



HAL
open science

Régulation de la sécrétion des phosphatases acides des champignons ectomycorhiziens et mobilisation de phosphore organique dans la rhizosphère des arbres forestiers : approches biochimiques et moléculaires

Julien Louche

► To cite this version:

Julien Louche. Régulation de la sécrétion des phosphatases acides des champignons ectomycorhiziens et mobilisation de phosphore organique dans la rhizosphère des arbres forestiers : approches biochimiques et moléculaires. Biologie végétale. Institut National d'Etudes Supérieures Agronomiques de Montpellier, 2009. Français. NNT: . tel-02822240

HAL Id: tel-02822240

<https://hal.inrae.fr/tel-02822240v1>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

**CENTRE INTERNATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES
EN SCIENCES AGRONOMIQUES
(Montpellier SupAgro)**

ECOLE DOCTORALE
Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences et Environnement
(SIBAGHE)

DOCTORAT

Discipline : Ecosystème

Julien LOUCHE

**REGULATION DE LA SECRETION DES PHOSPHATASES ACIDES DES
CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS ET MOBILISATION DE PHOSPHORE
ORGANIQUE DANS LA RHIZOSPHERE DES ARBRES FORESTIERS :
APPROCHES BIOCHIMIQUES ET MOLECULAIRES**

Thèse dirigée par **Claude PLASSARD**

Date de soutenance proposée, le 17 décembre 2009

Membres du Jury proposés:

Michel CHALOT Professeur, Université Nancy I	Rapporteur
Eliane DUMAS-GAUDOT Directeur de recherche, INRA, Dijon	Rapporteur
Mark Bakker Ingénieur de recherche, ENITA, Bordeaux	Examineur
Bruno TOURAINÉ Professeur, Université Montpellier II	Examineur
Hervé QUIQUAMPOIX Directeur de recherche, INRA, Montpellier	Co-directeur de thèse
Claude PLASSARD Chargée de Recherche, INRA, Montpellier	Directrice de thèse

Régulation de la sécrétion des phosphatases acides des champignons ectomycorhiziens et mobilisation de phosphore organique dans la rhizosphère des arbres forestiers : approches biochimiques et moléculaires

Résumé

En culture pure, certains champignons ectomycorhiziens sont capables de sécréter de grandes quantités de phosphatase acide (AcPase). L'hypothèse centrale de ce travail est que ces enzymes joueraient un rôle déterminant dans la mobilisation de P organique (Po) des sols forestiers. Pour étudier cette hypothèse nous avons utilisé le basidiomycète ectomycorhizien modèle *Hebeloma cylindrosporum*, reconnu pour sa forte capacité de sécrétion d'AcPase *in vitro*. La séparation des protéines sécrétées dans le milieu de culture par une résine échangeuse de cations a permis l'identification de quatre fractions d'activité phosphatase. Les AcPases contenues dans ces fractions ont libéré du P inorganique (Pi) à partir de Po extrait d'un podzol acide. Les vitesses d'hydrolyse sont accélérées quand le sol est préalablement autoclavé, suggérant que les pools de Po microbiens libérés par l'autoclavage seraient un meilleur substrat pour les AcPases de *H. cylindrosporum*. Un gène codant pour une AcPase, nommé *HcPhoA*, a été identifié dans une banque d'ADNc de *H. cylindrosporum*. L'expression de *HcPhoA* est fortement augmentée dans le mycélium en culture pure en réponse à la déficience en Pi, indiquant que la production de HcPhoA est régulée au niveau transcriptionnel. Cependant, la transcription de *HcPhoA* survient après celle de *HcPT1*, qui code un transporteur H⁺:Pi. La mycorhization du Pin maritime par *H. cylindrosporum* a augmenté la croissance et le prélèvement net de P des plantes à partir d'un podzol acide pauvre en Pi. L'augmentation de l'expression de *HcPhoA* dans les ectomycorhizes pourrait indiquer un rôle de HcPhoA dans la minéralisation du P organique du sol au profit de la plante hôte.

Mots clés : Phosphatase acide, Ectomycorhizes, *Hebeloma cylindrosporum*, *Pinus pinaster*, Nutrition phosphatée, Régulation transcriptionnelle, Anticorps.

Regulation of the secretion of acid phosphatase of ectomycorrhizal fungi and mobilization of organic phosphorus in the rhizosphere of forest trees: biochemical and molecular approaches

Abstract

Some ectomycorrhizal fungi are able to release appreciable amounts of acid phosphatase (AcPase) when grown in pure culture. The main hypothesis of this work is that these enzymes would play an important role in organic P (Po) mobilisation of forest soils. To study this hypothesis, we used the model ectomycorrhizal fungus, *Hebeloma cylindrosporum*, already known for its great capability to release AcPase in vitro. The separation of secreted proteins in the culture medium with a cation exchange resin made it possible to identify four AcPase fractions. AcPases from each fraction released inorganic P (Pi) from Po extracted in acidic podzol. The rates of Pi release were increased when the soil was previously autoclaved, suggesting that pools of microbial Po released after soil autoclaving could be a better substrate for *H. cylindrosporum* AcPases. A gene coding for an AcPase, named *HcPhoA*, was identified from a cDNA library of *H. cylindrosporum*. Expression level of *HcPhoA* was strongly increased in the mycelium grown in pure culture as a response to Pi deficiency, indicating that the regulation *HcPhoA* production was transcriptional. However, *HcPhoA* expression level increased after that of *HcPT1* coding for a H⁺:Pi transporter. The mycorrhizal association between *H. cylindrosporum* and maritime pine increased plant growth and net P accumulation from an acidic podzol low in Pi. The increase of *HcPhoA* in ectomycorrhizae could indicate a role of *HcPhoA* in the mineralisation of soil Po for the host plant.

Key words: Acid phosphatase, Ectomycorrhizae, *Hebeloma cylindrosporum*, *Pinus pinaster*, Phosphorus nutrition, Transcriptional regulation, Antibody.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1.....	5
Synthèse bibliographique	5
1. Le phosphore dans le sol.....	5
1.1. Le cycle global de P dans le sol.....	5
1.2. Les principales formes de P dans le sol et leur devenir	7
1.2.1 Le phosphore minéral.....	7
1.2.2. Le phosphore organique	9
1.2.3. Les mécanismes de la mobilisation de P	12
1.2.3.1. <i>Les mécanismes physico-chimiques</i>	12
1.2.3.2. <i>Les mécanismes biologiques</i>	13
2. La nutrition phosphatée chez la plante	15
2.1. Une stratégie individuelle	15
2.1.1. La morphologie et le dynamisme du système racinaire	15
2.1.1.1. <i>Architecture racinaire</i>	15
2.1.1.2. <i>Production de poils racinaires</i>	16
2.1.1.3. <i>Formation de "Cluster roots"</i>	17
2.1.2. Les exsudats racinaires	18
2.1.3. Les phosphatases acides racinaires	19
2.1.4. Les transporteurs de Pi au niveau de l'interface sol/racine chez les plantes.....	20
2.2. Une stratégie collective : la symbiose mycorhizienne	21
3. La symbiose mycorhizienne.....	23
3.1. Classification.....	23
3.1.1. Les ectomycorhizes	23
3.1.2. Les endomycorhizes	24
3.1.3. Les ectendomycorhizes	25
3.2. Formation de la symbiose ectomycorhizienne	26
3.2.1. Pré-infection	26
3.2.2. Initiation	27
3.2.3. Différenciation	28
3.3. Fonctionnement des mycorhizes et nutrition P de la plante hôte	29
3.3.1. Exploration du sol : le mycélium extramatriciel	29
3.3.2. Mobilisation de P complexé dans la rhizosphère	30
3.3.2.1. <i>Les acides organiques</i>	30
3.3.2.2. <i>Les phosphatases acides fongiques</i>	31
3.3.3. Absorption du P au niveau de l'interface sol/champignon	32
3.3.4. Accumulation et transfert du P vers la cellule hôte.....	34
3.3.4.1. <i>Synthèse et rôle des polyphosphates</i>	34
3.3.4.2. <i>Dégradation des polyP et transfert vers la plante hôte</i>	37
4. Les phosphatases acides extracellulaires.....	38
4.1. Classification.....	38
4.2. Identification des gènes et mécanismes de régulation.....	38
4.3. Propriétés enzymatiques.....	39
4.3.1. pH et température	39
4.3.2. Les inhibiteurs	40

4.3.3. Influence du phosphore inorganique	41
4.4. Interaction des phosphatases acides avec la phase solide du sol.....	41
5. Hypothèse et stratégie de recherche	42
6. Références	44

CHAPITRE 2..... 58

Separation of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and their effectiveness in hydrolyzing organic phosphorus in a sandy soil after different fertilisation regimes..... 60

1. Introduction	61
2. Material and Methods.....	63
2.1. Strain and Growth conditions.....	63
2.2. Separation of <i>H. cylindrosporum</i> AcPases.....	63
2.3. Analysis of collected fractions	64
2.4. Substrate specificity	64
2.5. Soils and total P, Pi and Po determinations.....	65
2.6. Incubation of enzymes with soil solution extracts	65
2.7. Effect of soil solution extracts on AcPase activity.....	66
2.8. Statistical analysis	66
3. Results	66
3.1. Chromatographic separation of <i>H. cylindrosporum</i> AcPases	66
3.2. Biochemical analyses of the four phosphatase activity fractions separated from <i>H. cylindrosporum</i>	67
3.3. Analysis of P contents extracted by NaHCO ₃ from unfertilized and fertilized soils	69
3.4. Hydrolysis of NaHCO ₃ -extractable Po by <i>H. cylindrosporum</i> AcPases.....	70
3.5. Effect of soil solution extracts on Glucose 6-P hydrolysis of <i>H. cylindrosporum</i> AcPases	72
4. Discussion	72
5. Conclusion.....	76
6. References	77

CHAPITRE 3..... 81

Identification of *HcPhoA*, a gene encoding an acid phosphatase released into its external medium by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* 83

1. Introduction	84
2. Material and Methods.....	85
2.1. Identification of a full-length cDNA from the <i>H. cylindrosporum</i> EST library	85
2.2. Computer analyses	86
2.3. Fungal strain and growth conditions	86
2.4. Protein precipitation from culture medium	86
2.5. Chromatographic separation of AcPases.....	87
2.6. Analysis of collected fractions	87
2.7. Dot Blot analysis	88
2.8. RNA extraction and RT-PCR procedures	88
3. Results and Discussion	89
3.1. Identification of a single full-length cDNA (<i>HcPhoA</i>) with high identity to known fungal AcPases	89
3.2. Analysis of the <i>HcPhoA</i> structure suggests a glycoprotein	91
3.3. Identification of four fractions with AcPase activity each induced by P starvation .	92

3.4. Anti-HcPhoA antibodies react with a single fraction of phosphatase activity.....	92
3.5. Pi deficiency increase the expression level of <i>HcPhoA</i>	94
4. Conclusion	95
5. References	96

CHAPITRE 4..... 99

Identification of physiological and molecular mechanisms used by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to cope with orthophosphate starvation..... 101

1. Introduction	102
2. Material and Methods	104
2.1. Strain and Growth conditions.....	104
2.2. Enzymatic and chemical analyses	104
2.4. Nucleic acid extraction.....	105
2.5. RT and real-time PCR procedures	106
2.6. Statistical analyses.....	107
3. Results	107
3.1. P starvation induced the secretion of extracellular AcPases from <i>H. cylindrosporum</i> into the culture medium.....	107
3.2. NMR-detectable phosphorus.....	107
3.3. Expression patterns of <i>HcPT1</i> , <i>HcPT2</i> and <i>HcPhoA</i> from <i>in vivo</i> -grown mycelia under different Pi concentrations	111
4. Discussion	111
5. Conclusion	115
6. Supplementary data	116
7. References	116

CHAPITRE 5..... 120

Differential expression of the phosphorus-regulated fungal genes, two phosphate transporters and one acid phosphatase, within *Hebeloma cylindrosporum*/*Pinus pinaster* ectomycorrhizae grown in acidic podzols 123

1. Introduction	124
2. Materiel and Methods	126
2.1. Fungal culture.....	126
2.2. Soil collection.....	126
2.3. Seed germination and plant culture conditions	126
2.4. Plant and soil harvest.....	127
2.5. AcPase activity	128
2.6. Plant and soil analysis	128
2.7. Total RNA extraction from <i>P. pinaster</i> ectomycorrhizae	129
2.8. Transcript analysis of <i>HcPT1</i> , <i>HcPT2</i> and <i>HcPhoA</i> genes	129
2.9. Statistical analyses.....	130
3. Results	131
3.1. Analysis of soil P fractions.....	131
3.2. Biomass and root length analyses	132
3.3. Effect of fungal association on plant P nutrition and net P-accumulation	133
3.4. Effects of soil P availabilities on fungal biomass and AcPase activity.....	134
3.5. Expression pattern of <i>HcPT1</i> , <i>HcPT2</i> and <i>HcPhoA</i> in ectomycorrhizal root tips ..	136
4. Discussion	137
5. Conclusion	140

6. References	141
----------------------------	------------

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	146
--	------------

1. Conclusions générales	146
1.1. Caractérisation biochimique des AcPases sécrétées par <i>H. cylindrosporum</i>	146
1.2. Efficacité des AcPases d' <i>H. cylindrosporum</i> à hydrolyser des composés de P organiques	146
1.3. Identification d'un gène codant une AcPase chez <i>H. cylindrosporum</i> sécrétée en réponse à la déficience en Pi dans le milieu de culture	147
1.4. Effet de la mycorhization sur le prélèvement de P par <i>Pinus pinaster</i> en croissance sur des sols Landais	148
2. Perspectives	149
2.1. Analyses biochimiques complémentaires pour HcPhoA	149
2.2. Identification des gènes codant pour d'autres AcPases chez le champignon ectomycorhizien <i>H. cylindrosporum</i>	150
2.3. Identification et caractérisation des pools de P organiques libérés par autoclavage des sols	151
2.4. Quantification de la contribution des phosphatases fongiques dans l'amélioration de la nutrition P des plantes	151

ANNEXES	154
----------------------	------------

INTRODUCTION GENERALE

La majorité du phosphore (P) contenu dans les sols se trouve sous des formes minérales et organiques complexes qui ne sont pas directement utilisables par les végétaux (Barber, 1984 ; Turner *et al.*, 2005). Seul l'orthophosphate (Pi : H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-}), forme soluble, est absorbé par les plantes. La faible mobilité du Pi dans la solution du sol, estimée de 10^{-12} à $10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Schachtman *et al.*, 1998), résulte de sa forte réactivité avec les constituants du sol. Seule une faible proportion de P est alors présente sous forme de Pi en solution et sa concentration est estimée pour la majorité des sols entre 0,1 et 10 μM (Hinsinger, 2001). Cette concentration est insuffisante face aux besoins nutritifs en P des végétaux et la biodisponibilité en Pi devient alors rapidement un facteur limitant pour la production de biomasse dans les écosystèmes naturels ou anthropiques.

En réponse à la déficience en P, les plantes ont toutefois développé de nombreuses stratégies afin de répondre à leur besoin en P. La croissance et la configuration spatiale du système racinaire permettent l'exploration continue de nouveaux horizons du sol. Une augmentation significative du nombre de racines fines a été observée dans les sols pauvres en P chez le pin maritime (Achat *et al.*, 2008). La formation de structures racinaires spécialisées tels que les poils racinaires (Gahoonia & Nielsen, 1997) ou les racines en « cluster » (Lamont, 1983) permet d'augmenter considérablement la surface d'échange et le volume de sol exploré. Les plantes sont également capables de mobiliser du Pi à partir des formes de P complexées par la sécrétion d'acides organiques (Jones, 1998) et de phosphatases acides (AcPases) (Duff *et al.*, 1994) dans la rhizosphère.

Dans les écosystèmes forestiers, les racines des arbres sont pratiquement toujours associées à des symbiotes fongiques au travers de la formation d'organes mixtes qui sont les ectomycorhizes (Marmeisse *et al.*, 2004). Les associations ectomycorhiziennes concernent presque exclusivement des plantes ligneuses et des champignons supérieurs. Seul 3% des espèces végétales sont concernées par cette association mais elles constituent la majorité des espèces de nos forêts tempérées et boréales (Smith & Read, 2008). De nombreuses études ont démontré l'effet bénéfique de l'association ectomycorhizienne sur la croissance de la plante hôte, notamment grâce à une amélioration de la nutrition minérale et plus particulièrement phosphatée (Cumming, 1996 ; Colpaert *et al.* 1999 ; Wallander *et al.* 2005). Cette symbiose mycorhizienne est considérée comme la stratégie la plus répandue pour accroître l'acquisition du P par les plantes surtout dans les sols appauvris en cet élément (Smith *et al.*, 2000). Cette

amélioration du statut P de la plante peut être attribué en partie aux hyphes extramatriciels qui vont coloniser le sol augmentant fortement la surface d'absorption des racines mycorhizées comparé aux racines non mycorhizées (Rousseau *et al.*, 1994 ; Torres Aquino & Plassard, 2004). Les travaux de Rousseau *et al.* (1994) ont montré que les hyphes extramatriciels des champignons ectomycorhiziens *Pisolithus tinctorius* et *Cenococum geophilum* pouvaient représenter jusqu'à 75% de la surface totale d'absorption de jeunes plantes de *Pinus taeda*. En plus de l'exploration du sol, les ectomycorhizes augmenteraient la disponibilité de Pi à partir des formes de P organiques par la sécrétion des AcPases dans la rhizosphère. La capacité des champignons ectomycorhiziens à sécréter des AcPases en réponse à la déficience en Pi a largement été établie en culture pure (Tibbett *et al.*, 1998 ; Quiquampoix & Mousain, 2005).

Dans les sols pauvres en P et riches en P organique, la sécrétion des AcPases apparaît donc déterminante pour permettre l'accès au P organique et l'amélioration de la nutrition P des plantes ectomycorhizées. Cependant les mécanismes de régulation de la synthèse de ces enzymes restent encore très mal définis. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse a été de caractériser les mécanismes biochimiques et moléculaires responsables de la sécrétion des AcPases chez un champignon ectomycorhizien basidiomycète modèle *Hebeloma cylindrosporum* en culture pure ou en association avec une plante hôte *Pinus pinaster*. Cette espèce fongique a été sélectionnée pour sa forte capacité de sécrétion des AcPases dans son milieu de culture (Leprince & Quiquampoix, 1996). Le travail de thèse a permis dans un premier temps de séparer plusieurs isoformes de AcPases chez cette espèce fongique et d'étudier leurs propriétés biochimiques dont leur efficacité à mobiliser du Pi à partir de l'hydrolyse de composés organiques extrait de sols sableux acides. Nos travaux ont également permis d'identifier un gène de phosphatase acide dont l'expression est fortement induite par la carence en Pi dans le milieu de culture. L'identification de ce gène a permis d'envisager l'utilisation d'outils moléculaires chez *H. cylindrosporum* pour étudier la régulation de la synthèse des phosphatases fongiques en conditions représentatives de celles de la rhizosphère.

Références

- Achat D, Bakker M & Trichet P (2008) Rooting patterns and fine root biomass of *Pinus pinaster* assessed by trench wall and core methods. *J For Res* **13**:165-175.
- Barber SA (1984). Phosphorus. In: Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. A Wiley Interscience Publication, John Willey & Sons, New York, 201-228.

- Colpaert JV, van Tichelen KK, van Assche JA & Van Laere A (1999) Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of intact *Pinus sylvestris* seedlings. *New Phytol* **143**: 589-597.
- Cumming JR (1996) Phosphate-limitation physiology in ectomycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings. *Tree Physiol* **16**: 977-983.
- Duff MG, Sarath G & Plaxton WC (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plant* **90**: 791-800.
- Gahoonia TS & Nielsen NE (1997) Variation in root hairs of barley cultivars doubled soil phosphorus uptake. *Euphytica* **98**: 177-182.
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* **237**: 173-195.
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant Soil* **205**: 25-44.
- Lamont B (1983) Root hair dimensions and surface/volume/weight ratios of roots with the aid of scanning electron microscopy. *Plant Soil* **74**: 149-152.
- Leprince F & Quiquampoix H (1996) Extracellular enzyme activity in soil: effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Eur J Soil Sc.* **47**: 511-522.
- Marmeisse R, Guidot A, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combier JP, Melayah D, Fraissinet-Tachet L & Debaud J-C (2004) *Hebeloma cylindrosporum* - a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytol* **163**: 481-498.
- Quiquampoix H & Mousain D (2005) Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. *Organic phosphorus in the environment* (Turner BL, Frossard E & Baldwin DS, eds), pp. 89-112. CAB International, Wallingford.
- Rousseau JVD, Sylvia DM & Fox AJ (1994) Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytol* **128**: 639-644.
- Schachtman DP, Reid RJ & Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* **116**: 447-453.
- Smith FW, Rae AL & Hawkesford MJ (2000) Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *BBA-Biomembranes* **1465**: 236-245.
- Smith SE & Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edition. Academic Press, London, UK.
- Tibbett M, Sanders FE & Cairney JWG (1998) The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. In axenic culture. *Mycol Res* **102**: 129-135.
- Torres Aquino M & Plassard C (2004) Dynamics of ectomycorrhizal mycelial growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 149-156.
- Turner BL, Frossard E & Baldwin DS (2005) *Organic phosphorus in the environment*. CABI Publishing, 875 Massachusetts Avenue, Cambridge, USA, 399 p.

Wallander H, Fossum A, Rosengren U & Jones H (2005) Ectomycorrhizal fungal biomass in roots and uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings growing in forest soil with and without wood ash amendment. *Mycorrhiza* **15**: 143-148.

CHAPITRE 1

Synthèse bibliographique

Le phosphore (P) est le cinquième élément composant la matière vivante. Quelque soit sa forme, l'atome de P est toujours associé à des atomes d'oxygène pour former le groupement phosphate PO_4^{3-} . La formation d'une liaison anhydride d'acide entre deux groupements phosphate (ex ATP) riche en énergie (ΔG° de $-7,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) lui confère un rôle central dans le stockage de l'énergie cellulaire. Le groupement phosphate entre aussi dans la composition de nombreuses molécules telles que les acides nucléiques (ADN, ARN) et les phospholipides, ce qui lui confère un rôle structural fondamental. Enfin, le processus de phosphorylation/déphosphorylation des protéines est un des principaux mécanismes de régulation du métabolisme cellulaire, ce qui confère au groupement phosphate un rôle supplémentaire dans le bon fonctionnement de la machinerie cellulaire. Cependant, malgré cette importance fondamentale dans le cycle du vivant, l'approvisionnement en P est une contrainte majeure pour de nombreux organismes vivants du sol.

1. Le phosphore dans le sol

1.1. Le cycle global de P dans le sol

La **Figure 1.1** (Walbridge, 1991) montre la complexité et la diversité des mécanismes géochimiques et biologiques responsables du cycle de P dans les sols naturels. L'ensemble du cycle de P est centré autour de la seule forme de P utilisable par les organismes vivants qui est le P en solution (Solution P, **Figure 1.1**). L'approvisionnement de ce pool de P en solution est sous l'influence de deux sous-cycles : un cycle biologique dans lequel les pools de P sont des formes organiques de P dont les transferts sont gouvernés par des réactions biologiques, et un cycle géochimique dans lequel les pools de P sont des composés chimiques et minéralogiques dont les transferts sont gouvernés par des mécanismes abiotiques. Le P du cycle géochimique provient majoritairement de l'altération des roches mères (Larsen, 1967). Les principales réserves naturelles mondiales de P (estimée environ à $5,7 \cdot 10^9$ tonnes) sont constituées de phosphorite, roche phosphatée constituée essentiellement de fluoroapatite.

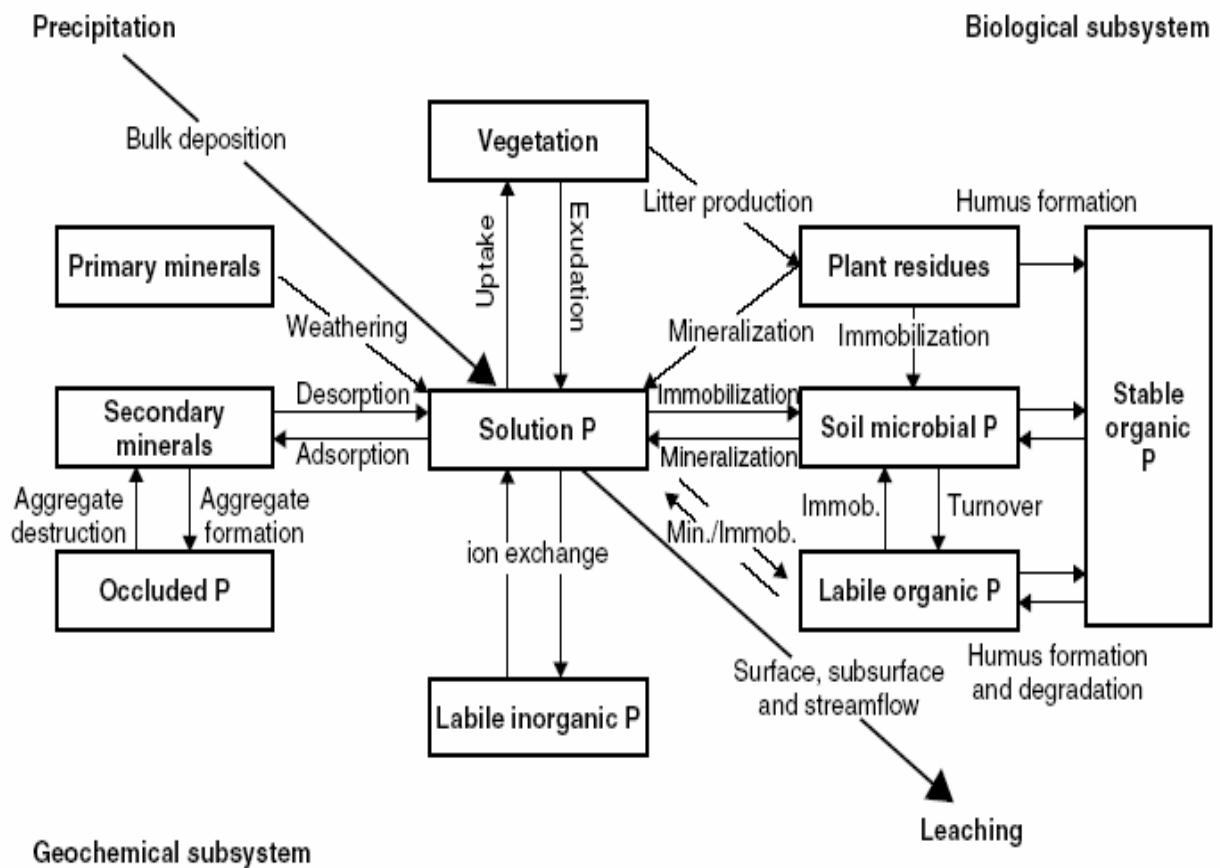


Figure 1.1. Représentation schématique du cycle du phosphore dans le sol (d'après Walbridge, 1991).

Les formes minérales (Pm) et organiques (Po) de P sont très variées dans le sol mais leur adsorption sur la phase solide du sol limite fortement leur diffusion dans la solution du sol. La précipitation de P avec les cations métalliques Al, Ca ou Fe conduit à la formation de minéraux phosphatés insolubles et peu mobiles. Toutefois, un ensemble de processus chimiques et physiques de désorption et adsorption vont contribuer au réapprovisionnement de la solution en P à partir de la phase minérale du sol. Les organismes vivants (plantes, champignons, bactéries) participent activement au processus de recyclage du P du sol. Malgré une forte immobilisation de P, ils sont capables de libérer P par solubilisation du Pm et par minéralisation du Po (**Figure 1.1**). Des pertes importantes de P peuvent également se produire par lessivage. Les phénomènes climatiques comme les précipitations peuvent augmenter la solubilisation du P. Des mesures sur la quantité en P présente dans une prairie du Canada ont démontré que les précipitations en fin de saison estivale conduisaient à une augmentation de la concentration en P de 0,08 g/m² à 0,25 g/m² (Halm *et al.*, 1972). Toutefois, il est important

de noter que les processus géochimiques et biologiques sont étroitement liés et permettent conjointement le recyclage du P dans la rhizosphère.

1.2. Les principales formes de P dans le sol et leur devenir

1.2.1 Le phosphore minéral

Les ions orthophosphates ou Pi constituent la seule forme de P directement assimilable par les plantes. La faible mobilité du Pi dans la solution du sol, estimée de 10^{-12} à 10^{-15} m².s⁻¹ (Schachtman *et al.*, 1998), résulte de sa forte réactivité avec les constituants du sol. Seule une faible proportion de P est présente sous forme de Pi en solution et sa concentration se maintient pour la majorité des sols entre 0,1 et 10 µM (Mengel & Kirkby, 1987 ; Hinsinger, 2001).

Les formes ioniques du Pi en solution proviennent de la dissociation de l'acide orthophosphorique. En fonction du pH de la solution, on note trois réactions de dissociation de l'acide orthophosphorique dont les valeurs de pKa sont présentées dans le **tableau 1.1**. Dans la gamme de pH mesurée dans la plupart des sols (pH 4-8), HPO₄²⁻ et H₂PO₄⁻ sont les deux principales formes de Pi présentes en solution. La forme H₂PO₄⁻ domine dans les sols acides tandis que la forme trivalente PO₄³⁻ ne se forme que pour des valeurs de pH très alcalines supérieures à 10 (**Figure 1.2**).

Tableau 1.1. Constantes de dissociation (pKa) des réactions de dissociation de l'acide orthophosphorique (Lindsay, 1979)

Dissociation	Réaction d'équilibre	pKa
1	$\text{H}_3\text{PO}_4 \leftrightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}^+$	2,15
2	$\text{H}_2\text{PO}_4^- \leftrightarrow \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$	7,20
3	$\text{HPO}_4^{2-} \leftrightarrow \text{PO}_4^{3-} + \text{H}^+$	12,35

Du fait de leur charge négative, les ions phosphate sont capables de se combiner avec de nombreux éléments du sol pour former des minéraux phosphatés avec des cations libres dans le sol comme le calcium, l'aluminium et le fer dont quelques exemples sont donnés dans le **tableau 1.2** En sols neutres ou légèrement alcalins, l'interaction des ions Pi avec les ions

Ca^{2+} conduit à la formation de différents phosphates de calcium (**Tableau 1.2**). Parmi ceux-ci, la formation des apatites peut être définie par une formule chimique de base $\text{M}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ où le minéral (M) est du Ca^{2+} et l'anion (X) peut être F^- (fluoroapatite), Cl^- (chloroapatite), OH^- (hydroxyapatite) ou CO_3^{2-} (Paul & Clark, 1989). Le calcium peut être remplacé par le magnésium, le manganèse, le césium ou d'autres cations. Les travaux d'Arvieu (1974) ont démontré que dans un sol calcaire représentatif, les phosphates monocalciques précipitent rapidement avec le carbonate de calcium ($\text{Ca}^{2+}\text{CO}_3^{2-}$) pour donner des phosphates dicalciques dihydratés évoluant ensuite en apatites (Sample *et al.*, 1980). En sols à pH très élevé ($\text{pH} > 8$) les phosphates mono- et dicalciques se transforment en phosphates tricalciques, puis en phosphates cristallisés de type apatite.

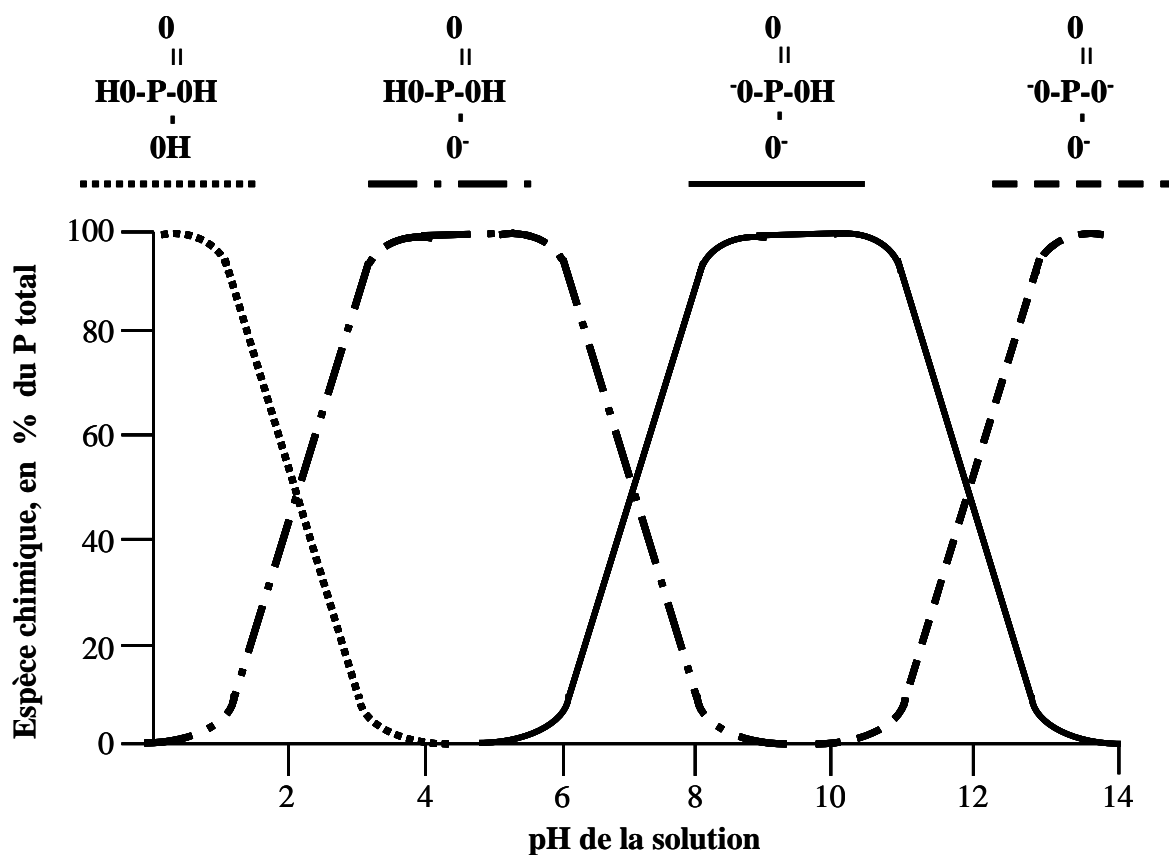


Figure 1.2. Distribution des différentes formes ioniques de l'acide orthophosphorique en solution en fonction du pH (Redessiné d'après Brady & Weil, 1996)

Par contre, dans les sols acides et réducteurs, l'abondance des ions libres Fe^{2+} et Al^{3+} provoque la précipitation du P sous forme de phosphates de Fer et d'Aluminium (**Tableau 1.2**) qui sont très peu solubles (Lindsay *et al.*, 1989 ; Morel, 1996).

Les ions phosphates peuvent être complexés à la surface de solides qui sont composés par exemple de silice, d'argile, d'hydroxydes métalliques, de carbonates ou de sulfures

(Behra *et al.*, 1999). Ces solides peuvent se comporter comme un centre métallique pour le ligand négatif (L^{y-}) et l'échange de ligands entre ions OH^- et anions avec une ou deux charges négatives aura pour résultat la complexation de l'anion considéré (par exemple le phosphate) à la surface du solide selon l'équation suivante (Behra *et al.*, 1999) :

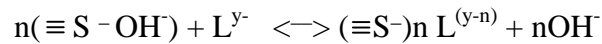


Tableau 1.2. Quelques minéraux phosphatés communs dans les sols (d'après Barber, 1984)

Phosphates de calcium	Phosphates d'aluminium	Phosphates de fer
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ Fluoroapatite	$\text{AlPO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$ Variscite	$\text{FePO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$ Strengite
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ Hydroxyapatite	$\text{H}_6\text{K}_3\text{Al}_5(\text{PO}_4)_8, 18 \text{H}_2\text{O}$ Taranakite de potassium	
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Phosphate tricalcique	AlPO_4 Berlinite	
$\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3, 2,5 \text{H}_2\text{O}$ Phosphate octocalcique		
CaHPO_4 Phosphate dicalcique		
$\text{CaHPO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$ Phosphate dicalcique dihydraté		

1.2.2. Le phosphore organique

On peut définir le phosphore organique (Po) comme l'ensemble des composés comportant un ou plusieurs groupements phosphate et qui sont produits par le métabolisme des êtres vivants. De ce fait, le Po dérive principalement des résidus végétaux, des cellules microbiennes et fongiques et des métabolites cellulaires. Le Po peut représenter jusqu'à 80% du P total présent dans un sol (Richardson, 1994 ; Condrón & Tiessen, 2005). Il est essentiellement présent sous forme de phosphates d'inositol (phytate) et secondairement sous forme de sucres, acides nucléiques, et phospholipides (Mengel & Kirby, 1987) (**Figure 1.3**). Les phosphates d'inositol constituent des réserves phosphorées (Frossard *et al.*, 1995) provenant en majorité des plantes et stockées dans les graines. Les différentes formes de Po peuvent être classées selon le nombre de liaison ester reliant le groupement P et le C. Une seule liaison définit les

phosphates monoesters $R-O-PO_3H_2$ et deux liaisons les phosphates diesters $R-O-(PO_2H)-O-R'$. On distingue également le groupe des phosphoanhydrides organiques caractérisés par la liaison $P-O-P$ comme l'ADP, l'ATP et les polyphosphates (**Tableau 1.3**).

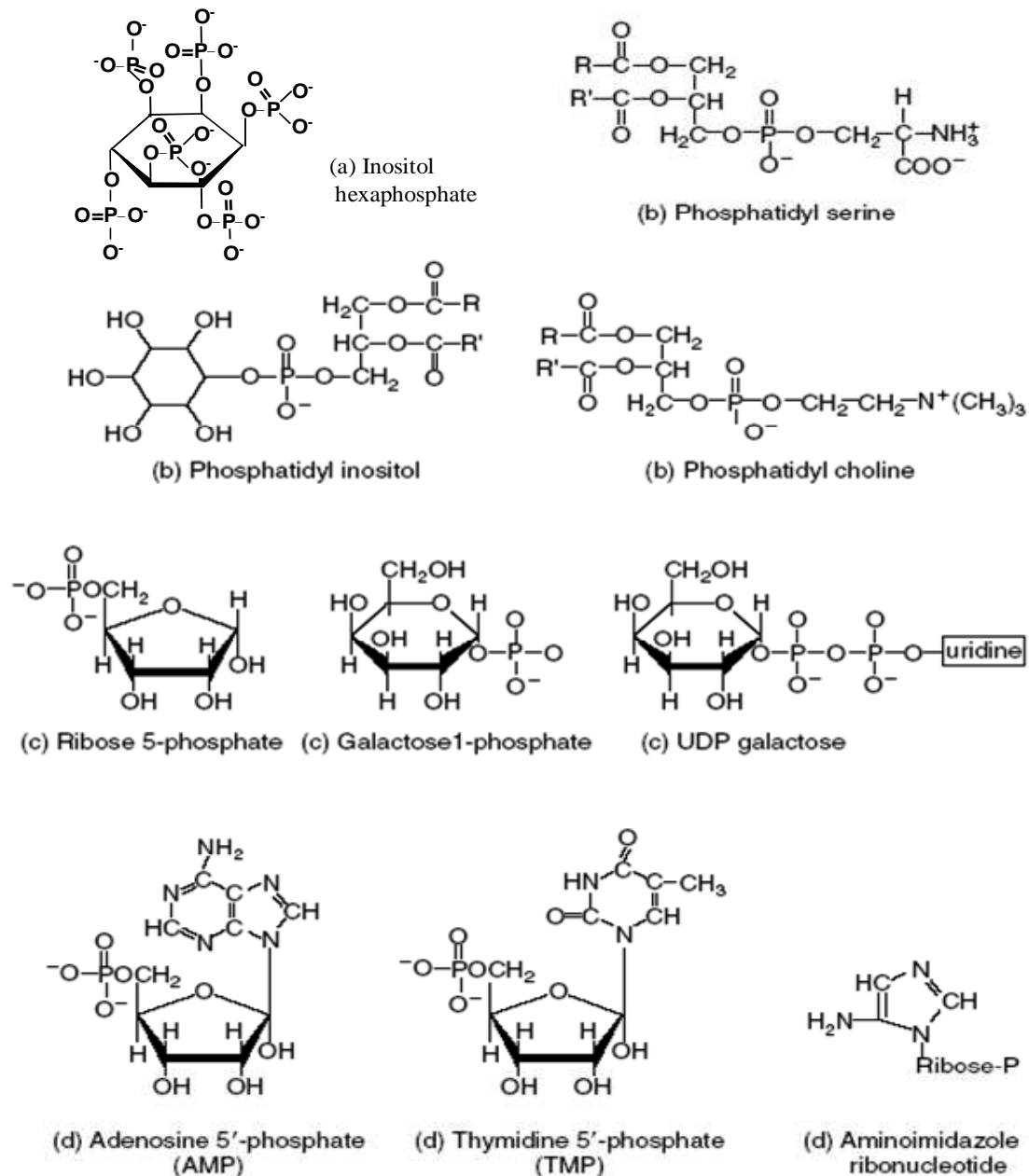


Figure 1.3. Exemples de composés de P organique. (a) Hexaphosphate d'inositol. Quand les charges négatives portées par les groupements phosphate sont associées à H^+ , il s'agit de l'acide phytique. (b) Phosphoglycérides (c) Sucres phosphatés. (d) Composants des acides nucléiques (adapté à partir de Plante, 2007).

Tableau 1.3. Tableau récapitulatif des principaux composés naturels de P organiques pouvant être présents dans l'environnement (d'après Turner *et al.*, 2005)

Composé	Formule chimique	Classe	Commentaires
Acide désoxyribonucléique	$C_2H_8NO_4P$	diester	
Acide ribonucléique		diester	
<i>myo</i> -inositol hexakisphosphate (acide phytique)	$C_6H_{18}O_{24}P_6$	monoester	Principal source de Po chez les plantes
D- <i>chiro</i> -inositol hexakisphosphate	$C_6H_{18}O_{24}P_6$	monoester	Origine microbienne
α -Glucose 1-phosphate	$C_6H_{13}O_9P$	monoester	Sucre répandu chez les plantes
Adénosine 5'-monophosphate	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	monoester	
Adénosine 5'-diphosphate	$C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$	polyphosphate	
Adénosine 5'-triphosphate	$C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$	phosphoanhydride	
β -Glycérophosphate	$C_3H_9O_6P$	monoester	Synthétisé par le clivage enzymatique de la choline
Phosphoénolpyruvate	$C_3H_5O_6P$	monoester	Commun chez les plantes
L- α -phosphatidyl ethanolamine	$C_7H_{12}NO_8P(2R)$	diester	Phospholipide chez les microorganismes
L- α -phosphatidyl-L-sérine	$C_8H_{12}NO_{10}P(2R)$	diester	Phospholipides chez les mammifères
Polyphosphate (linéaire)	$H_{2n}O_{3n+1}P_n$	phosphoanhydride	Origine microbienne
Pyrophosphate	$H_4O_7P_2$	phosphoanhydride	
Phosphocreatine	$C_4H_{10}N_3O_5P$	monoester	Commun chez les muscles des vertébrés

La présence d'un ou plusieurs groupements phosphate dans les composés de Po entraîne une faible mobilité dans la solution du sol. En effet, ils peuvent être fortement adsorbés par les minéraux argileux et peuvent former avec la matière organique des composés difficilement dégradables ou précipiter avec les oxydes de Fe ou d'Al dans les sols acides ou de Ca et Mg dans les sols alcalins. Le taux d'adsorption du Po dans les sols est fonction de sa structure, notamment du nombre de résidus P, de sa charge mais aussi de sa taille moléculaire.

Ainsi, les phosphates d'inositol s'adsorbent plus facilement à la surface des argiles que les acides nucléiques, les phospholipides ou les sucres simples (Leytem *et al.*, 2002). La difficulté d'accessibilité aux formes de Po en interaction avec les argiles et la matière organique du sol implique qu'une grande proportion de Po du sol reste encore chimiquement non déterminée (Turner *et al.*, 2005).

1.2.3. Les mécanismes de la mobilisation de P

1.2.3.1. Les mécanismes physico-chimiques

Les mécanismes physico-chimiques responsables de la mobilisation de P sont l'altération (weathering) des minéraux primaires, la destruction des agrégats qui libère des minéraux P secondaires suivie de la désorption des ions phosphate contenus dans ces minéraux et enfin les échanges ioniques qui permettent la mise en solution de Pi à partir du pool labile de P inorganique (**Figure 1.1**). Cependant, le mécanisme majeur qui détermine la mise en solution de Pi à partir des minéraux phosphatés ou des surfaces d'échanges du sol est la variation de pH de la solution du sol (Hinsinger, 2001). Concernant la dynamique de dissolution des minéraux phosphatés, les isothermes de dissolution/précipitation de ces minéraux peuvent être établis en fonction du pH et de la concentration en H_2PO_4^- de la solution (**Figure 1.4**). Pour chaque minéral, les points situés au-dessus des isothermes indiquent une précipitation du minéral. Il est ainsi possible de voir qu'à pH acide, les minéraux de fer et d'aluminium précipitent pour de très faibles concentrations en Pi. Inversement, l'augmentation du pH de la solution du sol augmente leur solubilité (**Figure 1.4**). La précipitation des minéraux calciques requiert des valeurs de concentration en Pi et de pH plus élevées que les phosphates de fer et d'aluminium. Par conséquent, une acidification du pH d'un sol riche en minéraux calciques pourra facilement libérer du Pi à partir de ces minéraux, en particulier le phosphate dicalcique dihydraté (**Figure 1.4**).

De la même façon, le pH de la solution détermine la charge nette de surface de nombreuses phases solides, en particulier les oxydes de fer et d'aluminium, qui présentent une valeur de pH pour laquelle elles ne sont pas chargées (pHpzc) (Behra *et al.*, 1999). Le **tableau 1.4** donne les valeurs de pHpzc de quelques solides du sol et montre qu'il existe une très grande variabilité de ces valeurs de pH. Lorsque le pH est inférieur à la valeur de pHpzc, les surfaces sont chargées positivement et peuvent fixer les anions comme le phosphate. Lorsque le pH est supérieur à la valeur de pHpzc, les surfaces sont chargées négativement et peuvent libérer les anions comme le phosphate. Toutefois, les anions phosphate retenus à la surface de

ces composés solides peuvent être échangés par échange de ligands avec des anions organiques comme le citrate ou l'oxalate.

1.2.3.2. Les mécanismes biologiques

Le sol contient une très grande diversité d'organismes (bactéries, champignons, plantes) capable de libérer du Pi à partir des formes de P minérales et organiques (Cosgrove, 1977). Les organismes vivants du sol sont capables de libérer du Pi à partir de P minéral et notamment des minéraux phosphatés du sol. **La solubilisation** de P minéral s'effectue par la sécrétion de ligands ou acides organiques qui vont se complexer avec le calcium, le fer ou l'aluminium, libérant ainsi du Pi dans la solution du sol (Hinsinger, 1998 ; Jones, 1998). Le Pi libéré dans la solution du sol par minéralisation ou solubilisation peut être absorbé par les plantes et les champignons, immobilisé par la population bactérienne, adsorbé sur les surfaces minérales ou perdu par lessivage et ruissellement (**Figure 1.1**).

La **minéralisation** des composés de P organique s'effectue grâce à la sécrétion d'enzymes qui ont la propriété de catalyser l'hydrolyse des liaisons esters phosphoriques et d'anhydrides d'acides en libérant du Pi (Figure 1.1). Ces enzymes appartiennent à un groupe très diversifié appelé phosphatases (Burns, 1982). Parmi les phosphatases, on peut différencier les phosphomonoestérases, les phosphodiesterases, les phytases et les nucléases qui vont respectivement libérer du Pi à partir des monoesters, des diesters, du phytate (acide phytique ou phytine) et des acides nucléiques (Figure 1.3). Ces enzymes peuvent être adsorbées sur la phase solide du sol, notamment avec les argiles, modifiant ainsi leurs propriétés catalytiques (Leprince & Quiquampoix, 1996 ; Quiquampoix & Mousain, 2005). Il est estimé que 70 à 80% des phosphatases sécrétées dans la rhizosphère sont d'origine bactérienne (Plante, 2007).

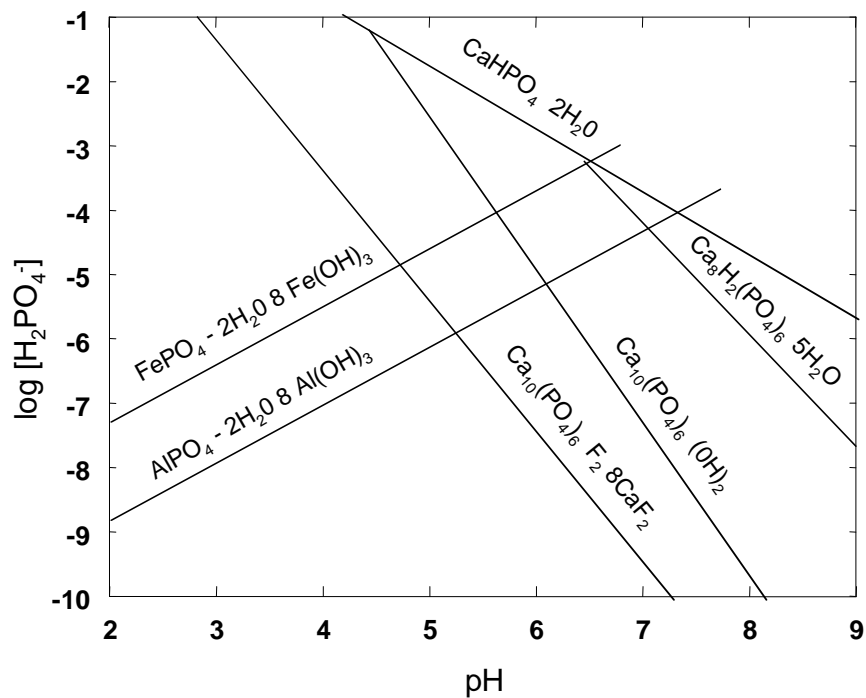


Figure 1.4. Isothermes de solubilisation des minéraux phosphatés indiqués. L'activité ionique du calcium est fixée arbitrairement à 3,2 mM. Les activités de l'aluminium et du fer sont contrôlées par la solubilité de leurs oxydes (redessiné d'après Olsen & Khasawneh, 1980 dans Barber, 1984)

Tableau 1.4. Valeurs de pH pour le point de charge zéro (pHpzc) de quelques phases solides (d'après Stumm, 1992 dans Behra *et al.*, 1999)

Matériel	pHpzc	Matériel	pHpzc
α -Al ₂ O ₃ (corundium)	9,1	β -MnO ₂ (birnessite)	7,2
α -Al(OH) ₃ (gibbsite)	5,0	SiO ₂ (quartz)	2,0-3,0
γ -AlOOH(boehmite)	8,2	TiO ₂ (anatase, rutile)	6,3
BeO	10,2	ZrO ₂	6,4
CuO (tenorite)	9,5	ZrSiO ₄	5,0
Fe ₃ O ₄ (magnetite)	6,5	Albite	2,0
α -FeOOH (goethite)	7,8	Chrysolithe	> 10
α -Fe ₂ O ₃ (hematite)	8,5	Feldspars	2-2,4
FeOOH (amorphe)	8,1	Kaolinite	4,6
MgO	12,4	Latex	8,0
δ -MnO ₂ (vernadite)	2,8	Montmorillonite	2,5

Note des auteurs (Behra *et al.*, 1999) : les valeurs ne sont pas des valeurs absolues car elles dépendent du modèle utilisé pour les estimer.

2. La nutrition phosphatée chez la plante

Comme indiqué précédemment, le P est présent sous de nombreuses formes dans le sol mais seul l'ion orthophosphate ou Pi (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) peut être directement absorbé par les plantes. Sa faible concentration dans les sols (Bielecki, 1973 ; Hinsinger, 2001) et sa faible diffusion (Schachtman *et al.*, 1998) font que la biodisponibilité de cet ion est un facteur limitant pour la production des écosystèmes. Les besoins importants en Pi chez la plante font que sa vitesse d'absorption par les racines soit plus rapide que celle de sa diffusion dans le sol. La principale conséquence de ces vitesses très contrastées est la formation d'une zone d'épuisement en Pi autour de la racine appelée zone de déplétion. Cependant, les plantes ont développé de nombreuses stratégies leur permettant d'assimiler le Pi avec une plus grande efficacité dans des sols appauvris en cet élément. Ces stratégies consistent tout d'abord à (i) une augmentation de la croissance racinaire, (ii) la mise en place d'organes spécialisés (Skene, 1998), (iii) l'expression de transporteurs de Pi à haute affinité (Raghothama & Karthikeyan, 2005), (iv) la sécrétion d'exsudats racinaires et d'enzymes spécialisées (Duff *et al.*, 1994 ; Jones, 1998) et (v) l'association symbiotique avec des champignons du sol (Smith & Read, 2008).

2.1. Une stratégie individuelle

2.1.1. La morphologie et le dynamisme du système racinaire

2.1.1.1. Architecture racinaire

Brièvement, l'architecture du système racinaire résulte de la croissance de la racine primaire, de la vitesse d'émission des racines secondaires et de leur vitesse d'allongement, ainsi que de la durée de ces différentes phases (Beemster & Baskin, 1998). Etant donné l'immobilité relative de P dans le sol, la configuration spatiale et la vitesse de croissance du système racinaire sont essentielles pour avoir accès continuellement à des nouveaux pools de P disséminés dans les différents horizons du sol. Dans ce contexte, de nombreuses études ont pu mettre en évidence des changements nets à la fois sur la croissance et l'architecture racinaire en réponse à une déficience en Pi (Lynch, 1995). Les travaux de Jackson *et al.* (1990) reportent les effets d'une répartition localisée du P dans le sol sur la prolifération et la croissance du système racinaire au niveau de ces points de nutrition chez plusieurs espèces pérennes d'Amérique du Nord. De la même façon, des études ont été réalisées sur le haricot commun afin de sélectionner des génotypes dont les traits architecturaux permettaient une meilleure adaptation aux sols appauvris en P (Lynch & Brown, 2001). Parmi ces traits

architecturaux, la trajectoire gravitropique des racines basales, l'enracinement accidentel, la dispersion des racines latérales et la plasticité de ces processus en réponse aux variations de disponibilité en P contribuent à l'efficacité d'absorption de P chez cette espèce. Similairement à Jackson *et al.* (1990), ces auteurs ont montré une forte croissance des racines dans les horizons du sol riches en matière organique.

La disponibilité de P exerce un effet très marqué à la fois sur l'évolution architecturale et la dynamique de croissance du système racinaire. En effet, Williamson *et al.* (2001) ont démontré que chez *Arabidopsis thaliana* la croissance en conditions de déficience en P induisait un ralentissement de l'élongation de la racine primaire et une augmentation de la densité des poils racinaires et de l'élongation des racines latérales ou secondaires. Un tel profil de croissance permet une meilleure exploration par les racines latérales des couches superficielles du sol. Toutefois, une forte biodisponibilité du P dans le milieu extérieur induit également des modifications de l'architecture racinaire. Ainsi, dans les parcelles naturelles où des pratiques de fertilisation annuelle et répétitive se mettent en place, on peut observer des changements significatifs de la biomasse racinaire, du diamètre racinaire et de la taille des racines fines comparés à des parcelles non fertilisées (Bakker *et al.*, 2009).

2.1.1.2. Production de poils racinaires

Les poils racinaires sont des cellules différenciées d'une assise cellulaire de la racine appelée zone pilifère localisée au dessus de la zone d'élongation racinaire. Ces poils racinaires, appelés aussi trichoblastes, ont une forme tubulaire de quelques millimètres de longueur et de 12 à 15 microns de diamètre (Gilroy & Jones, 2000). Ils sont spécialisés dans l'absorption de l'eau et des nutriments à partir de la solution du sol. Leur forme allongée permet l'augmentation de l'aire de surface d'absorption de la racine et l'exploration d'un plus grand volume de sol. Leur durée de vie est de quelques jours mais ils sont sans cesse renouvelés au fur et à mesure de la croissance racinaire. Outre leur fonction dans la nutrition minérale de la plante, les poils racinaires sont impliqués dans les processus de mise en place de la symbiose mycorhizienne (Harley & Smith, 1983) et nodulaire chez les légumineuses (Torrey & Callahan, 1978).

L'importance des poils racinaires dans l'acquisition de P a été démontrée par l'observation d'une zone de déplétion au ^{32}P autour de la zone pilifère des racines de blés (Lewis & Quirk, 1967) et d'oignons (Bhat & Nye, 1974). De nombreuses études ont montré une augmentation de la densité et de la longueur des poils racinaires en réponse à la déficience en P_i chez certaines légumineuses et céréales (Reid, 1981 ; Jungk *et al.*, 1990).

Chez *Arabidopsis thaliana* la densité des poils racinaires en condition de déficience en Pi (1 mmol m^{-3}) était 5 fois plus élevée comparée à celle en condition de suffisance en Pi (1000 mmol m^{-3}) (Ma *et al.*, 2001). Cette augmentation de la densité en réponse à la déficience en Pi pouvait s'expliquer par une plus grande stimulation du nombre de cellules de l'assise cellulaire pouvant se différencier en trichoblastes. En résumé l'ensemble de ces résultats démontre clairement que le développement des poils racinaires ainsi que l'augmentation de leur longueur permet d'acquérir plus efficacement le P dans des sols appauvris en cet élément (Gahoonia & Nielsen, 1997).

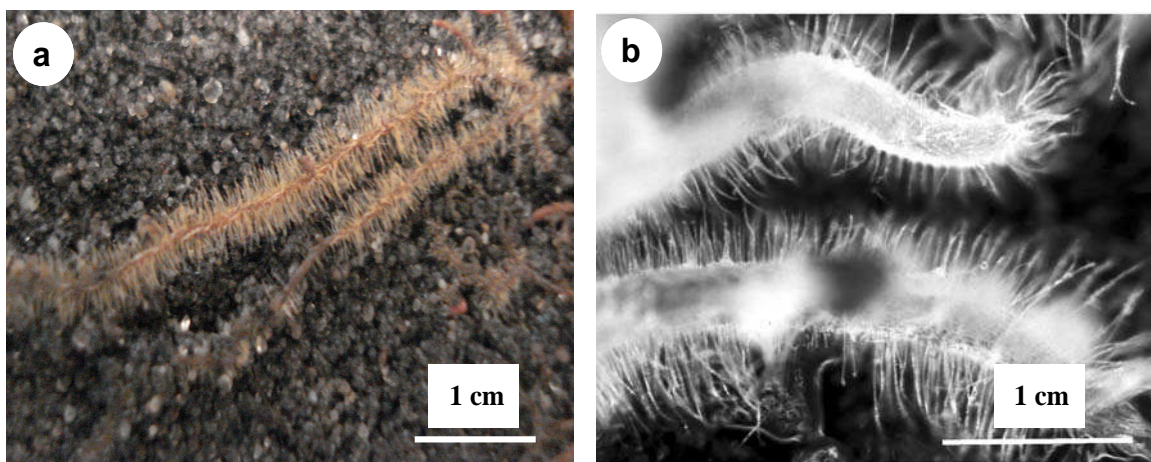


Figure 1.5. (a) Formation de poils racinaires sur des racines latérales de *Pinus pinaster* en croissance sur un sol sableux (podzol) déficient en P (Photo Louche J). (b) Développement de poils racinaires sur une radicule mature de *Hakea prostrata* en culture hydroponique sous conditions de déficience en P ($P_i \leq 1 \text{ mM}$) (d'après Shane & Lambers, 2005).

2.1.1.3. Formation de "Cluster roots"

Après la symbiose mycorhizienne, la formation de « cluster roots » est considérée comme l'une des adaptations majeures pour l'assimilation du P dans les sols appauvris (Skene, 1998). Les « cluster roots » sont des structures racinaires particulières que l'on retrouve majoritairement chez les plantes de la famille des Protéacées. Ces structures sont constituées d'un regroupement très compact de plusieurs radicules latérales de quelques millimètres de longueur sur une section de la racine (Purnell, 1960) permettant ainsi d'augmenter considérablement la surface d'absorption de la racine. En effet, les valeurs de surface d'absorption et de volume d'exploration du sol par une racine présentant une structure en cluster roots chez *Leucadendron lauroolum* étaient respectivement 140 et 300 fois plus élevées comparées à celles d'une même longueur racinaire ne présentant pas cette structure

(Lamont, 1983). Des niveaux faibles de concentrations en P stimulent la formation de cluster roots (Skene *et al.*, 1996). Plusieurs auteurs ont démontré qu'en conditions naturelles les structures en cluster roots se formaient préférentiellement dans les horizons du sol riches en matière organique (Lamont, 1973 ; Gould 1998). D'autre part, les cluster roots constituent des zones privilégiées pour la sécrétion d'exsudats racinaires (Dinkelaker *et al.*, 1989 ; Shu *et al.*, 2007) et de phosphatases acides (Gilbert *et al.*, 1999 ; Wasaki *et al.*, 2003) qui permettent la libération à partir des formes de P qui ne sont pas libres dans la solution du sol.

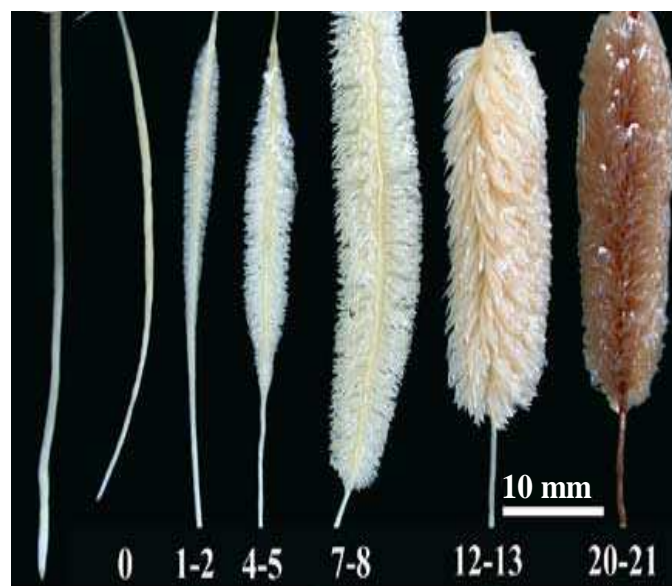


Figure 1.6. Présentation des différentes étapes de la formation d'une cluster root chez *Hakea prostrata*. Les racines sont classées, de gauche à droite, par ordre chronologique de développement du début du gonflement de l'axe (jour 0) jusqu'à la sénescence de la cluster root (jours 20 à 21). La racine présentée sur l'extrémité gauche de l'image est une racine sans formation de cluster (d'après Shane & Lambers, 2005).

2.1.2. Les exsudats racinaires

Les exsudats racinaires constituent un mélange de composés organiques et inorganiques complexes résultant du métabolisme cellulaire et dont certains peuvent agir sur la disponibilité des éléments minéraux en solution (Hinsinger, 1998). Les exsudats racinaires sont majoritairement des acides organiques ou ligands, des enzymes, des ions inorganiques (OH^- , H^+ , HCO_3^-), des molécules gazeuses (CO_2 , H_2) et minoritairement des métabolites comme les sucres, les vitamines, ou les acides aminés (Jones, 1998 ; Dakora & Phillips, 2002). En fonction de la nature des exsudats racinaires on distingue deux types d'actions :

ceux qui arrachent directement des éléments minéraux à partir des constituants du sol (enzymes, anions organiques) et ceux qui vont modifier le pH de la rhizosphère au voisinage de la racine (ions inorganiques) et par conséquent augmenter la mobilité chimique de certains éléments comme le P (Dakora & Phillips, 2002).

Il existe de nombreuses formes d'acides organiques (citrique, malonique, oxalique, formique...) et les formes sécrétées sont fonctions de l'espèce de la plante, de son âge mais aussi des conditions physicochimiques de l'environnement (Curl & Trueglove, 1986 ; Jones, 1998). Ces acides jouent un rôle crucial pour la mobilité et l'acquisition du P chez les plantes dans les sols appauvris en cet élément. Ils sont capables d'augmenter la biodisponibilité du P en libérant du P à partir des phosphates solubles de fer, d'aluminium et de calcium par échanges anioniques (Marschner, 1995). Il a aussi été proposé qu'ils favorisent la solubilisation du P_i en saturant les sites potentiels de fixation du P_i sur la matière organique (Dinkelaker *et al.*, 1989). Ainsi, de nombreuses études montrent une forte corrélation entre l'augmentation de la concentration en acides organiques sécrétée dans le milieu extérieur et l'amélioration de la nutrition en P chez la plante en présence de P minéral (Neumann & Römheld, 1999 ; Shu *et al.*, 2007). Dans des conditions de culture hydroponique, Hoffland (1992) a montré chez le colza que la sécrétion de citrate et de malate s'accompagne de la solubilisation d'un phosphate naturel, la phosphorite.

2.1.3. Les phosphatases acides racinaires

La sécrétion des phosphatases acides constitue également une réponse adaptative majeure chez les plantes pour faire face à la faible disponibilité en P des sols (Duff *et al.*, 1994). Les phosphatases acides sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons esters phosphoriques et d'anhydrides des composés organiques (**Figure 1.3, Tableau 1.3**) libérant ainsi du P_i au voisinage de la racine. Elles sont également synthétisées par les bactéries (Boyce & Walsh, 2007) et les champignons (Tasaki *et al.*, 2006). La classification ainsi que les différents paramètres régulant l'activité catalytique de ces enzymes seront discutés en détails par la suite. L'augmentation des activités phosphatases en réponse à la déficience en P_i est très bien documenté chez les plantes (Doumas *et al.*, 1983 ; Goldstein *et al.*, 1988 ; Coello, 2002). Plusieurs études ont démontré que l'augmentation de l'activité phosphatase autour de la racine entraînait la formation d'une zone de déplétion en P organique traduisant ainsi l'efficacité de ces enzymes à libérer du P_i à partir du P organique au profit de la racine (Tarafdar & Jungk, 1987 ; George *et al.*, 2006). Toutefois, Tarafdar & Jungk (1987) ont montré que cette zone de déplétion s'effectuait à une distance proche de la racine, soit 0,8 mm

pour le trèfle et 1,5 mm pour le blé, impliquant que le volume de sol exploré autour de la racine par les enzymes reste limité.

D'autre part, l'augmentation de l'activité phosphatase sous déficience en Pi apparaît être corrélée avec une augmentation de l'expression des gènes codant pour des phosphatases acides (Wasaki *et al.*, 1999 ; Baldwin *et al.*, 2001 ; Miller *et al.*, 2001). Cependant, peu d'études quantifient la contribution effective des phosphatases acides dans la nutrition P des plantes. Toutefois, les études biochimiques et moléculaires suggèrent fortement que la sécrétion des phosphatases acides constitue une partie intégrante des mécanismes de réponse des plantes à la faible disponibilité en P des sols.

2.1.4. Les transporteurs de Pi au niveau de l'interface sol/racine chez les plantes

Les transporteurs de Pi sont des protéines localisées dans la membrane plasmique responsables de l'absorption du Pi circulant dans la solution du sol. Les transporteurs de Pi identifiés chez les plantes sont tous des symports $H^+ : Pi$ appartenant à la famille *Pht1* (Daram *et al.*, 1999). Ils sont constitués de 12 domaines transmembranaires répartis en deux groupes de six séparés par une longue boucle centrale hydrophile (Smith *et al.*, 2000). A ce jour, ils ont été identifiés chez de nombreuses espèces végétales comme *Arabidopsis thaliana* (Muchhal *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 1997 ; Lu *et al.*, 1997), *Solanum tuberosum* (Leggewie *et al.*, 1997 ; Rausch *et al.*, 2001), *Lycopersicon esculentum* (Liu *et al.*, 1998a), *Medicago truncatula* (Liu *et al.*, 1998b), *Oryza sativa* (Paszkowski *et al.*, 2002) et *Catharanthus roseus* (Kai *et al.*, 1997). Il est admis que la majorité des transporteurs de Pi impliqués dans l'absorption du P au niveau de l'interface racine/sol sont à haute affinité tandis que ceux responsables de la mobilisation du Pi interne de la plante sont à basse affinité (Daram *et al.*, 1999).

De nombreuses études ont montré que la carence en phosphate provoque une augmentation de la capacité de prélèvement de Pi chez les plantes. Cette augmentation apparaît être corrélée avec une augmentation du niveau d'expression des gènes codant pour des transporteurs de Pi au niveau des racines (Leggewie *et al.*, 1997 ; Paszkowski *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 1998b). En effet, une extraction des ARN totaux chez des plantes cultivées en milieu pauvre (0 μM) et riche (250 μM) en Pi a démontré une augmentation rapide du niveau de transcription des transporteurs *LePT1* et *LePT2* dans la racine en conditions de déficience en Pi (Liu *et al.*, 1998a). D'autre part, ces auteurs ont détecté une hausse du niveau de transcrits de *LePT1* dans les feuilles. L'expression simultanée de *LePT1* à la fois dans la partie racinaire et la partie aérienne est en accord avec les travaux décrits par Daram *et al.*

(1998) et Rosewarne *et al.* (1999). De plus, ce profil d'expression a été rapporté pour plusieurs autres gènes codant pour un transporteur de Pi à haute affinité comme *PIT1* chez *Catharanthus roseus* (Kai *et al.*, 1997) et *StPT1* chez *Solanum tuberosum* (Leggewie *et al.*, 1997) indiquant leur implication potentielle dans la translocation du Pi interne.

Ainsi l'adaptation d'une plante à un sol présentant de fortes variabilités de concentrations en Pi nécessite obligatoirement une capacité à réguler l'expression et la fonctionnalité des gènes codant pour des transporteurs de Pi à haute affinité au niveau de la racine. La hausse de l'expression de ces gènes permet une optimisation de l'absorption du Pi dans la solution du sol en conditions de déficience en Pi (Daram *et al.*, 1998 ; Raghothama, 1999, 2000). A l'inverse, la répression de l'expression de ces gènes permet d'éviter une exposition à la toxicité dans des sols riches en P (Shane *et al.*, 2004 ; Lambers *et al.*, 2008).

2.2. Une stratégie collective : la symbiose mycorhizienne

Le phénomène de mycorhization a été observé dans les conditions naturelles les plus diverses et concerne 90% des taxons végétaux. Les plantes non mycorhizées appartiennent à quelques familles végétales dont les Brassicacées, les Chénopodiacées, Saxifragacées, Caryophyllacées et Joncacées. La symbiose mycorhizienne peut être définie comme l'association intime entre les racines fines d'une plante et les hyphes d'un champignon. Cette association va conduire à la formation d'un organe mixte appelé mycorhize au niveau duquel des échanges bénéfiques vont s'opérer entre les deux partenaires. La plante fournira au champignon du C essentiellement sous forme de sucres élaborés par la photosynthèse (photosynthétats) et en retour le champignon fournira à la plante de l'eau et des éléments minéraux, et notamment le P (Smith & Read, 2008). Les mycorhizes peuvent être divisées en plusieurs groupes mais on en distingue essentiellement deux qui sont importants de part leurs intérêts agronomiques et forestiers : les endomycorhizes et les ectomycorhizes, respectivement. Le **tableau 1.5** rapporte quelques études qui ont pu démontrer l'effet bénéfique de la symbiose mycorhizienne sur l'amélioration de la nutrition P de la plante hôte. Cette amélioration de la nutrition phosphatée peut souvent s'accompagner par une stimulation de la croissance comparée aux plantes non mycorhizées dans les mêmes conditions de culture (Mousain *et al.*, 1979, Jentschke *et al.*, 2001).

Tableau 1. 5. Exemples d'association symbiotique montrant le rôle du champignon dans l'amélioration de la nutrition P de la plante hôte.

Plantes hôtes	Champignons	Type de mycorhization	Références
<i>Pinus radiata</i>	<i>Cenococcum graniforme, Suillus luteus</i>	Ectomycorhize	Mejstrik & Krause, 1973
<i>Pinus taeda</i>	<i>Cenococcum geophilum, Pisolithus tinctorius</i>	Ectomycorhize	Rousseau <i>et al.</i> 1994
<i>Pinus rigida</i>	<i>Laccaria bicolor, Pisolithus tinctorius, Paxillus involutus</i>	Ectomycorhize	Cumming, 1996
<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Paxillus involutus, Suillus luteus, Suillus bovinus, Thelephora terrestris</i>	Ectomycorhize	Colpaert <i>et al.</i> 1999
<i>Daucus carota</i>	<i>Glomus intraradices</i>	Endomycorhize	Koide & Kabir, 2000
<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Suillus. variegatus</i>	Ectomycorhize	Wallander, 2000
<i>Betula pendula</i>	<i>Paxillus involutus</i>	Ectomycorhize	Perez-Moreno & Read, 2000
<i>Picea abies</i>	<i>Paxillus involutus</i>	Ectomycorhize	Jentschke <i>et al.</i> , 2001
<i>Salix sp</i>	<i>Hebeloma syrjense</i>	Ectomycorhize	Tibbett & Sanders, 2002
<i>Linum usitatissimum, Medicago truncatula</i>	<i>Glomus caledonium, Glomus intraradices</i>	Endomycorhize	Smith <i>et al.</i> , 2003
<i>Pinus pinaster</i>	<i>Rhizopogon roseolus</i>	Ectomycorhize	Casarin <i>et al.</i> , 2004
<i>Pinus sylvestris</i>	Espèces indigènes	Ectomycorhize	Wallander <i>et al.</i> 2005

3. La symbiose mycorhizienne

Les champignons mycorhiziens ont une fonction essentielle dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers et influencent fortement la diversité et la productivité des forêts. La symbiose mycorhizienne constitue une réponse évolutive majeure pour les plantes face à la faible disponibilité en P dans les sols. Outre l'amélioration de la nutrition minérale, la mycorhization induit d'autres bénéfices comme la tolérance au stress hydrique (Lamhamedi *et al.*, 1992), la tolérance aux métaux (Read, 1999) et la protection contre les pathogènes (Azcon-Aguilar & Barea, 1996). La classification des différents types de mycorhizes ainsi que les connaissances relatives aux mécanismes impliqués dans la mobilisation et le transfert du P vers la plante vont être présentées ci-après.

3.1. Classification

3.1.1. Les ectomycorhizes

Les champignons ectomycorhiziens représentent plus de 5000 espèces fongiques, majoritairement des basidiomycètes et quelques ascomycètes et zygomycètes (Castellano & Bougher, 1994 ; Barker *et al.*, 1998). Les ectomycorhizes constituent le deuxième groupe de mycorhizes le plus fréquemment rencontrés après les endomycorhizes. Les familles végétales formant des ectomycorhizes sont des espèces vasculaires ou ligneuses et représentent seulement 3% des espèces végétales, mais constituent la majorité des espèces des forêts tempérées et boréales (Fagacées, Bétulacées, Pinacées, Myrtacées...) et de certaines forêts tropicales. Dans les forêts boréales et tempérées, on estime que plus de 90% des racines courtes forment des ectomycorhizes (Smith & Read, 2008).

Lors de la formation d'ectomycorhizes, les hyphes du champignon s'associent avec des racines latérales à croissance réduite (**Figure 1.7a,b**). Les filaments mycéliens viennent s'agglomérer autour de la racine pour former un manchon mycélien appelé **manteau fongique** (**Figure 1.7c**). Du côté interne du manteau, des filaments vont pénétrer entre les cellules corticales pour former l'interface symbiotique ou **réseau de Hartig** (**Figure 1.7d**) au niveau duquel s'effectuent les échanges entre les deux partenaires (Peterson & Bonfante, 1994). Du côté externe du manteau, des hyphes vont explorer le sol jusqu'à plusieurs centimètres de la racine et prélever l'eau et les éléments minéraux du sol. L'établissement d'ectomycorhizes provoque une modification très visible de la morphologie racinaire qui devient alors hypertrophiée et de forme variable (simple, dichotome, noduleuse...) (Smith & Read, 2008).

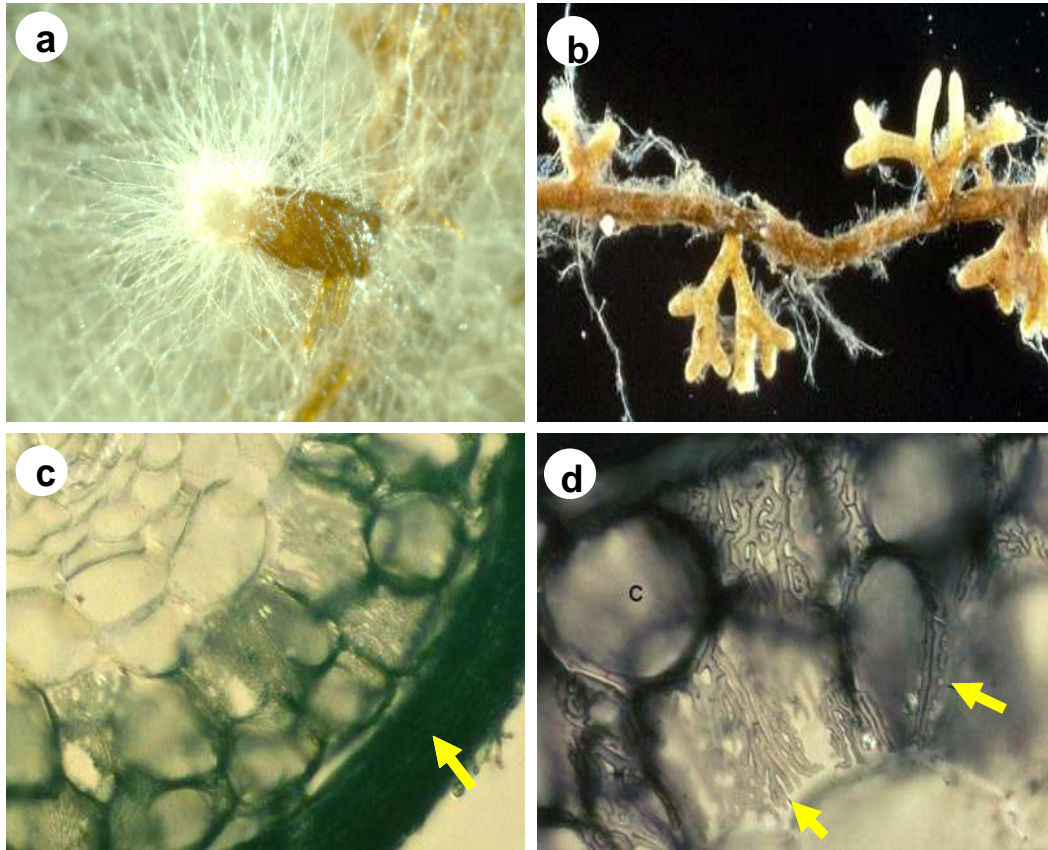


Figure 1.7. (a) Racine de pin maritime (*Pinus pinaster*) mycorhizée par un champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* (Photo Louche J). (b) Ectomycorhizes de *Pinus radiata* inoculées avec *Suillus brevipes* (dans <http://mycorrhizas.info/ecmf.html>). Coupe transversale d'une ectomycorhize de pin blanc (*Pinus strobus*) montrant la formation d'un manteau fongique épais (c, flèche jaune) autour de la racine courte et d'hyphes intercellulaires pénétrant entre les cellules du cortex racinaire (d, flèches jaunes). (c, d) Les racines ont été colorées au noir de Chlorazol E et visualisées au microscope à contraste d'interférences (Brundrett *et al.*, 1990 dans <http://mycorrhizas.info/ecmf.html>).

3.1.2. Les endomycorhizes

Morphologiquement, les endomycorhizes se différencient des ectomycorhizes par l'absence d'un manteau fongique autour de la racine. Les filaments mycéliens pénètrent plus profondément dans les cellules du cortex en traversant la paroi des cellules et en repoussant le plasmalemme. Cependant, les membranes plasmiques du champignon et de la cellule végétale restent intactes, sans aucune communication directe entre elles comme celle établie au travers de la formation de plasmodesmes. Comme les ectomycorhizes, il y a formation d'un réseau d'hyphes extramatriciels explorant le sol. Selon la différenciation morphologique des hyphes intercellulaires, on peut distinguer deux types d'endomycorhizes :

- Les endomycorhizes à **arbuscules** sont les plus répandues car elles se forment avec 80% des espèces végétales (Allen *et al.*, 2003). Les champignons concernés appartiennent à l'ordre des Glomales (Zygomycètes). Les plantes endomycorhizées

peuvent être des végétaux herbacés ou ligneux. Les hyphes intercellulaires peuvent se ramifier en arbuscule (rôle d'échanges) ou se dilater en vésicule (rôle de réserve) (Smith & Read, 2008) (**Figure 1.8**).

- Les endomycorhizes à **pelotons** sont essentiellement formées par des Ascomycètes et des Basidiomycètes. Le filament mycélien pénètre dans les cellules actives et s'enroule sur lui-même pour former un peloton intercellulaire. Ce sont les mycorhizes des orchidées (**mycorhizes orchidoïde**) ou des Ericaceae (**mycorhizes éricoïdes**).

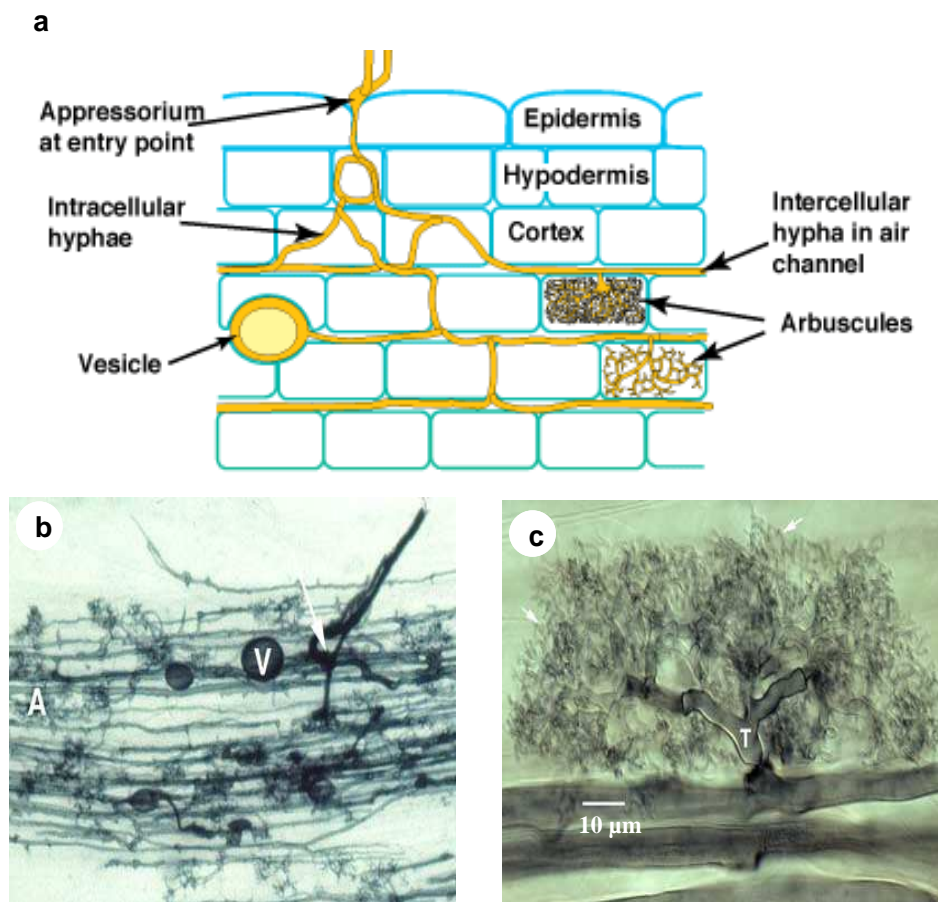


Figure 1.8. (a) Représentation schématique de la formation d'une endomycorhize à arbuscules et de ses différentes structures. (b) Observation microscopique d'une coupe longitudinale de racine endomycorhizée par *Glomus sp.* avec formation de vésicules V et d'arbuscules A. (c) Développement d'un arbuscule de *Glomus mossae* dans une cellule racinaire. Le tronc T de l'arbuscule prend naissance sur un hyphe intercellulaire pour donner des ramifications arbusculaires (<http://mycorrhizas.info/vam.html>). (b, c) Images obtenues au microscope d'interférence de Nomarski.

3.1.3. Les ectendomycorhizes

Les ectendomycorhizes forment un groupe particulier présentant à la fois des caractéristiques des ectomycorhizes et des endomycorhizes. Les hyphes mycéliens forment autour de la racine un manteau fongique généralement plus réduit que celui des ectomycorhizes et les hyphes

franchissent les parois des cellules végétales. Les ectendomycorhizes ont d'abord été considérées comme des infections d'importance mineure chez les conifères, apparaissant en l'absence de champignons ectomycorhiziens. En fait, ce type d'interaction est mutualiste et correspond souvent à une colonisation mycorhizienne précoce des plantules (Smith & Read, 1997).

Parmi les ectendomycorhizes, on différencie les **mycorhizes arbutoïdes** qui se forment entre des végétaux appartenant à la famille des Arbutacées et des basidiomycètes exclusivement. Ces champignons peuvent également former des ectomycorhizes sur d'autres plantes. Ces ectomycorhizes forment des complexes denses d'hyphes dans certaines cellules épidermiques (Smith & Read, 2008). On distingue également les **mycorhizes monotropoïdes** qui se forment avec des végétaux appartenant aux Monotropacées (plante non chlorophyllienne) et un sous-ensemble spécifique de champignons dans la famille des Russulacées et des Boletacées. Pendant longtemps, il a été pensé que seuls les champignons basidiomycètes formaient des mycorhizes monotropoïdes. Il y a pénétration des hyphes intracellulaires dans les cellules racinaires et la formation à la fois du manteau fongique et du réseau de Hartig reste très limitée.

3.2. Formation de la symbiose ectomycorhizienne

Malgré une très grande diversité d'espèces végétales et fongiques dans la rhizosphère, l'association entre les deux partenaires ne s'effectue pas au hasard. Bien au contraire, elle nécessite une reconnaissance spécifique des surfaces cellulaires entre les deux partenaires (Martin *et al.*, 2001). Le processus de formation de la symbiose ectomycorhizienne est caractérisé par des modifications morphologiques s'opérant pendant la colonisation de l'hyphes par la racine (Tagu *et al.*, 2002). Selon Martin *et al.* (1997) ce processus peut être divisé essentiellement en 3 étapes jusqu'à la fonctionnalité de l'organe symbiotique qui sont la pré-infection, l'initiation et la différenciation.

3.2.1. Pré-infection

La pré-infection correspond à l'étape de reconnaissance mutuelle entre le champignon et la racine. L'hyphes colonisateur peut être issu de la germination d'une spore à faible réserve de métabolites et d'énergie ou bien provenir d'une mycorhize déjà existante (Tagu *et al.*, 2002). Le processus de communication d'une cellule à l'autre peut être différent selon que l'hyphes colonisateur provient de la germination d'une spore ou d'une ectomycorhize.

Il est probable que l'étape de pré-infection réside en la reconnaissance de molécules sécrétées dans la rhizosphère par chacun des partenaires. Ces molécules sont regroupées sous le nom de molécules rhizosphériques signal et peuvent être des flavonoïdes, des terpènes, des hormones et autres composés (Martin *et al.*, 2001). En effet, certaines molécules sécrétées parmi les exsudats racinaires sont connues pour stimuler la germination des spores ou la croissance des hyphes chez plusieurs espèces ectomycorhizienne (Martin et Hilbert, 1991 ; Duplessis *et al.*, 2001). Parmi les composés actifs présents dans les exsudats racinaires de *Pinus densiflora*, 11 flavonoïdes (hespéridine, rutine, chrysine...) ont été identifiés comme des composés stimulateurs de la germination des basidiospores chez *Suillus bovinus* (Kikuchi *et al.*, 2007). Similairement, les champignons sécrètent eux aussi des molécules rhizosphériques signal pouvant modifier la croissance ou l'architecture racinaire (Barker & Tagu, 2000). Gay *et al.* (1994) ont reporté que le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* pouvait sécréter une phytohormone (auxine) capable de stimuler la croissance des racines latérales de sa plante hôte et par conséquent d'augmenter son activité de mycorhization.

3.2.2. Initiation

L'étape d'initiation correspond à l'établissement d'un contact physique entre les deux partenaires aboutissant à de profonds changements morphologiques de la cellule fongique. En effet, au contact de la racine, la cellule fongique se gonfle et adhère solidement à la cellule corticale. Cette adhésion peut résulter de la synthèse d'un voile fibrillaire extensif formé de glycoprotéines et de polysaccharides, rayonnant autour des hyphes et permettant leur amarrage à la racine (Guillot, 1997). Ce voile a été observé pour plusieurs types de mycorhizes et il est également formé par des champignons pathogènes et des bactéries symbiotiques. Dans le modèle d'association *Pisolithus/Eucalyptus*, Lei *et al.* (1990) ont reporté la synthèse de nombreuses fibrilles entourant les hyphes et les cellules de la paroi racinaire après seulement deux jours d'inoculation. On peut toutefois noter qu'avant la formation du voile fibrillaire, un premier contact se met en place entre les hyphes et les poils racinaires qui vont dégénérer par la suite (Lei *et al.*, 1990).

Après adhésion, les filaments mycéliens se multiplient à la périphérie de la racine (**Figure 1.9a**). Comme pour l'étape de pré-infection, il est proposé que la croissance et la ramification des hyphes sont sous le contrôle de molécules rhizosphériques signal sécrétées par les deux partenaires. Lagrange *et al.* (2001) ont reporté l'effet de la rutine (sucre glucosidique) sécrétée par de jeunes plants d'eucalyptus sur la stimulation de la croissance *in*

in vitro des hyphes de *Pisolithus* sp. D'autres composés indoliques sécrétés par le champignon jouent aussi un rôle dans le développement de l'organe symbiotique. Parmi ces composés, l'hypaphorine fongique diminue le taux d'élongation des poils absorbants (Ditengou *et al.*, 2000).

Après avoir colonisé la surface des racines secondaires, les hyphes vont ensuite proliférer pour entourer l'extrémité racinaire et former un manchon dense autour de la racine, le manteau fongique (**Figure 1.9b**). Les hyphes du manteau interne sont très ramifiés et agglutinés dans une structure composée de polysaccharides et de glycoprotéines (Massicotte *et al.*, 1987).

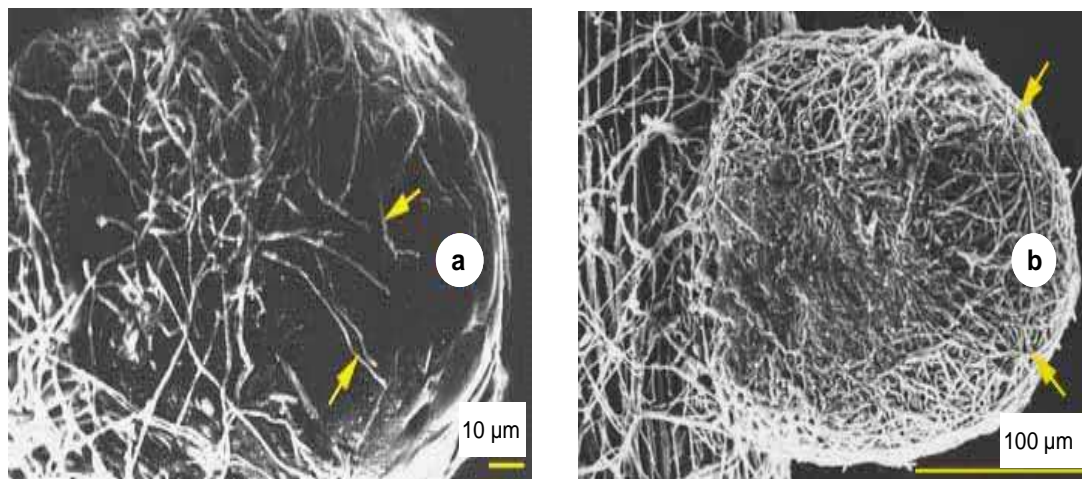


Figure 1.9. Etapes de formation d'une ectomycorhize entre le champignon *Pisolithus tinctorius* et une racine latérale (racine courte) de pin (Microscopie électronique à balayage) (Piché *et al.*, 1983). (a) Début de croissance des hyphes (flèches) autour de l'apex racinaire. (b) Formation d'un manteau fongique dense (flèche) recouvrant l'apex racinaire.

3.2.3. Différenciation

L'étape de différenciation correspond à la pénétration des hyphes dans le cortex racinaire et à la mise en place de la structure d'échange appelée réseau de Hartig. Ce réseau peut, suivant les partenaires en présence, être très développé et s'étendre jusqu'au cylindre central ou au contraire resté limité aux premières assises cellulaires (Dexheimer, 1997).

Des études cytologiques utilisant des anticorps dirigés contre des enzymes et des lectines ont montré que le compartiment symbiotique interfacial entre partenaires contient une matrice formée de polysaccharides et de protéines d'origine à la fois fongique et végétale

(Dexheimer & Pargney, 1991). Les principaux composés de cette interface sont la chitine et les β -1,3 glucanes (Martin *et al.*, 1999). Des études biochimiques et moléculaires menées sur des ectomycorhizes de *Pisolithus tinctorius* associé à *Eucalyptus* ont montré l'expression différentielle de protéines pariétales (hydrophobines, adhésines et mannoprotéines) pendant l'élaboration de la symbiose (Martin *et al.*, 1999).

Enfin, après la formation de l'ectomycorhize tout un ensemble de molécules, encore mal identifiées, vont faciliter la pérennité de la symbiose face aux réactions d'autodéfenses de la plante (Salzer *et al.*, 1996). La mise en place de l'association mycorhizienne requiert un échange continu de signaux entre les deux partenaires provoquant une cascade d'événements conduisant à l'expression ou à la répression de certains gènes en accord avec le fonctionnement de la symbiose.

3.3. Fonctionnement des mycorhizes et nutrition P de la plante hôte

La mycorhization des plantes conduit à une amélioration de la nutrition minérale des plantes, en particulier phosphatée (cf § 2.2). Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer cet effet bénéfique sur la nutrition P de la plante par le partenaire fongique : (i) l'augmentation de la surface d'absorption et de volume de sol exploré par les racines mycorhizées, (ii) la mobilisation supplémentaire de sources de P insolubles inaccessibles aux plantes, (iii) une meilleure efficacité à absorber le Pi en solution et (iv) la capacité à stocker le P sous des formes facilement mobilisables. Le second mécanisme implique l'exsudation d'acides organiques et la sécrétion de phosphatases acides dans la rhizosphère par le champignon mycorhizien (Smith & Read, 2008).

3.3.1. Exploration du sol : le mycélium extramatriciel

L'absorption du Pi par les racines mycorhizées n'est pas limitée seulement à la zone sub-apicale de la racine. En effet, les plantes mycorhizées peuvent recevoir du Pi provenant d'une distance très éloignée de la racine grâce à une connexion avec un réseau d'hyphes externes (appelés aussi extramatriciels) colonisant le sol (Bending & Read, 1995). Cette connexion implique que les plantes mycorhizées ont une surface d'absorption et un volume de sol exploité beaucoup plus élevés que celui des plantes non mycorhizées (Rousseau *et al.*, 1994 ; Ekblad *et al.*, 1995). Les travaux de Rousseau *et al.* (1994) ont montré que les hyphes externes des champignons ectomycorhiziens *Pisolithus tinctorius* et *Cenococum geophilum*

pouvaient représenter jusqu'à 75% de la surface totale d'absorption de jeunes plantes de *Pinus taeda*.

Malgré l'importance du mycélium extramatriciel dans l'amélioration de la nutrition P de la plante, très peu d'études ont tenté de quantifier la relation entre la vitesse d'exploration du sol par les hyphes externes et les effets sur la nutrition P de la plante en fonction de la disponibilité du P dans un sol. Dans un modèle d'association symbiotique *Hebeloma cylindrosporum/Pinus pinaster*, Torres Aquino & Plassard (2004) ont démontré une forte corrélation entre la quantité totale de P accumulée dans la plante et la surface de sol exploré par les hyphes externes. Les valeurs de transfert net en P du champignon vers la plante ont été estimées à 0,36 et 0,66 μmol de P par cm^2 de mycélium dans des sols pauvre et riche en P assimilable, respectivement.

L'augmentation du volume de sol exploré est renforcée par le faible diamètre des hyphes qui peuvent ainsi coloniser des zones du sol inaccessibles aux racines des plantes. Smith *et al.* (2003) ont mis en place un dispositif expérimental dans lequel une source d'orthophosphate marquée au ^{33}P , mélangée avec du sol et un inoculum fongique, était contenue dans une membrane de nylon dont le diamètre des pores (25 μm) ne permettait que le passage des filaments mycéliens. Ces auteurs ont mesuré le transfert de ^{33}P vers la plante hôte à partir d'un compartiment du sol non exploitable par les racines.

3.3.2. Mobilisation de P complexé dans la rhizosphère

3.3.2.1. Les acides organiques

Tout comme les bactéries et les plantes (cf. § 2.1.2.), les champignons mycorhiziens sont capables de produire et de sécréter différentes molécules d'acides organiques dans la rhizosphère (acide oxalique, acide malique, acide citrique...). Ces acides organiques sont connus pour jouer un rôle significatif dans l'augmentation de la disponibilité du P_i à partir des formes minérales peu solubles de P (Jones, 1998 ; Ström *et al.*, 2005). Cette augmentation de la biodisponibilité en P_i est due à la diminution du pH (Zou *et al.*, 1995) et/ou à la solubilisation des minéraux phosphatés présents en solution (Fox & Comerford, 1990 ; Jones & Darrah, 1994). Wallander *et al.* (1997) ont rapporté la capacité de nombreuses espèces de champignons ectomycorhiziens à améliorer la nutrition en P de jeunes pins sylvestre à partir d'apatites comme seule source en P. Ainsi dans le cas de *Suillus variegatus* l'accumulation en P dans la plante était fortement corrélée avec la diminution de pH du sol et la sécrétion d'acide oxalique par les racines mycorhizées. De plus, ils ont démontré que l'augmentation de

la concentration en acide oxalique était en relation avec une augmentation de la concentration en P disponible dans le sol au voisinage de la racine mycorhizée (Wallander, 2000).

L'identification de cristaux d'oxalate a été montrée en conditions naturelles dans la litière des sols forestiers colonisée par des champignons ectomycorhiziens comme *Hysterangium crassum* (Cromack *et al.*, 1979) et *Gautiera monticola* (Griffiths *et al.*, 1994). Il convient de noter que la capacité à produire de l'acide oxalique peut fortement varier en fonction des espèces ectomycorhiziennes. En culture *in vitro*, Arvieu *et al.* (2003) ont rapporté une forte production d'acide oxalique pour *Rhizopogon roseolus* comparée à celle d'*Hebeloma cylindrosporum*. Ces capacités contrastées à libérer de l'acide oxalique ont été maintenues dans la rhizosphère formée autour des racines de pins maritime mycorhizées par les deux espèces fongiques citées précédemment (Casarin *et al.*, 2003, 2004). De plus, ces auteurs ont suggéré que l'amélioration de la nutrition en P des plantes mycorhizées pouvait être interprétée par une augmentation de la disponibilité en P due à la sécrétion de fortes quantités d'acide oxalique par *R. roseolus* (Casarin *et al.*, 2004).

3.3.2.2. Les phosphatases acides fongiques

Les phosphatases acides (AcPases) ont, en théorie, la capacité de minéraliser les substrats organiques (esters, polyphosphates organiques) en libérant du Pi dans la solution du sol (Turner & Haygarth 2005 ; Smith & Read, 2008). Cependant, cette action catalytique présente un avantage incontestable uniquement dans la mesure où elle s'effectue en périphérie des hyphes ou des racines mycorhizées (Burns, 1982 ; Joner *et al.*, 1995).

La sécrétion des AcPases est fonction de la disponibilité en P mais aussi des besoins en P du champignon ou de la plante (Mousain *et al.*, 1997). En réponse à la déficience en Pi, l'augmentation de l'activité phosphatase sécrétée par les champignons ectomycorhiziens a été démontrée à la fois en culture pure (Calleja & D'Auzac, 1982 ; Tibbett *et al.*, 1998) et dans les sols (Chen *et al.*, 2002). Toutefois, l'activité catalytique de l'enzyme est sujette à de fortes variations en fonction de la nature des composés présents en solution et de son interaction avec la phase solide du sol (Quiquampoix *et al.*, 1995 ; Quiquampoix & Mousain, 2005). La capacité des AcPases à hydrolyser différentes fractions de Po extraites de différents sols a été testée par de nombreux auteurs (Hayes *et al.*, 2000 ; Turner *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 2004). Ces auteurs ont rapporté des capacités très contrastées en fonction du type d'enzyme, du type de sol (forestier, agricole), de la méthode d'extraction et des conditions expérimentales utilisées (Bünemann, 2008). Cependant, il est important de noter que la quasi-totalité des

enzymes utilisées dans ces expériences sont des AcPases ou des phytases purifiées chez des champignons saprophytes.

Les racines mycorhizées peuvent ou non présenter des activités phosphatases plus élevée que les racines non mycorhizées (MacFall *et al.*, 1991 ; Perez-Moreno & Read, 2000). L'utilisation de jeunes plants de bouleau cultivés en microcosme en présence du champignon ectomycorhizien *Paxillus involutus* a permis de mesurer des pertes en P à partir de différents horizons de sols forestiers (Perez-Moreno & Read, 2000). La capacité chez les plantes à obtenir du P à partir de la minéralisation du Po contenue dans la litière a été attribuée à la production de AcPases par les hyphes extramatriciels colonisant les horizons des différentes litières (Bending & Read, 1995). Similairement, Tibbett & Sanders (2002) ont reporté la capacité d'*Hebeloma syrjense* à améliorer la nutrition P de la plante au travers de l'accès à des ressources limitées en Po. Enfin, l'implication du mycélium racinaire dans la production de AcPases a été suggérée par la forte corrélation entre la longueur des hyphes et l'activité phosphatase mesurée dans le sol (Haüssling & Marschner, 1989).

3.3.3. Absorption du P au niveau de l'interface sol/champignon

Il est estimé que la concentration en Pi dans les hyphes peut être plus de 1000 fois supérieure à celle du sol (Bolan, 1991 ; Smith & Read, 2008). L'ion phosphate ou Pi est donc absorbé activement, contre son gradient électrochimique, grâce à la présence de systèmes membranaires spécialisés qui sont les transporteurs de Pi. Les transporteurs de Pi identifiés à ce jour chez les champignons mycorhiziens sont tous des symports H⁺ : Pi appartenant à la famille *Pht1* (Daram *et al.*, 1999). Comme les symports H⁺:Pi identifiés chez les végétaux (cf § 2.1.3.), les transporteurs de Pi fongiques sont constitués de 12 domaines transmembranaires divisés en deux groupes de 6 séparés par une boucle centrale hydrophile.

D'un point de vue cinétique, les transporteurs de Pi peuvent être divisés en deux grands groupes selon leur valeur d'affinité pour le Pi (K_M). En effet, les analyses cinétiques montrent une absorption biphasique, impliquant un système de transport à haute affinité (K_M compris entre 1 et 10 μM) et un système de transport à basse affinité (K_M compris entre 100 et 1000 μM) qui s'expriment lorsque les concentrations en Pi dans le milieu extérieur sont respectivement faibles (μM) et élevées (mM). Cette cinétique biphasique de transport de Pi a été identifiée chez les plantes mais plus particulièrement chez les champignons endomycorhiziens (Thomson *et al.*, 1990) et ectomycorhiziens (Cairney & Alexander, 1992). En effet, l'étude cinétique de l'absorption du Pi par des racines de *Picea sitchensis* ectomycorhizées avec *Tylospora fibrillosa* a montré une absorption en deux phases pouvant

témoigner de l'implication de deux systèmes différents de transporteurs de Pi (Cairney & Alexander, 1992). Cependant il faut noter qu'il existe de fortes différences inter spécifiques de vitesse d'absorption du Pi, comme cela a été démontré pour plusieurs champignons ectomycorhiziens en culture pure (Dighton *et al.*, 1993). De plus, Van tichelen & Colpaert (2000) ont démontré que les racines de pins sylvestre ectomycorhizées avec 3 espèces différentes de champignons ectomycorhiziens (*Paxillus involutus*, *Suillus bovinus* et *Thelephora terrestris*) présentaient toutes des capacités d'absorption relativement plus élevées que celles des racines non mycorhizées.

D'un point de vue moléculaire, le premier transporteur de Pi nommé GvPT a été identifié chez un champignon endomycorhizien *Glomus versiforme* (Harrison & Van Buuren, 1995). Des expériences de complémentation fonctionnelle dans une levure ont permis de l'identifier comme étant un transporteur à haute affinité avec une valeur apparente de K_M de 18 μM . La localisation de l'expression du gène au niveau des hyphes externes pendant l'association mycorhizienne était en accord avec un rôle dans l'absorption du Pi au niveau de l'interface sol/champignon (Harrison & Van Buuren, 1995). Ces mêmes auteurs ont également démontré une augmentation du niveau de transcription du gène *GvPT* en réponse à de faibles concentrations en P dans le sol. Il convient d'ajouter que deux autres transporteurs de Pi nommés *GiPT* et *GmPT* ont été identifiés respectivement chez les espèces endomycorhiziennes *G. intraradices* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001) et *G. mosseae* (Benedetto *et al.*, 2005). Tout comme *GvPT*, ces gènes codent putativement des protéines appartenant à la famille des transporteurs $\text{H}^+:\text{Pi}$ à haute affinité dont l'expression est significativement augmentée dans les hyphes extramatriciels en réponse à de faibles concentrations en Pi. Par contre, aucune expression du gène *GiPT* n'a été observée en présence d'une concentration élevée en Pi (3,5 mM) et, de façon plus surprenante, en l'absence totale de Pi (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001). Ces auteurs ont montré aussi que l'expression de *GiPT* était fonction des besoins en P de la plante. L'expression du gène *GmPT* a été mesurée dans les hyphes internes mais son niveau d'expression n'était pas dépendant des concentrations externes en Pi (Benedetto *et al.*, 2005). En résumé, les profils d'expression de ces deux gènes sont en faveur d'un rôle important dans l'acquisition de Pi au niveau de l'interface sol/champignon.

Récemment, Tatry *et al.* (2009) ont rapporté pour la première fois une étude détaillée des propriétés moléculaires de deux transporteurs de Pi HcPT1 et HcPT2 identifiées chez un champignon ectomycorhizien basidiomycète *Hebeloma cylindrosporum*. Exprimés dans la levure, HcPT1 et HcPT2 sont capables de rétablir le transport de Pi qui est dépendant du pH

du milieu. L'ensemble des données obtenues indique que HcPT1 et HcPT2 sont deux systèmes de symports $H^+ : P_i$ présentant des valeurs de K_M de 55 et 4 μM , respectivement. Une analyse par RT-qPCR a montré que le niveau de transcription de *HcPT1* était fortement augmenté en réponse à la déficience en P_i à la fois dans le mycélium en culture pure et au niveau des hyphes extramatriciels lorsque *H. cylindrosporum* était associé à une plante hôte *Pinus pinaster*. Par contre, le niveau de transcription de *HcPT2* était moins dépendant de la disponibilité en P_i dans le mycélium en culture pure mais son expression était fortement maintenue dans les hyphes mycorhiziens en présence de P dans le sol. Ainsi, ces auteurs ont suggéré que le transporteur HcPT2 pourrait jouer un rôle majeur dans l'amélioration de la nutrition P de la plante hôte dans des conditions de biodisponibilité suffisantes en P tandis que HcPT1 serait principalement impliqué dans le prélèvement de P lorsque la biodisponibilité en cet élément deviendrait limitée.

3.3.4. Accumulation et transfert du P vers la cellule hôte

3.3.4.1. Synthèse et rôle des polyphosphates

Le P_i absorbé par les cellules fongiques est tout d'abord incorporé dans le pool de P_i cytoplasmique pour maintenir les fonctions cellulaires comme la production d'énergie et la biosynthèse des acides nucléiques ou des phospholipides. Toutefois, lorsque la concentration en P_i cytoplasmique est suffisante pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'excès de P_i absorbé peut être transféré dans la vacuole et stocké sous forme de polyphosphates (polyP) (Ezawa *et al.*, 2002). Chez les plantes, il a été démontré que le transfert du P_i cytoplasmique dans la vacuole dépendait d'un gradient de potentiel électrique créé par le fonctionnement d'une pompe vacuolaire $H^+ / ATPase$ (Massonneau *et al.*, 2000).

Les polyP sont des polymères linéaires dont la longueur, donnée par le nombre de résidus orthophosphate, peut varier de trois à plus d'un millier (Wood & Clark, 1988). Les polyP ont été identifiés chez de nombreux champignons endomycorhiziens (Ezawa *et al.*, 2001 ; Solaiman & Saito, 2001 ; Viereck *et al.*, 2004) et ectomycorhiziens (Martin *et al.*, 1983 ; Grellier *et al.*, 1989 ; Martins *et al.*, 1999 ; Torres Aquino, 2003) (**Figure 1.10 ; Tableau 1.6**). Le métabolisme des polyP a très bien été étudié chez les procaryotes et de nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse de ces polyP ont été identifiées et caractérisées (Kornberg *et al.*, 1999). Parmi ces enzymes, on distingue la polyphosphate kinase qui synthétise des polyP en utilisant l'ATP comme donneur d'énergie. La polyphosphate glucokinase (PPGK) transfère un résidu terminal de P_i à une molécule de glucose pour former

du glucose-6 P. Puis on distingue également deux types de phosphatases, des exopolyphosphatases (PPX) et des endopolyphosphatases (PPN), qui hydrolysent les liaisons terminale et centrale, respectivement. Les réactions enzymatiques sont décrites dans Capaccio & Callow, (1982). Chez les eucaryotes, ces enzymes ont pu être identifiées mais leur rôle reste encore très mal définie (Capaccio & Callow, 1982 ; Ogawa *et al.*, 2000).

Les fonctions de ces PolyP ne sont pas encore totalement comprises, mais il est proposé qu'ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de la concentration en Pi dans la cellule fongique, agissant comme un puits pour le retrait du Pi. Ainsi, lorsque des excès en Pi intracellulaire existent, la synthèse de polyP dans le compartiment vacuolaire apparaît comme une solution pour l'enlèvement et le stockage du Pi cytoplasmique. En conditions limitantes en P, les polyP sont hydrolysés permettant ainsi la libération de Pi et le maintien de l'homéostasie cellulaire (Martin *et al.*, 1985 ; MacFall *et al.*, 1992).

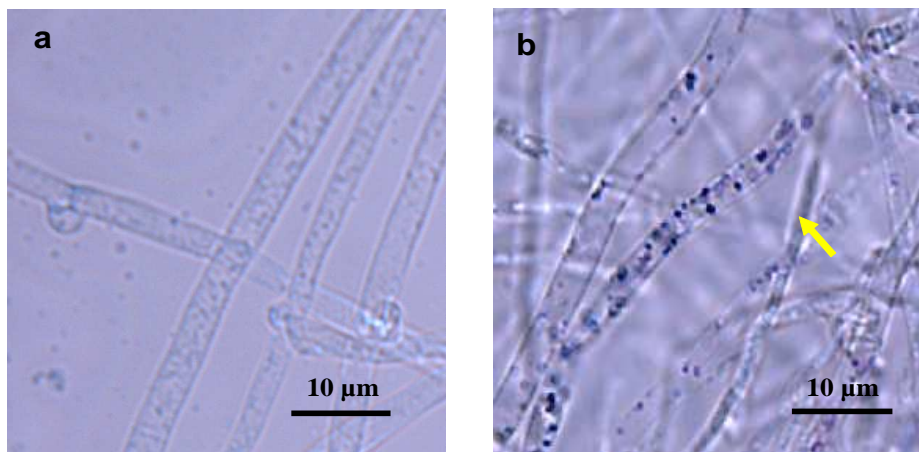


Figure 1.10. Révélation au bleu de Toluidine O de la synthèse des granules de polyphosphate chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* (Observation microscopique, Olympus BX61). Après 7 jours de culture sur un milieu nutritif complet (1 mM Pi), les thalles ont été cultivés pendant 5 jours sur un milieu déficient en Pi (a) puis transférés à nouveau pendant 40 minutes sur un milieu contenant 1 mM de Pi (b) (d'après Torres Aquino, 2003).

Tableau 1.6. Détection des polyphosphates chez différentes espèces de champignons mycorhiziens en association ou non avec une plante hôte.

Champignons	Tissus	Méthodes de détection	Références
Champignons indigènes	Ectomycorhize	Cytochimie	Ashford <i>et al.</i> , 1975
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> , <i>Cenococcum graniforme</i>	Mycélium en culture pure	RMN ³¹ P	Martin <i>et al.</i> , 1985
<i>Hebeloma arenosa</i>	Ectomycorhize	RMN ³¹ P	MacFall <i>et al.</i> , 1992
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Mycélium en culture pure	Cytochimie, RMN ³¹ P	Ashford <i>et al.</i> , 1994
<i>Suillus bovinus</i>	Ectomycorhize, mycélium en culture pure	RMN ³¹ P	Gerlitz & Werk, 1994
<i>Suillus bovinus</i>	Ectomycorhize, mycélium en culture pure	RMN ³¹ P	Gerlitz & Gerlitz, 1997
<i>Suillus bovinus</i> , <i>Paxillus involutus</i> , <i>Pisolithus tinctorius</i> , <i>Laccaria laccata</i>	Mycélium en culture pure	Spectrométrie dispersive aux rayons X	Bücking & Heyser, 1999
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Ectomycorhize	RMN ³¹ P	Martins <i>et al.</i> , 1999
<i>Glomus intraradices</i>	Endomycorhize, hyphes extraracinaires	RMN ³¹ P	Rasmussen <i>et al.</i> , 2000
<i>Glomus coronatum</i> , <i>Glomus etunicatum</i>	Hyphes intraracinaires et extraracinaires	Dosage enzymatique	Ezawa <i>et al.</i> , 2001
<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	Ectomycorhize, mycélium en culture pure	Cytochimie, RMN ³¹ P	Torres Aquino, 2003
<i>Glomus intraradices</i>	Endomycorhize, hyphes extraracinaires	RMN ³¹ P	Viereck <i>et al.</i> , 2004
<i>Gigaspora margarita</i>	Endomycorhize	Cytochimie	Ohtomo & Saito, 2005
<i>Glomus sp</i>	Endomycorhize	Dosage enzymatique	Takanishi <i>et al.</i> , 2009

3.3.4.2. Dégradation des polyP et transfert vers la plante hôte

L'effet bénéfique de la mycorhization sur la nutrition P de la plante nécessite que le Pi accumulé dans les cellules fongiques puisse être facilement mobilisable et transférable vers la plante hôte. L'action d'hydrolyse des enzymes décrites précédemment, PPX et PPN, permet respectivement de libérer du Pi et de former de courtes chaînes de polyP plus facilement mobilisables. Ezawa *et al.* (2001) ont pu démontrer chez *Glomus coronatum* que la différence de métabolisme des polyP entre les hyphes intra- et extraracinaires impliquait au moins deux activités PPX différentes. Une activité PPX à pH 5,0 dans les hyphes intraracinaires et une activité PPX à pH neutre fortement inhibée par l'héparine dans les hyphes extraracinaires.

Il est reconnu que les polyP joueraient un rôle essentiel dans le transfert de Pi vers la plante hôte. En effet, les polyP synthétisés au niveau des hyphes extraracinaires et intraracinaires seraient transportés jusqu'au niveau des structures d'échanges (réseau de Hartig et arbuscules) où ils seraient hydrolysés en Pi puis libérés ensuite dans l'espace apoplasmique commun. Ce transport des polyP s'effectuerait grâce à un système de vacuoles tubulaires mobiles identifié à la fois chez les champignons ectomycorhiziens (Rees *et al.*, 1994) et endomycorhiziens (Uetake *et al.*, 2002). Dans ce système, des groupes de vacuoles sont interconnectés par un réseau de tubules le long duquel les vacuoles seraient mobiles (Hyde *et al.*, 1997).

Le transfert bidirectionnel des nutriments à travers les interfaces symbiotiques implique un efflux passif de solutés de l'organisme donneur dans l'apoplasme interfacial, suivi d'une absorption active par l'organisme receveur (Ezawa *et al.*, 2002). Concernant le transfert de Pi vers la cellule hôte, un efflux passif de P permettrait d'expliquer la libération du Pi par la cellule fongique dans l'espace apoplasmique commun. La concentration élevée en Pi dans le compartiment intracellulaire de la cellule fongique permettrait de limiter considérablement la réabsorption du Pi à partir de l'espace apoplasmique interfacial. Par contre, l'absorption par le donneur impliquerait un mécanisme actif. Hahn & Mendgen (2001) ont montré que les membranes plasmiques des deux partenaires étaient riches en activité ATPases. Ils ont proposé que le transport de P pourrait être énergisé par une force protomotrice résultant de l'activité des pompes membranaires H⁺/ATPase couplée à la présence de transporteurs induits spécifiquement par la symbiose. De nombreux auteurs ont rapporté l'identification des transporteurs de Pi à haute affinité s'exprimant uniquement dans des cellules racinaires endomycorhizées suggérant ainsi un rôle dans l'absorption active du Pi libéré par le champignon dans l'espace péri-arbusculaire (Rosewarne *et al.*, 1999 ; Harrison *et*

al., 2002 ; Paszkowski *et al.*, 2002 ; Glassop *et al.*, 2005 ; Karandashov & Bucher, 2005 ; Javot *et al.*, 2007).

4. Les phosphatases acides extracellulaires

Les AcPases extracellulaires sont des enzymes qui permettent d'améliorer la mobilité et la biodisponibilité du P par la minéralisation des composés organiques phosphatés présents dans les sols (cf. § 2.1.3. et 3.3.2). L'identification de ces enzymes chez les plantes et les microorganismes montre l'importance fonctionnelle de ces enzymes. La régulation de la sécrétion des AcPases peut apparaître ainsi comme une réponse adaptative majeure pour faire face aux variations de disponibilité en P dans les sols. Toutefois, une fois sécrétées dans l'environnement, l'efficacité catalytique de ces enzymes va être régulée par de nombreux mécanismes chimiques, physiques et biologiques.

4.1. Classification

Par convention, les phosphatases sont classées en fonction de leurs propriétés catalytiques (Burns, 1982 ; Duff *et al.*, 1994). On distingue les **phosphomonoestérases** qui hydrolysent les liaisons esters avec libération de Pi (**Tableau 1.3.**). Parmi celles-ci, les **phytases** constituent une famille particulière de phosphatases hydrolysant l'acide phytique en Pi et inositol. L'acide phytique constitue la principale forme de réserve en P chez les plantes (Raboy, 2003) et peut donc être présent en grande quantité dans les sols (Turner *et al.*, 2003). Ces phytases ont été majoritairement identifiées chez les bactéries (Yoon *et al.*, 1996) et chez les champignons pathogènes et saprophytes (Pasamontes *et al.*, 1997 ; Lassen *et al.*, 2001). On distingue également les **phosphodiesterases** qui libèrent du Pi à partir des phosphates diesters (**Tableau 1.3.**). Dans la majorité des cas, chaque phosphatase ne peut catalyser l'hydrolyse que d'un seul type d'ester. Toutefois, certaines AcPases font exception à la règle dont celles sécrétées par *Penicillium funiculosum* (Yoshida *et al.*, 1989) et par *Aspergillus fumigatus* (Bernard *et al.*, 2002) qui catalyse à la fois l'hydrolyse de phosphomonoesters et de phosphodiesters.

4.2. Identification des gènes et mécanismes de régulation

La capacité des champignons mycorrhiziens à sécréter des AcPases extracellulaires dans le milieu extérieur est vérifiée principalement *in vitro* par l'hydrolyse de substrats phosphatés dont le plus couramment utilisé est le *para*-nitrophénylphosphate (pNPP). De par cette

méthode, de nombreuses espèces mycorrhiziennes ont présenté la capacité à exprimer et synthétiser des activités phosphatases et parfois des activités phytases (Mousain & Salsac, 1982 ; Antibus *et al.*, 1986, 1992 ; Tibbett, 2002). Toutefois, les gènes codant pour ces enzymes restent encore inconnus chez les champignons mycorrhiziens. Le seul gène de phosphatase acide disponible à ce jour est celui appartenant au premier champignon forestier ectomycorhizien dont le génome ait été séquencé, *Laccaria bicolor*. Ce gène code pour une protéine native estimée à 43 kDa présentant 9 sites potentiels de glycosylation (**Tableau 1.7**). On observe que le poids moléculaire prédit de cette protéine est proche de celui des autres AcPases extracellulaires identifiés chez des champignons non mycorrhiziens. Le nombre élevé de sites potentiels de glycosylation suggère la possibilité de fortes modifications post-transcriptionnelles de la protéine (Bernard *et al.*, 2002).

Tasaki *et al.* (2006) ont rapporté l'identification de deux gènes codant pour différentes AcPases PNAP1 (40 kDa) et PNAP2 (43 kDa) chez le champignon saprophyte *Pholiota nameko*. PNAP1 et PNAP2 présentent 68% d'homologie de séquence en acide aminés. Ces auteurs ont étudié l'expression des deux gènes par la technique du Northern blot dans des thalles cultivés jusqu'à 30 jours sur un milieu sans (-P) et avec (+P) P inorganique soluble. Ils ont montré une forte accumulation de transcrits pour ces deux gènes en milieu -P après 10 jours de culture. En milieu +P, le niveau de transcription reste très faible voire indétectable pour PNAP1 après 20 jours de culture. Ces résultats suggèrent fortement que la régulation de la production de AcPases en réponse à la déficience en Pi s'effectue au niveau transcriptionnel au moins chez les champignons non mycorrhiziens.

4.3. Propriétés enzymatiques

4.3.1. pH et température

Les phosphatases sécrétées dans la rhizosphère sont dites acides car leur fonction enzymatique n'est maintenue que pour des valeurs de pH < 7. Pour la plupart des enzymes, le pH optimal d'activité est situé entre 4-6 (Antibus, 1986 ; Kroehler *et al.*, 1988 ; Yoshida *et al.*, 1989). Certaines AcPases peuvent présenter plusieurs valeurs de pH optimal d'activité. La phosphatase acide identifiée chez *Lactarius* sp. possède deux pics d'activité phosphatase pour des valeurs de pH proche de 4,5 et 5,5 (Antibus *et al.*, 1992). Les phytases sécrétées par *Aspergillus niger* et *Aspergillus ficuum* ont également deux valeurs de pH optimal d'activité à 2,5 et 5,0 (Wyss *et al.*, 1999).

La **température** joue également un rôle dans l'efficacité catalytique des AcPases. Des activités phosphatases maximales ont été mesurées pour des températures de 60-70°C (Antibus, 1986 ; Wannet *et al.*, 2000). Cependant ces températures sont bien trop éloignées des conditions réelles rencontrées dans les sols et les activités phosphatases mesurées sont inappropriées pour estimer leur réelle efficacité. La température joue également un rôle dans la production des AcPases. Ainsi Tibbett *et al.* (1998) ont démontré que pour une température <12°C les thalles d'*Hebeloma spp* provenant des régions arctiques produisaient plus de AcPases extracellulaires que ceux des régions tempérées.

Tableau 1.7. Séquences protéiques de phosphatases acides extracellulaires identifiées chez des champignons mycorhiziens et non mycorhiziennes.

Champignons	Type	Poids moléculaire (kDa)*	Nombre de sites glycosylation**	Références
<i>Penicillium chrysogenum</i>	moisissure	45,6	7	Haas <i>et al.</i> , 1992
<i>Aspergillus niger</i>	saprophyte	46,7	6	Ehrlich <i>et al.</i> , 1994
<i>Aspergillus ficuum</i>	saprophyte	67,2	13	Mullaney <i>et al.</i> , 1995
<i>Pholiota nameko</i>				
PNAP1	saprophyte	40,4	7	Tasaki <i>et al.</i> , 2006
PNAP2		42,4	6	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	saprophyte	53,0	12	Bernard <i>et al.</i> , 2002
<i>Aspergillus clavatus</i>	saprophyte	48,9	9	Federova <i>et al.</i> , 2008
<i>Laccaria bicolor</i>	mycorhizien	42,5	9	Martin <i>et al.</i> , 2008

*Poids moléculaire natif estimé à partir de la séquence en ADNc

**Nombre potentiel de sites de N-glycosylation

4.3.2. Les inhibiteurs

Dans un sol, les **composés phénoliques** tels que les **tanins** sont connus pour inhiber l'activité phosphatase. Joannis *et al.* (2007) ont démontré que l'addition de 0,2 g.L⁻¹ de tanins extraits d'une litière forestière pouvait diminuer de 40% l'activité phosphatase mesurée dans un sol. De nombreux **éléments chimiques** du sol peuvent également interagir avec les phosphatases. Les cations divalents (Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺) ont un effet inhibiteur sur l'activité catalytique des phosphatases (Yoshida *et al.*, 1989). Cette inhibition s'accompagne par une capacité des ions métalliques à fixer le Pi libre dans la solution du sol.

D'autres composés comme le molybdate, le vanadate et le fluorure ont également un effet d'inhibiteur sur l'activité phosphatase. L'activité de la phosphatase acide sécrétée par *Aspergillus fumigatus* est inhibée à 60 et 85% par 10 mM de NaF et de molybdate, respectivement (Bernard *et al.*, 2002). Son activité est totalement inhibée par 10 mM de vanadate. Certains composés chimiques ont la faculté de se lier au site catalytique des phosphatases. Le phénylglyoxal et le 1,2-cyclohexadione inhibent l'activité phytase en modifiant la conformation de la protéine au niveau du site actif par interaction avec l'arginine (Ullah *et al.*, 2000).

4.3.3. Influence du phosphore inorganique

La disponibilité en Pi dans le milieu extérieur joue fortement sur la régulation des activités phosphatases. En effet, l'activité phosphatase est fortement inhibée par l'ajout de concentrations élevées en Pi dans le milieu de culture des champignons (Yoshida *et al.*, 1989 ; Tibbett *et al.*, 1998 ; Wannet *et al.*, 2000 ; Bernard *et al.*, 2002). Par contre, tous ces auteurs ont rapporté que la déficience en Pi induisait une forte augmentation de l'activité phosphatase mesurée dans le milieu de culture soulignant ainsi une activation de la production et de la sécrétion de ces enzymes en réponse à la faible disponibilité en Pi. Ces AcPases sont dites alors « inductibles » car leur niveau d'expression augmente en réponse à la déficience en P dans le milieu extérieur. A l'inverse, certaines AcPases sont dites « constitutives » car elles sont exprimées et sécrétées continuellement quelque soit la concentration en P dans le milieu extérieur, comme celle identifiée chez le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* (Weber & Pitt, 1997).

4.4. Interaction des phosphatases acides avec la phase solide du sol

Les AcPases sécrétées dans la solution du sol possèdent une structure tridimensionnelle leur conférant une stabilité maximale et qui correspond généralement à leur conformation biologique active. Cependant, ces enzymes peuvent être fortement adsorbées sur la phase solide du sol modifiant ainsi leur mobilité et leurs propriétés catalytiques (Quiquampoix & Mousain, 2005 ; Quiquampoix & Burns, 2007). L'adsorption des enzymes à la surface des argiles s'effectue majoritairement par des interactions hydrophobes et électrostatiques. La part de chacune de ces interactions est fonction des surfaces mises en jeu (charges, hydrophobicité) du pH et de la force ionique du milieu réactionnel (Quiquampoix *et al.*, 1989 ; Quiquampoix *et al.*, 1995). L'interaction de l'enzyme avec les surfaces adsorbantes

dépend également du point isoélectrique (pI) de la protéine : pour un $\text{pH} < \text{pI}$ la charge nette de la protéine est positive tandis que pour un $\text{pH} > \text{pI}$ celle-ci est négative.

L'adsorption des enzymes à la surface des argiles peut entraîner une diminution de leur activité catalytique (Sandwick & Schray, 1987). Deux mécanismes ont été avancés pour expliquer cette perte d'activité : un effet de pH de surface et une modification de conformation de la protéine (Geluk *et al.*, 1992). Les effets du pH et de la force ionique sur l'activité de deux AcPases identifiées chez *H. cylindrosporum* ont été étudiés en présence de montmorillonite (Leprince & Quiquampoix, 1996). Ces auteurs ont pu démontrer que l'adsorption des enzymes à la surface de la montmorillonite conduisait à une augmentation du pH optimal de l'activité catalytique. Ce phénomène a été interprété par une modification pH dépendante de la conformation des enzymes essentiellement due aux interactions électrostatiques mises en place avec la surface argileuse.

Ainsi les activités phosphatases d'un sol regroupent celles des enzymes libres en solution et celles qui sont immobilisées sur les colloïdes du sol. Bien que le sol soit un environnement défavorable au maintien de l'activité enzymatique (variation de pH, adsorption, dégradation par les protéases), il est proposé que certains complexes permettent de protéger les activités enzymatiques. D'après Burns (1980) la formation de complexes enzyme-humus est favorable au maintien de l'activité enzymatique. En accord avec cette hypothèse, Rao & Gianfreda (2000) ont démontré que les AcPases adsorbées à la surface des argiles présentaient une meilleure stabilité face aux attaques protéolytiques.

5. Hypothèse et stratégie de recherche

La revue de la littérature montre clairement que la faible disponibilité en P_i est un facteur limitant pour la croissance des plantes dans les écosystèmes forestiers. Or parmi les mécanismes susceptibles d'améliorer la disponibilité en P_i dans la solution du sol, la production de phosphate à partir de composés organiques apparaît comme particulièrement importante dans les écosystèmes forestiers pauvres en P_i et riches en P organique. D'un autre côté, en conditions naturelles, les racines des arbres sont toujours associées aux champignons ectomycorhiziens et notre hypothèse centrale est que les phosphatases produites par ces partenaires fongiques sont de très bons candidats pour améliorer la nutrition P de la plante-hôte à partir de composés de P organique du sol. Cependant, le rôle réel joué par la sécrétion de AcPases par les champignons ectomycorhiziens est encore mal connu. Le séquençage du génome de *Laccaria bicolor* a permis l'identification du premier gène codant pour une phosphatase acide chez un champignon ectomycorhizien mais aucune étude fonctionnelle n'a

encore été publiée sur ce gène. Finalement, les seules connaissances concernant les propriétés biochimiques et moléculaires des AcPases fongiques ont été obtenues chez des champignons saprophytes.

Dans ce contexte, l'objectif des travaux de ma thèse vise à mieux comprendre le rôle joué par la sécrétion de AcPases par les champignons ectomycorhiziens sur la mobilisation de Po des sols forestiers. Nous avons choisi comme modèle de sol forestier celui de la forêt de Pin maritime (*Pinus pinaster* Soland In Ait.) des Landes de Gascogne qui se développe sur des sols sableux, acides, pauvres en Pi. Toutefois, ces sols sont caractérisés par une forte proportion de P total sous forme de P organique (Achat, 2009). Les travaux de thèse ont été effectués sur une espèce fongique modèle *Hebeloma cylindrosporum* choisie pour sa forte capacité de sécrétion d'activité phosphatase dans son milieu de culture (Matumoto-Pintro, 1996). De plus, ce champignon a été isolé de la forêt landaise et s'associe très facilement au Pin maritime en conditions contrôlées. Pour éprouver notre hypothèse, nous avons adressé les questions suivantes :

- 1) Quelles sont les propriétés catalytiques des phosphatases produites par le mycélium en culture pure, en particulier sur des solutions de sol extraites des sols forestiers landais ?
- 2) Est-il possible d'identifier le(s) gène(s) qui code(nt) pour ces enzymes ?
- 3) Comment la disponibilité en Pi régule-t-elle les activités et l'expression du ou des gènes de phosphatase(s), que le champignons soit en culture pure ou en association avec la plante ?
- 4) L'inoculation des plantes de Pin maritime par *H. cylindrosporum* augmente-t-elle le prélèvement net de P des plantes cultivées sur des échantillons de sol landais présentant des disponibilités contrastées en Pi ?

Les résultats obtenus au cours de la thèse seront présentés sous la forme de quatre projets d'article:

- 1) Separation of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and their effectiveness in hydrolyzing organic phosphorus in a sandy soil after different fertilisation regimes
- 2) Identification of *HcPhoA*, a gene encoding an acid phosphatase released into its external medium by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*.

- 3) Identification of physiological and molecular mechanisms used by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to cope with orthophosphate starvation
- 4) Differential expressions of the phosphorus-regulated fungal genes, two P transporters and one acid phosphatase, within *Hebeloma cylindrosporum/Pinus pinaster* ectomycorrhizae grown in acidic podzols.

Finalement, le manuscrit de thèse se terminera par une conclusion générale et des perspectives.

6. Références

- Achat DL (2009) Biodisponibilité du phosphore dans les sols landais pour les peuplements forestiers de Pin maritime. Thèse Doctorat Université, Bordeaux 1.
- Allen MF, Swenson W, Querejeta JI, Egerton-Warburton LM & Reseder KK (2003) Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Ann Rev Phytopathol* **41**: 271-303.
- Antibus RK, Kroehler CJ & Linkins AE (1986) The effects of external pH temperature and substrate concentration on acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Can J Bot* **64**: 2383–2387.
- Antibus RK, Sinsabaugh RL & Linkins AE (1992) Phosphatase activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Can J Bot* **70**: 794–801.
- Arvieu JC (1974) Les processus chimiques de l'évolution des phosphates en sols calcaires. *Bull AFES* **4**: 207-224.
- Arvieu JC, Leprince F & Plassard C (2003) Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to Pi-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Ann For Sci* **60**: 815-821.
- Ashford AE, Lee ML & Chilvers GA (1975) Polyphosphate in eucalypt mycorrhizas: a cytochemical demonstration. *New Phytol* **74**: 447-453.
- Ashford AE, Ryde S & Barrow KD (1994) Demonstration of a short chain polyphosphate in *Pisolithus tinctorius* and the implications for phosphorus transport. *New Phytol* **126**: 239-247.
- Azcon-Aguilar C & Barea JM (1996) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne fungi: an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* **6**: 457-464.
- Bakker MR, Jolicœur E, Trichet P, Augusto L, Plassard C, Guinberteau J & Loustau D (2009) Adaptation of fine roots to annual fertilization and irrigation in a 13-year-old *Pinus pinaster* stand. *Tree Physiol* **29**: 229-238.
- Baldwin JC, Karthikeyan AS & Raghothama KG (2001) LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol* **125**: 728-737.
- Barber SA (1984). Phosphorus. In: Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. A Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, 201-228.

- Barker SJ, Tagu D & Delp G (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiol* **116**: 1201-1207.
- Barker SJ & Tagu D (2000) The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *J Plant Growth Regul* **19**: 144-154.
- Beemster GTS & Baskin TI (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**: 1515-1526.
- Behra P, Douch J & Binde F (1999). Sorption mechanisms at the solid-water interface. In: Effect of mineral-organic-microorganism interactions on soil and freshwater environments. Edited by Berthelin J., Huang PM, Bollag J-M, Andreux F. Academic/Plenum publishers, New York, p. 1-13.
- Bending GD & Read RJ (1995) The structure and function of the vegetative mycelium of the ectomycorrhizal plants. V. Foraging behaviour and translocation of nutrients from exploited litter. *New Phytol* **130**: 401-409.
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P & Lanfranco L (2005) Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **15**: 620-627.
- Bernard M, Mouyna I, Dubreucq G, Debeauvais JP, Fontaine T, Vorgias C, Fuglsang C & Latgé JP (2002) Characterization of a cell-wall acidic phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **148**: 2819-2829.
- Bhat KKS & Nye PH (1974) Diffusion of phosphate to plant roots in soil. III. Depletion around onion roots without root hairs. *Plant Soil* **41**: 383-394.
- Bieleski RL (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* **24**: 225-252.
- Bolan NS (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plant. *Plant Soil* **134**: 189-207.
- Boyce A & Walsh G (2007) Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. *J Biotech* **132**: 82-87.
- Brady NC & Weil RR (1996) The nature and properties of soil. 11th Eds, Prentice Hall, New Jersey, USA, 740 p.
- Brundrett MC, Murase G, Kendrick B (1990) Comparative anatomy of roots and mycorrhizae of common Ontario trees. *Canad J Bot* **68**: 551-578.
- Bücking H & Heyser W (1999) Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi: an X-ray microanalytical study. *Mycol Res* **103**: 31-39.
- Bünemann EK (2008) Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. *Soil Biol Biochem* **40**: 2116-2129.
- Burns RG (1980) Microbial adhesion to soil surfaces: consequences for growth and enzyme activities. In: Microbial adhesion to surfaces, Berkeley et al., Eds, Ellis Horwood, Chichester, UK, p. 249-262.
- Burns RG (1982) Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol Biochem* **14**: 423-427.

- Cairney JWG & Alexander IJ (1992) A study of ageing of spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Barr.] ectomycorrhizas. III. Phosphate absorption and transfer in ageing *Picea sitchensis* / *Tylospora fibrillosa* (Burt.) Donk ectomycorrhizas. *New Phytol* **122**: 159-164.
- Calleja M & D'Auzac J (1982) Activités phosphatases et carence phosphate chez des champignons supérieurs. *Can J Bot* **61**: 79-86.
- Capaccio LCM & Callow JA (1982) The enzymes of polyphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol* **91**: 81-91.
- Casarin V, Plassard C, Souche G & Arvieu J-C (2003) Quantification of oxalate ions and protons released by ectomycorrhizal fungi in rhizosphere soil. *Agronomie* **23**: 461-469.
- Casarin V, Plassard C, Hinsinger H & Arvieu J-C (2004) Quantification of ectomycorrhizal fungal effects on the bioavailability and mobilization of soil P in the rhizosphere of *Pinus pinaster*. *New phytol* **163**: 177-185.
- Castellano MA & Bougher NL (1994) Consideration of taxonomy and biodiversity of Australian ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **159**:37-46.
- Chen CR, Condon LM, Davis MR & Sherlock RR (2002) Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biol Biochem* **34**: 487-499.
- Coello P (2002) Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus deficient *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **116**: 293-298.
- Colpaert JV, van Tichelen KK, van Assche JA & Van Laere A (1999) Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of intact *Pinus sylvestris* seedlings. *New Phytol* **143**: 589-597.
- Condon LM & Tiessen H (2005) Interactions of organic phosphorus in terrestrial environments. In: Turner B.L., Frossard E. and Baldwin D.S. Eds, *Organic Phosphorus in the Environment*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, p. 295-307.
- Cosgrove DJ, (1977) Microbial transformations in the phosphorus cycle. In: M. Alexander, (Ed) *Adv Microb Ecol*. New York: Plenum Press.
- Cromack KJ, Sollins KP, Graustein WC, Speidel T, Todd AW, Spyker G, Li CY & Todd RL (1979) Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. *Soil Biol Biochem* **11**: 463-468.
- Cumming JR (1996) Phosphate-limitation physiology in ectomycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings. *Tree Physiol* **16**: 977-983.
- Curl EA & Trueglove B (1986) *The rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 288 p.
- Dakora FD & Phillips DA (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrients environments. *Plant Soil* **245**: 35-47.
- Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N, Bucher M (1998) Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* **206**: 225-233.

- Daram P, Brunner S, Rausch C, Steiner C, Amrhein N & Bucher M (1999) *Pht2;1* encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2153-2166.
- Dexheimer J & Pargney J (1991) Comparative anatomy of the host-fungus interface in mycorrhizas. *Experientia* **47**: 312-320.
- Dexheimer J (1997) Etude structurale et fonctionnelle des interfaces entre le champignon et la plante-hôte. *Rev For Fr* **XLIV**: 43-56.
- Dighton J, Poskitt JM Brown TK (1993) Phosphate influx into ectomycorrhizal and saprophytic fungal hyphae in relation to phosphate supply; a potential method for selection of efficient mycorrhizal species. *Mycol Res* **97**: 355-358.
- Dinkelaker B, Römheld V & Marschner H (1989) Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ* **12**: 285-292.
- Ditengou FA, Béguiristain T & Lapeyrie F (2000) Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. *Planta* **211**: 722-728.
- Doumas P, Coupé M & D'Auzac J (1983) Effet de la carence en phosphate sur les activités des phosphatases racinaires du Pin d'Alep. *Physiol Vég* **21**: 651-663.
- Duff MG, Sarath G & Plaxton WC (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plant* **90**: 791-800.
- Duplessis S, Tagu D & Marin F (2001) Living together underground: a molecular glimpse of the ectomycorrhizal symbiosis. In: Molecular biology of fungal development: Mycological series. Eds Osiewacz H, Dekker & Dekker, New York, USA. In press.
- Ehrlich KC, Montalbano BG, Mullaney EJ, Dischinger HCJ & Ullah AH (1994) An acid phosphatase from *Aspergillus ficuum* has homology to *Penicillium chrysogenum* PhoA. *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 63-68.
- Ekblad A, Wallander H, Carlsson R & Huss-Danell K (1995) Fungal biomass in roots and extramatricial mycelium in relation to macronutrients and plant biomass of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* and *Alnus incana*. *New Phytol* **131**: 443-451.
- Ezawa T, Smith SE & FA Smith (2001) Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **149**: 555-563.
- Ezawa T, Smith SE & FA Smith (2002) P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil* **224**: 221-230.
- Fedorova ND, Khaldi N, Joardar VS *et al.* (2008) Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* **4**: e1000046.
- Fox TR & Comerford N (1990) Low-molecular-weight organic acids in selected forest soils of the South eastern USA. *Soil Sci Soc Am J* **54**:1139-1144.
- Frossard E, Brossard M, Hedley MJ & Metherell A (1995) Reactions controlling the cycling of P in soils. In: Tiessen H Eds, Phosphorus in global environment, John Wiley & Sons, New York, USA, p. 108-137.

- Gahoonia TS & Nielsen NE (1997) Variation in root hairs of barley cultivars doubled soil phosphorus uptake. *Euphytica* **98**: 177-182.
- Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B & Debaud JC (1994) Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytol* **128**: 645-657.
- Geluk MA, Norde W, Van Kalsbeek HKAI & Van't Riet K (1992) Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. *Enzyme Microb Technol* **14**: 748-754.
- George TS, Turner BL, Gregory PJ, Cade-Menun BJ & Richardson AE (2006) Depletion of organic phosphorus from oxisols in relation to phosphate activities in the rhizosphere. *Eur J Soil Sci* **57**: 47-57.
- Gerlitz TGM & Werk WB (1994) Investigations on phosphate uptake and polyphosphate metabolism by mycorrhized and non-mycorrhized roots of beech and pine as investigated by *in vivo* ³¹P-NMR. *Mycorrhiza* **4**: 207-214.
- Gerlitz TGM & Gerlitz A (1997) Phosphate uptake and polyphosphate metabolism of mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of pine and of *Suillus bovinus* at varying external pH measured by *in vivo* ³¹P-NMR. *Mycorrhiza* **7**: 101-106.
- Gilbert GA, Knight JD, Vance CP & Allan DL (1999) Acid phosphorus activity in phosphorus-deficient white lupin roots. *Plant Cell Environ* **22**: 801-810.
- Gilroy S & Jones DL (2000) Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends Plant Sci* **5**: 56-60.
- Glassop D, Smith SE & Smith FW (2005) Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots. *Planta* **222**: 688-698.
- Goldstein AH, Baertlein DA & McDaniel RG (1988) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum* .1. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension cultured cells. *Plant Physiol* **87**: 711-715.
- Gould SF (1998) Proteoid root mats bind surface materials in Hawkesbury Sandstone biomantles. *Aust J Soil Res* **36**: 1019-1031.
- Grellier B, Strullu DG, Martin F & Renaudin S (1989) Synthesis *in vitro*, microanalysis and ³¹P-NMR study of metachromatic granules in birch mycorrhizas. *New Phytol* **112**: 49-54.
- Griffiths RP, Baham JE, Cadwell BA (1994) Soil solution chemistry of ectomycorrhizal mats in forest soil. *Soil Biochem* **26**: 331-337.
- Guillot J (1997) Les bases de la spécificité des champignons ectomycorhiziens vis-à-vis de leur hôte. *Rev For Fr* n° **XLIX**.
- Haas H, Redl B, Friedlin E & Stoffler G (1992) Isolation and analysis of the *Penicillium chrysogenum* phoA gene encoding a secreted phosphate-repressible acid phosphatase. *Gene* **113**: 129-133.
- Hahn H & Mendgen (2001) Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 322-327.
- Halm BJ, Stewart JWB & Halstead RL (1972) The phosphorus cycle in a native grassland ecosystem. *Isotopes and Radiation in Soil-Plant relationships including forestry*, IAEA, Vienna, p. 571-586.

- Harley JL & Smith SE (1983) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press Inc., London, UK, 483 p.
- Harrison MJ & van Buuren ML (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.
- Harrison MJ, Dewbre GR & Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**: 2413-2429.
- Haüssling, M. and H. Marschner. 1989. Organic and inorganic soil phosphates and acid phosphatase activity in the rhizosphere of 80-year-old Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) trees. *Biol Fert Soils* **8**:128-133.
- Hayes JE, Richardson AE & Simpson RJ (2000) Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biol Fert Soils* **32**: 279-286.
- He ZQ, Griffin TS & Honeycutt CW (2004) Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in swine manure and soil. *J Environ Qual* **33**: 367-372.
- Hinsinger P (1998) How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv Agron* **64**: 225-265.
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* **237**: 173-195.
- Hoffland E (1992) Quantitative evaluation of the role of organic acid exudation in the mobilisation of rock phosphate by rape. *Plant Soil* **140**: 279-289.
- Hyde G, Cole L & Ashford AE (1997) Mycorrhiza movies. *Mycorrhiza* **7**: 167-169.
- Jackson MB, Manwaring JH & Caldwell MM (1990) Rapid physiological adjustments of roots to localized soil enrichments. *Nature* **344**: 58-60.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR & Harrison MJ (2007) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Nat Acad Sci USA* **104**: 1720-1725.
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schroder WH & Godbold DL (2001) Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* **149**: 327-337.
- Joanisse GD, Bradley RL, Preston CM & Munson AD (2007) Soil enzyme inhibition by condensed litter tannins may drive ecosystem structure and processes: the case of *Kalmia angustifolia*. *New Phytol* **175**: 535-546.
- Joner EJ, Magid J, Gahoonia TS & Jakobsen I (1995) P depletion and activity of phosphatases in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Soil Biol Biochem* **27**: 1145-1151.
- Jones DL & Darrah PR (1994) Role of root derived organic acids in the mobilisation of nutrient from the rhizosphere. *Plant Soil* **166**:247-257.
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant Soil* **205**: 25-44.
- Jungk A, Asher CJ, Edwards DG & Meyer D (1990) Influence of phosphate status on phosphate uptake kinetics of maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*). *Plant Soil* **124**: 175-182.

- Kai M, Masuda Y, Kikuchi Y, Osaki M & Tadano T (1997) Isolation and characterization of a cDNA from *Catharanthus roseus* which is highly homologous with phosphate transporter. *Soil Sci Plant Nutr* **43**: 227-235.
- Karandashov V & Bucher M (2005) Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci* **10**: 22-29.
- Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K & Hogetsu T (2007) Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*. *Mycorrhiza* **17**: 563-570.
- Koide RT & Kabir Z (2000) Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytol* **148**: 511-517.
- Kornberg A, Rao NN & Ault-Riche D (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* **68**: 89-125.
- Kroehler CJ, Antibus RK & Linkins AE (1988) The effects of organic and inorganic phosphorus concentration on the acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Can J Bot* **66**: 750-756.
- Lagrange H, Jay-Allemand C & Lapeyrie F (2001) Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytol* **149**: 349-355.
- Lambers H, Raven JA, Shaver GR & Smith SE (2008) Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends Ecol Evol* **23**: 95-103.
- Lamhamedi MS, Bernier PY & Fortin JA (1992) Growth, nutrition and response to water stress of *Pinus pinaster* inoculated with ten dikaryotic strains of *Pisolithus* sp. *Tree Physiol* **10**: 153-167.
- Lamont B (1973) Factors affecting the distribution of proteoid roots within the root systems of two *Hakea* species. *Aust J Bot* **21**: 165-187.
- Lamont B (1983) Root hair dimensions and surface/volume/weight ratios of roots with the aid of scanning electron microscopy. *Plant Soil* **74**: 149-152.
- Larsen S (1967) Soil phosphorus. *Adv Agron* **19**: 151-210.
- Lassen SF, Breinholt J, Ostergaard PR, Brugger R, Bischoff A, Wyss M & Fuglsang CC (2001) Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4701-4707.
- Leggewie G, Willmitzer L & Riesmeier JW (1997) Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate-uptake deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* **9**: 381-392.
- Lei J, Lapeyrie F, Malajczuk V & Dexheimer J (1990) Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. II. Ultrastructural and morphological changes at the early stage of mycorrhiza formation. *New Phytol* **116**: 115-122.
- Leprince F & Quiquampoix H (1996) Extracellular enzyme activity in soil: effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Eur J Soil Sci* **47**: 511-522.

- Lewis DG & Quirk JP (1967) Phosphate diffusion in soil and uptake by plants. *Plant Soil* **26**: 445-453.
- Leytem AB, Mikkelsen RL & Gilliam JW (2002) Sorption of organic phosphorus compounds in Atlantic coastal plain soils. *Soil Sci* **167**: 652-658.
- Lindsay WL (1979) Chemical equilibria in soils. John Wiley & Sons, New York, USA, 449 p.
- Lindsay WL, Vlek PLG & SH (1989) Phosphate minerals. In: Minerals in soil environment, 2nd Edition. Edited by Dixon, J.B., Weed, S.B. Soil science society of America, Madison, WI, USA, 1089-1130.
- Liu C, Muchhal US, Uthappa M, Kononowicz AK & Raghothama KG (1998a) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* **116**: 91-99.
- Liu H, Trieu AT, Blaylock LA & Harrison MJ (1998b) Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol Plant-Microb Interact* **11**: 14-22.
- Lu YP, Zhen RG & Rea PA (1997) *AtPT4*: a fourth member of the *Arabidopsis* phosphate transporter gene family. *Plant Physiol* **114**: 737-747.
- Lynch WL (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol* **109**: 7-13.
- Lynch JP & Brown KM (2001) Topsoil foraging: an architectural adaptation of plants to low phosphorus. *Plant Soil* **237**: 225-237.
- Ma Z, Bielenberg KM, Brown KM & Lynch P (2001) Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **24**: 459-467.
- MacFall JS, Slack SA & Iyer J (1992) Effects of *Hebeloma arenosa* and phosphorus fertility on root acid phosphatase activity of red pine (*Pinus resinosa*) seedlings. *Can J Bot* **69**: 380-383.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre IE & Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant-Microb Interact* **14**: 1140-1148.
- Marschner H (1995) Nutrient availability in soils. In: Mineral nutrition of higher plants Eds, Academic Press, London, UK, p. 483-507.
- Martin F, Canet D, Rolin D, Marchal JP & Lahrer F (1983) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of polyphosphate metabolism in intact ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **71**: 469-476.
- Martin F, Marchal J-P, Timinska A & Canet D (1985) The metabolism and physical state of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi. A ³¹P nuclear magnetic resonance study. *New Phytol* **101**: 275-290.
- Martin F & Hilbert J-L (1991) Morphological, biochemical and molecular changes during ectomycorrhiza development. *Experientia* **47**: 321-331.
- Martin F, Lapeyrie F & Tagu D (1997) Altered gene expression during ectomycorrhiza development. *Mycotaxon* **6**: 223-242.
- Martin F, Laurent P, Carvallo D, Voiblet C, Balestrini R, Bonafante P & Tagu D (1999) Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: Identification, function and expression

- in symbiosis. *Fungal Genet Biol* **27**: 161-174.
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C & Lapeyrie F (2001) Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytol* **151**: 145-154.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D *et al.* (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- Martins A, Santos M, Santos H & Pais MS (1999) A ³¹P nuclear magnetic resonance study of phosphate levels in roots of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal plants of *Castanea sativa* Mill. *Trees* **13**: 168-172.
- Massicotte HB, Peterson RL & Ashford AZ (1987) Ontogeny of *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae. II. Transmission electron microscopy. *Can J Bot* **65**: 1940-1947.
- Massonneau A, Martinoia E, Dietz KJ & Mimura T (2000) Phosphate uptake across the tonoplast of intact vacuoles isolated from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Planta* **211**: 390-395.
- Matumoto-Pintro P (1996) Rôle des phosphatases dans l'utilisation du phosphore organique par les champignons ectomycorhiziens et leurs association avec le Pin laricio de Corse. Influence des surfaces adsorbantes sur l'activité des phosphatases. Thèse Doctorat Ecole Nationale Supérieure Agronomique Montpellier, 197 p.
- Mejstrik VK & Krause HH (1973) Uptake of ³²P by *Pinus radiata* roots inoculated with *Suillus luteus* and *Cenococcum graniforme* from different sources of available phosphate. *New Phytol* **72**: 137-140.
- Mengel K & Kirkby (1987) Principles of plant nutrition. 4th Eds, International Potash Institute, Bern, Switzerland, 687 p.
- Miller SS, Allan PL, Menzhuber CJ, Fedorova M & Vance CP (2001) Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. *Plant Physiol* **127**: 594-606.
- Morel R (1996) Les sols cultivés. Lavoisier, 2th Eds, Paris, France, 376 p.
- Mousain D, Poitou N & Delmas J (1979) La Symbiose mycorhizienne : résultats obtenus avec l'*Hebeloma cylindrosporium* et le *Pisolithus tinctorius*, et perspectives d'application agronomique. In : Mushroom Science X (Part I), Proceedings of the 10th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Delmas Eds, Bourges, Tardy, Quercy SA, p. 949-956.
- Mousain D, Salsac L, 1982. Nutrition phosphatée et activités phosphatases acides des symbiotes ectomycorhiziens cultivés isolément ou en association. In "Les mycorhizes: biologie et utilisation" Dijon. Les colloques de l'INRA No 13
- Mousain D, Matumoto-Pintro P & Quiquampoix D (1997) Le rôle des mycorhizes dans la nutrition phosphatée des arbres forestiers. *Rev For Fr* **XLIV**: 67-81.
- Muchhal US, Pardo JM & Raghothama KG (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat Acad Sci USA* **93**: 10519-10523.

- Mullaney EJ, Daly CB, Ehrlich KC & Ullah AH (1995) The *Aspergillus niger* (*ficuum*) *aphA* gene encodes a pH 6.0-optimum acid phosphatase. *Gene* **162**: 117-121.
- Neumann G & Römheld V (1999) Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* **211**: 121-130.
- Ogawa N, De Risi J & Brown PO (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell* **11**: 4309-4321.
- Ohtomo R & Saito M (2005) Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* **167**: 571-578.
- Olsen SR & Khasawneh FE (1980) Use and limitations of physical-chemical criteria for assessing the status of phosphorus in soils. In: The role of phosphorus in agriculture, FE Khasawneh, EC Sample, EJ Kamprath, Eds Am Soc Agron, Madison WI, p. 361-410
- Pasamontes L, Haiker M, Henriquez-Huecas M, Mitchell DB & van Loon APGM (1997) Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talamoryce thermophilus*. *Biochim Biophys Acta* **1353**: 217-223.
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C & Briggs SP (2002) Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Nat Acad Sci USA* **99**: 13324-13329.
- Paul EA & Clark FE (1989) Phosphorus transformations in soil. In: Soil Microbiology and Biochemistry. Eds, Academic Press. p. 222-231.
- Perez-Moreno J & Read DJ (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytol* **145**: 301-309.
- Peterson RL & Bonfante P (1994) Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant Soil* **159**: 79-88.
- Piché Y, Peterson RL & Ackerley CA (1983) Early development of ectomycorrhizal short roots of pine. *Scanning Electron Microscopy* **1983**: 1467-1474.
- Plante AF (2007) Soil biogeochemical cycling of inorganic nutrients and metals. In: Paul E. A. (Eds.), Soil microbiology and biochemistry Elsevier Academic Press, Burlington, USA. pp. 391-398.
- Purnell HM (1960) Studies of the family Proteaceae. I. Anatomy and morphology of the roots of some Victorian species. *Aust J Bot* **68**: 2564-2570.
- Quiquampoix H, Chassin P & Ratcliffe RG (1989) Enzyme activity and cation exchange as tools for the study of the conformation of the protein adsorbed on mineral surfaces. *Progr Colloid Polym Sci* **79**: 59-63.
- Quiquampoix H, Abadie J, Baron MH, Leprince F, Matumoto-Pintro PT, Ratcliffe RG & Staunton S (1995) Mechanisms and consequences of protein adsorption on soil mineral surfaces. *ACS Symposium series* **602**: 321-333.

- Quiquampoix H & Mousain D (2005) Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. *Organic phosphorus in the environment* (Turner BL, Frossard E & Baldwin DS, eds), pp. 89-112. CAB International, Wallingford.
- Quiquampoix H & Burns RG (2007) Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* **3**: 401-406.
- Raboy V (2003) myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* **64**: 1033-1043.
- Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 665-693.
- Raghothama KG (2000) Phosphate transport and signalling. *Trends Plant Sci* **5**: 37-49.
- Raghothama KG & Karthikeyan (2005) Phosphate acquisition. *Plant Soil* **274**: 411-413.
- Rao MA & Gianfreda L (2000) Properties of acid phosphatase-tannic acid complexes formed in the presence of Fe and Mn. *Soil Biol Biochem* **32**: 1921-1926.
- Rasmussen N, Llyod DC, Ratcliffe RG, Hansen PE & Jakobsen I (2000) ^{31}P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* **226**: 245-253.
- Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Laloi M, Leggewie G, Amrhein N & Bucher M (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* **414**: 462-470.
- Read DJ (1999) Mycorrhiza-the state of the art. In: Mycorrhiza, Varma A, Hock B, Springer-Verlag, Eds, Berlin, Germany, p. 3-34.
- Rees B, Shepherd VA & Ashford AE (1994) Presence of a motile tubular vacuole system in different phyla of fungi. *Mycol Res* **98**: 985-992.
- Reid JB (1981) Observations in root hair production by Lucerne, maize and perennial rye grass grown in sandy loam. *Plant Soil* **23**: 223-228.
- Richardson AE (1994) Soil microorganisms and phosphorus availability. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. Eds, Soil Biota Management in Sustainable Farming System. CSIRO, Melbourne, Australia, p. 50-62.
- Rosewarne GM, Barker SJ, Smith SE, Smith F & Schachtman DP (1999) A *Lycopersicon* esculentum phosphate transporter (LePT1) involved in phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* **144**: 507-516.
- Rousseau JVD, Sylvia DM & Fox AJ (1994) Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytol* **128**: 639-644.
- Salzer P, Hebe G, Reith A, Zitterell-Haid B, Stransky H, Gaschler K & Hager A (1996) Rapid reactions of spruce cells to elicitors released from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*, and inactivation of these elicitors by extracellular spruce cell enzymes. *Planta* **198**: 118-126.
- Sample EC, Soper RJ & Racz GJ (1980) Reactions of phosphate fertilizers on soils. In: The role of phosphorus in Agriculture» FE Kassawneh, EC sample and EJ Kamprath (Eds) ASA, CSSA, SSSA, Madison WI. p. 263-310.
- Sandwick RK & Schray KJ (1987) The inactivation of enzymes upon interaction with a hydrophobic latex surfaces. *J Colloid Interf Sci* **115**: 130-138.

- Schachtman DP, Reid RJ & Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* **116**: 447-453.
- Shane MW, Szota C & Lambers H (2004) A root trait accounting for the extreme phosphorus sensitivity of *Hakea prostrata* (Proteaceae). *Plant Cell Environ* **27**: 991-1004.
- Shane MW & Lambers H (2005) Cluster roots: a curiosity in context. *Plant Soil* **274**: 101-125.
- Shu L, Shen L, Rengel Z, Tang C, Zhang F & Cawthray G (2007) Formation of cluster roots and exudation by *Lupinus albus* in response to localized application of different phosphorus source. *Plant Sci* **172**: 1017-1024.
- Skene KR, Kierans M, Sprent JI & Ravens JA (1996) Structural aspects of cluster roots development and their possible significance for nutrient acquisition in *Grevillea robusta* (Proteaceae). *Ann Bot* **77**: 443-45.
- Skene KR (1998) Cluster roots: some ecological considerations. *J Ecol* **86**: 1060-1064.
- Smith FW, Ealing PM, Dong B & Delhaize E (1997) The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant J* **11**: 83-92.
- Smith SE & Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis. 2nd Eds. Academic Press, London, UK.
- Smith FW, Rae AL & Hawkesford MJ (2000) Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1465**: 236-245.
- Smith SE, Smith FA & Jakobsen I (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol* **133**: 16-20.
- Smith SE & Read DJ (2008) Mycorrhizal Symbiosis, 3rd Eds. Academic Press, London, UK.
- Solaiman MZ & Saito M (2001) Phosphate efflux from intraradical hyphae of *Gigaspora maragarita* *in vitro* and its implication for phosphorus translocation. *New Phytol* **151**: 525-533.
- Ström L, Owen AG, Godbold DL & Jones DL (2005) Organic acid behaviour in a calcareous soil implication for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biol Biochem* **37**: 2046-2054.
- Tagu D, Lapeyrie F & Martin F (2002) The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. *Plant Soil* **244**: 97-105.
- Takanishi I, Ohtomo R, Hayatsu M & Saito M (2009) Short-chain polyphosphate in arbuscular mycorrhizal roots colonized by *Glomus* spp.: a possible phosphate pool for host plants. *Soil Biol Biochem* **41**: 1571-1573.
- Tarafdar JC & Jungk A (1987) Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Bio Fert Soils* **3**: 199-204.
- Tasaki Y, Azwan A, Yasaki Y, Hara T & Joh T (2006) Structure and expression of two genes encoding secreted acid phosphatases under phosphate-deficient conditions in *Pholiota nameko* strain N2. *Curr Genet* **49**: 323-332.
- Tatry M-V, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H & Plassard C (2009). Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J* **57**: 1092-1102.

- Thomson BD, Clarkson DT & Brain P (1990) Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol* **116**: 647-653.
- Tibbett M, Sanders FE & Cairney JWG (1998) The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. In axenic culture. *Mycol Res* **102**: 129-135.
- Tibbett M (2002) Considerations on the use of the *p*-nitrophenyl phosphomonoesterase assay in the study of the phosphorus nutrition of soil borne fungi. *Microbiol Res* **157**: 221-231.
- Tibbett M & Sanders FE (2002) Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Ann Bot* **89**: 783-789.
- Torres Aquino M (2003) Approches physiologiques du rôle du partenaire fongique sur l'accumulation et le transfert de P vers la plante hôte dans la symbiose ectomycorhizienne modèle *Hebeloma cylindrosporum/Pinus pinaster*. Thèse Doctorat Ecole Nationale Supérieure Agronomique Montpellier, 112 p.
- Torres Aquino M & Plassard C (2004) Dynamics of ectomycorrhizal mycelial growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 149-156.
- Torrey JG & Callahan D (1978) Determinate development of nodule roots in actinomycete-induced root nodules of *Myrica gale*. *Can J Bot* **56**: 1357-1364.
- Turner BL, Cade-Menun BJ & Westermann DT (2003) Organic phosphorus composition and potential bioavailability in semi-arid arable soils of the western United States. *Soil Sci Soc Am J* **67**: 1168-1179.
- Turner BL, Frossard E & Baldwin DS (2005) Organic phosphorus in the environment. CABI Publishing, 875 Massachusetts Avenue, Cambridge, USA, 399 p.
- Turner BL & Haygarth PM (2005) Phosphatase activity in temperate pasture soils: potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. *Sci Total Environ* **344**: 27-36.
- Uetake Y, Kojima T, Ezawa T & Saito M (2002) Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol* **154**: 761-768.
- Ullah AJ, Sethumadhavan K, Lei XG, Mullaney EJ (2000) Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). *Bioch Bioph Res Comm* **275** : 279-285.
- Van Tichelen KK & Colpaert JV (2000) Kinetics of phosphate absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal Scots pine seedlings. *Physiol Planta* **110**: 96-103.
- Viereck N, Hansen PE & Jakobsen I (2004) Phosphate pool dynamics in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* studied by *in vivo* 31P NMR spectroscopy. *New Phytol* **162**: 783-794.
- Walbridge MR (1991) Phosphorus Availability in Acid Organic Soils of the Lower North Carolina Coastal-Plain. *Ecology* **72**: 2083-2100.
- Wallander H, Wickman T & Jacks G (1997) Apatite as a P source in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant Soil* **196**: 123-131.
- Wallander H (2000) Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **218**: 249-260.

- Wallander H, Fossum A, Rosengren U & Jones H (2005) Ectomycorrhizal fungal biomass in roots and uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings growing in forest soil with and without wood ash amendment. *Mycorrhiza* **15**: 143-148.
- Wannet WJB, Wassenaar RW, Jorissen HJMM, van der Drift C & Op den Camp HJM (2000) Purification and characterization of an acid phosphatase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**: 215-220.
- Wasaki J, Omura M, Osaki M, Ito H, Matsui H, Shinano T & Todano T (1999) Structure of a cDNA for an acid phosphatase from phosphate-deficient lupin (*Lupinus albus* L.) roots. *Soil Sci Plant Nutr* **45**: 439-449.
- Wasaki J, Yamamura T, Shinano T & Osaki M (2003) Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Soil* **248**: 129-136.
- Weber RWS & Pitt D (1997) Purification, characterization and exit routes of two acid phosphatases secreted by *Botrytis cinerea*. *Mycol Res* **101**: 1431-1439.
- Williamson LC, Ribrioux SP, Fitter AH & Leyser HM (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 875-882.
- Wood HG & Clark JE (1988) Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Ann Rev Biochem* **57**: 235-260.
- Wyss M, Brugger R, Kronenberg A, Rémy R, Fimbel R, Oesterhelt G, Lehmann M & Loon A (1999). Biochemical characterization of fungal phytases (myo-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl Environ Microbiol* **65**: 367-373.
- Yoon SJ, Choi YJ, Min HK, Cho KK, Kim JW, Lee SC & Jung YH (1996) Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb Technol* **18**: 449-454.
- Yoshida H, Oikawa S, Ikeda M & Reese ET (1989) A novel acid phosphatase excreted by *Penicillium funiculosum* that hydrolyzes both phosphodiester and phosphomonoesters with aryl leaving groups. *J. Biochem.* **105**: 794-798.
- Zou X, Binkley D & Caldwell BA (1995) Effects of dinitrogen-fixing trees on phosphorus biogeochemical cycling in contrasting forests. *Soil Sci Soc Am J* **59**: 1452-1458.

CHAPITRE 2

Séparation des phosphatases acides sécrétées par le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporium* et leur efficacité à hydrolyser du phosphore organique extrait d'un sol sableux avec différents régimes de fertilisation

Il est reconnu que la faible disponibilité du phosphore (P) dans les sols constitue un problème majeur pour la production de biomasse dans les écosystèmes forestiers (Bielecki, 1973 ; Frossard *et al.*, 1995). Cependant, les organismes du sol (bactéries, champignons, plantes) ont développé de nombreuses stratégies pour l'amélioration de la disponibilité en P. La sécrétion de phosphatases acides (AcPases) est une de ces stratégies (Burns, 1982).

La production des AcPases en réponse à des variations de concentration en P dans le milieu extérieur a largement été démontrée en culture *in vitro* pour de nombreuses espèces de champignons ectomycorhiziens (Mousain & Salsac, 1982 ; Antibus *et al.*, 1992). Les travaux ont montré la forte capacité des AcPases à libérer du Pi à partir d'une large variété de composés phosphatés naturels ou artificiels. *Cependant, malgré le rôle potentiel de ces enzymes dans le fonctionnement des écosystèmes naturels, très peu d'études ont porté sur l'efficacité réelle de ces enzymes à mobiliser du Pi à partir de différentes sources de P organique extraites de sols forestiers.*

Les objectifs de ce deuxième chapitre sont donc les suivants :

- 1) Séparer les différentes AcPases extracellulaires synthétisées par le champignon ectomycorhizien *H. cylindrosporium* en culture pure sous conditions de déficience en Pi.
- 2) Evaluer les propriétés catalytiques de ces enzymes et notamment leur efficacité à libérer du Pi par l'hydrolyse de composés organiques phosphatés extraits d'un sol sableux de l'écosystème Landais présentant différents régimes de fertilisation.

Pour répondre à notre premier objectif, les mycéliums de *H. cylindrosporium* ont tout d'abord été cultivés à la surface d'un milieu nutritif liquide (N6, 3 mM NaH₂PO₄) (Annexe 1) à l'aide d'un dispositif élaboré au sein de notre unité (Annexe 2). Les thalles sont ensuite transférés pendant plusieurs jours sur un nouveau milieu sans Pi afin de stimuler la sécrétion des AcPases. A la fin de la culture, les AcPases sécrétées par *H. cylindrosporium* dans le milieu de

culture sont séparées par sur résine échangeuse de cations et identifiées par l'hydrolyse d'un substrat artificiel le *para*-nitrophénylphosphate (pNPP).

Pour répondre à notre second objectif, nous avons utilisé des sols sableux (podzol) acides échantillonnés dans une forêt de pin maritime dans le sud-ouest de la France (station expérimentale de Pierroton). Les sols ont été choisis pour leurs concentrations contrastées en P inorganique et en P organique. De plus, l'espèce fongique étudiée est naturellement présente sur ces sols.

L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un premier article intitulé : «Separation of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and their effectiveness in hydrolyzing organic phosphorus in a sandy soil after different fertilisation regimes » qui a été soumis en 2009 à la revue *FEMS Microbiology & Ecology*.

References

- Antibus RK, Sinsabaugh RL & Linkins AE (1992) Phosphatase activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi.. *Can J Bot* **70**: 794–801.
- Bieleski RL (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* **24**: 225-252.
- Burns RG (1982) Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol Biochem* **14**: 423-427.
- Frossard E, Brossard M, Hedley MJ & Metherell A (1995) Reactions controlling the cycling of P in soils. In: Tiessen H Eds, Phosphorus in global environment, John Wiley & Sons, New York, USA, p. 108-137.
- Mousain D & Salsac L (1982) Nutrition phosphatée et activités phosphatases acides des symbiotes ectomycorhiziens cultivés isolément ou en association. In "Les mycorhizes: biologie et utilisation" Dijon. Les colloques de l'INRA No 13.

Separation of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and their effectiveness in hydrolyzing organic phosphorus in a sandy soil after different fertilisation regimes

Authors: Julien Louche¹, Muhammad Arif Ali¹, François-Xavier Sauvage², Hervé Quiquampoix¹ & Claude Plassard¹

Affiliation: ¹UMR 1222 Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols, INRA-IRD-Montpellier SupAgro, Montpellier, France ; and ²UMR 1083 Sciences Pour l'Oenologie, INRA, Montpellier, France

Correspondence: Claude Plassard, plassard@supagro.inra.fr, Tel.: +33 4 99 61 29 79; fax: +33 4 99 61 30 88

Abstract

It has been suggested that ectomycorrhizal fungi may improve phosphate nutrition of their host plants by secreting, into the soil solution, acid phosphatases (AcPases) which are able to release orthophosphate (Pi) from soil organic phosphorus (Po). We studied the AcPases secreted by the basidiomycete ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and their efficiency to exploit NaHCO₃-extractable Po fraction from sandy podzol. Four fractions with AcPase activity, secreted from mycelia grown in pure culture under P-starved conditions, were separated by cation-exchange chromatography, and numbered P1 to P4. Each AcPase active fraction displayed strong ability to hydrolyse a wide range of phosphate monoesters but none of them hydrolysed phytate. Up to 11% of the NaHCO₃-extractable Po was enzyme reactive and this percentage reached 45% in autoclaved soils. Each fraction of activity showed different abilities to hydrolyse Po according to the soil treatment and the fertilization regime. Soil autoclaving showed that incomplete hydrolysis of Po in fresh soils resulted from both the lack of available substrates and the inhibition of the added enzymes by soil compounds. This work suggests that AcPases secreted from *H. cylindrosporum* could be efficient in recycling Po pools from soil microorganisms that may be delivered by soil autoclaving.

Keywords: chromatography; substrate specificity; sodium bicarbonate extractable organic phosphorus; enzyme inhibition; soil sterilization; podzol.

1. Introduction

Phosphorus (P) is an essential macronutrient required for growth and development of living organisms. In soil, P occurs under various organic and inorganic forms not directly assimilable by plants or soil microorganisms. Orthophosphate (Pi) is the only form of P directly available to plants. Its low concentration in soil and its low mobility (Hinsinger, 2001; Vance, 2003) make P bioavailability a limiting factor for ecosystem production. However, organisms have developed various mechanisms to enhance Pi availability in soil including the secretion of extracellular acid phosphatases (AcPases) (Burns, 1982).

AcPases (EC 3.1.3.2) form a key group of enzymes that are able to mobilize Pi from organic P (Po) compounds as they catalyze the hydrolysis of phosphate esters to release Pi in acidic environment. AcPase activity in rhizosphere may originate from plant roots (Goldstein *et al.*, 1988; Coello, 2002), bacteria (Palacios *et al.*, 2005; Boyce & Walsh, 2007) and fungi (Yoshida *et al.*, 1989; Weber & Pitt, 1997; Bernard *et al.*, 2002). The secretion of AcPases is induced by Pi deficient conditions in all the organisms studied so far (Goldstein *et al.*, 1988; Bernard *et al.*, 2002). Laboratory experiments with known substrates showed that AcPases are generally not substrate dependent, excepted for phytases (Wyss *et al.*, 1999), and are able to release Pi from various phosphorylated substrates. However, soil is not an ideal environment for enzyme activity, which can be highly modified by soil compounds (Joanisse *et al.*, 2007) and by interactions with the solid phase of soil (Quiquampoix, 1987a, b; Quiquampoix *et al.*, 1995; Quiquampoix & Burns, 2007).

Trees from boreal or temperate regions live in association with symbiotic fungi (Smith & Read, 2008). The mycorrhizal fungus is intimately associated with the root through the formation of ectomycorrhiza and various exchanges between fungal and root cells take place in this new organ. It also produces extraradical hyphae that are able to explore the soil distant from the mycorrhizal roots. Ectomycorrhizal fungi have been reported to enhance P nutrition of host plant (Jentschke *et al.*, 2001; Chalot *et al.*, 2002; Torres Aquino & Plassard, 2004), and this beneficial effect has been attributed mainly to the growth of external hyphae into the soil, thus considerably increasing the soil volume exploited compared to non mycorrhizal roots. It has also been suggested that ectomycorrhizal fungi could contribute to organic P mobilization from soil solution through the production of extracellular AcPases (Quiquampoix & Mousain, 2005).

Despite the potential role of ectomycorrhizal symbiosis on Po mobilization, there is little information about the actual role played by AcPases released by ectomycorrhizal fungi.

As indicated by Bünemann (2008a), addition of enzyme can be used as a tool to assess the potential bioavailability of Po extracted from soils. However, most of the enzymes currently used in experiments are AcPases or phytases purified from saprophytic fungi (Hayes *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2003) or plants (Hens & Merckx, 2001; He *et al.*, 2004). To improve knowledge about the contribution of symbiotic fungi to the cycling of soil P, we have focused our work on the AcPases secreted by the basidiomycete ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. It is a model species extensively used to study biological processes involved in the establishment of the mycorrhizal symbiosis (Marmeisse *et al.*, 2004). Recently, two EST libraries (Wipf *et al.*, 2003; Lambilliotte *et al.*, 2004) have been constructed from this fungal species giving useful tools for the identification of the molecular processes involved in the uptake of P from soil (Tatry *et al.*, 2009). However, no sequence presenting homologies with extracellular AcPase genes were found in these available resources.

There is considerable variation in the expression of AcPase activity *in vitro* between ectomycorrhizal fungi (Calleja & D'Auzac, 1982; Tibbett *et al.*, 1998). Of the species previously studied, the ectomycorrhizal species *H. cylindrosporum* displayed large AcPase activities released in its culture medium (Leprince & Quiquampoix, 1996; Tibbett *et al.*, 1998) and is therefore a good candidate to improve P nutrition of the host plant grown in P deficient soils. A preliminary study of this species separated two AcPase isoforms from broth medium (Deransart *et al.*, 1990). These isoforms have been used to study the effects of pH and ionic strength on the interaction with clays on the isolated fractions (Leprince & Quiquampoix, 1996). However, the efficiency of these enzymes to release Pi from soil Po fractions was not evaluated.

The aim of this work was to evaluate the contribution of *H. cylindrosporum* AcPases on soil biological processes involved in Po transformations. In this paper, we present the substrate specificity of several fractions showing AcPase activity secreted by *H. cylindrosporum* in its culture medium under Pi-starved conditions. We also measured the ability of these AcPases to release Pi from soil Po fractions extracted from sandy podzols collected in a maritime pine forest in which *H. cylindrosporum* is naturally present. We compared the effect of soil extracts from fresh or autoclaved soils on Pi release, either from soil Po or glucose 6-phosphate (G6P), in order to get insights about the low rate of Pi released by *H. cylindrosporum* AcPases from fresh soil.

2. Material and Methods

2.1. Strain and Growth conditions

A dikaryotic strain (D2) of the ectomycorrhizal basidiomycete *H. cylindrosporum* Romagnesi, resulting from the plasmogamy of two compatible homokaryotic strains (h1 and h7) (Debaud & Gay, 1987) was used. A dikaryotic strain was used because this fungal stage is much more frequent in natural conditions than the homokaryotic one resulting from spore germination. Fungal stock cultures were grown in Petri dishes at 24°C in the dark, on solid standard medium (agar, 14 g l⁻¹) (pH 5.5) containing KNO₃ (6 mM), NaH₂PO₄ (3 mM), MgSO₄ 7H₂O (1 mM), KCl (4 mM), CaCl₂ (0.5 mM), ferric citrate 1‰, thiamine HCl (0.3 µM), Morizet & Mingeau (1996) micronutrients solution (0.2 ml l⁻¹) and glucose (5 g l⁻¹).

AcPases were obtained from P-starved mycelia grown in liquid medium. Mycelia were first grown in liquid standard solution (same composition as above, without agar). Agar plugs (8 mm diameter) of 1 month-old stock cultures were used to inoculate glass flasks containing 80 ml of liquid medium. A nichrome wire was used to maintain the agar plugs on the solution surface. Mycelia were grown for 15 d, at 24°C, without shaking. Pi starvation was achieved by transferring mycelia into 25 ml of new liquid solution of the same composition with no phosphate supply (-P treatment) for 10 additional days. To avoid Pi contamination during transfer, mycelia were rinsed few minutes in -P medium. All operations were carried out under sterile conditions. At the end of the culture, media containing extracellular enzymes from 24 mycelia were pooled and filtered through a nylon cloth. This solution was then used for AcPase separation.

2.2. Separation of *H. cylindrosporum* AcPases

The solution was first brought to 50% saturation with ammonium sulfate (29.1 g per 100 ml of culture medium), incubated at 4°C for 1 h and centrifuged (15,000 g, 40 min, 4°C). As preliminary experiments showed that the pellet did not contain detectable AcPase activity, it was discarded. The supernatant was collected and proteins were precipitated as described above using 90% saturation with ammonium sulfate (26.8 g per 100 ml of used culture medium). The pellet was dissolved in 10 ml of sodium acetate buffer 0.1 M pH 5.0. The resulting concentrated protein extract was desalted using dialysis membrane (MWCO 12-14,000 Da) against deionized water, overnight at 4°C. Sodium azide (0.02%) and phenylmethylsulphonyl fluoride (1 mM) were added to the protein extract. Separation of AcPases from the concentrated, desalted protein extract was then carried out at 4°C, by using

a cation exchange (CM-Trisacryl M from IBF Biotechnics) column (2.5 x 20 cm) equilibrated at pH 5.0 with sodium acetate buffer (0.1 M). Around 20 mg of total protein were loaded into the column that was first washed with 200 ml of the buffer used for column equilibration to remove the unbound proteins. Bound proteins were then eluted from the column with a NaCl gradient (0-0.5 M). The flow rate for both steps was 1.5 ml mn^{-1} . During washing and elution, the solution dripping out of the column was collected by fractions of 3 ml that were assayed for protein and AcPase activity.

2.3. Analysis of collected fractions

Protein concentration was estimated by measuring absorbance at 280 nm and was then calculated by using BSA (0-1mg ml^{-1}) as standard.

Phosphomonoesterase activity of eluted fractions was measured by using *para*-nitrophenylphosphate (*p*NPP) as substrate. 50 μl of each fraction was incubated with 200 μl of 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) containing 10 mM of *p*NPP. After incubation for 30 min at 30°C, the reaction was stopped by adding 1 ml of NaOH 0.5M and the *para*-nitrophenolate (*p*NP) produced was determined by colorimetry at 410 nm. AcPase activity was expressed in nkat ml^{-1} of *p*NP released. Fractions with AcPase activity were collected separately and kept at 4°C for further analysis.

2.4. Substrate specificity

The substrate specificity was determined by incubating enzyme with various phosphorylated substrates at 10 mM. All the substrates were from Sigma (www.sigmaaldrich.com) and are detailed in Table 1. Enzyme was incubated (30°C) with acetate buffer 0.1 M for 30 min with the exception of sodium phytate which was incubated for 1 hr at 37°C. Enzymatic reaction was stopped by adding 1 ml of HCl 2 N. Substrate hydrolysis was measured by the release of Pi in the solution and AcPase activity was expressed in nkat ml^{-1} of Pi released. Concentration of orthophosphate (Pi) was determined using the malachite green method as described by Ohno & Zilbiske (1991) and KH_2PO_4 (0-10 μM) as standard. In order to compare results from the four phosphatase activity fractions adequately, data were transformed to a relative percentage activity value taking *p*NPPase activity as 100%.

2.5. Soils and total P, Pi and Po determinations

The soil used to study the abilities of *H. cylindrosporium* AcPases to hydrolyse soil Po was a sandy podzol collected in three different plots of a 15 year-old *Pinus pinaster* forest stand in Pierroton, south-west of France. One plot was unfertilized (control) and two plots were fertilized either with phosphorus (P) or with complete fertilizers (NPK). Frequency and forms of fertilizers applied in soil are summarized in Bakker *et al.* (2009). Soils core (8 x 15 cm) were taken in autumn 2008. Samples were sieved < 2 mm and stored at 4°C.

Extractions of labile P were carried out either on fresh or twice autoclaved (110°C for 60 min) soils according to Olsen *et al.* (1954) method. Four g of soil were shaken for 30 min in 40 ml sodium bicarbonate solution (0.5 M, pH 8.5) at room temperature. After shaking, samples were allowed to settle for few minutes and supernatant was filtered through a 0.2 µm cellulose membrane filter (VWR International). Soil solution was used immediately for determining labile P forms Pi and Pt and conserved at 4°C prior to enzyme analyses.

Phosphate was measured before (Pi) and after (total P, Pt) mineralization of soil extracts using malachite green method. Mineralization was carried out in acidified soil extracts with HCl 12N (1/1, v/v) at 110°C for 16 hrs. Preliminary experiments showed that these conditions mineralised all the organic P contained in the solution (data not shown). Po was calculated as the difference between Pt and Pi. Soils were dried overnight at 105°C to determine the percentage of humidity and to calculate Pi, Po and Pt concentrations per g of dried soil.

2.6. Incubation of enzymes with soil solution extracts

The ability of AcPases to hydrolyse Po fraction extracted by sodium bicarbonate was evaluated in the different soils previously described. One volume of soil solution was mixed with two volumes of sodium acetate buffer solution (1 M, pH 5.0) and the pH of each solution mixture (solution A) was adjusted to 5.0 with HCl 6 N. A volume of 100 µl of each phosphatase activity fraction was incubated for 1 hr at 30°C with 200 µl of solution A. Pi concentration was measured before and after incubation using the malachite green method. Enzyme activities are expressed in pkat of Pi released. The percentage of enzyme-reactive Po is also indicated. Hydrolysis of Po occurring in each soil solution without added enzymes was also measured.

2.7. Effect of soil solution extracts on AcPase activity

Effect of soil solution on enzyme activity was investigated by assaying hydrolysis of Glucose 6-phosphate (G6P) (Sigma, ref G-7250) added in excess into each soil solution. This substrate was used because it is a natural phosphate monoester that could be present in soils. A volume of 100 μ l of each phosphatase activity fraction was incubated for 1 hr at 30°C with 200 μ l of solution A containing 10 mM of G6P. Pi concentration was measured before and after incubation using the malachite green method. Enzyme activities are expressed in pkat of Pi released. The percentage of inhibition of G6P hydrolysis was also calculated by comparing the enzyme activities in presence and absence of soil solution extracts. In the latter case, the soil solution was replaced by sodium acetate buffer (0.1 M, pH 5.0).

2.8. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed for each activity fraction to evaluate the differences between soil types and soil treatments. Means were compared by using least significant difference (LSD, Fisher model), and differences were considered significant at $P < 0.05$. Statistica 8 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) was used to conduct statistical analysis.

3. Results

3.1. Chromatographic separation of *H. cylindrosporum* AcPases

Chromatographic separation of the extract on a cation exchange column made it possible to obtain 4 phosphatase activity peaks. They were named P1, P2, P3 and P4, in order of elution (Figure 1). The first peak P1 was not retained by the column and was eluted along with more than 90% of the proteins loaded onto the column. Although P2 and P3 did not bind either onto the column, they were clearly separated from each other. Only P4 was retained on the column and was eluted by NaCl 165 mM. As indicated by protein assay at 280 nm, only 2% of total proteins were retained at pH 5.0. Maximal activity recorded from the four phosphatase activity peaks was respectively 5, 28, 40 and 5 nkat of *p*NP released ml^{-1} of collected fraction. Activity of peak P1, P2, P3 and P4 represented respectively 5, 30, 55 and 10% of the total activity secreted by *H. cylindrosporum* in P starved growth conditions. For P1 and P4, fractions with the highest activity were pooled, corresponding to fractions 12-14 for P1 and 110-112 for P4. To avoid any mixture of P2 and P3, only the first two fractions of P2 (fractions 22-24) and the last two of P3 (fractions 35-37) were taken.

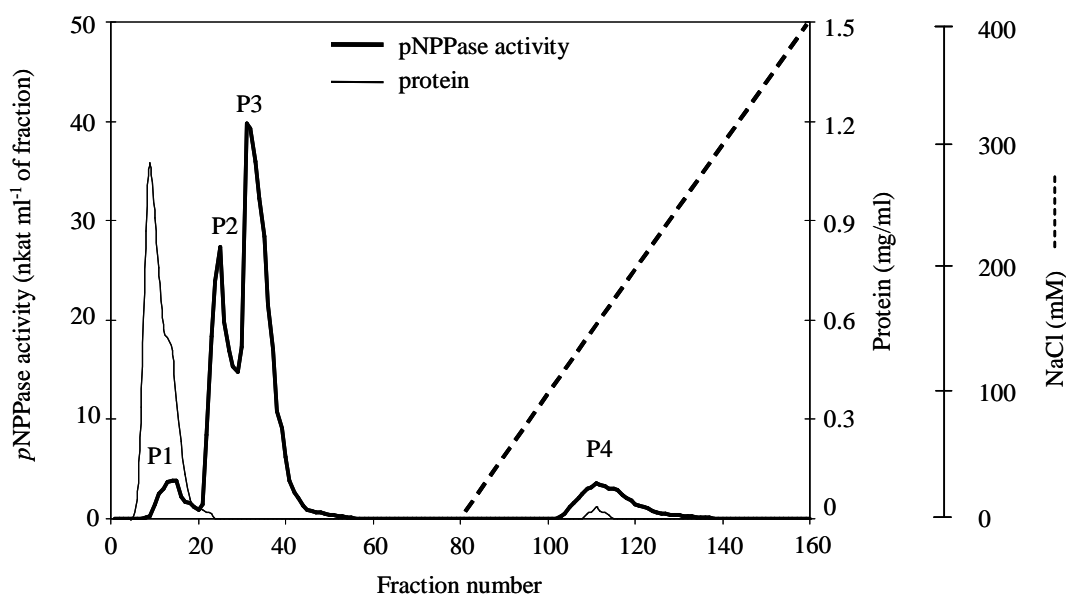


Figure 1. Chromatography profile on a cation exchange resin of phosphatases released by the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporum* under P starvation. The column was equilibrated with acetate buffer 0.1M at pH 5.0. Elution was performed with NaCl gradient (dotted line). Fractions (3 ml) were analyzed for proteins at 280 nm (fine line) and *p*NPPase activity (thick line). The mycelia were grown for 15 d in P-sufficient medium, and then transferred for 10 d in P-starved medium. 20 mg of proteins were loaded onto the column and were eluted at a flow rate of 1.5 ml min⁻¹. Four phosphatase activity peaks were separated (P1 to P4).

3.2. Biochemical analyses of the four phosphatase activity fractions separated from *H. cylindrosporum*

Preliminary experiments showed that each phosphatase active fraction exhibited catalytic activity within the pH range 2.5 – 7, with maxima between pH 5 – 6. Hence, AcPase activities were subsequently carried out at pH 5. Each phosphatase activity fraction hydrolysed a broad range of phosphorylated substrates (Table 1). Each fraction exhibited greater activity for some substrates than for *p*NPP. P1 and P2 had their greatest activity with linear polyphosphates (TripolyP) while the greatest catalytic rates for P3 and P4 respectively were observed for the hydrolysis of pyrophosphate (PPi) and glucose 1-phosphate (G1P). ADP and ATP were easily dephosphorylated by each of the 4 phosphatase activity fractions. None of them had the ability to catalyse Pi release from phytic acid as substrate neither at pH 5.0 nor at pH 3.0, 4.0 and 6.0 (data not shown). Similarly, each phosphatase active fraction had a low activity for the phosphodiester bis*p*NPP compared to the other substrates. Preliminary experiments showed that AcPase activity did not require metal ion cofactors and was strongly inhibited by 1 mM of vanadate (50% of inhibition for P2 and P3, 80% for P4 and 90% for P1) and

molybdate (more than 90% of inhibition). AcPase activity was not inhibited by tartrate at 1 mM.

Table 1. Substrate specificity of the four acid phosphatase activity peaks separated by cation exchange chromatography from the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporum*

Substrate ^a (10 mM)	Acid Phosphatase peaks			
	P1	P2	P3	P4
<i>p</i> NPP (control)	100 ± 1	100 ± 3	100 ± 2	100 ± 1
PPi	339 ± 38	175 ± 12	237 ± 24	282 ± 89
TripolyP	680 ± 12	224 ± 11	188 ± 19	227 ± 51
1-Naphtyl P	85 ± 8	16 ± 4	22 ± 7	111 ± 7
2-Naphtyl P	99 ± 2	54 ± 1	74 ± 10	105 ± 13
Glucose 1-P	241 ± 11	99 ± 13	230 ± 21	413 ± 14
Glucose 6-P	56 ± 3	46 ± 2	61 ± 3	79 ± 14
Fructose 1,6-biP	60 ± 3	50 ± 3	60 ± 1	18 ± 1
Fructose 6-P	75 ± 1	23 ± 3	37 ± 6	101 ± 9
bis <i>p</i> NPP	4 ± 1	7 ± 3	10 ± 3	1 ± 0
AMP	100 ± 1	28 ± 15	20 ± 6	112 ± 2
ADP	169 ± 7	102 ± 1	144 ± 9	129 ± 6
ATP	372 ± 22	164 ± 4	233 ± 37	250 ± 24
Phytate	0	0	0	0

For each fraction, activity was first determined using *p*NPP (10 mM) as substrate at pH 5.0 in acetate buffer (0.1 M). 100% of activity for *p*NPP corresponded respectively to 4.6, 16.6, 9, 2.3 nkat ml⁻¹ of Pi released from P1, P2, P3, P4. Values are means ± standard deviation (n = 5). ^a*p*NPP: *para*-nitrophenylphosphate (N4645); PPi: Pyrophosphate (P8135); TripolyP: Pentasodium Tripolyphosphate (P5883); 1-Naphtyl P: 1-Naphtyl phosphate (Fluka 71105); 2-Naphtyl P: 2-Naphtyl phosphate (N7375); Glucose 1-P: α-D-Glucose 1-phosphate (G7018); Glucose 6-P: D-Glucose 6-phosphate (G7250), Fructose 1,6-biP: D-Fructose 1,6-biphosphate (F4757); Fructose 6-P: D-Fructose 6-phosphate (F3627); bis*p*NPP: Bis(*p*-nitrophenyl) phosphate (N3002); AMP: Adenosine 5'-monophosphate (A1752); ADP: Adenosine 5'-diphosphate (A2754); ATP: Adenosine 5'-triphosphate (A5394); Phytate: Phytic acid from rice (P8810).

3.3. Analysis of P contents extracted by NaHCO₃ from unfertilized and fertilized soils

Soils from Pierroton station were initially selected because of their different P concentrations and management practices. As indicated in Table 2, quantities of total P extracted with NaHCO₃ were higher from fertilized plots than from unfertilized plot. Concentrations of Pi (or orthophosphate ion) were 26 and 16 times higher from fertilized soils than from unfertilized soil. Po amounts represented 71% of the Pt extracted from control soil compared to NPK (13%) and P (21%) soils. However, amounts of extracted Po were higher in fertilized soils.

Table 2. Total P (Pt), inorganic (Pi) and organic (Po) phosphorus concentrations extracted by sodium bicarbonate from sandy podzols sampled in *Pinus pinaster* plots with different fertilization regimes

Soil treatment	Fertilization regime ^a	P (mg kg ⁻¹ d. wt. soil)		
		Pt	Pi	Po
Fresh	Control	5.2 ± 0.3f	1.5 ± 0.1f	3.7 ± 0.4c
	NPK	46.6 ± 2.2a	40.4 ± 2.2a	6.2 ± 1.8b
	P	31.1 ± 0.9c	24.6 ± 0.9c	6.5 ± 1.4b
Autoclaved	Control	8.4 ± 0.1e	2.6 ± 0.3e	5.8 ± 0.3b
	NPK	39.9 ± 0.8b	31.1 ± 1b	8.8 ± 1.5a
	P	27 ± 1.1d	19.4 ± 0.4d	8.6 ± 1.1b

Extractions were either carried out on fresh (Fresh) or autoclaved (twice, 110°C, 60 min) (Autoclaved) soil samples according to Olsen *et al.* (1954) method. Values are means ± standard deviation (n=6). Different letters show significant difference between treatments according to LSD Fisher model ($P < 0.05$). ^aControl: no fertilizer added; NPK: complete fertilization at a mean rate (in kg ha⁻¹ year⁻¹) for 1998-2005 of 84 N, 32 P, 56 K, 22 Ca, 7 Mg, 1.3 B, 2.9 Cu, 2.1 Mn and 0.6 Zn; P: fertilization P only at a mean rate in 1998-2005 of 32 kg P ha⁻¹ year⁻¹ (Bakker *et al.*, 2009).

Soil autoclaving increased Po concentrations by 55% from control soil, 43% and 32% respectively from NPK and P soils. On the other hand, amounts of Pi decreased of 23% and 21% from NPK and P soils respectively. However, soil autoclaving induced from control soil an increase of more than 70% of the Pi concentration extracted with sodium bicarbonate. The effect on Pt of autoclaving was similar to that on Pi, being somewhat more marked for the control soil and slightly less for the amended soils.

3.4. Hydrolysis of NaHCO₃-extractable Po by *H. cylindrosporum* AcPases

The ability of each AcPase to degrade Po extracted from a forest soil was studied in order to estimate the actual potential of each activity fraction to use this source of Po. The AcPases released by *H. cylindrosporum* had contrasting abilities to hydrolyse the NaHCO₃-extractable Po from fresh soils (Figure 2, Table 3). P1 was able to release a low quantity of Pi from control and P forest soils. Such activity values indicated that approximately 10% and 5% of the Po extracted from control and P plots was enzyme-reactive after 1 hr of incubation (Table 3). P2 was able to hydrolyse Po from the three soil extracts at the same rate. In contrast, activity of P3 was barely detectable in soil extracts from control and NPK plots in which less than 5% of the Po was enzyme reactive. P4 was able to degrade about 7% of the Po extracted from P soil and had no activity in control soil. Increasing incubation time up to 3 hrs led to a higher amount of Pi release than after 1 hr, indicating that the plateau of activity was not reached (data not shown). When enzyme activity was not measured, after 3 hrs this activity remained not detectable. It is worthwhile to notice that an insignificant level of Po hydrolysis was measured when no enzyme was added to soil solutions extracted from fresh soils (data not shown).

Soil sterilisation by autoclaving significantly increased the efficiency of phosphatase activities to release Pi from soil Po (Figure 2, Table 3). The greatest P1 activity was assayed in P fertilized soil in which more than 30% of soil Po was enzyme reactive. For P2, the greatest activity was recorded in control soil in which approximately 48% of the Po was enzyme reactive. P3 was more efficient to release Pi from control (41%) and NPK (43%) fertilized plots than from P (24%) fertilized plots. Finally, P4 displayed its greatest activity with soil extracts from NPK fertilized plots, with 47% of the Po being enzyme reactive after 1 hr of incubation (Figure 2). However, the totality of bicarbonate-extractable Po from autoclaved soil was practically hydrolysed after 3 hrs of incubation for P1 in P soil, P2 in control soil, P3 in control and NPK soils, and P4 in NPK soil (data not shown). Also, no hydrolysis of Po was detected when no enzyme was added to soil solutions extracted from autoclaved soils (data not shown).

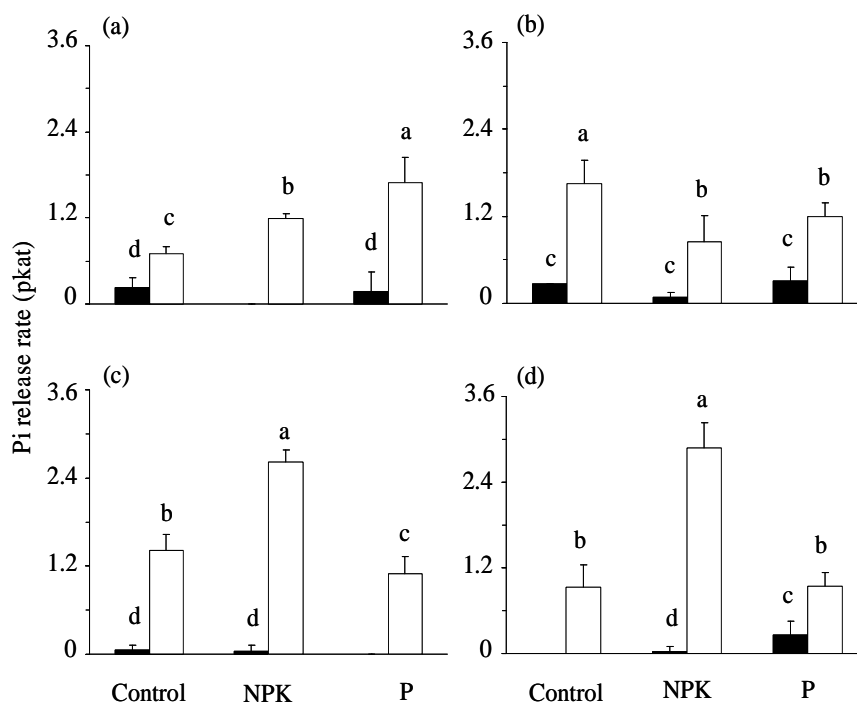


Figure 2. Ability of the four phosphatase activity fractions identified from the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporium* to hydrolyse Po extracted by sodium bicarbonate from unfertilized (Control) and fertilized (NPK, P) plots. (a), (b), (c) and (d) represent respectively P1, P2, P3 and P4 acid phosphatase activities. Extractions were either carried out on fresh (black bars) or autoclaved (twice, 110°C, 60 min) (white bars) soil samples according to Olsen *et al.* (1954) method. Each acid phosphatase fraction was incubated for 1 hr at 30°C with the soil solutions. Values are expressed in pkat of Pi released. Soil fertilization regime is indicated in Table 2. Values are means \pm standard deviation ($n = 7$), and bars with different letters are significantly different at $P < 0.05$ (Fisher LSD test). Samples without enzyme activity were excluded from the statistical analysis.

Table 3. Percentage of Po accessible to the enzymatic hydrolysis of the four phosphatase activity fractions identified from *H. cylindrosporium*

Soil treatment	Fertilization regime	P1	P2	P3	P4
		Enzyme reactive Po (%)			
Fresh	Control	10 \pm 9c	11 \pm 10c	4 \pm 5c	nd
	NPK	Nd	7 \pm 11c	2 \pm 4c	1 \pm 1c
	P	5 \pm 7c	8 \pm 6c	nd	7 \pm 9c
Autoclaved	Control	20 \pm 6b	48 \pm 13a	41 \pm 10a	27 \pm 14b
	NPK	23 \pm 2b	14 \pm 2c	43 \pm 5a	47 \pm 8a
	P	34 \pm 9a	27 \pm 11b	24 \pm 6b	21 \pm 7b

Po was extracted with sodium bicarbonate (Olsen *et al.*, 1954) from sandy podzols sampled in *Pinus pinaster* plots with different fertilization regimes (Table 2) either fresh or autoclaved (twice, 110°C, 60 min). Values correspond to the percentage of enzyme reactive Po after 1 hr of incubation (Figure 2). Values are means \pm standard deviation ($n = 7$). nd: activity not detectable. Different letters show significant difference between treatments according to LSD Fisher model ($P < 0.05$). Samples without enzyme activity are excluded from the statistical analysis.

3.5. Effect of soil solution extracts on Glucose 6-P hydrolysis of *H. cylindrosporum* AcPases

As shown in Figure 3, the extent of G6P hydrolysis depended both on the enzyme fraction, previous soil fertilization and pre-treatment (fresh or autoclaved). Three of the four AcPase fractions (P1, P2 and P3) presented G6P higher hydrolysis in autoclaved soils than in fresh soils. The percentage of inhibition for P1 varied between 5-24% whatever the soil (Control, NPK, P) and the treatment (fresh, autoclaved). Results were similar for P2 with the maximum inhibition (26%) observed in fresh control soil (Table 4). P3 displayed hydrolysis rates of G6P significantly decreased whatever the soil solution extracted from fresh soil (Figure 3) ranging from 20 to 44 % of enzyme activity (Table 4). In contrast, addition of soil solution extracted from sterilized soil either did not affect Pi release from G6P (NPK and P soils) or decreased only slightly the activity (C soil) (Figure 3 and Table 4). Soil autoclaving also had a strong impact on P4 activity by decreasing significantly the inhibition of soil extracts from NPK plot. However, the reverse situation was also observed, with a lower inhibitory effect of soil solution extracted from fresh than from autoclaved soil from P plots (Table 4).

4. Discussion

Four phosphatase activity peaks obtained from the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporum* have been separated using ammonium sulfate precipitation and cation-exchange chromatography (Figure 1). Preliminary trials using other chromatographic techniques such as anion exchange and size exclusion columns did not allow us to separate four activity peaks. By using same experimental procedures, Deransart *et al.* (1990) reported the separation of two phosphatase activity peaks secreted from a different *H. cylindrosporum* fungal isolate. The first peak was not retained whereas the second one was eluted with NaCl gradient. Subsequent polyacrylamide gel electrophoresis carried out on the two peaks allowed different activity bands to be separated, three for peak 1 and one for peak 2. This suggests that these authors could also have isolated at least 4 different extracellular AcPases released by *H. cylindrosporum*. We can suppose that the increasing of column size (from 2.2 x 5 cm to 2.5 x 20 cm) enabled us to separate efficiently the four isoforms into four peaks directly after cation-exchange chromatography without additional electrophoresis separation. Nevertheless, the absence of detailed biochemical experiments performed on each phosphatase activity fraction did not allow us to associate each peak with an isoform. However, we assume that chromatographic conditions, described previously, have permitted to separate properly, at least, four extracellular AcPases.

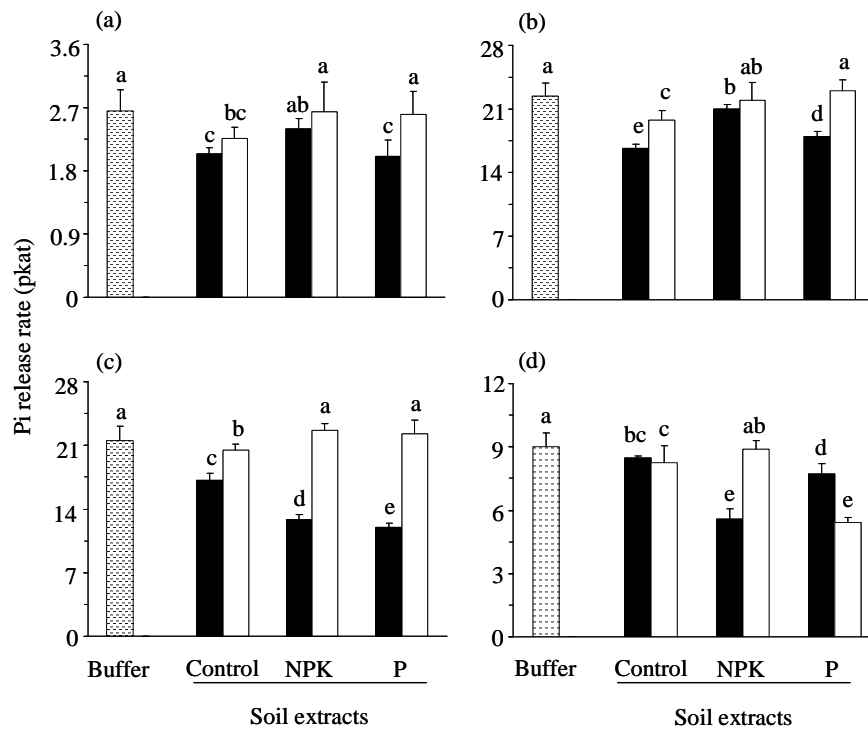


Figure 3. Hydrolysis of glucose 6-phosphate (G6P) in presence of soil extracts of the four phosphatase activity fractions identified from *H. cylindrosporium*. (a), (b), (c) and (d) represent respectively P1, P2, P3 and P4 acid phosphatase activities. Extractions were carried out using sodium bicarbonate (Olsen *et al.*, 1954) either on fresh (black bars) or autoclaved (twice, 110°C, 60 min) (white bars) soil samples taken from unfertilized (Control) or fertilized (NPK, K) plots. Soil fertilization regime is indicated in Table 2. Dotted bars represent enzyme activity when the soil solution was replaced by sodium acetate buffer (0.1 M, pH 5.0). Each acid phosphatase fraction was incubated 1 hr at 30°C with soil solution extracts containing 10 mM of commercial G6P (Sigma, ref G-7250). Values are expressed in pkat of Pi released. Values are means \pm standard deviation (n = 5), and bars with different letters are significantly different at $p < 0.05$ (Fisher LSD test).

Table 4. Effects of soil solution extracts on the hydrolysis of glucose 6-phosphate (G6P) of the four phosphatase activity fractions identified from *H. cylindrosporium*

Soil treatment	Fertilization regime	P1	P2	P3	P4
		Inhibition of G6P activity (%)			
Fresh	Control	22 \pm 7ab	26 \pm 3a	20 \pm 3c	6 \pm 3cd
	NPK	10 \pm 7c	6 \pm 3d	40 \pm 2b	38 \pm 6a
	P	24 \pm 7a	20 \pm 4b	44 \pm 3a	14 \pm 3b
Autoclaved	Control	14 \pm 11bc	12 \pm 6c	5 \pm 3d	9 \pm 6c
	NPK	7 \pm 8c	4 \pm 6d	0 \pm 0e	3 \pm 3d
	P	5 \pm 7c	2 \pm 3d	1 \pm 1e	40 \pm 4a

Soil solutions were extracted with sodium bicarbonate (Olsen *et al.*, 1954) from unfertilized or fertilized (Table 2) sandy podzols collected in a maritime pine forest. Extractions were performed either on fresh or autoclaved (twice, 110°C, 60 min) soils. Values are expressed in percentage of activity inhibition calculated from G6P activity assayed without soil extract (Figure 3). Values are means \pm standard deviation (n = 7). Different letters show significant difference between treatments according to LSD Fisher model ($P < 0.05$).

As reported for the other AcPases secreted from saprophytic fungi (Yoshida *et al.*, 1989; Wyss *et al.*, 1999; Bernard *et al.*, 2002), our results demonstrated that all the *H. cylindrosporum* AcPases, contained in isolated fractions, hydrolysed a broad range of phosphorylated substrates (Table 1). Each phosphatase activity peak showed the ability to release Pi from organic (Glucose 1-P and 6-P; Fructose 1, 6-biP and 6-P; AMP) and synthetic (*p*NPP; 1- and 2-naphtyl-P) phosphate monoesters, phosphoanhydrides and polyphosphates (ADP, ATP, PPi, TripolyP). Phosphodiesterase activity was very low (1% to 10%) compared to *Penicillium funiculosum* AcPase that has a relative activity for bis*p*NPP of 69% (Yoshida *et al.*, 1989). However, our study of substrate specificity was carried out on non-purified fractions, the bis*p*NPP hydrolysis recorded for P2 (7%) and P3 (10%) could be attributed to phosphodiesterases highly specific for this substrate mixed with phosphomonoesterases in our collected fractions. None of the isolated fractions was able to hydrolyse phytate, the major form of P storage in plants (Raboy, 2003). Thus, we assume that the enzymes released by *H. cylindrosporum* in its culture medium after 10 days of P starvation are not phytases but AcPases.

The ability of *H. cylindrosporum* AcPases to release Pi from various phosphorylated substrates was used to quantify the enzyme efficiency to hydrolyse Po extracted with NaHCO₃ from sandy podzols where this fungus is present. The net release of Pi from NaHCO₃ Po extracted from fresh soil following incubation of each *H. cylindrosporum* AcPase fraction reached at maximum 11%, whatever the fertilization regime applied to the *Pinus pinaster* forest (Figure 2, Table 3). Despite a higher concentration of Po extracted in fertilized soils than in control soils, the rate of Pi release was not increased compared to those measured in control soils for all AcPase fraction but P4. This suggests that P fertilization did not lead to the release of other Po forms which could be more accessible to enzyme hydrolysis. Our values of enzyme reactive Po (up to 11%) are close from those reported by Hayes *et al.* (2000) who showed that 9% of the Po extracted with NaHCO₃ from a fertilizer pasture soil was hydrolysed from *A. niger* phytase after 6 hrs of incubation. Nevertheless, our values are in contrast to studies obtained in andic and grassland soils, in which up to 22-62% (Negrin *et al.*, 1995) and 81% (He *et al.*, 2004) of NaHCO₃-extractable Po were hydrolysed by phytases and AcPases purified from wheat after 1 hr of incubation. However, we must remain very cautious in comparing our results with those of the literature because our experimental parameters can be different from those used by authors. According to Bünemann (2008a), the amount of Po accessible to enzyme hydrolysis depends on several

parameters (soil type, management practice, enzyme, experimental factors, extraction method or time of incubation).

The low proportion of enzyme reactive Po extracted with NaHCO_3 from these soils can mean that small quantities of Po compounds were accessible to enzyme hydrolysis. Based on the substrate specificity of *H. cylindrosporium* AcPases, the present work might suggest that high levels of phytate and/or phosphate diesters occur in these soils and also that phosphate monoesters accessible to a more general phosphatase activity are present in small quantities. Turner *et al.* (2003) had demonstrated for 18 semi-arid arable soils of the western United States of America that high levels of phytate occurred in soil solution extracted with NaHCO_3 . NaHCO_3 -extractable Po has been proposed to be an active pool of soil Po readily exchangeable for the plant (Bowman & Cole, 1978). However, our results obtained in fresh soils do not support this assumption that NaHCO_3 -extractable Po is highly hydrolysed by enzymes contrarily to He *et al.* (2004) experiments.

Incomplete hydrolysis of soil solution Po may be explained by the capacity of soil extracts to inhibit enzyme activities. It is well documented that other enzymes such as protease or organic compounds present in soils can strongly modulate the capacity of enzyme to play its functional role (Quiquampoix & Mousain, 2005; Allison, 2006). We investigated any possible inhibitory effect of soil compounds on *H. cylindrosporium* AcPase by measuring the degradation of G6P in presence or absence of soil solution extracted from fresh soil or autoclaved soils (Figure 3). Our results showed that, in most of the cases, when soil solution extracted from fresh soils was added to the reaction mixture, the release of Pi from G6P was systematically reduced whatever the fertilization regime, the soil treatment and the enzyme fraction. In fresh soils, the percentage of inhibition of G6P hydrolysis reached up to 44% and 26% in fertilized and unfertilized soils, respectively (Table 4). Such inhibition values could be sufficient to explain the incomplete hydrolyse of NaHCO_3 -extractable Po from these soils. However, in some cases, the incomplete Po hydrolysis cannot be attributed only to soil compounds because the rate of G6P hydrolysis was very little affected by the addition of soil extracts.

On the other hand, we observed that the proportion of enzyme reactive Po extracted with NaHCO_3 was significantly increased by soil autoclaving whatever soil treatments and enzymes. Two main hypotheses can be proposed to explain these results.

Firstly, the capacity of soil solution extracts to inhibit enzyme activity is strongly reduced by heating. Soil compounds, such as humic acid or polyphenols, that are known to inhibit enzyme activity, can be degraded at high temperature (Campanella *et al.*, 2008). Also, Carter

et al. (2007) reported that proteases can lose more than 90% of their activity after autoclaving of natural soils. The second hypothesis to explain the positive effect of autoclaving on AcPase activity is that heating could modify soil composition and lead to the release of Po forms which are more accessible to enzyme hydrolysis. Our results of soil P analyses showed that the amount of Po extracted with NaHCO₃ is always higher in autoclaved soils than in fresh soils (Table 2) and we can propose that soil autoclaving released a new pool of Po into the soil that was accumulated in soil microorganisms (Serrasolses *et al.*, 2008). This new pool of Po is probably diverse but should contain sizable amounts of phosphomonoesters that could be easily hydrolysed by the AcPases of *H. cylindrosporum*. In agreement with this hypothesis, Anderson & Magdoff (2005) reported that soil autoclaving increased significantly the amount of soluble orthophosphate monoester (> 78%) and diester (> 60%) and soluble Pi (> 54%) compared to non-autoclaved soil. Similarly, Bünemann *et al.* (2008b) reported that high concentrations of polyphosphates and pyrophosphates and high concentrations of monoester and diester phosphates were present respectively in different fungal and bacterial strains isolated from two Australian soils.

5. Conclusion

To resume, the present work provides new insights about the capacity of enzymes secreted by mycorrhizal fungi to improve the bioavailability of P in natural soils. We showed that the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporum* secreted several forms of AcPases which had a high capacity to hydrolyse phosphate monoesters and polyphosphates in comparison with phosphate diesters and phytate. In fresh soil solutions, up to 11% of the NaHCO₃-extractable Po was enzyme reactive and this value reached 50% in soils previously autoclaved. The incomplete hydrolysis of Po in fresh soils could be due to the lack of available substrates and the inhibition of added enzymes by soil compounds. The comparison between fresh and autoclaved soils allowed us to hypothesize that microbial Po could be an easily mineralised pool of Po by *H. cylindrosporum* AcPases. Even if the values of Po hydrolysis are relatively low, *H. cylindrosporum* could contribute to the soil biological processes involved in Po transformations by releasing several AcPases into the rhizosphere.

Acknowledgements

J. Louche was supported by a grant from the French Minister of Research and Technology, Muhamad A. Ali by a grant from the Higher Education Commission of Pakistan. This work was partly supported the ANR (Agence Nationale de la Recherche) through the FUNDIV

project (ANR-06-BDIV-06). We thank Dr W. Szponarski (INRA, UMR 5004, Montpellier, France) for useful advice on enzyme purification and Dr S. Staunton (UMR 1222, INRA Montpellier, France) for critical comments on the manuscript.

6. References

- Allison SD (2006) Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. *Biogeochemistry* **81**: 361-373.
- Anderson BH & Magdoff FR (2005) Autoclaving soil samples affects algal-available phosphorus. *J Environ Qual* **34**: 1958-1963.
- Bakker MR, Jolicœur E, Trichet P, Augusto L, Plassard C, Guinberteau J & Loustau D (2009) Adaptation of fine roots to annual fertilization and irrigation in a 13-year-old *Pinus pinaster* stand. *Tree Physiol* **29**: 229-238.
- Bernard M, Mouyna I, Dubreucq G, Debeaupuis JP, Fontaine T, Vorgias C, Fuglsang C & Latge JP (2002) Characterization of a cell wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **148**: 2819-2829.
- Bowman RA & Cole CV (1978) Transformations of organic phosphorus substrates in soils as evaluated by NaHCO₃ extraction. *Soil Sci* **125**: 49-54.
- Boyce A & Walsh G (2007) Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. *J Biotech* **132**: 82-87.
- Bünemann EK (2008a) Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. *Soil Biol Biochem* **40**: 2116-2129.
- Bünemann EK, Smernik RJ, Doolette AL, Marschner P, Stonor R, Wakelin SA & McNeill AM (2008b) Forms of phosphorus in bacteria and fungi isolated from two Australian soils. *Soil Biol Biochem* **40**: 1908-1915.
- Burns RG (1982) Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol Biochem* **14**: 423-427.
- Calleja M & D'Auzac J (1982) Activités phosphatases et carence phosphate chez des champignons supérieurs. *Can J Bot* **61**: 79-86.
- Campanella L, Nuccilli A, Tomassetti M & Vecchio S (2008) Biosensor analysis for the kinetic study of polyphenols deterioration during the forced thermal oxidation of extra-virgin olive oil. *Talanta* **74**: 1287-1298.
- Carter DO, Yellowlees D & Tibbett M (2007) Autoclaving kills soil microbes yet soil enzymes remain active. *Pedobiologia* **51**: 295-299.
- Chalot M, Javelle A, Blaudez D, Lambilliotte R, Cooke R, Sentenac H, Wipf D & Botton B (2002) An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant Soil* **244**: 165-175.
- Coello P (2002) Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus deficient *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **116**: 293-298.
- Debaud J-C & Gay G (1987) *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus

- Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytol* **105**: 429-435.
- Deransart C, Chaumat E, Cleyetmarel JC, Mousain D & Labarere J (1990) Purification assay of phosphatases secreted by *Hebeloma cylindrosporum* and preparation of polyclonal antibodies. *Symbiosis* **9**: 185-194.
- Goldstein AH, Baertlein DA & McDaniel RG (1988) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum* .1. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension cultured cells. *Plant Physiol* **87**: 711-715.
- Hayes JE, Richardson AE & Simpson RJ (2000) Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Biol Fert Soils* **32**: 279-286.
- He ZQ, Griffin TS & Honeycutt CW (2004) Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus in swine manure and soil. *J Environ Qual* **33**: 367-372.
- Hens M & Merckx R (2001) Functional characterization of colloidal phosphorus species in the soil solution of sandy soils. *Environ Sci Technol* **35**: 493-500.
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* **237**: 173-195.
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schroder WH & Godbold DL (2001) Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* **149**: 327-337.
- Joanisse GD, Bradley RL, Preston CM & Munson AD (2007) Soil enzyme inhibition by condensed litter tannins may drive ecosystem structure and processes: the case of *Kalmia angustifolia*. *New Phytol* **175**: 535-546.
- Lambilliotte R, Cooke R, Samson D *et al.* (2004) Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol* **164**: 505-513.
- Leprince F & Quiquampoix H (1996) Extracellular enzyme activity in soil: effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Eur J Soil Sci* **47**: 511-522.
- Marmeisse R, Guidot A, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combier JP, Melayah D, Fraissinet-Tachet L & Debaud J-C (2004) *Hebeloma cylindrosporum* - a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytol* **163**: 481-498.
- Morizet J & Mingeau M (1976) Effect of Environment on water uptake, as studied on beheaded exuding tomato .1. Role of nutrients. *Ann Agron* **27**: 183-205.
- Negrin MA, Gonzalez-Carcedo S & Hernandez-Moreno JM (1995). P fractionation in sodium bicarbonate extracts of andic soils. *Soil Biol Biochem* **27**: 761-766.
- Ohno T & Zibilske LM (1991) Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using Malachite Green. *Soil Sci Soc Am J* **55**: 892-895.
- Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS & Dean LA (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circ. No. 939. USDA, Washington DC.

- Palacios MC, Haros M, Rosell CM & Sanz Y (2005) Characterization of an acid phosphatase from *Lactobacillus pentosus*: regulation and biochemical properties. *J Appl Microbiol* **98**: 229-237.
- Peterson RL & Bonfante P (1994) Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. *Plant Soil* **159**: 79-88.
- Quiquampoix H (1987a) A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme-activity in soil. 1. Effect of electrostatic interactions on the conformation of a beta-D-glucosidase adsorbed on different mineral surfaces. *Biochimie* **69**: 753-763.
- Quiquampoix (1987b) A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme-activity in soil. 2. Competitive effects on the adsorption of a beta-D-glucosidase in mixed mineral or organo mineral system. *Biochimie* **69**: 765-771.
- Quiquampoix H, Abadie J, Baron MH, Leprince F, Matumoto-Pintro PT, Ratcliffe RG & Staunton S (1995) Mechanisms and consequences of protein adsorption on soil mineral surfaces. *ACS Symposium series* **602**: 321-333.
- Quiquampoix H & Burns RG (2007) Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* **3**: 401-406.
- Quiquampoix H & Mousain D (2005) Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. *Organic phosphorus in the environment* (Turner BL, Frossard E & Baldwin DS, eds), pp. 89-112. CAB International, Wallingford.
- Raboy V (2003) myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* **64**: 1033-1043.
- Serrasolses I, Romanya J & Khanna PK (2008) Effects of heating and autoclaving on sorption and desorption of phosphorus in some forest soils. *Biol Fert Soils* **44**: 1063-1072.
- Smith SE & Read DJ (2008) Mycorrhizal Symbiosis, 3rd edition. Academic Press, London, UK.
- Tatry M-V, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H & Plassard C (2009). Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J* **57**: 1092-1102.
- Tibbett M, Sanders FE & Cairney JWG (1998) The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. In axenic culture. *Mycol Res* **102**: 129-135.
- Torres Aquino M & Plassard C (2004) Dynamics of ectomycorrhizal mycelial growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability. *FEMS Microbiol Ecol* **48**:149-156.
- Turner BL, Cade-Menun BJ & Westermann DT (2003) Organic phosphorus composition and potential bioavailability in semi-arid arable soils of the western United States. *Soil Sci Soc Am J* **67**: 1168-1179.
- Vance CP (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* **157**: 423-447.
- Weber RWS & Pitt D (1997) Purification, characterization and exit routes of two acid phosphatases secreted by *Botrytis cinerea*. *Mycol Res* **101**: 1431-1439.

- Wipf D, Benjdia M, Rikirsch E, Zimmermann S, Tegeder M & Frommer WB (2003) An expression cDNA library for suppression cloning in yeast mutants, complementation of a yeast *his4* mutant, and EST analysis from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum*. *Genome* **46**: 177-181.
- Wyss M, Brugger R, Kroenberger A, Remy R, Fimbel R, Osterhelt G, Lehmann M & van Loon A (1999) Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *Appl Environ Microbiol* **65**: 367-373.
- Yoshida H, Oikawa S, Ikeda M & Reese ET (1989) A Novel acid-phosphatase excreted by *Penicillium Funiculosum* that hydrolyzes both phosphodiester and phosphomonoesters with aryl leaving groups. *J Biochem* **105**: 794-798.

CHAPITRE 3

Identification de *HcPhoA*, un gène codant pour une phosphatase acide extracellulaire chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporium*

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que le champignon ectomycorhizien *H. cylindrosporium* pouvait sécréter dans son milieu de culture plusieurs isoformes de phosphatases acides (AcPases). Toutes ces enzymes ont montré une large spécificité de substrats et une efficacité à mobiliser du Pi à partir de l'hydrolyse de composés organiques, surtout extraits de sols autoclavés. La capacité à réguler la sécrétion et la production des AcPases chez *H. cylindrosporium* apparaît donc essentielle pour faire face à des variations de disponibilité en P dans les sols forestiers. Cependant les mécanismes de régulation de ces enzymes sont encore mal connus.

Le séquençage du génome de *Laccaria bicolor* a permis l'identification du premier gène codant pour une AcPase chez un champignon ectomycorhizien mais aucune étude fonctionnelle n'a encore été publiée sur ce gène (Martin *et al.*, 2008). Finalement, les seules connaissances concernant les propriétés biochimiques et moléculaires des AcPases fongiques ont été obtenues chez des champignons saprophytes (Bernard *et al.*, 2002 ; Tasaki *et al.*, 2006). Ces premiers résultats ont montré que la régulation de la production des AcPases extracellulaires en réponse à la déficience en P s'effectuait au niveau transcriptionnel.

Les objectifs de ce chapitre sont donc les suivants :

- 1) Identifier le (les) gène(s) qui codent des AcPases extracellulaires chez le champignon ectomycorhizien *H. cylindrosporium*.
- 2) Identifier la (les) protéine(s) codée(s) par ces gènes
- 3) Evaluer l'effet de la disponibilité en P sur le niveau d'expression du (des) gène(s) codant des AcPases chez cette espèce fongique.

Pour identifier un ou des gène(s) codant pour une AcPase, nous avons d'abord recherché si la banque d'EST préparée à partir des mycéliums de *H. cylindrosporium* cultivés dans des conditions de déficience et de suffisance en P (Lambilliotte *et al.*, 2004) contenait une séquence homologue de gène de AcPase. Comme cette recherche a été infructueuse, nous avons opté pour une démarche basée sur l'amplification de régions conservées parmi les séquences de AcPases disponibles dans la littérature. A partir d'un alignement de plusieurs

séquences en acides aminés codant pour des AcPases sécrétées par divers organismes (Bernard *et al.*, 2002) et de l'identification de ces régions conservées parmi ces polypeptides, nous avons dessiné des amorces dégénérées qui ont ensuite été utilisées pour effectuer une amplification sur la banque d'ADNc de *H. cylindrosporum* (Lambilliotte *et al.*, 2004). Les séquences amplifiées ont été ensuite clonées puis séquencées et nous ont permis d'identifier un gène fortement homologue des autres gènes de phosphatase acide fongique.

Références

- Bernard M, Mouyna I, Dubreucq G, Debeaupuis JP, Fontaine T, Vorgias C, Fuglsang C & Latgé JP (2002) Characterization of a cell-wall acide phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **148**: 2819-2829.
- Lambilliotte R, Cooke R, Samson D *et al.* (2004) Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol* **164**: 505-513.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D *et al.* (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- Tasaki Y, Azwan A, Yasaki Y, Hara T & Joh T (2006) Structure and expression of two genes encoding secreted acid phosphatases under phosphate-deficient conditions in *Pholiota nameko* strain N2. *Curr Genet* **49**: 323-332.

Identification of *HcPhoA*, a gene encoding an acid phosphatase released into its external medium by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*

Authors: Julien Louche¹, Laurie Amenc¹, François-Xavier Sauvage², Hervé Quiquampoix¹ & Claude Plassard¹

Affiliation: ¹UMR 1222 Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols, INRA-IRD-Montpellier SupAgro, Montpellier, France ; and ²UMR 1083 Sciences Pour l'Oenologie, INRA, Montpellier, France

Correspondence: Claude Plassard, plassard@supagro.inra.fr, Tel.: +33 4 99 61 29 79; fax: +33 4 99 61 30 88

Abstract

The effectiveness of ectomycorrhizal fungi to secrete acid phosphatases (AcPases) in response to P starvation is well established in pure culture, but most of the genes encoding these enzymes are still unknown. We identified a single full-length cDNA (*HcPhoA*) in a cDNA library prepared from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* with significant identities to AcPases secreted from non-mycorrhizal and mycorrhizal fungi. Sequence analysis showed that *HcPhoA* encodes a native protein of 42,200 Da with 8 potential sites of N-glycosylation. An unrooted phylogenetic tree constructed with predicted protein sequences for AcPases of ascomycete and basidiomycete fungi showed that *HcPhoA* has close relationship with PNAP1, an inducible AcPase identified from the saprophyte fungus *Pholiota nameko*. Four fractions with AcPase activity, secreted from mycelia grown in pure culture under P-deficient or P-sufficient conditions, were separated by cation-exchange chromatography. The results indicated that phosphatase activity of each fraction was significantly increased under P-starved conditions. Using polyclonal antibodies raised against two internal peptides of *HcPhoA*, we demonstrated that *HcPhoA* encodes an extracellular AcPase detected in one fraction only. RT-PCR analysis performed on mycelia grown in pure culture showed that the transcript level of *HcPhoA* was significantly increased in response to P deficiency. This work suggests that *HcPhoA* is an inducible AcPase which could play a key role in improving the availability of P for plants and microorganisms in P impoverished soils.

Keywords: Pi starvation; chromatography; electrophoresis; acid phosphatase activity; gene expression

1. Introduction

Phosphorus (P) is an essential element for all soil organisms, which can be taken up only in the form of orthophosphate ions (Pi, H₂PO₄⁻ or HPO₄²⁻). However, Pi availability is often a limiting factor for microorganisms and plants in many natural ecosystems (Frossard *et al.*, 1995; Hinsinger, 2001). To cope with Pi deficiency conditions, most of the organisms have developed an adaptive response by producing and secreting acid phosphatases (AcPases) in the external medium. AcPases (EC 3.1.3.2) form a key group of enzymes that catalyse the hydrolysis of phosphate ester and acid anhydride bonds to release Pi in the acidic environment. These enzymes are widely distributed in nature and can be secreted from plants (Tarafdar & Jungk, 1987; Goldstein *et al.*, 1988) bacteria (Boyce & Walsh, 2007) and mycorrhizal (Kroehler *et al.*, 1988; Antibus *et al.*, 1992) or non mycorrhizal (Yoshida *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1987) fungi. AcPases are commonly classified on the basis of their mode of expression. Constitutive AcPase expression is not dependent on external Pi concentrations (Weber & Pitt, 1997). Inducible AcPases are expressed in response to environmental stresses such as Pi deficiency. The synthesis and the secretion of inducible AcPases are generally increased under low Pi availability conditions (Tibbett *et al.*, 1998; Bernard *et al.*, 2002).

Mycorrhizal symbiosis is reported to improve the P nutrition of the host plant (Smith & Read, 2008). It has been proposed that this beneficial effect could be due the secretion of fungal AcPases which are able to cleave organic P (Po) compounds, releasing Pi in the soil solution (Perez-Moreno & Read, 2000). Despite the potential role played by these enzymes in the improvement of soil P availability, data regarding the identification of genes encoding extracellular AcPases from mycorrhizal fungi are still lacking. The single gene available was recently provided through the sequencing of the genome of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Martin *et al.*, 2008). However, no study had been published on the functional properties of this gene.

Hebeloma cylindrosporum is an ectomycorrhizal fungal species frequently found, but not exclusively, in forest stands developing in sandy soils of the Mediterranean and Atlantic coasts in Europe (Marmeisse *et al.*, 2004). Several studies report the high capability of this fungal species to secrete *in vitro* abundant AcPases in response to Pi deficiency (Deransart *et al.*, 1990; Matumoto-Pintro, 1996). Using chromatographic method, we reported the separation of four fractions with AcPase activity secreted from *H. cylindrosporum* mycelia grown in pure culture under P-starved conditions (Louche *et al.*, 2009). Each fraction displayed a strong ability to hydrolyse a broad range of commercially available phosphorylated substrates as well as different efficiency to release Pi from Po compounds

extracted from a sandy soil, in which *H. cylindrosporium* is naturally present. Such ability suggests that *H. cylindrosporium* might be a good candidate for improving soil P availability and therefore the P status of the host plant. However, the genes encoding these AcPases are still unknown.

The aim of this work is to provide new molecular tools for the studying regulatory mechanisms involved in the production of AcPases in ectomycorrhizal fungi. In this study we present the identification of a complete cDNA sequence (*HcPhoA*) encoding an extracellular AcPase from the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporium*, showing high sequence homologies with other known inducible AcPases. AcPases secreted by mycelia grown in pure culture under P-deficient or P-sufficient conditions were separated using cation-exchange chromatography. Dot blot analysis was performed on each fraction with phosphatase activity in order to identify the proteins encoded by the *HcPhoA* gene. Our results indicated that among the four phosphatase active fractions separated only one fraction contained the AcPases encoded by *HcPhoA*. RT-PCR analysis achieved on mycelia grown in pure culture showed that the expression of *HcPhoA* was increased in response to Pi deficiency.

2. Material and Methods

2.1. Identification of a full-length cDNA from the *H. cylindrosporium* EST library

Alignment of predicted amino-acid sequences of genes encoding AcPases secreted by various organisms (Bernard *et al.*, 2002) was used to identify conserved regions among these polypeptides. We chose the region DYRVHNPL that is located roughly in the central part of the predicted acid phosphatase from *Aspergillus fumigatus* to design degenerated primers. They were named ACPmid forward (5'-GAYTAYGTNMCNAARCAAYAAYCC-3') and ACPmid reverse (5'GGRTTRTGYYTICKIACRTARTC-3'). Specific primers from the yeast expression vector pFL61 used to construct the cDNA library (Lambilliotte *et al.*, 2004) were designed (L1: 5'-CTTCTAACCAAGGGGTGGTTTAGTTAG-3' and R1: 5'-CTGCATAAAGCCATTAAAAAGAGCG-3'). The amplification of 5' (L1/ACPmid rev) and 3' (R1/ACPmid forward) parts of *HcphoA* was carried out using the cDNA library and Platinum® *taq* DNA polymerase high fidelity (11304-011, <http://www.invitrogen.com>). The amplified fragments were then immediately cloned into TOPO® Vector using the TOPO® cloning kit (K4575-J10, Invitrogen). Sequencing of cloned cDNA fragments was performed by Genome Express (<http://www.cogenicsonline.com>).

2.2. Computer analyses

Similarity search for the cloned sequences was done with the BLAST® program at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul *et al.* 1990) as well as in the EST library (http://urgi.versailles.inra.fr/projects/INRA_Hcy1/index.php). The accession numbers (SWISS-PROT databases; <http://www.expasy.ch/sprot/>) of protein sequences used for comparison and construction of the phylogenetic tree are: *Pholiota nameko* Pnameko1 (PNAP1; Q75V99) and Pnameko2 (PNAP2; Q75V97) (Tasaki *et al.*, 2006); *Laccaria bicolor* (Lbicolor; B0DV46; Martin *et al.*, 2008); *Aspergillus fumigatus* (Afumigatus; Q8X176; Bernard *et al.*, 2002); *A. clavatus* (Aclavatus; A1CRV1; Fedorova *et al.*, 2008); *A. ficuum* (Aficuum; Q12546; Mullaney *et al.*, 1995); *A. niger* (Aniger; P34724; Ehrlich *et al.*, 1994); *Penicillium chrysogenum* (Pchrysogenum; P37274; Haas *et al.*, 1992). Multiple sequence alignment was performed using Clustal W (Thompson *et al.*, 1994; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) with default parameters (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Phylogenetic relationships between fungal AcPases were determined using Tree top (http://www.genebee.msu.su/services/phtree_reduced.html).

2.3. Fungal strain and growth conditions

In this study we used a dikaryotic strain (D2) of the ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi resulting from the plasmogamy of two compatible homokaryotic strains h1 and h7 (Debaud & Gay, 1987). Experimental procedures for fungus growth are detailed in Louche *et al.* (2009). For protein analyses, mycelia were grown in standard liquid medium (+P medium, 3 mM NaH₂PO₄) for 15 days and then transferred for 10 additional days into a new medium with (+P medium) or without Pi (-P medium). At the end of the culture, media containing extracellular enzymes secreted from 24 mycelia were pooled and filtered through a nylon cloth. This solution was then used for AcPase separation. For transcript analyses, mycelia were grown in +P medium (1 mM NaH₂PO₄) for 10 days and then transferred for specified durations into new culture medium without Pi. At the end of culture, mycelia were harvested, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

2.4. Protein precipitation from culture medium

The solution was first brought to 50% saturation with ammonium sulfate (A4418, Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>) (29.1 g per 100 ml of culture medium), incubated at 4°C for 1 h and centrifuged (15,000 g, 40 min, 4°C). As preliminary experiments showed that

the pellet did not contain detectable AcPase activity, it was discarded. The supernatant was collected and proteins were precipitated as described above using 90% saturation with ammonium sulfate (26.8 g per 100 ml of used culture medium). The pellet was dissolved in 10 ml of sodium acetate buffer 0.1 M pH 5.0. The resulting concentrated protein extract was desalted using dialysis membrane (MWCO 12-14,000 Da) against deionized water, overnight at 4°C with shaking and used for chromatographic experiment.

2.5. Chromatographic separation of AcPases

Separation of AcPases from the concentrated, desalted protein extract was then carried out at 4°C, by using a cation exchange (CM-Trisacryl M from IBF Biotechnics) column (2.5 x 20 cm) equilibrated at pH 5.0 with sodium acetate buffer (0.1 M). Around 20 mg of total protein were loaded into the column that was first washed with 200 ml of the buffer used for column equilibration to remove the unbound proteins. Bound proteins were then eluted from the column with a NaCl gradient (0-0.5 M). The flow rate for both steps was 1.5 ml min⁻¹. During washing and elution, the solution dripping out of the column was collected by fractions of 3 ml that were assayed for AcPase activity and protein.

2.6. Analysis of collected fractions

Phosphomonoesterase activity of eluted fractions was measured by using *para*-nitrophenylphosphate (*p*NPP) as substrate. 50 µl of each fraction was incubated with 200 µl of 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) containing 10 mM of *p*NPP. After incubation for 30 min at 30°C, the reaction was stopped by adding 1 ml of NaOH 0.5M and the *para*-nitrophenolate (*p*NP) produced was determined by colorimetry at 410 nm. AcPase activity was expressed in nkat ml⁻¹ of *p*NP released. Fractions with AcPase activity were collected separately and kept at 4°C for further analysis. Fractions designated as belonging to a single peak of phosphatase activity were pooled in dialysis membrane (MWCO 12-14,000 Da) and concentrated in 30% solution of polyethylene glycol of 20,000 Da, overnight at 4°C with shaking. Phosphatase active fractions were next conserved at -20°C prior to dot blot analysis.

Protein concentration of collected fractions was estimated by measuring absorbance at 280 nm and was then calculated by using BSA (0-1mg ml⁻¹) as standard.

2.7. Dot Blot analysis

For dot blot analysis, each phosphatase active fraction was diluted (3/1, v/v) with water or Laemmli buffer (SDS 8%; Tris-HCl 0.25 M, pH 6.8; glycerol 40%; β -mercaptoethanol 7%) and heated for 10 min at 100°C or for protein denaturing. Proteins were gently blotted onto a 0.45 μ m nitrocellulose membrane that was then air dried for several minutes. The membrane was blocked for 1 hr with 5% of bovine serum albumin (A2058, Sigma-Aldrich) in a solution saline (TBS-T) containing 0.05% Tween 20, 20 mM Tris-HCl pH 7.5 and 150 mM NaCl. The membrane was then incubated for 30 min with anti-HcPhoA antibodies (1/1000) in TBS-T containing 0.1% BSA. After rinsing (three times 5 min in TBS-T/BSA 0.1%), the membrane was incubated for 30 min with an anti-rabbit IgG-Alkaline phosphatase antibody (A3687, Sigma-Aldrich) diluted at 1/5000 in TBS-T/BSA 0.1%. The membrane was rinsed again (three times 5 min in TBS-T/BSA 0.1%) and incubated in TBS-T/BSA 0.1% containing 2% NBT/BCIP solution (11681451001, Roche Diagnostics, <http://www.rochediagnostics.fr/>) for immunodetection. All steps were carried out under shaking at room temperature. The membrane was then air dried between glass plates and scanned. Anti-HcPhoA is a polyclonal antibody that was raised by Genosphere Biotechnologies (Paris, France, <http://www.genosphere-biotech.fr/>) in rabbits against two internal peptides of HcPhoA (143-QGKNDYVRKHNPLI-156 and 366-CTTYNGSLVVPSAAN-380). The serum of the rabbit before antigen injection was used as negative control.

2.8. RNA extraction and RT-PCR procedures

Fungal RNA was extracted from the mycelia grown in liquid culture according to the methods described in Ausubel *et al.* (2003). A reverse transcription reaction was carried out on 0.5 μ g of total RNA using the M-MLV Reverse Transcriptase H minus (M3682, Promega) with a specific primer (PhoAJ2rev: 5'-CATCGTTCGTCATGTTTGGGGTGA-3') complementary to nucleotides 575-598 of the identified cDNA of *HcPhoA* or polydT as primer, according to the manufacturer's instructions. One μ l of the RT product was then used to carry out PCR amplification with the *Taq* polymerase (18038-026, Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Transcripts of the *AcPase* gene were amplified using a set of primers specific of *HcPhoA* (PhoAJ2rev and PhoAJ3 forward 5'-GATGATTTACGCAAGTGTCCGGCG-3' complementary of the 295-398 nucleotides sequence) from the PhoAJ2rev RT reaction. Transcript levels of HcTUB (*H. cylindrosporum* alpha-tubulin) were used as controls and

were amplified from the polydT RT reaction using the following primers (5'-ATCTCTGCAGAGAAAGCTCACCACG-3' and 5'-CATACCCTCACCGACGTACCAGTGC-3' (Corratgé *et al.*, 2007). All the PCR reactions were carried out for 35 cycles at 60°C as annealing temperature. After gel electrophoresis, intensities of amplified bands were analyzed using the ImageQuantTM TL software.

3. Results and Discussion

3.1. Identification of a single full-length cDNA (*HcPhoA*) with high identity to known fungal AcPases

A single sequence that showed significant similarity with fungal AcPases was identified in a cDNA library prepared from the dikaryotic mycelia of *H. cylindrosporum* D2 grown in pure culture under P-sufficient and P-deficient conditions (Lambilliotte *et al.*, 2004). However, blasting this sequence with the EST database from *H. cylindrosporum* did not produce significant alignments, indicating that this gene was not present as an EST. The corresponding sequence contained an open reading frame of 1,664 pb encoding a predicted protein of 388 amino acids with a molecular mass estimated to 42, 200 Da (<http://bioinfo.hku.hk/>). Blast searches of the SWISS-PROT databases showed that the predicted polypeptide HcPhoA had significant identity with known fungal AcPases. The sequence of the polypeptide HcPhoA presented respectively 70% and 65% of homology with PNAP1 and PNAP2, two inducible AcPases identified from an edible saprophyte basidiomycete *P. nameko* (Tasaki *et al.*, 2006) (Figure 1). HcPhoA was found to be also very close (68%) to a predicted polypeptide (ID 310810) identified as an AcPase in the genome of the ectomycorrhizal fungus *L. bicolor* (<http://www.jgi.doe.gov/>; Martin *et al.*, 2008). The sequence of HcPhoA had 42% identity with both AcPase of *Penicillium chrysogenum* (Haas *et al.*, 1992) and AcPase of *Aspergillus fumigatus* (Bernard *et al.*, 2002). However, HcPhoA displayed a lower level of identity with bacterial AcPases, such as SapM (E70842) of *Mycobacterium tuberculosis* (Saleh & Belisle, 2000) with 19% identity. The construction of a phylogenetic tree with several AcPases identified in mycorrhizal and non mycorrhizal fungal species showed a close relationship of HcPhoA with PNAP1 and PNAP2 of *P. nameko* and the putative AcPase of *L. bicolor* (Figure 2). This close relationship of HcPhoA with PNAP1 and PNAP2 is in agreement with a phylogenetic study suggesting that the genus *Hebeloma* could be related to that of saprophyte fungi, especially *Agrocybe* (Moncalvo *et al.*, 2000) or *Pholiota* (Moncalvo *et al.*, 2002).

Hcylindrosporium	---MILTAVIVAAIAFAHGAASAGNNEDNGHK-----GPGHVVEGVAFDRYITIWLE	48
Pnameko1	---MIFSIVLFFSSLVYSAQA-----IVPGVVFDRYVSIWLE	33
Pnameko2	---MLLSSLICIGLILGAESRLILPKPKPKF-----RP--IVPGAVFDRFITIWLE	46
Lbicolor	---MHLAKLVAFLLAGCILNAFANSSPDSKH-----SKLSVVPGKAFDRFVTIWLE	48
Afumigatus	MKPSVATLLLATVSLVYAQTATEKEPELSLAIESAAAASIQPYSVPSNVVEGVAFNRFFQVWLE	60
*		
Hcylindrosporium	NTDFAAASADPNFQALTKOGLQLTNYFAVTHPSEPNYLSVVGGEYFGMONDDFTQVPAI	108
Pnameko1	NTDFSAAAADPNFAALTKOGLQLTNYFAVTHPSEPNYVSVVGGEYFGMNDNLDNLNIPANI	93
Pnameko2	NINFASASADPNFAALTKOGLQLTNYFAVTHPSEPNYVASVGGEYFGMNDNLDNRVPAI	106
Lbicolor	NTDFSAMADPNLSALASQGIQLTNYFALVTHPSEPNYVASVGGEYFGMNDNLDNLNIPVNV	108
Afumigatus	NIDYEDAAADENMKWLASQGIQLTNYFAVTHPSEPNYCAAVGGDTFGMNDNLDNIPANV	120
1		
Hcylindrosporium	STIVDLLEDKGISWAQEYQEDMPSSGFTGFQSLNAQG--KNDYVRKHNPLIIYDSVATVPAI	167
Pnameko1	SSVVDLLEDKGIITWAEYQEDMPSTGFTGFSS--FSKTS--ANDYVRKHNPLIIYDSVSTKPSR	151
Pnameko2	SSVVDLLEEKGISWGEYQEHMPITGFGQGFEMLNPDG--ANDYVRKHNPLIIFDSVANFSSR	165
Lbicolor	STIVDLLEDKGIITWAEYEYEDMPSTGFTGLQFLNPRGTANDYVRKHNPLIIVNYSVSGNPAR	168
Afumigatus	STVADLLDTKNIAWGEYQEHLPYPGQGFENYSNQGTYVNDYVRKHNPLVLYDSVTNKSTR	180
*		
Hcylindrosporium	ANLIKKNFTLFEQEDLKNNALAQWIFITPNMTNDGHDTNITFSSKWAIDFLGPLLKNPWFNG	227
Pnameko1	AANVKNFTLFEQDLNESNLQPMWFITPNMTNDGHDTNVATASTWAINFLPLLLKNPWFNA	211
Pnameko2	ANQVKNFTLFEQDLADDNLQPMWFITPNMTNDGHDTNISFASTWAKDFLEPLLKNPWFNA	225
Lbicolor	SANIKKNFTLFEQDLAAGKLPQWIFITPNMTNDGHDTNVTFAAKWVKGFLTPLLSNTNFWNG	228
Afumigatus	LRQIKKNFTSFEDDLANKKLPQWAFITPNMTNDAHDTNITFGAKWERSWIAPLLNNSYFNM	240
*		
Hcylindrosporium	PKTLISLTFDENSTGRQLQNRVDITVLLGNAVPRSLIGTQDAAFYNHYSDIATIEADWKLHT	287
Pnameko1	AKTLIVLTFDENGSTNSVANRIDTIIVLGSAPVAVSLVGTQDATYFNHYSEIATVEANWDLHT	271
Pnameko2	KKTLVLLTFDENGSTDPHNRVDSILLGTAVERQLVGTQDSTFYFNHYSEIATVEANWGLHT	285
Lbicolor	DRTLVLLTFDENETYGKQNRVRAILLGSAIPSNLIGTDSNFDYHYSEISTIEANWGLHT	288
Afumigatus	-DTLILLTFDEDGTYSKSNKIFSVLLGGAIPDELKGTQDDTFYTHYSVIASVSNWGLPS	299
*		
Hcylindrosporium	LGRYDVGANVFSFVAKKTDGVVR--TLPDLDKTFLNASYPGVFNSGPKAPLP-----	337
Pnameko1	LGRYDVGANVYSFVAAKTGDIVDAPTNPITLAKILLNLSYPGPFNSGASGPLP-----	323
Pnameko2	LGRFDVGANVFNFVAKHTHDVIR---PADLEQSFLNLSYPGPFNSAPSGKFT-----	334
Lbicolor	LGRYDVGANVFSFVAQRTHDTIRTTLQNPPLSQTFNLGNSYPGVFNSKTTAPLP-----	340
Afumigatus	LGRWDCCGANILEIVANKTGYVNY---DVDITNLRLNLETYPGPMASAGEYSKYSFVWPNALT	356
*		
Hcylindrosporium	-----IPNTSLVVNHRVLP--KIVATWGSAAALQKCTTYNGSLVVPSAA	379
Pnameko1	-----IPNTSLVVNGRVLP--AIASTWGSASHLQRCITLYTGALQPPSGL	365
Pnameko2	-----VPNTRLIVNGRHVLP--KIVETWGSAAALQKCTTYTGSVNVPSNS	376
Lbicolor	-----IPNTSLVVNGRVLP--GIVNVWGSAAALQRCITTYACKLEIPSS	382
Afumigatus	RGDCSAGHGILDIVKETYANTEPTYNYSSPFPYDYASNYNTKVTATKKNVTGTHRSSSS	416
*		
Hcylindrosporium	NPPVLPQGC-----	388
Pnameko1	NPPTIPQGC-----	374
Pnameko2	NPPILPSGC-----	385
Lbicolor	NPPVLPAGC-----	391
Afumigatus	SPSASSNAAVSAVAPAAGVSGLLLGLALNLL	447

Figure 1. Alignment of the predicted amino acid sequences of HcPhoA with known fungal AcPases. Pnameko1 and Pnameko2, *Pholiota Nameko*; Lbicolor, *Laccaria bicolor*; Afumigatus, *Aspergillus fumigatus*. Identical and similar residues are indicated by black and grey boxes, respectively. The 8 potential N-glycosylation sites of HcPhoA are each mentioned by an asterisk. Its putative active site containing histidin and aspartic acid is indicated by Δ . The amino acid sequence (1), identified from other AcPases, was used to create degenerated primers for cDNA amplification.

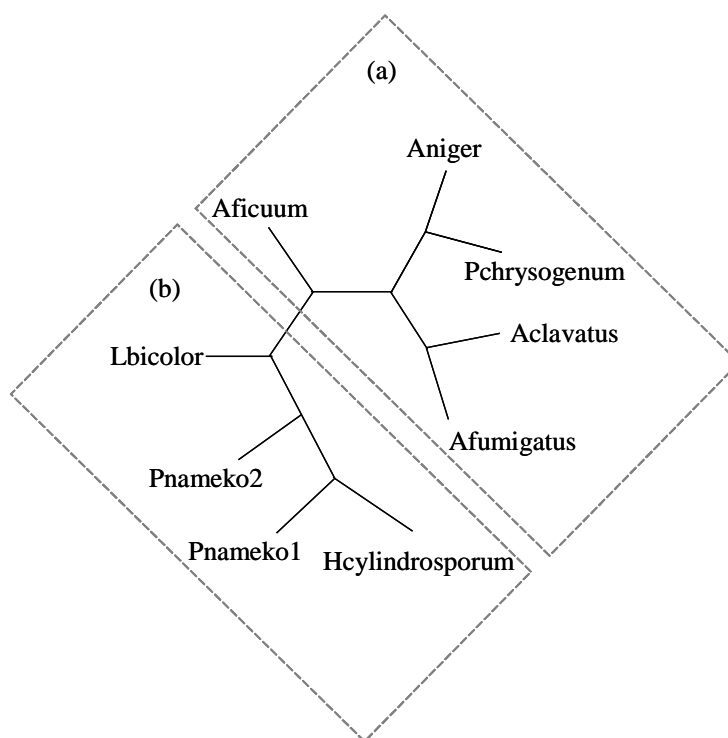


Figure 2. Phylogenetic relationship of HcPhoA with other fungal AcPases. The unrooted phylogenetic tree was constructed from predicted protein sequences for AcPases of the following species: Pnameko1 (PNAP1) and Pnameko2 (PNAP2) from *Pholiota nameko*; Lbicolor *Laccaria bicolor*; Afumigatus, *Aspergillus fumigatus*; Aclavatus, *A. clavatus*, Aficum, *A. ficuum*; Aniger, *A. niger*; Pchrysogenum, *Penicillium chrysogenum*. Based on protein sequences, AcPases of ascomycete fungi are clustered in group (a) and those of basidiomycete fungi are clustered in group (b).

3.2. Analysis of the HcPhoA structure suggests a glycoprotein

The study of the protein structure shows that HcPhoA has 8 potential sites of N-glycosylation located at amino acid residues 107, 173, 195, 204, 239, 321, 340 and 370 (Figure 1). In addition, 5 sites (107, 173, 195, 239 and 321) are shared with four other fungal AcPases (Figure 1). The putative AcPase catalytic site (HD) proposed by Ostanin *et al.* (1992) was found at amino acid residues 201-202 in HcPhoA (Figure1). The high number of potential N-glycosylation sites suggests that HcPhoA could be highly glycosylated in its secreted form. The glycosylation is a common feature among the different AcPases of high molecular weight described so far (Ullah *et al.*, 2000; Tasaki *et al.*, 2006). As an example, the PhoAp of *A. fumigatus* has an apparent molecular mass of 80,000 Da decreasing to 58,000 Da after a glycopeptidase treatment (Bernard *et al.*, 2002). The function of the protein glycosylation is not completely understood but it is proposed that the glycosylation is responsible of the stability of proteins secreted particularly in the external environment (Wyss *et al.*, 1999). Han & Lei (1999) studied the role of glycosylation in the functional expression of an *A. niger* phytase expressed in *Pichia pastoris*. These authors reported that the deglycosylation of the

secreted phytase decreased of 34% its thermostability and the addition of tunicamycin in the culture medium affected strongly its biosynthesis.

3.3. Identification of four fractions with AcPase activity each induced by P starvation

AcPases secreted by *H. cylindrosporum* mycelia grown under P-deficient and P-sufficient conditions were separated in four phosphatase active fractions (named P1 to P4) by using cation-exchange chromatography (Figure 3a, b). The chromatographic conditions described in this study were the only ones that allowed the clear separation of four phosphatase active fractions. The chromatographic profile obtained in figure 3b is quite similar to that presented previously in Louche *et al.* (2009). Under +P and -P conditions, the first peak P1 was not retained by the column and was eluted with 99% of the total protein loaded onto the column. Although P2 and P3 were not retained by the column, they were clearly separated from each other. P4 was eluted with NaCl 165 mM. The comparison of the two chromatographic profile obtained under +P and -P conditions indicated that AcPase activity of each fraction was increased in response to Pi starvation. Indeed, AcPase activities secreted by mycelia grown in -P medium were 12, 46, 48 and 13 times higher than those secreted by mycelia grown in +P medium for P1, P2, P3 and P4 respectively. This result suggests that *H. cylindrosporum* is able to secrete several forms of AcPase in response to changes in P availability in the culture medium.

3.4. Anti-HcPhoA antibodies react with a single fraction of phosphatase activity

Dot blot analysis performed on each separated phosphatase active fractions showed that only P1 reacted with the anti-HcPhoA antibodies (Figure 4). This result indicates that *HcPhoA* encodes for an AcPase that is secreted in the culture medium under Pi starvation. However, we cannot exclude the hypothesis that *HcPhoA* may encode several AcPase isoforms which could be contained in P1 fraction, as reported for *PNAP1* in *P. nameko*. This gene was shown to encode two polypeptides (47, 000 and 48, 000 Da) showing different pattern of glycosylation but similar isoelectric point of 4.9 (Yasaki *et al.*, 1997; Tasaki *et al.*, 2006). However, the absence of immunodetection for P2, P3 and P4 suggests that the genome of *H. cylindrosporum* possess different genes encoding for these other extracellular AcPases.

Dot blot analysis showed that the immunodetection of HcPhoA was diffuse for denatured proteins (treatment with SDS and β -mercaptoethanol) and dense for non-denatured protein (treatment with water) (Figure 4). Such difference of blot between the two treatments

strongly suggests that HcPhoA contain disulfide bonds. The study of the polypeptide composition of HcPhoA shows two cystein residues in C-terminal position susceptible to form a disulfide bond (Figure 1). Furthermore, a revelation of phosphatase activity on SDS polyacrylamide gel revealed that the addition of β -mercaptoethanol in the buffer of migration induced a loss of P1 activity (data not shown). This result indicates that the spatial configuration of HcPhoA is necessary for its catalytic functioning.

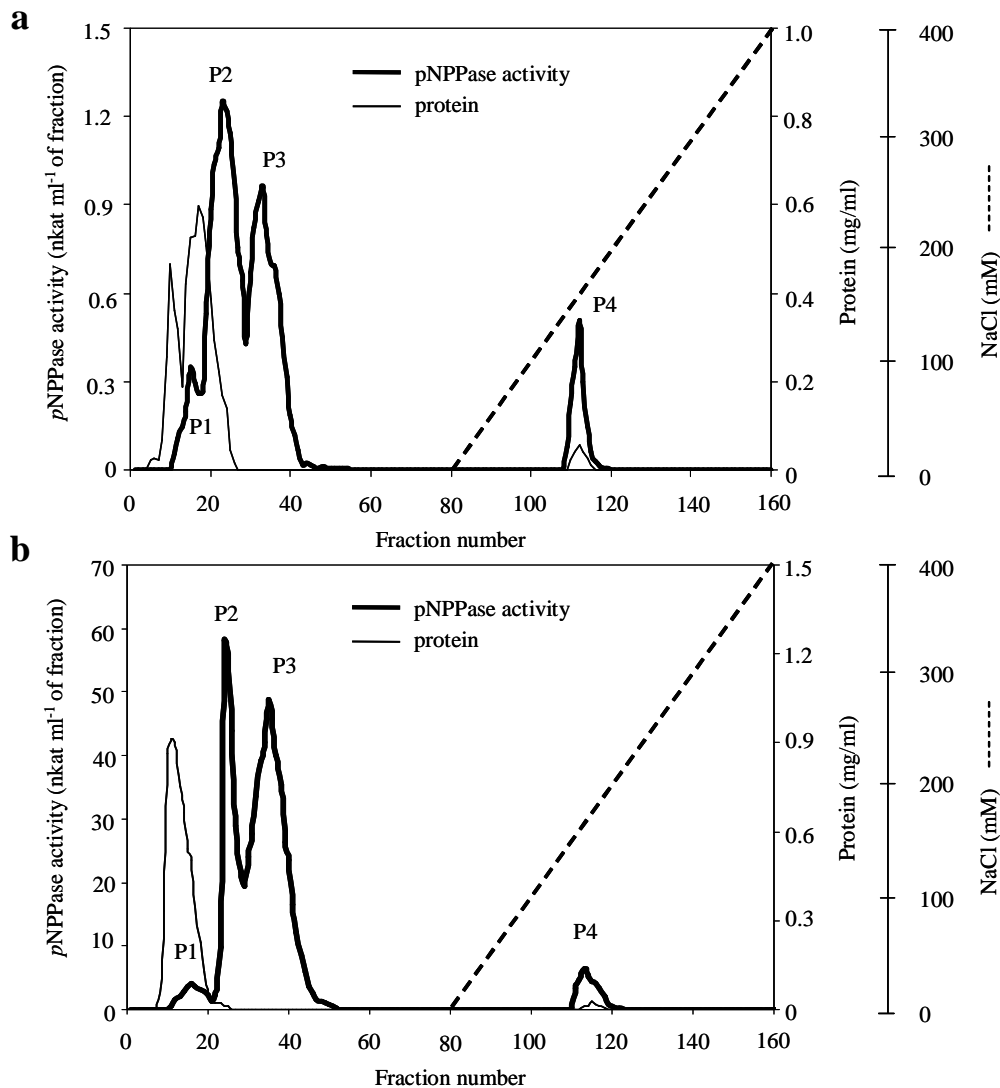


Figure 3. Separation on a cation exchange resin of AcPases released by *Hebeloma cylindrosporium* under P-sufficient (a) or P-deficient (b) conditions. The column was equilibrated with acetate buffer 0.1M at pH 5.0. Elution was performed with NaCl gradient (dotted line). Fractions (3 ml) were analyzed for proteins at 280 nm (fine line) and pNPPase activity (thick line). The mycelia were grown for 15 days in P-sufficient medium, and then transferred for 10 days in culture medium with (3 mM Pi) or without (0 mM Pi) P. Around of 20 mg of proteins were loaded onto the column and were eluted at a flow rate of 1.5 ml min⁻¹. Four phosphatase activity peaks were separated (P1 to P4).

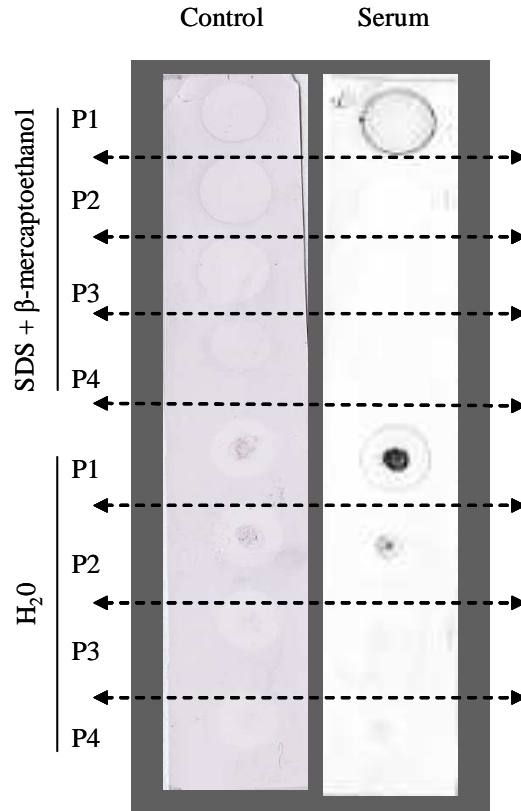


Figure 4. Detection of HcPhoA in the four phosphatase active fractions identified from *H. cylindrosporum* grown in pure culture under P starvation. Dot blot analysis was performed with the anti-HcPhoA antibodies (dilution 1/1000). The serum without anti-HcPhoA was used as a negative control. The four phosphatase active fractions were separated from the culture medium of mycelia grown under P starvation by using cation-exchange chromatography. Before dot blot experiments, each phosphatase active fraction was heated to 100°C for 10 min with water or SDS and β -mercaptoethanol. 5 μ l of each protein extract was blotted on the nitrocellulose membrane.

3.5. Pi deficiency increase the expression level of *HcPhoA*

To investigate the expression of *HcPhoA* in response to Pi deficiency, *H. cylindrosporum* mycelia were grown in P-sufficient medium for 10 days (+P mycelia) and then transferred for 1 to 5 supplementary days in P-deficient medium (-P mycelia). RT-PCR analysis showed that the expression level of *HcPhoA* in +P mycelia was quite similar to that of alpha-tubuline (Figure 5). However, when mycelia were transferred in P deficient conditions the transcript level of *HcPhoA* was rapidly increased. Indeed, after 5 days of growth in -P medium the accumulation of mRNA of *HcPhoA* was 8.3 fold higher than that of the reference. These results provide evidence that *HcPhoA* expression is significantly induced in response to Pi deficiency. Such an enhancement of expression of AcPase genes under Pi deficiency was also found in *P. nameko* mycelia grown in pure culture (Tasaki *et al.*, 2006). These authors reported that the transcripts of both *PNAP1* and *PNAP2* started to accumulate after 10 days of growth in P deficient medium and increased significantly up to day 15. However, the

transcripts of *PNAP1* were undetectable after 20 days of growth in P-sufficient conditions and that of *PNAP2* were slightly detectable.

The increase of phosphatase activity of P1 fraction measured in -P medium (Figure 3b) was in agreement with the increase of the transcript level of *HcPhoA* in response to Pi starvation. This result indicates that the production and the secretion of HcPhoA are regulated at the level of transcription. The change in level of expression of *HcPhoA* as a function of the P availability in the culture medium suggests that HcPhoA is an inducible AcPase.

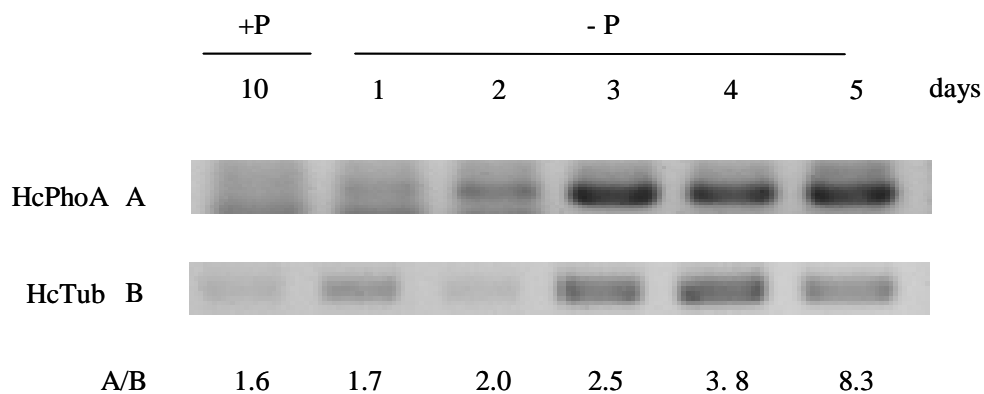


Figure 5. Semi-quantitative analysis of *HcPhoA* expression using RT PCR carried out on total RNA extracted from mycelia grown in pure culture under different Pi availabilities. Total RNA was extracted from mycelia grown for 10 days (+P) in P-sufficient medium (1 mM Pi) and then transferred for 1 to 5 days (-P) in P-deficient medium (0 mM Pi). The alpha-tubuline gene was used as reference.

4. Conclusion

This work provides the evidence that the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporium* is able to synthesise one AcPase showing high sequence homology with those identified in several fungal species. These first results showed that HcPhoA is secreted in the culture medium in response to Pi starvation. In addition, semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that the transcript level of *HcPhoA* was significantly increased by transferring mycelia cultivated in liquid medium from P-sufficient to P-deficient conditions. This finding indicates that the expression of *HcPhoA* is regulated at the transcriptional level. Therefore, the identification of *HcPhoA* provides a useful molecular tool to study the regulatory mechanisms controlling the production of AcPases in ectomycorrhizal fungal species associated or not with a host plant under different P availabilities.

5. References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Antibus RK, Sinsabaugh RL & Linkins AE (1992) Phosphatase activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Can J Bot* **70**: 794–801.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl (2003) Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley & Sons.
- Bernard M, Mouyna I, Dubreucq G, Debeaupuis JP, Fontaine T, Vorgias C, Fuglsang C & Latgé JP (2002) Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **148**: 2819-2829.
- Boyce A & Walsh G (2007) Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. *J Biotech* **132**: 82-87.
- Corratgé C, Zimmermann S, Lambilliotte R, Plassard C, Marmeisse R, Thibaud JB, Lacombe B & Sentenac H (2007) Molecular and functional characterization of Na⁺-K⁺ transporter from the TRK family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *J Biol Chem* **282**: 26057-26066.
- Debaud J-C & Gay G (1987) *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytol* **105**: 429-435.
- Deransart C, Chaumat E, Cleytmarel JC, Mousain D & Labarere J (1990) Purification assay of phosphatases secreted by *Hebeloma cylindrosporum* and preparation of polyclonal antibodies. *Symbiosis* **9**: 185-194.
- Ehrlich KC, Montalbano BG, Mullaney EJ, Dischinger HCJ & Ullah AH (1994) An acid phosphatase from *Aspergillus ficuum* has homology to *Penicillium chrysogenum* PhoA. *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 63-68.
- Fedorova ND, Khaldi N, Joardar VS *et al.* (2008) Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* **4**: e1000046.
- Frossard E, Brossard M, Hedley MJ & Metherell A (1995) Reactions controlling the cycling of P in soils. In: Tiessen H Eds, Phosphorus in global environment, John Wiley & Sons, New York, USA, p. 108-137.
- Goldstein AH, Baertlein DA & McDaniel RG (1988) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum* .1. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension cultured cells. *Plant Physiol* **87**: 711-715.
- Haas H, Redl B, Friedlin E & Stoffler G (1992) Isolation and analysis of the *Penicillium chrysogenum* phoA gene encoding a secreted phosphate-repressible acid phosphatase. *Gene* **113**: 129-133.
- Han Y & Lei XG (1999) Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* **364**: 83-90.
- Han SW, Nahas E & Rossi A (1987) Regulation of synthesis and secretion of acid and alkaline phosphatases in *Neurospora crassa*. *Curr Genet* **11**: 521-527.
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced

- chemical changes: a review. *Plant Soil* **237**: 173-195.
- Kroehler CJ, Antibus RK & Linkins AE (1988) The effects of organic and inorganic phosphorus concentration on the acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Can J Bot* **66**: 750-756.
- Lambilliotte R, Cooke R, Samson D *et al.* (2004) Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol* **164**: 505-513.
- Louche J, Ali MA, Sauvage F-X, Quiquampoix H & Claude Plassard C (2009) Separation of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and their effectiveness in hydrolyzing organic phosphorus in a sandy soil after different fertilisation regimes. In preparation.
- Marmeisse R, Guidot A, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combier JP, Melayah D, Fraissinet-Tachet L & Debaud J-C (2004) *Hebeloma cylindrosporum* - a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytol* **163**: 481-498.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D *et al.* (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- Matumoto-Pintro P (1996) Rôle des phosphatases dans l'utilisation du phosphore organique par les champignons ectomycorhiziens et leurs association avec le Pin laricio de Corse. Influence des surfaces adsorbantes sur l'activité des phosphatases. Thèse Doctorat Ecole Nationale Supérieure Agronomique Montpellier, 197 p.
- Moncalvo JM, Lutzoni FM, Rehner SA, Johnson J & Vilgalys R (2000) Phylogenetic relationships of Agaric fungi on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Syst Biol* **49**: 278-305.
- Moncalvo JM, Vilgalys R, Redhead SA *et al.* (2002) One hundred and seventeen clades of euagarics. *Mol Phylogenet Evol* **23**: 357-400.
- Mullaney EJ, Daly CB, Ehrlich KC & Ullah AH (1995) The *Aspergillus niger* (*ficuum*) *aphA* gene encodes a pH 6.0-optimum acid phosphatase. *Gene* **162**: 117-121.
- Ostanin K, Harms EH, Stevis PE, Kuciel R, Zhou M-M & Van Etten RL (1992) Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J Biol Chem* **267**: 22830-22836.
- Perez-Moreno J & Read DJ (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytol* **145**: 301-309.
- Saleh MT & Belisle JT (2000) Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. *J Bacteriol* **182**: 6850-6853.
- Smith SE & Read DJ (2008) Mycorrhizal Symbiosis, 3rd edition. Academic Press, London, UK.
- Tarafdar JC & Jungk A (1987) Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Bio Fert Soils* **3**: 199-204.
- Tasaki Y, Azwan A, Yasaki Y, Hara T & Joh T (2006) Structure and expression of two genes encoding secreted acid phosphatases under phosphate-deficient conditions in *Pholiota nameko* strain N2. *Curr Genet* **49**: 323-332.

- Thompson J, Higgins D & Gibson T (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tibbett M, Sanders FE & Cairney JWG (1998) The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. In axenic culture. *Mycol Res* **102**: 129-135.
- Ullah AJ, Sethumadhavan K, Lei XG & Mullaney EJ (2000) Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). *Bioch Bioph Res Comm* **275**: 279-285.
- Weber RWS & Pitt D (1997) Purification, characterization and exit routes of two acid phosphatases secreted by *Botrytis cinerea*. *Mycol Res* **101**: 1431-1439.
- Wyss M, Pasamontes L, Friedlein A *et al.* (1999) Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl Environ Microbiol* **65**: 359-366.
- Yazaki J, Joh T, Tomida SI & Hayakawa T (1997) Acid phosphatase isozymes secreted under phosphate deficient conditions in *Pholiota nameko*. *Mycoscience* **38**: 347-350.
- Yoshida H, Oikawa S, Ikeda M & Reese ET (1989) A novel acid phosphatase excreted by *Penicillium funiculosum* that hydrolyzes both phosphodiester and phosphomonoesters with aryl leaving groups. *J. Biochem.* **105**: 794-798.

CHAPITRE 4

Identification des mécanismes physiologiques et moléculaires utilisés par le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum* pour faire face à la déficience en orthophosphate

Dans le chapitre précédent, nous avons identifié le gène *HcPhoA* codant pour une phosphatase acide (AcPase) sécrétée dans le milieu de culture par le champignon ectomycorhizien *H. cylindrosporum*. Le niveau d'expression de ce gène, déterminé par RT-PCR semi-quantitative, indique qu'il augmente avec la diminution de la disponibilité en Pi. Nous savons aussi que cette espèce fongique possède au moins deux gènes codant pour deux transporteurs de Pi à haute affinité, *HcPT1* et *HcPT2* dont les niveaux d'expression sont régulés de façon différente par la disponibilité en Pi dans le milieu (Tatry *et al.*, 2009). D'autre part, les connaissances acquises chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* indiquent que les niveaux d'expression du gène *Pho84* codant pour le transporteur H⁺:Pi à haute affinité et du gène *PHO5* codant pour une AcPase sécrétée sont régulés respectivement par la concentration externe (*Pho84*) et la concentration interne (*PHO5*) en Pi (Persson *et al.*, 2003 ; Mouillon & Persson, 2006). Il est aussi admis que la concentration interne en Pi est régulée par la synthèse et la dégradation du pool de polyphosphate intracellulaire chez la levure (Ausueke *et al.*, 2004) ou chez les champignons mycorhiziens (Ezawa *et al.*, 2001). Notre hypothèse est donc que chez *H. cylindrosporum*, l'expression des gènes codant pour les deux transporteurs de phosphate et la phosphatase acide pourrait être régulée différemment par la disponibilité externe ou interne en Pi.

Dans ce chapitre, nos objectifs ont été les suivants :

Comparer les variations des niveaux de l'activité AcPase mesurée dans le milieu et de l'expression du gène *HcPhoA*,

- 1) Suivre la variation des pools de polyphosphates et de Pi intracellulaires des mycéliums de *H. cylindrosporum*,
- 2) Quantifier les variations des niveaux d'expression de *HcPT1* et *HcPT2*, en fonction de la disponibilité en Pi dans le milieu de culture.

Pour cela, les mycéliums de *H. cylindrosporum* ont d'abord été cultivés en milieu liquide riche en Pi (N6, 3 mM de Pi) avant d'être transférés soit dans le même milieu N6 avec Pi ou

sans Pi. La cinétique de transfert a duré 12 jours au cours desquels des mycéliums ont été prélevés. Les activités phosphatase totales, les concentrations en Pi du milieu et accumulées dans les thalles ont été systématiquement mesurées à chaque prélèvement. Les thalles ont aussi été utilisés en RMN du ^{31}P *in vivo* pour déterminer les variations des différentes fractions de P soluble visibles par RMN. Enfin, le niveau d'expression des trois gènes, *HcPT1*, *HcPT2* et *HcPhoA* a été déterminé par RT-qPCR.

Références

- Auesukaree C, Homma T, Tochio H, Shirakawa M, Kanedo Y & Harashima S (2004) Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 17289-17294.
- Ezawa T, Smith SE & FA Smith (2001) Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* **149**: 221-230.
- Mouillon J-M & Persson BL (2006) New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**: 171-176.
- Persson BL, Lagerstedt JO, Pratt JR, Pattison-Granberg J, Lundh K, Shokrollahzadeh S & Lundh F (2003) Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**: 225-244.
- Tatry M-V, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H & Plassard C (2009). Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J* **57**: 1092-1102.

Identification of physiological and molecular mechanisms used by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to cope with orthophosphate starvation

Authors: Julien Louche¹, Christine Le Guerneve², Laurie Amenc¹, Hervé Quiquampoix¹ & Claude Plassard¹

Affiliation : ¹UMR 1222 Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols, INRA-IRD-Montpellier SupAgro, Montpellier, France; and ²UMR 1083 Sciences Pour l'Oenologie, INRA, Montpellier, France

Correspondence: Claude Plassard, plassard@supagro.inra.fr, Tel.: +33 4 99 61 29 79; fax: +33 4 99 61 30 88

Abstract

The effects of different Pi availabilities were studied on the dynamic of intracellular P and the expression level of two phosphate transporters (*HcPT1* and *HcPT2*) genes and one acid phosphatase (*HcPhoA*) gene recently identified from the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporum*. Mycelia were grown in liquid culture medium containing either 3 mM or no Pi. *In vivo* ³¹P NMR spectroscopy showed that under Pi-sufficient condition *H. cylindrosporum* was capable to accumulate both orthophosphate (Pi) and soluble polyphosphates. Pi represented the predominant form of P accumulated but polyphosphates could be represented up to 40% of the total NMR-detectable intracellular P in mycelia grown under Pi-deficient conditions. This value decreased to 21% in 12 day-old mycelia indicating that polyphosphates were progressively hydrolysed to maintain the cell homeostasis. Real-time PCR showed that each gene was differentially regulated as a function of Pi availability in the external medium. The transcript level of *HcPT1* was rapidly increased in response to Pi starvation while that of *HcPT2* did not vary much suggesting that *HcPT1* was more involved than *HcPT2* in the uptake of P from the external medium in condition of low Pi availability. The prolonged absence of sufficient Pi availability increased simultaneously the transcript level of both *HcPT2* and *HcPhoA* in *H. cylindrosporum* mycelia. Our data support the hypothesis that *HcPT1*, *HcPT2* and *HcPhoA* expression in mycelia could be differentially regulated in response to various P availabilities.

Keywords: ³¹P NMR, polyphosphates, phosphorus metabolism, phosphate transporter, acid phosphatase, transcriptional analysis

1. Introduction

Phosphorus (P) availability in forestry soils is known to be a limiting factor for plant growth. Inorganic phosphate (Pi or orthophosphate ion) is the only form of P directly assimilable for soil living organisms. Its low concentration in the soil solution, ranging between 0.1 and 10 μM , can be explained by its high capacity to make complexes with metal cations (Al, Fe), soil minerals and soil organic matter (Frossard *et al.*, 2000; Hinsinger, 2001). However, to cope with changes in P availability, mycorrhizal fungi have developed various strategies for the effective uptake of Pi including the excretion of organic acids (Wallander, 2000; Arvieu *et al.*, 2003), the secretion of acid phosphatase (AcPases) (Perez-Moreno & Read, 2000) and the enhanced expression of phosphate (Pi) transporters (Chalot *et al.*, 2002).

There is increasing evidence that Pi diffusing in the soil solution is absorbed through the functioning of Pi:H⁺ transporters, expressed on the surface of external hyphae growing in the soil. Full-lengths cDNAs coding for Pi transporters have been identified from saprophytic (Tasaki *et al.*, 2002), endomycorrhizal (Harrison & Van Buuren, 1995, Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001) and recently ectomycorrhizal (Tatry *et al.*, 2009) fungi. Pi transporters are commonly classified as low-affinity or high-affinity transporter, depending on the value of the apparent affinity constant (K_m). It is well reported that in response to low Pi availability, the transcript level of the gene encoding a high-affinity Pi transporter is significantly increased in saprophyte (Tasaki *et al.*, 2002) and in mycorrhizal (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001; Benedetto *et al.*, 2005) fungi. Such capability to up- and down-regulate the gene expression of its Pi transporter allows the fungus to cope with various Pi availabilities in soil solution. However, most of the available data report the effect of various external Pi concentrations on the expression of Pi transporter and no information is given about the dependence of P uptake on the expression of transporter genes and the P metabolism in ectomycorrhizal fungi.

The orthophosphate ions entering the cytoplasm of mycorrhizal fungi may be incorporated into phosphorylated primary metabolites, structural molecules and nucleic acids. However, it is well accepted that the excess of Pi in the cytoplasm can be accumulated and stored as polyphosphates into the vacuole (Smith & Read, 2008). Polyphosphates are linear polymers whose length, given by the number of orthophosphate residues, can vary from three up to more than one thousand (Wood & Clark, 1988; Kornberg *et al.*, 1999). The functions of these polyphosphates are not completely understood, but it is proposed that the polyphosphate pool participates actively in maintaining Pi concentration in the fungal cell, acting as a sink for removal of Pi (Martin *et al.*, 1985; MacFall *et al.*, 1992). Using ³¹P nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy methods, polyphosphates have been detected in several

ectomycorrhizal fungal species grown either in pure culture or in association with a host plant (Martin *et al.*, 1983; Grellier *et al.*, 1989; Ashford *et al.*, 1994; Rasmussen *et al.*, 2000; Viereck *et al.*, 2004). The metabolism of polyphosphates is not well established but it is accepted that the polyphosphates can be hydrolysed by two types of enzymes: an exopolyphosphatase which cleaves terminal residues and releases Pi and, an endopolyphosphatase which cleaves the internal linkages and releases short chain of polyphosphates in the vacuole (Kulaev *et al.*, 1997; Ezawa *et al.*, 2001). The capability of mycorrhizal fungi to accumulate phosphate by the formation of polyphosphates under high external Pi condition, and to re-mobilise this storage pool under low external Pi condition, is thought to be an important mechanism for the continuous P supply of the host plant. Several experiments have reported the capability of some mycorrhizal fungal species to accumulate higher quantities of polyphosphates when the fungus is associated with a host plant, supporting a key role of this fungal P pool for the plant P nutrition (MacFall *et al.*, 1992; Gerlitz & Gerlitz, 1997, Ezawa *et al.*, 2002; Takanishi *et al.*, 2009).

Recently, we have identified the complete cDNA sequence (*HcPhoA*) encoding a secreted AcPase from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* presenting high sequence homology with the others AcPases available in the genomic database (Louche *et al.*, 2009). Similarly, Tatry *et al.* (2009) reported from the same fungal species the identification of two Pi transporters (*HcPT1* and *HcPT2*) which presented expression profiles consistent with a role in P acquisition from the external medium. However, the mechanisms of regulation of these genes as a function of external and internal Pi concentrations are still poorly understood. In this paper, the expression pattern of the two Pi transporters genes and that of the AcPase gene were simultaneously studied as a function of Pi availability in *H. cylindrosporum* hyphae grown in pure culture. Given the importance of polyphosphate metabolism assigned to the maintaining of Pi concentration in the fungal cell, we re-examined the ability of *H. cylindrosporum* grown in pure culture to synthesise polyphosphates using ³¹P-NMR spectroscopy. Our findings demonstrate that these three genes were differentially expressed as a function of the Pi availability in the external medium and also of the dynamics of P reserves in the fungal cell.

2. Material and Methods

2.1. Strain and Growth conditions

We have used the dikaryotic strain (D2) of the ectomycorrhizal basidiomycete *H. cylindrosporum* Romagnesi, resulting from the plasmogamy of two compatible homokaryotic strains (h1 and h7) (Debaud & Gay, 1987). Fungal stock cultures were grown in Petri dishes at 24°C in the dark, on solid standard medium (agar, 14 g l⁻¹) (pH 5.5) containing KNO₃ (6 mM), NaH₂PO₄ (3 mM), MgSO₄ 7H₂O (1 mM), KCl (4 mM), CaCl₂ (0.5 mM), ferric citrate 1‰, thiamine HCl (0.3 µM), Morizet & Mingeau (1996) micronutrients solution (0.2 ml l⁻¹) and glucose (5 g l⁻¹).

Mycelium culture was carried out in a growth chamber at 24°C, in the dark, and without shaking. Agar plugs (8 mm diameter) of 1 month-old stock cultures were used to inoculate glass flasks containing 60 ml of liquid medium. A nichrome wire was used to maintain the agar plugs on the solution surface. Mycelia were first grown for 10 days in liquid medium (same composition as above, without agar) (control mycelia) and next transferred for 1 to 12 supplementary days in new glass flasks containing 60 ml of the same liquid medium with 3 mM Pi (+P mycelia) or no Pi (-P mycelia). To avoid Pi contamination during transfer, mycelia were rinsed with their respective liquid medium for 5 minutes. All operations were carried out under sterile conditions. For each time of culture, six mycelia were harvested, dried between filter paper sheets, weighed and immediately used for the *in vivo* ³¹P NMR experiment.

2.2. Enzymatic and chemical analyses

The total phosphomonoesterase activity secreted from mycelia in the culture medium was calculated by colorimetric method using the *para*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) as substrate. The reaction mixture was made of 100 µl of culture medium and 200 µl of sodium acetate buffer (0.1 M, pH 5.0) containing 10 mM of *p*NPP. Incubation was performed at 30°C for 1 hr. The enzymic reaction was stopped by adding 1 ml of NaOH 0.5 M and the *para*-nitrophenolate (*p*NP) produced was assayed at 410 nm. AcPase activity was expressed in nkat g⁻¹ of fresh (f) weight (wt) mycelium.

Inorganic phosphate was extracted from mycelia according to the method of Conjeaud *et al.* (1996). Thirty mg of mycelium was dried overnight at 80°C and then boiled in water for two periods of 10 min. Inorganic P concentration was determined by using the malachite

green method as described by Ohno & Zilbiske (1991) and KH_2PO_4 (0-10 μM) as standard. Pi concentration was expressed in $\mu\text{g ml}^{-1}$ of culture medium.

2.3. *In vivo* NMR experiments

^{31}P NMR spectra from intact mycelia were recorded at 202.4 MHz on a Varian Unity Inova 500 spectrometer, equipped with a 10 mm broad band probe. Acquisition conditions were a 90° radio frequency pulse angle, a 20 sec inter-scan delay, and 180 scans giving a total accumulation time of 1 h. Probe temperature was regulated at 25°C . Spectra were referenced to the chemical shift of methylene diphosphonic acid (MDP) at 16.38 ppm. The solution of MDP (pH 7.5, 1 mM) was contained in a 1 mm capillary placed at the centre of the NMR tube. The experimental device used for *in vivo* NMR experiments was described in Roby *et al.* (1987). For each NMR experiment, 6 mycelia were introduced in the 10 mm NMR tube and evenly placed in the centre of the magnetic field exerted by the coil in order to get the best signal. Mycelia were continuously perfused at a flow rate of 1 ml min^{-1} with specific solutions containing KNO_3 (6 mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mM), KCl (4 mM), CaCl_2 (0.5 mM) glucose (5 g l^{-1}), with (+P mycelia) or without NaH_2PO_4 (3 mM) (-P mycelia). The incoming solution was constantly oxygenated by using an air pump. At the end of each NMR experiment, mycelia were dried between filter paper sheets, immediately frozen in liquid nitrogen, and conserved at -80°C for total RNA extractions.

2.4. Nucleic acid extraction

Total RNA extraction was performed for each *in vitro*-grown mycelia used for NMR experiment by using a modified method of Kiefer *et al.* (2000) improving the quantity of total RNA extracted. Briefly, fresh mycelium (approximately 10 mg) was grinded (30 s, twice at 5 min intervals) in a lysing matrice C (116912, MP Biomedicals, <http://www.mpbio.com>) containing 0.5 ml of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.0; 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 7.0, 2% cetyltrimethylammonium bromide; 2% polyvinylpyrrolidone; 2.5 M NaCl; 0.5 g l^{-1} spermidine; 2% β -mercaptoethanol) by using the FastPrep[®]-24 instrument (MP Biomedicals). After grinding, 0.25 ml of chloroform isoamyl alcohol (CI) (24:1) and 0.05 ml of Nucleon PhytoPure resin (RPN8510, GE Healthcare, <http://www.gelifesciences.com>) were added to bind polysaccharides and the sample was incubated for 10 min at room temperature and shaken by hand every 2 min. It was then centrifuged (16,000 g, 5 min, 4°C) and the upper phase was transferred to a new

eppendorf tube. 0.2 ml of CI was added and it was briefly shaken and centrifuged (16,000 g, 5 min, 4°C). The upper phase was transferred again to a new eppendorf tube, incubated for 15 min at -20°C in 1 ml of isopropanol and centrifuged (16,000 g, 20 min, 4°C). The pellet was washed with 0.5 ml of ethanol 70%, centrifuged (16,000 g, 5 min, 4°C) and air dried. It was then dissolved with 50 µl of RNase-free ultrapure water. One RNA extraction was made for each mycelium. RNA concentrations were measured by UV measurement at 260 nm and RNA extracts were conserved at -80°C for real-time RT-PCR measurements.

2.5. RT and real-time PCR procedures

Reverse transcription using poly(dT) as the primer was performed according to the manufacturer's instructions using Verso reverse transcriptase (AB-1453/B, ThermoFisher Scientific, <http://www.thermo.com>) on 50 ng of total RNA extracts in 10 µl of final volume. One reverse transcription reaction was made for each RNA extraction. Real-time PCR reactions were performed using the CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com>) in a 10 µl final volume containing 1 µl of reverse transcription product, 0.6 µl of each primer (0.15 µM), 2.8 µl of water, and 5 µl of PCR mix containing a Taq DNA polymerase and SYBR Green (Absolute™ QPCR SYBR® Green ROX mix; ABgene, <http://www.abgene.com>). The same PCR program was used for the four genes (15 min of enzyme activation at 95°C, followed by 45 cycles of 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec, 72°C for 35 sec). PCR reactions without cDNA were used as negative controls. The specificity of the amplification of each PCR reaction was controlled by studying the melting curve of the PCR product given from the Bio-Rad CFX Manager software. The gene of alpha-tubuline (*HcTub*, GenBank accession number CK993737) was used as reference gene. Amplifications of *HcTub*, *HcPT1* (accession number AJ970310) and *HcPT2* (accession number AJ970311) were performed by using the primer pairs given in table S1. Preliminary real-time PCR studies have been performed for *HcPhoA* gene to select one primer pair showing no primer dimerisation and similar values of PCR efficiency with the three other genes. Sequences of primers used for real-time PCR are indicated in Table S1. Relative gene expression levels were obtained by using the $\Delta\Delta C_t$ method as described by Winer *et al.* (1999). The ΔC_t was calculated as the threshold cycle (C_t) of the target gene (*HcPT1*, *HcPT2*, *HcPhoA*) minus the threshold cycle of the reference gene (*HcTub*). The relative gene expression was normalized to control treatment. The main C_t value for *HcTub* was 24.8 ± 0.9 . Each value of relative gene expression was the mean of 6 biological replicates.

2.6. Statistical analyses

Significant difference of AcPase activity ($n = 6$) measured for $-P$ and $+P$ mycelia at different culture time were determined using t-test ($P < 0.05$). Analyses of variance were performed to evaluate significant difference between phosphomonoesterase activity, fresh mycelial biomass, and transcript level of *HcPT1*, *HcPT2* and *HcPhoA* genes. Means were compared using least significant difference of Fisher model ($P < 0.05$). All data were analysed using Statistica software package (Statistica 8, Statsoft Inc. Tulsa OK, USA).

3. Results

3.1. P starvation induced the secretion of extracellular AcPases from *H. cylindrosporium* into the culture medium

Total phosphomonoesterase activity secreted from mycelia grown in Pi deficient medium was significantly higher from that of mycelia grown in Pi-sufficient at each culture time (Table 1). Analysis of variance showed that when Pi was sufficient, AcPase activity secreted from $+P$ mycelia did not vary much after 12 days of culture (Table 1). Conversely, AcPase activity secreted from $-P$ mycelia was significantly increased after the fifth day of growth under Pi-deficient conditions. P supply had an effect on mycelia biomass. At days 8 and 12, biomass of mycelia grown in $+P$ medium was significantly higher than that of mycelia grown in $-P$ medium, however mycelia incubated in P starved medium were able to increase their biomass. Although the mycelia were rinsed before transfer, low Pi concentrations were measured in Pi deficient medium, ranging from 17 μM just after transfer to 4.6 μM after 12 days in P-starved conditions (Table 1). Also, the transfer of mycelia in $-P$ medium resulted in a significant decrease of internal Pi concentrations of more than 60% compared to the initial contents accumulated in the fungal cells (Table 1).

3.2. NMR-detectable phosphorus

Each NMR spectrum obtained from *in vitro* grown mycelia exhibited several peaks of ^{31}P resonance whatever the P treatment applied to the fungus (Figure 1). Peak assignment was made according to ^{31}P NMR spectra obtained with other ectomycorrhizal fungus species such as *Suillus bovinus* (Gerlitz & Werk, 1994) and *Pisolithus tinctorius* (Martins *et al.*, 1999). Due to technical problems, ^{31}P NMR spectrum obtained in control condition for $+P$ mycelia was not usable (Table 2).

Table 1. Acid phosphatase activity, mycelium biomass, external Pi and internal Pi concentrations measured in *H. cylindrosporum* grown in liquid culture. Mycelia were first grown for 10 days in liquid medium (control) and then transferred for 1-12 days in the same liquid medium containing 3mM Pi (+P treatment) or no Pi (-P treatment). Each value is mean of 6 biological replicates with standard error between brackets. Different letters show significant difference according to LSD Fisher model ($P < 0.05$).

P treatment	Day	AcPase activity nkat[§] g⁻¹ f wt	Biomass g f wt	External Pi mM	Internal Pi μmol g⁻¹ dwt
+P	0 (control)	0.13 ^d (0.11)	0.13 ^d (0.052)	3600 (50)	159 ^a (45)
	1	0.39 ^d (0.13)	0.18 ^{cd} (0.041)	3350 (120)	150 ^{ab} (35)
	2	0.41 ^d (0.12)	0.21 ^{bcd} (0.058)	3410 (150)	136 ^{abc} (22)
	5	0.37 ^d (0.16)	0.30 ^{bc} (0.059)	3490 (180)	129 ^{bc} (20)
	8	1.24 ^d (0.35)	0.46 ^a (0.12)	3250 (110)	109 ^{cd} (19)
	12	2.6 ^d (0.77)	0.53 ^a (0.303)	3240 (230)	96 ^f (21)
-P	0 (control)	1.9 ^d (0.46)	0.15 ^d (0.032)	17.2 (2.8)	132 ^{abc} (34)
	1	1.6 ^d (0.33)	0.15 ^d (0.035)	15.7 (5.3)	87 ^{de} (13)
	2	2.9 ^d (0.85)	0.17 ^d (0.053)	9.2 (2.2)	98 ^d (11)
	5	15.8 ^c (4.83)	0.20 ^{cd} (0.01)	8.6 (4.8)	63 ^{ef} (7)
	8	32.4 ^b (4.46)	0.25 ^{bcd} (0.046)	7.8 (4.9)	57 ^f (20)
	12	49.8 ^a (7.32)	0.33 ^b (0.092)	4.7 (1.8)	50 ^f (13)

[§]One nkat of enzyme activity is equivalent to one nmole of *p*NP released per second

In +P mycelia, peaks with chemical shift of +1.1 and +0.56 were assigned to cytoplasmic Pi and vacuolar Pi, respectively (Figure 1a). A third peak with a chemical shift of +0.3 was assigned to medium Pi as it was not present when the circulating solution contained no Pi (compare spectra in Figure 1a and 1b). In addition, two peaks at -11 and -13 ppm, attributed to phosphate groups of UDP-N-acetylglucosamine (Martins *et al.* 1999) were detected in +P mycelia at day 12 (Figure 1a). Another peak at +0.05 ppm (+P mycelia) was also observed which was not described in *S. bovinus* and *P. tinctorius*. A peak with a similar resonance was identified as glycerophosphocholine (GroPCho) in cell suspension cultures of *Daucus carota* (Van der Rest *et al.*, 2002). Another peak detected at -21.9 was identified as polyphosphates. The integration of peak surface allowed us to quantify the proportions of

soluble phosphate (cytoplasmic Pi, vacuolar Pi and phosphate group of glycerophosphocholine) and soluble polyphosphates accumulated in mycelia for each culture time (Table 2). Results showed that the fungal cells accumulated their soluble P mainly as Pi and GroPCho compared to polyphosphates that represented at maximum 26% of total soluble P (Table 2). In addition, the proportion of each P compounds did not vary much during the incubation time (Table 2). Despite the absence of strong variations in intracellular Pi compartmentalisation, the comparison of NMR spectra obtained for +P mycelia showed a widening of vacuolar Pi and polyphosphate peaks from day 1 to 12 indicating that *H. cylindrosporium* was able to accumulate Pi with time of growth in Pi-sufficient conditions (data not shown).

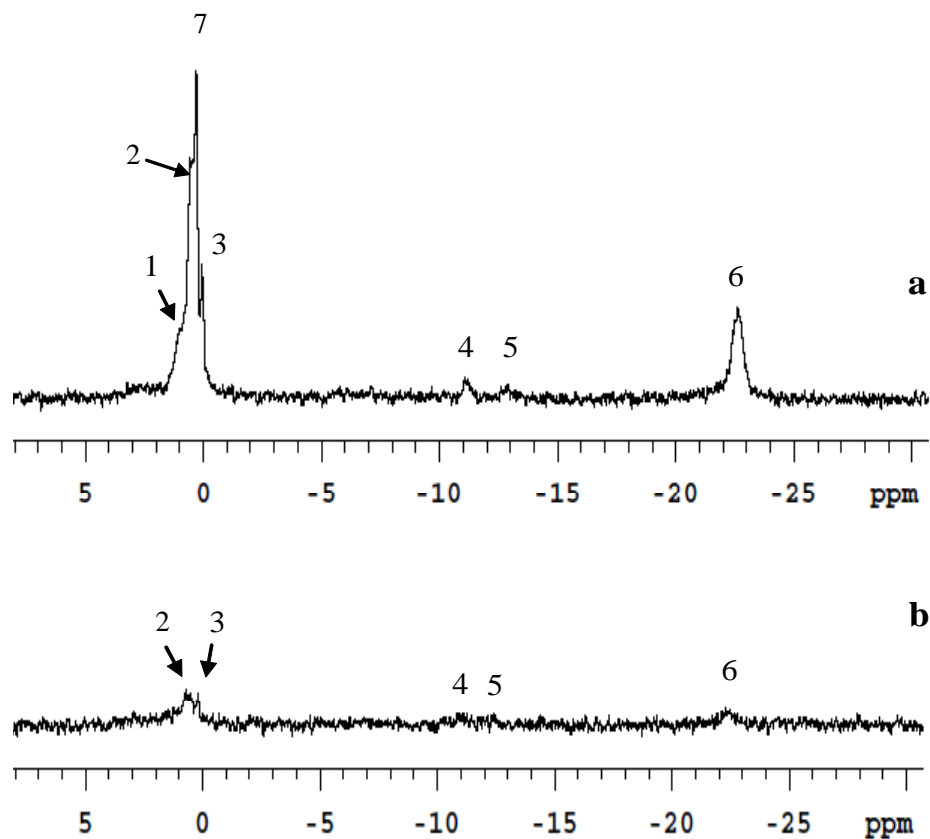


Figure 1. *In vivo* ^{31}P -NMR spectra of *H. cylindrosporium* mycelia grown for 12 days in Pi-sufficient (a) and Pi-deficient (b) conditions. Mycelia were first grown in complete liquid medium (3 mM Pi) for 10 days (control) and then transferred for 12 days in the same liquid medium containing 3 mM Pi (+P mycelia) or no Pi (-P mycelia). Each NMR spectra was obtained from the analysis of six mycelia. Mycelia were perfused for 1 hr with their respective culture medium at a flow rate of 1 ml min^{-1} . Spectra were referenced to the chemical shift of methylene diphosphonic acid (MDP) at 16.38 ppm. Peak attribution was (1) cytoplasmic Pi, (2) vacuolar Pi, (3) glycerophosphocholine, (4, 5) UDP-N-acetylglucosamine, (6) polyphosphates, (7) Pi from the medium.

In -P mycelia, each peak of ^{31}P resonance was slightly detected after 12 days of growth in Pi-deficient conditions (Figure 1b). As in +P mycelia, we observed at +0.07 the chemical shift corresponding to the glycerophosphocholine. Polyphosphate peak was easily detected until the second day and then strongly decreased the following days (data not shown). Analyses of percentage values obtained for phosphate soluble and polyphosphates showed that polyphosphates represented 40% of the total intracellular P at day 1 (Table 2). This percentage decreased then considerably up to 14% at day 8 and reached 21% at day 12.

Table 2. Accumulation of intracellular soluble phosphate and polyphosphates in *H. cylindrosporum* mycelia as a function of incubation time in a complete liquid medium with or without Pi. Mycelia were first grown for 10 days in liquid culture medium (3 mM Pi, control mycelia) and then transferred for 1-12 days in the same liquid medium containing either 3 mM Pi (+P mycelia) or no Pi (-P mycelia). For each culture time six mycelia were transferred in a NMR tube and continuously perfused at a flow rate of 1 ml mn^{-1} with their respective complete medium. The total time of accumulation for each NMR spectra was of one hr. Accumulation values were expressed as the percentage of total ^{31}P NMR-detectable.

Time (days)	Mycelia +P		Mycelia -P	
	Soluble phosphate *	Polyphosphates	Soluble phosphate	Polyphosphates
control	nd	nd	65	35
1	74	26	60	40
2	85	15	72	28
5	83	17	85	15
8	82	18	86	14
12	76	24	79	21

*soluble phosphate is the sum of peaks between -2 and +2 ppm corresponding to cytoplasmic Pi, vacuolar Pi and phosphate group of phosphoglycerocholine.

3.3. Expression patterns of *HcPT1*, *HcPT2* and *HcPhoA* from *in vivo*-grown mycelia under different Pi concentrations

Expression analysis by real-time RT-PCR showed that each gene displayed different expression patterns according to the P treatment (Figure 2). Transcripts of *HcPT1*, *HcPT2* and *HcPhoA* were detected under all conditions used (-/+ Pi). When mycelia grew in Pi-sufficient medium, transcript levels of each of the three genes did not vary much, even after 12 days of culture (Figure 2a, c, e). The two Pi transporters *HcPT1* and *HcPT2* were simultaneously expressed in + P mycelia.

Conversely to +P treatment, analyses of variance indicated that P deficiency increased significantly the transcript level of the three genes. *HcPT1* and *HcPT2* genes displayed different expression patterns according to the time of growth in Pi-starved conditions. Indeed, the transcript level of *HcPT1* gene was significantly increased up to the fifth day (30-fold higher than in the control conditions) while that of *HcPT2* did not vary much (Figure 2b, d). In contrast, the transcript level of *HcPT2* was significantly increased from day 8 (3-fold higher than in the control conditions) while that of *HcPT1* was considerably reduced (4-fold higher than in the control conditions). Similarly to *HcPT2*, the expression level of *HcPhoA* gene remained low until the fifth day and increased significantly (16-fold higher than in the control conditions) at day 8 and remained up-regulated at day 12 (Figure 2f).

4. Discussion

In response to Pi deficiency, the mycelium of *H. cylindrosporum* cultivated *in vitro* displayed the ability to increase the secretion of extracellular AcPases in the culture medium. AcPase activity secreted by mycelia grown for 12 days in Pi deficient medium was 20 times higher than that of mycelia grown for 12 days in Pi-sufficient medium (Table 1). Such an enhancement of secretion of AcPase activity in response to low Pi concentrations is in agreement with the data reported in saprophytic (Weber & Pitt, 1997; Bernard *et al.*, 2002) and mycorrhizal fungi (Calleja & D'Auzac, 1982; Bousquet *et al.*, 1986). Similar results have been reported by Tibbett *et al.* (1998) for *H. cylindrosporum* who showed that total AcPase production was derepressed when Pi availability was limited in the culture medium. In the other hand, previous studies performed on *H. cylindrosporum* showed that it was capable to secrete several AcPase isoforms in response to Pi deficiency (Deransart *et al.*, 1990; Leprince *et al.*, 1997) and such ability was also shared with other basidiomycete fungi such as *Pholiota nameko* (Yazaki *et al.*, 1997).

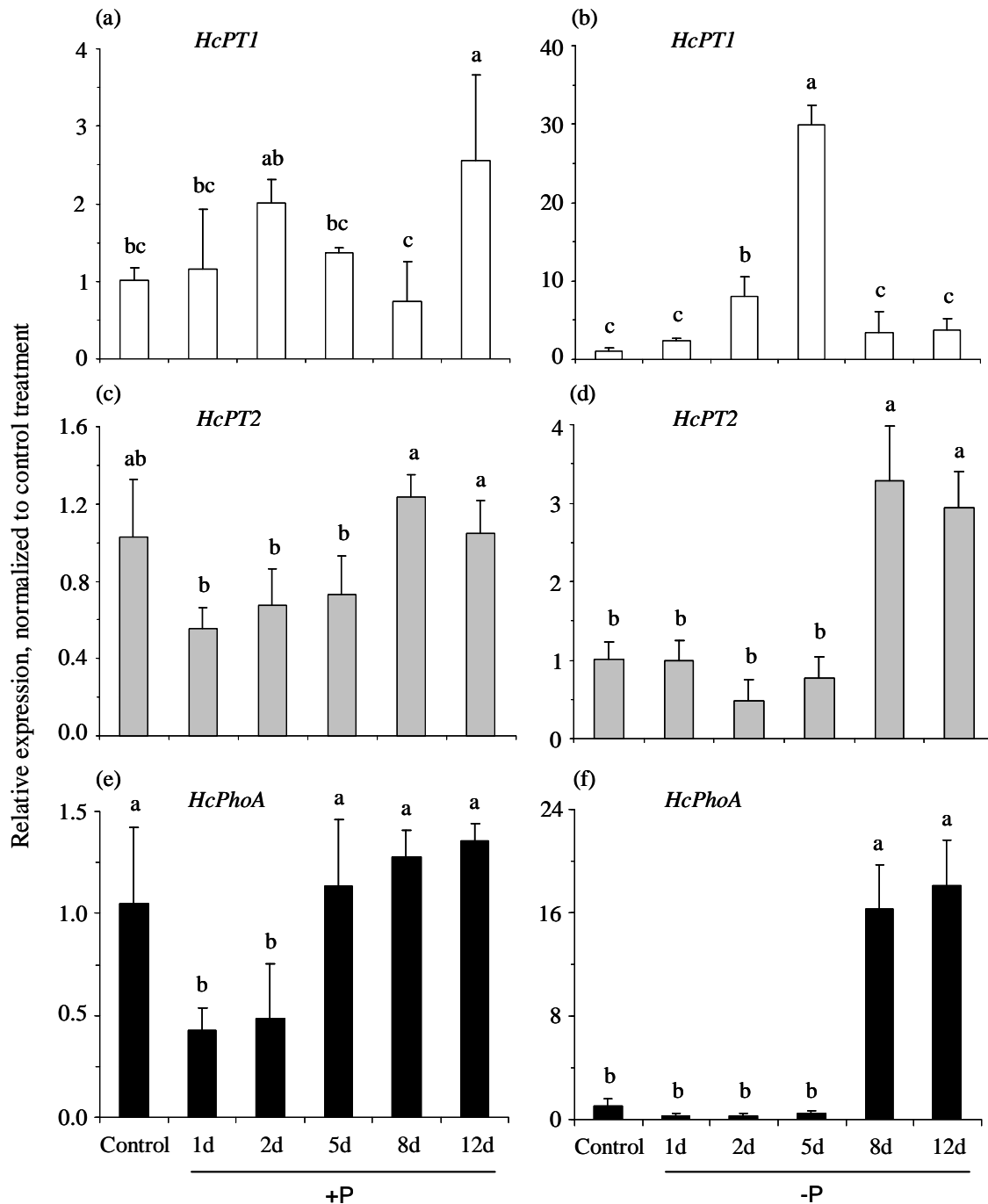


Figure 2. Expression of *HcPhoA*, *HcPT1* and *HcPT2* in *Hebeloma cylindrosporum* grown in pure culture. Real-time PCR analysis of *HcPhoA* (black bars), *HcPT1* (white bars) and *HcPT2* (grey bars) was performed on mycelia grown for 10 days (control) in liquid culture (3 mM Pi) and transferred for 1-12 days into liquid medium containing either 3 mM Pi (+P treatment) (a,c,e) or no Pi (-P treatment) (b,d,f). The transcript level of each gene was first normalized against *HcTub*, and the values shown are relative expression normalized to control conditions. Each value is mean \pm SD of six biological replicates and bars with different letters are significantly different at $P < 0.05$ (Fisher LSD test).

The analysis of ^{31}P NMR spectra showed that when Pi availability was not limited, *H. cylindrosporium* was able to accumulate both orthophosphate (Pi) and polyphosphates (Figure 1). This observation agrees with the ^{31}P NMR analysis performed on *H. cylindrosporium* (Martin *et al.*, 1983) and other ectomycorrhizal fungi (Martin *et al.*, 1985; MacFall *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 1999). The integration of peak surface corresponding to soluble P (cytoplasmic and vacuolar Pi and phosphate group of phosphoglycerocholine) and polyphosphates showed that Pi represent the main form of NMR-detectable P accumulated in the fungal cell. Indeed, percentage values of soluble P ranged from 74-85% of the total NMR-detectable P when mycelia were grown with high Pi concentrations. Martin *et al.* (1983, 1985) suggested that Pi represented the prominent form of P accumulated within the fungal cell because such P storage form was more easily mobilised compared to polyphosphates. Similarly, chemical analyses of P fractions showed that Pi and polyphosphate pools represented respectively up to 40% and 9% of the total P accumulated in P-satiated mycelia of *H. cylindrosporium* (Rolin *et al.*, 1994). On the other hand, polyphosphates can represent up to 40% of the total NMR-detectable P in mycelia grown under low Pi availability (Table 2). This percentage is higher than the values (2-9%) given in Martin *et al.* (1983) in *H. cylindrosporium*. Such difference could be explained by the use of different culture conditions and also of different fungal strains.

When mycelia were grown in Pi-deficient medium the percentage of polyphosphates accumulated in the vacuole decreased considerably from 40% at day 1 to 14% at day 8. Such decrease could be explained by the hydrolysis of polyphosphates in order to release Pi and to maintain Pi concentration in the fungal cell. Indeed, it is well accepted that the polyphosphate pool participates actively in maintaining Pi concentration in the fungal cell, acting as a sink for removal of Pi. Where excess intracellular Pi exists, polyphosphate synthesis provides a solution for the removal and the storage of Pi. In Pi-limiting conditions, the stored polyphosphates are hydrolysed, releasing Pi and maintaining Pi concentration in the cytosol of the fungal cell (Martin *et al.*, 1985; MacFall *et al.*, 1992).

Transcripts of *HcPT1* and *HcPT2* were detected in *H. cylindrosporium* mycelia under all P conditions analyzed (-/+ Pi). However, these two genes were differentially regulated in response to low Pi concentrations in the culture medium. In +P treatment, the expression level of each one remained very close to that of control mycelia (Figure 2). However, in response to low Pi availability, *HcPT1* expression was rapidly up-regulated and reached its higher expression level at day 5 (>30-fold higher than control). Conversely to *HcPT1*, the level of *HcPT2* transcripts did not vary much suggesting that *HcPT2* expression was less dependent

on Pi concentration. Our results are in agreement with those reported in Tatry *et al.* (2009) who showed that Pi starvation increased significantly the level of *HcPT1* transcripts in *H. cylindrosporum* hyphae grown in pure culture. The enhancement of Pi transporter synthesis in response to Pi starvation was also demonstrated for *Pnpdi85* in the saprophytic fungus *Pholiota nameko* (Tasaki *et al.*, 2002), for *GmosPT* and *GiPT* in the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Benedetto *et al.*, 2005) and *Glomus versiforme* (Harrison & van Buuren, 1995), respectively. In addition of Tatry *et al.* (2009) findings, we showed that in response to a long period of Pi starvation *H. cylindrosporum* did not maintain a high level of *HcPT1* expression. These data suggest that *HcPT1* could be regulated in a similar way as that described in yeast (Persson *et al.*, 2003) where it was shown that the transcription of *PHO84* coding for the high affinity H⁺:Pi transporter *pho84p* is transient. *PHO84* transcript levels varied greatly with external Pi concentration, with a repression of Pi transport activities occurred at high (repressing conditions) but also at low (<10 µM) external Pi concentration. As proposed for the regulation of *PHO84* (Persson *et al.*, 2003), the expression of *HcPT1* could be regulated by external Pi concentration. On the other hand, the expression of *HcPT2* coding for the other high affinity H⁺:Pi transporter of *H. cylindrosporum* is up-regulated by prolonged P starvation. *HcPT2* was found to have a much lower value of apparent Km when expressed in yeast than *HcPT1* (4 and 50 µM, respectively, Tatry *et al.*, 2009) and it can be proposed that *HcPT2* could be specifically induced when the external Pi concentration is in the range of its Km. However, we cannot exclude the hypothesis that the expression of both transporters could be controlled by the Pi concentration in the cytoplasm, as this gradually decreased with incubation time in -P medium.

Similarly to *HcPT1* and *HcPT2*, transcripts of *HcPhoA* were detected under all phosphate conditions analyzed and the regulation of its expression was highly dependent on the Pi concentration (Figure 2). When Pi availability was not limited the expression of *HcPhoA* did not vary much throughout the fungal culture. However, when Pi availability was limited *H. cylindrosporum* was able to increase significantly the transcript level of *HcPhoA*. It is interesting to note that *HcPT1* and *HcPhoA* were both strongly up-regulated under low Pi availability but each at different culture time. However, the expression levels of *HcPhoA* and *HcPT2* were simultaneously up-regulated. Such an enhancement of the AcPase gene expression in response to Pi-starved conditions had been reported in Tasaki *et al.* (2006) for two genes (*PNAP1* and *PNAP2*) encoding secreted AcPases identified from the basidiomycete fungus *Pholiota nameko*. Northern blot analysis performed on mycelia grown *in vitro*, showed that the expression of *PNAP1* and *PNAP2* were both induced after ten day of culture in Pi

deficient conditions. The enhancement of *HcPhoA* gene expression was in agreement with the enhancement of AcPase activity measured in culture medium of mycelia grown under Pi-starved conditions. It is suggested that the expression of *HcPhoA* is regulated at the transcriptional level. As for *HcPT2*, it can be proposed that *HcPhoA* expression level can be up-regulated either by external or cytoplasmic Pi concentrations that have been lower than those required for *HcPT1* expression. From the data available in yeast, however, where repressible AcPase secreted into the periplasmic space is regulated mainly by the concentration of cytoplasmic Pi (Auesukaree *et al.*, 2004; Mouillon & Persson, 2006), it could be proposed that the Pi concentration of *H. cylindrosporum* cells, regulated by polyphosphate hydrolysis, could also play a major role in the regulation of *HcPhoA*. Nevertheless, the effect of Pi starvation on the increase of AcPase activities was markedly observed at day 5 while the expression of our studied AcPase gene was up-regulated at day 8. Therefore, Pi starvation induced the synthesis of other AcPase isoforms from the *in vitro*-grown mycelia of *H. cylindrosporum* (Deransart *et al.*, 1990; Louche *et al.*, 2009).

5. Conclusion

In conclusion, the present work provides new insights about the different biological mechanisms used by the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporum* to cope with different Pi availabilities. Under Pi-sufficient conditions, the excess of Pi is accumulated and stored as polyphosphates in the vacuole. Conversely, when Pi availability is limited, the mobile polyphosphate pool is hydrolysed, releasing Pi and maintaining the homeostasis of the fungal cell. Real-time RT-PCR showed that in response to Pi deficiency, *H. cylindrosporum* is able to express simultaneously the two Pi transporters (*HcPT1* and *HcPT2*) which are differentially up-regulated as a function of culture time and also Pi concentrations in the culture medium. Our results show that *HcPT1* may be more involved than *HcPT2* in the uptake of P from the external medium in condition of low, but moderate, Pi availability. On the other hand, we demonstrated that in response to a prolonged absence of sufficient Pi availability, *H. cylindrosporum* is also able to induce the gene expression of a secreted AcPase. The secretion of such enzyme under Pi sufficient conditions could support its efficiency to mobilise Pi from the hydrolysis of soil organic compounds.

6. Supplementary data

Table S1. Sequence of primers used for real-time PCR experiments.

Genes	Primers	Sequences (5'-3')	PCR fragment size (bp)	PCR efficiency (%)	Melt point (T°C)
<i>HcTub</i> [*]	Hc-Tub2U	GTCTTCAAGGCT TCGTCTTC	207	109	84.5
	Hc-Tub2L	ACAGTCAGAGTGCTCCAAGGTAGT			
<i>HcPT1</i> [§]	HcPT1-U	CACAAATAAATTCGTCAAGCATATTCT CG	157	91	82.0
	HcPT1-L	GCGTTCTCGCACACCTCTG			
<i>HcPT2</i> [§]	HcPT2-U	CTTCGGTT GCTGTATCGCTG	101	107	82.5
	HcPT2-L	TACGCACACGGATTTCCCTCC			
<i>HcPhoA</i>	HcPhoA 776dir	TTCGCTCATCGGTACACAAGAC	393	92	85.5
	HcPhoA 1169 rev	ATTCAACACCCCTGTGGAAGAAC			

^{*}Sequences of primer pair used are given in Bailly *et al.* (2007)

[§]Sequences of primer pair used are given in Tatry *et al.* (2009)

7. References

- Arvieu JC, Leprince F & Plassard C (2003) Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to Pi-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Ann For Sci* **60**: 815-821.
- Ashford AE, Ryde S & Barrow KD (1994) Demonstration of a short chain polyphosphate in *Pisolithus tinctorius* and the implications for phosphorus transport. *New Phytol* **126**: 239-247.
- Auesukaree C, Homma T, Tochio H, Shirakawa M, Kanedo Y & Harashima S (2004) Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 17289-17294.
- Bailly J, Debaud J-C, Verner M-C, Plassard C, Chalot M, Marmaise R & Fraissinet-Tachet L (2007) How does a symbiotic fungus modulate expression of its host plant nitrite reductase? *New Phytol* **175**: 155-165.
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P & Lanfranco L (2005) Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **15**: 620-627.
- Bernard M, Mouyna I, Dubreucq G, Debeaupuis JP, Fontaine T, Vorgias C, Fuglsang C & Latge JP (2002) Characterization of a cell wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*

148: 2819-2829.

- Bousquet N, Mousain D & Salsac L (1986) Influence de l'orthophosphate sur les activités phosphatases de *Suillus granulatus* en culture *in vitro*. *Physiol Vég* **24**: 153-162.
- Calleja M & D'Auzac J (1982) Activités phosphatases et carence phosphate chez des champignons supérieurs. *Can J Bot* **61**: 79-86.
- Chalot M, Javelle A, Blaudez D, Lambilliotte R, Cooke R, Sentenac H, Wipf D & Botton B (2002) An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant Soil* **244**: 165-175.
- Conjeaud C, Scheromm P & Mousain D (1996) Effects of phosphorus and ectomycorrhiza on maritime pine seedlings (*Pinus pinaster*). *New Phytol* **133**: 345-351.
- Debaud J-C & Gay G (1987) *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytol* **105**: 429-435.
- Deransart C, Chaumat E, Cleyetmarel JC, Mousain D & Labarere J (1990) Purification assay of phosphatases secreted by *Hebeloma cylindrosporum* and preparation of polyclonal antibodies. *Symbiosis* **9**: 185-194.
- Ezawa T, Smith SE & FA Smith (2001) Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **149**: 555-563.
- Ezawa T, Smith SE & FA Smith (2002) P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil* **224**: 221-230.
- Frossard E, Condrón LM, Oberson A, Sinaj S & Fardeau JC (2000) Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *J Environ Qual* **29**: 12-53.
- Gerlitz TGM & Werk WB (1994) Investigations on phosphate uptake and polyphosphate metabolism by mycorrhized and non-mycorrhized roots of beech and pine as investigated by *in vivo* ³¹P-NMR. *Mycorrhiza* **4**: 207-214.
- Gerlitz TGM & Gerlitz A (1997) Phosphate uptake and polyphosphate metabolism of mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of pine and of *Suillus bovinus* at varying external pH measured by *in vivo* ³¹P-NMR. *Mycorrhiza* **7**: 101-106.
- Grellier B, Strullu DG, Martin F & Renaudin S (1989) Synthesis *in vitro*, microanalysis and ³¹P-NMR study of metachromatic granules in birch mycorrhizas. *New Phytol* **112**: 49-54.
- Harrison MJ & van Buuren ML (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* **237**: 173-195.
- Kiefer E, Heller W & Ernst D (2000) A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol Biol Rep* **18**: 33-39.
- Kornberg A, Rao NN & Ault-Riche D (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* **68**: 89-125.
- Kulaev I, Andreeva N, Lichko I & Kulakovskaya T (1997) Comparison of exopolyphosphatases of different yeast cell compartments. *Microbiol Res* **152**: 221-226.
- Leprince F & Quiquampoix H (1996) Extracellular enzyme activity in soil: effect of pH and ionic strength

- on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Eur J Soil Sci* **47**: 511-522.
- Louche J, Amenc L, Sauvage F-X & Plassard C (2009) Identification of *HcPhoA*, a gene encoding an acid phosphatase released into its external medium by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. In preparation.
- MacFall JS, Slack SA & Wehrli S (1992) Phosphorus distribution in red pine roots and the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma arenosa*. *Plant Physiol* **100**: 713-717.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR & Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 1140-1148.
- Martin F, Canet D, Rolin D, Marchal JP & Lahrer F (1983) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of polyphosphate metabolism in intact ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **71**: 469-476.
- Martin F, Marchal J-P, Timinska A & Canet D (1985) The metabolism and physical state of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi. A ³¹P nuclear magnetic resonance study. *New Phytol* **101**: 275-290.
- Martins A, Santos M, Santos H & Pais MS (1999) A ³¹P nuclear magnetic resonance study of phosphate levels in roots of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal plants of *Castanea sativa* Mill. *Trees* **13**: 168-172.
- Morizet J & Mingeau M (1976) Effect of Environment on water uptake, as studied on beheaded exuding tomato. 1. Role of nutrients. *Ann Agron* **27**: 183-205.
- Mouillon J-M & Persson BL (2006) New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**: 171-176.
- Ohno T & Zibilske LM (1991) Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using Malachite Green. *Soil Sci Soc Am J* **55**: 892-895.
- Perez-Moreno J & Read DJ (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytol* **154**: 301-309.
- Persson BL, Lagerstedt JO, Pratt JR, Pattison-Granberg J, Lundh K, Shokrollahzadeh S & Lundh F (2003) Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**: 225-244.
- Rasmussen N, Llyod DC, Ratcliffe RG, Hansen PE & Jakobsen I (2000) ³¹P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* **226**: 245-253.
- Roby C, Martin J-B, Bligny R & Douce R (1987) Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells: phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. *J Biol Chem* **262**: 5000-5007.
- Rolin D, Le Tacon F & Larher F (1984) Characterization of the different forms of phosphorus in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus, *Hebeloma cylindrosporum*, cultivated in pure culture. *New Phytol* **98**: 335-343.
- Smith SE & Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd edition. Academic Press, San Diego, USA.
- Takanishi I, Ohtomo R, Hayatsu M & Saito M (2009) Short-chain polyphosphate in arbuscular mycorrhizal

- roots colonized by *Glomus* spp.: a possible phosphate pool for host plants. *Soil Biol Biochem* **41**: 1571-1573.
- Tasaki Y, Azwan A, Yasaki Y, Hara T & Joh T (2006) Structure and expression of two genes encoding secreted acid phosphatases under phosphate-deficient conditions in *Pholiota nameka* strain N2. *Curr Genet* **49**: 323-332.
- Tasaki Y, Kamiya Y, Azwan A, Hara T & Joh T (2002) Gene expression during Pi deficiency in *Pholiota nameko*: accumulation of mRNAs for two transporters. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 790-800.
- Tatry M-V, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H & Plassard C (2009). Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J* **57**: 1092-1102.
- Tibbett M, Sanders FE & Cairney JWG (1998) The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. In axenic culture. *Mycol Res* **102**: 129-135.
- Van Aarle IM, Viennois G, Amenc LK, Tatry M-V, Luu DT & Plassard C (2007) Fluorescent in situ RT-PCR to visualise the expression of a phosphate transporter gene from an ectomycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* **17**: 487-494.
- Van Der Rest B, Boisson A-M, Gout E, Bligny R & Douce R (2002) Glycerophosphocholine metabolism in higher plant cells: evidence of a new glyceryl-phosphodiester phosphodiesterases. *Plant Physiol* **130**: 244-255.
- Viereck N, Hansen PE & Jakobsen I (2004) Phosphate pool dynamics in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* studied by *in vivo* ³¹P NMR spectroscopy. *New Phytol* **162**: 783-794.
- Wallander H (2000) Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **218**: 249-256.
- Weber RWS & Pitt D (1997) Purification and characterization and exit routes of two acid phosphatases secreted by *Botrytis cinerea*. *Mycol Res* **101**: 1431-1439.
- Winer J, Jung KS, Shackel I & William PI (1999) Development and validation of real-time quantitative transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem* **270**: 41-49.
- Wood HG & Clark JE (1988) Biological Aspects of Inorganic Polyphosphates. *Ann Rev Biochem* **57**: 235-260.
- Yazaki J, Joh T, Tomida SI & Hayakawa T (1997) Acid phosphatase isozymes secreted under phosphate deficient conditions in *Pholiota nameko*. *Mycoscience* **38**: 347-350.

CHAPITRE 5

Expression différentielle de deux gènes codant chacun un transporteur de phosphate et un gène codant pour une phosphatase acide, identifiés chez le champignon ectomycorhizien *Hebeloma cylindrosporum*, dans des ectomycorhizes de pin maritime (*Pinus pinaster*) cultivés sur des sols acides

La symbiose mycorhizienne est considérée comme la stratégie la plus répandue pour accroître l'acquisition du P par les plantes (Smith *et al.*, 2000). Des études réalisées sur divers modèles d'associations entre des plantes ligneuses et des champignons ectomycorhiziens ont montré l'effet bénéfique de cette association sur le statut P de la plante hôte (Colpaert *et al.* 1999 ; Wallander, 2000). Cette amélioration de la nutrition phosphatée peut souvent s'accompagner par une stimulation de la croissance comparée aux plantes non mycorhizées dans les mêmes conditions de culture (Mousain *et al.*, 1979, Jentschke *et al.*, 2001).

L'une des hypothèses permettant d'expliquer cet effet bénéfique de l'association ectomycorhizienne est la sécrétion de phosphatases acides (AcPases) par le partenaire fongique. Toutefois, peu d'études ont tenté d'évaluer la contribution réelle du Pi libéré par les AcPases fongiques dans l'amélioration de la nutrition P des plantes. Perez-Moreno & Read (2000) ont rapporté que la capacité chez des jeunes plants de bouleau à obtenir du P à partir de la minéralisation du Po contenue dans des litières a été attribuée à la production de AcPases par les hyphes extramatriciels de *Paxillus involutus* colonisant les horizons des différentes litières. Cependant la contribution de ces AcPases n'a jamais été démontrée par une approche moléculaire.

Dans le chapitre 3 nous avons rapporté l'identification d'un gène (*HcPhoA*) codant pour une AcPase chez *H. cylindrosporum*. L'augmentation significative de l'expression de *HcPhoA* en réponse à la déficience en Pi suggère que cette enzyme pourrait jouer un rôle clé dans l'amélioration de la disponibilité du P surtout dans les sols pauvres en cet élément.

Les objectifs de ce dernier chapitre sont :

- 1) Quantifier l'effet du champignon ectomycorhizien *H. cylindrosporum* sur la nutrition P de jeunes plants de pin maritime (*Pinus pinsater*) cultivées sur des sols sableux acides présentant des concentrations contrastées en P inorganique et P organique.

2) Evaluer le rôle potentiel des AcPases fongiques dans la mobilisation du Pi et l'amélioration du statut P de la plante hôte par le suivi de l'expression du gène *HcPhoA* dans des ectomycorhizes.

L'effet de la symbiose ectomycorhizienne sur la nutrition P de *P. pinaster* a été étudié en fonction de la disponibilité en P de différents podzols acides de mêmes types que ceux utilisés dans le chapitre 2. Pour cela, de jeunes plantules issues de la germination de graines sont cultivées en conditions stériles pendant 2 mois dans un dispositif de tube en verre (Plassard *et al.*, 2004) contenant une solution nutritive complète (0.4 mM; KH₂PO₄) en présence ou non du champignon *H. cylindrosporum* (Annexe 3). Les jeunes plants mycorhizés ou non sont ensuite délicatement transférés sur une mince couche de sol en rhizotron (Casarin *et al.*, 2004) pour 3 mois (Annexe 4).

A la fin de la culture, nous avons prélevé sous la loupe binoculaire des apex racinaires mycorhizés et non mycorhizés pour le dosage des activités phosphatase. Des ectomycorhizes ont également été prélevées pour le suivi de l'expression du gène *HcPhoA* par la méthode de RT-PCR quantitative. Enfin, un ensemble d'analyses a été réalisé sur les sols et les plantes pour quantifier les variations de Pi et Po du sol rhizosphérique et bulk, ainsi que l'accumulation de P dans les plantes.

Références

- Casarin V, Plassard C, Hinsinger H & Arvieu J-C (2004) Quantification of ectomycorrhizal fungal effects on the bioavailability and mobilization of soil P in the rhizosphere of *Pinus pinaster*. *New phytol* **163**: 177-185.
- Colpaert JV, van Tichelen KK, van Assche JA & Van Laere A (1999) Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of intact *Pinus sylvestris* seedlings. *New Phytol* **143**: 589-597.
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schroder WH & Godbold DL (2001) Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* **149**: 327-337.
- Mousain D, Poitou N & Delmas J (1979) La Symbiose mycorhizienne : résultats obtenus avec l'*Hebeloma cylindrosporum* et le *Pisolithus tinctorius*, et perspectives d'application agronomique. In : Mushroom Science X (Part I), Proceedings of the 10th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Delmas Eds, Bourges, Tardy, Quercy SA, p. 949-956.
- Plassard C, Barry D, Eltrop L & Mousain D (1994) Nitrate uptake in maritime pine (*Pinus pinaster*) and the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*: effect of ectomycorrhizal symbiosis. *Can J*

Bot B **72**: 189-197.

Smith FW, Rae AL & Hawkesford MJ (2000) Molecular mechanisms of phosphate and sulphate transport in plants. *BBA-Biomembranes* **1465**: 236-245.

Tibbett M & Sanders FE (2002) Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Ann Bot* **89**: 783-789.

Wallander H (2000) Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **218**: 249-260.

Differential expression of the phosphorus-regulated fungal genes, two phosphate transporters and one acid phosphatase, within *Hebeloma cylindrosporum*/*Pinus pinaster* ectomycorrhizae grown in acidic podzols

Authors: Julien Louche, Muhammad Arif Ali, Laurie Amenc, Hervé Quiquampoix & Claude Plassard

Affiliation: UMR 1222 Ecologie Fonctionnelle et Biogéochimie des Sols, INRA-IRD-Montpellier SupAgro, Montpellier, France

Correspondence: Claude Plassard, plassard@supagro.inra.fr, Tel.: +33 4 99 61 29 79; fax: +33 4 99 61 30 88

Abstract

The effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* on phosphorus (P) nutrition of *Pinus pinaster* was investigated in relation to different soil P availabilities. Mycorrhizal and non mycorrhizal *P. pinaster* seedlings were grown for 3 months in rhizoboxes in sterile conditions onto acidic podzol soil samples with low (control) or high (NPK or P) soil P availabilities. In control soil, root biomass and shoot P concentration of mycorrhizal plants were significantly higher than non mycorrhizal plants. Net P-accumulation both in roots and shoot were greatly promoted by the presence of the fungus in these conditions. In NPK soil, mycorrhizal association had a negative effect on shoot biomass, root P concentration and root length compared to non mycorrhizal plants. Acid phosphatase (AcPase) activity of mycorrhizal root tips was systematically higher than that of non mycorrhizal root tips whatever the soil treatment. Real-time RT-PCR results showed that the level of *HcPT1* transcripts was significantly increased in ectomycorrhizae grown under low Pi availability suggesting that HcPT1 may be involved in the uptake of Pi from the soil solution under low Pi conditions. However, the transcript level of *HcPT2* was less dependent on soil Pi availability. Similarly to *HcPT1*, the highest transcript level of *HcPhoA* was observed in ectomycorrhizae grown in soil with low Pi availability. The expression pattern of *HcPhoA* in ectomycorrhizae indicated that AcPases may be involved in the improvement of plant P nutrition by increasing Pi availability in the vicinity of roots.

Keywords: soil P availability; plant P nutrition; ectomycorrhizal symbiosis; acid phosphatase activity; gene expression.

1. Introduction

In woodland ecosystems, the low phosphorus (P) availability is considered as one of the main factor limiting plant growth. Inorganic P (Pi) is the only form of P that can be used by plant and its large reactivity with numerous soil constituents reduces considerably its diffusion in the soil solution and also its availability for plants (Hinsinger, 2001). In response to low Pi availability, plants have developed various strategies for the uptake of this nutrient with high effectiveness, including the modification of root structure (Lynch & Brown, 2001), the secretion of root exudates (Hinsinger, 1998), the expression of Pi transporter (Smith, 2002), the release of acid phosphatases (AcPases) (Vance *et al.*, 2003), and the association with mycorrhizal fungi (Smith & Read, 2008).

Trees from boreal and temperate regions live in symbiotic association with soil fungi (Marmeisse *et al.*, 2004). The fungus is intimately associated with the plant roots through the formation of ectomycorrhizae and several exchanges take place between the root cell and the fungus in this new organ (Smith & Read, 2008). Mycorrhizal association between plant and fungi is considered as the major strategy for the improvement of plant P nutrition in soils with low P availability. Several experiments performed on different plant-fungus association models growing in soils with different P concentrations clearly showed that under inorganic P deficiency, plants associated with an ectomycorrhizal partner had significantly higher P content than non mycorrhizal plant (Jentschke *et al.*, 2001; Torres Aquino & Plassard, 2004; Taniguchi *et al.*, 2008). This beneficial effect of the mycorrhizal symbiosis on plant P nutrition is mainly attributed to the rapid growth of external hyphae into the soil, increasing considerably the soil volume exploited compared to non mycorrhizal plant (Rousseau *et al.*, 1994; Perez-Moreno & Read, 2000). However, the molecular mechanisms involved in the uptake and transfer of Pi from the fungus to the host plant are still unclear.

Two main types of Pi transporters, belonging to the Pht1 family, involved in the transfer of Pi through the mycorrhizal pathway have been described so far. The first one is a plant Pi transporter identified exclusively in endomycorrhizal plant species allowing the uptake of Pi released by the fungus in the peri-arbuscular space (Harrison *et al.*, 2002; Paszkowski *et al.*, 2002; Nagy *et al.*, 2005). The second one is thought to be responsible for Pi uptake from the soil solution and has been principally identified in endomycorrhizal species (Harrison & Van Buuren, 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001; Benedetto *et al.*, 2005). Recently, Tatry *et al.* (2009) reported the first description of the molecular and functional properties of two Pi transporters (HcPT1 and HcPT2) identified from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. These authors demonstrated that *HcPT1* and *HcPT2* were

differentially expressed in *H. cylindrosporium* associated with its natural host plant, *Pinus pinaster*, under low and high soil P levels. The expression patterns of these two Pi transporters in both extramatricial hyphae exploring the soil and *P. pinaster* ectomycorrhizae established their roles in the uptake of Pi from the external environment and also in the improvement of the P status of the host plant.

Mycorrhizal fungi are thought to be able to release Pi from organic P (Po) fractions by secreting AcPases in the external medium (Smith & Read, 2008). AcPases form a key group of enzymes that catalyses the hydrolysis of a wide variety of phosphate esters to release Pi in the acidic environment. The aptitude of ectomycorrhizal fungal to release high amount of AcPases have been tested in pure culture (Antibus *et al.*, 1983; Tibbett *et al.*, 1998) or in association with a host plant (Chen *et al.*, 2002; Taniguchi *et al.*, 2008). Some experiments reported the efficiency of ectomycorrhizal fungi to enhance the plant P nutrition through the using of discrete organic P sources added into the soil (Perez-Moreno & Read, 2000; Tibbett & Sanders, 2002). Such findings highlight the key role played by the fungal AcPases in the improvement of plant P nutrition through the mycorrhizal association. In the other hand, it is obvious that the regulation of synthesis of enzyme activity would allow the fungus to cope with changes in soil P concentrations. However, the molecular mechanisms of regulation of fungal AcPase genes are poorly understood because most of these genes are still unknown. Recently, we identified a complete cDNA sequence (*HcPhoA*) encoding a secreted AcPase from the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporium* (Louche *et al.*, 2009a). Our first results performed on mycelium grown in pure culture showed an over-expression of *HcPhoA* in response to Pi-starvation indicating a possible role in the uptake of Pi from the external medium when the Pi concentration is limiting (Louche *et al.*, 2009b). However, the expression patterns of *HcPhoA* from *H. cylindrosporium* associated with a host plant in soils with different Pi availabilities are still lacking.

The objective of this work was to study the effect of *H. cylindrosporium* on P nutrition of young *Pinus pinaster* seedlings under different P availabilities. We attempted to evaluate the molecular mechanisms which could be involved in the improvement of P nutrition of plants by following the expression of two Pi transporters genes (*HcPT1* and *HcPT2*) and one secreted AcPase gene (*HcPhoA*) in *P. pinaster* ectomycorrhizae. Because this fungal species display low competence to secrete organic acids in the external medium (Arvieu *et al.*, 2003; Casarin *et al.*, 2004), we hypothesize that regulation of AcPase gene expression must be essential for the uptake of Pi from soil Po fraction and subsequently for the enhancement of plant P nutrition in P impoverished soils. The study has been performed on mycorrhizal and

non mycorrhizal *P. pinaster* young seedlings grown for three months in rhizoboxes containing a thin layer of acidic podzol soil with contrasted Pi and Po concentrations collected in a 15 year-old *P. pinaster* forest where *H. cylindrosporium* is naturally present. Our results provide new insights into the potential role played by AcPases from ectomycorrhizal fungi in improving the P nutrition of the host plant especially in soils with low Pi availability.

2. Materiel and Methods

2.1. Fungal culture

A dikaryotic strain (D2) of the ectomycorrhizal basidiomycete *H. cylindrosporium* Romagnesi, resulting from the plasmogamy of two compatible homokaryotic strains (h1 and h7) (Debaud & Gay, 1987) was used. Fungal stock cultures were grown in Petri dishes at 24°C in the dark without shaking, on solid standard medium (agar, 14 g l⁻¹) (pH 5.5) containing KNO₃ (6 mM), NaH₂PO₄ (3 mM), MgSO₄ 7H₂O (1 mM), KCl (4 mM), CaCl₂ (0.5 mM), ferric citrate 1‰, thiamine HCl (0.3 µM), Morizet & Mingeau (1996) micronutrients solution (0.2 ml l⁻¹) and glucose (5 g l⁻¹).

2.2. Soil collection

Soil samples used in this study were sandy podzols collected in three different plots of a 15 year-old *Pinus pinaster* forest stand in Pierroton, south-west of France. One plot was unfertilized (control) and two plots were either fertilized with complete fertilizers (NPK) or with phosphorus (P) only. Frequency and forms of fertilizers applied in soil are summarized in Bakker *et al.* (2009). Soil cores (8 x 15 cm) were taken in autumn 2008 and were sieved < 2 mm. Soils were stored at 4°C prior to be used in rhizoboxes.

2.3. Seed germination and plant culture conditions

Seeds of maritime pine (*Pinus pinaster* Soland. in Ait., from Medoc, Landes-Score-VG source, France) were surface sterilized with 30% hydrogen peroxide (w/w) for 30 min then rinsed several times with sterile water. Seeds were next soaked in sterile water and conserved at 4°C during 48 hrs for stratification. Seeds were air dried, carefully placed in Petri dishes containing water agar gel (14 g l⁻¹) and glucose (2 g l⁻¹), and conserved at 24°C in the dark for germination. Germinated seeds were then transferred in glass tubes (Plassard *et al.*, 1994) sterilised twice (120°C, 20 min) containing 10 ml of a complete nutrient solution (Ca (NO₃)₂ 0.3 mM; KNO₃ 0.4 mM; KH₂PO₄ 0.4 mM; MgSO₄ 1 mM; KCl 0.2 mM; sequestrene 16.6 mg

l^{-1} ; micronutrients $0.2 \text{ ml } l^{-1}$ (Morizet & Mingeau, 1996); thiamine-HCl $100 \mu\text{g } l^{-1}$; pH adjusted at 5.5). Mycorrhizal symbiosis was performed under sterile conditions in test tubes by placing actively growing mycelia (agar plugs of diameter 8 mm taken from a 1 month-old fungal stock culture) close to the roots of maritime pine seedlings. Seedlings were allowed to grow in a growth chamber for two months and the complete nutrient solution was renewed every week under sterile conditions.

Mycorrhizal and non mycorrhizal seedlings were next transferred in rhizoboxes (Casarin *et al.*, 2004) containing three different soil samples (twice autoclaved, 20 min at 120°C) with different fertiliser regimes. Briefly, the rhizobox consisted of two Perspex plates ($20 \times 10 \text{ cm}$) separated by 3 mm PVC spacers. The spacers made it possible to establish a 3 mm-thick layer of soil, using 70 g of fresh soil. After the installation of soil in the first Perspex plate, a sterile piece ($7 \times 10 \text{ cm}$) of glass fibre paper sheet wrapped in a nylon cloth was placed at the bottom of the soil layer. This sheet was in contact with a water reservoir to ensure water supply to the soil and plant. The seedling root system was gently spread onto the soil layer and the system was closed with the second Perspex plate, clamps and sticky tape. Rhizoboxes were then arranged in a container containing distilled water and plants were grown for 3 months in a growth chamber with regular supply of distilled water. For each type of soil (Control, NPK and P) six mycorrhizal and six non mycorrhizal plants were grown. Growth conditions were similar in test tubes and rhizoboxes: 16/8 hrs light/dark cycle at $25/18^{\circ}\text{C}$, 70% of relative humidity, CO_2 concentration of *c.* $350 \text{ mm}^3 l^{-1}$ and a PAR of *c.* $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (400-700 nm).

2.4. Plant and soil harvest

At the end of culture, rhizoboxes were gently dismantled. Each root system was examined under binocular microscope to pick up mycorrhizal and non mycorrhizal root tips for measuring AcPase activity. Similarly, several ectomycorrhizae uniformly taken from the whole root system of each plant were pooled and immediately frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C for transcript analysis. The root system was next carefully pulled out from the soil layer. Soil attached to (rhizosphere soil) and away from roots (bulk soil) was separated, weighed, and freeze-dried. The root system was rinsed with distilled water, quickly dried between absorbent paper sheets and the plant was separated into roots and shoot (stem and needles). Each root system was scanned and analysed with the WinRHIZOTM 2005b software (Regent Instruments Inc., Canada). The weight of fresh and freeze-dried roots and shoots was recorded prior to analysis.

2.5. AcPase activity

AcPase activity (Tabatabai, 1982) of ten mycorrhizal and non mycorrhizal root tips collected from each plant seedlings was estimated separately. Each root tip was incubated for 30 min at 30°C in 200 µl of sodium acetate buffer 0.1 M (pH 5.0) containing 10 mM of *para*-nitrophenylphosphate (*p*NPP) as substrate. A blank sample was prepared for each plant by incubating one root tip in 200 µl of distilled water. The enzyme reaction was stopped by adding 1 ml of NaOH 0.5 M and the *para*-nitrophenolate (*p*NP) produced was determined by colorimetry at 410 nm. After incubation each root tip was placed in one microplate well containing distilled water and was then scanned. AcPase activity was calculated in nmoles of *p*NP produced min⁻¹ cm⁻² of fresh root tip surface. The surface of each root tip was obtained by image analysis with the WinRHIZO™ 2005b software.

2.6. Plant and soil analysis

Extractions of labile P were carried out on both bulk and rhizosphere freeze-dried soils according to the method of Olsen *et al.* (1954). Plant available fraction of P was extracted by shaking 0.3 g of sieved soil for 30 min in 6 ml of NaHCO₃ (0.5 M, pH 5.0) at room temperature. Each bicarbonate soil extracts was allowed to settle for few minutes and the supernatant was centrifuged (10 min, 13, 000 g). An aliquot fraction of each bicarbonate soil extract was diluted with distilled water (1/6, v/v), and acidified with HCl 12 N (1/600, v/v) over the night at 4°C to precipitate humic material. Mineralization was carried out in acidified soil extracts with HCl 12N (1/1, v/v) at 110°C for 16 hrs (Ali *et al.*, 2009). Phosphate was measure before (Pi) and after (total P, Pt) mineralization of bicarbonate soil extracts using the malachite green method as described by Ohno & Zilbiske (1991).

Total P concentration was measured in each freeze-dried roots and shoot. Plant roots and shoot material was finely ground and 25 mg of roots or shoot dry matter was mineralised in Pyrex glass tube under chemical fume hood using 0.5 ml of H₂SO₄ (36 N) for 10 min at 150°C, and for 30 min at 330°C (McDonald, 1978) in a tube mineralization block. If solution was not transparent, tubes were removed and allowed to cool down and 0.1 ml of H₂O₂ was added till the solution became transparent. A blank sample containing only 0.5 ml of H₂SO₄ (36 N) was achieved for each tube mineralization block. Each mineralised extracts was diluted (1/20, v/v) with distilled water and P concentration was assayed according to Ohno & Zilbiske method (1991).

Estimation of mycorrhizal colonisation in *P. pinaster* roots was determined using chitin assay according to Vignon *et al.* (1986) method. Twenty mg of root dry matter was hydrolysed in 2 ml of HCl 6N for 3hrs at room temperature, and 16 hrs at 80°C. The released glucosamine was next assayed by colorimetric method (Vignon *et al.* 1986) using glucosamine-HCl (C9752, <http://sigmaaldrich.com>) as standard (0-30 µg ml⁻¹). Since amino sugars contained in root tissues of the host plant may be taken into account in the assay of glucosamine, the absorbance due to fungal glucosamine was calculated as the difference between the absorbance assayed in mycorrhizal roots minus the absorbance assayed in non mycorrhizal root. Fungal glucosamine was expressed in mg g⁻¹ of dry root.

2.7. Total RNA extraction from *P. pinaster* ectomycorrhizae

Total RNA was extracted from ectomycorrhizae by using a modified method of Kiefer *et al.* (2000) improving the quantity of functional RNA extracted (data not shown). One total RNA extraction was performed for each mycorrhizal plant. Around 20 mg of ectomycorrhiza were grinded in a lysing matrice A (116910, MP Biomedicals, <http://www.mpbio.com>) containing 0.5 ml of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.0; 25 mM EDTA, pH 7.0, 2% CTAB; 2% PVP; 2.5 M NaCl; 0.5 g l⁻¹ spermidine; 2% β-mercaptoethanol). Sample was grinded 40 sec by using the FastPrep[®]-24 instrument (MP Biomedicals). After grinding, 0.25 ml of chloroform: isoamyl alcohol (CI) (24:1) and 0.05 ml of Nucleon[™] PhytoPure[™] Genomic DNA extraction resin (RPN8510, GE Healthcare, <http://www.gehealthcare.com>) were added and the sample was incubated for 10 min at room temperature by shaking every 2 min. It was next centrifuged (16,000 g, 5 min, 4°C) and the upper phase was transferred to a new eppendorf tube. 0.2 ml of CI was added and it was briefly shaken and centrifuged (16,000 g, 5 min, 4°C). The upper phase was transferred again to a new eppendorf tube, incubated for 15 min at -20°C in 1 ml of isopropanol and centrifuged (16,000 g, 20 min, 4°C). The pellet was washed with 0.5 ml of ethanol 70%, centrifuged (16,000 g, 5 min, 4°C) and air-dried. It was next dissolved in 50 µl of ultrapure water. RNA concentration was measured at 260 nm and extractions were kept at -80°C until real-time PCR experiments.

2.8. Transcript analysis of *HcPT1*, *HcPT2* and *HcPhoA* genes

Reverse transcription using poly(dT) as the primer was performed according to the manufacturer's instructions using Verso reverse transcriptase (AB-1453/B, ThermoFisher Scientific, <http://www.thermofisher.com>) on 50 ng of total RNA extracts in 10 µl of final

volume. One reverse transcription reaction was made for each RNA extraction. Before performing real-time PCR, cDNAs from ectomycorrhizal roots were checked with classic PCR for the detection of the reference gene *H. cylindrosporium* α -tubuline (*HcTub*, GenBank accession number CK993737). Taq polymerase (18038-026, Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>) was used for PCR amplification (40 cycles) of 1 μ l of the reverse transcriptase product using the primer pair Hc-Tub2U and Hc-Tub2L (Bailly *et al.*, 2007). Real-time PCR reactions were performed using the CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com>) in a 10 μ l final volume containing 1 μ l of reverse transcription product, 0.6 μ l of each primer (0.15 μ M), 2.8 μ l of water, and 5 μ l of PCR mix containing a Taq DNA polymerase and SYBR Green (Absolute™ QPCR SYBR® Green ROX mix; ABgene). The same PCR program was used for the four genes (15 min of enzyme activation at 95°C, followed by 45 cycles of 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec, 72°C for 35 sec). PCR reactions without cDNA were used as negative controls. The specificity of the amplification of each PCR reaction was controlled by studying the melting curve of the PCR product given from the Bio-Rad CFX Manager software. Sequences of primers used for real-time PCR and values of PCR efficiency are indicated in Louche *et al.* (2009b). Relative gene expression levels were obtained by using the $\Delta\Delta C_t$ method as described by Winer *et al.* (1999). The ΔC_t was calculated as the threshold cycle (C_t) of the target gene (*HcPT1*, *HcPT2*, *HcPhoA*) minus the threshold cycle of the reference gene (*HcTub*). The relative gene expression was normalized to control treatment. The main C_t value for *HcTub* was 28.7 ± 1.7 . Each value of relative gene expression was the mean of 6 biological repetitions.

2.9. Statistical analyses

All results given are means obtained for 6 plants with standard deviations. Means of the different soil P fractions, weight and P concentrations of roots and shoot, root lengths, total P, root P uptake efficiency, AcPase activities and glucosamine concentrations were compared using t-test in order to evaluate significant difference between mycorrhizal and non mycorrhizal plants for each soil treatment. Analysis of variance was also performed to study the effect of soil P_i availability on AcPase activity, glucosamine concentration and transcript level of each gene. Means were compared using least significant difference of Fisher model ($P < 0.05$) and different letters indicated significant difference. All data were analysed using Statistica software package (Statistica 8, Statsoft Inc. Tulsa OK, USA).

3. Results

3.1. Analysis of soil P fractions

Concentrations of bicarbonate extractable Pi were systematically higher than those of organic P in bulk or rhizosphere soil whatever the plant or the soil sample (Table 1). The annually fertilized soils (NPK, P) showed significantly higher concentrations of each P fraction compared to control soil. Bicarbonate Pi was significantly depleted in the rhizosphere soil of all soil treatments compared to bulk soil. However, rhizosphere soil samples from mycorrhizal plants grown in fertilized soils (NPK, P) contained higher Pi concentrations than those measured in control plants. Although the concentrations of Po were lower in rhizosphere soil samples than in bulk soil, the decrease was never significant. Also, no significant differences between Po concentrations measured in bulk or rhizosphere soils occurred between mycorrhizal and non mycorrhizal *P. pinaster* seedlings grown in each soil types.

Table 1. Concentrations of inorganic and organic P extracted by NaHCO₃ from bulk (B) or rhizosphere (R) soils collected in rhizoboxes containing *P. pinaster* plants grown for 3 months in different soil samples. Soil samples were a sandy podzol collected in three different plots of a 15 year-old maritime pine forest stand in Pierroton, south-west of France. One plot was unfertilized (control) and two plots were fertilized either with complete fertilizers (NPK) or with phosphorus (P). Measurements of P concentrations were achieved on freeze-dried soils. Values are means (n=6 plants) with standard deviation between brackets. Different letters show significant difference of P concentrations between soil samples according to LSD Fisher model ($P < 0.05$). t-test was used to show significant difference between bulk and rhizosphere soils for P-inorganic and P-organic fractions.

Soil sample ^a	Plant treatment	P-inorganic (mg.kg ⁻¹ of dwt soil)			P-organic (mg.kg ⁻¹ of dwt soil)		
		B	R	<i>t-test (P)</i>	B	R	<i>t-test (P)</i>
Control	NM	9.5 ^c (1.7)	4.8 ^d (0.8)	< 0.001	2.5 ^b (1.9)	2.4 ^b (1.3)	0.946
	M	8.3 ^c (1.4)	5.7 ^d (1.4)	< 0.01	3.5 ^b (1.8)	3.1 ^b (1.9)	0.831
NPK	NM	59.4 ^a (6.0)	38.0 ^b (6.0)	< 0.001	22.6 ^a (5.6)	16.4 ^a (5.9)	0.134
	M	60.0 ^a (4.3)	43.5 ^a (1.6)	< 0.001	18.8 ^a (2.1)	15.8 ^a (4.8)	0.239
P	NM	36.4 ^b (3.4)	27.0 ^c (4.2)	< 0.01	18.6 ^a (6.6)	12.7 ^a (5.4)	0.179
	M	40.7 ^b (5.3)	33.9 ^b (3.6)	< 0.05	17.1 ^a (8.9)	16.3 ^a (3.3)	0.849

^aControl: no fertilizer added; NPK: complete fertilization at a mean rate (in kg ha⁻¹ year⁻¹) for 1998-2005 of 84 N, 32 P, 56 K, 22 Ca, 7 Mg, 1.3 B, 2.9 Cu, 2.1 Mn and 0.6 Zn; P: fertilization P only at a mean rate in 1998-2005 of 32 kg P ha⁻¹ year⁻¹ (Bakker *et al.*, 2009).

3.2. Biomass and root length analyses

The plant analysis showed that root biomass of mycorrhizal plants was increased of 66% in control treatment (Table 2). Despite of high root biomass in mycorrhizal plants, root length did not vary significantly compared to non mycorrhizal plants. In NPK treatment, the association of plants with *H. cylindrosporum* decreased significantly biomass of shoots and root length. Nevertheless the root biomass did not vary significantly between mycorrhizal and non mycorrhizal plants. In P fertilised soils, the difference between plant biomass and root length were not significant with and without the fungal association. Analysis of variance ($P < 0.05$) showed that non mycorrhizal plants of NPK treatment accumulated more root and shoot biomass than those of control and P treatments. The increase in biomass of mycorrhizal plants was not significantly different in NPK treatment compared to P treatment. The maximum root length was observed in non mycorrhizal plants of NPK treatment.

Table 2. Biomass accumulation and root length per plant measured from *P. pinaster* plants grown for 3 month in rhizoboxes containing soil samples with different fertilisation regimes. Maritime pine seedlings were first grown for 2 months in test tubes in presence or not of the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporum*. Mycorrhizal (M) and non mycorrhizal (NM) maritime pine seedlings, were next transferred in rhizoboxes for 3 months containing soil samples (see Table 1 for details). Values are means of 6 plants with standard deviation between brackets. Analyse of variance was performed and different letters show significant difference between treatments according to LSD Fisher model ($P < 0.05$). t-test was used to compare the biomass and root length of mycorrhizal and non mycorrhizal plants in each soil.

Soil sample	Plant treatment	Biomass (g dwt plant ⁻¹)		Root length (cm plant ⁻¹)
		Root	Shoot	
Control	NM	0.35 ^c (0.03)	0.26 ^b (0.05)	634 ^{bc} (144.2)
	M	0.58 ^a (0.2)	0.23 ^b (0.04)	602 ^{bc} (72.3)
	<i>t-test (P)</i>	<i>< 0.05</i>	<i>0.139</i>	<i>0.639</i>
NPK	NM	0.52 ^{ab} (0.13)	0.51 ^a (0.16)	820 ^a (132.5)
	M	0.43 ^{bc} (0.15)	0.34 ^b (0.08)	510 ^{bc} (115.7)
	<i>t-test (P)</i>	<i>0.293</i>	<i>< 0.05</i>	<i>< 0.01</i>
P	NM	0.36 ^c (0.1)	0.30 ^b (0.12)	644 ^{bc} (172.7)
	M	0.45 ^{abc} (0.06)	0.30 ^b (0.05)	492 ^c (80.1)
	<i>t-test (P)</i>	<i>0.111</i>	<i>0.967</i>	<i>0.079</i>

3.3. Effect of fungal association on plant P nutrition and net P-accumulation

The plant analysis showed that concentration of P in shoot of mycorrhizal plants was increased of 46% in control treatment (Table 3). In NPK and P treatments, association of plants with *H. cylindrosporium* decreased significantly P concentration in roots. The shoot P concentration of mycorrhizal plants increased of 33% compared to that of non mycorrhizal plants in NPK soil. In addition, plant analysis indicated that P concentrations in roots of mycorrhizal and non mycorrhizal plants grown in fertilized soils (NPK, P) were systematically higher than those of plants grown in control treatment.

Table 3. P concentrations in roots and shoots, total P and root uptake efficiency per plant measured from *P. pinaster* plants grown for 3 month in rhizoboxes containing soil samples with different fertilisation regimes. Maritime pine seedlings were first grown for 2 months in test tubes in presence or not of the ectomycorrhizal fungus *H. cylindrosporium*. Mycorrhizal (M) or non mycorrhizal (NM) maritime pine seedlings, were next transferred in rhizoboxes for 3 months containing soil samples (see Table 1 for details). Values are means of 6 plants with standard deviation between brackets. Analyse of variance was performed and different letters show significant difference between treatments according to LSD Fisher model ($P < 0.05$). t-test was used to compare the P concentrations, total P and root uptake efficiency of mycorrhizal and non mycorrhizal plants in each soil.

Soil sample	Plant treatment	P concentrations (mg g ⁻¹ dwt)		Total P (mg plant ⁻¹)	Root P uptake efficiency (µg P cm ⁻¹ root length)
		Root	Shoot		
Control	NM	1.04 ^d (0.09)	1.25 ^d (0.13)	0.68 ^d (0.06)	1.07 ^d (0.24)
	M	0.89 ^d (0.24)	1.82 ^{bc} (0.31)	1.02 ^c (0.1)	1.7 ^c (0.16)
	<i>t-test (P)</i>	0.184	< 0.01	< 0.001	<0.001
NPK	NM	2.07 ^a (0.21)	1.99 ^b (0.52)	2.04 ^a (0.56)	2.49 ^b (0.69)
	M	1.66 ^{bc} (0.22)	2.65 ^a (0.35)	1.57 ^b (0.30)	3.08 ^a (0.31)
	<i>t-test (P)</i>	< 0.01	< 0.05	0.098	0.088
P	NM	1.78 ^b (0.31)	2.38 ^{ab} (0.69)	1.3 ^{bc} (0.17)	2.02 ^{bc} (0.59)
	M	1.43 ^c (0.18)	2.21 ^{ab} (0.68)	1.29 ^{bc} (0.27)	2.62 ^{ab} (0.37)
	<i>t-test (P)</i>	<0.05	0.67	0.958	0.111

Root P uptake efficiency, defined as the ratio between the total amount of P in plant (μg) and the root length (cm), indicated that mycorrhizal plants absorbed more efficiently P than non mycorrhizal plants whatever the soil treatment (Table 3). Indeed, values of P uptake for mycorrhizal root systems were 59, 24 and 30% higher than non mycorrhizal roots systems in control, NPK and P treatments, respectively. However, these increases were not significant in fertilised soils (Table 3).

The mycorrhizal plants grown in control soil treatment for 3 months in rhizoboxes showed 97% and 140% higher net P accumulation in roots and shoot respectively compared to non mycorrhizal plants (Figure 1). In contrast, in fertilized soils (NPK, P) the net P accumulation was systematically higher both in roots and shoot of non mycorrhizal plant compared to mycorrhizal plants. However, the significant difference of net P accumulation (94 %) was only observed in roots of NPK treatment. Additionally, the net P accumulation in roots and shoot of non mycorrhizal plants in NPK soil was significantly higher compared to seedlings in P and control soils.

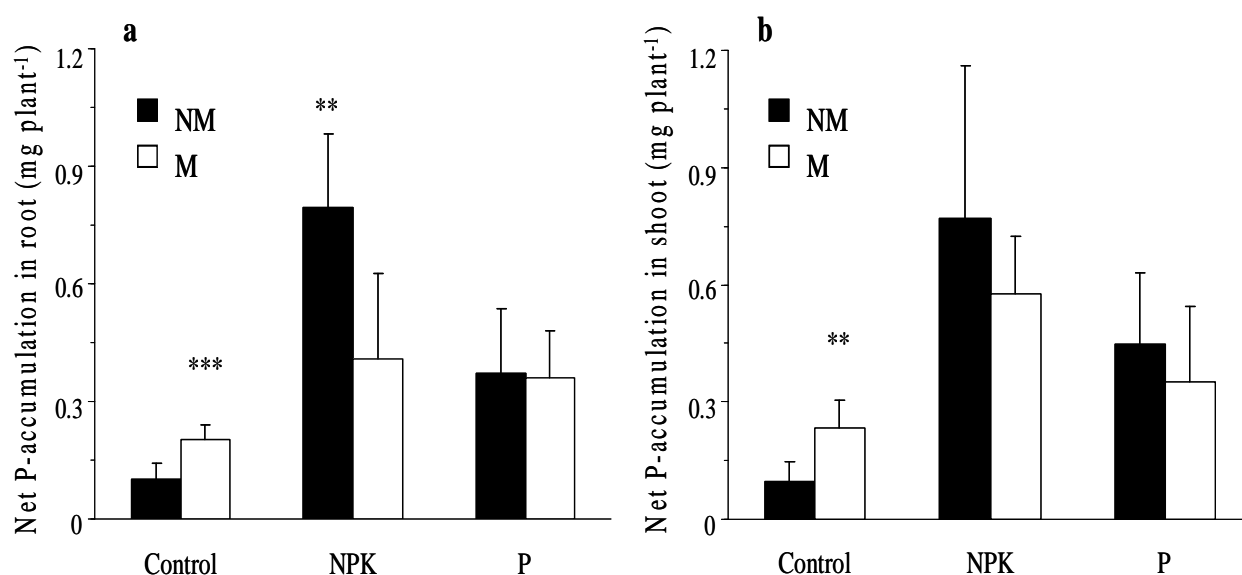


Figure 1. Net accumulation of P in root (a) and shoot (b) of non mycorrhizal (NM) or *H. cylindrosporum* mycorrhizal (M) *P. pinaster* seedlings grown for 3 months in rhizoboxes containing soil samples with different fertilisation regime (see Table 1 for details). Values are mean \pm standard deviation of 6 plants. Means of net P-accumulation in roots and shoot of mycorrhizal and non mycorrhizal plants were compared for each soil by using t-test. Asterisks denote significant difference (*= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$).

3.4. Effects of soil P availabilities on fungal biomass and AcPase activity

The fungal biomass estimated by assaying glucosamine in mycorrhizal plants showed 56% and 32% increase in NPK treatment with respect to control and P treatments respectively (Figure 2). In contrast, values of glucosamine were not significantly different between control and P mycorrhizal plants. AcPase activities secreted from mycorrhizal root tips were systematically higher than those of non mycorrhizal root tips whatever the soil Pi availabilities (Figure 3). Like fungal biomass, AcPase activity secreted by ectomycorrhizae collected from *P. pinaster* seedlings grown in NPK soil was significantly higher (90% and 85 %, respectively) in comparison to mycorrhizal plants grown in control and P soils. However, the phosphatase activity of non mycorrhizal root tips did not vary among different soil treatments.

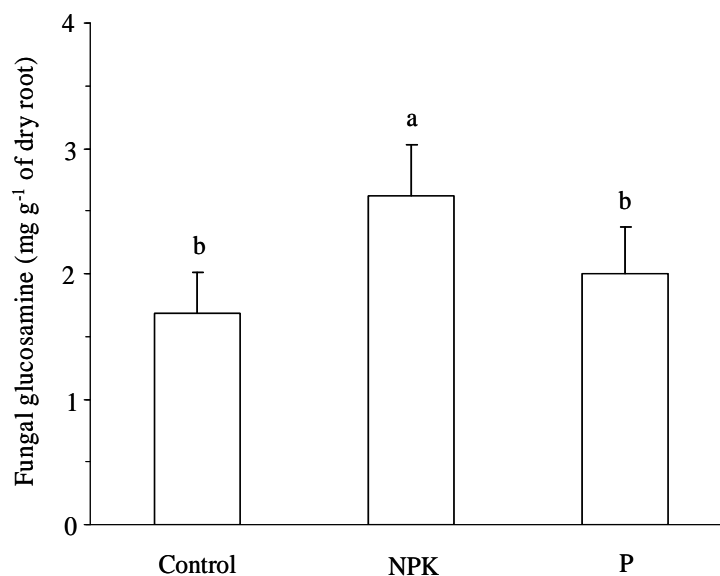


Figure 2. Assays of *H. cylindrosporum* glucosamine in roots of *P. pinaster* plants grown for 3 months in rhizoboxes containing different soils with different fertiliser regimes. Values are means \pm standard deviation of 6 plants. Analyse of variance was used to compare the concentration of glucosamine between each soil and significant difference was shown by different letters (LSD Fisher, $P < 0.05$).

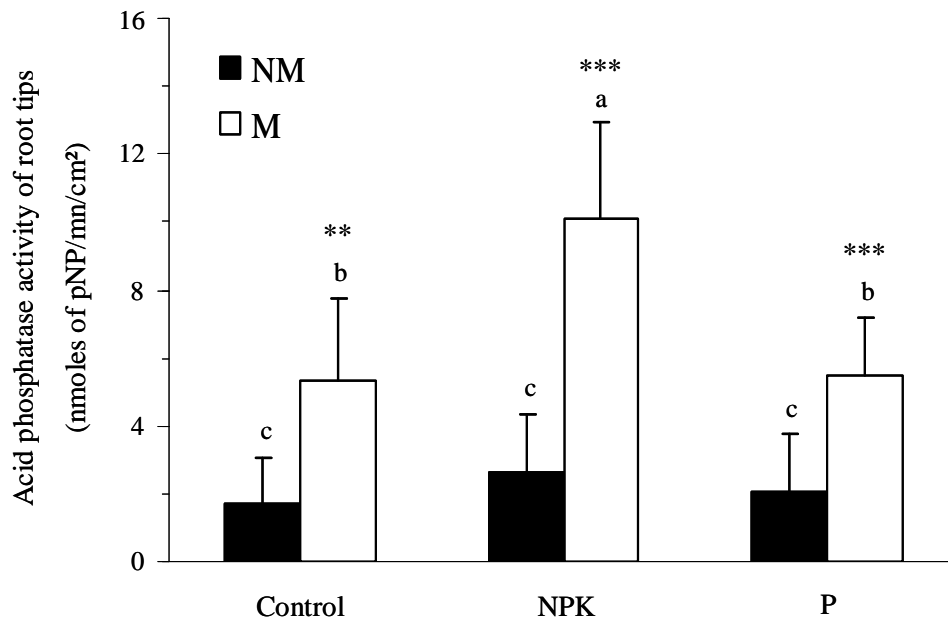


Figure 3. Acid phosphatase activity secreted from non mycorrhizal (NM) and mycorrhizal (M) *P. pinaster* root tips with *H. cylindrosporum*. Ectomycorrhizae were collected from young seedlings grown for 3 months in rhizoboxes containing soil samples with different fertilisation regimes (see Table 1 for details). Values are means \pm standard deviation of 6 plants (10 root tips collected from each plant). Analyse of variance was performed and different letters show significant difference between soil treatments according to LSD Fisher model ($P < 0.05$).

3.5. Expression pattern of *HcPT1*, *HcPT2* and *HcPhoA* in ectomycorrhizal root tips

AcPase gene (*HcPhoA*) in ectomycorrhizal root tips of *P. pinaster* young seedlings grown for 3 months in rhizoboxes was expressed 12 and 3 times more in control and P soils respectively as compared to NPK soil (Figure 4). Moreover the expression level was 4 folds higher in ectomycorrhizal root tips of control soil than that of P soil. Similarly, the transcript level of *HcPT1* Pi transporter in ectomycorrhizal root tips was more than 30 times higher compared to ectomycorrhizal root tips of NPK and P treatments. Nevertheless, transcripts of *HcPT1* were nearly not detectable in NPK soil. Contrarily to *HcPhoA* and *HcPT1* genes, the transcript level of *HcPT2* did not vary significantly in response to low and high soil Pi availabilities. However, the transcripts of *HcPT2* were detected under all soil P availability conditions analysed and remained very close to that of the reference gene.

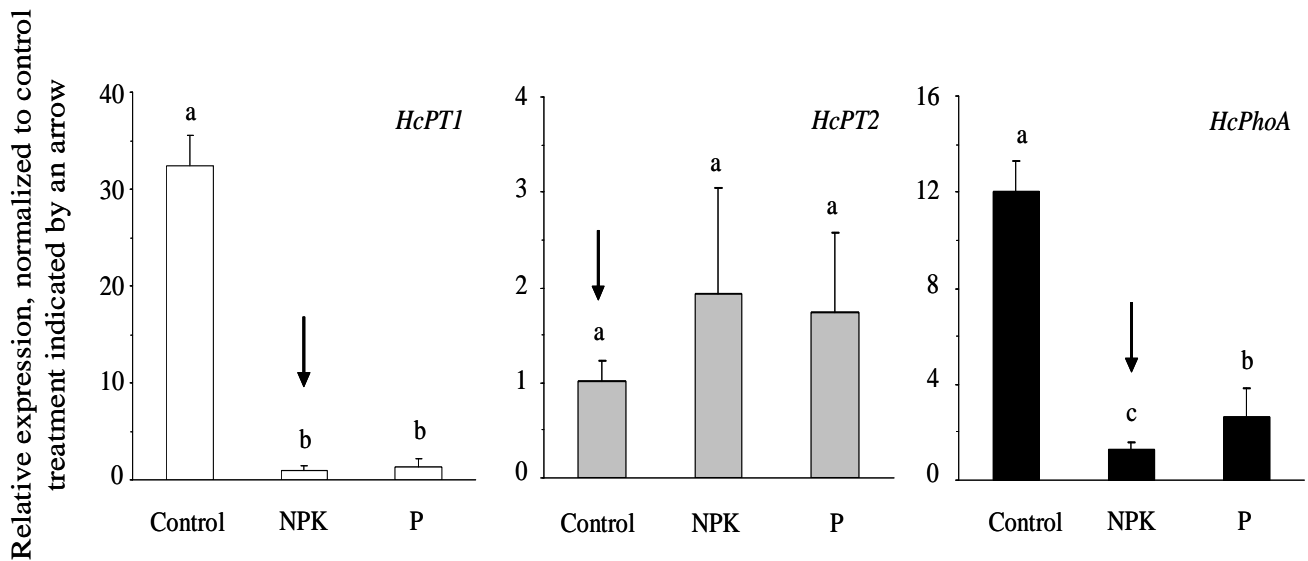


Figure 4. Expression of *HcPT1*, *HcPT2* and *HcPhoA* in ectomycorrhizal *P. pinaster* root tips with *H. cylindrosporum*. Real-time RT-PCR analysis of *HcPT1* (open bars), *HcPT2* (grey bars) and *HcPhoA* (closed bars) was performed on ectomycorrhizal root tips of *P. pinaster* plants grown for 3 months in rhizoboxes containing low (control) or high (NPK, P) Pi availabilities. The transcript level of each gene was first normalized against *HcTub*, and then expressed relative to the condition with the lowest expression (indicated by an arrow). Values are mean \pm SD of six plants and bars with different letters are significantly different at $P < 0.05$ (Fisher LSD test).

4. Discussion

The effects of mycorrhizal symbiosis on growth parameters and P nutrition of *P. pinaster* young seedlings varied as a function of the soil P availability levels. Root biomass and shoot P concentrations of plants were greatly promoted by the presence of the fungus *H. cylindrosporum* under low Pi availability conditions (Tables 2, 3). The positive effect of the ectomycorrhizal symbiosis on plant P nutrition has been reported for numerous fungal species such as *Paxillus involutus* (Perez-Moreno & Read, 2000; Jentschke *et al.*, 2001) or *H. syrjense* (Tibbett & Sanders, 2002). We observed that despite a significant increase of root biomass in presence of the fungal partner, the root length of mycorrhizal plants was quite similar to that of non mycorrhizal plants in control soil. Such event could be explained by an increase of fine root diameter as demonstrated by Rousseau *et al.* (1994) for *Pinus taeda* seedlings associated with *P. tinctorius* or *Cenococcum geophilum*. Nevertheless, in soils with high Pi availability, mycorrhizal association could have negative effects on biomass and plant P nutrition. In NPK soil, shoot biomass, root P concentrations and root length of mycorrhizal

plants were decreased compared to non mycorrhizal plants (Tables 2, 3). These negative effects could be explained by the carbon cost resulting from the maintenance of the mycorrhizal pathway (Conjeaud *et al.*, 1996). Schroeder & Janos (2004) proposed that negative effects of mycorrhizae growth will occur when the benefits of increased nutrient uptake do not exceed the carbon cost of the association.

Analysis of net P-accumulation indicated that plants associated to the fungus absorbed P with greater efficiency compared to non mycorrhizal plants under low soil Pi availability (Figure 1). This beneficial effect could be attributed to the fact that extramatricial hyphae increased the capability of the host plant to explore a larger volume of soil than roots alone and to uptake P from a greater surface area. In agreement with this proposal, we calculated that the uptake of P from mycorrhizal root systems was systematically higher than that of non mycorrhizal systems highlighting the contribution of the fungus to the host plant P nutrition (Table 3). The effectiveness of the extramatricial hyphae in scavenging the soil for mineral P has been demonstrated for several mycorrhizal species (Rousseau *et al.*, 1994; Ekblad *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1996; Tibbett & Sanders, 2002). Torres Aquino & Plassard (2004) studied the dynamics of *H. cylindrosporum* mycelial growth and P transfer to the *P. pinaster* seedlings in response to low and high soil Pi availability. These authors showed a strong correlation between the amount of P accumulated in mycorrhizal plants and the soil surface covered by the fungus. They estimated the net P transfer from the fungus to the plant at 0.36 and 0.66 μmol of P per cm^2 of mycelium in low and high soil Pi availability, respectively. Our analysis of bicarbonate Pi concentrations in bulk soils showed no significant difference between mycorrhizal and non mycorrhizal plants (Table 1) suggesting that other mechanisms would support the positive effect of mycorrhizal symbiosis on plant P nutrition observed particularly in control soil.

The enhancement of plant P nutrition, especially in control soil; could be also explained by the aptitude of fungal AcPases to increase the bioavailability of P in the vicinity of mycorrhizal roots. The analysis of NaHCO_3 extractable P fractions showed that concentrations of Pi in rhizosphere soil of mycorrhizal plants were systematically higher than that of non mycorrhizal plants (Table 1). This enhanced Pi availability in the rhizosphere of mycorrhizal plants may be due to the intensive secretion of *H. cylindrosporum* AcPases into the soil solution releasing Pi from the hydrolysis of soil Po. Indeed, our results indicated that phosphatase activities of mycorrhizal root tips were significantly higher than that of non mycorrhizal root tips whatever the level of soil Pi availability (Figure 3). In addition, the effectiveness of the different *H. cylindrosporum* AcPases secreted under Pi-starvation to

release Pi from Po extracted with NaHCO₃ from similar sandy soils have been investigated (Louche *et al.*, 2009c). We presented that up to 11% of the total NaHCO₃-extractable Po was hydrolysed by AcPases and this value can reach 45% after soil autoclaving. However, we noticed that NaHCO₃ extractable Po concentration measured in soil with non mycorrhizal plants was not significantly different from that measured in soil with mycorrhizal plants (Table 1). We propose that the Po fraction from which the fungus may improve the plant P nutrition, especially in control soil, is certainly different from that extracted by sodium bicarbonate in this soil type. Bünemann (2008) indicated that the efficiency of AcPases to hydrolyse Po fraction extracted from a same soil can vary as a function of the extraction method used.

The estimation of fungal biomass by assaying glucosamine in root system indicated that plants grown in NPK soil contained more biomass of *H. cylindrosporium* than the plants grown in P and control soils (Figure 2). This result is consistent with our personal observations showing that extramatricial hyphae and ectomycorrhizae (white colour) were more visible and numerous in soils with complete fertilisation (NPK). Likewise, this result agrees with Ali *et al.* (2009) who demonstrated high concentrations of ergosterol in sandy soil with complete fertilisation regime and with Bakker *et al.* (2009) who reported significantly more fungal hyphae in P fertilised plots than in unfertilised plots in maritime pine forest. However, total glucosamine of plants grown in control soil was not significantly different from plants grown in P soil. This is in contrast with several authors who demonstrated the negative effect of P availability on fungal biomass (Pampolina *et al.*, 2002; Aquino & Plassard, 2004). Visual observations indicated that ectomycorrhizal roots were completely ensheathed by the symbiotic fungal mycelium suggesting that most of the P taken up in ectomycorrhizal plants should be transferred to the host plant through the mycorrhizal pathway (Smith *et al.*, 2003).

Molecular studies showed that *HcPT1* expression was strongly enhanced in *P. pinaster* ectomycorrhizae growing in soil with low Pi availability (control) compared to those growing in soils with high Pi availability (NPK, P) (Figure 4). Such an enhancement of expression of a Pi transporter gene in response to low Pi availability was found in the extramatricial hyphae of the endomycorrhizal fungi *Glomus intraradices* (Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001) and *Glomus mossae* (Benedetto *et al.*, 2005). Contrarily to *HcPT1*, transcript level of *HcPT2* did not vary much under all soil Pi availabilities analysed. In addition to our results, Tatry *et al.* (2009) showed that transcript level of *HcPT1* was also increased in *H. cylindrosporium* hyphae exploring soil with low Pi availability (3 mg of Pi kg⁻¹ dwt soil) compared to those exploring

soil with high Pi availability (50 mg of Pi kg⁻¹ dwt soil). Taken as a whole, there is a strong evidence that HcPT1 could be mainly involved in the uptake of Pi from the external medium under low Pi conditions. The expression pattern obtained for *HcPT2* in ectomycorrhizal *P. pinaster* root tips indicates that HcPT2 may mediate Pi uptake from external medium when the Pi concentration is not limited, especially in NPK soil where no transcripts of *HcPT1* could be detected in ectomycorrhizal tips. However, *H. cylindrosporum* may express other Pi transporter genes as the genome of another ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor* has five predicted polypeptides putatively coding for H⁺:Pi transporters (<http://www.jgi.doe.gov/>; Martin et al., 2008) that were highly homologous to *HcPT1* (2 genes) or *HcPT2* (3 genes).

Real-time RT-PCR results showed also that expression of *HcPhoA* gene was increased in ectomycorrhizal *P. pinaster* root tips growing in control soil (Figure 4). The expression of *HcPhoA* in ectomycorrhizae, especially in control soil, supports the hypothesis that the corresponding AcPase may improve the hydrolysis of soil organic compounds and the supply of Pi to the ectomycorrhizal plant. Some studies reported the effectiveness of the vegetative mycelium of mycorrhizal fungi to assimilate Pi from the hydrolysis of Po forms (Koide & Kabir, 2000; Perez-Moreno & Read, 2000; Tibbett & Sanders, 2002). For example, Perez-Moreno & Read (2001) demonstrated that 29% N and 25% P were transferred to the whole plants of *Betula pendula* in symbiosis with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* after 115 days of growth with pollen as the sole source of P nutrients. The contribution of fungal AcPases in improved plant P nutrition was suggested by these authors but was never demonstrated by a molecular approach.

AcPase activity secreted by ectomycorrhizae from plants grown in NPK soil was significantly higher compared to ectomycorrhizae from plants grown in control and P soils. This result is in disagreement with the enhancement of *HcPhoA* expression in control soil. We propose that AcPase isoforms secreted in soil solution under low Pi concentration might be different from those secreted under high Pi concentration. In agreement with our results, several studies have reported the ability of *H. cylindrosporum* mycelium grown in liquid medium to secrete several AcPase isoforms in response to different Pi availabilities (Deransart *et al.*, 1990; Leprince & Quiquampoix, 1996; Louche *et al.*, 2009c).

5. Conclusion

To summarize, the present work gives new data on the beneficial effect of mycorrhizal association on plant P nutrition and also on the molecular mechanisms underlying this

positive effect. In soils with high Pi availability, *H. cylindrosporum* association had no evident beneficial effect on plant growth or P nutrition but the high colonisation of root system by symbiotic fungal mycelium meant that all nutrients were inevitably transferred to the host plant through the mycorrhizal pathway. In soil with low Pi availability, however, mycorrhizal plants accumulated significantly more P both in roots and shoot indicating their greater effectiveness in absorbing P in this soil. This beneficial effect may be attributed to the extramatricial hyphae increasing the soil surface explored by mycorrhizal roots and to the ability of fungal AcPases to increase the availability of P in the vicinity of the root. Molecular study showed that *HcPT1* and *HcPT2* were both expressed in *P. pinaster* ectomycorrhizae but differentially regulated as a function of soil P concentrations. The increase of *HcPT1* expression in control soil suggests its function in the uptake of Pi under low soil P availability. In addition, we demonstrated that in response to low Pi availability *H. cylindrosporum* was able to increase the transcript level of *HcPhoA*. The expression of *HcPhoA* gene and the high AcPase activity of ectomycorrhizal root tips may indicate the key role played by these enzymes in the improvement of plant P nutrition in acidic soil from the Landes forest ecosystem.

Acknowledgements

J. Louche was supported by a grant from the French Minister of Research and Technology, M. A. Ali by a grant from the Higher Education Commission of Pakistan. This work was partly supported the ANR (Agence Nationale de la Recherche) through the FUNDIV project (ANR-06-BDIV-06).

6. References

- Ali MA, Louche J, Legname E, Duchemin M & Plassard C (2009) *Pinus pinaster* seedlings and their fungal symbionts show high plasticity in phosphorus acquisition in acidic soils. *Tree Physiol* In press.
- Andersson S, Jensen P & Söderström B (1996) Effects of mycorrhizal colonisation of *Paxillus involutus* on uptake of Ca and P by *Picea abies* and *Betula pendula* grown in unlimed and limed peat. *New Phytol* **133**: 695-704.
- Antibus RK, Sinsabaugh RL & Linkins AE (1983) Phosphatase activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Can J Bot* **70**: 794-801.
- Arvieu JC, Leprince F & Plassard C (2003) Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to Pi-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Ann For Sci* **60**: 815-821.

- Bailly J, Debaud J-C, Verner M-C, Plassard C, Chalot M, Marmaise R & Fraissinet-Tachet L (2007) How does a symbiotic fungus modulate expression of its host plant nitrite reductase? *New Phytol* **175**: 155-165.
- Bakker MR, Jolicoeur E, Trichet P, Augusto L, Plassard C, Guinberteau J & Loustau D (2009) Adaptation of fine roots to annual fertilization and irrigation in a 13-year-old *Pinus pinaster* stand. *Tree Physiol* **29**: 229-238.
- Benedetto A, Magurno F, Bonfante P & Lanfranco L (2005) Expression profiles of a phosphate transporter gene (*GmosPT*) from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **15**: 620-627.
- Bünemann EK (2008) Enzyme additions as a tool to assess the potential bioavailability of organically bound nutrients. *Soil Biol Biochem* **40**: 2116-2129.
- Casarin V, Plassard C, Hinsinger H & Arvieu J-C (2004) Quantification of ectomycorrhizal fungal effects on the bioavailability and mobilization of soil P in the rhizosphere of *Pinus pinaster*. *New phytol* **163**: 177-185.
- Chen CR, Condon LM, Davis MR & Sherlock RR (2002) Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biol Biochem* **34**:487-499.
- Conjeaud C, Scheromm P & Mousain D (1996) Effects of phosphorus and ectomycorrhiza on maritime pine seedlings (*Pinus pinaster*). *New Phytol* **133**: 345-351.
- Debaud J-C & Gay G (1987) *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytol* **105**: 429-435.
- Deransart C, Chaumat E, Cleyetmarel JC, Mousain D & Labarere J (1990) Purification assay of phosphatases secreted by *Hebeloma cylindrosporum* and preparation of polyclonal antibodies. *Symbiosis* **9**: 185-194.
- Ekblad A, Wallander H, Carlsson R & Huss-Danell K (1995) Fungal biomass in roots and extramatricial mycelium in relation to macronutrients and plant biomass of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* and *Alnus incana*. *New Phytol* **131**: 443-451.
- Harrison MJ & van Buuren ML (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629.
- Harrison MJ, Dewbre GR & Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**: 2413-2429.
- Hinsinger P (1998) How do plant roots acquire mineral nutrients, Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv Agron* **64**: 225-265.
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* **237**: 173-195.
- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schroder WH & Godbold DL (2001) Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytol* **149**: 327-337.
- Kiefer E, Heller W & Ernst D (2000) A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from

- plant tissues rich in secondary metabolites. *Plant Mol Biol Rep* **18**: 33-39.
- Koide RT & Kabir Z (2000) Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytol* **148**: 511-517.
- Leprince F & Quiquampoix H (1996) Extracellular enzyme activity in soil: effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Eur J Soil Sci* **47**: 511-522.
- Louche J, Amenc L, Sauvage F-X & Plassard C (2009a) Identification of *HcPhoA*, a gene encoding an acid phosphatase released into its external medium by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. In preparation.
- Louche J, Amenc L, Le Guernevé C & Plassard C (2009b) Identification of physiological and molecular mechanisms used by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to cope with orthophosphate starvation. In preparation.
- Louche J, Ali MA, Sauvage F-X, Quiquampoix H & Claude Plassard C (2009c) Separation of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and their effectiveness in hydrolyzing organic phosphorus in a sandy soil after different fertilisation regimes. In preparation.
- Lynch JP & Brown KM (2001) Topsoil foraging: an architectural adaptation of plants to low phosphorus. *Plant Soil* **109**: 7-13.
- Maldonado-Mendoza IE, Dewbre IE & Harrison MJ (2001) A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol Plant-Microb Interact* **14**: 1140-1148.
- Marmeisse R, Guidot A, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combier JP, Melayah D, Fraissinet-Tachet L & Debaud J-C (2004) *Hebeloma cylindrosporum* - a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytol* **163**: 481-498.
- Martin F, Aerts A., Ahrén D *et al.* (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- McDonald MS (1978) A simple and improved method for the determination of microgram quantities of nitrogen in plant material. *Ann Bot* **42**: 363-366.
- Morizet J & Mingeau M (1976) Effect of Environment on water uptake, as studied on beheaded exuding tomato .1. Role of nutrients. *Ann Agron* **27**: 183-205.
- Nagy R, Karandashov V, Chague V, Kalinkevich K, Tamasloukht M, Xu G, Jakobsen I, Levy A, Amrhein N & Bucher M (2005) The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transporter in solanaceous species. *Plant J* **42**: 236-250.
- Ohno T & Zibilske LM (1991) Determination of low concentrations of phosphorus in soil extracts using Malachite Green. *Soil Sci Soc Am J* **55**: 892-895.
- Olsen SR, Cole CV, Watanbe FS & Dean LA (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. Circ. No. 939. USDA, Washington DC.

- Pampolina NM, Dell B & Malajczuk N (2002) Dynamics of ectomycorrhizal fungi in an *Eucalyptus globulus* plantation: effect of phosphorus fertilisation. *For Ecol Man* **158**: 291-304.
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C & Briggs SP (2002) Rice phosphate transporters include an evolutionary divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13324-13329.
- Perez-Moreno J & Read DJ (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytol* **145**: 301-309.
- Perez-Moreno J & Read DJ (2001) Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient cycling in boreal forests. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **268**: 1329-1335.
- Plassard C, Barry D, Eltrop L & Mousain D (1994) Nitrate uptake in maritime pine (*Pinus pinaster*) and the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*: effect of ectomycorrhizal symbiosis. *Can J Bot B* **72**: 189-197.
- Rousseau JVD, Sylvia DM & Fox AJ (1994) Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytol* **128**: 639-644.
- Schroeder MS & Janos (2004) Phosphorus and intraspecific density after plant responses to arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* **264**: 335-348.
- Smith FW (2002) The phosphate uptake mechanism. *Plant Soil* **245**: 105-114.
- Smith SE & Read DJ (2008) Mycorrhizal Symbiosis, 3rd edition. Academic Press, London, UK.
- Smith SE, Smith FA & Jakobsen I (2003) Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol* **133**: 16-20.
- Tabatabai M.A. 1982. Assay of enzymes in soil. In *Methods of Soil Analysis*, Vol. 2 (ed. A.L. Page), Am. Soci Agron and Soil Sci. Soc. Am, Madison, WI. pp. 922-947.
- Taniguchi T, Kataoka R & Futai K (2008) Plant growth and nutrition in pine (*Pinus thunbergii*) seedlings and dehydrogenase and phosphatase activity of ectomycorrhizal root tips inoculated with seven individual ectomycorrhizal fungal species at high and low nitrogen conditions. *Soil Biol Biochem* **40**: 1235-1243.
- Tatry M-V, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H & Plassard C (2009). Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J* **57**: 1092-1102.
- Tibbett M, Sanders FE & Cairney JWG (1998) The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. In axenic culture. *Mycol Res* **102**: 129-135.
- Tibbett M & Sanders FE (2002) Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Ann Bot* **89**: 783-789.
- Torres Aquino M & Plassard C (2004) Dynamics of ectomycorrhizal mycelial growth and P transfer to the host plant in response to low and high soil P availability. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 149-156.

- Vance CP, Uhde-Stone C & Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource. *New Phytol* **157**: 423-447.
- Vignon C, Plassard C, Mousain D & Salsac L (1986) Assay of fungal chitin and estimation of mycorrhizal infection. *Physiol Vég* **24**: 201-207.
- Winer J, Jung KS, Shackel I & William PI (1999) Development and validation of real-time quantitative transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem* **270**: 41-49.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

1. Conclusions générales

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont permis de répondre à notre objectif principal de thèse qui consistait en une meilleure compréhension du rôle des phosphatases acides (AcPases) sécrétées par les champignons ectomycorhiziens dans la mobilisation du P organique. Les principaux résultats sont résumés dans ce chapitre.

1.1. Caractérisation biochimique des AcPases sécrétées par *H. cylindrosporium*

Une approche biochimique nous a permis de démontrer que le champignon *H. cylindrosporium* (souche dicaryotique) avait la capacité de sécréter plusieurs formes d'AcPases dans son milieu de culture (Chapitres 2 et 3). L'utilisation d'une résine échangeuse de cations a conduit à la séparation de quatre fractions d'activité phosphatase, notées P1 à P4 en fonction de leur ordre d'élution. Les AcPases contenues dans ces fractions possédaient des caractéristiques catalytiques qui sont communes aux AcPases fongiques décrites à ce jour (Yoshida *et al.*, 1989 ; Bernard *et al.*, 2002) : (i) un pH optimal d'activité acide compris entre 5-6, (ii) une forte inhibition de l'activité phosphatase par certains composés chimiques tels que le molybdate et le vanadate, et (iii) une capacité à hydrolyser une large gamme de composés phosphorylés artificiels ou naturels (Chapitre 2). En comparaison avec l'hydrolyse du *para*-nitrophénylphosphate (*p*NPP), ces enzymes ont toutes montré une faible activité phosphodiesterase et une incapacité à hydrolyser le phytate suggérant ainsi que ces AcPases sont des phosphomonoestérases.

1.2. Efficacité des AcPases d'*H. cylindrosporium* à hydrolyser des composés de P organiques

La forte capacité de sécrétion de AcPases en réponse à la déficience en P suggérait que cette espèce fongique pouvait être un bon candidat dans la mobilisation du P organique dans les sols forestiers pauvres en P. Nous avons donc évalué l'efficacité de chaque fraction d'activité phosphatase séparée par chromatographie à hydrolyser des composés de P organique extraits de sols sableux acides prélevés dans une plantation de pin maritime dans le Sud-Ouest de la France (Station expérimentale de Pierroton). Ces sols ont été sélectionnés car ils présentaient des concentrations variables de P organique et que l'espèce fongique étudiée y était naturellement présente en association avec le pin maritime. Les résultats obtenus ont montré que les AcPases présentaient des profils d'activités très contrastés selon que la solution de sol

était extraite d'un sol frais ou d'un même sol mais autoclavé. Jusqu'à 11% du Po extrait au bicarbonate de sodium était hydrolysé par les AcPases dans les sols frais. Toutefois, dans les sols autoclavés cette valeur était significativement plus élevée pour chaque fraction d'activité phosphatase et pouvait atteindre 45% après 1 heure d'incubation (Chapitre 2). Une telle différence d'activité entre les sols frais et les sols autoclavés pouvait s'expliquer par l'effet du chauffage sur la libération de nouveaux pools de Pi plus accessibles à l'hydrolyse enzymatique. En effet des études ont montré que les bactéries et les champignons pouvaient stocker le P sous formes de polyphosphates et de phosphomonoesters (Bünemann *et al.*, 2008) libérés dans la solution du sol après autoclavage des sols (Anderson & Magdoff, 2005). De plus, nos résultats ont montré que les sols autoclavés contenaient systématiquement des concentrations en Po supérieures à celles des sols frais. Ainsi ces travaux ont suggérés que les AcPases sécrétées par *H. cylindrosporium* pouvaient jouer un rôle important dans la mobilisation du P à partir de l'hydrolyse des composés organiques synthétisés par les microorganismes.

1.3. Identification d'un gène codant une AcPase chez *H. cylindrosporium* sécrétée en réponse à la déficience en Pi dans le milieu de culture

Un alignement de plusieurs séquences en acides aminés codant pour des AcPases sécrétées par divers organismes (Bernard *et al.*, 2002) a été utilisé pour identifier des régions conservées parmi ces polypeptides. A partir de ces motifs conservés, nous avons dessiné des amorces dégénérées qui ont ensuite été utilisées pour effectuer une amplification sur la banque d'ADNc préparée à partir des thalles de *H. cylindrosporium* cultivés dans des conditions de déficience et de suffisance en P (Lambilliotte *et al.*, 2004). Cette méthode a conduit à l'identification d'une seule séquence en ADNc de 1164 pb codant pour une AcPase de 42200 kDa (Chapitre 3). La comparaison avec le programme t-blastx sur la banque de données SWISS-PROT a montré que cette séquence présentait de fortes homologues avec les AcPases fongiques, dont notamment celles sécrétées par le champignon saprophyte *Pholiota nameko* (Tasaki *et al.*, 2006).

L'utilisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre deux séquences polypeptidiques internes de HcPhoA a permis de démontrer que le gène *HcPhoA* codait bien une AcPase extracellulaire identifiée dans le milieu de culture de *H. cylindrosporium* (Chapitre 3). Cependant, seule la fraction P1 a été reconnue par l'anticorps indiquant que le génome de *H.*

cylindrosporum possède d'autres gènes codant pour les AcPases contenues dans les fractions P2, P3 et P4.

L'étude de l'expression de *HcPhoA* par RT-PCR quantitative dans des mycéliums en culture pure a démontré une forte augmentation de l'expression de *HcPhoA* en réponse à la déficience en Pi (Chapitre 4). Le niveau de transcription du gène *HcPhoA* est resté constant jusqu'au 5ème jour de culture en milieu -P et a augmenté significativement (16 fois plus élevé que dans les conditions contrôles) à partir du 8ème jour, et est resté fortement exprimé au 12ème jour de culture (Chapitre 4). Par contre, dans les mycéliums en croissance sur un milieu riche en Pi (3 mM), le niveau d'expression de *HcPhoA* n'a pas montré de variations significatives et resté constant jusqu'au 12ème jour de culture. Parallèlement à une forte augmentation du niveau d'expression de *HcPhoA* nous avons mesuré une augmentation significative de l'activité phosphatase dans le milieu de culture. Ces résultats démontrent que la régulation de la production de *HcPhoA* en réponse à des variations externes en Pi s'effectue au niveau transcriptionnel (Chapitre 4).

Nous avons également comparé l'expression de *HcPhoA* avec celle de deux transporteurs de Pi, *HcPT1* et *HcPT2*, identifiés chez *H. cylindrosporum* (Tatry *et al.*, 2009). Nos résultats ont montré une augmentation rapide de l'expression de *HcPT1* dans le mycélium dès le 2ème jour de culture en milieu -P. Le niveau d'expression de *HcPT1* a atteint son maximum au 5ème jour (30 fois plus élevé que dans les conditions contrôles) puis a chuté fortement dès le 8ème jour (Chapitre 4). L'expression retardée de *HcPhoA* par rapport à celle de *HcPT1* suggère que la sécrétion de *HcPhoA* n'est pas le premier mécanisme induit chez *H. cylindrosporum* en réponse à la déficience en Pi en culture pure. Tout comme *HcPhoA*, le niveau d'expression de *HcPT2* était significativement induit à partir du 8ème jour de culture en condition -P.

1.4. Effet de la mycorhization sur le prélèvement de P par *Pinus pinaster* en croissance sur des sols Landais

L'effet de *H. cylindrosporum* sur la nutrition P de *P. pinaster* a également été évalué en fonction de la disponibilité en P dans différents sols sableux acides présentant des concentrations contrastées en P organique. Ces sols étaient de même type que ceux utilisés dans le Chapitre 2 pour l'étude de l'efficacité des différentes fractions d'activité phosphatase à mobiliser du P organique. Ces sols ont été autoclavés afin d'étudier spécifiquement l'effet d'*H. cylindrosporum* sur le prélèvement de P de la plante hôte.

Dans un sol déficient en P (control ; $P_i < 10 \text{ mg.kg}^{-1}$ de sol sec), les plantes mycorhizées ont prélevé significativement plus de P que les plantes non mycorhizées (Chapitre 5). En effet, après 3 mois de culture en rhizotron, l'accumulation nette de P (mg plante^{-1}) dans la partie racinaire et la partie aérienne des jeunes pins était augmentée respectivement de 97% et 40% dans les plantes mycorhizées comparé aux plantes non mycorhizées. L'effet bénéfique de la symbiose ectomycorhizienne sur le statut P de la plante dans le sol control s'explique par une meilleure efficacité du champignon à prélever et mobiliser le P dans ce type de sol. Les résultats suggèrent que les AcPases sécrétées par le champignon dans la solution de sol pourraient jouer un rôle important dans cet effet bénéfique pour trois raisons. Premièrement, les activités phosphatase des racines mycorhizées étaient systématiquement plus élevées que celles des racines non mycorhizées. Deuxièmement, nous avons démontré l'efficacité des AcPases sécrétées par *H. cylindrosporum* à mobiliser du P_i à partir des composés de P organique extraits de sols similaires autoclavés (Chapitre 2). Troisièmement, la concentration en P_i mesurée dans les sols rhizosphériques chez les plantes mycorhizées était systématiquement plus élevée que celle des plantes non mycorhizées quelque soit le type de sol, indiquant la mobilisation supplémentaire d'un pool de P_i .

Une analyse par RT-PCR quantitative réalisée sur des ectomycorhizes a montré une augmentation significative de l'expression de *HcPhoA* dans le sol control comparé aux sols fertilisés (NPK : $P_i > 55 \text{ mg kg}^{-1}$; P : $P_i > 35 \text{ mg kg}^{-1}$) (Chapitre 5). Le profil d'expression ainsi obtenu pour *HcPhoA* dans des ectomycorhizes suggère que cette AcPase pourrait jouer un rôle important dans l'amélioration de la nutrition P de la plante hôte en augmentant la disponibilité du P au voisinage de la racine.

2. Perspectives

2.1. Analyses biochimiques complémentaires pour HcPhoA

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont conduit à l'identification d'un gène codant une AcPase extracellulaire chez le champignon ectomycorhizien *H. cylindrosporum*. Une analyse en Dot Blot a permis d'identifier cette AcPase dans le milieu de culture. Toutefois cette analyse ne permet pas de répondre à des questions importantes comme l'estimation du poids moléculaire de la forme excrétée de HcPhoA ou le nombre d'isoformes de AcPases codé par le gène *HcPhoA*. La littérature montre que les AcPases sécrétées dans l'environnement extérieur sont dans la majorité des cas sous forme glycosylées (Yazaki *et al.*, 1997 ; Bernard *et al.*, 2002). L'identification de 8 sites potentiels de N-glycosylation sur la séquence

polypeptidique prédite de HcPhoA suggère fortement que cette enzyme pourrait être sécrétée sous une forme glycosylée. Afin de valider cette hypothèse nous proposons d'effectuer une analyse en Western blot avec l'anticorps anti-HcPhoA sur la fraction P1 incubée ou non avec une enzyme de déglycosylation. Cette expérimentation permettrait tout d'abord (i) d'estimer le poids moléculaire apparent de HcPhoA, (ii) de vérifier si HcPhoA est sécrétée sous une forme glycosylée, et (iii) d'évaluer le nombre d'isoformes codés par le gène correspondant.

2.2. Identification des gènes codant pour d'autres AcPases chez le champignon ectomycorhizien *H. cylindrosporum*

L'utilisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre deux séquences polypeptidiques de HcPhoA a permis de démontrer que le génome d'*H. cylindrosporum* possède d'autres gènes codant les AcPases contenues dans les fractions P2, P3 et P4. Plusieurs résultats tendent à démontrer l'importance de ces enzymes dans la mobilisation du Pi dans les sols. Premièrement, chacune des fractions a montré une forte efficacité à libérer du Pi à partir de composés organiques extrait de sols autoclavés (Chapitre 2). Deuxièmement, la comparaison des profils chromatographiques obtenus pour des mycéliums cultivés en conditions de déficience et de suffisance en P a indiqué une augmentation significative de leur activité en réponse à la déficience en P (Chapitre 3). Troisièmement, la comparaison entre le profil d'expression du gène *HcPhoA* et les activités phosphatases des ectomycorhizes indique que la sécrétion des AcPases des fractions P2, P3 ou P4 interviendrait dans les sols avec de fortes disponibilité en Pi (Chapitre 5). L'identification des gènes codant ces enzymes apparaît donc nécessaire pour évaluer la contribution des AcPases sécrétées par *H. cylindrosporum* dans la mobilisation du Pi, notamment dans l'écosystème du massif forestier Landais.

Nous proposons d'identifier ces gènes par une approche biochimique à partir de la purification des protéines. Les conditions chromatographiques présentées dans ce manuscrit ont permis la séparation de plusieurs fractions d'activité phosphatase dont trois (P2, P3 et P4) contenaient des concentrations en protéines difficilement mesurables par absorbance à 280 nm. Notre hypothèse est que P2, P3 et P4 sont probablement pures alors que P1 ne l'est pas car elle est éluée avec plus de 90% des protéines sécrétées par le champignon. La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec la combinaison de plusieurs colonnes (colonnes d'affinité, d'exclusion de taille...) devrait permettre une meilleure purification de P1. La mesure des activités phosphatases avec le *pNPP* (Chapitre 2, 3) permettra l'identification des fractions chromatographiques présentant des AcPases. Les

protéines contenues dans l'ensemble de ces fractions seront alors séparées en fonction de leur point isoélectrique et de leur poids moléculaire par électrophorèse bidimensionnelle. Les spots protéiques révélés sur gel seront ensuite prélevés pour obtenir une séquence protéique qui sera comparée avec la base de données SWISS-PROT. Selon l'état d'avancement du séquençage du génome de *H. cylindrosporium* (F. Martin, comm. Pers.), nous rechercherons les gènes contenant ces polypeptides. Alternativement, nous isolerons les gènes complets à partir de la banque d'ADNc en utilisant la même démarche que celle décrite au chapitre 3.

2.3. Identification et caractérisation des pools de P organiques libérés par autoclavage des sols

Dans le chapitre 2, nous avons pu démontrer que l'efficacité de chaque fraction à libérer du Pi à partir de l'hydrolyse de composés organiques dans une solution de sol était fortement augmentée après autoclavage des sols. Nous émettons l'hypothèse que cette augmentation de la vitesse d'hydrolyse dans les sols autoclavés est due à la libération par autoclavage de nouveaux pools de Po d'origine microbienne, qui sont de meilleurs substrats pour les AcPases de *H. cylindrosporium*. En conditions naturelles, le Pi absorbé par les microorganismes du sol peut être transformé en des formes plus ou moins complexes de Po qui seraient plus accessibles aux AcPases fongiques. Ces pools de Po peuvent être libérés dans la solution du sol après Cette hypothèse redéfinit le rôle des AcPases des champignons ectomycorhiziens dans le recyclage du P dans les sols forestiers (Figure 1). Une première confirmation de cette hypothèse pourrait être obtenue par l'identification par RMN du ^{31}P *in vitro* du pool de Po extrait des sols frais ou autoclavés.

2.4. Quantification de la contribution des phosphatases fongiques dans l'amélioration de la nutrition P des plantes

Dans le chapitre 5, nous avons montré que la présence de *H. cylindrosporium* augmentait significativement le prélèvement net de P pour la plante hôte. Pour tester la double hypothèse du rôle des phosphatases sur la mobilisation du P organique et la meilleure accessibilité du pool de Po microbien, on peut imaginer un système de culture dans lequel la source de Po ne serait accessible qu'aux hyphes du partenaire fongique. Pour cela, la source de Po pourrait être contenue dans un sac de nylon dont le diamètre des pores (30 μm) ne laisserait passer que les hyphes du champignon. La source de Po pourrait être variable (par exemple sol autoclavé ou sol frais) et les plantes, mycorhizées ou non, pourraient être cultivées dans ce dispositif. La comparaison des quantités de P accumulées en présence ou en absence de mycorhization

permettrait alors de quantifier plus précisément la contribution des phosphatases du partenaire fongique à la minéralisation du Po et au transfert de Pi à la plante hôte.

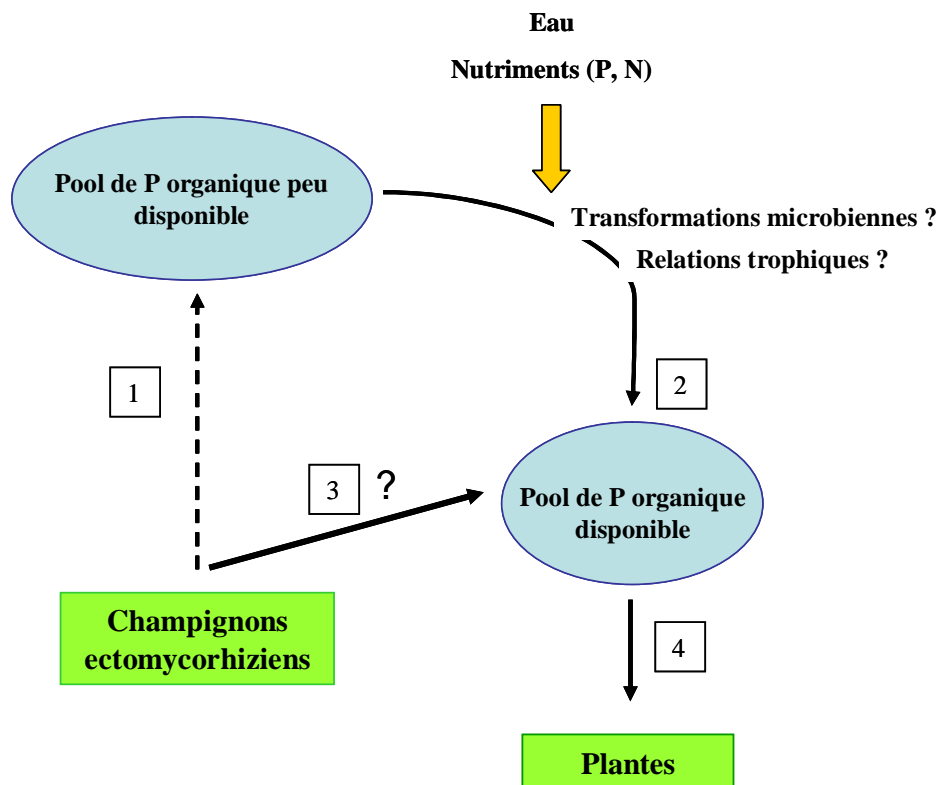


Figure 1: Représentation schématique d'un rôle hypothétique joué par les AcPases des champignons ectomycorhiziens sur la minéralisation du pool de P organique des podzols acides. (1) les AcPases des champignons ectomycorhiziens ont une faible efficacité pour libérer du Pi du pool de P organique (Po) extrait des sols, rendant ainsi ce pool « peu disponible » pour les champignons ectomycorhiziens. (2) Le pool de Po contenu dans les populations microbiennes pourrait devenir un pool de Po « disponible » pour les champignons ectomycorhiziens après leur libération en particulier par les relations trophiques. La taille du pool de Po microbiens peut dépendre de la disponibilité en P, N et eau du milieu. (3) Les phosphatases acides des champignons ectomycorhiziens pourraient alors libérer plus de Pi à partir de ce nouveau pool de Po, et ce au profit de la plante (4).

Références

- Ali MA (2009) Rôle des phosphatases sécrétées par les champignons ectomycorhiziens associés au pin maritime (*Pinus pinaster*) dans la mobilisation du phosphore des podzols de l'écosystème Landais. Thèse Doctorat Ecole Nationale Supérieure Agronomique Montpellier, 176 p
- Anderson BH & Magdoff FR (2005) Autoclaving soil samples affects algal-available phosphorus. *J Environ Qual* **34**: 1958-1963.

- Bernard M, Mouyna I, Dubreucq G, Debeauvais JP, Fontaine T, Vorgias C, Fuglsang C & Latgé JP (2002) Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **148**: 2819-2829.
- Bünemann EK, Smernik RJ, Doolette AL, Marschner P, Stonor R, Wakelin SA & McNeill AM (2008b) Forms of phosphorus in bacteria and fungi isolated from two Australian soils. *Soil Biol Biochem* **40**: 1908-1915.
- Lambilliotte R, Cooke R, Samson D *et al.* (2004) Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol* **164**: 505-513.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D *et al.* (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- Tasaki Y, Azwan A, Yasaki Y, Hara T & Joh T (2006) Structure and expression of two genes encoding secreted acid phosphatases under phosphate-deficient conditions in *Pholiota nameko* strain N2. *Curr Genet* **49**: 323-332.
- Tatry M-V, El Kassis E, Lambilliotte R, Corratgé C, van Aarle I, Amenc LK, Alary R, Zimmermann S, Sentenac H & Plassard C (2009). Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *Plant J* **57**: 1092-1102.
- Yazaki J, Joh T, Tomida SI & Hayakawa T (1997) Acid phosphatase isozymes secreted under phosphate deficient conditions in *Pholiota nameko*. *Mycoscience* **38**: 347-350.
- Yoshida H, Oikawa S, Ikeda M & Reese ET (1989) A novel acid phosphatase excreted by *Penicillium funiculosum* that hydrolyzes both phosphodiester and phosphomonoesters with aryl leaving groups. *J. Biochem.* **105**: 794-798.

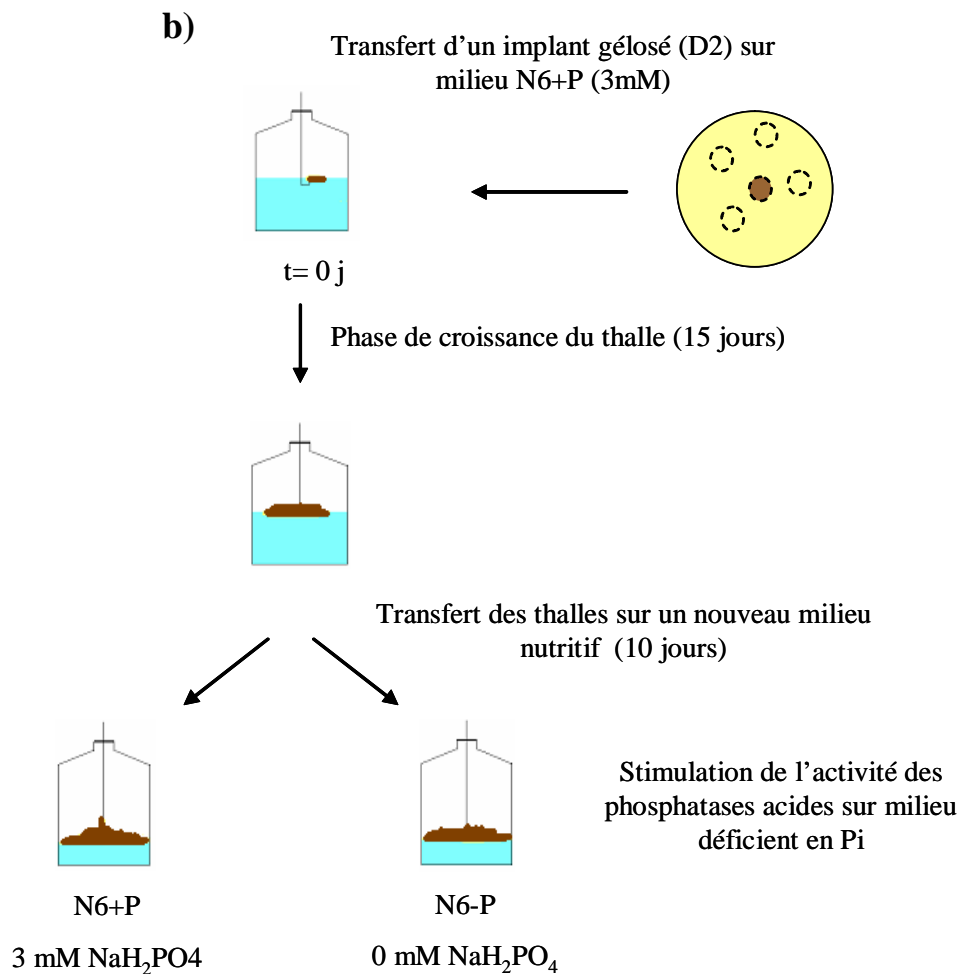
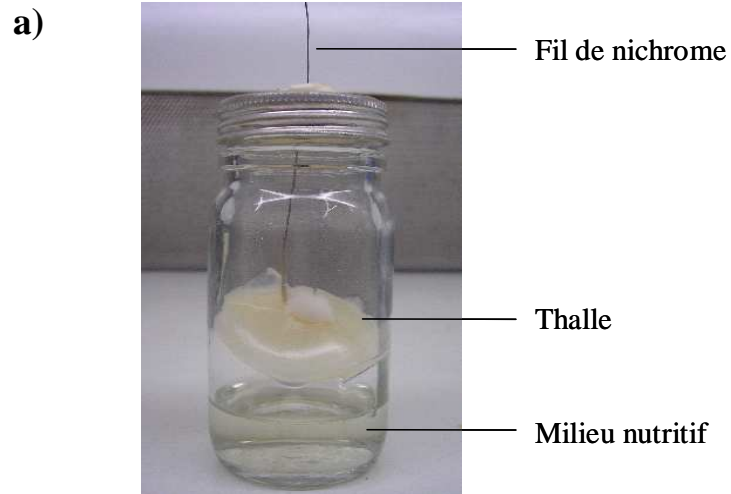
ANNEXES

Annexe 1 : Composition du milieu nutritif N6 pour la culture des mycéliums

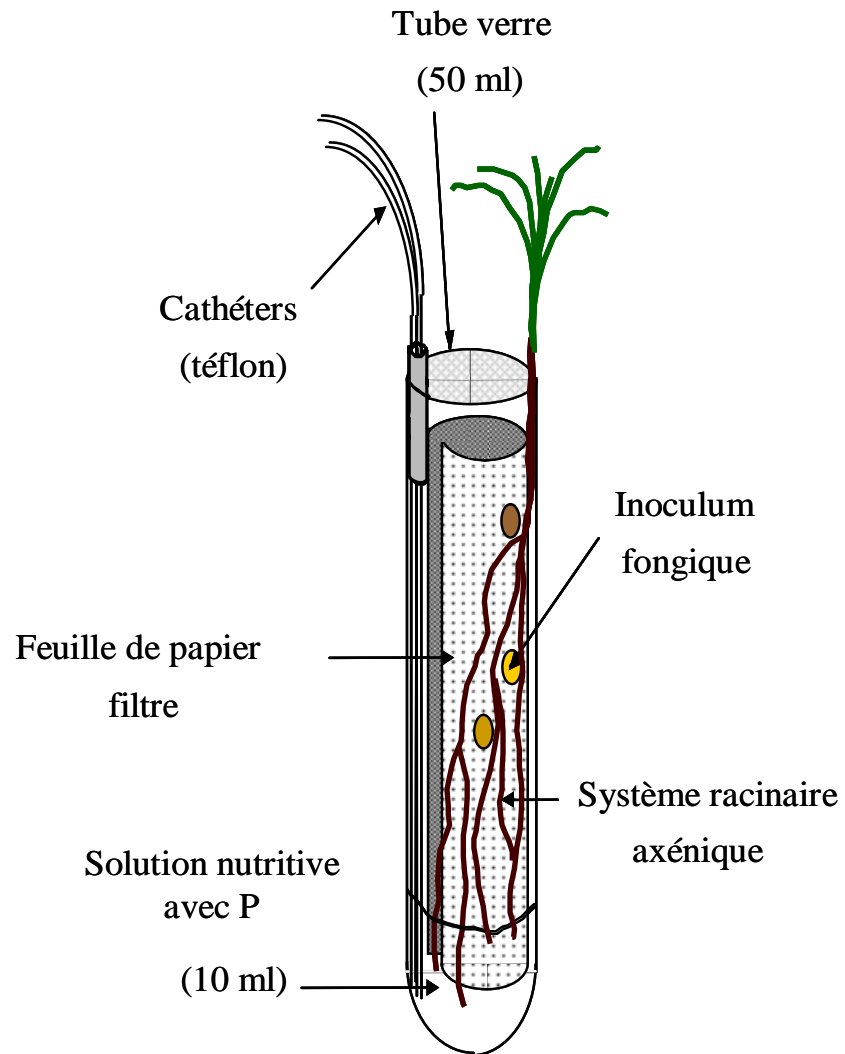
Eléments	Concentration finale (mM)	Volume de solution mère (ml) pour :			
		1L	2L	3L	4L
KNO₃ (1M)	6	6	12	18	24
NaH₂PO₄ (1M)	3	3	6	9	12
MgSO₄ (1M)	1	1	2	3	4
CaCl₂ (0,5M)	0,5	1	2	3	4
KCl (1M)	4	4	8	12	16
Citrate ferrique 1%	1 ml/l	1	2	3	4
Thiamine HCl (100µg/l)	1 ml/l	1	2	3	4
Oligo-éléments	0,2 ml/l	0.2	0.4	0.6	0.8
Glucose	5 g/l	5g	10g	15g	20g

Le pH de la solution est ajusté à 5,5

Annexe 2 : (a) Dispositif de mise en culture du mycelium en culture liquide. (b) Représentation schématique des différentes étapes de culture du thalle d'*Hebeloma cylindrosporum*.



Annexe 3 : (a) Dispositif de mise en culture en tube.



Annexe 4 : Dispositif de mise en culture sur couche mince de sol en rhizotron

