



Qualité et  
sécurité  
des produits agricoles  
et agro-alimentaires

**Impacts des variations géographiques et temporelles sur le fonctionnement des communautés symbiotiques associées à *Acacia mangium* : Diversité en zone d'origine, évolution et adaptation en zone d'introduction.**

**Impact of geographical and temporal variations on microbial communities in symbiosis with *Acacia mangium* : diversity in native area, evolution and adaptation in introduction zones.**

Programme Ecosystèmes Tropicaux  
Rapport de fin de contrat

UMR 113 LSTM (CIRAD/IRD/UM2, USC-INRA/SupAgro)  
Campus de Baillarguet TA10/J, 34398 Montpellier cedex 05

Yves Prin et Gilles Béna  
Tel : 04 67 59 38 01, Fax : 04 67 59 38 02  
[benam@mpl.ird.fr](mailto:benam@mpl.ird.fr), [prin@cirad.fr](mailto:prin@cirad.fr)

Date : 15/01/2010

N° de contrat : 334  
Date du contrat : 16/10/2006

# TABLE DES MATIERES

Remarques concernant ce document .....	3
Synthèse destinée à publication.....	4
Résumés .....	10
Rapport scientifique .....	12
Annexe : copie des publications.....	32
Annexe : partie confidentielle .....	42

## REMARQUES CONCERNANT CE DOCUMENT

- ❖ La mise en forme de ce rapport, hormis sa partie scientifique et les annexes, doit être respectée. Ce format imposé permettra au Service de la recherche une copie automatique vers d'autres documents à usage interne ou externe.
- ❖ Merci de limiter la taille de votre document à 5Mo (merci de réduire le poids des photos notamment).
- ❖ Votre rapport doit nous parvenir sous forme électronique ainsi que sous format papier en 3 exemplaires en recto-verso, interligne simple, sans couverture plastique ni spirales. Des exemplaires supplémentaires, à la charge du ou des bénéficiaire(s), seront éventuellement demandés (art. 4 de la convention).
- ❖ Les versions électroniques des **résumés** et de la **synthèse** de votre rapport doivent impérativement nous parvenir sous format modifiable rtf afin de pouvoir être réutilisés pour valorisation ou publiés (après relecture de votre part), ainsi que sous format pdf (art. 4 de la convention).
- ❖ Les documents de ce rapport, en dehors de l'éventuelle partie confidentielle, serviront aussi bien pour l'évaluation du projet que pour la valorisation des résultats.

# SYNTHESE DESTINEE A PUBLICATION

## TITRE DU PROJET

**Impacts des variations géographiques et temporelles sur le fonctionnement des communautés symbiotiques associés à *Acacia mangium* : Diversité en zone d'origine, évolution et adaptation en zone d'introduction.**

## NOM DU PROGRAMME ECOSYSTEMES TROPICAUX

### ASPECTS ADMINISTRATIFS ET OBJECTIFS DES RECHERCHES

#### ASPECTS ADMINISTRATIFS

**Date d'engagement :** 16/10/2006

**Montant du budget :** 80 000 euros TTC

**Cofinancements obtenus :** CIRAD bourse de thèse MM Perrineau, 2007-2010 et appui thésard 3 fois 5000 euros

#### Participants au projet :

**Responsable scientifique du projet :** Gilles Béna, *Chargé de recherche à l'IRD et Yves Prin, Chercheur CIRAD. Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Campus de Baillarguet, TA 10/J 34398 Montpellier cedex 5. Tel : 04 67 59 38 24. Fax : 04 67 59 38 02. Mèls : bena@mpl.ird.fr, prin@cirad.fr*

#### Noms et organismes des autres partenaires scientifiques bénéficiaires

1- UMR 113 LSTM (CIRAD/Agro-M/USC-INRA/IRD/UM2)

*Campus de Baillarguet TA10/J, 34398 Montpellier cedex 05 et Laboratoire Commun de Microbiologie, IRD/ISRA/UCAD, Centre de Recherche de Bel-Air, BP 1386 CP 18524 Dakar-Sénégal. Tel : 04 67 59 38 01, Fax : 04 67 59 38 02*

2- EcoBiotics, PO Box 148, Yungaburra, Queensland, 4884, Australie

*Tel : 00 61 7 4089 7777 ; Fax : 00 61 7 4089 7778*

3- EMBRAPA, Agrobiologia, BR 465, Km 47, CEP 23.890-000, Seropédica, Rio de Janeiro,

*Brésil Tel: 55 21 2682 1500 Fax: 55 21 2682 1230*

4- Biotechnology and Horticulture Division, Innoprise Corporation Sdn Bhd., Yayasan Sabah

*Group, P. O. Box 60793, 91017 Tawau, Sabah, Malaysia*

**MOTS CLES :** *Acacia mangium* ; *Bradyrhizobium sp* ; *Ectomycorrhize* ; Symbiose ; zone d'introduction ; Evolution.

#### OBJECTIFS DES RECHERCHES

Ce projet a pour objectif de répondre à plusieurs questions d'ordre scientifique

1- Dans une forêt tropicale non perturbée, comment la diversité des symbiotes bactériens associés dans la fixation d'azote avec un arbre a-t-elle évolué sur 20 ans ? Peut on mettre en évidence une variation (augmentation ou baisse) significative de cette diversité, ou son déplacement (changement de fréquence des différents génotypes bactériens) ? Quelles conséquences en tirer sur la gestion et la préservation des ressources génétiques bactériennes symbiotiques ?

2- Lors de son introduction hors de son aire d'origine, sans son cortège symbiotique, avec quelles souches bactériennes et quels champignons mycorrhiziens *Acacia mangium* a-t-il réalisé sa symbiose ? Ces nouveaux partenaires symbiotiques présentent une diversité réduite par rapport à la zone d'origine, et donc un potentiel de sélection et d'adaptation limité ? Ces nouveaux partenaires présentent ils une efficacité symbiotique

plus restreinte, justifiant ainsi des inoculations artificielles lors de la mise en place des plantations ? Inversement, le niveau atteint par les souches locales après dix ans de plantation suggère t'il que cette durée a été suffisante pour qu'une adaptation et une sélection des souches puissent intervenir efficacement ?

3- Dans le cas où les plantations d'*A. mangium* ont été faites en association avec des souches précédemment sélectionnées, que sont devenues ces souches ? Ont-elles disparu depuis leur introduction, suggérant que l'effet de l'inoculation se restreint aux premiers temps de la plantation ? Ces souches se sont-elles maintenues dans leur intégrité, suggérant inversement un caractère très efficace de la sélection pour leur maintien, et donc soulignant l'intérêt de l'inoculation initiale ? Enfin, observe-t-on une recombinaison de ces souches introduites avec des souches locales, et cette recombinaison touche-t-elle l'îlot symbiotique directement impliqué dans la symbiose ?

4- Dans le cas de recombinaison entre souches locales et souches introduites, la nouvelle souche chimérique présente-t-elle un niveau d'efficacité de fixation identique à la souche initialement introduite ? Inversement, la disparition de la souche initialement introduite est-elle le résultat d'une différence de survie ou de compétition avec les souches locales ?

## I. PRESENTATION DES TRAVAUX

### INTRODUCTION (problématiques)

Avec environ 1200 espèces, originaires des continents africain, américain et en Australie, le genre *Acacia* est de loin le plus riche parmi les Mimosaceae, au sein des Légumineuses (ou Fabaceae). Ce genre est divisé en trois sous-genres : *Acacia*, *Aculeiferum* et *Phyllodineae*. Des études récentes de phylogénie moléculaire des Mimosoidae menées sur des séquences d'ADN chloroplastique (Lückow et al 2003) ont permis de confirmer le caractère paraphylétique du genre *Acacia*, avec des divergences très marquées entre les 3 sous-genres. Ces mêmes travaux montrent le caractère monophylétique du sous genre *Phyllodinae*. C'est parmi le sous-genre *Phyllodineae* que sont regroupés les acacias australiens qui comptent plus de 900 espèces. Parmi ceux-ci, 3 à 4 espèces (*mangium*, *auriculiformis*, *crassicarpa*) en font, après *Eucalyptus*, le deuxième genre le plus planté sous les tropiques, avec environ 1,4 millions d'hectares (plantations industrielles) (Cossalter and Pye-Smith, 2003). C'est *Acacia mangium* qui est le plus largement utilisé avec une productivité annuelle de 15 à 30 m<sup>3</sup> par ha et une maturité à 7 ans. A partir d'une aire d'origine très limitée et fragmentée dans quelques îlots de forêt dense du Nord-Queensland ainsi que de Papouasie Nouvelle-Guinée et Timor, *A. mangium* a été exporté d'Australie pour la première fois en 1966 : il s'agissait d'un lot de 200 graines récoltées sur un seul arbre, près de Mission Beach dans le N Qld, qui ont été plantées en Malaisie et en Indonésie (Awang and Taylor, 1993). Devant les performances exceptionnelles de ces arbres, supérieures aux *Eucalyptus deglupta* et *Gmelina arborea* jusqu'alors utilisés, les premières plantations industrielles pilotes ont été mises en place dès 1976, par une compagnie privée du Sabah. Devant son adaptabilité et sa productivité, il est passé, en une vingtaine d'années, du statut d'espèce sauvage à celui de plante industrielle, utilisé en Asie (Indonésie, Malaisie, Philippines, Chine, Vietnam, Inde, Thaïlande) mais aussi en Afrique (Côte d'Ivoire, Guinée, Madagascar) et Amérique du Sud (Brésil). Un élément supplémentaire de son succès a été sa capacité à limiter, grâce à la fermeture rapide de son couvert en plantation, le développement d'*Imperata cylindrica*, une espèce de graminée très envahissante en Asie du Sud Est.

*A. mangium* est une espèce de zone tropicale humide (1500 à 3000 mm de pluie annuelle) de faible altitude, dont la hauteur adulte oscille entre 25 et 35 m. C'est une espèce à phyllode, dont les vraies feuilles ne sont visibles qu'au stade juvénile, les feuilles adultes étant des pétioles modifiés (ou "phyllodes"). Ses très bonnes performances sur sols érodés et peu fertiles sont généralement attribuées à sa capacité, assez exceptionnelle, d'association symbiotique simultanée avec des bactéries du groupe des rhizobiums au sens large (Galiana et al 1990, Nuswantara et al, 1997), des champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules (Awang and Taylor, 1993, Weber et al 2005) et des champignons ectomycorhiziens (Founoune et al 2002, Duponnois et al 2002), lui conférant un "plus" adaptatif sérieux dans sa croissance sur sols pauvres. Si les symbioses à mycorhizes VA sont, *a priori*, généralisées chez les légumineuses, la combinaison fixation d'azote/ectomycorhization n'est connue que chez très peu d'espèces d'*Acacia*, appartenant d'ailleurs toutes au sous-genre *Phyllodinae*, comme chez très peu de légumineuses, en général.

Depuis les années 1980, l'utilisation croissante de cette essence a suscité des travaux sur ses partenaires symbiotiques visant, en particulier, à identifier les partenaires bactériens et mycorhiziens les plus efficaces pour promouvoir la productivité au champ dans les zones d'introduction.

En 1986, une campagne d'échantillonnage a été menée afin de récolter des graines dans les peuplements naturels du nord Queensland en Australie (Souvannavong et Cremerie 1986). Par la même occasion des nodules furent prélevés sur de nombreux arbres et plusieurs sites (populations) couvrant l'aire de répartition de l'espèce. Ces nodules furent préservés desséchés en tube contenant du silicagel. Au cours de sa thèse, A. Galiana (associé à ce projet) a pu isoler 80 souches issues de 7 populations différentes. Ces souches sont en collection au LSTM. Une sélection de souches performantes en terme de fixation d'azote en association avec *A. mangium* a été ensuite réalisée. C'est ainsi que des essais d'inoculations contrôlées avec des souches de rhizobiums sélectionnées en conditions de plantations ont pu être mis place dans un grand nombre de pays depuis l'Asie (Malaisie (Frémont et al 1991, Martin Laurent et al 1999), l'Afrique (Côte d'Ivoire (Galiana et al 1994), Bénin (Galiana et al 1998), Madagascar (Prin et al 2003) ainsi que l'Océanie (Iles Cook (Galiana et al 1998)). Ces essais ont, d'une manière générale, montré les effets très significatifs de l'inoculation avec des souches sélectionnées dans l'aire d'origine d'*A. mangium* (souches australiennes), permettant d'obtenir des gains de productivité en surface terrière (mesure reflétant directement la production de bois) de l'ordre de 20% - et parfois plus - par rapport au témoin non inoculé (et pourtant nodulé spontanément) (Galiana et al 1998). Cette nodulation spontanée, même si elle est moins efficace, constitue probablement un frein au développement des pratiques d'inoculation. Ainsi, les pratiques d'inoculation contrôlées sont restées extrêmement marginales et limitées à quelques essais, dans toutes les zones d'introduction.

Ce contexte, assez exceptionnel, du passage d'une espèce végétale d'un stade "sauvage" (avec une zone d'origine fragmentée et très ponctuelle, et à partir d'arbres semenciers originels identifiés et souvent encore en place actuellement dans leur écosystème forestier naturel) au stade industriel, en une vingtaine d'années, fait d'*A. mangium* un matériel de choix pour analyser le comportement d'une espèce végétale vis-à-vis de ses partenaires

symbiotiques, bactériens et ectomycorhiziens, lors de sa dispersion géographique et au cours du temps. Il est notable qu'une telle étude ne peut évidemment se faire que sur une espèce présentant les deux types de symbioses (bactérienne fixatrice d'azote et ectomycorhizienne), et qu'*Acacia mangium* est une des rares légumineuses à posséder une telle caractéristique.

Nous proposons donc, sur ce modèle, d'étudier l'impact des variations géographiques et temporelles sur le fonctionnement des communautés biologiques en interactions, en confrontant notamment des zones d'origine avec des zones d'introduction, et d'analyser la dynamique des réseaux d'interactions durables ainsi formés.

Nous pourrions répondre à ces problématiques en réalisant des inventaires de diversités bactérienne symbiotique et ectomycorhizienne dans trois environnements contrastés :

(i) d'une part dans la zone naturelle d'origine d'*A. mangium*, dans le Nord Queensland. La première phase d'échantillonnage des bactéries associées aux populations naturelles d'*A. mangium* avait été réalisée au cours de l'année 1986. Les données d'échantillonnage sont très précises (localisations des arbres échantillonnés) et couvrent l'aire de répartition de l'espèce en Australie ; Nous souhaitons procéder à une seconde phase d'échantillonnage, et de comparer l'évolution de la diversité bactérienne in situ sur 20 ans, globalement mais aussi arbre par arbre. Il n'existe actuellement aucune étude évaluant les modifications des compositions génétiques des populations bactériennes symbiotiques du sol non anthropisé. Ces populations naturelles d'*A. mangium* se trouvent dans des zones protégées, et donc faiblement soumises à des perturbations anthropiques directes. Nous évaluerons ainsi l'évolution "naturelle" de cette diversité, provenant d'effets de sélection, de dérive, voire de migration.

(ii) À partir de début des années 80, *A. mangium* a été introduit en tant qu'espèce sylvicole dans de nombreux pays de la zone intertropicale. Dans les peuplements où il n'y a pas eu d'inoculations volontaires des plants, nous analyserons la stratégie comportementale d'une même espèce de plante face à des communautés microbiennes édaphiques "allopatriques", que cela soit les communautés procaryotiques nodulantes spontanément (rhizobiums s.l.) et les communautés eucaryotiques mycorhizantes spontanément (champignons ectomycorhiziens). En particulier, nous souhaitons déterminer quelle diversité génétique de souches a pu être "capturée", comparer cette diversité à celle observée dans la zone d'origine de l'espèce, et déterminer si ces souches présentent, comme la théorie le prédit, une effectivité de fixation d'azote plus faible que les souches de la zone d'origine.

(iii) Enfin, dans le cadre de dissémination sympatrique plantes/rhizobiums, nous souhaitons étudier le devenir des souches allogènes introduites, notamment si elles se sont maintenues en tant que telles, si elles ont disparu du fait d'une moindre valeur sélective ou si des phénomènes de recombinaison entre souches autochtones et allogènes se sont produits, notamment des clusters symbiotiques des souches introduites, par rapport aux populations bactériennes locales nodulantes, plusieurs années après leur introduction.

#### **Matériels et méthodes (sites, espèces, protocoles...)**

- Diversité et évolution des souches bactériennes symbiotiques en zone d'origine. Pour cela nous disposons de l'échantillonnage de nodules réalisé au nord de l'Australie en 1986 et piégé (après broyage) sur plantes. Un second échantillonnage a été réalisé en 2007 et 2008, sur tous les sites de 1986 avec un protocole d'isolement identique. Le pouvoir nodulant de tous les isolats de cette étude a été testé systématiquement sur plantes. L'analyse de cette diversité s'est faite par séquençage du gène *recA*, gène de ménage impliqué dans la réparation et la recombinaison de l'ADN.

- Diversité et évolution des souches bactériennes symbiotiques en zone d'introduction (nodulation spontanée) : Parcelles non inoculées présentant une nodulation spontanée, échantillonnées au Brésil, au Sénégal et en Malaisie. Le pouvoir nodulant de tous les isolats de cette étude a été testé systématiquement sur plantes.

- Suivi des souches inoculées en parcelles d'essai au Brésil, au Sénégal et en Malaisie. Les nodules récoltés dans les parcelles inoculées sont traités et caractérisés de la même manière que pour les parcelles non inoculées.

- Diversité des champignons ectomycorhiziens associés à *A. mangium* dans les différents sites visités.

#### **Résultats - discussion**

##### **1 - Evolution de la diversité des bactéries symbiotiques associées à *Acacia mangium* en zone d'origine**

Sur les 80 souches australiennes (représentant 21 arbres) isolées en 1986 par broyat de nodules/piégeage provenant de populations naturelles d'*A. mangium*, 76 ont pu être redémarrées. A partir de la récolte 2007, 103 isolats nouveaux (représentant 26 arbres) ont pu être piégés selon la même méthode qu'en 1986. Cette seconde récolte est complétée par une troisième récolte effectuée en 2009, dans le cadre de la thèse de Melle MM Perrineau, doctorante CIRAD, sur ce même sujet. Pour cette dernière récolte les isolements et tests de nodulation et caractérisation sont toujours en cours.

Le séquençage du gène *recA* définit ces bactéries symbiotiques comme appartenant à deux groupes de *Bradyrhizobium* : le premier proche de *B. japonicum* et le deuxième proche de *B. elkanii*.

La comparaison, encore préliminaire (par Neighbor-Joining), des séquences, ne met pas en évidence une claire structuration géographique des souches, ni de structuration particulière entre les souches isolées en 1986 et

en 2007. Des analyses statistiques plus poussées, sur un échantillonnage augmenté des isolats de la récolte 2009 sont en cours dans le cadre de la thèse de MM Perrineau, en liaison avec le Dr J Thioulouse, UMR CNRS 5558 Université Lyon 1.

2 - Au sein des aires d'introduction et sans inoculation artificielle, à quels partenaires bactériens *A. mangium* s'est-il associé ? Existe-il une structuration des populations en fonction de leurs origines géographiques ?

Une campagne d'échantillonnage a été réalisée au Brésil, en 2007, grâce au partenariat avec l'EMBRAPA, pour prélever des souches provenant de 4 sites non inoculés. Deux de ces quatre sites, ont du être ré-échantillonnés en 2009 pour compléter les isolats.

En Malaisie, grâce au partenariat avec Innoprise Corporation Sdn Bhd, la campagne d'échantillonnage, réalisée sur 3 sites de cette compagnie (Taliwas, Brumas, Luasong), a permis au final l'obtention de 33 isolats de parcelles non inoculées.

Au Sénégal, la campagne d'échantillonnage a été réalisée, en 2008, grâce au partenariat avec l'ISRA (Institut Sénégalais de Recherches Agricoles), a permis au final l'obtention de 27 isolats sur un site non inoculé (Richard Toll).

Enfin, les nodules provenant de la campagne d'échantillonnage Australienne de 2007, ont également servi pour comparer ces trois «populations» aux souches issues de l'aire d'origine d'*A. mangium*.

Les résultats obtenus par séquençage du gène *recA* ont montré que *A. mangium* s'associe principalement avec des bactéries fixatrices d'azote du genre *Bradyrhizobium*. Ce genre bactérien est celui qui est classiquement retrouvé en association avec cet arbre. De plus, sur un site brésilien, *A. mangium* est également associé au genre *Mesorhizobium*, déjà retrouvé en Indonésie.

Enfin, il ne semble pas y avoir de structuration géographique de la diversité des souches isolées dans différents pays, différents continents.

3- Dans leurs aires d'introduction et avec inoculation artificielle, comment ont évolué les souches bactériennes introduites ?

Au Brésil, des souches de 2007 issues de 3 sites inoculés, par deux souches brésiliennes sélectionnées, ont été isolées. Un de ces trois sites a dû également être ré-échantillonné en 2009 faute d'isolats. Dans les deux sites étudiés, on ne retrouve pas les souches inoculum.

En Malaisie, les nodules de cinq arbres inoculés, par une souche australienne ou asiatique, ont été analysés. Seulement trois souches ont pu être isolées ce qui n'a pas permis de tirer de conclusion quant à la persistance de l'inoculum.

Au Sénégal, un site inoculé par une souche australienne a été analysé, dans ce cas l'inoculum n'a également pas pu être détecté.

Ainsi dans les trois cas d'introduction, il ne semble pas y avoir de persistance des souches inoculum remettent en cause l'intérêt de l'inoculation contrôlée.

#### - Symbioses ectomycorhiziennes

En Australie et dans les zones d'introduction, la recherche de carpophores sous *A. mangium* a été poursuivie pendant toute la durée du projet. Au Brésil, 6 carpophores ont été récoltés dont 5 sont du genre *Pisolithus* et de l'espèce *microcarpus*, ce qui paraît original, cette espèce étant plutôt de milieu méditerranéen (l'espèce classiquement rencontrée avec *A. mangium* est *P. albus*). En Malaisie, les carpophores récoltés appartiennent aux genres *Telephora* et *Pisolithus*. Aucun carpophore n'a été trouvé au Sénégal.

### CONCLUSIONS – PERSPECTIVES

Globalement, sur les 20 dernières années, il ne semble pas que les populations australiennes de bactéries symbiotiques associées à *A. mangium* aient radicalement évolué. De plus, il ne semble pas y avoir de structuration géographique au sein même de l'aire d'origine. Il ne semble également pas y avoir de structuration géographique à une plus large échelle. Enfin l'intérêt de l'inoculation contrôlée est sérieusement remis en cause par cette étude qui met en avant la nécessité de sélectionner des souches inoculum efficaces mais également persistantes.

Le projet étant en décalage d'une année avec la thèse de Melle MM Perrineau, un certain nombre de points sont encore en cours et vont être éclaircis d'ici à la fin 2010 dans le cadre de cette thèse. En particulier, le rééchantillonnage de sites australiens et brésiliens permettant de valider statistiquement certaines données (courbes de raréfaction) ainsi que l'exploitation statistique complète des centaines de séquences nucléiques (phylogénies, ...) et l'identification des souches susceptibles d'avoir subi des recombinaisons.

## II. ACQUIS EN TERMES DE TRANSFERT

Méthodologies :

- Echantillonnage : La récolte de nodule sur le terrain n'est pas toujours évidente sur des arbres relativement âgés en zone de forêts dense (ou de plantations déjà anciennes). Le nombre de nodules récoltés s'est de ce fait trouvé parfois relativement limités ce qui a imposé des rééchantillonnages rendus possibles par des financements complémentaires (appui thésard du CIRAD à MM Perrineau) et l'investissement répété des partenaires locaux.

- Stratégie d'isolement des souches : la caractérisation des souches nodulantes peut se faire selon plusieurs stratégies : directement à partir d'ADN extrait de nodules récoltés sur le terrain, avec tout un choix de marqueurs procaryotiques neutres ou symbiotiques, ou après isolement. L'isolement peut être réalisé directement à partir des nodules récoltés sur le terrain (« isolement direct ») ou après broyage des nodules terrain et inoculation de germinations de la même plante (« piégeage homologue»). Les souches de rhizobia étant faciles à conserver sur de longues périodes (à -80°C) c'est cette approche isolement qui a été utilisée dans cette étude. Nous avons également, pour l'Australie, cherché à reproduire au maximum le protocole utilisé en 1986, c'est à dire la technique du piégeage homologue. Cette technique plus longue est apparue beaucoup plus efficace que l'isolement direct sur lequel le taux de réussite ne dépassait parfois pas les 10%.

- Le test de pouvoir nodulant des isolats en tubes fermés et en chambre de culture, développé à grande échelle pour cette étude s'est avéré extrêmement fiable au niveau des risques de contamination (sur plusieurs centaines d'isolats testés, aucun témoin non inoculé n'a nodulé), rapide pour la lecture des résultats, avec aucun entretien (ajout de milieu) sur cette durée de manipulation. Des cas de contaminations ponctuelles de certains témoins se sont par contre produits, malgré les précautions prises, lors d'essais de piégeage en pot et en serre, probablement en liaison avec la présence chez *A. mangium* de nectaires foliaires apparemment très attractifs vis à vis de fourmis et de moucheron divers (difficiles à contrôler en serre), transporteurs potentiels de contaminants. Ces tests de nodulation (homologues ou hétérologues), parfois lourds (en fonction des plantes considérées) et malheureusement pas toujours effectués dans la littérature, sont pourtant essentiels pour remplir le postulat de Koch et valider la notion de souche bactérienne.

- La validation relativement récente du marqueur *recA* chez les *Bradyrhizobium* en particulier nous a amené à ne pas pousser davantage les caractérisations AFLP, plus lourdes à mettre en œuvre et pas plus informatives, sur la séquence de restriction testée.

- Les représentations phylogéniques classiques (cladogrammes et phylogrammes) se sont révélées assez peu adaptées aux questions que nous nous posons, en particulier celle relative à une éventuelle structuration géographique des isolats. Des partenariats sont donc en cours avec des biostatisticiens pour trouver des tests et des représentations statistiques adaptées.

- Enfin, en terme d'application, le suivi moléculaire des souches inoculums est un des résultats frappants de cette étude puisque dans aucun des sites d'introduction étudiés les inoculants ne se sont maintenus parfois même après des périodes très courtes comme au Brésil. Cela ne remet pas forcément en cause la nécessité de l'inoculation celle-ci pouvant avoir joué un rôle déterminant dans le taux de survie des plants lors du transfert de la pépinière au champ.

### III. LISTE DES PRINCIPALES VALORISATIONS DES RECHERCHES

- Articles scientifiques publiés, sous presse, soumis et en préparation.

- Perrineau MM., Ducouso M., Weber J., Galiana A., Reddell P., Duponnois R., Lee S.K., Bâ A.M., and Prin Y. *Ectomycorrhizal symbioses of the nitrogen-fixing tree legume Acacia mangium Willd. En préparation pour Mycorrhiza.*

- Perrineau M.M., Galiana A., de Lajudie P., Duponnois R., Béna G., Dreyfus B. and Prin Y. *Rhizobia nodulating acacias, in the light of plant molecular phylogeny. Article de synthèse, en préparation.*

- Le Roux Christine, Diana Tentchev, Yves Prin, Doreen Goh, Yani Japarudin, Marie-Mathilde Perrineau, Robin Duponnois, Odile Domergue, Philippe de Lajudie, and Antoine Galiana. *Bradyrhizobia nodulating the Acacia mangium x A. auriculiformis interspecific hybrid are specific and differ from those associated to both parental species. Appl. Environ. Microbiol. (sous presse) doi:10.1128/AEM.01887-09*

- Participations aux colloques nationaux ou internationaux (communication orale et poster).

- Perrineau MM., C. Le Roux, S. de Faria, A. Galiana, R. Duponnois, G. Béna et Y. Prin. 2010. *Les bactéries symbiotiques associées à Acacia mangium en populations naturelles et introduites, au Brésil. 9<sup>èmes</sup> Rencontres Plantes-Bactéries – Aussois 2010. 18-22 Janvier 2010.*

- Rapports de fin d'étude (mémoires de master, de DEA, thèses...).

- Mora F. 2007. *Diversité des rhizobiums symbiotiques d'Acacia mangium en zone d'origine, évolution et adaptation en zone d'introduction. Stage de 4<sup>ème</sup> année IUP, UM2, 21 pp.*

- Taschen E. 2009. *Diversité des bactéries symbiotiques associées à Acacia mangium au Brésil. Stage de M1, fonctionnement des écosystèmes naturels et cultivés, UM2, 18 pp.*

## En français

---

### RESUME

La problématique générale de ce projet porte sur l'évolution des bactéries symbiotiques et des champignons ectomycorhiziens associés à *Acacia mangium*, en communautés naturelles et introduites. Ce travail se situe dans le cadre général de l'évolution des interactions inter-spécifiques après introductions volontaires et de la comparaison de réseaux d'interaction durable dans divers contextes géographiques et biotiques.

*Acacia mangium* a été introduit dans de nombreux pays de la zone tropicale en vue d'exploitation à partir de son aire d'origine australienne, avec ou sans inoculations volontaires par des souches sélectionnées. Une campagne d'échantillonnage des souches symbiotiques a été réalisée en Australie en 1986, 2007 et 2009, et dans 3 zones d'introduction (Brésil, au Sénégal et en Malaisie) où nous possédons un historique précis de la mise en place des plantations, ainsi que les souches qui avaient été initialement utilisées lors des inoculations artificielles.

L'évolution de la diversité des souches symbiotiques en zone d'origine au cours des 20 dernières années, a été analysée sur le gène *recA*. Cette caractérisation nous permet de confirmer la nodulation limitée au genre *Bradyrhizobium* en Australie, avec une diversification accrue sur les 2 campagnes d'échantillonnage. La campagne 2009 en cours d'analyse devrait nous permettre de vérifier la saturation de cette diversité ; De la même manière, dans les trois zones d'introduction, le séquençage du même gène *recA* sur un échantillonnage de plusieurs centaines d'isolats, vérifiés comme re-nodulants, a permis de montrer une diversité parfois très réduite (Sénégal) mais aussi, au Brésil, une nodulation par des genres nouveaux, non retrouvés dans l'aire d'origine comme *Mesorhizobium* ou *Rhizobium*.

Enfin, dans les sites où *A. mangium* a été introduit conjointement avec une bactérie symbiotique sélectionnée, le séquençage du même gène *recA* sur des isolats vérifiés comme re-nodulants a permis de montrer une absence des souches originellement utilisées dans les essais d'inoculation. Des analyses plus fines des séquences visent à étudier l'existence de phénomènes de recombinaison avec les bactéries autochtones.

Au niveau des champignons ectomycorhiziens, la diversité des carpophores récoltés semble très réduite en zone d'introduction au regard de l'aire d'origine, ce qui validerait un recours à l'inoculation pour optimiser la productivité des plantations, en fonction de l'efficacité des souches locales.

Les résultats acquis nous permettent d'émettre des recommandations en terme de sauvegarde de la biodiversité microbienne symbiotique en zone naturelle, ainsi que des recommandations sur la pertinence de procéder à des inoculations artificielles lors de la mise en place de plantation d'*Acacia mangium*.

### MOTS CLES

*Acacia mangium* ; *Bradyrhizobium* sp ; ectomycorhize ; symbiose ; zone d'introduction ; évolution.

## In English

---

### ABSTRACT

1/2-1 page

The aim of this project is to study the evolution of symbiotic, ectomycorrhizal and nitrogen-fixing bacterial communities associated to *Acacia mangium* both in native and introduction zones. From Australia, its native area and since 3 decades, *A. mangium* has been introduced in many tropical countries as pulp- and fuelwood. Symbiotic nodule bacteria have been sampled from over 20 sites in Australia in 1986 and 2009 and in 3 introduction countries : Brazil, Senegal and Malaysia, where *A. mangium* had been used for inoculation trials with selected bacterial strains. More than 500 isolates were obtained from which over 300 gave positive response in nodulation tests with *A. mangium*. These were then characterized using PCR/sequencing characterization of the *recA* gene, a particularly efficient marker of *Bradyrhizobium* strains.

Phylogenies of the obtained sequences were made, confirming the high level of bacterial diversity in the native area, and the much more reduced diversity in the introduction zones. In Australia, over 20 years, there was no clear geographical structuration of the sampling sites, as particular clades within the phylograms. At the taxonomic level all the strains belonged to the genus *Bradyrhizobium* with some putatively new species. In the different introduction areas some other bacterial genera were found to nodulate *A. mangium*, but the main results was the absence of the inoculant strain within nodules from the inoculated plots. More isolate are being currently analysed to confirm these data.

The diversity of ectomycorrhizal sporocarps was found to be drastically reduced in introduction areas by reference to Australia, evidencing a potential need for ecm inoculant from the native area to be made available for testing in introduction zones (at least for some cultivable ecm taxa).

We demonstrated through this study that *A. mangium* although preferentially nodulated by bradyrhizobia in its native area might be nodulated by genera *Mesorhizobium*, in introduction zone. We also showed a systematic

loss of inoculant strains in test plots of introduction zones even with Australian strains, a result contradictory to previous studies but often after shorter periods following inoculation.

**KEY WORDS**

*Acacia mangium* ; *Bradyrhizobium sp* ; ectomycorrhiza ; symbiosis ; introduction zone; evolution.

# RAPPORT SCIENTIFIQUE

**Titre du projet** : Impacts des variations géographiques et temporelles sur le fonctionnement des communautés symbiotiques associés à *Acacia mangium* : Diversité en zone d'origine, évolution et adaptation en zone d'introduction.

## NOM DU PROGRAMME ECOSYSTEMES TROPICAUX

### Nom du responsable scientifique du projet

**Gilles Béna**, Chargé de recherche à l'IRD et **Yves Prin**, Chercheur CIRAD.

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Campus de Baillarguet, TA 10/J  
34398 Montpellier cedex 5.

Tel : 04 67 59 38 24

Fax : 04 67 59 38 02

Mèls : [bena@mpl.ird.fr](mailto:bena@mpl.ird.fr), [prin@cirad.fr](mailto:prin@cirad.fr)

### Noms des autres partenaires scientifiques bénéficiaires

- EcoBiotics, PO Box 148, Yungaburra, Queensland, 4884, Australie

Tel : 00 61 7 4089 7777 ; Fax : 00 61 7 4089 7778. Reddell Paul, PhD, Executive Director, Research & Development: [paul.reddell@ecobiotics.com.au](mailto:paul.reddell@ecobiotics.com.au)

- EMBRAPA, Agrobiologia, BR 465, Km 47, CEP 23.890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brésil

Tel: 55 21 2682 1500 Fax: 55 21 2682 1230

- Miana de Faria Sergio, PhD Chercheur à l'Embrapa Agrobiology : [sdefaria@cnpab.embrapa.br](mailto:sdefaria@cnpab.embrapa.br)

- de Souza Francisco, PhD Chercheur à l'Embrapa Agrobiology : [fsouza@cnpab.embrapa.br](mailto:fsouza@cnpab.embrapa.br)

- Biotechnology and Horticulture Division, Innoprise Corporation Sdn Bhd., Yayasan Sabah Group, P. O. Box 60793, 91017 Tawau, Sabah, Malaysian - Goh Doreen, Manager Biotech and Herbal Division : [dorngoh@pc.jaring.my](mailto:dorngoh@pc.jaring.my)

## Note importante

---

*Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).*

### **- Rappel succinct des objectifs**

Ce projet a pour objectif de répondre à plusieurs questions d'ordre scientifique mais aussi en terme de gestion

1- Dans une forêt tropicale non perturbée, comment la diversité des symbiotes bactériens associés dans la fixation d'azote avec un arbre a-t-elle évolué sur 20 ans ? Peut on mettre en évidence une variation (augmentation ou baisse) significative de cette diversité, ou son déplacement (changement de fréquence des différents génotypes bactériens) ? Quelles conséquences en tirer sur la gestion et la préservation des ressources génétiques bactériennes symbiotiques ?

2- Lors de son introduction hors de son aire d'origine, sans son cortège symbiotique, avec quelles souches bactériennes et quels champignons mycorhiziens *Acacia mangium* a-t-il réalisé sa symbiose ? Ces nouveaux partenaires symbiotiques présentent une diversité réduite par rapport à la zone d'origine, et donc un potentiel de sélection et d'adaptation limité ? Ces nouveaux partenaires présentent ils une efficacité symbiotique plus restreinte, justifiant ainsi des inoculations artificielles lors de la mise en place des plantations ? Inversement, le niveau atteint par les souches locales après dix ans de plantation suggère t'il que cette durée a été suffisante pour qu'une adaptation et une sélection des souches puissent intervenir efficacement ?

3- Dans le cas où les plantations d'*A. mangium* ont eu lieu en association avec des souches précédemment sélectionnées, que sont devenues ces souches ? Ont-elles disparu depuis leur introduction, suggérant que l'effet de l'inoculation se restreint aux premiers temps de la plantation ? Ces souches se sont elles maintenues dans leur intégrité, suggérant inversement un caractère très efficace de la sélection pour leur maintien, et donc soulignant l'intérêt de l'inoculation initiale ? Enfin, observe t'on une recombinaison de ces souches introduites avec des souches locales, et cette recombinaison touche t'elle l'îlot symbiotique directement impliqué dans la symbiose ?

4- Dans le cas de recombinaisons entre souches locales et souches introduites, la nouvelle souche chimérique présente t'elle un niveau d'efficacité de fixation identique à la souche initialement introduite ? Inversement, la disparition de la souche initialement introduite est-elle le résultat d'une différence de survie ou de compétition avec les souches locales ?

### **- Justification des éventuels écarts par rapport au projet de départ (partie obligatoire en cas de modification du projet)**

Notre projet affichait à l'origine comme partenaire pour le continent africain le Laboratoire de Microbiologie et d'Ecologie à Antananarivo, Madagascar. Ce partenariat n'ayant finalement pas pu se mettre en place, c'est le Sénégal (où sont implantés des chercheurs du LSTM) et où plusieurs essais d'inoculation avaient été mis en place qui a été choisi comme partenaire africain. Au départ prenant en compte les trois grands types de symbioses rencontrées chez *A. mangium*, c'est à dire fixation d'azote (rhizobiums), mycorhization arbusculaire et ectomycorhization, notre projet a été recentré plutôt sur les rhizobiums et les champignons ectomycorhiziens (avec une caractérisation limitée au phénotype des carpophores), son enveloppe budgétaire étant passée de 122 000 euros demandés à 80 000 attribués.

## - Description du déroulement du projet et des matériels utilisés



### 1- Acquisition du matériel biologique

Suivant le programme proposé, nous avons prospecté plusieurs sites afin de procéder à l'isolement de souches bactériennes symbiotiques d'*Acacia mangium*, que cela soit en zone naturelle d'origine, ou en zones d'introduction artificielle.

#### - Sites prospectés :

**Aire d'origine : Australie** - Les sites Australiens présentent deux intérêts majeurs : D'une part l'Australie est la zone d'origine naturelle de *A. mangium*. D'autre part, les populations avaient déjà été échantillonnées en 1986. Les sites de nouveau échantillonnés, tous situés dans le Nord Queensland, sont pour l'essentiel les mêmes que ceux prospectés entre le 20 octobre et le 4 novembre 1986 lors d'une récolte de graines conjointe entre le CSIRO australien et le Centre Technique Forestier Tropical du CIRAD. A l'époque, les nodules avaient été récoltés sur 7 sites et 21 arbres/provenances différents. Ces mêmes sites ont été prospectés à nouveau en avril 2007 et 2009, à l'exception du site de Iron Range, très isolé des autres sites, localisé très au nord, à approximativement 200 km (à vol d'oiseau) de Cape York, la pointe nord du Nord Queensland, et inaccessible selon les saisons.

#### Zones d'introduction

Trois zones d'introduction, situées sur 3 continents différents avaient été choisies afin d'évaluer les potentialités d'*A. mangium* à trouver des partenaires symbiotiques en dehors de son aire naturelle d'origine, mais aussi de tester la persistance des souches artificiellement introduites lors des plantations.

**Brésil** : les prospections ont été faites dans 3 états différents : récolte de nodules, sporophores et racines ectomycorhiziennes d'*Acacia mangium* en plantations, inoculé et non inoculé par des rhizobiums.

**Sabah (Malaisie)**. Récolte de nodules sur parcelles inoculées et non inoculées. Récolte de racines pour identification ectomycorhizes.

**Sénégal**. Récolte de nodules sur parcelles inoculées et non inoculées. Récolte de racines pour identification ectomycorhizes

**2- Echantillonnages et conditionnement** : Les nodules ont été récoltés avec leurs systèmes racinaires et conservés frais dans le sol local en sachets plastiques. Les sachets de sols avec racines et nodules sont stockés à 4°C.

### 3- Cultures bactériennes :

Les souches isolées en 1986 par piégeage (Galiana, 1990) étaient conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  en présence de glycérol. Après plusieurs repiquages sur milieu YM (yeast mannitol) solide pour éliminer des éventuels contaminants des souches et après contrôle à la loupe binoculaire de la pureté des souches conservées, celles-ci sont réensemencées dans 20 mL de milieu de culture YM liquide. La composition du milieu YM du est la suivante (Somasegaran and Hoben, 1985): 10 g/L de mannitol ; 0,5 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ; 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0,1 g/L de Na Cl ; 0,5 g/L d'extrait de levure. En culture liquide , pour l'extraction d'ADN, la concentration de mannitol est ramenée à 1 g/L pour limiter la production d'exopolysaccharides par les bactéries.

### 4- Isolements à partir de nodules :

- Isolements « direct » : Les nodules sont séparés des systèmes racinaires sous une loupe binoculaire. Deux nodules de chaque échantillon sont lavés et stérilisés dans l' $\text{H}_2\text{O}_2$  30% pendant 2 mn, rincés à l'eau distillée stérile et étalés sur YM solide. Un à deux isolats sont sélectionnés par nodule.

- Isolement après piégeage : Après stérilisation selon le même traitement que pour les tests de nodulation les graines sont transférées en pots sur substrat attapulgite stérile, et inoculé à l'aide d'un broyat de nodules (4 nodules par arbre). Après 8 semaines de croissance les nodules sont récoltés et traités pour isolement selon le protocole de l'isolement direct.

### 5- Test de nodulation :

Les graines d'*Acacia mangium* (lot 19297 du CSIRO Tree Seed Center) sont traitées à l'eau bouillante pendant 2mn et stérilisées à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  30% pendant 5 min. Elles sont mises à germer dans des conditions stériles sur gélose nutritive pendant 3 jours. Les graines germées et stériles sont trempées dans la culture bactérienne pendant 10 min (inoculation) et transférées dans un dispositif de culture *in vitro* stérile.

Après 2 semaines de développement les plants sont observés à la loupe binoculaire afin de vérifier la présence de nodules. Ceux-ci sont ensuite prélevés et conservés dans du glycérol à 25% et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 6- Conservation de souches :

Les souches sont stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans la souchothèque du LSTM. Pour cela, 700  $\mu\text{L}$  de chaque culture bactérienne liquide sont ajoutés à 700  $\mu\text{L}$  de glycérol à 50 %. Après homogénéisation au vortex, les différentes collections sont ensuite numérotées, répertoriées et rangées à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 7- Caractérisation moléculaire :

La caractérisation moléculaire des souches est effectuée selon 2 approches : PCR-séquençage du gène *recA* (Stepkowski et al, 2005) permettant un premier génotypage et AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) sur les isolats australiens afin d'estimer la variabilité génomique et le « plus » éventuel lié à cette approche. En plus de *recA*, les marqueurs *glnB*, *dnaK* et *nodA* ont été testés sur les isolats brésiliens

- Extraction d'ADN : La méthode utilisée comprend les étapes suivantes :

- lyse cellulaire sur le culot bactérien par 200  $\mu\text{L}$  de Sodium Dodecyl Sulfate et agitation vigoureuse durant 3 minutes,
- solubilisation de l'ADN par 133  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M pendant 15 minutes dans la glace,
- deuxième solubilisation de l'ADN par 1 volume de chloroforme + alcool isoamylique avec renversements,
- précipitation de l'ADN à l'aide d'un volume d'isopropanol avec inversion
- lavage et précipitation à l'éthanol.
- le dernier culot est repris dans du Tris EDTA+Rnase.

Le dosage des extraits obtenus se fait par un spectrophotomètre sans dilution (Nanodrop) pour lequel seulement 2  $\mu\text{L}$  de la solution sont suffisants. La concentration de l'extrait doit être supérieure à 50 ng/ $\mu\text{L}$  pour les PCR, et supérieure à 200 ng/ $\mu\text{L}$  pour l'AFLP. L'extrait peut être ensuite conservé à  $4^{\circ}\text{C}$  ou  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- PCR *recA*

Les PCR ciblées sur le gène *recA* (recombinase bactérienne) ont été réalisées à l'aide des amorces TsrecAf (CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAAGG) et TsrecA (CGGATCTGGTTGATGAAGATCACCATG). Après PCR et migration sur agarose, les bandes d'ADN sont purifiées à l'aide du kit QIA quick Gel Extraction Kit de QIAGEN. L'ADN ainsi purifié est dosé au Nanodrop.

- Séquençage

Le séquençage est confié soit à la société Macrogen en Corée du Sud, soit à Genoscreen , Lille, France. Les résultats sont reçus via Internet après une semaine.

- Alignement des séquences et construction d'un arbre phylogénique

Les séquences nucléotidiques sont corrigées manuellement et alignées à l'aide des logiciels ChromasPro, ClustalX (Thompson et al, 1997) et GeneDoc (Nicholas and Nicholas ,1997). Enfin c'est le logiciel PAUP

(Swofford, 1998) qui est utilisé pour construire l'arbre final selon la méthode du maximum de vraisemblance. L'arbre obtenu est visualisé en utilisant le logiciel TreeView.

- AFLP

Les analyses AFLP ont été obtenus à partir d'une seule digestion enzymatique, par PstI sur 1 µg d'ADN génomique bactérie. Après ligation, les fragments ainsi obtenus sont amplifiés grâce à une amorce AFLPGT (GACTGCGTACATGCAGGT, PM : 5539,7) spécifique des adaptateurs. La migration des produits PCR est réalisée sur gel d'agarose à 1% TBE à 70 Volts durant 2 heures environ. Les photos des gels prises en salle de révélation sont traitées par le logiciel GelComparII qui permet de normaliser les différents profils AFLP obtenus et de les comparer un à un pour composer les arbres phylogénétiques.

## - Présentation des résultats des recherches

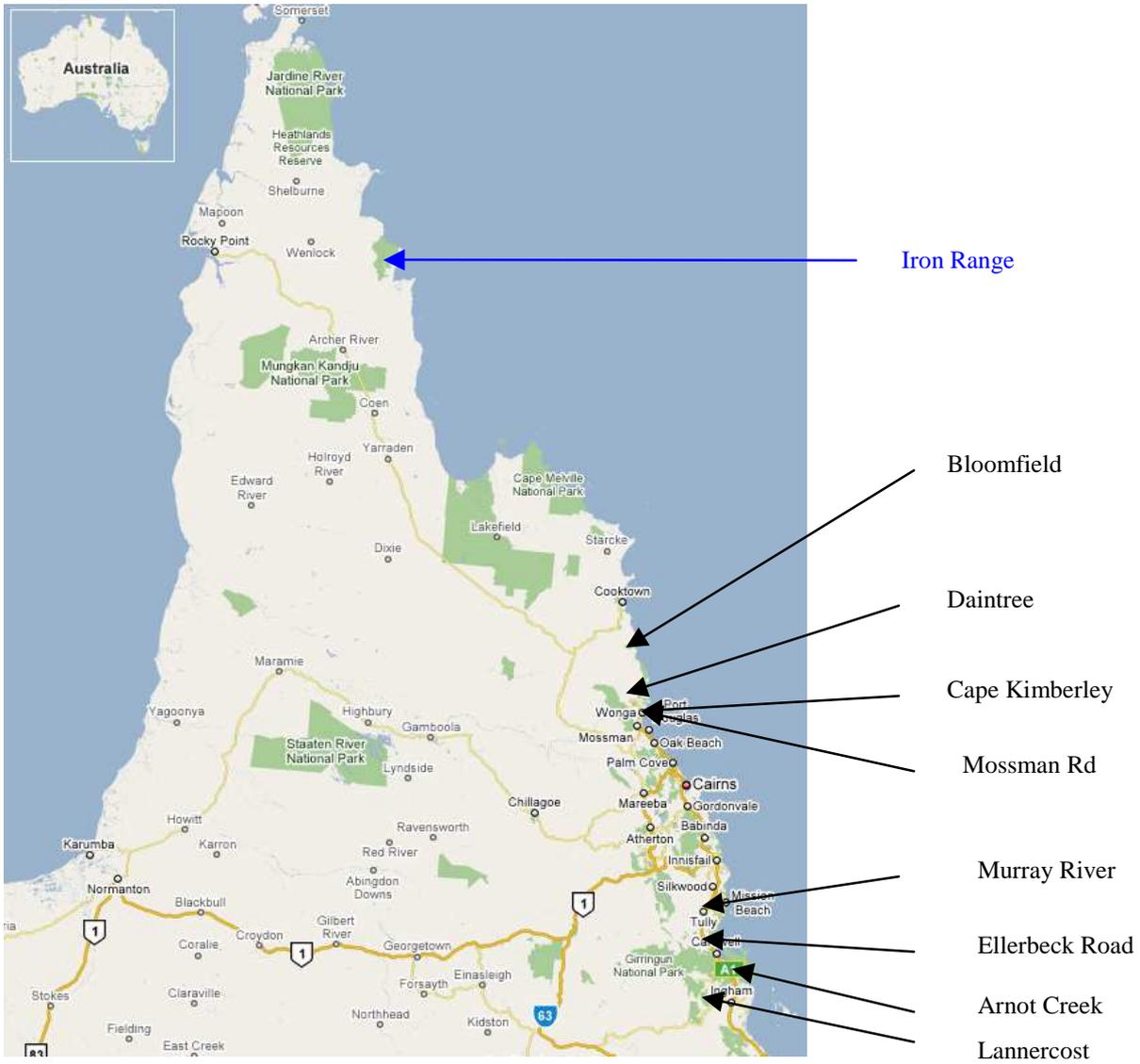
### - Missions - Récoltes de matériel :

(NI : Non Inoculé, I : Inoculé)

### - Brésil



- Australie



- Sabah (Malaisie)



Taliwas : NI

Brumas : NI

Luasong : NI & I

- Sénégal



Richard Toll

Saint Louis

Matériel récolté : (NI : Non Inoculé, I : Inoculé)

Pays	Site	Nb Arbres NI	Nb Isolats NI	Nb Arbres I	Nb Isolats I
Australie	Iron Range	0 (0)	0 (0)	-	-
	Bloomfield	4 (+13)	16 (+26)	-	-
	Daintree	2 (+9)	8 (+10)	-	-
	Kimberley	2 (+4)	8 (+8)	-	-
	Mossman Rd	2 (+4)	7 (+8)	-	-
	Murray River	2 (+3)	8 (+6)	-	-
	Ellerbeck Rd	2 (+6)	8 (+12)	-	-
	Arnot Creek	2 (+4)	8 (+8)	-	-
	Lannercost	8 (+8)	32 (+16)	-	-
	<b>Total Australie</b>	<b>24 (+51)</b>	<b>95 (+94)</b>	-	-
Brésil	Porto Trombetas	10	18	10	19
	Seropedica	10	22	10	45
	Itatinga	11 (+10)	3 (+19)	11 (+10)	2 (+50)
	Angatuba	12	1	-	-
		<b>Total Brésil</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>31</b>
Malaisie	Luasong	7	14	5	10
	Taliwas	6	12	-	-
	Brumas	4	8	-	-
		<b>Total Malaisie</b>	<b>17</b>	<b>34</b>	<b>5</b>
Sénégal	Richard Toll	6	26	6	26
		<b>Total Sénégal</b>	<b>6</b>	<b>26</b>	<b>6</b>

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux rééchantillonnages récents en cours d'analyse dans le cadre de la thèse de MM Perrineau.

- Australie : Les chiffres donnés correspondent aux essais d'isolement après piégeage. Les isolements directs ne sont pas reportés. Les sites Kimberley et Mossman Rd n'avaient pas été échantillonnés en 1986.

- Brésil : Il s'agit d'isolements directs, réalisés par l'EMBRAPA. Les tests de nodulation sont à réaliser. Les sites d'Itatinga et d'Angatuba vont également être rééchantillonnés afin d'augmenter le nombre d'isolats. Le faible taux de réussite de ces 2 sites, par rapport au nombre de nodules traités, ne trouve pas d'explication évidente.

- Malaisie : Isolements directs.

- Sénégal : Isolements directs.

Collections bactériennes : Les souches isolées en 1986 et conservées à -80°C au laboratoire ont été remises en culture sur milieu YM gélosé. Sur les 80 souches originelles issues de 21 arbres sur 7 sites différents, 76 souches se sont avérées viables, avec la même représentation en nombre de sites et d'arbres.

Caractérisations moléculaires :

- Typage *recA* : La phylogénie moléculaire des souches australiennes de 1986 ciblée sur les séquences *recA* est présentée Figures 2 et 3. On voit que, par rapport aux espèces et espèces génomiques définies de *Bradyrhizobium* (séquences de souches-type), toutes les souches australiennes semblent appartenir à ce genre. La diversité infragénérique rencontrée est importante, avec certains clusters originaux pouvant représenter des espèces nouvelles. La Figure 3 montre que cette diversité ne s'organise pas de manière évidente en fonction de l'origine géographique. Il sera particulièrement intéressant d'enrichir cette phylogénie avec les souches rééchantillonnées.

On ne retrouve donc pas dans l'aire d'origine, la diversité décrite chez les souches isolées de différentes zones d'introduction comme la Chine et l'Indonésie où plusieurs auteurs ont isolé les genres *Mesorhizobium* (Clapp *et al* 2001, Wang *et al*, 2006), *Rhizobium* et *Ochrobactrum* (Ngom *et al*, 2004). *Mesorhizobium* et *Rhizobium* ont été cependant retrouvés au Brésil.

- AFLP : Les résultats sont restés limités (une seule enzyme utilisée, Pst1), confirmant la faisabilité de la méthode sur notre matériel. La validation récente du gène *recA* dans les phylogénies de *Bradyrhizobium* nous a fait privilégier ce marqueur, en augmentant plutôt notre échantillonnage.

- Question 1 : Evolution de la diversité des bactéries symbiotiques associées à *Acacia mangium* en zone d'origine

Le séquençage du gène *recA* définit ces bactéries symbiotiques comme appartenant à deux groupes de *Bradyrhizobium* : le premier proche de *B. japonicum* et le deuxième proche de *B. elkanii*. D'après les reconstructions phylogéniques, il ne semble pas y avoir de structuration spatio-temporelle des souches, y compris entre 1986 et 2007.

- Question 2 : Au sein des aires d'introduction et sans inoculation artificielle, à quels partenaires bactériens *A. mangium* s'est-il associé ? Existe-il une structuration des populations en fonction de leurs origines géographiques ?

Les résultats obtenus par séquençage du gène *recA* ont montré que *A. mangium* s'associe principalement avec des bactéries fixatrices d'azote du genre *Bradyrhizobium*. Ce genre bactérien est celui qui est classiquement retrouvé en association avec cet arbre. De plus, sur un site brésilien *A. mangium* est également associé au genre *Mesorhizobium*, déjà retrouvé en Indonésie. Enfin, il ne semble pas y avoir de structuration géographique de la diversité des souches isolées dans différents pays, différents continents.

Question 3 : Dans leurs aires d'introduction et avec inoculation artificielle, comment ont évolué les souches bactériennes introduites ?

Au Brésil, des souches de 2007 ont été isolées à partir des sites inoculés par deux souches brésiliennes sélectionnées. Un de ces trois sites a dû être ré-échantillonné en 2009 faute d'isolats. Dans les deux sites étudiés, on ne retrouve pas les souches inoculum.

En Malaisie, les nodules de cinq arbres inoculés par 2 souches sélectionnées, une australienne et une asiatique, ont été analysés. Seulement trois souches ont pu être actuellement isolées ce qui ne permet pas de tirer de conclusions définitives quant à la persistance de l'inoculum. Des caractérisations complémentaires sont en cours.

Au Sénégal, un site inoculé par une souche australienne a été analysé, dans ce cas-ci l'inoculum n'a également pas pu être détecté.

Ainsi dans les trois cas d'introduction, il ne semble pas y avoir de persistance des souches inoculum remettent en cause l'intérêt de l'inoculation contrôlée.

- Symbioses ectomycorhiziennes :

Les sporophores récoltés ont été caractérisés macroscopiquement, les parts d'herbiers réalisées, et une partie de chaque sporophore ainsi que des apex mycorhiziens conditionnés en tubes Eppendorf. Le tableau ci-dessous présente la liste des sporophores récoltés dans le Nord Queensland.

Ref. N°	Field identification	Site	Host
MD07-306	<i>Panellus ligaturus</i>	Lannercost 1	Soil organic matter
MD07-307	<i>Polyporus badius</i>	Lannercost 1	ind. dead wood
MD07-308	<i>Micropus xanthopus</i>	Lannercost 1	ind. dead wood
MD07-309	<b><i>Cortinarius aff. canaria</i></b>	Lannercost 1	<i>A. mangium</i> + 10 sp.
MD07-310	<b><i>Cortinarius aff. sinapicolor</i></b>	Lannercost 1	<i>A. mangium</i> + 10 sp.
MD07-311	<b><i>Ramaria gracilis</i></b>	Lannercost 1	<i>A. mangium</i> + 10 sp.
MD07-312	<b><i>Clavaria sp.</i></b>	Lannercost 1	<i>A. mangium</i> + 10 sp.
MD07-313	<i>Ryvardenia cretacea</i>	Lannercost 2	ind. dead wood
MD07-314	<b><i>Russula sp.</i></b>	Lannercost 3	<i>A. mangium</i>
MD07-315	<b><i>Laccaria sp.</i></b>	Lannercost 3	<i>A. mangium</i>
MD07-316	<b><i>Lactarius sp.</i></b>	Ellerbeck 1	<i>A. mangium</i> + 1 sp.
MD07-317	<b><i>Lactarius sp.</i></b>	Ellerbeck 1	<i>A. mangium</i> + 1 sp.
MD07-318	<b><i>Phylloporus sp.</i></b>	Ellerbeck 2	<i>A. mangium</i>

MD07-319	Saprophyte ind.	Ellerbeck 2	ind. dead wood
MD07-320	<i>Hygrocybe</i> sp.	Ellerbeck 2	Soil organic matter
MD07-321	<b><i>Dermocybe</i> sp.</b>	Ellerbeck 2	<i>A. mangium</i>
MD07-322	<b><i>Amanitopsis</i> sp.</b>	Murray upper rd	<i>A. mangium</i> + 2 sp.
MD07-323	<i>Pycnioporus sanguineus</i>	Mission bay	ind. dead wood
MD07-324	<i>Hygrocybe miniata</i>	Mission bay	Soil organic matter
MD07-325	<i>Ganoderma applanatum</i>	Mission bay	ind. dead wood
MD07-326	<b><i>Inocybe</i> sp.</b>	Collins ck	<i>Casuarina equisetifolia</i>
MD07-327	<b><i>Russula</i> sp.</b>	Collins ck	<i>Melaleuca leucadendron</i>
MD07-328	<b><i>Amanita</i> sp.</b>	Bloomfield 1	<i>A. mangium</i> + 1 sp.
MD07-329	<i>Phaeocollybia</i> sp.	Bloomfield 2	Soil organic matter
MD07-330	<i>Amauroderma rude</i>	Bloomfield 2	Soil organic matter
MD07-331	<b><i>Amanitopsis</i> sp.</b>	Bloomfield 3	<i>A. mangium</i> + 2 sp.
MD07-332	<i>Phaeocollybia</i> sp.	Bloomfield 3	Soil organic matter
MD07-333	<b><i>Amanita</i> sp.</b>	Daintree CT 1	<i>E. pellita</i>
MD07-334	<b><i>Boletellus emodensis</i></b>	Daintree CT 1	Soil organic matter
MD07-335	<b><i>Hebeloma</i> sp.</b>	Daintree CT 1	<i>E. pellita</i>
MD07-336	<i>Hygrocybe</i> sp.	Daintree CT 2	Soil organic matter
MD07-337	<b><i>Russula</i> sp.</b>	Daintree CT 3	<i>E. pellita</i>
MD07-338	<b><i>Thelephora</i> sp.</b>	Noah beach	<i>Casuarina equisetifolia</i>
MD07-339	<b><i>Amanitopsis</i> sp.</b>		
MD07-340	<i>Cookenia tricholoma</i>		ind. dead wood
MD07-341	<b><i>Russula</i> sp.</b>	Kimberley rd	<i>A. mangium</i> + 1 sp.
MD07-342	<b><i>Russula</i> sp.</b>	Kimberley rd	<i>A. mangium</i> + 1 sp.
MD07-343	<i>Plectania campylospora</i>	Kimberley rd	Soil organic matter
MD07-344	*****	***	****
MD07-345	Saprophyte ind.	Kimberley rd	ind. dead wood
MD07-346	<b><i>Russula</i> sp.</b>	Peterson ck	<i>E. tereticornis</i>

En Australie et dans les zones d'introduction, la recherche de sporophores sous *A. mangium* s'est poursuivie pendant toute la durée du projet. Au Brésil, 6 sporophores ont été récoltés dont 5 sont du genre *Pisolithus* et de l'espèce *microcarpus* (Figure 1), ce qui paraît original, cette espèce étant plutôt de milieu méditerranéen (l'espèce classiquement rencontrée avec *A. mangium* est *P. albus*). En Malaisie, on retrouve des sporophores de *Telephora ramarioides* et *P. albus*. Aucun sporophore n'a été trouvé au Sénégal.

QuickTime™ et un  
décompresseur TIFF (non compressé)  
sont requis pour visionner cette image.

Figure 1 : Sporophore de *Pisolithus microcarpus* sous *Acacia mangium* à Itatinga (Brésil).

#### • Premiers acquis en termes de transfert (méthodes, recommandations)

- Echantillonnage : La récolte de nodule sur le terrain n'est pas toujours évidente sur des arbres relativement âgés en zone de forêts dense (ou de plantations déjà anciennes). Le nombre de nodules récoltés s'est de ce fait trouvé parfois relativement limités ce qui a imposé des rééchantillonnages rendus possibles par des financements complémentaires (appui thésard du CIRAD à MM Perrineau) et l'investissement répété des partenaires locaux.

- Stratégie d'isolement des souches : la caractérisation des souches nodulantes peut se faire selon plusieurs stratégies : directement à partir d'ADN extrait de nodules récoltés sur le terrain, avec tout un choix de marqueurs procaryotiques neutres ou symbiotiques, ou après isolement. L'isolement peut être réalisé directement à partir

des nodules récoltés sur le terrain (« isolement direct ») ou après broyage des nodules terrain et inoculation de germinations de la même plante (« piégeage homologue»). Les souches de rhizobia étant faciles à conserver sur de longues périodes (à -80°C) c'est cette approche isolement qui a été utilisée dans cette étude. Nous avons également, pour l'Australie, cherché à reproduire au maximum le protocole utilisé en 1986, c'est à dire la technique du piégeage homologue. Cette technique plus longue est apparue beaucoup plus efficace que l'isolement direct sur lequel le taux de réussite ne dépassait parfois pas les 10 %.

- Le test de pouvoir nodulant des isolats en tubes fermés et en chambre de culture, développé à grande échelle pour cette étude s'est avéré extrêmement fiable au niveau des risques de contamination (sur plusieurs centaines d'isolats testés, aucun témoin non inoculé n'a nodulé), rapide pour la lecture des résultats, avec aucun entretien (ajout de milieu) sur cette durée de manipulation. Des cas de contaminations ponctuelles de certains témoins se sont par contre produits, malgré les précautions prises, lors d'essais de piégeage en pot et en serre, probablement en liaison avec la présence chez *A. mangium* de nectaires foliaires apparemment très attractifs vis à vis de fourmis et de moucheron divers (difficiles à contrôler en serre), transporteurs potentiels de contaminants. Ces tests de nodulation (homologues ou hétérologues), parfois lourds (en fonction des plantes considérées) et malheureusement pas toujours effectués dans la littérature, sont pourtant essentiels pour remplir le postulat de Koch et valider la notion de souche bactérienne.

- La validation relativement récente du marqueur *recA* chez les *Bradyrhizobium* en particulier nous a amené à ne pas pousser davantage les caractérisations AFLP, plus lourdes à mettre en œuvre et a priori pas plus informatives, sur la séquence de restriction testée.

- Les représentations phylogéniques classiques (cladogrammes et phylogrammes) se sont révélées assez peu adaptées aux questions que nous nous posons, en particulier celle relative à une éventuelle structuration géographique des isolats. Des partenariats sont donc en cours avec des biostatisticiens pour trouver des tests et des représentations statistiques adaptées.

- Enfin, en terme d'application, le suivi moléculaire des souches inoculums est un des résultats frappants de cette étude puisque dans aucun des sites d'introduction étudiés les inoculants ne se sont maintenus parfois même après des périodes très courtes comme au Brésil. Cela ne remet pas forcément en cause la nécessité de l'inoculation celle-ci pouvant avoir joué un rôle déterminant dans le taux de survie des plants lors du transfert de la pépinière au champ.

#### VALORISATION DES TRAVAUX

- Mora Fanchon (2007) Diversité des rhizobiums symbiotiques d'*Acacia mangium* en zone d'origine, évolution et adaptation en zone d'introduction. Rapport de 4<sup>ème</sup> année d'IUP. 34 pp.

- Le Roux Christine (2007) Rapport de mission au Brésil, du 16 mars au 3 avril 2007. 35 pp.

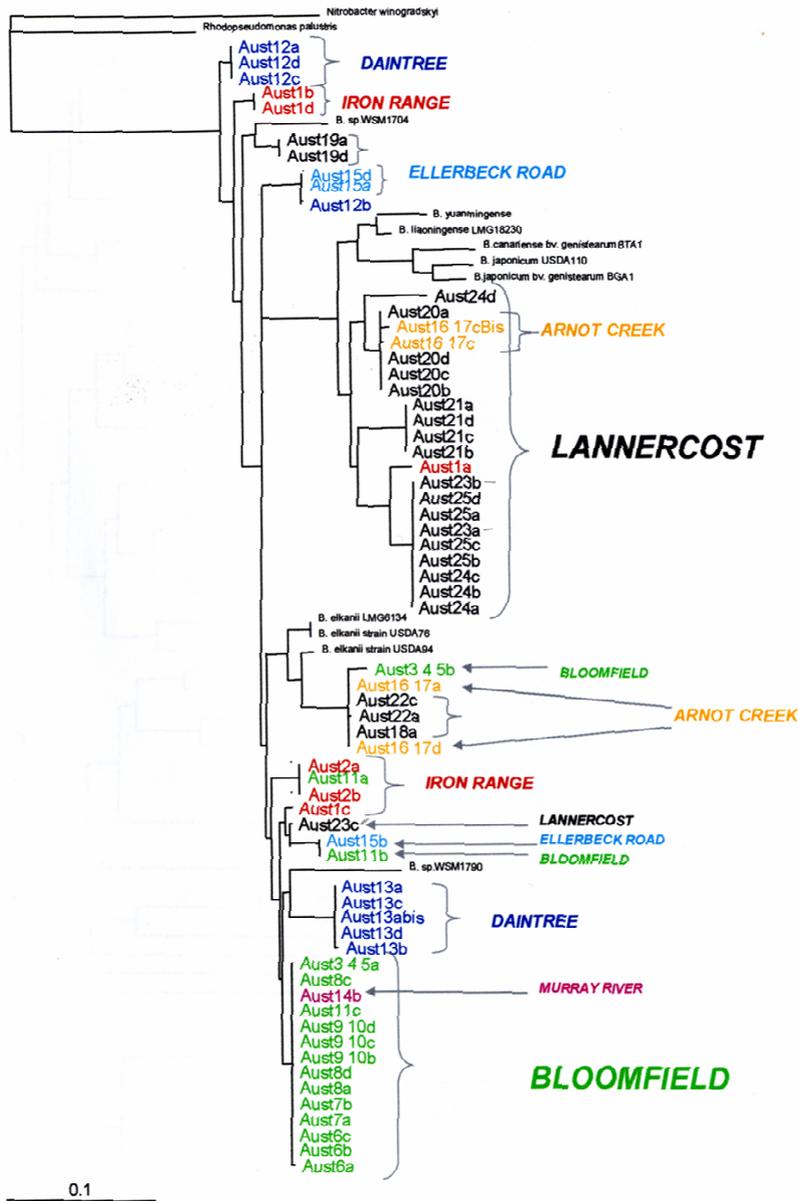
- Prin Yves, Béna Gilles et Ducouso Marc (2007) Rapport d'une mission au Queensland (Australie), du 18 au 28 avril 2007. 12 pp.

- Taschen Elisa (2009) Diversité des bactéries associées à *Acacia mangium* au Brésil. Rapport de stage M1 BGAE Université Montpellier 2.

- Perrineau MM (2009) Rapport de mission en Australie, du 10 au 27 mai 2009.

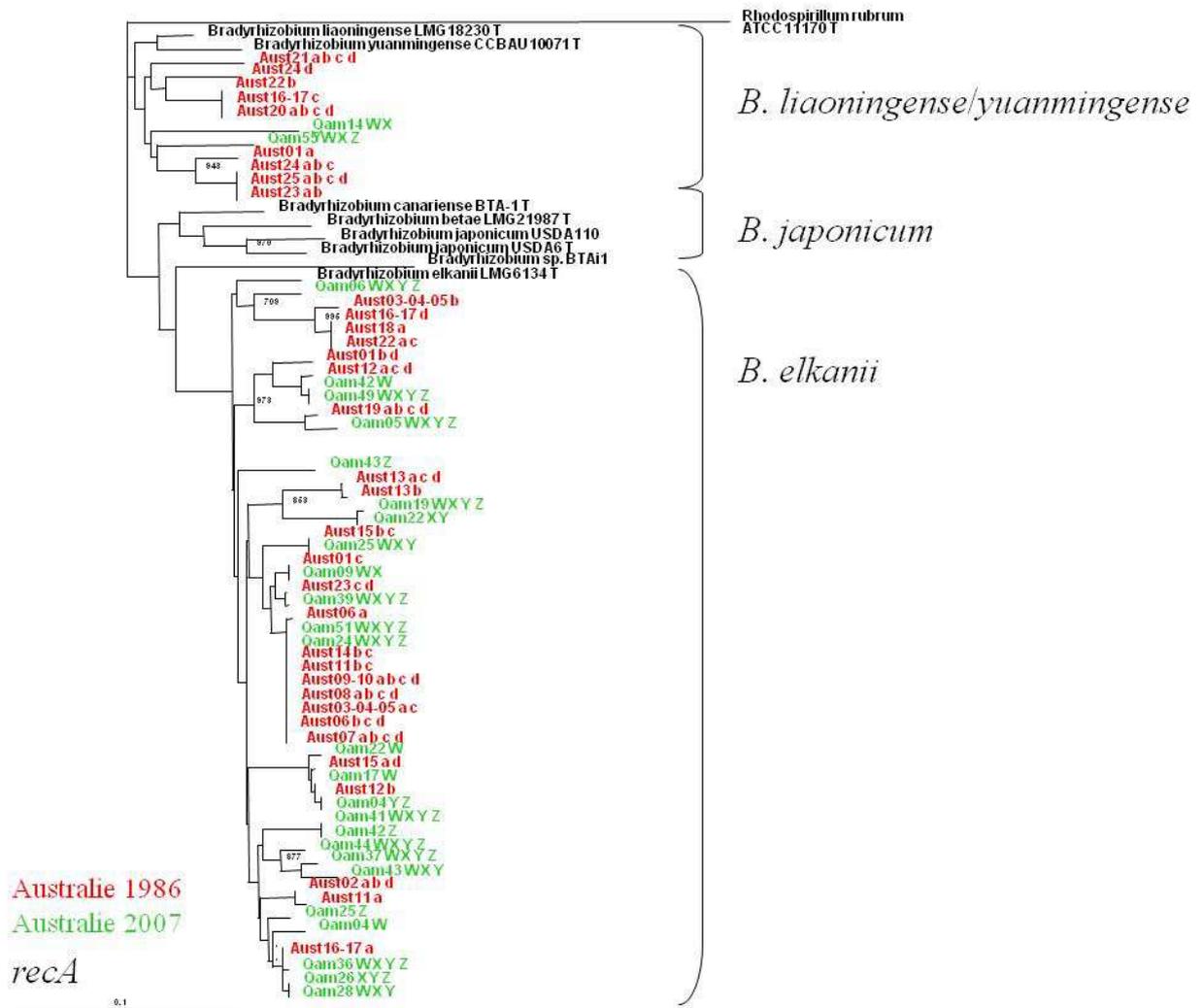
#### Diversité des souches isolées d'Australie entre 1986 et 2007

Les objectifs étaient d'une part d'analyser la diversité génétique des souches s'associant avec *A. mangium* dans sa zone naturelle d'origine, et d'autre part d'estimer si sur 30 ans, il y avait eu des modifications majeures de diversité bactérienne au sein d'une même zone. L'isolement des souches en 1986 ne montre pas de structuration liée à l'origine (figure 2). Les souches des différents sites s'intercalent dans les mêmes clades, suggérant ainsi une dispersion importante entre les différents sites. Les souches se classent toutes dans le genre *Bradyrhizobium*, connu pour être les symbiotes habituel d'*Acacia mangium*. La phylogénie suggère que les souches sont pour une partie apparentée au cluster *B. japonicum/B. liaoningense*, et une autre partie à *B. elkanii*. On note par ailleurs une importante diversité globale, les 76 souches résultant en 23 génotypes différents, alors même que l'approche d'isolement par piégeages a dû minimiser la diversité recouvrée. Des analyses de raréfaction pour relier à la diversité théorique totale sont en cours.



**Figure 2 :** Phylogénie des souches de 1986 basée sur le gène *recA*

La comparaison des diversités obtenues entre 1986 et 2007 est illustrée sur la figure 3.



**Figure 3 :** Diversités échantillonnées en Australie entre 1986 et 2007.

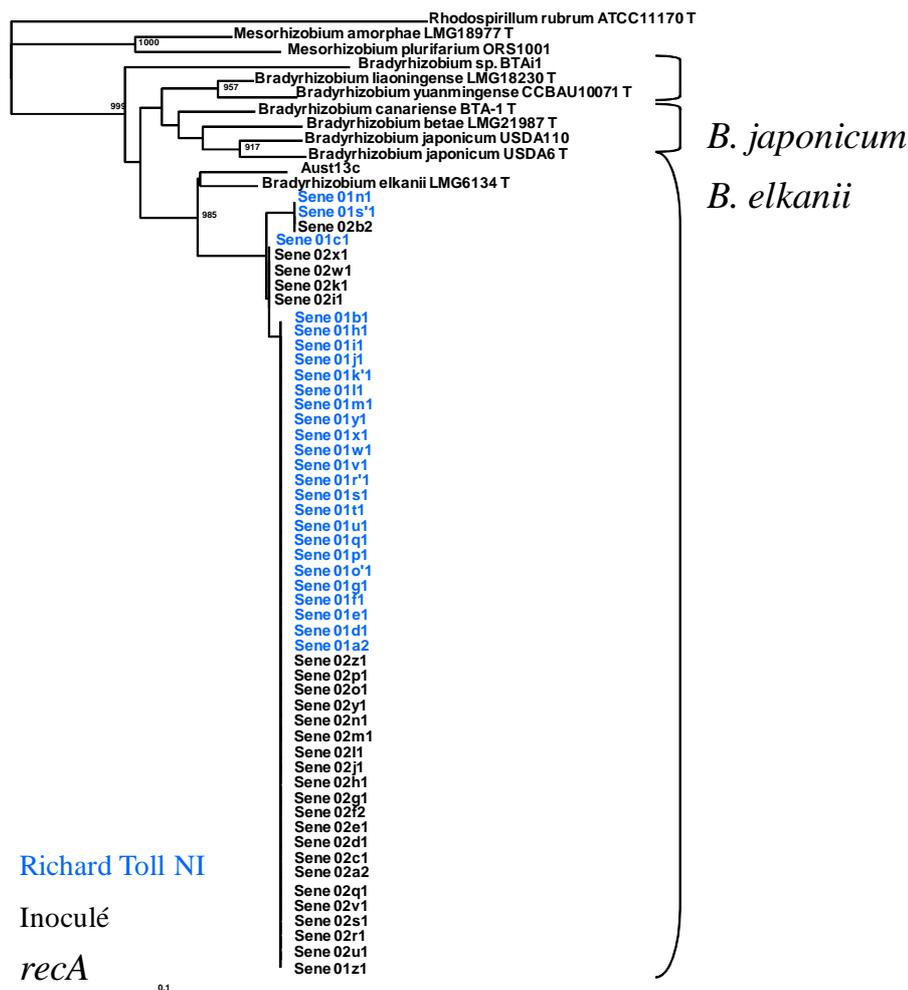
Nous ne mettons en évidence aucune structuration en fonction de l'année d'isolement. Il ne semble donc pas y avoir eu de modification majeure de la diversité sur 30 ans. De plus, on peut noter que plusieurs souches partagent la même séquence *recA* (telles que Aust15b et Qam25W). Il conviendra de nouveau de tester par des approches de rarefaction la diversité obtenue sur 2007. Mais les résultats obtenus tendent à montrer que sur 30 années, et malgré un certain nombre de modifications majeures environnementales (urbanisation, passage d'un cyclone), la diversité des souches s'associant avec *A. mangium* n'a pas profondément été modifiée. Des analyses plus fines en terme de différenciation génétique sont en cours pour appuyer statistiquement cette vision. On ne retrouve donc pas dans l'aire d'origine la diversité isolée de différentes zones d'introduction comme la Chine et l'Indonésie où plusieurs auteurs ont isolé les genres *Mesorhizobium* (Clapp *et al* 2001, Wang *et al*, 2006), *Rhizobium* et *Ochrobactrum* (Ngom *et al*, 2004).

### Diversité en zones d'introduction

Nous voulions déterminer la diversité des bactéries symbiotiques avec lesquelles *A. mangium* pouvait s'associer en étant introduit dans des régions où l'espèce n'est pas naturellement présente. De plus, nous souhaitions suivre le devenir des souches inoculées artificiellement lors de la mise en place des plantations d'*A. mangium*.

Les résultats sont extrêmement variables en fonction des sites.

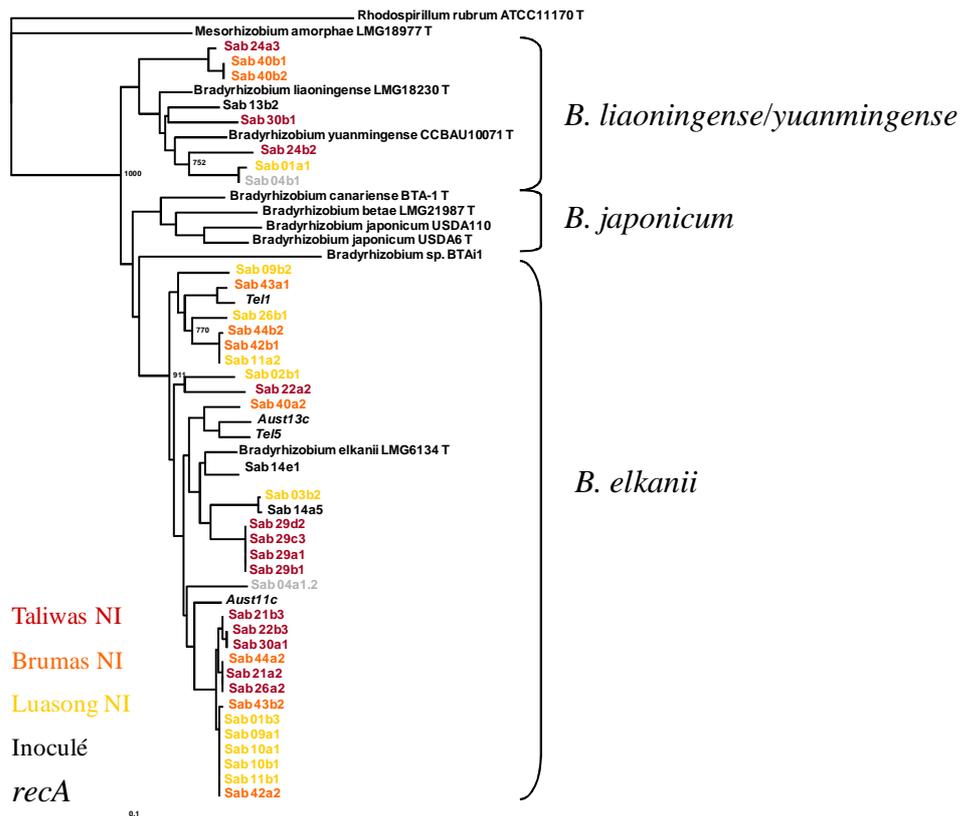
Au Sénégal, cas le plus simple, nous observons une diversité génétique sur le gène *recA* extrêmement faible (figure 4). En effet, nous ne retrouvons que trois génotypes différents, dont un présent à plus de 80%.



**Figure 4 :** Phylogénie *recA* des souches isolées du Sénégal, à partir de parcelles historiquement inoculées et non inoculées lors de l'implantation d'*A. mangium*.

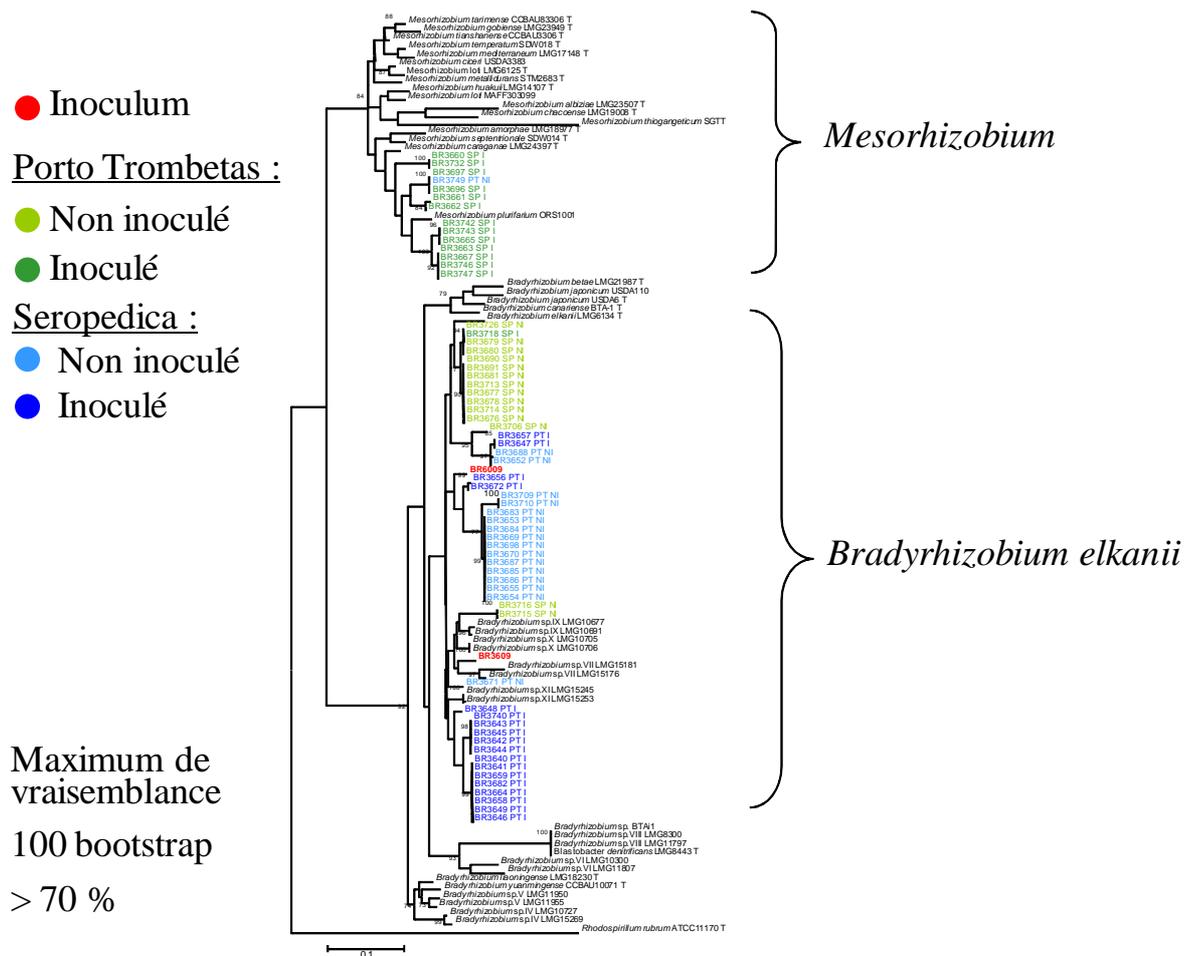
Que cela soit en zones où une inoculation artificielle avait été réalisée (avec la souche australienne Aust13c), ou en zone où les arbres avaient été implantés sans inoculation, nous n'observons pas de différences de diversité entre les deux conditions. Nous ne retrouvons pas les souches inoculées, et il n'existe aucune différence entre sites inoculés et non inoculés.

En **Malaisie** (Figure 5), nous observons une diversité génétique beaucoup plus élevée qu'au Sénégal. Nous ne retrouvons pas la souche initialement inoculée (Aust11c et Aust13c), mais il faut noter que seules trois souches ont été isolées des zones inoculées, du fait d'une absence quasi-totale de nodules accessibles. Les souches isolées sont de nouveaux fortement apparentées aux deux espèces *B. elkanii* et *B. liaoningense*.



**Figure 5** : Phylogénie du gène *recA* des souches isolées de Malaisie.

**Le Brésil** a permis l'échantillonnage d'une diversité taxonomique différente puisque des souches de *Mesorhizobium* y ont été isolées (figure 6). Nous retrouvons donc ici un résultat d'étude précédentes suggérant que *A. mangium* pouvait s'associer avec d'autre genre que *Bradyrhizobium*. Il convient cependant de noter que ces souches, nodulantes, se sont révélées être non fixatrices, limitant ainsi la notion de diversité symbiotique. Nous retrouvons par ailleurs une diversité relativement faible entre les souches de *Bradyrhizobium*, avec certes 15 génotypes différents pour 49 souches de *Bradyrhizobium* séquencées, mais cette diversité se réduisant au final à 4 grands clades. La diversité se structure par ailleurs dans ce cas en fonction non seulement des sites d'étude, mais aussi des traitements (inoculé vs non inoculé) appliqués.



**Figure 6 :** Phylogénie *recA* des souches isolées des sites d'étude du Brésil

Comme dans les cas précédents, nous ne retrouvons pas la souche initialement inoculée. Afin d'affiner ce résultat, et vérifier qu'il ne résultait pas de phénomène de recombinaison chromosomique, nous avons également séquencé les gènes de ménage *dnaK* et *glnB* chez ces souches. Nous confirmons dans les deux cas la distinction d'une part entre les différents clades en fonction des conditions expérimentales et le site d'échantillonnage, mais aussi le fait que les deux souches initialement inoculées ne sont pas ré-isolées.

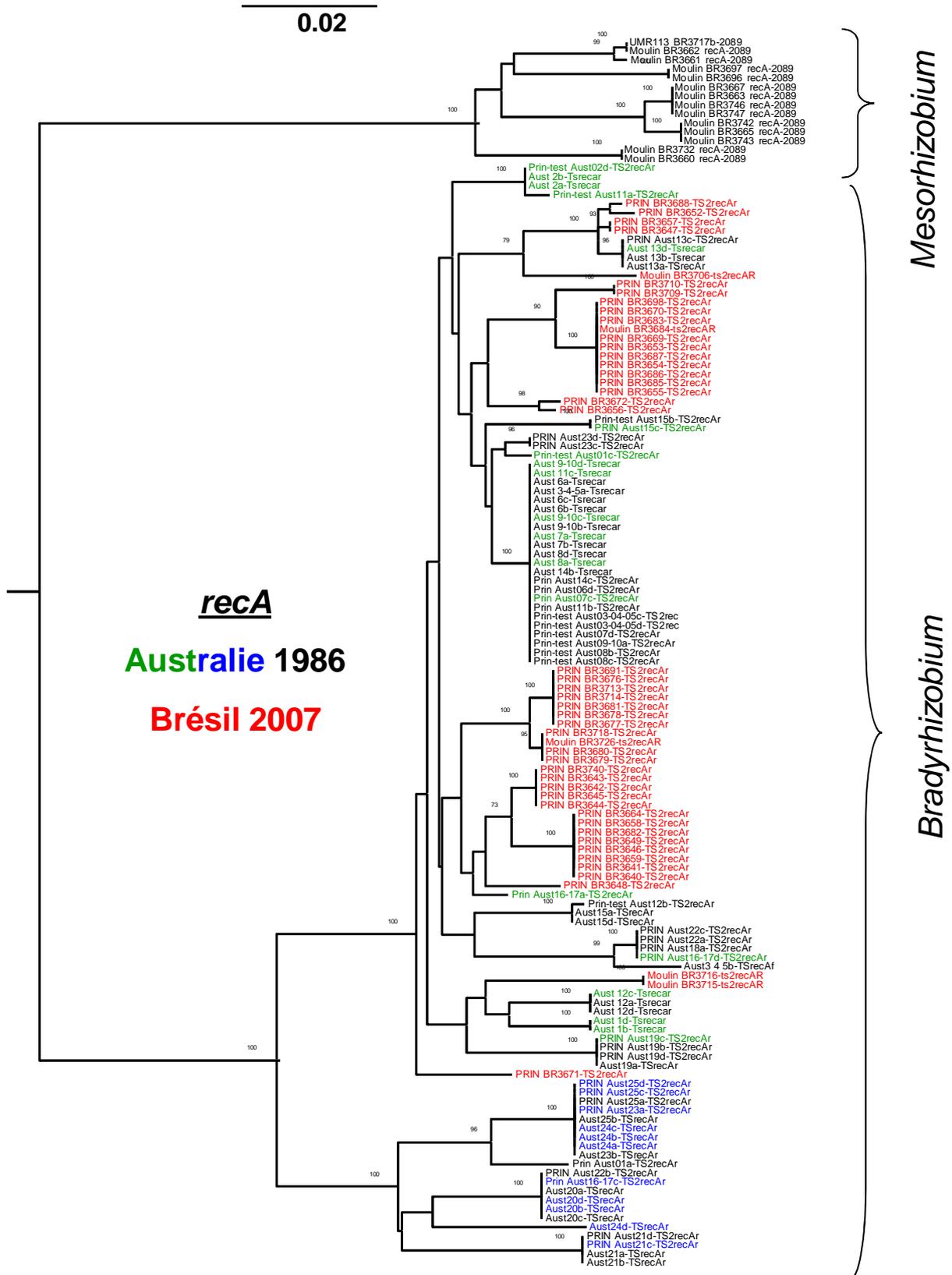
De ces résultats, plusieurs tendances sont à relever :

- *A. mangium* est effectivement une espèce qui arrive à s'associer avec des souches bactériennes locales. Les tests d'efficacité sont en cours, et il est possible que les souches d'origine (Australienne) soient effectivement plus efficaces. Mais *A. mangium* confirme ici sa capacité à « trouver » des partenaires symbiotiques alternatifs en dehors de son aire de répartition naturelle, même si ces associations symbiotiques peuvent être non efficaces, comme dans les cas des souches de *Mesorhizobium* isolées du Brésil.
- La diversité locale apparaît très variable. Si elle n'atteint jamais le niveau observé dans la zone d'origine, où le nombre de génotype symbiotique apparaît très élevé, la diversité recouvrée en zone d'introduction peut être très faible, comme dans le cas du Sénégal, à relativement importante, comme dans le cas de la Malaisie. La diversité génétique des plants utilisés en plantation industrielle étant à base très étroite, il faut sans doute mettre ces variations en rapport avec des paramètres pédoclimatiques contrastés.
- L'inoculation artificielle, telle qu'elle a été pratiquée dans les trois pays d'introduction, donne des résultats contrastés. Dans les trois cas, la souche introduite ne perdure pas, même très peu de temps après (6 mois dans le cas du Brésil). Il semble donc que si l'inoculation a un effet, cela doit être limité à un effet

en pépinière, les souches locales prenant rapidement et entièrement « le dessus » en conditions de plantations.

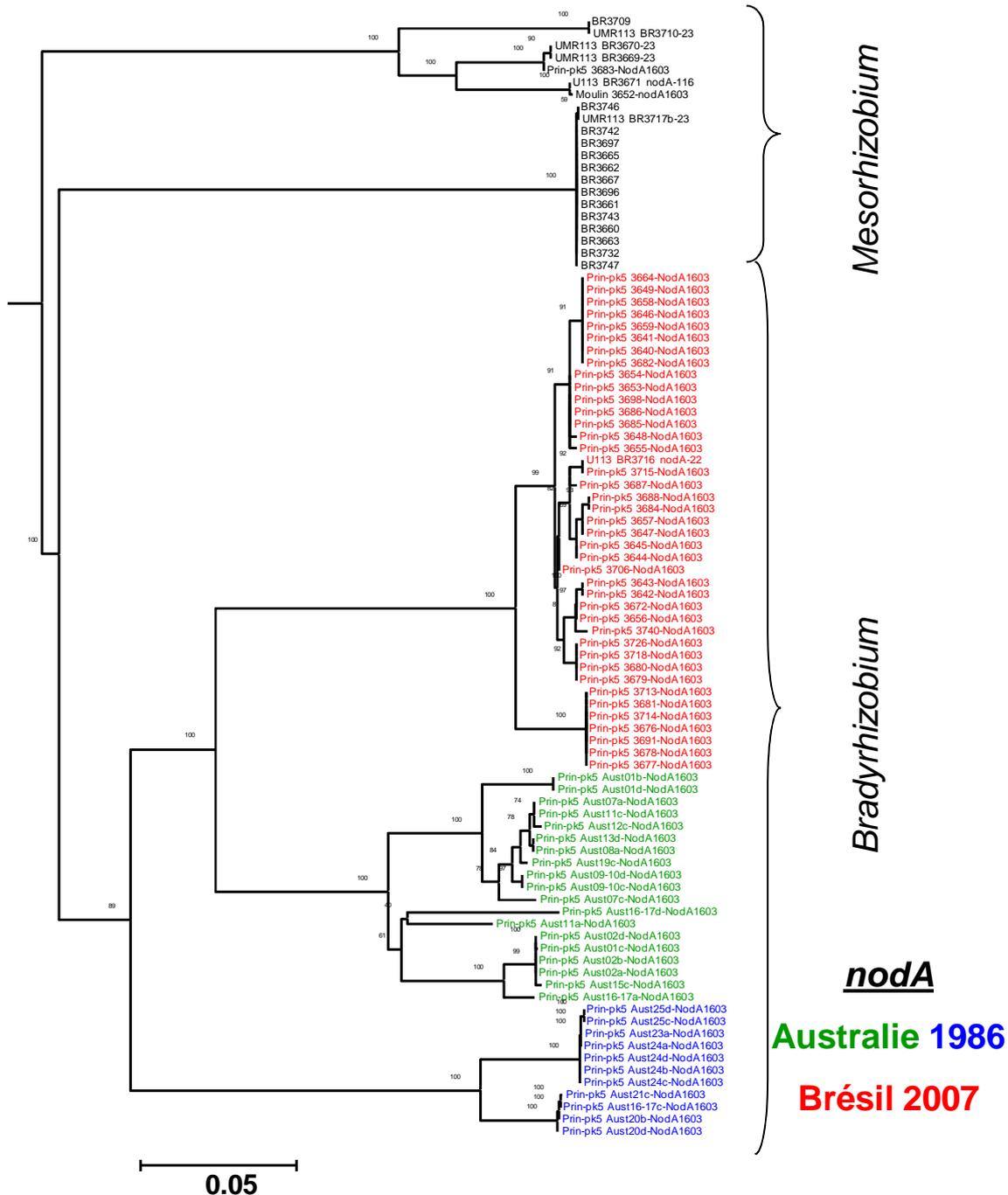
- Le cas du Brésil révèle un résultat surprenant, dans la mesure où l'inoculation semble avoir influencé la diversité des souches piégées par la plante. En effet, alors que les sites sont adjacents, donc a priori sous des mêmes contraintes et paramètres pédoclimatiques, les deux sites de Porto Trombetas et Seropedica présentent chacun des diversités radicalement différentes selon qu'il y a eu inoculation préalable ou pas (figure 6). Nous n'avons pas aujourd'hui d'explication pour comprendre ce résultat, notamment l'association préférentielle avec des souches de *Mesorhizobium*. Un effet indirect via des transferts de gènes de nodulation pourrait expliquer ce résultat, mais la phylogénie des gènes *nodA* ne soutient pas cette hypothèse. En effet, la figure 7 montre la phylogénie *nodA* obtenue pour les souches brésiliennes. Les souches de *Mesorhizobium* ne montrent aucune proximité génétique sur la base du gène symbiotique. On doit donc exclure une hypothèse d'adaptation des souches locales après acquisition des gènes symbiotiques de la souche inoculée. De même, aucune des souches se distinguant sur les gènes de ménage ne présente la même séquence *nodA* que l'une des deux souches introduites. IL ne semble donc pas y avoir eu de recombinaison locale entre les souches introduites et les souches natives.
- On peut ainsi se poser la question de l'absence apparente de compétitivité des souches inoculées. Dans aucun des trois cas, ces souches n'ont été ré-isolées. Deux hypothèses peuvent être avancées : Les souches sont très rapidement contre sélectionnées par le milieu auquel elles ne sont pas adaptées. Cela doit avoir joué pour les souches originaires d'Australie et inoculées en Malaisie et au Sénégal. Par contre, il faut noter que les deux souches inoculées au Brésil étaient originaire du Brésil, même si l'immensité du pays et des climats font qu'elles ont sans doute également subi une contre sélection. La faible compétitivité des souches en terme de nodulation semble moins probable, notamment vis-à-vis de souches locales qui n'avaient jamais été en contact avec des plants d'*A. mangium*, sauf à considérer une compétitivité fortuite (mais récurrente). Des tests de compétition devraient en partie nous aider à résoudre cette question.





**Figure 8 :** Phylogénie *recA* des souches Brésil et Australie 1986.

Inversement, la phylogénie, basée sur le gène symbiotique *nodA*, montre des liens évolutifs radicalement différents (figure 9).



**Figure 9 :** Phylogénie *nodA* des souches Brésil et Australie 1986.

On peut ainsi constater que l'ensemble des souches de *Bradyrhizobium* brésiliennes se positionnent dans un unique clade, strictement différents des deux clades observés pour les souches Australiennes. Ce résultat est à mettre en relation avec l'absence de lien direct entre les souches utilisées dans l'inoculation des plants brésiliens, et les souches isolées, pour ce qui concerne le gène *nodA*. Il apparaît donc que sur un pas de temps court, nous ne mettons en évidence aucun transfert de gènes ou de clusters symbiotiques. Inversement, sur le long terme, nos résultats montrent une homogénéisation des souches quant au fond génomique symbiotique. Savoir si cette homogénéisation résulte de phénomène de transfert suivi d'une sélection purificatrice, ou si c'est le résultat de transferts suivis d'une dérive génomique reste à éclaircir.

L'ensemble de ces résultats demandent à être approfondis. Ils apportent cependant une première image radicalement différente à nos attendus, en terme de diversité, d'adaptation des souches introduites et de réponse de la plante à un nouvel environnement symbiotique. La récupération de données se poursuit (notamment en typage symbiotiques des souches Sénégal, Malaisie, et Australie 2007 et 2008), ainsi que les tests d'efficience des souches.

## Annexe : copie des publications

*Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).*

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PARUES**

*Merci de joindre des copies des publications, et d'indiquer les restrictions éventuelles en termes de droits de reproduction (notamment sur le site Internet du Meeddm ou d'Ecofor)..*

- Le Roux C., Tentcheva D., Prin Y., Moo H., Japarudin Y., Perrineau M.M., Duponnois R., Domergue O., de Lajudie & Galiana A. (2009). Bradyrhizobia nodulating the *Acacia mangium* x *A. auriculiformis* interspecific hybrid are specific and differ from those associated to both parental species. Appl. Environ. Microbiol. 74: 1485-1493 doi:10.1128/AEM.01887-09 (publication sous copyright, non reproductible)

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES A PARAITRE**

#### **- Ms pour soumission à Mycorrhiza :**

Title: **Ectomycorrhizal symbioses of the nitrogen-fixing tree legume *Acacia mangium* Willd.**

Authors: MM Perrineau<sup>1</sup>, M. Ducouso<sup>1\*</sup>, J. Weber<sup>1,2</sup>, A. Galiana, P. Reddell<sup>3</sup>, R. Duponnois<sup>1</sup>, S.K. Lee<sup>2</sup>, A.M. Bâ<sup>4</sup>, Y. Prin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR 1063 Agro-M / CIRAD / INRA / IRD, TA 10/J, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>2</sup> Nanyang Technology University / National Institute of Education, Natural Science Division, Biology Section, 1 Nanyang Walk, Singapore 637616

<sup>3</sup> EcoBiotics, PO Box 148, Yungaburra, Queensland, 4884, Australia.

<sup>4</sup> Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, Faculté des Sciences Exactes et Naturelles, Université Antilles Guyane, BP. 592, 97159 Pointe à Pitre, Guadeloupe.

\* Corresponding author: [marc.ducouso@cirad.fr](mailto:marc.ducouso@cirad.fr)

#### **Abstract**

The ectomycorrhizal associations of *Acacia mangium* have been explored in several introduction zones and under laboratory controlled conditions. We collected several putative ectomycorrhizal fungi and some ectomycorrhizas from under monospecific *A. mangium* plantations. Controlled syntheses have been experimented between this host plant and several ectomycorrhizal genera, in laboratory and greenhouse conditions to complete the characterisation of the ectomycorrhizal status of *A. mangium*. These studies allow to confirm the symbiotic association of *A. mangium* with the following ectomycorrhizal genera: *Paxillus*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Thelephora*, *Tylopilus* and *Xerocomus*. The complete symbiosis is histologically characterised by a Hartig net and a fungal sheath covering the root apex. However, differences in the intensity of infection depending on the fungal partner have been clearly evidence. That way ectomycorrhizas with a fungal sheath but without any Hartig net have been observed. Some of the fungal genera such as *Amanita*, *Elaphomyces* and *Laccaria* failed to form ectomycorrhizas. This feature is interpreted as a non-sufficient infrageneric diversity of the tested strains.

**Key words:** Ectomycorrhizas, *Acacia mangium*, *In vitro* symbiosis, Mycorrhizal status

#### **Introduction**

The pan-tropical genus *Acacia*, member of the Mimosaceae, comprises more than 1,200 species of which about 800 are native from Australia. From its native area (Australia, Papua New Guinea and Irian Jaya), the phyllodinous tree *A. mangium* has been extensively used in industrial plantations for the production of pulpwood and for the rehabilitation of degraded soils in a range of inter-tropical countries, mainly in Asia, Brasil and Africa (Pinyopusarek et al. 1993; De la Cruz and Garcia 1991). It is symbiotically associated with *Bradyrhizobium* spp. (Nuswantara et al. 1997) and arbuscular mycorrhizal fungi (Reddell and Warren 1987; De la Cruz and Yantasath 1993; Bâ et al. 1996). If in the past ten years, a number a works have dealt with rhizobia characterization and inoculation (e.g.: Umali-Garcia et al. 1988; Galiana et al. 1990, 1994, 1998; Nuswantara et al. 1997; Clapp et al. 2001), very few studies are available on the characterisation of ectomycorrhizas and on the ectomycorrhizal fungi associated with *A. mangium*. From these studies (Chong 1986; Duponnois and Bâ 1999; Martin-Laurent et al. 2001) it appears that *A. mangium* would be associated with *Pisolithus* spp. (probably two species) and *Thelephora ramarioides* D.A. Reid. *Pisolithus* sp. is infective and effective on *A. mangium* in nursery conditions (Duponnois and Bâ 1999) and *T. ramarioides*, a black coral fungus, is often found in *A.*

*mangium* stands in Asia, but without clear effect on plant growth, being even considered as a weak parasite (Lee 1990). The economic importance of *A. mangium*, particularly throughout extensive plantations in Asia and the potential benefits of ectomycorrhizal inoculation on planting productivity (Brundrett et al. 1996) lead us to investigate: 1- The putative ectomycorrhizal fungi fruiting spontaneously under *A. mangium* in five selected introduction zones, 2- The ability of several fungal cultures to form ectomycorrhizas with *A. mangium* in experimental conditions and 3- The characterisation of field collected and experimentally obtained ectomycorrhizas.

## Materials and methods

### Ectomycorrhizas and ectomycorrhizal fungi fruiting beneath *A. mangium* in introduction areas

Prospecting was conducted for over ten years in planted stands of *A. mangium* in Congo, Madagascar, Malaysia (Sabah and Sarawak), Senegal and Singapore. The ectomycorrhizal status was established on the naturally fruiting sporophores and on ectomycorrhizal roots examination. Sporophores and ectomycorrhizas were *in situ* photographed and dried in "Silicagel" for laboratory examination. Only ectomycorrhizas whose connections with *A. mangium* were undoubted: clear evidence of a physical link between the ectomycorrhizal root apex and a perfectly identified *A. mangium* tree, were taken into account.

### Plant infection tests

#### *Plant material*

The different seedlots of *A. mangium* have been obtained from the Australian Tree Seed Centre (CSIRO), Kingston, Australia (Table 1). Seeds were germinated after soaking for two minutes in boiling water and surface-sterilised five minutes in 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v). After washing in sterile water, the seeds were placed for germination, into 90 mm Petri dishes on Nutrient Agar (Difco, France) to reveal eventual contaminants.

#### *Fungal material*

The fungal strains used in this study were from: 1- CSIRO Land and Water Division, Townsville, 2- LSTM, Montpellier, France and 3- Soil Microbiology Laboratory, IRD, Dakar, Senegal (Table 2). These cultures were maintained by quarterly sub-cultured at 26°C in 90 mm Petri dishes on MNM medium (Marx, 1969).

#### *Rhizobial material*

*Bradyrhizobium* sp. strain AUST13c isolated from nodules of *A. mangium* collected in its native area, North Queensland, Australia (Galiana et al. 1990) and *Bradyrhizobium* sp. strain RMBY isolated from *A. mangium* nodules harvested in Senegal was both sub-cultured on Yeast Mannitol Broth (Vincent 1970).

### Ectomycorrhizal syntheses

\* *Axenic Petri dishes technique for the study of ectomycorrhizal colonisation of different seedlots with *Pisolithus* spp. isolates*

Sterilised seeds were placed for germination, into 150 mm Petri dishes on Shemanakova medium (Chilvers et al. 1986) covered with a sterile cellophane disk that has been previously boiled for 30 min in a 0.37 g.L<sup>-1</sup> EDTA solution, and rinsed twice in water and autoclaved. The dishes were sowed at a rate of four seeds per plate, sealed with electric insulating tape and incubated one week at 26°C. One week after germination the seedlings were inoculated with a plug of *Pisolithus* culture placed at three to five mm from the tap root. The seedlings were arranged so that the roots were facing the growing edge of the fungal colony and the plates were sealed with Parafilm®. Plates were disposed at an inclination of approximately 70° from horizontal and incubated for two months. All inoculation combinations with seven *A. mangium* provenances and six *Pisolithus* strains (S2A, R, COI001, COI007, Antonio Dubréka, MG86) have been tested with three replicates for each combination. Roots were hand-sectioned and observed under differential interference contrast microscope.

\* *Axenic test tube technique for the study of ectomycorrhizal colonisation with a range of ectomycorrhizal fungus genera and for the study of the influence of culture media on *Pisolithus* sp. strain PR264 infectivity*

Glass tubes syntheses were conducted in 250X25 mm tubes containing one 30X120 mm paper strip cut from the paper sheet of a Seed Germination Pouch (Mega International, Minneapolis, USA), (Vergnaud et al. 1985). The paper strip is applied to the tube wall and dips in 20 ml of MNM liquid media. After capping, the tubes were autoclaved at 120°C for 20 min. Sterile *A. mangium* seedlings were transferred to sterile glass tubes and inoculated with a ten mm side square piece of fungal colony grown on MNM. Six replicates were made for each strain and six for the non-inoculated control. The ten fungal genera tested were *Amanita* sp. strain E4090, *Boletellus* sp. strain E4249, *Elaphomyces* sp. strain H4029, *Gen nov* strain H4027, *Hysterangium* sp. strain H4134, *Labyrinthomyces* sp. strain Taraval, *Laccaria* sp. strain E4124, *Pisolithus* sp. strain H4003, *Scleroderma* sp. strain Scl4Paluma and *Tylopilus* sp. strain E4240. After 27 and 56 days, the roots systems and the fungal plug

in each tube were examined under a stereomicroscope. The formation of ectomycorrhizas was reported. The influence of culture media on *Pisolithus* sp. strain PR264 infectivity was also tested. In that purpose, sterile *A. mangium* seedlings were transferred into sterile glass tubes and inoculated with a ten mm square piece of *Pisolithus* sp. PR264 colony. Eight replicates were made for each strain and the non-inoculated MNM control. The five following treatments were tested: 1- complete MNM; 2- complete MNM with the plant root system kept in the dark by wrapping the tube in a paper foil; 3- MNM without glucose; 4- complete MNM for fourteen days then MNM without glucose; 5- complete MNM for fourteen days then complete (with nitrogen) BD plant medium (Broughton and Dilworth 1971). After 23 and 29 days number of ectomycorrhizas formed per tube was examined.

*\* Compatibility of ectomycorrhizas and nodule formation in vitro*

Co-inoculation experiments were conducted in the glass tubes/paper strip systems previously described with eight replicates. Three days after seed sterilization according to the above procedure, seedlings were transferred to sterile glass tubes papers dipping in liquid MNM and inoculated with a ten mm side square piece of *Pisolithus albus* strain ORS8143. Six days later, the liquid MNM was replaced by liquid nitrogen-free BD medium and inoculated with 1ml of one week-old *Bradyrhizobium* sp. strain AUST13c. Fifty-three days after inoculation, the plants were examined for ectomycorrhizas and nodule formation.

**\* STUDY OF THE ABILITY OF *A. MANGIUM* TO FORM ECTOMYCORRHIZAS WITH 24 FUNGAL STRAINS**

To test the ectomycorrhizal ability of 24 ectomycorrhizal fungal strains, sterile seedlings of *A. mangium* were transferred to one l polyethylene bags containing a sterilized mixture of sand, polystyrene beads and vermiculite (2v/v/v). This substrate was daily watered to the water capacity with tap water. Two days after transfer, the seedlings were inoculated with *Bradyrhizobium* strain RMBY (Galiana et al. 1990), at a rate of  $3.10^9$  bacteria per bag. Six weeks after transfer, the saplings were inoculated with 50 ml of an ectomycorrhizal inoculum prepared according to Molina (1979). For each strain, five replicates were made. The root systems and the colour of the fungal mantle were examined six months after inoculation. On transversal hand sections, diameter of ectomycorrhizas, thickness of the mantle and Hartig-net depth were measured.

*Histological observations*

*Light microscopy*

Microscopic examination of ectomycorrhizas was also made after clearing and staining according to Phillips and Hayman (1970). When necessary, ectomycorrhizas were Vibratome (Leica, Marseille, France) sectioned for examination under the microscope after staining with Congo red, using an Olympus Provis photomicroscope.

*Electron microscopy*

Entire root system was fixed in 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M phosphate buffer for 2 h before rinsing in the same buffer and dehydration. The samples were critical point dried in a Balzer apparatus and observed with a Philips Scanning Electron Microscope.

For transmission electron microscopy, samples were postfixed in 1% osmium tetroxyde, embedded in Spurr's resin and sectioned using a Reichert ultramicrotome. Observations were made using a Jeol 1200EX electron microscope.

**RESULTS**

*Ectomycorrhizas and ectomycorrhizal fungi fruiting beneath *A. mangium* in plantings*

The results are summarised in Table 3. Ectomycorrhizas are generally more abundant at the soil-litter interface. In Malaysia and Singapour *T. ramarioides* fruitbodies are very abundantly and regularly found all along the year, mostly under young trees (Fig 1A), particularly when the canopy remained opened. Ectomycorrhizas of *T. ramarioides* exhibit a dark brown colour with a whitish apex, the youngest being totally whitish (Fig 1B). Cross sections through these young ectomycorrhizas reveal both a mantle and a slight Hartig net, with a clumped mycelium, characteristic of Basidiomycetes (Fig 2A). In Madagascar *Xerocomus* sp. fruited abundantly during the rainy season (Fig 1C). The *Xerocomus* sp. associated to *A. mangium* in Madagascar formed numerous brown yellow straight ectomycorrhizas. Another spontaneous ectomycorrhizal associate, which was observed in *A. mangium* plantatings was the genus *Scleroderma* in a monospecific stand at Loandjili (Congo). No sporophore was found in this plantation, but numerous white and typically sinuous ectomycorrhizas (Fig 1D) with a characteristic "sclerodermic" smell. These ectomycorrhizas had a thick mantle and a clear Hartig net (Fig 2B). *Pisolithus albus* sporophores were found in a monospecific stand in Southern Senegal (Casamance). Yellow gold ectomycorrhizas were abundantly observed in this stand. From this sporophore was isolated by Ducouso and Duponnois (Duponnois and Bâ 1999) the strain COI007.

### *In vitro* syntheses

#### *Infectivity of ten different ectomycorrhizal fungi on A. mangium:*

Twenty-eight days after inoculation, only three genera were able to establish ectomycorrhizas-like structure with *A. mangium* (Table 4), the most infective being *Pisolithus* sp. (strain H4003), although most of these genera originated from Australia. *Pisolithus* sp. ectomycorrhizas display a characteristic yellow-gold mantle, and numerous gold rhizomorphs (Fig 3A). Infectivity of the *Scleroderma* sp. strain Scl4 Paluma was confirmed in a second *in vitro* experiment (Fig 3B). Transversal hand sections through the ectomycorrhizal roots allowed confirming the occurrence of a fungal mantle, but without any clear Hartig net.

#### *Response of different seedlots to Pisolithus spp. inoculation*

Results of ectomycorrhizal infection two months after inoculation of seven *A. mangium* provenances with six *Pisolithus* spp. strains are presented Table 5. *Pisolithus* strain S2A was the most aggressive and surrounded the secondary roots of *A. mangium* forming a felt root mantle. The morphology of the infected root system did not show a clear heterorhizy among the plants inoculated with different strains of *Pisolithus*. However, for strain S2A, the mantle surrounded mostly short lateral roots without any branching. The difference of seed provenance of *A. mangium* did not interfere with fungal development and aggressiveness. On transversal sections of infected roots no Hartig net has been observed. In some cases, with strain S2A, the fungus invaded the decaying external epidermal cell layer.

#### *Influence of culture media on Pisolithus sp. strain PR264 infectivity*

This experiment do not evidence any difference between plants cultivated on MNM and plant left for only fourteen days on MNM medium then fifteen days on BD medium in terms of number of ectomycorrhizas per plant (Table 6). Wrapping the tubes with a paper foil to protect the root system from light neither has any effect on ectomycorrhizas formation. The suppression of glucose in the MNM do has a drastic effect on ectomycorrhizas formation, even after a pre-growth phase of fourteen days on complete MNM. The aspect of ectomycorrhizas within the test tube and the abundance of golden rhizomorphs are illustrated Fig 3C. Scanning electron observations allow to evidence the clumped mycelium colonizing the root surface (Fig 2C) while transmission electron microscope reveal a densely packed mycelium with active electron-dense hyphal cytoplasm (Fig 2D).

#### *In vitro compatibility between nodule and ectomycorrhizas formation*

Fifty-three days after inoculation, six off the eight plants formed nodules and ectomycorrhizas, one plant having only nodules and another only ectomycorrhizas. Five plants had the double symbioses *i.e.* nitrogen-fixing nodules and yellow-gold ectomycorrhizas (Fig 3D and E).

### *Greenhouse syntheses*

Off the eight fungal genera tested (Table 7) only two enabled the formation of ectomycorrhizas in greenhouse conditions, *Pisolithus* spp. and *Paxillus involutus*. The two species of *Scleroderma* tested, namely *S. cepa* and *S. dictyosporum*, failed to associate with *A. mangium*, although was obtained *in vitro* ectomycorrhizas with this genus (*Scleroderma* sp. strain Scl4 Paluma) in *in vitro* conditions. Among *Pisolithus* spp., *P. arhizus* did not formed ectomycorrhizas while among the seven *P. albus* strains tested six enabled the formation of ectomycorrhizas. It is noticeable that when ectomycorrhizas formation was observed, the infections were complete with mantles and Hartig nets. Ectomycorrhizas diameters range from 320 to 420  $\mu\text{m}$  and the weakest infection observed was with *Paxillus involutus* with Hartig nets not deeper than eight  $\mu\text{m}$ .

## **Discussion**

Our observations concerning *A. mangium* mycorrhizal status confirm the findings of Reddell and Warren (1987) for arbuscular mycorrhizas and of Sim (1987) for ectomycorrhizas; in field conditions, *A. mangium* is able to form arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas.

Like Duponnois and Bâ (1999), we observed that *A. mangium* ectomycorrhizas do not always present a characteristic Hartig net. Intercellular penetration of hyphae is often visible, but with much less intensity than those observed with other tropical ectomycorrhizal plant genera such as *Eucalyptus*, *Azelia*, *Uapaca* or Dipterocarps. According to Warcup (1980) "there seems no logical reason why the term (ectomycorrhizas) should only be used in the restricted sense, *i.e.* that an ectomycorrhizas should have a Hartig net and a well-developed fungal sheath that encloses the apex of the root". The identification of atypical associations as ectomycorrhizal remains controversial because they need to be carefully distinguished from association with saprophytic or incompatible ectomycorrhizal fungi, that may also grow on surface of roots collected in the field (Brundrett et al. 1996). *Acacia mangium* has also recently been inoculated *in vitro* with *Pisolithus* sp., suggesting that differences in the ectomycorrhizal status of *A. mangium* in plantations and in experimental culture

conditions might be explained by: i- The absence of compatible ectomycorrhizal fungi; ii- The ectomycorrhizal dependence of the host provenance; iii- The competition between ectomycorrhizal fungi in their environment.

Among the oldest report on the ectomycorrhizal status of the genus *Acacia* one must cite Warcup (1980) who established the ectomycorrhizal status of 12 Australian species of *Acacia* but without mentioning *A. mangium*. In 1987, Sim citing Gibson (1981) reported a symbiotic relationship between *A. mangium* and the ectomycorrhizal fungus *T. ramarioides*. This fungus was reported to fruit in nurseries as well as in plantations in Sabah. This association was more recently reported by Lee (1990) and De la Cruz and Yantasath (1993), although these authors contested the validity of this association as "it does not show typical symptoms, including fungal sheath and Hartig net". In a very short paper, Anino (1992) reported the ectomycorrhizal association of *A. mangium* with a coral fungus doubtfully identified as *Clavaria* sp.; the description and the ecological behaviour let think of the misidentification of *Thelephora* sp. According to this author the association would be highly beneficial to the tree. Our own observations allow confirming the ectomycorrhizal status of the *T. ramarioides/A. mangium* association. The possible beneficial effect of this association remains unexplored.

Aside *T. ramarioides*, the other fungus reported to be associated with *A. mangium* belongs to the genus *Pisolithus*. This fungal genus was collected in plantations from the introduction areas. One strain COI007, used by Duponnois and Bâ (1999), was isolated from one sporophore harvested in Senegal in a pure *A. mangium* stand. The other is a sporophore harvested in Malaysia, from which, the strain GEMAS (Martin et al. 2002) had been isolated. According to Martin et al. (2002), when analysing ribosomal ITS sequences, strains COI007 and GEMAS phylogenetically grouped with *P. albus*. The *Pisolithus* sporophore we collected in Madagascar in a pure stand of *A. mangium* was morphologically and anatomically similar as to COI007. Our field observations allow completing the list of fungal partners with the genus *Scleroderma* in Congo and in Madagascar, and the genus *Xerocomus* in Madagascar.

Ectomycorrhizal syntheses in controlled conditions are essential to confirm the ectomycorrhizal status of one given host plant. Our study failed to evidence any difference in ectomycotrophy between several provenances representative of *A. mangium* native areas. Duponnois et al. (2000) obtain similar results in pot culture with six provenances of *A. auriculiformis* inoculated with *Pisolithus* sp. COI007 and COI024. This suggests that differences in the ectomycorrhizal status of *A. mangium* in plantations and in experimental culture might not be linked to host provenance but rather to host compatibility of the locally present ectomycorrhizal fungi. We also validate several conditions of *in vitro* ectomycorrhizas formation, trying to make these conditions compatible with nodulation, particularly by using a plant medium classically used for legume inoculation like BD medium. Using successively both MNM and nitrogen-free BD media, both ectomycorrhizas and nodules were obtained. We confirmed Martin-Laurent et al. (2001) observations that one-month was necessary to observe a generalized response to inoculation, although the first ectomycorrhizas were visible only 14 days after inoculation. We observed (data not shown) such shorter period when allowing the fungal plug to develop for 3 to 5 days before adding the *A. mangium* seedling in the glass tube. With *Eucalyptus urophylla*, in Petri dish conditions, ectomycorrhizal roots with a one hyphae thick Hartig net can be observed only 4 days after inoculation (Lei et al. 1990). This could be attributed to a much higher ectotrophic dependence of eucalypts compared to *A. mangium*, may be due to a slower *in vitro* growth of *A. mangium* (Martin-Laurent et al. 2001) and also a different behaviour towards phosphorus nutrition.

Even when selecting fungal strains from the host plant native area, only *Pisolithus* spp. was always infective. *Scleroderma* sp., with higher time of contact was also infective. *Tylopilus* sp. remained poorly infective, even with higher times of contact. *In vitro* infectivity tests confirmed differential behaviour of the genus *Pisolithus* when diversifying the origins of the strain used. Martin-Laurent et al. (2001) reported that in Petri dishes syntheses only two out of the six *Pisolithus* isolates they used induced ectomycorrhizas with a mantle sheath and a Hartig net. The phylogenetic placement of all these *Pisolithus* strains, according to Martin et al. (2002), could be informative on the taxonomic specificity of the *Pisolithus* spp./*A. mangium* associations.

In greenhouse conditions the general behaviour of *A. mangium* towards ectomycorrhizal fungi was not very different from *in vitro*. Responses to *Pisolithus* spp. inoculations were of three types, *i.e.* non-infective, infective with yellow-gold ectomycorrhizas, and infective with brown ectomycorrhizas, probably attributable to different taxonomical positions of the strains. Molecular characterisation would probably help in analysing fungal specificity. The non-infectivity of two *Scleroderma* species collected under *Pinus kesiya* and *Afzelia africana* suggests an infrageneric selective receptivity of *A. mangium*. A similar interpretation of the non-infectivity of well-known ectomycorrhizal genera such as *Amanita*, *Elaphomyces* and *Laccaria* could be proposed. *Paxillus involutus* is a new but clearly infective genus with *A. mangium* in nursery conditions.

In similar conditions, Duponnois and Bâ (1999) were the first to measure *A. mangium* response to inoculation. They used the fungal isolate of *Pisolithus* sp. COI007, originally isolated from *A. mangium* in Senegal, and obtained typical ectomycorrhizas with a fungal sheath and Hartig net. Depending on the levels of available phosphorus in soils, a significant growth response in terms of shoot biomass occurred in inoculated plants after two months growth. This positive effect was confirmed in term of elements concentration in leaves of the

inoculated plants, particularly for P, K, S and Cu. Their study was the first to clearly show the beneficial effect of ectomycorrhizas on *A. mangium* growth and physiology.

**Acknowledgements:** Authors are very grateful for financial supports by the French Embassy in Singapore (French Minister of Foreign Affairs) and by the Nanyang Technology University, Singapore (J. Weber PhD grant). Thanks are also expressed to G. Chaix from Madagascar, Rosalie Safou-Matondo from Congo and Dominique Louppe from Côte d'Ivoire for their help in field prospecting. Part of this work was financed by French Minister of Ecology and Sustainable Development (Call for project "Ecosystèmes Tropicaux").

## References

- Anino EO (1992) Natural ecto-mycorrhiza of *Acacia mangium*. Nitrogen Fixing Tree Research Reports 10:96
- Bâ AM, Dalpé Y, Guissou T (1996) Les glomales d'*Acacia holosericea* et d'*Acacia mangium*. Bois et Forêts des Tropiques 250:5-18
- Broughton WJ, Dilworth MJ (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. Biochem J 125:1075-1080
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N (eds) (1996) Working with mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32.
- Chong L (1986) Occurrence of mycorrhizae in seedlings of some tree species in Sarawak. Information paper I-21. Conference Paper Vol. II. 9<sup>th</sup> Malaysian Forestry Conference. Kuching, Sarawak.
- Chilvers A, Douglass PA, Lapeyrie FF (1986) A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. New Phytol 103:397-402
- Clapp JP, Mansur I, Dodd JC, Jeffries P (2001) Ribotyping of rhizobia nodulating *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* from different geographical areas in Indonesia using PCR-RFLP-SSCP (PRS) and sequencing. Environ Microbiol 3:273-280
- De la Cruz RE, Garcia MU (1991) Nitrogen fixation and mycorrhizae in *Acacias* on degraded grasslands. In: Awang K, Taylor DA (eds) Tropical *Acacias* in East Asia and the Pacific. Winrock International, Bangkok, Thailand, pp 59-71.
- De la Cruz RE, Yantasath K (1993) Symbiotic associations. In: Awang K, Taylor DA (eds) *Acacia mangium* growing and utilisation. Winrock International and FAO, Bangkok, Thailand, pp 101-111
- Duponnois R, Bâ AM (1999) Growth stimulation of *Acacia mangium* Willd. by *Pisolithus* sp. in some Senegalese soils. Forest Ecol Manage 119:209-215
- Duponnois R, Founoune H, Lesueur D, Thioulouse J, Neyra M (2000) Ectomycorrhization of six *Acacia auriculiformis* provenances from Australia, Papua New Guinea and Senegal in glasshouse conditions: effect on the plant growth and on the multiplication of plant parasitic nematodes. Aust J Exp Agric 40:443-450
- Galiana A, Chaumont J, Diem HG, Dommergues YR (1990) Nitrogen fixation potential of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* spp. Biol Fertil Soil 9:261-267
- Galiana A, Gnahoua GM, Chaumont J, Lesueur D, Prin Y, Mallet B (1998) Improvement of nitrogen fixation in *Acacia mangium* through inoculation with rhizobium, Agroforestry Systeme 40:297-307
- Galiana A, Prin Y, Mallet B, Gnahoua GM, Poitel M, Diem HG (1994) Inoculation of *Acacia mangium* with alginate beads containing selected *Bradyrhizobium* strains under field conditions: long-term effect on plant growth and persistence of the introduced strains in soil. Appl Environ Microbiol 60:3974-3980
- Gibson IAS (ed) (1981) Forest mycology. FAO/UNDP, Malaysia Consultant Report No 3 Rome FAO, 45 p
- Lee SS (1990) The association of *Thelephora ramarioides* D.A. Reid With *Acacia mangium* Willd. In: Proc. Third Int. Conf. Plant Protection in Tropics, Vol. IV, Genting Highlands, Malaysia, pp 171-173
- Lei J, Lapeyrie F, Malajczuk N, Dexheimer J (1990) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch on roots of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake *in vitro*. New Phytol 116:115-122
- Martin F, Diez J, Dell B, Delaruelle C (2002) Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. New Phytol 153:345-357
- Martin-Laurent F, Tham FY, Lee SK (2001) *In vitro* mycorrhization of *Acacia mangium* Willd with *Pisolithus* spp. Asian J Trop Biol 4:35-40
- Marx DH (1969) The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I- Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59:153-163
- Molina R (1979) Pure culture synthesis and specificity and host specificity of red alder mycorrhizae. Can J Bot 57:1223-1228
- Nuswantara S, Fujie M, Sukiman HI, Yamashita M, Yamada T, Murooka Y (1997) Phylogeny of bacterial symbionts of the leguminous tree *Acacia mangium*. J Ferment Bioeng 84:511-518
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans Br Mycol Soc 55:158-160

- Pinyopusarek K, Sim BL, Gunn BV (1993) Taxonomy, distribution, biology, and use as an exotic. In: Awang K, Taylor D (eds) *Acacia mangium* Growing and Utilization MPTS Monograph Series N°3, Winrock International and FAO Bangkok Thailand, pp 1-21
- Reddell P, Warren R (1987) Inoculation of *Acacia* with mycorrhizal fungi: potential benefits. In: Turnbull JW (ed) Australian Acacias in Developing Countries ACIAR Proceedings No. 16. Canberra, Australia pp 50-53
- Sim BL (1987) Research on *Acacia mangium* in Sabah: a review. In: Turnbull JW (ed) Australian Acacias in Developing Countries ACIAR Proceedings No. 16. Canberra, Australia pp 164-166
- Umali-Garcia M, Libuit JS, Baggayan RL (1988) Effects of *Rhizobium* inoculation on growth and nodulation of *Albizia falcataria* (L.) Fosh. and *Acacia mangium* Willd. in the nursery. Plant Soil 108:71-78
- Vergnaud L, Chaboud A, Prin Y, Rougier M (1985) Preinfection events in the establishment of *Alnus-Frankia* symbiosis. Development of a spot-inoculation technique. Plant Soil 87:67-78
- Vincent JM (1970) A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. International Biological program. Handbook No 15. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 164 p
- Warcup JH (1980) Ectomycorrhizal associations of Australian indigenous plants. New Phytol 85:531-535

Table 1: Reference number of *Acacia mangium* seedlots provided by CSIRO Tree Seed Center with their geographical origin.

Seedlot	Origin
16679	Bloomfield-Ayton, Qld Australia;
16728	North Ayton, Qld Australia;
19232	Wasua, Papua New Guinea;
19297	Rex-Cassowary, Qld, Australia;
19738	Lower Fly River WP, Papua New Guinea;
20002	Laulau Viti, Fiji,
20128	Balimo, Papua New Guinea.

Table 2: Species, strain number, host plant (when known), origin and reference of the 41 fungal strains used in this study. Strains were from: 1- CSIRO Land and Water Division, Townsville, 2- Soil Microbiology Laboratory, IRD, Dakar, Senegal and 3- LSTM, Montpellier, France. They are listed in. These cultures were maintained by quarterly sub-cultured at 26°C in 90 mm Petri dishes on MNM medium (Marx, 1969).

Taxon	Strain nb.	Host plant	Origin	Reference
<i>Amanita</i> sp.	E4090	nd	Australia (1)	This study
<i>Austrogautiera</i> sp.	ORS7873	<i>Uapaca guineensis</i>	Senegal (2)	This study
<i>Elaphomyces</i> sp.	H4029	nd	Australia (1)	This study
<i>Gen. nov.</i>	H4027	nd	Australia (1)	This study
<i>Gyrodon intermedius</i>	ORS 7729	<i>Afzelia africana</i>	Senegal (2)	This study
<i>Hysterangium</i> sp.	H4134	nd	Australia (1)	This study
<i>Labyrinthomyces</i> sp.	Taraval	nd	Australia (1)	This study
<i>Laccaria</i> sp.	E4124	nd	Australia (1)	This study
<i>Paxillus involutus</i>	PaxInv	<i>Quercus</i> sp.	France (2)	This study
<i>Phallus roseus</i>	PhSK1	<i>Acacia holosericea</i>	Senegal (2)	This study
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS 7468	<i>Prosopis juliflora</i>	Senegal (2)	This study
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS 7744	<i>Acacia holosericea</i>	Senegal (2)	This study
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS 7866	<i>Acacia nilotica</i>	Senegal (2)	This study
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS 7868	<i>Acacia senegal</i>	Senegal (2)	This study
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS X010	nd	Senegal (2)	This study
<i>Pisolithus albus</i>	COI 001	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Senegal (3)	This study
<i>Pisolithus albus</i>	Antonio Dubréka	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Guinea (3)	This study
<i>Pisolithus albus</i>	COI 007	<i>Acacia mangium</i>	Senegal (3)	
<i>Pisolithus albus</i>	ORS8143	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Senegal (2)	This study
<i>Pisolithus arhizus</i>	F11	<i>Pinus pinaster</i>	France (2)	Mousain et al. (1988)
<i>Pisolithus</i> sp.	H4003	nd	Australia (1)	This study
<i>Pisolithus albus</i>	ORS 7865	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Senegal (2)	This study
<i>Pisolithus albus</i>	ORS 7867	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Senegal (2)	This study
<i>Pisolithus albus</i>	ORS 7869	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Senegal (2)	This study
<i>Pisolithus albus</i>	ORS 7870	<i>Acacia holosericea</i>	Senegal (2)	Thoen et al. (1990)
<i>Pisolithus albus</i>	ORS X003	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Senegal (2)	This study
<i>Pisolithus albus</i>	ORS X004	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Senegal (2)	Thoen et al. (1990)

<i>Pisolithus</i> sp.	PR 264	nd	Australia (1)	?
<i>Pisolithus</i> sp.	PR100	nd	Australia (1)	?
<i>Pisolithus</i> sp.	PR32	nd	Australia (1)	?
<i>Pisolithus</i> sp.	PR86	<i>Eucalyptus</i> sp.	Australia (1)	Thoen et al. (1990)
<i>Pisolithus</i> sp.	PR94	nd	Australia (1)	?
<i>Pisolithus albus</i>	PS3	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Senegal (2)	This study
<i>Pisolithus arhizus</i>	R	<i>Pinus taeda</i>	USA (2)	Marx
<i>Pisolithus</i> sp.	S2A	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Morocco (3)	This study
<i>Pisolithus</i> sp.	MG 86	<i>Eucalyptus</i> sp.	Madagascar (3)	This study
<i>Scleroderma cepa</i>	ORS 7938	<i>Pinus kesiya</i>	Guinea (3)	This study
<i>Scleroderma dictyosporum</i>	ORS 7731	<i>Afzelia africana</i>	Senegal (3)	This study
<i>Scleroderma</i> sp.	Paluma 4	<i>Acacia mangium</i>	Australia (1)	This study
<i>Tylosiella brunneosetosa</i>	ORS 7573	<i>Uapaca guineensis</i>	Senegal (2)	This study
<i>Tylopilus</i> sp.	E4240	nd	Australia (1)	This study

Table 3: Characteristics of the ectomycorrhizal fungi associated with *A. mangium* in plantations in various introduction zones.

Taxon / country	Ectomycorrhizas	Sporophore	Microscopy	DNA
<i>Scleroderma</i> sp./Congo	Whitish, sinuous	No	Mantle, HN	nd
<i>Pisolithus</i> sp./Madagascar	Yellow-gold, straight	Yes	Mantle, HN	nd
<i>Scleroderma</i> sp./Madagascar	Whitish, sinuous	No	nd	nd
<i>Xerocomus</i> sp./Madagascar	Yellow-brown, hairy	Yes	nd	Sporophore
<i>Thelephora ramarioides</i> /Malaysia	Dark-brown	Yes	Mantle	Sporophore, ecm
<i>Pisolithus albus</i> /Sénégal	Yellow-gold, straight	Yes	Mantle, HN	Sporophore
<i>Thelephora ramarioides</i> /Singapour	Dark-brown	Yes	Mantle	Sporophore, ecm

Table 4: Monoxenic (glass tube) infectivity of ten different ectomycorrhizal strains on *Acacia mangium* 28 days after inoculation (34 days after seed sterilization).

Taxon	Strain	Nb mycorrhizal tubes
<i>Amanita</i> sp.	E4090	0/6
<i>Boletellus</i> sp.	E4249	0/6
<i>Elaphomyces</i> sp.	H4029	0/6
<i>Gen nov</i>	H4027	0/6
<i>Hysterangium</i>	H4134	0/6
<i>Labyrinthomyces</i> sp.	Taraval	0/6
<i>Laccaria</i> sp.	E4124	0/6
<i>Pisolithus</i> sp.	H4003	6/6
<i>Scleroderma</i> sp.	Scl4 Paluma	1/6
<i>Tylopilus</i> sp.	E4240	1/6

Table 5: Macroscopic description of the interactions between different *Pisolithus* spp. strains and the root system of different *Acacia mangium* provenances.

Seedlot	<i>Pisolithus</i> spp. strains					
	S 2A	R	COI 001	A. Dubréka	Mg 86	COI 007
19297 Queensland	+++	+	-	-	-	-
19738 PNG	+++	+	-	-	-	-
20002 Fiji	+++	+	-	-	nd	-
16679 Queensland	+++	+	-	-	-	-

19232 PNG	+++	+	-	-	-	-
20128 PNG	+++	+	-	-	-	-
16728 Queensland	+++	+	-	-	-	-

+++ : Fungal mantle growing around secondary roots

++ : Fungal mantle only around the primary roots

+ : Fungus partially covering the roots

- : No fungus covering the roots

Table 6: Influence of cultural conditions of *A. mangium* on ectomycorrhizas formation with *Pisolithus* sp. strain PR264

Treatments	Nb mycorrhizal roots/tube			
	23*		29*	
	Mean**	Std dev	Mean**	Std dev
PR264 + MNM	3.88a	± 1.9	8.38a	± 3.9
PR264 + MNM + Dark	4.88a	± 5.2	7.38a	± 4.3
PR264 + MNM - Glucose	0b	± 0	0b	± 0
PR264 + MNM(14 d)+MNM-gluc	0.13b	± 0.4	1.63b	± 1.3
PR264 + MNM (14 d)+BDN	3.75a	± 4.3	6.00a	± 4.9

\* Days after inoculation

\*\* In the same column values followed by the same letter are not significantly different at p= 0.05

Table 7: Ectomycorrhizal syntheses using 24 fungal strains with *Acacia mangium*, in greenhouse conditions: infectivity, colour and diameter of the ectomycorrhizas, mantle thickness and Hartig net penetration depth, six months after inoculation.

Taxon	Strain	Infectivity	Colour	Diam. (µm)	Mantle (µm)	Hartig net (µm)
<i>Austrogautiera</i> sp.	ORS 7873	-	-	-	-	-
<i>Gyrodon intermedius</i>	ORS 7729	-	-	-	-	-
<i>Paxillus involutus</i>	Pi	+	Dark-brown	320	14	8
<i>Phallus roseus</i>	PhSK1	-	-	-	-	-
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS 7866	-	-	-	-	-
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS X010	-	-	-	-	-
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS 7868	-	-	-	-	-
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS 7744	-	-	-	-	-
<i>Phlebopus sudanicus</i>	ORS 7468	-	-	-	-	-
<i>Pisolithus</i> sp.	PR32	+	Yellow-Brown	360	28	14
<i>Pisolithus</i> sp.	PR86	+	Yellow-Brown	330	34	14
<i>Pisolithus</i> sp.	PR100	+	Yellow-Brown	350	26	20
<i>Pisolithus arhizus</i>	F11	-	-	-	-	-
<i>Pisolithus albus</i>	ORS X003	-	-	-	-	-
<i>Pisolithus albus</i>	ORS X004	+	Yellow-gold	380	34	18
<i>Pisolithus albus</i>	ORS 7865	+	Yellow-gold	390	28	12
<i>Pisolithus albus</i>	ORS 7867	+	Yellow-gold	400	32	18
<i>Pisolithus albus</i>	ORS 7869	+	Yellow-gold	400	35	16
<i>Pisolithus albus</i>	ORS 7870	+	Yellow-gold	420	36	24
<i>Pisolithus albus</i>	ORS 8143	+	Yellow-Brown	380	26	17
<i>Scleroderma cepa</i>	ORS 7938	-	-	-	-	-
<i>Scleroderma dictyosporum</i>	ORS 7731	-	-	-	-	-
<i>Tubosaete brunneosetosa</i>	ORS 7573	-	-	-	-	-

### Figure legends

Figure 1: Spontaneous ectomycorrhizas of *Acacia mangium* in plantations. A: *Thelephora ramarioides* sporophores in Singapore; B: Whitish young ectomycorrhizas of *T. ramarioides*; C: *Xerocomus* sp. sporophore

in a pure *A. mangium* stand in Madagascar; D: Whitish and sinuous ectomycorrhizas characteristic of *Scleroderma* sp. in Congo.

Figure 2: Histological observations of cross-sectioned ectomycorrhizas of *A. mangium* stained in Congo red. A: Field harvested (Singapore) *Thelephora ramarioides* ectomycorrhizas with fungal sheath and intercellular infections forming a slight Hartig net; B: Field harvested (Congo) *Scleroderma* sp. ectomycorrhizas with a fungal sheath and a Hartig net; C: scanning electron microscopic view of the ectomycorrhizas surface (*Pisolithus* sp. strain PR264) with clumped mycelium; D: transmission electron microscopic view of a cross-sectioned ectomycorrhizas (*Pisolithus* sp. strain PR264) revealing an electron-dense, active fungal mycelial sheath tightly applied to the root surface.

Figure 3: *In vitro* ectomycorrhizal syntheses with *Acacia mangium*. A: General view of the test tube system with the paper pouch strip and a 29 day-old ectomycorrhizal *A. mangium*, 24 days after inoculation with *Pisolithus* sp. strain PR264; B: Whitish ectomycorrhizas obtained with *Scleroderma* sp. strain Paluma 4, respectively 41 and 38 days after seed sterilization and inoculation; C: Abundant rhizomorphs production by *Pisolithus* sp. strain PR264, 41 and 38 days respectively after seed sterilization and inoculation; D: Typical *Pisolithus* sp. yellow-gold ectomycorrhizas *in vitro* obtained 53 days after inoculation of *A. mangium* by *P. albus* strain ORS8143; E: Ectomycorrhizal and nodule formation obtained 53 days after inoculation of *A. mangium* by *P. albus* strain ORS8143 and *Bradyrhizobium* sp. strain Aust13c.

### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PRÉVUES**

- Perrineau M.M., Galiana A., de Lajudie P., Duponnois R., Béna G., Dreyfus B. and Prin Y. Rhizobia nodulating acacias, in the light of plant molecular phylogeny. Article de synthèse, en préparation.

## **ANNEXE : PARTIE CONFIDENTIELLE**

*Vous pouvez insérer ici toute information ou résultat qui revêt une part de confidentialité.*

*Merci de préciser le degré de confidentialité de ces données.*

*Nous vous recommandons de préciser dans la partie non confidentielle l'existence de ces données confidentielle et d'expliquer la raison de leur confidentialité.*

*Cette partie ne sera pas diffusée sur le site Internet du Ministère ou d'Ecofor.*

*Cette partie peut être rendue sous forme non modifiable (fichier pdf de préférence).*

*Son format est laissé à la libre appréciation de ses rédacteurs.*