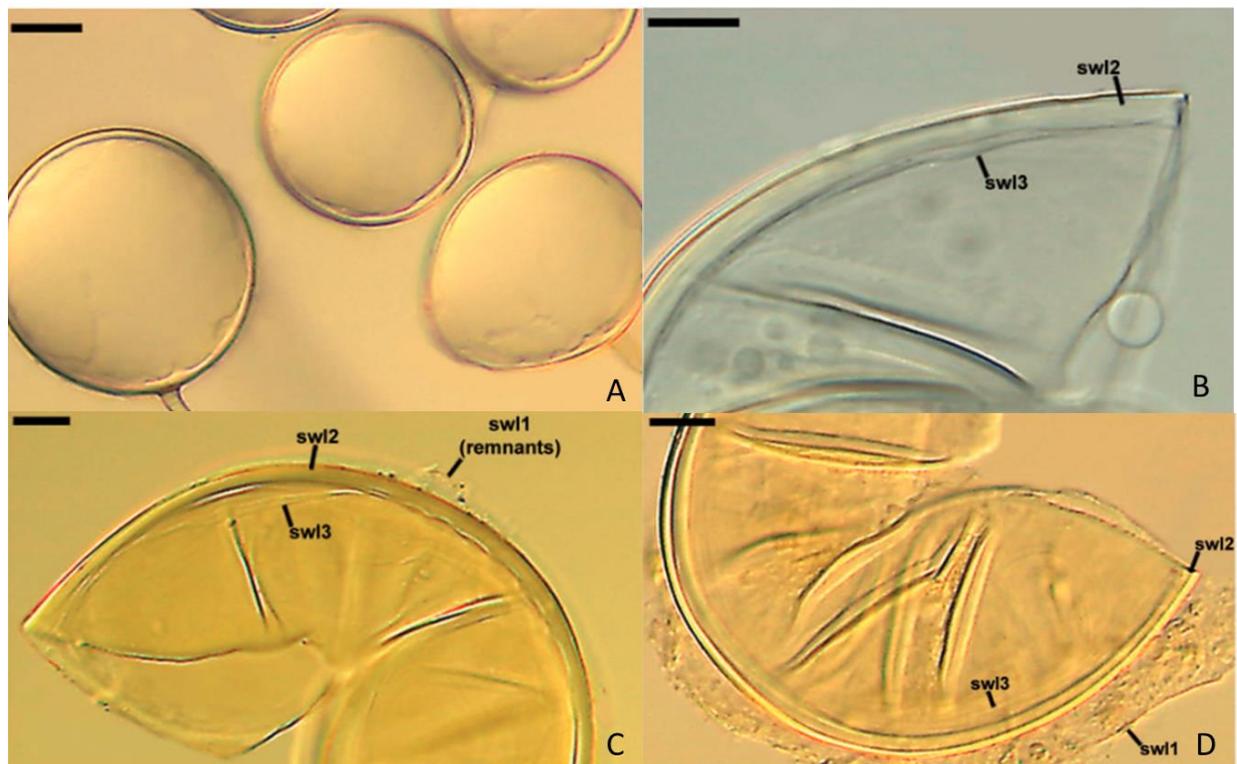


Figure 31. Photographies des spores d'*Innospora majewskii*. A. Spores intactes. B. Couche 2 de la paroi de la spore (swl2), couche 3 de la paroi de la spore (swl3). C. D. Couche 1 de la paroi de la spore (swl1), couche 2 de la paroi de la spore (swl2), couche 3 de la paroi de la spore (swl3). A. B. Spore dans du PVLG. C. D. Spore dans du PVLG + Melzer. A ; barre=20 µm. B. C. D ; barre=10 µm. (Photographies fournies par Janusz Błaszowski).

Ce genre compte actuellement 1 espèce ayant une position phylogénétique claire : *Innospora majewskii* (Błaszowski et al. 2012 ; Błaszowski et al. 2017).

Pervetustaceae Blaszk., Chwat, Kozłowska, Symanczik & Al-Yahya'ei. (Błaszowski et al. 2017).

Les spores sont produites seules, sont glomoiïdes et hyalines. La spore possède deux parois (Fig. 32). Les structures mycorhiziennes se colorent de manière variable avec le bleu de Trypan. Les séquences de l'ADNr diffèrent des séquences de l'ADNr des *Paraglomus* spp. et des *Innospora* spp. Ce genre possède une signature moléculaire sur le gène de l'ADNr codant pour la grande sous unité ribosomique : CACCGCCAAGGACGCTGGCGTAATGGCTTCAAACGACCCGTCTTGAAACACGGA CCAAGGAGTC.

Pervetustus Blaszk., Chwat, Kozłowska, Symanczik & Al-Yahya'ei. (Błaszowski et al. 2017). Possède les caractéristiques de la famille des Pervetustaceae. L'analyse phylogénétique des séquences SSU-(ITS)-LSU de l'ADNr (Fig. 1 ; Fig. 27) de l'espèce de ce genre confirme la position phylogénétique de ce genre.

Ce genre compte actuellement 1 espèce ayant une position phylogénétique claire : *Pervetustus simplex* (Błaszowski et al. 2017).

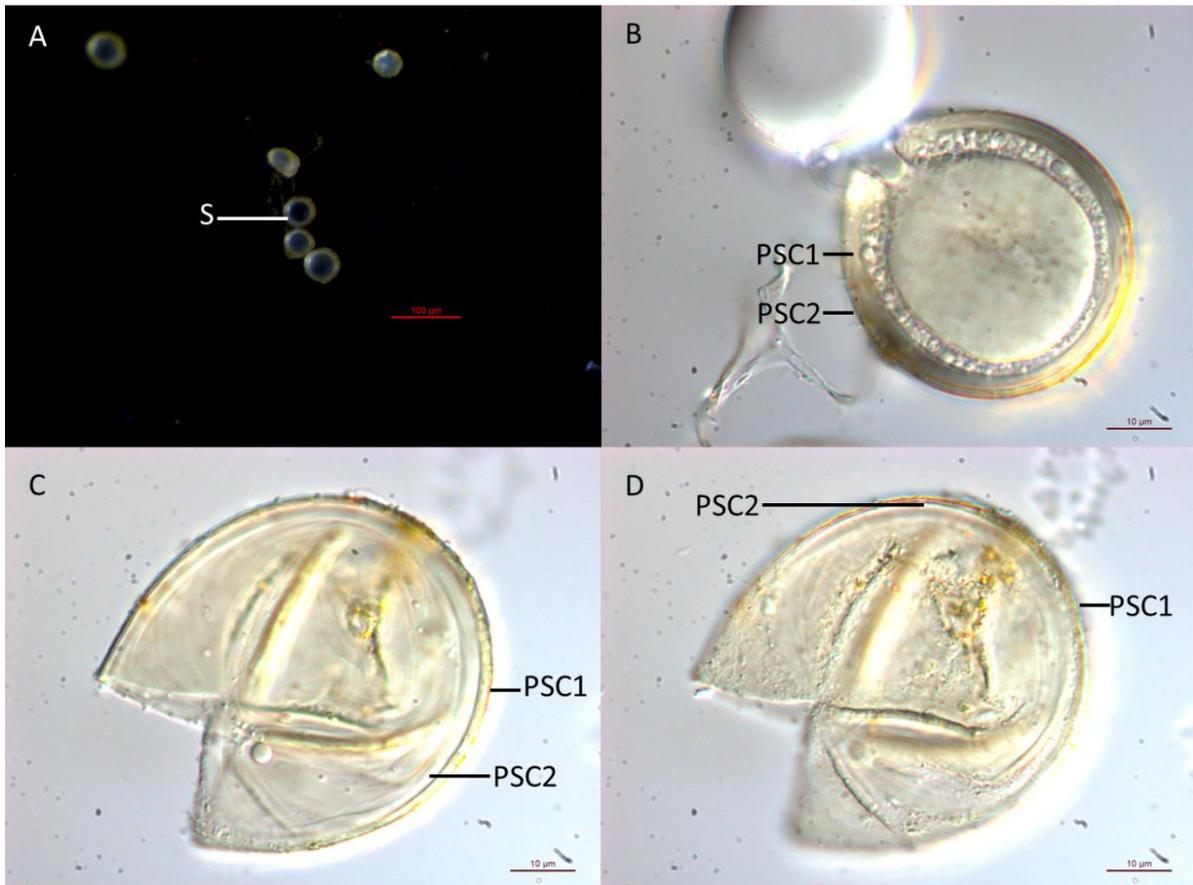


Figure 32. Photographies des spores de *Pervetustus simplex* nc. A. Spores intactes (S). B. C. D. Paroi de la spore couche 1 (PSC1), paroi de la spore couche 2 (PSC2). B. C. D. Spore dans du PVLG.

Conclusion

Cette étude recense 292 espèces. Pour 64 % (185 espèces) de ces espèces des données moléculaire sont disponibles, 36% (106 espèces) de ces espèces sont décrites sans donnée moléculaire parmi ces espèces, 50% (47 espèces) appartiennent au genre *Glomus* (*sensu lato*) (Schüßler & Walker 2010). L'analyse phylogénétique réalisée dans cette étude est basée sur les séquences de 158 espèces qui représentent 55% des espèces décrites jusqu'à aujourd'hui. Tous les genres acceptés et non incertains (Redecker et al. 2013) forment des groupes monophylétiques de niveau générique excepté les genres *Corymbiglomus* et *Redeckera* qui forment un seul groupe. Pour clarifier la situation, différentes espèces de *Redeckera* spp. doivent être séquencées afin de décider si ces deux genres doivent être fusionnés ou non. Les genres *Tricispora* et *Otospora* (Divercisporaceae) sont décrits comme incertains par Redecker et al. 2013, l'analyse phylogénétique réalisée dans cette étude confirme l'absence de preuve phylogénétique pour la création de ces deux genres. En effet les genres *Tricispora* et

Otospora apparaissent au sein du groupe des *Diversispora*. Les espèces de ces deux genres doivent être re-séquencées afin de vérifier leurs positions phylogénétiques et si leur position est confirmée, les espèces de ces genres doivent être incluses au genre *Diversispora*, les caractères morphologiques définissant le genre *Diversispora* devront alors être modifiés. L'espèce *Diversispora omaniana* forme un groupe proche du clade *Corymbiglomus/Redeckera* au lieu de grouper avec le clade des *Diversispora*. *D. omaniana* appartient probablement à un genre qui reste à décrire. Des analyses morphologiques doivent être entreprises afin d'établir si cette espèce doit être transférée dans le genre *Corymbiglomus* ou former un nouveau genre. L'espèce du genre *Bulbospora* (Gigasporaceae) forme un groupe monophylétique proche des *Scutellospora* spp. avec une faible valeur de bootstrap. Une seule espèce a été décrite pour ce genre et les séquences proviennent de spores récoltées sur le terrain, en conséquence les séquences de ce champignon peuvent être erronées. Les genres *Intraornatospora* et *Paradentiscutata* forment un groupe de niveau générique. Pour le genre *Intraornatospora* les séquences proviennent également de spores récoltées sur le terrain, pour le genre *Paradentiscutata* les spores proviennent de culture pièges, en conséquence les séquences peuvent être erronées. Les espèces de ces deux genres doivent être re-séquencées afin de vérifier leurs positions phylogénétiques, si la position phylogénétique est confirmée ces deux genres doivent être fusionnés en un seul genre. Le genre *Entrophospora* reste énigmatique les séquences d'*Entrophospora infrequens* groupent parfaitement avec les séquences des *Claroideoglomus* spp. alors que la morphologie des spores d'*E. infrequens* est complètement différente de la morphologie des spores des *Claroideoglomus* spp. la situation doit être clarifiée. Le genre *Palaeospora* (Archaeosporaceae) ne semble pas former un groupe assez éloigné des *Archaeospora* spp. pour être considéré comme un genre. Tous les autres genres forment des groupes monophylétiques de niveau générique. Toutes les séquences des 158 espèces analysées sont bien différenciées entre elles par l'analyse phylogénétique. Les caractères morphologiques de chaque genre sont également retrouvés chez toutes les espèces examinées.

Mise à jour : une nouvelle espèce *Diversispora sabulosa* (*Diversispora*, Diversisporaceae, Diversisporales) a été décrite en 2018 (Symanzik et al. 2018). L'espèce *Diversispora omaniana* a été renommée *Desertispora omaniana* et placée dans son propre genre *Desertispora* Błaszk., Kozłowska, Ryszka, Al-Yahya'ei & Symanzik (Symanzik et al. 2018). Curieusement une seule espèce de *Corymbiglomus* spp., est représentée dans les analyses phylogénétiques, alors que les séquences sont disponibles pour des espèces de

Corymbiglomus spp., plus proches phylogénétiquement de *De. omaniana*. Le nombre d'espèce de CMA décrites s'élève donc à 293.

Bibliographie

- Al-Yahya'ei MN, Mullath SK, AlDhaheeri LA, et al (2017) *Dominikia emiratia* and *Rhizoglomus dunense*, two new species in the Glomeromycota. *Botany* 95:629–639. doi: 10.1139/cjb-2016-0294
- Almeida RT, Schenck NC (1990) A revision of the genus *Sclerocystis* (Glomaceae: Glomales). *Mycologia* 82: 703-714.
- Ames RN, Linderman RG (1976) *Acaulospora trappei* sp.nov. *Mycotaxon* 3(3):565-569.
- Ames RN, Schneider RW (1979) *Entrophospora*, a new genus in the Endogonaceae. *Mycotaxon* 8(2):347-352.
- Balázs TK, Błaszowski J, Chwat G, et al (2015) Spore-based study of arbuscular mycorrhizal fungi of semiarid sandy areas in Hungary, with *Diversispora jakucisiae* sp. nov. *Mycol Progress* 14:1021. doi: 10.1007/s11557-014-1021-z
- Becker WN, Hall IR (1976) *Gigaspora margarita*, a new species in the Endogonaceae. *Mycotaxon* 4:155-160.
- Becker WN, Gerdemann JW (1977) *Glomus etunicatus* sp.nov. *Mycotaxon* 6(1):29-32.
- Bentivenga S.P, Morton J.B (1995) A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. *Mycologia* 87: 720-732.
- Berch SM, Fortin JA (1983) Lectotypification of *Glomus macrocarpum* and proposal of new combinations: *Glomus australe*, *Glomus versiforme*, and *Glomus tenebrosum* (Endogonaceae). *Canadian Journal of Botany* 61:2608–2617. doi: 10.1139/b83-287
- Berch SM (1985a) *Acaulospora sporocarpia*, a new, sporocarpic species, and emendation of the genus *Acaulospora* (Endogonaceae, Zygomycotina). *Mycotaxon* 23:409-418.
- Berch SM, Trappe JM (1985b) A New Species of Endogonaceae, *Glomus hoi*. *Mycologia* 77:654–657. doi: 10.2307/3793364
- Berch SM, Koske RE (1986) *Glomus pansihalos*: a new species in the Endogonaceae, Zygomycetes. *Mycologia* 78, 838-842.
- Berkeley MJ, Broome CE (1873) Enumeration of the Fungi of Ceylon. Part II., containing the remainder of the Hymenomycetes, with the remaining established tribes of Fungi. (Continued.). *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 14:65–140. doi: 10.1111/j.1095-8339.1873.tb00302.x
- Bentivenga SP, Hetrick BAD (1991) *Glomus mortonii* sp. nov., a previously undescribed species in the Glomaceae isolated from the tallgrass prairie in Kansas, In: *Mycotaxon* 42:9–15.
- Bhattacharjee M, Mukerji KG (1980) Studies on Indian Endogonaceae II. The genus *Glomus*. *Sydowia*. 33:14-17

- Bhattacharjee M, Mukerji KG, Tewari JP, et al (1982) Structure and hyperparasitism of a new species of *Gigaspora*. *Transactions of the British Mycological Society* 78:184–188. doi: 10.1016/S0007-1536(82)80096-X
- Błaszczkowski J (1988a) Three new vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Poland. *Bull Acad Pol Sci* 36:271-275.
- Błaszczkowski J (1988b) Four new species of the Endogonaceae (Zygomycotina) from Poland. *Karstenia* 27:37-42.
- Błaszczkowski J (1989) *Acaulospora cavernata* - a new species with pitted spores. *Cryptogamic Botany* 1:204-207.
- Błaszczkowski J (1990) Polish Endogonaceae. VII. *Acaulospora capsicula* sp. nov. *Mycologia* 82:794–798. doi: 10.2307/3760171
- Błaszczkowski J (1991) Polish Glomales 8. *Scutellispora nodosa* - a new species with knobby spores. *Mycologia*. 83(4):537-542.
- Błaszczkowski J (1992) *Scutellospora armeniaca*, a New Species in Glomales (Zygomycetes) from Poland. *Mycologia* 84:939. doi: 10.2307/3760298
- Błaszczkowski, J. (1995a) *Acaulospora koskei*, a new species in Glomales from Poland. *Mycological Research* 99:237-240.
- Błaszczkowski J (1995b) *Glomus corymbiforme*, a new species in Glomales from Poland. *Mycologia* 87: 732–737. <http://dx.doi.org/10.2307/3760819>
- Błaszczkowski J (1997a) *Glomus gibbosum*, a New Species from Poland. *Mycologia* 89:339–345. doi: 10.2307/3761092
- Błaszczkowski J, Tadych M (1997b) *Glomus multiforum* and *G. verruculosum*, two New Species from Poland. *Mycologia* 89:804–811. doi: 10.2307/3761138
- Błaszczkowski J, Madej T, Tadych M (1998) *Entrophospora baltica* sp. nov. and *Glomus fuegianum*, two species in the Glomales from Poland. *Mycotaxon* 68: 165–184.
- Błaszczkowski J, Tadych M, Madej T (2000) *Glomus minutum*, a new species in Glomales (Zygomycetes) from Poland. *Mycotaxon* 76:187-195.
- Błaszczkowski J, Tadych M, Madej T (2001) *Glomus arenarium*, a new species in Glomales (Zygomycetes). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 70:97–101. doi: 10.5586/asbp.2001.013
- Błaszczkowski J, Blanke V, Renker C, et al (2004a) *Glomus aurantium* and *G. xanthium*, new species in Glomeromycota. *Mycotaxon* 90:447–467.
- Błaszczkowski J, Adamska I, Czerniawska B (2004b) *Glomus insculptum*, a new arbuscular mycorrhizal species from Poland. *Mycotaxon* 89: 225–234.
- Błaszczkowski J, Renker C, Buscot F (2006) *Glomus drummondii* and *G. walkeri*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycological Research* 110:555–566. doi: 10.1016/j.mycres.2006.02.006

- Błaszowski J, Czerniawska B, Wubet T et al (2008) *Glomus irregularis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus in the Glomeromycota. *Mycotaxon* 106:247-267.
- Błaszowski J, Ryszka P, Oehl F, et al (2009a) *Glomus achrum* and *G. bistratum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) found in maritime sand dunes. *Botany* 87:260–271. doi: 10.1139/B08-138
- Błaszowski J, Kovács GM, Balázs T (2009b) *Glomus perpusillum*, a new arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycologia* 101(2):247-255.
- Błaszowski J, Kovács GM, Balázs TK, et al (2010a) *Glomus africanum* and *G. iranicum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycologia* 102:1450–1462. doi: 10.3852/09-302
- Błaszowski J, Wubet T, Harikumar VS et al (2010b) *Glomus indicum*, a new arbuscular mycorrhizal fungus. *Botany* 88(2):132-143.
- Błaszowski J (2012) Glomeromycota. W. Szafer Institute of Botany. Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Błaszowski J, Kovács GM, Gáspár BK, et al (2012) The arbuscular mycorrhizal *Paraglomus majewskii* sp. nov. represents a distinct basal lineage in Glomeromycota. *Mycologia* 104:148–156. doi: 10.3852/10-430
- Błaszowski J, Chwat G (2013a) *Septoglomus deserticola* emended and new combinations in the emended definition of the family Diversisporaceae. *Acta Mycologica* 48:89–103. doi: 10.5586/am.2013.011
- Błaszowski J, Chwat G, Kovacs GM, et al (2013b) *Septoglomus fuscum* and *S. furcatum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycologia* 105:670–680. doi: 10.3852/12-127
- Błaszowski J, Chwat G, Góralska A, et al (2014a) Two new genera, *Dominikia* and *Kamienskia*, and *D. disticha* sp. nov. in Glomeromycota. *Nova Hedwigia* 100:225–238. doi: 10.1127/nova_hedwigia/2014/0216
- Błaszowski J, Chwat G, Góralska A, et al (2014b) *Septoglomus jasnowskae* and *Septoglomus turnauae*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycol Progress* 13:985. doi: 10.1007/s11557-014-0985-z
- Błaszowski J, Chwat G, Góralska A et al (2014c) *Rhizophagus natalensis*, a new species in the Glomeromycota. *Mycotaxon* 129(1):97-108.
- Błaszowski J, Furrázola E, Chwat G, et al (2015a) Three new arbuscular mycorrhizal *Diversispora* species in Glomeromycota. *Mycol Progress* 14:105. doi: 10.1007/s11557-015-1122-3
- Błaszowski J, Chwat G, Góralska A (2015b) *Acaulospora ignota* and *Claroideoglomus hanlinii*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) from Brazil and Cuba. *Mycological Progress*. doi: 10.1007/s11557-015-1042-2
- Błaszowski J, Chwat G, Góralska A, Bobrowska-Chwat A (2015c) *Glomus tetrastratosum*, a

- new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycoscience* 56:280–286. doi: 10.1016/j.myc.2014.08.003
- Błaszowski J, Chwat G, Góralska A, et al (2015d) Two new genera, *Dominikia* and *Kamienskia*, and *D. disticha* sp. nov. in Glomeromycota. *Nova Hedwigia*. 100:225-238.
- Błaszowski J, Chwat G, Symanczik S (2015e) *Dominikia duoreactiva* and *D. difficilevidera*, two new species in the Glomeromycota. *Botany* 93:389-396.
- Błaszowski J, Chwat G, Góralska A (2016) *Dominikia lithuanica* and *Kamienskia divaricata*: new species in the Glomeromycota. *Botany* 94:1075–1085. doi: 10.1139/cjb-2016-0167
- Błaszowski J, Kozłowska A, Crossay T, et al (2017) A new family, Pervetustaceae with a new genus, *Pervetustus*, and *P. simplex* sp. nov. (Paraglomerales), and a new genus, *Innospora* with *I. majewskii* comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina. http://www.ingentaconnect.com/content/schweiz/novh/pre-prints/content-nova_hedwigia_000_0_0_0000_0000_blaszkowski_0419_prepub. Accessed 3 Oct 2017
- Boyetchko SM, Tewari JP (1986) A new species of *Glomus* (Endogonaceae, Zygomycotina) mycorrhizal with barley in Alberta. *Canadian Journal of Botany* 64(1):90-95.
- Cabello M, Gaspar L, Pollero R (1994) *Glomus antarcticum* sp. nov., a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus from Antarctica. *Mycotaxon* 51:123-128.
- Cano C, Bago A, Dalpé Y (2009) *Glomus custos* sp. nov., isolated from a naturally heavy metal-polluted environment in southern Spain. *Mycotaxon* 109:499-512.
- Chellappan P, Mohan N, Ramesh C, et al (2005) A new approach for enhanced multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi and isolation of ITS regions from *Glomus deserticola* and *Laccaria fraterna*. *Indian Journal of Experimental Biology* 43:808-812.
- Cuenca G, Herrera-Peraza R (2006) *Scutellospora striata* sp. nov., a newly described Glomeromycotan fungus from La Gran Sabana, Venezuela. *Mycotaxon* 105:79-87
- da Silva DKA, de Oliveira Freitas N, et al (2008) *Scutellospora pernambucana*, a new fungal species in the Glomeromycetes with a diagnostic germination orb. *Mycotaxon* 106:361–370.
- De Andrade Z, Furrázola E, Cuenca G (2017) *Scutellospora tepuiensis* sp. nov. from the highland tepuis of Venezuela. *Mycotaxon* 132:9–18. doi: 10.5248/132.9
- Declerck S, Cranenbrouck S, Dalpé Y et al (2000) *Glomus proliferum* sp. nov.: a description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. *Mycologia* 92(8):1178-1187.
- Dalpé Y, Koske RE, Tews LL (1992) *Glomus lamellosum* sp.nov.: a new Glomaceae associated with beach grass. *Mycotaxon* 43:289-293.
- Dalpé Y, Plenchette C, Frenot Y et al (2002) *Glomus kerguelense* sp. nov., a new Glomales species from sub-Antarctic. *Mycotaxon* 84:51-60.

- Dangeard PA (1896) Une maladie du peuplier dans l'ouest de la France. *Le Botaniste* 5: 38–43.
- Dangeard PA (1900) *Le Rhizopagus populinus*. *Le Botaniste* 7:285-287.
- Daniels B & Trappe JM (1979) *Glomus epigaeus* sp. nov., a useful fungus for vesicular-arbuscular mycorrhizal research. *Canad. J. Bot.* 57: 539-542.
- Declerck S, Séguin S, Dalpé Y (2005) The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for germplasm collections. In: Declerck S, Strullu D-G, Fortin JA. eds. *In vitro culture of mycorrhizas*. Springer Berlin, Heidelberg. pp. 17-30.
- Engler A, Gilg E (1924) *Syllabus der Pflanzenfamilien*. :1-420.
- Estrada B, Palenzuela J, Barea J-M, et al (2012) *Diversispora clara* Glomeromycetes a new species from saline dunes in the Natural Park Cabo de Gata (Spain). *Mycotaxon* 118:73–81. doi: 10.5248/118.73
- Fayuan W, Runjin L (2002) *Glomus zaozhuangianus*, a new species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycosystema* 21:522–524.
- Ferrer RL, Herrera RA (1980) El género *Gigaspora* Gerdemann et Trappe (Endogonaceae) en Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional Habana* 1(1):43-66.
- Fortin JA, Declerck S, Strullu D-G (2005) *In vitro culture of mycorrhizas*. In: Declerck S, Strullu D-G, Fortin JA.eds. *In vitro culture of mycorrhizas*. Springer. Berlin, Heidelberg pp. 3-14.
- Furrazola E, Herrera-Peraza R, Kaonongbua W, Bever JD (2010) *Glomus candidum*, a new species of arbuscular mycorrhizal fungi from North American grassland. *Mycotaxon* 113:101–109. doi: 10.5248/113.101
- Furrazola E, Torres-Arias Y, Ferrer RL, et al (2011) *Glomus crenatum* (Glomeromycetes), a new ornamented species from Cuba. *Mycotaxon* 116:143–149. doi: 10.5248/116.143
- Gamper HA, Walker C, Schüssler A (2009) *Diversispora celata* sp. nov: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 182:495–506. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02750.
- Gerdemann JW, Trappe JM (1974) The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir* No. 5: 1-76.
- Gerdemann JW, Bakshi BK (1976) Endogonaceae of India: Two new species. *Transactions of the British Mycological Society* 66(2):340-343.
- Giovannetti M, Avio L, Salutini L (1991) Morphological, cytochemical, and ontogenetic characteristics of a new species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Canadian Journal of Botany* 69(1):161-167.
- Goto BT, Maia LC, Oehl F (2008) *Ambispora brasiliensis*, a new ornamented species in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. *Mycotaxon* 105:11–18.
- Goto BT, Maia LC, Alves da Silva G, et al (2009a) *Racocetra intraornata*, a new species in

- the Glomeromycetes with a unique spore wall structure. *Mycotaxon*. 109:483-491
- Goto BT, Costa CMC, Maia LC (2009b) *Glomus halonatum* Rose & Trappe (Glomeromycota) in South America: comments on the morphological characteristics of the species. *Acta Botanica Brasilica* 23:1167–1170. doi: 10.1590/S0102-33062009000400026
- Goto BT, da Silva GA, Costa Maia L, et al (2010) *Dentiscutata colliculosa*, a new species in the Glomeromycetes from Northeastern Brazil with colliculate spore ornamentation. *Nova Hedwigia* 90(3-4):383-393.
- Goto BT, Silva GA, Maia LC, et al (2011) *Racocetra tropicana*, a new species in the Glomeromycetes from tropical areas. *Nova Hedwigia*. doi: <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2011/0092-0069>
- Goto BT, Silva GA, Assis DMA de, et al (2012a) Intraornatosporaceae (Gigasporales), a new family with two new genera and two new species. *Mycotaxon* 119:117–132. doi: 10.5248/119.117
- Goto BT, Jardim JG, da Silva GA, et al (2012b) *Glomus trufemii* (Glomeromycetes), a new sporocarpic species from Brazilian sand dunes. *Mycotaxon* 120:1-9.
- Goto BT, Pereira CMR, Nobre CP, et al (2013a) *Acaulospora endographis* (Glomeromycetes), a new fungus with a complex spore wall. *Mycotaxon* 123:403–408. doi: 10.5248/123.403
- Goto BT, Araújo AF, Soares ACF, et al (2013b) *Septoglomus titan*, a new fungus in the Glomeraceae (Glomeromycetes) from Bahia, Brazil. *Mycotaxon* 124:101–109. doi: 10.5248/124.101
- Graham JH, Hodge NC, Morton JB (1995) Fatty acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Applied and Environmental Microbiology* 61:58-64.
- Hall IR (1977) Species and mycorrhizal infections of New Zealand Endogonaceae. *Transactions of the British Mycological Society* 68(3):341-356.
- Hall IR, Abbott LK (1984) Some Endogonaceae from south Western Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 83:203–208. doi: 10.1016/S0007-1536(84)80137-0
- Hennings (1897) *Endogone pulvinata*. *Hedwigia* 36: 212.
- Herrera-Peraza RA, Cuenca G, Walker C (2001) *Scutellospora crenulata*, a new species of Glomales from La Gran Sabana, Venezuela. *Canadian Journal of Botany* 79:674–678. doi: 10.1139/cjb-79-6-674
- Herrera-Peraza RA, Ferrer RL, Sieverding E (2003) *Glomus brohultii*: A new species in the arbuscular mycorrhiza forming glomerales. *Journal of applied botany* 77:37–40.
- Höhnelt F von (1910) Fragmente zur Mykologie: X. Mitteilung (Nr. 468 bis 526). *Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Math.-naturw. Klasse Abt. I*. 119:393-473.

- Hu HT. (1988) Study on the Endomycorrhizae of Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata* Hooker) and Taiwania (*Taiwania cryptomerioides* Hay.). *Quarterly Journal of Chinese Forestry* 21:45–72.
- Hu HT (2002) *Glomus spinosum* sp. nov. in the Glomaceae from Taiwan. *Mycotaxon*. 83:159-164.
- Iqbal SH, Perveen B (1980) Some species of *Sclerocystis* (Endogonaceae) from Pakistan. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 21(1):57-63.
- Ingleby K, Walker C, Mason PA (1994) *Acaulospora excavata* sp. nov. - an endomycorrhizal fungus from Cote d'Ivoire. *Mycotaxon* 50:99-105.
- Janos DP, Trappe JM (1982) Two new *Acaulospora* species from tropical America. *Mycotaxon* 15:515-522.
- Kaonongbua W, Morton JB, Bever JD (2010) Taxonomic revision transferring species in *Kuklospora* to *Acaulospora* (Glomeromycota) and a description of *Acaulospora colliculosa* sp. nov. from field collected spores. *Mycologia* 102:1497–1509. doi: 10.3852/10-011
- Kennedy LJ, Stutz JC, Morton JB (1999) *Glomus eburneum* and *G. luteum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi, with emendation of *G. spurcum*. *MYCOLOGIA*, *Mycologia* 91:1083–1093.
- Khade SW (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi in wild banana. II: A new species (*Glomus goaensis* Khade sp. nov). *Mycorrhiza News* 20:21–22.
- Khade SW (2010) *Dentiscutata nigerita* - a new species of arbuscular mycorrhizal fungi from India. *Mycosphere* 1(3):241-247.
- Koske RE, Miller DD, Walker (1983) *Gigaspora reticulata*: a newly described endomycorrhizal fungus from New England. *Mycotaxon* 16(2):429-435.
- Koske RE, Walker C (1984) *Gigaspora erythropha*, a New Species Forming Arbuscular Mycorrhizae. *Mycologia* 76:250–255. doi: 10.2307/3793100
- Koske RE, Walker C (1985a) Species of *Gigaspora* (Endogonaceae) with roughened outer walls. *Mycologia* 77(5):702-720.
- Koske RE (1985b) *Glomus aggregatum* Emended: A Distinct Taxon in the *Glomus fasciculatum* Complex. *Mycologia* 77:619–630. doi: 10.2307/3793360
- Koske RE, Friese C, Walker C, et al (1986a) *Glomus pustulatum*: a new species in the Endogonaceae. *Mycotaxon* 26:143–149.
- Koske RE, Walker C (1986b) Species of *Scutellospora* with smooth-walled spores from maritime sand dunes: two new species and a redescription of the spores of *Scutellospora pellucida* and *Scutellospora calospora*. *Mycotaxon* 27:219-235.
- Koske R.E, Walker C (1986c) *Glomus globiferum*, a new species of Endogonaceae with a hyphal peridium. *Mycotaxon* 26:133-142.

- Koske RE, Gemma JN (1986d) *Glomus microaggregatum*, a new species in the Endogonaceae. *Mycotaxon* 26:125-132.
- Koske RE, Halvorson WL (1989a) *Scutellospora arenicola* and *Glomus trimurales*: Two New Species in the Endogonaceae. *Mycologia* 81:927–933. doi: 10.2307/3760112
- Koske RE, Gemma JN (1989b) *Glomus nanolumen* (Endogonaceae), a New Species from Hawaii. *Mycologia* 81:935–938. doi: 10.2307/3760114
- Koske RE, Gemma JN (1995) *Scutellospora hawaiiensis*: A New Species of Arbuscular Mycorrhizal Fungus from Hawaii. *Mycologia* 87:678–683. doi: 10.2307/3760811
- Kramadibrata K, Hedger JN (1990) A new species of *Acaulospora* associated with cocoa in Java and Bali (Indonesia). *Mycotaxon* 37:73-77.
- Kramadibrata K, Walker C, Schwarzott D, et al (2000) A New Species of *Scutellospora* with a Coiled Germination Shield. *Annals of Botany* 86:21–27.
- Krüger M, Walker C, Schüßler A (2011) *Acaulospora brasiliensis* comb. nov. and *Acaulospora alpina* (Glomeromycota) from upland Scotland: morphology, molecular phylogeny and DNA-based detection in roots. *Mycorrhiza* 21:577–587. doi: 10.1007/s00572-011-0361-7
- Krüger M, Krüger C, Walker C, et al (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193:970–984. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x
- Krüger C, Walker C, Schüßler A (2014) *Scutellospora savannicola*: redescription, epitypification, DNA barcoding and transfer to *Dentiscutata*. *Micol Progress* 13:1005. doi: 10.1007/s11557-014-1005-z
- Lange M, Lund EM (1954) The genus *Endogone* in Denmark. *Friesia* 5(1):90-95.
- Lin T-C, Yen C-H (2011) *Racocetra undulata*, a new species in the Glomeromycetes from Taiwan. *Mycotaxon* 116:401–406. doi: 10.5248/116.401
- Marinho F, Silva GA, Ferreira AC, et al (2014) *Bulbospora minima*, a new genus and a new species in the Glomeromycetes from semi-arid Northeast Brazil. *Sydowia* 66:313–323.
- McGee PA (1986) Further sporocarpic species of *Glomus* (Endogonaceae) from South Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 87:123–129. doi: 10.1016/S0007-1536(86)80011-0
- McGee PA, Trappe JM (2002) The Australian zygomycetous mycorrhizal fungi. II. Further Australian sporocarpic Glomaceae. *Australian Systematic Botany* 15:115–124.
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, et al (2012) International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). *Regnum Vegetabile* 154. A.R.G. Gantner Verlag KG, Ruggell, Liechtenstein. ISBN 978-3-87429-425-6. Available at <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>
- McNeill J, Barrie FR, Burdet HM, et al (2006) International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna,

Austria, July 2005. Regnum Vegetabile 146 Ruggell: A.R.G. Ganter Verlag.

- Medina J, Cornejo P, Borie F, et al (2014) *Corymbioglomus pacificum* a new glomeromycete from a saline lakeshore in Chile. Mycotaxon 127:173–183. doi: 10.5248/127.173
- Mehrotra VS, Barjal U, Allahabad U (1992) *Glomus sterilum*, a new species of VA-mycorrhiza isolated from potato roots. Philippine Journal of Science Section C Botany 121(3):305-316.
- Mehrotra VS (1997) *Glomus bagyarajii* sp. nov., a new species of Glomaceae (Glomales, Zygomycetes) from India. Philippine Journal of Science Section C Botany 126(3):233-242.
- Mei-Qing Z, You-Shan W, Lijun X (1997) GLOMUS DOLICHOSPORUM, A NEW SPECIES OF THE GLOMALES FROM SOUTHERN CHINA. MYCOSYSTEMA 4:000.
- Mello CMA, Silva GA, Assis DMA et al (2013) *Paraglomus pernambucanum* sp. nov. and *Paraglomus bolivianum* com. nov., and biogeographic distribution of *Paraglomus* and *Pacispora*. Journal of Applied Botany and Food Quality 86:113-125.
- Miller JS, Funk VA, Wagner WL, et al (2011) Outcomes of the 2011 Botanical Nomenclature Section at the XVIII International Botanical Congress. PhytoKeys 5:1–3. doi: 10.3897/phytokeys.5.1850
- Montecchi A, Ruini S, Gross G (1996) *Gigaspora lazzarii* nov.sp. Riv. Micol. 39(1):21-28.
- Morton JB, Walker C (1984) *Glomus diaphanum*: a new species in the Endogonaceae common in West Virginia. Mycotaxon 21:431-440.
- Morton JB (1986) Three new species of *Acaulospora* (Endogonaceae) from high aluminium, low pH soils in West Virginia. Mycologia 78(4):641-648.
- Morton JB, Koske RE (1988) *Scutellospora dipurpurescens*, a New Species in the Endogonaceae from West Virginia. Mycologia 80:520–524. doi: 10.2307/3807854
- Morton J.B, Benny G.L (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. Mycotaxon 37:471-491.
- 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. doi: 10.2307/3761615
- Morton JB (2017) International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. West Virginia University. <http://www.invam.caf.wvu.edu/>
- Msiska Z, Morton JB (2008) Phylogenetic analysis of the Glomeromycota by partial β -tubulin gene sequences. Mycorrhiza 19(4): 247 -254.
- Mukerji KG, Bhattacharjee M, Tewari JP (1983) New species of vesicular-arbuscular

- mycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 81(3):641-643.
- Nicolson TH, Gerdemann JW (1968) Mycorrhizal Endogone Species. *Mycologia* 60:313–325. doi: 10.2307/3757161
- Nicolson TH, Schenck NC (1979) Endogonaceous Mycorrhizal Endophytes in Florida. *Mycologia* 71:178–198. doi: 10.2307/3759231
- Novas MV, Fracchia S, Menéndez A, et al (2005) *Glomus patagonicum* sp. nov. (Glomerales), a new arbuscular mycorrhizal fungus from Argentina. *Nova Hedwigia* 80(3–4):533–539.
- Oehl F, Wiemken A, Sieverding E (2002) *Glomus caesaris*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from the Kaiserstuhl in Germany *Mycotaxon*. 84:379-385.
- Oehl F, Wiemken A, Sieverding E (2003a) *Glomus spinuliferum*, a new ornamented species in the Glomales. *Mycotaxon* 86:157-162.
- Oehl F, Wiemken A, Sieverding E (2003b) *Glomus aureum*, a new sporocarpic species in the Glomales from European grasslands. *Journal of Applied Botany* 77:111-115.
- Oehl F, Sieverding E (2004) *Pacispora*, a new vesicular arbuscular fungal genus in the Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany* 78:72-82.
- Oehl F, Redecker D, Sieverding E (2005) *Glomus badium*, a new sporocarpic mycorrhizal fungal species from European grasslands with higher soil pH. *Angewandte Botanik* 79:38–43.
- Oehl F, Sýkorová Z, Redecker D, et al (2006) *Acaulospora alpina*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species characteristic for high mountainous and alpine regions of the Swiss Alps. *Mycologia* 98:286–294.
- Oehl F, de Souza FA, Sieverding E (2008) Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. *Mycotaxon* 106:311–360.
- Oehl F, Silva GA da, Goto BT, et al (2011a) Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116:75–120. doi: 10.5248/116.75
- Oehl F, Silva GA da, Sánchez-Castro I, et al (2011b) Revision of Glomeromycetes with entrophosporoid and glomoid spore formation with three new genera. *Mycotaxon* 117:297–316. doi: 10.5248/117.297
- Oehl F, Silva GA da, Goto BT, Sieverding E (2011c) New recombinations in Glomeromycota. *Mycotaxon* 117:429–434. doi: 10.5248/117.429
- Oehl F, Jansa J, de Souza FA, et al (2011d) *Cetraspora helvetica*, a new ornamented species in the Glomeromycetes from Swiss agricultural fields. *Mycotaxon* 114:71–84. doi: 10.5248/114.71
- Oehl F, Palenzuela J, Sánchez-Castro I, et al (2011e) *Acaulospora minuta*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species from sub-Saharan savannas of West Africa. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 84:213-218.

- Oehl F, Silva GA da, Palenzuela J, et al (2011f) *Acaulospora punctata*, a new fungal species in the Glomeromycetes from mountainous altitudes of the Swiss Alps and Chilean Andes. *Nova Hedwigia* 93:353–362. doi: 10.1127/0029-5035/2011/0093-0353
- Oehl F, Sýkorová Z, Blaszkowski, et al (2011g) *Acaulospora sieverdingii*, an ecologically diverse new fungus in the Glomeromycota, described from lowland temperate Europe and tropical West Africa. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 84:47-53.
- Oehl F, Palenzuela J, Sánchez-Castro I, et al (2012) *Acaulospora nivalis*, a new fungus in the Glomeromycetes, characteristic for high alpine and nival altitudes of the Swiss Alps. *Nova Hedwigia* 95(105):122.
- Oehl F, Castillo C, Schneider D, et al (2013) *Ambispora reticulata*, a new species in the Glomeromycota from mountainous areas in Switzerland and Chile. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 85:129.
- Oehl F, Tchabi A, Silva GA, et al (2014a) *Acaulospora spinosissima*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from the Southern Guinea Savanna in Benin. *Sydowia*. doi: [https://dx.doi.org/10.12905/0380.sydowia66\(1\)2014-0029](https://dx.doi.org/10.12905/0380.sydowia66(1)2014-0029)
- Oehl F, Sanchez-Castro I, Palenzuela J, et al (2014b) *Glomus compressum*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from different agro-ecosystems in Central Europe. *Nova Hedwigia* 99:429–439. doi: 10.1127/0029-5035/2014/0200
- Oehl F, Sánchez-Castro I, de Sousa NMF, et al (2015a) *Dominikia bernensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from a Swiss no-till farming site, and *D. aurea*, *D. compressa* and *D. indica* three new combinations in *Dominikia*. *Nova Hedwigia* 101:65–76. doi: 10.1127/nova_hedwigia/2014/0235
- Oehl F, Sánchez-Castro I, Palenzuela J, da Silva GA (2015b) *Palaeospora spainii*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from Swiss agricultural soils. *Nova Hedwigia* 89–102. doi: 10.1127/nova_hedwigia/2014/0229
- Palenzuela J, Ferrol N, Boller T, et al (2008) *Otospora bareai*, a new fungal species in the Glomeromycetes from a dolomitic shrub land in Sierra de Baza National Park (Granada, Spain). *Mycologia* 100:296–305.
- Palenzuela J, Barea JM, Ferrol N, et al (2010) *Entrophospora nevadensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from Sierra Nevada National Park (southeastern Spain). *Mycologia* 102:624–632.
- Palenzuela J, Barea JM, Ferrol N, et al (2011) *Ambispora granatensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus, associated with *Asparagus officinalis* in Andalucía (Spain). *Mycologia* 103(2):333-340.
- Palenzuela J, Azcón-Aguilar C, Barea J-M, et al (2013a) *Acaulospora pustulata* and *Acaulospora tortuosa*, two new species in the Glomeromycota from Sierra Nevada National Park (southern Spain). *Nova Hedwigia* 305–319. doi: 10.1127/0029-5035/2013/0129
- Palenzuela J, Azcón-Aguilar C, Barea J-M, et al (2013b) *Septoglomus altomontanum*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from mountainous and alpine areas in Andalucía

- (southern Spain). IMA Fungus 4:243–249. doi: 10.5598/imafungus.2013.04.02.09
- Palenzuela J, Azcón-Aguilar C, Barea J-M, et al (2014) *Acaulospora viridis*, a new species in the Glomeromycetes from two mountain ranges in Andalucía (Spain). Nova Hedwigia 71–82. doi: 10.1127/0029-5035/2014/0180
- Palenzuela J, Azcón-Aguilar C, Barea J-M, et al (2015) *Acaulospora baetica*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species from two mountain ranges in Andalucía (Spain). Nova Hedwigia 101:463–474. doi: 10.1127/nova_hedwigia/2015/0285
- Patouillard NT (1902) Champignons de la Guadeloupe, recueillis par le R.P. Duss. Bulletin de la Société Mycologique de France 18(2):171-186.
- Pereira CMR, Maia LC, Sánchez-Castro I, et al (2016) *Acaulospora papillosa*, a new mycorrhizal fungus from NE Brazil, and *Acaulospora rugosa* from Norway. Phytotaxa 260:14–24. doi: 10.11646/phytotaxa.260.1.2
- Petch T (1925) Additions to Ceylon fungi. III. Annals of the Royal Botanic Gardens Peradeniya 9(3):313-328.
- Petri L (1919) Sopra una presunta malattia del pioppo. Firenze: M. Ricci. 10 p. [extract from Annali del R. Istituto Superiore Forestale Nazionale, vol. 4].
- Pfeiffer CM, Walker C, Bloss HE (1996) *Glomus spurcum*: a new endomycorrhizal fungus from Arizona. Mycotaxon 59:373–382.
- Pirozynski KA, Dalpé Y (1989) Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. Symbiosis 7:1-36.
- Pontes JS de, Sanchez-Castro I, Palenzuela J, et al (2013) *Scutellospora alterata*, a new gigasporalean species from the semi-arid Caatinga biome in Northeastern Brazil. Mycotaxon 125:169–181. doi: 10.5248/125.169
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000a) Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremiodes*. Mycologia 92: 282-285.
- 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, Oehl F, et al (2007) A novel clade of sporocarps-forming species of glomeromycotan fungi in the Diversisporales lineage. Mycological Progress 6: 35-44
- Redecker D, Schüssler A, Stockinger H, et al (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycorrhiza 23:515–531. doi: 10.1007/s00572-013-0486-y
- Renker C, Blaszkowski J, Buscot F (2007) *Paraglomus laccatum* comb. nov. a new member of Paraglomeraceae (Glomeromycota). Nova Hedwigia 84(3-4):395-407.
- Rodríguez Y, Dalpé Y, Séguin S, Fernández K, Fernández F, Rivera RA (2011) *Glomus cubense* sp. nov., an arbuscular mycorrhizal fungus from Cuba. Mycotaxon 118:337-347.

- Rose SL, Daniels BA, Trappe JM (1979) *Glomus gerdemannii* sp. nov. Mycotaxon 3:297-301.
- Rose SL, Trappe JM (1980) Three new Endomycorrhizae and *Glomus* ssp. associated with actinorhizal shrubs. Mycotaxon 10(2):413-420.
- Rothwell FM, Trappe JM (1979) *Acaulospora bireticulata* sp. nov. Mycotaxon 8(2):471-475.
- Rothwell FM, Victor BJ (1984) A new species of Endogonaceae: *Glomus botryoides*. Mycotaxon 20(1):163-167.
- Saccardo PA (1882) Fungi boreali-americani. Michelia 2(8):564-582.
- Saccardo PA (1886) Sylloge Hyphomycetum. Sylloge Fungorum 4:1-807.
- Sawaki H, Sugawara K, Saito M (1998) Phylogenetic position of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora gerdemannii*, and its synanamorph *Glomus leptotichum*, based upon 18S rRNA gene sequence. Mycoscience 39:477-480.
- Schenck NC, Smith GS (1982) Additional New and Unreported Species of Mycorrhizal Fungi (Endogonaceae) from Florida. Mycologia 74:77-92. doi: 10.2307/3792631
- Schenck NC, Spain JL, Sieverding E, et al (1984) Several new and unreported vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Colombia. Mycologia 76:685-699.
- Schenck NC, Spain JL, Sieverding E (1986) A new sporocarpic species of *Acaulospora* (Endogonaceae). Mycotaxon 25(1):111-117.
- Schultz PA, Bever JD, Morton JB (1999) *Acaulospora colossica* sp. nov. from an Old Field in North Carolina and Morphological Comparisons with Similar Species, *A. laevis* and *A. koskei*. Mycologia 91:676-683. doi: 10.2307/3761255
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. Mycological Research 105: 1413-1421.
- Schüßler A (2002) Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. In: Diversity and Integration in Mycorrhizas. Springer, pp 75-83.
- Schüßler A, Walker C (2010) The Glomeromycota: a species list with new families. Arthur Schüßler & Christopher Walker, Gloucester. Published in December 2010 in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. Printed copy available under ISBN-13: 978-1466388048, ISBN-10: 1466388048. Available at <http://www.amf-phylogeny.com>
- Schwarzott D, Schüßler A (2001) A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. Mycorrhiza 10: 203-207.
- Sieverding E, Toro TS (1987a) *Acaulospora denticulata* sp. nov. and *Acaulospora rehmi* sp. nov. (Endogonaceae) with ornamented spore walls. Angewandte Botanik 61: 217-223.

- Sieverding E (1987b) A VA-mycorrhizal fungus, *Glomus glomerulatum* sp.nov., with two hyphal attachments and spores formed only in sporocarps. *Mycotaxon* 29:73
- Sieverding E, Toro TS (1987c) *Entrophospora schenckii*: a new species in the Endogonaceae from Colombia. *Mycotaxon* 28(1):209-214.
- Sieverding E, Chaverri A, Rojas I (1988a) *Acaulospora splendida*, a new species in the Endogonaceae from Costa Rica. *Mycotaxon* 33:251-256.
- Sieverding E (1988b) Two new species of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae from tropical high lands of Africa. *Angewandte Botanik* 62, 373-380.
- Sieverding E, Oehl F (2006) Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany* 80:69-81.
- Sieverding E, Silva GA, Berndt R et al (2014) *Rhizoglomus*, a new genus of the Glomeraceae. *Mycotaxon* 129(2):373-386.
- Sinclair RC, Greuning JV van, Eicker A (2000) A new species of sporocarpic glomales from South Africa. *Mycotaxon* 74:337-342.
- Skou JP, Jakobsen I (1989) Two new *Glomus* species from arable land. *Mycotaxon* 36(1):273-282.
- Smith GW, Schenck NC (1985) Two new dimorphic species in the Edogonaceae: *Glomus ambisporum* and *Glomus heterosporum*. *Mycologia*. 77(4):566-574
- Souza de Pontes J, Santos VM, Pereira CD, et al (2017) *Acaulospora spinulifera*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species from the Brazilian Cerrado and Atlantic Rain forest. *Nova Hedwigia* 105:219-229. doi: 10.1127/nova_hedwigia/2017/0407
- Spain JL, Sieverding E, Schenck NC (1989a) *Gigaspora ramisporophora*: a new species with novel sporophores from Brazil. *Mycotaxon* 34(2):667-677.
- Spain JL, Sieverding E, Toro TS (1989b) *Scutellospora biornata*: a new species in the Endogonaceae from the Llanos Orientales of Colombia. *Mycotaxon* 35(2):219-227.
- Spain JL, Claessen de Miranda J (1996a) *Scutellospora cerradensis*: an ornamented species in the Gigasporaceae (Glomales) from the Cerrado region of Brazil. *Mycotaxon* 60:129-136.
- Spain JL, Claessen de Miranda J (1996b) *Glomus brasilianum*: an ornamented species in the Glomaceae. *Mycotaxon* 60:137-142.
- Spain JL, Sieverding E, Oehl F (2006) *Appendicispora*: A new genus in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes, with a discussion of the genus *Archaeospora*. *Mycotaxon* 97:163-182.
- Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, et al (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108:1028-1046. doi: 10.3852/16-042

- Stockinger H, Walker C, Schüßler 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 (1999) *Scutellospora rubra*, a new arbuscular mycorrhizal species from Brazil. *Mycological Research* 103:949–954. doi: 10.1017/S0953756298007898
- Sudová R, Sýkorová Z, Rydlová J et al (2015) *Rhizophagus melanus*, a new arbuscular mycorrhizal fungal species associated with submerged plants in freshwater lake Avsjøen in Norway. *Mycological Progress* 14(3/9):1-8.
- Swarupa Rani S, Kunwar IK, Prasad GS, Manoharachary C (2004) *Glomus hyderabadensis*, a new species: its taxonomy and phylogenetic comparison with related species. *Mycotaxon* 89(2):245-253.
- Symanczik S, Al-Yahya'ei MN, Kozłowska A, et al (2018) A new genus, *Desertispora*, and a new species, *Diversispora sabulosa*, in the family Diversisporaceae (order Diversisporales, subphylum Glomeromycotina). *Mycol Progress* 1–13. doi: 10.1007/s11557-017-1369-y
- Symanczik S, Błaszowski J, Chwat G, et al (2014) Three new species of arbuscular mycorrhizal fungi discovered at one location in a desert of Oman: *Diversispora omaniana*, *Septoglomus nakheelum* and *Rhizophagus arabicus*. *Mycologia* 106:243–259. doi: 10.3852/106.2.243
- Tandy PA (1975) Sporocarpic species of Endogonaceae in Australia. *Aust. J. Bot* 23:849-866.
- Tang Z, Zang M (1984) ADDITIONS TO THE KEY OF ENDOGONACEAE AND A NEW SPECIES OF MYCORRHIZAL FUNGUS: *Glomus citricolus* Tang et Zang. *Acta Botanica Yunnanica* 6(03): 1-3.
- Tchabi A, Hountondji F, Laouwin L, et al (2009) *Racocetra beninensis* from sub-Saharan savannas: a new species in the Glomeromycetes with ornamented spores. *Mycotaxon* 110:199–209. doi: 10.5248/110.199
- Thaxter R (1922) A revision of the Endogoneae. In: *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* JSTOR, pp 291–350.
- Trappe JM (1977) Three new Endogonaceae: *Glomus constrictus*, *Sclerocystis clavispora*, and *Acaulospora scrobiculata*. *Mycotaxon* 6(2):359-366.
- Trappe JM (1979) *Glomus segmentatus* sp. nov. *Transactions of the British Mycological Society* 73(2):361-362.
- Trappe JM, Bloss HE, Menge JA (1984) *Glomus deserticola* sp. nov. *Mycotaxon* 20(1):123-127.
- Tulasne LR & Tulasne C (1844) Fungi nonnulli hipogaei, novi v. minus cogniti auct. *Giornale Botanico Italiano* 2: 55-63.
- Velazquez MS, Cabello MN, Irrazabal G, et al (2008) Acaulosporaceae from El Palmar National Park, Entre Ríos, Argentina. *Mycotaxon* 103:171-187.

- Walker C, Trappe JM (1981a) *Acaulospora spinosa* sp. nov. with a key to the species of Acaulospora. Mycotaxon 12(2):515-521.
- Walker C, Rhodes LH (1981b) *Glomus albidus*: a new species in the Endogonaceae. Mycotaxon. 12(2):509-514.
- Walker C (1982) Species in the Endogonaceae: a new species (*Glomus occultum*) and a new combination (*Glomus geosporum*). Mycotaxon 15:49-61.
- Walker C, Reed LE, Sanders FE (1984) *Acaulospora nicolsonii*, a new endogonaceous species from Great Britain. Transactions of the British Mycological Society 83:360–364. doi: 10.1016/S0007-1536(84)80165-5
- Walker C, Sanders FE (1986a) Taxonomic concepts in the Endogonaceae. III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. Mycotaxon. 27:169-182.
- Walker C, Pfeiffer CM, Bloss HE (1986b) *Acaulospora delicata* sp. nov.: an endomycorrhizal fungus from Arizona. Mycotaxon 25(2):621-628.
- Walker C, Koske RE (1987) Taxonomic concepts in the Endogonaceae. IV. *Glomus fasciculatum* redescribed. Mycotaxon 30: 253-262.
- Walker C, Diederichs C (1989) *Scutellospora scutata* sp. nov., a newly described endomycorrhizal fungus from Brazil. Mycotaxon 35(2):357-361.
- Walker C, Gianinazzi-Pearson V, Marion-Espinasse H (1993) *Scutellospora castanea*, a newly described arbuscular mycorrhizal species. Cryptogamie Mycologie 14(4):279-286.
- Walker C, Giovannetti M, Avio L et al (1995) A new fungal species forming arbuscular mycorrhizas: *Glomus viscosum*. Mycological Research 99:1500-1506.
- Walker C, Vestberg M (1998) Synonymy amongst the arbuscular mycorrhizal fungi: *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstenum* and *G. fistulosum*. Annals of Botany 82:601–624.
- Walker C, Cuenca G, Sánchez F (1998) *Scutellospora spinosissima* sp. nov. A Newly Described Glomalean Fungus from Acidic, Low Nutrient Plant Communities in Venezuela. Annals of Botany 82:721–725.
- Walker C, Błaszczowski J, Schwarzott D, et al (2004a) *Gerdemannia* gen. nov., a genus separated from *Glomus*, and Gerdemanniaceae fam. nov., a new family in the Glomeromycota. Mycological Research 108:707–718. doi: 10.1017/S0953756204000346
- Walker C, Schüßler A (2004b) Nomenclatural Clarifications and New Taxa in the Glomeromycota *Pacispora*. Mycological Research 108:981–982. doi: 10.1017/S0953756204231173
- Walker C, Vestberg M, Schuessler A (2007a) Mycological Research News (Nomenclatural clarifications in Glomeromycota). Mycological Research 111:253–256. doi: 10.1016/j.mycres.2007.02.009

- Walker C, Vestberg M, Demircik F, et al (2007b) Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp. nov., Ambisporaceae fam. nov., and emendation of *Archaeospora* and Archaeosporaceae. Mycological Research 111:137–153. doi: 10.1016/j.mycres.2006.11.008
- Walker, C (2008) *Ambispora* and Ambisporaceae resurrected. Mycological Research 112(3):297-298.
- Walker C, Trappe JM, Schüßler A, et al (2017) (2491) Proposal to conserve the name *Rhizophagus* with a conserved type (Fungi: Glomeromycota: Glomeraceae). Taxon 66:199–200. doi: 10.12705/661.19
- Willis A, Błaszowski J, Prabhu T, et al (2016) *Sacculospora felinonii*, a novel arbuscular mycorrhizal fungal species (Glomeromycota) from dunes on the west coast of India. Mycological Progress 15:791–798. doi: 10.1007/s11557-016-1208-6
- Wright SF, Morton JB, Sworobuk JE (1987) Identification of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. Applied and Environmental Microbiology 53:2222-2225.
- Wu CG, Chen ZC (1986) The Endogonaceae of Taiwan I. A preliminary investigation on Endogonaceae of bamboo vegetation at Chi-tou areas, central Taiwan. Taiwania 31:65-88.
- Wu CG, Chen ZC 1987 The Endogonaceae of Taiwan II. Two new species of *Sclerocystis* from Taiwan. Transactions of the Mycological Society of Republic of China 2(2): 73-83.
- Wu CG, Liu YS, Hwuang, YL, et al (1995) Glomales of Taiwan: V. *Glomus chimonobambusae* and *Entrophospora kentinensis*, spp. nov. Mycotaxon 53:283-294.
- Wettstein F (1915) Geosiphon Fr. Wettst, eine neue, interessante Siphonee. Österreichische Botanische Zeitschrift 65(5-6):145-156.
- Yao YJ, Pegler DN, Young TWK (1995) Validation of two combinations in *Glomus* (Endogonales). Kew Bulletin 50(2):306-306.
- Zycha H (1935) Mucorineae. Kryptogamen-flora der Mark Brandenburg 6a, Leipzig. 264.